

Izražaj koštanih morfogenetskih proteina u normalnim i karcinomskim stanicama bubrega

Markić, Dean

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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:188:121115>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dean Markić

IZRAŽAJ KOŠTANIH MORFOGENETSKIH PROTEINA U
NORMALNIM I KARCINOMSKIM STANICAMA BUBREGA

Doktorski rad

Rijeka, 2010.

Mentori rada: prof.dr.sc. Dragica Bobinac, dr.med. i prof.dr.sc. Željko Fučkar, dr.med.

Doktorski rad obranjen je dana 24. rujna 2010. na Medicinskom fakultetu u Rijeci,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr. Elvira Mustać, dr.med.

2. doc.dr.sc. Nikolina Bašić Jukić, dr.med

3. prof.dr.sc. Ivana Marić, dr.med.

4. prof.dr.sc. Dragica Bobinac, dr.med.

5. prof.dr.sc. Željko Fučkar, dr.med.

Rad ima 135 listova.

UDK:616.61:616.006:616-092.4/.9(043.3)

PREDGOVOR

Ovaj doktorski rad izrađen je u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske (broj projekta: 062-0620226-0207).

Zahvalio bih se mentorima prof.dr.sc. Dragici Bobinac, dr.med. i prof.dr.sc. Željku Fučkaru, dr.med. na ustrajnoj pomoći te strpljenju u izradi doktorskog rada. Također bih se zahvalio Tanji Ćelić, dr.med. na pomoći u obradi uzoraka i rezultata te doc.dr.sc. Gordani Đorđević, dr.med. na pomoći u adekvatnoj histološkoj interpretaciji uzoraka.

Hvala i svim djelatnicima Klinike za urologiju, KBC Rijeka i Zavoda za anatomiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci bez čije pomoći ovaj rad ne bi bilo moguće izraditi.

Zahvaljujem prof. Ivi Piglič na lektoriranju doktorskog rada.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA. Cilj doktorskog rada bio je prikazati izražaj koštanih morfogenetskih proteina (BMP), njihovih receptora (BMPR) i proteina njihovog signalnog puta (pSmad1/5/8) u zdravom tkivu bubrega, tkivu karcinoma bubrega (RCC) te tkivu na granici između karcinoma i normalnog bubrega. Nadalje, željeli smo prikazati promjenu u njihovoj ekspresiji između zdravog tkiva i RCC u usporedbi s kliničkim i patološkim značajkama ispitanika.

ISPITANICI I METODE. Istraživanje je bilo prospektivno, a istražili smo tkivo bubrega u 64 ispitanika u kojih je, na Klinici za urologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka, učinjena nefrektomija zbog nemetastatskog karcinoma bubrega. Analizirali smo zdravo tkivo bubrega, tkivo karcinoma bubrega te granično tkivo, a analiza tkiva je provedena na Zavodu za anatomiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci. Zabilježili smo ekspresiju proteina BMP-6, BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8 (imunohistokemija i Western Blot: WB) odnosno njihove mRNA: mRNA BMP-2, mRNA BMP-4, mRNA BMP-6, mRNA BMP-7, mRNA BMPR-IA, mRNA BMPR-IB, BMP-RII (lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije: RT-PCR). Razliku u ekspresiji BMP između različitih tkiva utvrdili smo korištenjem Student t testa (WB) i Mann-Whitney testa (RT-PCR).

REZULTATI. U normalnom bubregu proteini BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8 dominantno su bili prisutni u proksimalnim tubulima. U tkivu RCC pronašli smo ekspresiju proteina BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II te pSmad 1/5/8. Ekspresiju BMP-6 u normalnom tkivu i u RCC nismo dokazali imunohistokemijskom metodom. Granično tkivo je pokazivalo obrazac ekspresije normalnog tkiva bubrega odnosno karcinoma bubrega u ovisnosti o kojem dijelu graničnog tkiva se radilo. Western blot metodom dokazali smo ekspresiju proteina BMP-6 i BMP-7, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8 u tkivu zdravog bubrega i u RCC. Ekspresija BMPR-IB i pSmad1/5/8 je bila povećana, a ekspresija BMPR-II, BMP-6 i BMP-7 je bila snižena u bolesnika s RCC. BMPR-IA se, ovom metodom, nije prikazao. mRNA svih BMP i njihovih receptora je pronađena u oba tkiva i bila je viša u RCC. Naj snažniji izražaj pokazao je mRNA BMP-2. Pronašli smo snažniju ekspresiju mRNA BMP-

2 u bolesnika s višim tumorskim stadijem i višu ekspresiju mRNA BMP-6 u bolesnika starijih od 60 godina. Također je izražaj mRNA BMP-7 veći u žena. U uznapredovalom tumorskom stadiju (T3 i T4) bolesnika s RCC došlo je do gubitka ekspresije mRNA BMP-6, BMP-7 i BMP-IB.

ZAKLJUČAK. BMP i njihovi receptori su prisutni u zdravom tkivu bubrega te u tkivu karcinoma bubrega. BMP proteini, u ovoj studiji, su podjednako izražaja u normalnom tkivu i karcinomu bubrega ali je ekspresija njihove mRNA znatno veća u RCC. Spoznaja kako je mRNA BMP-2 snažno eksprimiran u RCC te kako njegova ekspresija ovisi o tumorskom stadiju govori u prilog njegove važnosti u tumorigenezi karcinoma bubrega koju bi trebalo daljnjim istraživanjima ispitati.

KLJUČNE RIJEČI: Koštani morfogenetski proteini; Koštani morfogenetski proteini – receptori; Lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije; Western blot; Imunohistokemija; Karcinom, bubrežnih stanica.

SUMMARY

OBJECTIVES. Aim of our study was to present expression of different bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors (BMPRs) and protein of their signaling pathway (pSmad1/5/8) in healthy kidney tissue, renal cell carcinoma (RCC) and borderline tissue. Also, we compared changes in expression between healthy kidney tissue and RCC and correlate their expression with clinicopathological parameters.

PATIENTS AND METHODS. We prospectively examined kidney tissue samples of 64 patients who underwent nephrectomy for localized kidney cancer. All patients were operated in Department of Urology, University Hospital Rijeka. Analysis was performed on healthy kidney tissue, RCC and borderline tissue on Institute of Anatomy, School of Medicine Rijeka. Protein expression of BMP-6, BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II and pSmad 1/5/8 was determined with immunohistochemistry and Western blot (WB) and expression of mRNA BMP-2, mRNA BMP-4, mRNA BMP-6, mRNA BMP-7, mRNA BMPR-IA, mRNA BMPR-IB, BMPR-II with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Difference in expression between tissue was estimated by Student t test (WB) and Mann-Whitney test (RT-PCR).

RESULTS. In healthy kidney proteins BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II and pSmad1/5/8 were dominantly expressed in proximal tubule. In RCC expression of proteins BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II and pSmad 1/5/8 was found. Expression of BMP-6 was not noticed in any tissue with immunohistochemistry. Borderline tissue showed expression like RCC or healthy tissue in dependence which part of borderline tissue was examined. Proteins BMP-6, BMP-7, BMPR-IB, BMPR-II and pSmad1/5/8 were detected with WB in RCC and normal kidney. Expression of BMPR-IB and pSmad1/5/8 was increased and expression of BMPR-II, BMP-6 and BMP-7 was decreased in RCC. BMPR-IA was not detected with WB. mRNA of all BMPs and BMPRs was detected in both tissue with higher expression in RCC, specially for BMP-2. Expression of mRNA BMP-2 was increased in patients with higher tumor stage, mRNA BMP-6 was increased in elderly (> 60 years) and

mRNA BMP-7 in female. We also found loss of mRNA BMP-6, BMP-7 i BMPR-IB expression in tumor stage T3 and T4.

CONCLUSION. BMPs and their receptors was expressed in healthy kidney tissue and RCC. BMP proteins, in our study, have similar level of expression in both tissue but expression of their mRNA was higher in RCC. High level of mRNA BMP-2 expression in RCC and their increased expression with higher tumor stage are arguments in favour of their role in RCC. Futher investigation is needed to elucidate role of BMP-2 in RCC.

KEY WORDS: Bone morphogenetic proteins; Bone morphogenetic protein receptors; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Western blot; Immunohistochemistry; Carcinoma, renal cell.

SADRŽAJ

1.UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1.Normalni bubreg.....	1
1.1.1.Anatomija.....	1
1.1.2.Embriologija i histologija.....	2
1.1.3. Osnove fiziologije bubrega.....	6
1.2.Karcinom bubrega.....	8
1.2.1.Incidencija karcinoma bubrega.....	8
1.2.2.Epidemiološki čimbenici.....	9
1.2.3.Klasifikacija tumora bubrega.....	10
1.2.4.Patogeneza karcinoma bubrega.....	17
1.2.5.Klinička slika.....	21
1.2.6.Slikovne metode u dijagnosticiranju karcinoma bubrega.....	21
1.2.7.Prognostički čimbenici.....	23
1.2.8.Liječenje.....	26
1.2.8.1.Operacijsko liječenje.....	26
1.2.8.2.Liječenje zračenjem.....	29
1.2.8.3.Medikamentozna terapija metastatskog karcinoma bubrega	30
1.3.Koštani morfofenetski proteini.....	33
1.3.1.Uvod.....	33
1.3.2.Struktura koštanih morfofenetskih proteina.....	35
1.3.3.Receptori koštanih morfofenetskih proteina.....	38
1.3.4.Signalni put.....	39
1.3.5.Koštani morfofenetski proteini i razvoj bubrega.....	43
1.3.6.Koštani morfofenetski proteini u adultnom bubregu.....	44

1.3.7. Koštani morfogenetski proteini u tumorskim bolestima.....	51
1.3.8. Koštani morfogenetski proteini i karcinom bubrega.....	54
1.3.9. Klinička primjena koštanih morfogenetskih proteina.....	56
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	57
3. ISPITANICI I METODE.....	59
3.1. Ispitanici.....	59
3.2. Metode.....	59
3.2.1. Imunohistokemija.....	61
3.2.2. Western blot.....	62
3.2.3. Lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije (RT-PCR).....	63
3.3. Etički aspekti istraživanja.....	65
3.4. Statistička obrada podataka.....	65
4. REZULTATI.....	67
4.1. Imunohistokemija.....	67
4.2. Western blot.....	69
4.3. Lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije (RT-PCR).....	71
5. RASPRAVA.....	81
6. ZAKLJUČCI.....	98
7. LITERATURA.....	100

8.ŽIVOTOPIS.....	120
------------------	-----

1.UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1.NORMALNI BUBREG

1.1.1.Anatomija

Bubreg je parni retroperitonealni organ smješten približno simetrično s obje strane kralješnice. Ima oblik graha, prosječne dimenzije su mu 12x6x3 cm i prosječne je težine 160 grama. Boja mu je crvenkastosmeđa. Na samom bubregu razlikujemo prednju površinu (*facies anterior*) i stražnju površinu (*facies posterior*). Također ima dva zaobljena kraja: gornji (*extremitas superior*) i donji (*extremitas inferior*) te dva ruba: *margo lateralis* koji je konveksan i *margo medialis* koji u sredini ima duboki urez. U tom urezu se nalazi bubrežni hilus koji predstavlja ulaz u bubrežni sinus. Kroz hilus i sinus bubrega ulaze odnosno iz njega izlaze krvne žile, limfne žile i živci te kanalni sustav bubrega (1,2).

Na površini bubrega nalazi se čvrsta vezivna čahura, *capsula fibrosa*. Bubrežni parenhim sastoji se od kore i srži. Srž (*medulla renalis*) se sastoji od 10-20 jedinica koje se zbog oblika zovu piramide. One su bazom okrenute prema vanjskoj površini bubrega, a vrhovi strše u sinus bubrega i zovemo ih bubrežnim papilama. Kora (*cortex renalis*) leži periferno od piramida, ali se nastavlja i između samih piramida stvarajući renalne kolumne. U mirovanju protok krvi kroz oba bubrega iznosi 25% srčanog minutnog volumena (1,25 l/min) iako bubrezi čine manje od 0,5% ukupne tjelesne mase. Bubreg krvlju opskrbljuje renalna arterija (parna visceralna grana abdominalne aorte) koja se neposredno pred bubregom dijeli u prednju i stražnju granu. Iz njih nastaju segmentalni ogranci iz kojih nastaju interlobarne arterije pa arkuatne arterije koje se pružaju po bazi piramida. Od njih prema kori odlaze interlobularne arterije koje davaju aferentne arteriole iz kojih nastaju glomeruli. Istoimene vene dreniraju krv putem renalne vene u donju šuplju venu. Oko vrhova piramida nalaze se male bubrežne čašice (*calices renales minores*) u koje bubreg izlučuje urin. Zatim se te čašice spajaju u šire bubrežne čašice (*calices renales majores*), a ove ulaze u bubrežnu zdjelicu, nakapnicu ili pijelon. Od njega se dalje nastavlja ureter. Oko bubrega i nadbubrežne

žlijezde nalazi se masno tkivo (*capsula adiposa*) koja obavija oba organa. Na prednjoj i stražnjoj strani masno tkivo je prekriveno vezivnom opnom (*fascia renalis*) (1).

Uzdužne osi oba bubrega konvergiraju prema kranijalno, a poprečne se sijeku sprijeda pod pravim kutem. Bubrezi ne stoje vertikalno, već su im donji krajevi razmaknuti više od gornjih, a prednja površina bubrega ne gleda samo sprijeda nego i lateralno (1,2).

Sintopski odnosi prema dorzalno su jednaki kod oba bubrega. Iza gornjeg dijela bubrega se nalazi ošit, a iza donjeg dijela m. psoas major, m. quadratus lumborum te m. transversus abdominis. Na gornjem kraju bubrega i susjednom dijelu medijalnog ruba bubrega nalazi se nadbubrežna žlijezda. S prednje strane su sintopski odnosi različiti na lijevoj i desnoj strani. Desni bubreg je svojom prednjom površinom u odnosu s duodenumom, jetrom i debelim crijevom. Lijevi bubreg je pak prednjom površinom u kontaktu s želucem, gušteračom, slezenom i debelim crijevom (1).

1.1.2. Embriologija i histologija

Urogenitalni sustav, pa prema tome i bubrezi, se razvija od zajedničkog parnog mezodermalnog tračka (intermedijarni mezoderm) koji je smješten duž stražnje stijenke trbušne šupljine. Početkom četvrtog tjedna intermedijarni mezoderm se u području vrata odvoji od somita i oblikuje segmentalno poredane nakupine stanica koje se zovu nefrotomi. Od njih nastaju samo rudimentarni sekretni kanalići koji nemaju sposobnost izlučivanja, a zovu se predbubreg ili *pronephros*. Potkraj četvrtog tjedna pronephros iščezne. Od intermedijarnog mezoderma od gornjih prsnih do gornjih slabinskih segmenata formira se prabubreg ili *mesonephros* kao i njegovi odvodni kanali. Pojavljuju se sekretni kanalići koji se produžuju i oblikuju petlju u koju urasta klupko krvnih kapilara (glomerul), nastaje bubrežno tjelešće, a sekretni kanalići se ulijevaju u odvodni kanal koji se naziva kanal mezonefrosa ili Wolffov kanal koji se ulijeva u kloaku. Mesonephros se počinje razvijati u četvrtom tjednu da bi u drugom mjesecu dostigao svoj maksimum (tada kratkotrajno izlučuje i mokraću). Međutim tada započinje i njegovo propadanje te u muškog spola nekoliko donjih kanalića sudjeluje u nastajanju spolnih organa, a u ženskog spola u potpunosti nestaje. Definitivni

bubreg ili *metanephros* pojavljuje se u petom tjednu. Njegovi se sekretni kanalići razvijaju od metanefrogenog mezoderma na isti način kao u mezonefrosu. Razvoj sustava odvodnih kanala je potpuno drukčiji nego u privremenim bubrezima. Odvodni kanali definitivnog bubrega razvijaju se od mokraćovodnog pupoljka koji izrasta iz donjeg dijela Wolffova kanala. Mokraćovodni pupoljak prodire u metanefrogeno tkivo te između njih nastaje recipročna induktivna interakcija kojom naposljetku od mokraćovodnog pupoljka nastaje sustav odvodnih kanala (sabrne cjevčice, sabirne cijevi, male bubrežne čašice, velike bubrežne čašice, pijelon, mokraćovod), a od metanefrogenog mezoderma nefron. Čimbenici rasta i geni koji sudjeluju u recipročnoj mezenhimo-epitelnoj indukciji su s strane metanefrogenog tkiva WT1, GDNF i BMP-4, a s strane epitelnih stanica mokraćovodnog pupoljka FGF-2, Wnt-4, Wnt-11, BMP-7 i LIF. (3,4)

Nefron je funkcionalna jedinica bubrega. Svaki se bubreg sastoji od 1 do 4 milijuna nefrona (prosječno 1,2 milijuna). Nefron se sastoji od bubrežnog tjelešca, proksimalnog zavijenog kanalića, tankog i debelog kraka Henleove petlje te distalnog zavijenog kanalića. Na distalni zavijeni kanalić se nastavlja sabirna cjevčica i sabirna cijev koji mokraću nastalu u nefronima odvede u kanalni sustav bubrega. Približno 1/7 svih nefrona smještena je blizu kortikomedularne granice pa se zato i zovu jukstamedularni nefroni. Ostali se nazivaju kortikalni nefroni. Jukstamedularni nefroni imaju duge Henleove petlje koje se protežu duboko u srž, a važni su za stvaranje gradijenta hipertoničnosti u intersticiju srži (osnova za stvaranje hipertonične mokraće). Svaki odsječak nefrona izgrađuju stanice jedinstveno prilagođene specifičnim prijenosnim funkcijama (5).

Bubrežno tjelešce sastoji se od glomerula (klupko krvnih kapilara) koji je okružen Bowmanovom čahurom (epitelna čahura dvostruke stijenke). Bowmanova čahura se sastoji od visceralnog lista (obavija kapilare glomerula) i parijetalnog lista koji stvara vanjsku granicu bubrežnog tjelešca. Između prije spomenuta dva lista nalazi se interkapsularni prostor u koji se kroz stijenku kapilara i visceralni list filtrira tekućina (glomerularni filtrat). Svako bubrežno tjelešce ima žilni pol (ulazi aferentna arteriola a izlazi eferentna arteriola) i mokraćni pol od

kojega polazi proksimalni zavijeni kanalić (proksimalni tubul). Parijetalni list Bowmanove čahure sastoji se od jednoslojnog pločastog epitela s bazalnom membranom i tankim slojem vezivnog tkiva ispod toga. Na mokraćnom polu epitel se mijenja u jednoslojni cilindrični koji je karakterističan za proksimalni zavijeni kanalić. Unutarnji list čine podociti koji leže na svojoj bazalnoj membrani. Podociti imaju brojne izdanke koji obuhvaćaju kapilare glomerula. Bazalna membrana podocita je ujedno i bazalna membrana endotelnim stanicama kapilara. Između izdanaka podocita nalaze se pore promjera 25 nm, tzv. filtracijske pukotine. Filtracijske pukotine premošćuje oko 6 nm debela opna koja je slična opni u fenestriranim endotelnim stanicama. Između fenestriranih endotelnih stanica kapilara glomerula i podocita nalazi se bazalna membrana (nastala je spajanjem bazalne membrane endotelnih stanica i podocita). To je filtracijska membrana koja odjeljuje mokraćni prostor od krvi u kapilarama. Čestice promjera većeg od 10 nm ne prolaze lako kroz bazalnu membranu, a negativno nabijene bjelančevine molekularne mase veće od albumina prolaze samo oskudno. U bolestima kao što su šećerna bolest i glomerulonefritis, glomerularni filter je daleko propusniji pa se proteini pojavljuju u urinu. Na mjestima gdje bazalna membrana čini omotač koji obuhvaća dvije ili više kapilara mogu se pronaći mezangijske stanice. Citoplazmatski izdanci mezangijskih stanica prodiru između endotelnih stanice sve do lumena kapilara. Te stanice sintetiziraju amorfnu matriks koji podupire stijenu kapilara. Ujedno ove stanice djeluju i kao makrofazi koji čiste bazalnu membranu od čestica koje se nakupljaju tijekom filtriranja (5).

Proksimalni zavijeni kanalić (proksimalni tubul) započinje od mokraćnog pola bubrežnoga tjelešca gdje pločasti epitel Bowmanove čahure prelazi u cilindrični epitel. Proksimalni zavijeni kanalić je duži od distalnoga te na presjeku kroz koru, oko glomerula, nalazimo više njegovih presjeka u odnosu na distalni kanalić. Stanice su velike te svaki poprečni presjek proksimalnog kanalića sadržava samo 3-5 okruglih jezgara, obično smještenih u sredini stanice. Sam kanalić obložen je jednoslojnim cilindričnim ili kubičnim epitelom. Stanice epitela imaju brojne mitohondrije te posljedično izrazito acidofilnu citoplazmu. Od dijela stanice koji je okrenut prema lumenu kanalića polaze brojni mikrovili, dugački oko 1 μm stvarajući tzv.

„četkastu prevlaku“. U apikalnoj citoplazmi epitelnih stanica između polazišta mikrovila nalaze se brojni pinocitotski mjehurići koji nastaju uvrnućem apikalnih membrana, a preko kojih se absorbiraju makromolekule (uglavnom bjelančevine koje su prošle kroz glomerularni filter). Na bazalnim dijelovima epitelnih stanica nalaze se brojna uvrnuća membrane kao i lateralne interdigitacije sa susjednim stanicama. Ovdje se nalazi i Na^+K^+ -ATP-aza koja je odgovorna za aktivni prijenos natrija. Oko tubula se nalazi razgranata mreža peritubularnih kapilara.

Henleova petlja ima oblik slova U, a sastoji se od debelog dijela silaznog kraka, tankog dijela silaznog kraka, tankog dijela uzlaznog kraka i debelog dijela uzlaznog kraka. Debeli dio silaznog kraka je po građi sličan proksimalnom zavijenom kanaliću dok je debeli dio uzlaznog kraka sličan distalnom zavijenom kanaliću. U vanjskom dijelu srži debeli dio silaznog kraka naglo se suzuje s 60 μm na 12 μm i nastavlja se kao tanki dio silaznog kraka. Epitelne stanice su ovdje pločaste i tanke te se jezgre djelomično izbočuju u lumen. Četkasta prevlaka ovdje nedostaje. Tanki krakovi slične krvnim kapilarama s kojima se mogu zamijeniti, a razlikuju se s obzirom na različiti intraluminalni sadržaj, izgled jezgara i debljinu stijenke.

Distalni zavijeni kanalić (distalni tubul) nastaje kada debeli uzlazni krak Henleove petlje uđe u koru, ali više nije ravan već postane zavijen. To je posljednji odsječak nefrona koji je obložen jednoslojnim kubičnim epitelom. Na histološkim rezovima razlika između proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića, koji se oba nalaze u kori, temelji se na slijedećim karakteristikama: stanice proksimalnog kanalića su veće, imaju četkastu prevlaku koje stanice distalnih kanalića nemaju, a ujedno su i jako acidofilne (brojni mitohondriji). Lumeni distalnih kanalića su širi, a kako su im stanice plosnatije i manje od stanice proksimalnih kanalića, vidi se više stanica i više jezgara na histološkom rezu. Apikalni citoplazmatski mjehurići koji su značajka proksimalnih kanalića ne nalaze se u distalnim kanalićima. Stanice distalnog kanalića imaju složena uvrnuća bazalnog dijela membrane udružena s mitohondrijima, što upućuje na njihovu funkciju u prijenosu iona. Duž svog toka u kori distalni zavijeni kanalić priliježe uz žilni pol bubrežnog tjelešca matičnog nefrona. Na dodirnom

mjestu promijene se i distalni kanalić i dovodna arteriola. U tom jukstaglomerularnom području stanice distalnoga kanalića obično postaju cilindrične, a jezgre su im bliže jedna drugoj. Taj promijenjeni odsječak stijenke distalnog zavijenog kanalića koji na mikroskopskom preparatu zbog zbijenosti jezgara izgleda tamniji zove se *macula densa*. Njezina uloga je da dovodnoj arterioli prenosi podatke o osmotskom tlaku tekućine u distalnom kanaliću.

Na distalne zavijene kanaliće se nastavlja sustav sabirnih cjevčica koje se udružuju u veće sabirne cijevi. Sabirne cjevčice obložene su kubičnim epitelom i promjera su približno 40 µm. Na putu kroz srž njihove stanice postaju više sve do cilindričnih. Blizu vrhova piramida promjer sabirne cijevi dostigne 200 µm. Duž cijeloga toka sabirne cjevčice i cijevi građene su od stanica koje se blijedo boje uobičajenim bojama. Granice između stanica se jasno vide jer nema interdigitacije lateralnih ploha susjednih stanica. Sabirne cijevi se udružuju u veće sabirne cijevi, koje se kroz vrške bubrežnih papila izlijevaju u bubrežne čašice (5).

1.1.3. Osnove fiziologije bubrega

Bubrezi imaju regulacijsku i ekskrecijsku funkciju. Oni izlučuju vodu i otopljene tvari, čime održavaju volumen i sastav tjelesnih tekućina unutar vrlo uskih granica, usprkos promjenjivom unosu hrane i vode. Homeostatska uloga bubrega održava relativnu stalnost unutrašnjeg okoliša nužnu za normalno funkcioniranje stanica (6,7).

Glavne funkcije bubrega su:

- a) regulacija osmotske koncentracije i volumena tjelesnih tekućina,
- b) regulacija ravnoteže elektrolita,
- c) regulacija acidobazne ravnoteže,
- d) izlučivanje metaboličkih proizvoda i stranih tvari te
- e) proizvodnja i sekrecija hormona.

Kontrola nad koncentracijom osmotski aktivnih tvari u tjelesnim tekućinama važna je za održavanje normalnih staničnih volumena u svim tkivima našeg tijela. Nadzor nad

volumenom tjelesnih tekućina neophodan je za normalan rad kardiovaskularnog sustava. U sprezi s dijelovima kardiovaskularnog sustava i CNS-a bubrezi te zahtjeve ostvaruju regulacijom izlučivanja vode i NaCl.

Bubrezi imaju ključnu ulogu u regulaciji koncentracije nekolicine važnih neorganskih iona kao što su: Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , H^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , PO_4^{---} . Bubrezi pridonose održavanju ravnoteže organskih iona. Oni primjerice kontroliraju izlučivanje mnogih međuprodukata Krebsovog ciklusa (citrata, sukcinata). Radi održavanja odgovarajuće ravnoteže, izlučivanje bilo kojega od navedenih elektrolita mora biti uravnoteženo s dnevnim unosom. Ako unos nadmaši izlučivanje, količina će se dotičnog elektrolita u tijelu povećati. Suprotno ako izlučivanje nadmaši unos količina se smanjuje. Za mnoge od navedenih elektrolita bubrezi su jedini ili glavni put izlučivanja. Ravnoteža elektrolita se prema tome ostvaruje pažljivim usklađivanjem dnevnoga bubrežnog izlučivanja s dnevnim unosom.

Mnoge tjelesne metaboličke funkcije jako su osjetljive na pH. Dakle, pH tjelesnih tekućina se mora održavati unutar vrlo uskih granica. Ta se regulacija ostvaruje pomoću pufera prisutnih u tjelesnim tekućinama kao i usklađenim djelovanjem pluća i bubrega.

Bubrezi izlučuju brojne krajnje metaboličke proizvode nepotrebne organizmu. U te otpadne tvari ubrajamo ureju (iz aminokiselina), mokraćnu kiselinu (iz nukleinskih kiselina), kreatinin (iz mišićnog kreatina), krajnje proizvode metabolizma hemoglobina kao i metabolite hormona. Brzina kojom bubrezi odstranjuju tvari iz tijela sukladna je brzini njihova nastajanja. Bubrezi su također važan put u odstranjenju stranih tvari iz tijela poput lijekova, pesticida i ostalih hranom unesenih kemikalija.

Bubrezi su i važni endokrini organ jer stvaraju i luče renin, prostaglandine, kinine, 1,25-dihidroksi-vitamin D_3 i eritropoetin. Renin potiče renin-angiotenzin-aldosteronski sustav koji je važan u regulaciji krvnog tlaka kao i u održavanju regulacije ravnoteže kalija i natrija. Prostaglandini i kinini su vazoaktivne supstancije pa su važni regulatori i modulatori bubrežnog protoka krvi. Zajedno s angiotenzinom II, prostaglandini i kinini utječu na sistemni krvni tlak. Vitamin D_3 prijeko je potreban za normalnu apsorpciju kalcija u probavnome

sustavu kao i za njegovo odlaganje u kostima. Eritropoetin potiče koštanu srž na stvaranje eritrocita (6,7).

1.2.KARCINOM BUBREGA

1.2.1.Incidencija karcinoma bubrega

Karcinom bubrega (renal cell carcinoma - RCC) je jedan od najznačajnijih tumora urogenitalnog sustava zbog visokoga mortaliteta i sve veće učestalosti (8-10). RCC, koji broji oko 3% od svih malignih tumora u odraslih, je najsmrtonosniji maligni tumor cijelog urotrakta. Približno 40% oboljelih od ovog karcinoma umire, dok smrtnost kod karcinoma prostate i mokraćnoga mjehura iznosi oko 20% (11). Postotak pacijenata koji imaju metastaze prilikom otkrivanja karcinoma bubrega je oko 30%, a slijedeća konstanta je kako 30% pacijenata razvija metastatsku bolest nakon nefrektomije. Bolesnici s metastatskom bolešću imaju 5-godišnje preživljenje između 5-10%, a 10-godišnje preživljenje 0-7% (12,13). Sve gore navedeno govori u prilog izrazite agresivnosti ove bolesti.

Svake godine se u svijetu dijagnosticira oko 210,000 novih bolesnika s RCC, od čega oko 86,000 u Europi (14). Oko 45,000 bolesnika u Europi godišnje umire od ove bolesti (14). Najviša incidencija RCC je u razvijenim zemljama svijeta (SAD, Kanada, Europa, Australija, Novi Zeland), a najniža u Aziji (Tajland, Kina i Filipini). U SAD učestalost je 16/100,000 muškaraca godišnje odnosno 8/100,000 žena (8). U Europi najveća učestalost je u Češkoj: 22/100,000 muškaraca odnosno 11/100,000 žena (8). Također visoka učestalost se nalazi u istočnim zemljama Europe, ali i Njemačkoj. Učestalost RCC u Aziji, Africi i Južnoj Americi je 10-15 puta niža (8). O porastu učestalosti govori i američka studija o učestalosti RCC između 1973. i 1998. godine koja je pokazala godišnje povećanje incidencije od 4,4% za Afroamerikance mlađe od 60 godina i 4,3% za starije od 60 godina dok je povećanje incidencije u ljudi bijele rase nešto manje tj. 2,8% odnosno 3,0% (15). U Engleskoj je između 1978. i 1997. učestalost porasla s 2,8 na 5,2/100,000 i to u oba spola i u svim dobnim grupama (9). Dobrim dijelom za to su zaslužne različite slikovne metode koje su i do 60%

povećale detekciju asimptomatskih, lokaliziranih tumora (10). Unatoč porastu broja lokaliziranih tumora, mortalitet je ipak u porastu (15). U SAD mortalitet je 6,1/100,000 muškaraca odnosno 2,8/100,000 žena. U Europi najveći mortalitet ima Češka 10/100,000 muškaraca odnosno 4,5/100,000 žena. Također visoki stupanj smrtnosti postoji u istočnoeuropskim zemljama i Njemačkoj (8).

Prema podacima Registra za rak, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2007. godini otkriveno je 623 novih bolesnika s karcinomom bubrega (od toga 388 u muškaraca i 235 u žena). Broj novooboljelih na 100,000 stanovnika je 14,0/100,000 (18,2/100,000 u muškaraca odnosno 10,2/100,000 u žena).

Ova bolest se najčešće javlja u šestom i sedmom desetljeću života, a češća je u muškaraca 1,6:1,0 (16). U najvećeg broja oboljelih radi se o sporadičnim slučajevima karcinoma, a u samo 2-3% bolesnika o familijarnim oblicima karcinoma (17). Bolesnici koji imaju lokaliziranu bolest imaju bolju prognozu za razliku od bolesnika s uznapredovalom bolešću čiji je preživljenje značajno smanjeno (tablica 1).

Tablica 1. Odnos između stadija tumora i preživljenja (9)

STADIJ	5-godišnje preživljenje	10-godišnje preživljenje
I	95%	95%
II	88%	81%
III	59%	43%
IV	20%	14%

1.2.2. Epidemiološki čimbenici

Brojni su epidemiološki čimbenici povezani s RCC, ali ipak najvažniji čimbenici rizika su pušenje, debljina i hipertenzija.

Pušači imaju 1,2 do 2,3 veći rizik za razvoj RCC u odnosu na nepušače, a kod teških pušača taj rizik se penje na 3,0. Pušenje ima utjecaj na razvoj RCC u 27-37% bolesnika. Pasivni pušači također imaju povećani rizik oboljevanja od ovog karcinoma (18,19).

U švedskoj studiji na više od 350,000 ispitanika, osobe s višim indeksom tjelesne težine imali su skoro dvostuko veći rizik od razvoja RCC od normalne populacije (20). Nije jasan uzročni mehanizam, ali kao jedna od mogućnosti spominju se hormonske promjene kao što je povećana razina endogenog estrogena. Naime animalni modeli su pokazali da estrogeni mogu inducirati razvoj karcinoma bubrega. Niža razina vitamina D, češća u adipoznijih ljudi, može imati utjecaj na razvoj RCC jer vitamin D ima inhibitorni učinak na rast staničnih linija karcinoma bubrega in vitro (21).

Hipertenzija se već dugo vremena spominje kao jedan od važnih čimbenika u razvoju karcinoma bubrega. Ljudi s povišenim arterijskim krvnim tlakom imaju relativni rizik za razvoj RCC 1,62 do 1,75 veći od zdrave populacije. Točan uzročni mehanizam do sada nije razjašnjen (22,23).

Od ostalih faktora treba spomenuti lijekove (analgetici, diuretici, estrogeni), prehrambene čimbenike (pretjerana konzumacija proteina i masti, premala voća i povrća, konzumacija alkohola i kave), profesionalnu izloženost (azbest, organska otapala), hemodijalizu i s njome povezanu stečenu cističnu bolest bubrega, izlaganje ionizacijskom zračenju, genetske čimbenike (hereditarni oblici RCC poput VHL sindroma i polimorfizam gena za CYP1A1 i CYP1B1) te infekcije mokraćnih puteva (23-36).

U skladu s gore navedenim činjenicama je i preporuka Europskog urološkog društva koja za najvažniju preventivnu mjeru ističe prestanak pušenja uz regulaciju tjelesne težine (32).

1.2.3. Klasifikacija tumora bubrega

Postoji nekoliko različitih klasifikacija tumora bubrega od kojih je jedna od najupotrebljavanijih ona koja dijeli tumorske mase bubrega na maligne, benigne i upalne (tablica 2) (37,38).

Tablica 2. Patološka klasifikacija tumora bubrega

Maligni	Benigni	Upalni
Karcinom bubrega	Jednostavna cista	Absces
Limfom	Angiomiolipom	Pijelonefritis
Leiomyosarkom	Onkocitom	Ksantogranulomatozni pijelonefritis
Hemangiopericitom	Pseudotumor	Inficirana cista bubrega
Liposarkom	Reninom	Tuberkuloza bubrega
Rabdomiosarkom	Feokromocitom	Reumatski granulom
Schwanom	Leiomiom	
Osteosarkom	Hemangiom	
Fibrozni histiocitom	Cistični nefrom	
Neurofibrosarkom	Fibrom	
Metastatski tumor	Arteriovenska malformacija	
Invazija tumora okolnih organa u bubreg	Hemangiopericitom	
Karcinoid	Hibernom	
Wilmsov tumor	Aneurizma renalne arterije	
Mezoblastični nefrom		
Leukemija		

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je tumore bubrega s obzirom na njihove histološke karakteristike podijelila na: tumore bubrežnih stanica, metanefričke tumore, nefroblastične tumore, mezenhimalne tumore, miješane mezenhimalne i epitelne tumore, neuroendokrine tumore, hematopoetske i limfoidne tumore, tumore zametnih stanica te metastatske tumore (39).

Od svih malignih tumora bubrega najčešći je karcinom bubrežnih stanica (RCC) koji nastaje od epitelnih stanica bubrega i čini preko 90% zloćudnih tumora bubrega (39). U samo 2-3% bolesnika s RCC radi se o tumorima unutar određenih nasljednih sindroma gdje je poznata mutacija tumor supresor gena ili onkogeno koja je dovela do razvoja tumora (tablica 3) (39).

Tablica 3. Nasljedni sindromi s karcinomom bubrežnih stanica i uzročnim genetskim defektom

Sindrom	Gen	Kromosomska promjena	Klinička slika
Von Hippel-Lindau	VHL	3p25	Multipli, obostrani, svjetlostanični RCC; feokromocitom, hemangioblastomi CNS-a
Hereditarni papilarni RCC	MET	7q31	Multipli, obostrani papilarni RCC, tip I
Hereditarna leiomiomatoza i RCC	FH	1q42-43	Papilarni RCC, tip II; leiomiomi kože i uterusa
Birt-Hogg-Dubè	BDH	17p11	Multipli kromofobni i svjetlostanični RCC, onkocitomi; kožni tumori, ciste pluća
Familijarni svjetlostanični RCC	Nepoznato	3p	Multipli, obostrani RCC (bez drugih manifestacija VHL sindroma)

U sporadičnim slučajevima RCC, koji predstavlja 97-98% svih karcinoma, također su pronađene određene genetske promjene (tablica 4) (38,39).

Tablica 4. Genetske promjene u sporadičnom RCC

Histološki tip RCC	Zahvaćeni kromosom	Tip promjene
Svjetlostanični	3	Delecija, mutacija
Papilarni	7,17	Trisomija i tetrasomija
Kromofobni	1,2,6,10,13,17,21	Gubitak kromosoma

Svjetska zdravstvena organizacija je 2004. godine podijelila RCC u slijedeće subtipove:

- svjetlostanični,
- papilarni,
- kromofobni,
- karcinom sabirnih tubula (Bellini),
- medularni karcinom,
- karcinom s Xp11 translokacijom,
- karcinom udružen s neuroblastomom,
- mucinozno-tubularni i karcinom vretenastih stanica i

-neklasificirani RCC (38,39).

Svjetlostanični i papilarni subtip su podrijetla epitela proksimalnog nefrona, a kromofobni RCC (kao i onkocitom) su podrijetla distalnog nefrona (interkalirajuće stanice) (40).

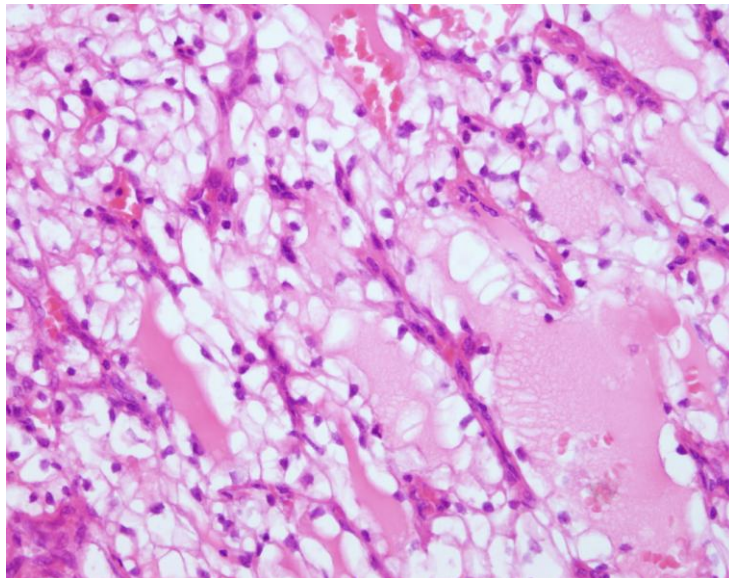
Najčešći subtipovi su svjetlostanični, papilarni i kromofobni.

a)svjetlostanični RCC (RCC-CC)

Svjetlostanični RCC je najčešći histološki subtip (70-75% od svih RCC), a njegove stanice imaju svijetlu ili eozinofilnu citoplazmu (slika 1) (41). Najčešće se pojavljuje kao solitarni kortikalni tumor na jednom od bubrežnih polova, a podjednako se javlja na oba bubrega. Multicentričnost ili obostrano pojavljivanje, pogotovo u mlađoj dobi, karakteristično je za nasljedne sindrome poput von Hippel-Lindau sindroma. Makroskopski radi se o relativno okruglim tumorima koji izbočuju konturu bubrega. Obično su jasno odvojeni od priležećeg normalnog tkiva bubrega kojega „guraju“ ispred sebe uz formiranje pseudokapsule koja dodatno odvaja tumor od zdravog tkiva. U kasnijoj fazi dolazi do probijanja tumora u masnu kapsulu ili nadbubrežnu žlijezdu, a nakon toga i u druge priležeće organe i strukture. Makroskopski je tipična slika zlatno-žutog tkiva (područje svijetlih stanica), sa smeđim dijelovima (područje eozinofilnih stanica). Stanice karcinoma su zlatnožute boje, a što je posljedica bogatog lipidnog sadržaja unutar stanica. Unutar tumora mogu se vidjeti cistične tvorbe, kalcifikacije kao i mjesta kvarenja. Nekroza unutar tumora može također biti prisutna i ona se mora registrirati jer je prognostički čimbenik (42). Arhitekturni oblici mogu biti alveolarni, acinarni, solidni ili cistični. Tumor je dobro vaskulariziran. Citoplazma neoplastičkih stanica je svijetla zbog visokog sadržaja glikogena i lipida. Te citoplazmatske komponente tijekom kemijske obrade histoloških preparata postaju vidljive kao tipična svjetla citoplazma. Jezgre su okrugle do poligonalne s slabo vidljivim nukleolima i finim kromatinom. Pleomorfizam jezgara, izraženi nukleoli i grubi kromatin odlike su tumora visokog stupnja.

Stanice svjetlostaničnog RCC su pozitivne na epitelijalni membranski antigen (EMA), niskomolekularni citokeratin (CK8, CK18, CK19), vimentin, MUC-1, MUC-3 i CD10 (41). Parvalbumin i β -defensin-1 su obično odsutni.

Svjetlostanični RCC može biti manifestacija von Hippel-Lindau ili drugog sindroma udruženog s RCC (vidi tablicu 3). Svi hereditarni oblici RCC imaju defekt VHL gena (smješten je na kromosomu broj 3 i spada u tumor supresorske gene). VHL gen je također uključen u nastanak većine sporadičnih svjetlostaničnih RCC (>60%). Iz toga razloga VHL gen smatramo izuzetno bitnim za nastanak svjetlostaničnog RCC. Defekt VHL gena može nastati zbog njegove delecije ili mutacije. VHL gen kodira VHL protein koji negativno regulira HIF (hipoksijom induciran faktor) 1 α i 2 α . HIF je transkripcijski aktivator koji dovodi do aktivacije gena uključenih u staničnu proliferaciju, angiogenezu i stvaranje vanstaničnog matriksa. Osim VHL gena u patogenezu svjetlostaničnog RCC uključeni su p53 i p27 (43,44).



SLIKA 1. Svjetlostanični karcinom bubrega (HE, povećanje 200x)

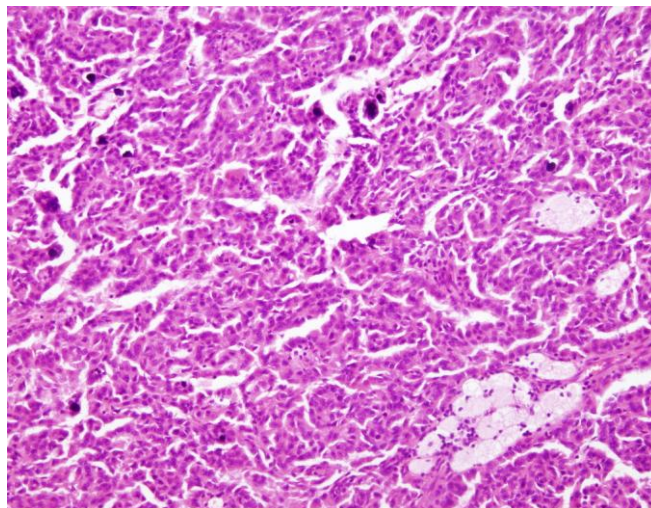
b) papilarni RCC

Papilarni RCC, koji obuhvaća 10-15% od svih RCC, je maligni tumor koji se sastoji od epitelnih stanica koje formiraju papilarne ili tubulopapilarne strukture. Makroskopski papilarni tumori su dobro ograničeni, crvenosmeđe do zlatnožute boje često s područjima krvarenja, nekroze ili cistične degeneracije. Multicentričnost i bilateralnost je daleko češća u ovog tipa tumora. Mikroskopski nalazimo tumorske papile koje se sastoje od površinskoga epitela te fibrovaskularne srži s različitim udjelom makrofaga i kalcifikacija u njoj. Na osnovi morfoloških

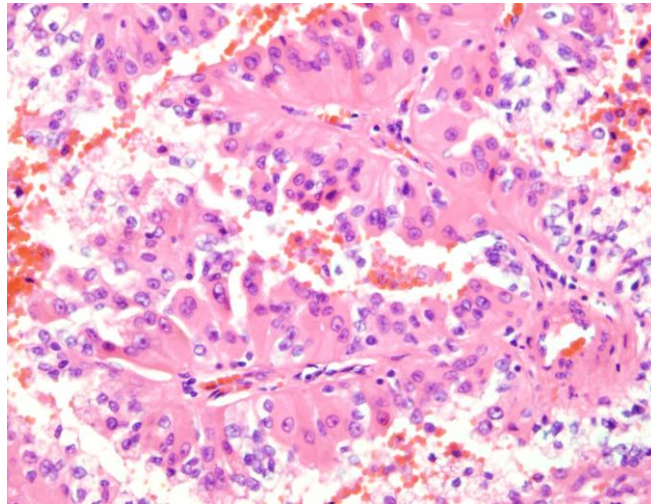
karakteristika epitelnih stanica razlikujemo 2 različita tipa papilarnog RCC (slika 2). Tip I ima papile s epitelom koji ima male stanice s svjetlom citoplazmom, neupadljivim jezgrama i malenim nukleolima. Papile se sastoje od samo jednog sloja stanica. Tip II se sastoji od velikih stanica s obilnom eozinofilnom citoplazmom, većim jezgrama i izraženijim nukleolima. Papile mogu imati jedan sloj stanica, ali mogu pokazivati i pseudostratifikaciju. Određivanje tipa papilarnog karcinoma ima prognostički značaj jer bolesnici s tumorom tipa I imaju u pravilu tumor nižeg stadija te duže preživljenje (45).

Stanice papilarnog RCC su pozitivne na niskomolekularne citokeratine, AE1/AE3, CK 7, CD10, parvalbumin i β -defensin-1.

Najčešće genetske promjene su one na kromosomima 7 i 17. Najznačajnije promjene su vezane uz mutacije MET gena na sedmom kromosomu. MET gen kodira receptorsku tirozin kinazu koja se normalno aktivira putem jetrenog čimbenika rasta i time igra važnu ulogu u staničnoj proliferaciji, smrti stanice, pokretljivosti i invaziji (46).



Slika 2A. Papilarni karcinom bubrega (tip I) (HE, povećanje 100x)



Slika 2B. Papilarni karcinom bubrega (tip II) (HE, povećanje 200x)

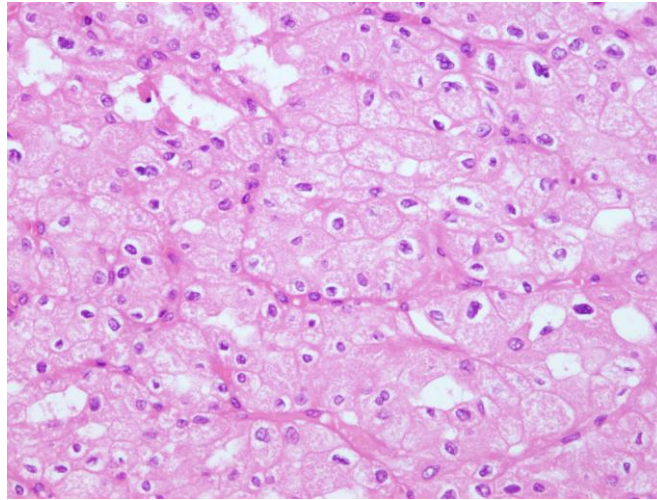
c) kromofobni RCC

On obuhvaća oko 5% svih RCC. Radi se o malignom tumoru bubrega koji se sastoji od velikih svjetlih do blijedo eozinofilnih stanica s istaknutim staničnim membranama (slika 3). Makroskopski radi se o solitarnim, dobro ograničenim tumorima. Na prerezu tumor je smeđe boje te podsjeća na onkocitom. Mikroskopski radi se o solidnom tumoru s kalcifikacijama i fibroznim septama u kojima se nalaze krvne žile. Histološki razlikuju se dva tipa: klasični i eozinofilni, ali u većini slučajeva radi se o njihovoj kombinaciji. Stanice klasičnog tipa imaju obilnu svjetlu citoplazmu s izraženim staničnim membranama, a kao posljedicu gomilanja staničnih organela na periferiji citoplazme. Eozinofilna varijanta se sastoji od eozinofilnih stanica s granuliranom citoplazmom zbog mnoštva mitohondrija. Jezgre u oba tipa tumora su nepravilne, nabrane s malim nukleolima. Koloidalna obojenost željezom je tipična za oba tipa kromofobnog RCC za razliku od ostalih tipova karcinoma bubrega koji tome nisu skloni. Također s obzirom na slično podrijetlo koloidalna obojenost željezom nam omogućuje razlikovanje onkocitoma od kromofobnog RCC. Ovom tehnikom stanice kromofobnog RCC su jako i difuzno obojene, za razliku od apikalne citoplazmatske obojenosti onkocitoma.

Stanice kromofobnog RCC su pozitivne na niskomolekularne citokeratine, CD10 (50% tumora), parvalbumin, β -defensin-1 i EMA dok su negativne na vimentin. Pozitivna reakcija

na Kit koja je zabilježena kod kromofobnih karcinoma (i onkocitoma), a ne i kod svjetlostaničnog tipa, može dodatno olakšati razlikovanje ova dva tipa tumora (47).

Većina kromofobnih karcinoma je karakterizirana brojnim genetskim promjenama na različitim kromosomima (48).



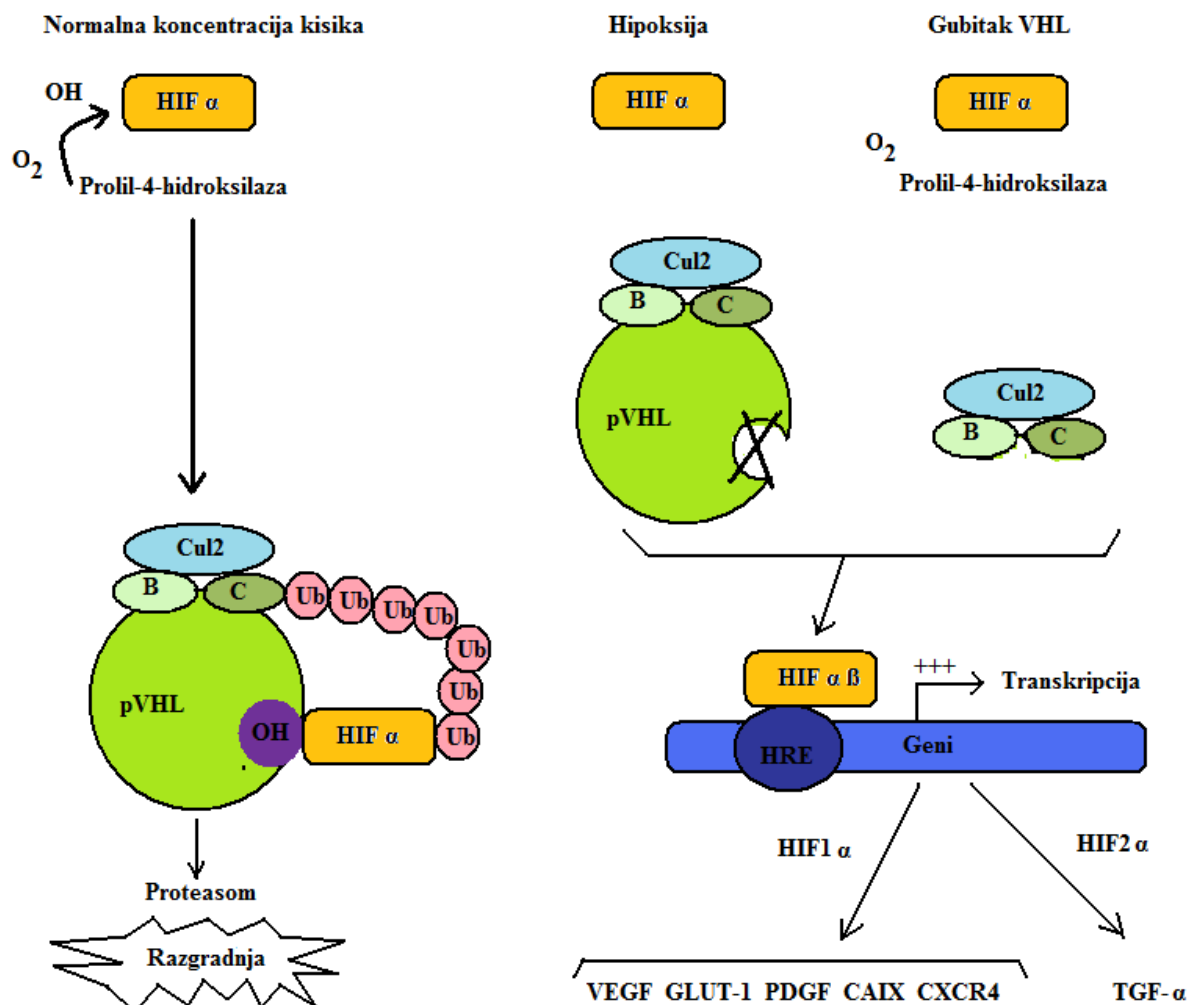
Slika 3. Kromofobni karcinom bubrega (HE, povećanje 200x)

1.2.4. Patogeneza karcinoma bubrega

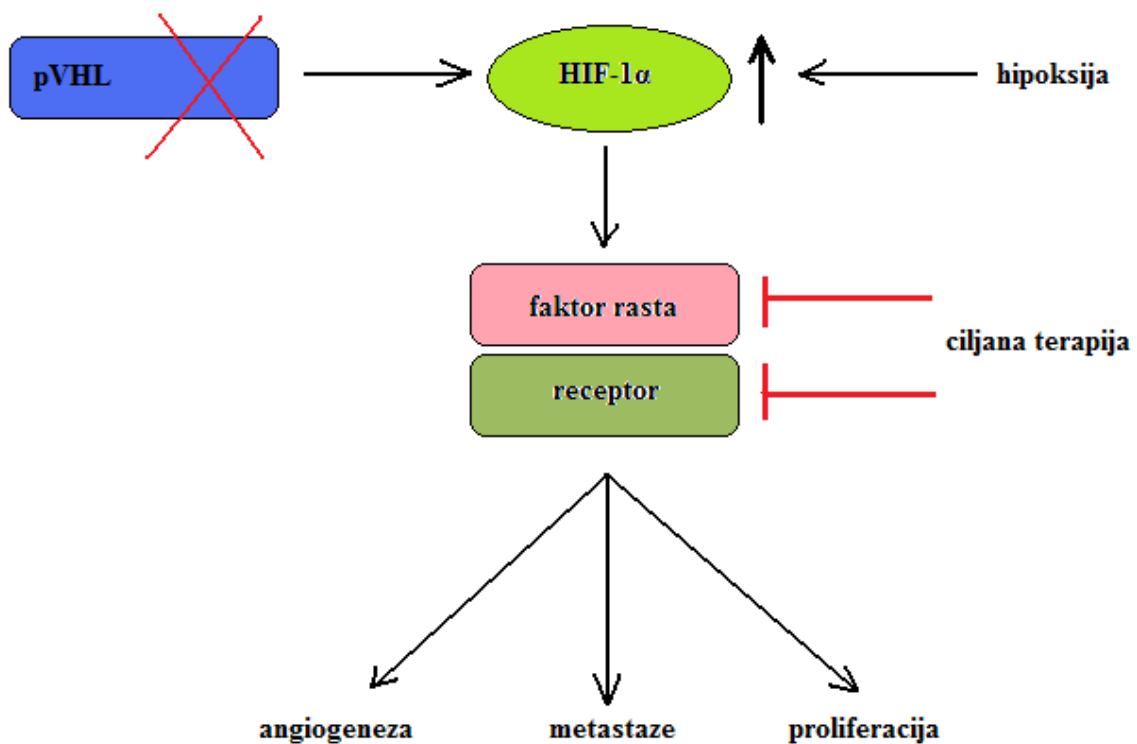
Do sada je najbolje ispitana i upoznata patogeneza najčešćeg tipa RCC, svjetlostaničnog tipa (RCC-CC). Velika većina RCC-CC nastaje zbog bilateralnog gubitka VHL gena na trećem kromosomu. VHL gen kodira VHL protein koji ima supresivnu ulogu na rast tumorskih stanica RCC in vitro. VHL protein inhibira prepisivanje gena koje je potaknuto staničnom hipoksijom, a čiji produkti imaju važnu ulogu u angiogenezi (VEGF: vascular endothelial growth factor-vaskularni endotelni čimbenik rasta, PDGF: platelet derived growth factor-čimbenik rasta iz trombocita), rastu stanica (TGF- α i TGF- β ; transforming growth factor α i β), unosu glukoze (GLUT-1 i GLUT-3; glucose transporter 1 i 3), migraciji stanica (CXCR4), apoptozi (Bid, Bax, Bad), održavanju acidobazne ravnoteže (CAIX; carbonic anhydrase IX) i stvaranju eritrocita (eritropoetin). Kod nedostatka VHL proteina, dolazi do pojačanog prepisivanja dotičnih gena i stvaranja njihovih proteina i time se stvara okoliš koji je pogodan za proliferaciju epitelnih stanica (slika 4). To prepisivanje gena se ostvaruje putem transkripcijskog aktivatora koji se zove HIF-1 (hypoxia-inducible factor – hipoksijom inducirani čimbenik). HIF se dijeli u dva

aktivna oblika: HIF-1 α i HIF-2 α . HIF-1 je heterodimer koji se sastoji od HIF-1 α i HIF-1 β od čega je HIF-1 β neprestano eksprimiran dok je unutarstanična koncentracija HIF-1 α kontrolirana na dva nivoa. Jedan je put biosinteze, a drugi na posttranslacijskom nivou. Na posttranslacijskom nivou HIF-1 α , kao i njemu srodni protein HIF-2 α , kontroliran je putem hipoksije preko VHL proteina koji djeluje supresijski. U situaciji s normalnom koncentracijom kisika VHL protein se zajedno s elonginima B i C veže za cul2 protein (kulinu su ubikvitinske ligaze) te na taj način VHL protein služi kao receptorska podjedinica u stvaranju ligaza ubikvitinskog kompleksa. Ovaj kompleks ima ulogu u ubikvitinaciji i destrukciji proteina. HIF-1 α i HIF-2 α se vežu na VHL što dovodi, nakon ubikvitinacije, do brzog raspadanja HIF- α . Da bi se HIF- α uopće vezao za VHL protein najprije treba doći do hidroksilacije njegovog prolinskog ostatka. Stupanj djelovanja te prolinske hidroksilaze ovisi o oksigenaciji stanice. U stanju hipoksije HIF-1 α i HIF-2 α se ne vežu za VHL i ne dolazi do njihove razgradnje putem VHL proteina. Mutacija, delecija ili hipermetilacija VHL gena također dovode do poremećene ubikvitinacije HIF subjedinica uz posljedično unutarstanično nakupljanje HIF-1 α i HIF-2 α , u ovom slučaju u odsustvu hipoksije (49). HIF- α u jezgri potiče prepisivanje HRE (hypoxia response element) koji su sastavni dijelovi gena poput VEGF-a. Nakupljanje HIF-1 α dovodi do prepisivanja gena za VEGF, GLUT-1, PDGF, CAIX i CXCR4 dok HIF-2 α aktivira TGF- α čime se potiče rast tumorskih stanica. Prema tome HIF ima značajnu ulogu u regulaciji odgovora na hipoksiju u mnogostaničnim organizmima, ali isto tako ima ulogu i kod RCC. Povećani nivo HIF je neophodan za razvoj karcinoma bubrega, ali sam po sebi nije dostatan. Također iako VEGF stvaraju brojni karcinomi, svjetlostanični tip RCC ga zbog gore navedenih razloga stvara u većim količinama čime se i objašnjava njegova dobra vaskularizacija jer je on bitan čimbenik u tumorskoj angiogenezi (50). Porast ulaska glukoze u tumorske stanice (povećanje GLUT-1 i -3) kao i povećana produkcija čimbenika rasta (PDGF i TGF- α) koji djeluju djelomično i autokrino može predstavljati važan korak u razvitku RCC. Među genima na koje utječe HIF, karbonska anhidraza IX (CAIX) je također važna u nastanku RCC. CAIX je transmembranski enzim koji ima ulogu u regulaciji unutarstaničnog i

izvanstaničnog pH. Smatra se da njegovo djelovanje omogućuje tumorskim stanicama prilagođavanje na uvjete hipoksije i acidoze i time olakšava njihovu daljnju proliferaciju i metastaziranje. Prije spomenuti VHL-HIF put je mjesto ciljane terapije tumorskih stanica karcinoma bubrega (slika 5) (46,49,51-53).



Slika 4. Razgradnja VHL proteina (VHL-HIF put) pri normalnoj koncentraciji kisika, hipoksiji te zbivanja koja se događaju kada postoji gubitak VHL proteina. U prisustvu normalne koncentracije kisika u stanici VHL protein se ragrađuje uz pomoć HIF- α . U stanjima hipoksije stanice ili prilikom gubitka VHL-a (npr. kod tumora) dolazi do nakupljanja HIF- α i prepisivanja određenih gena koji imaju ulogu i u tumorigenezi. Detaljniji opis u tekstu prije slike. Modificirano prema: Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. *Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. Eur Urol* 2006;49:633-43. (51)



Slika 5. Nakupljanje HIF-1 α dovodi do aktivacije određenih faktora rasta i njihovih receptora koji pospešuju proliferaciju stanica, angiogenezu i metastaziranje. Osnov ciljne terapije je djelovanje na točno određeni faktor rasta ili njegov receptor. HIF-1 α = hipoksijom induciran čimbenik 1alfa; pVHL = VHL protein. *Modificirano prema: Störkel S, Kristiansen G, Moch H. The importance of pathology and genetics for the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. Eur Urol Supl 2007;6:603-10. (52)*

Kod papilarnog karcinoma promjene se dešavaju na 7. kromosomu koji sadržava MET protoonkogen. Radi se o genu koji kodira MET protein (receptorska tirozin-kinaza). Ta kinaza se normalno aktivira putem jetrenog čimbenika rasta (hepatocyte growth factor: HGF). U nedostatku liganda MET se nalazi u autoinhibiranome stanju. U prisustvu liganda MET se aktivira. Mutacije ovog gena dovode do aktivacije receptora i bez prisustva jetrenog čimbenika rasta ili pak nakon aktivacije s jetrenim čimbenikom rasta receptor postane trajno aktivan. Mutirani MET alel se tada i duplicira povećavajući ekspresiju MET proteina. Aktivirani MET protein potiče staničnu proliferaciju, te ima utjecaj na pokretljivost stanica, sposobnost invazije stanica i njihovo preživljenje (53).

1.2.5. Klinička slika

Bubreg je zbog svog retroperitonealnog smještaja i masne kapsule koja ga odvaja od okolnih struktura relativno „izoliran organ“. Iz toga razloga je i karcinom bubrega dugo vremena asimptomatski, a pojava simptoma najčešće znači i lokalno uznapredovalu bolest (32,54). Zbog uporabe široko rasprostranjenih dijagnostičkih metoda preko 60% bolesnika se danas otkriva u asimptomatskoj fazi, tj. incidentalno prilikom evaluacije nekih nespecifičnih simptoma (32).

Klasični trijas simptoma: bol u lumbalnoj regiji, makrohematurija i palpabilna masa u abdomenu se danas izuzetno rijetko nalazi (u 6-10% bolesnika) (55,56). S obzirom da se tada u velikoj većini slučajeva radi o uznapredovaloj bolesti neki ga još nazivaju i „zakašnjeli trijas“ (32). Prije uporabe ultrazvuka i kompjuterizirane tomografije većina pacijenata se otkrivala baš na ovaj način. Ostali simptomi uznapredovale bolesti su opći simptomi poput gubitka tjelesne težine, povišene tjelesne temperature, noćnog znojenja odnosno znakovi poput limfadenopatije vrata, pojave varikocela ili obostranog edema nogu (zadnje kao posljedica invazije tumora u venski sustav). Paraneoplastički sindrom se javlja u 20-30% bolesnika, a nastaje kao posljedica stvaranja biološki aktivnih tvari iz tumora ili imunog odgovora normalnog tkiva na tumor (17). Tvari koje se stvaraju kod RCC su: paratireoidnom hormonu sličan peptid, gonadotropini, renin, eritropoetin, glukagon, inzulin, placentolaktogen, adrenokortikotropni hormon, alkalna fosfataza. Klinički nalazimo hiperkalcijemiju, hipertenziju, policitemiju, nemetastatsku disfunkciju jetre (Staufferov sindrom), Cushingov sindrom, hiperglikemiju, galaktoreju, neuromiopatiju i poremećaje zgrušavanja krvi (57). Dio pacijenata (30%) se javlja s simptomima metastatske bolesti poput perzistirajućeg kašlja ili bolova u kostima (17).

1.2.6. Slikovne metode u dijagnosticiranju karcinoma bubrega

Povećanje broja novootkrivenih bolesnika s RCC kao i otkrivanje u ranijem stadiju bolesti posljedica je široke uporabe slikovnih metoda. André i suradnici su prikazali da je broj RCC

manjih od 3 cm u periodu između 1974. i 1977. bio samo 5,3%, a deset godina kasnije (kada su ultrazvuk i kompjuterizirana tomografija ušli u svakodnevnu kliničku praksu) 25,5% (58).

Intravenska urografija je nekada bila osnovna dijagnostička metoda u otkrivanju karcinoma bubrega. Njezina senzitivnost je 80-85% u otkrivanju RCC većih od 3 cm, a manja od 10% u tumora manjih od 3 cm. U današnje vrijeme nju su zamijenili ultrazvuk i kompjuterizirana tomografija (59).

Multidisciplinarna uporaba ultrazvuka dovela je do porasta broja novotkrivenih RCC, pogotovo u ranijem stadiju bolesti. Učestalost otkrivanja asimptomatskih tumora bubrega je porasla za 60%, u čemu ultrazvuk ima važniju ulogu i od CT-a, a čak 83% asimptomatskih karcinoma bubrega se otkriva slučajnim ultrazvučnim pregledom (60). Ograničavajući čimbenik kod ultrazvučnog pregleda je veličina tumora jer je kod onih manjih od 3 cm osjetljivost ispod 80%, dok se 1,5 cm smatra najmanjom realnom veličinom za detekciju. Uvođenjem Dopplera, Power-Dopplera i uporaba kontrasta uvelike se poboljšala ultrazvučna vizualizacija patološkog tkiva i senzitivnost u otkrivanju RCC. Dodatnu ulogu ima i intraoperacijski ultrazvuk tijekom pošteđenih operacija tumora (parcijalna nefrektomija, enukleacija tumora), kada pomaže u razgraničenju normalnog od patološkog tkiva, tj. u određivanju resekcijske linije. Osim prikaza same novotvorine, ultrazvukom se prijeoperacijski vizualizira i okolne organe i krvne žile zbog mogućeg pronalaska širenja tumora te time određuje stadij tumora. Ultrazvuk služi i pri uzimanju perkutanih bioptata („true-cut biopsy“) i aspirata tankom iglom („fine needle aspiration biopsy“) u nejasnih formacija (61).

U razvijenim zemljama svijeta kompjuterizirana tomografija (CT) je „zlatni standard“ u evaluaciji tumorskih tvorbi bubrega. Kompjuterizirana tomografija s kontrastom pokazala je veću točnost nalaza u odnosu na ultrazvuk (90%:75%), naročito pri tumorima manjim od 3 cm. Uvođenjem, tzv. „multislice“ CT-a kvaliteta prikaza se kroz sve manje debljine presjeka pokazala metodom izbora u prijeoperacijskoj procjeni stadija bolesti. Tom metodom moguće je učiniti i trodimenzionalnu rekonstrukciju kojom se može utvrditi odnos tumora prema

zdravom dijelu bubrega, kanalnom sustavu te okolnim organima i strukturama. Ujedno se može i odrediti broj renalnih arterija kao i njihov tok u odnosu na tumor (značajno kod parcijalnih nefrektomija) te prisutnost i ekstenziju tromba u venskom sustavu. Također se dobiju i informacije o funkciji i morfologiji kontralateralnog bubrega. Temeljni nedostaci CT-a su količina iradijacije i moguće alergijske reakcije na kontrastna sredstva (62).

Magnetska rezonancija (MR) se do prije nekoliko godina koristila u bolesnika kao nadopuna nejasnim ultrazvučnim ili CT nalazima. Ona je bila metoda izbora u bolesnika s bubrežnom insuficijencijom, alergijom na jodne kontraste ili kada izlaganje radijaciji nije poželjno (djeca, trudnice). Zbog recentnih tehničkih unapređenja MR možemo smatrati metodom izbora jer u odnosu na CT ima podjednaku sposobnost trodimenzionalne rekonstrukcije, bolju mogućnost tkivne analize, a nema izlaganja zračenju. Točnost nalaza je približna ili bolja od CT-a (63,64).

1.2.7. Prognostički čimbenici

Prognostički čimbenici se mogu podijeliti na anatomske, histološke, kliničke i molekularne.

a) anatomske čimbenici

U anatomske čimbenike spada veličina tumora, zahvaćenost vena, invazija perinefritičkog tkiva i nadbubrežne žlijezde, invazija okolnih organa i struktura, zahvaćenost limfnih čvorova i prisustvo metastaza. Ovi čimbenici su objedinjeni u TNM klasifikaciji, a određuju stadij tumora (tablica 5). Trenutačno je aktualna TNM klasifikacija iz 2002. godine (65). Odnos između preživljenja i tumorskog stadija se najbolje vidi iz tablice 1.

TNM klasifikacija :

T: Primarni tumor

Tx: primarni tumor ne može biti određen

T0: bez znakova primarnog tumora

T1: tumor veličine ≤ 7 cm, ograničen na bubreg

T1a: tumor veličine ≤ 4 cm, ograničen na bubreg

T1b: tumor > 4 cm ali ≤ 7 cm, ograničen na bubreg

T2: tumor > 7 cm, ograničen na bubreg

T3: tumor proširen u glavne vene ili zahvaća nadbubrežnu žlijezdu ili perinefritičko tkivo, no ne prelazi Gerotinu fasciju

T3a: tumor zahvaća nadbubrežnu žlijezdu ili perinefritičko tkivo (uključujući i peripijelično masno tkivo), ali ne izvan Gerotine fascije

T3b: tumor se širi u renalnu venu ili njezine segmentalne ogranke ili donju šuplju venu ispod ošita

T3c: tumor se nalazi unutar donje šuplje vene iznad ošita

T4: tumor prodire izvan Gerotine fascije

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

Nx: status regionalnih čvorova ne može biti određen

N0: 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: prisustvo udaljenih metastaza ne može biti određeno

M0: bez udaljenih metastaza

M1: prisutne udaljene metastaze

Tablica 5. Grupiranje karcinoma bubrega u stadije s obzirom na TNM klasifikaciju

Stadij	T	N	M
Stadij I	T1	N0	M0
Stadij II	T2	N0	M0
Stadij III	T3	N0	M0
	T1,T2,T3	N1	M0
Stadij IV	T4	N0,N1	M0
	Bilo koji T	N2	M0
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

b) histološki čimbenici

U histološke čimbenike spadaju nuklearni gradus po Fuhrmanu, histološki subtip, prisustvo sarkomatoidne komponente, mikrovaskularna invazija, nekroza tumora i invazija kanalnog sustava.

U klasifikaciji nuklearnog gradusa koristi se Fuhrmanova 4-stupanjska podjela koja se temelji na veličini jezgre, iregularnosti jezgre, nukleolarnoj prominenciji ili prisustvu neobičnih multilobularnih jezgara i grubo grudastog kromatina (66):

I STUPANJ: male (do 10 μm), okrugle, pravilne, hiperkromatske jezgre s nezamjetnim nukleolima,

II STUPANJ: jezgre srednje veličine (oko 15 μm), s nepravilnim rubovima, mali nukleoli (vidljivi pod povećanjem od 400x), fino granulirani kromatin,

III STUPANJ: velike (oko 20 μm) jezgre s izraženo nepravilnim rubovima i istaknutim nukleolima,

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

Iako je određivanje nuklearnog gradusa podložno intra- i inter-observerskom razlikovanju, radi se o važnom neovisnom prognostičkom čimbeniku (66-69).

Najčešći histološki subtipovi su svjetlostanični, papilarni i kromofobni tip. U studiji s Mayo klinike, na 2385 bolesnika, najveće 5-godišnje preživljenje imali su bolesnici s papilarnim RCC (87,4%), nešto slabije s kromofobnim (86,7%) i najmanje bolesnici s svjetlostaničnim subtipom tumora (68,9%) (68). U europskoj studiji na 4000 bolesnika u univarijantnoj analizi prisustvo određenog histološkog subtipa bilo je povezano s duljim preživljenjem, ali u multivarijantnoj analizi kao neovisan prognostički čimbenik pokazao se tumorski stadij, Fuhrman nuklearni gradus i ECOG status, a ne i histološki subtip (69). U najnovije vrijeme su se unutar papilarne grupe tumora izdvojila dva podtipa s različitom prognozom koja je izuzetno povoljna za tip I, a nepovoljna za tip II (70).

c) klinički čimbenici

U kliničke faktore s prognostičkom ulogom spadaju stupanj opće tjelesne sposobnosti bolesnika (ECOG status), prisustvo simptoma, kaheksija, anemija i broj trombocita (69,71-76).

ECOG status:

0 stupanj: potpuno aktivan bolesnik – kao i prije bolesti, potpuno sposoban da se brine za sebe, bez ikakvih ograničenja,

I stupanj: ograničen u izvođenju teških tjelesnih aktivnosti ali pokretan, sposoban da se brine za sebe i da se bavi lakšim poslom kao npr. lakšim kućnim poslom ili radom u uredu,

II stupanj: pokretan, sposoban da se brine za sebe ali nesposoban za provođenje bilo kakvih radnih aktivnosti, može stajati preko 50% budnog vremena,

III stupanj: ograničeno se može brinuti o sebi, ograničen na krevet ili kolica više od 50% budnog vremena,

IV stupanj: potpuno nesposoban da se brine za sebe, potpuno vezan uz krevet ili kolica,

V stupanj: mrtav.

d)molekularni čimbenici

Postoje brojni molekularni čimbenici koji su istraživani kao potencijalni prognostički faktori: karbonska anhidraza IX i XII, VEGF, HIF, Ki67, p53, PTEN, E-kadherin, CD 44 (77). Za sada niti jedan od njih nije ušao u svakodnevnu uporabu kao npr. prostata specifični antigen u oboljelih od karcinoma prostate. Također je u najnovije vrijeme izrađen profil genske ekspresije u RCC kojim je indentificirano 259 gena koji mogu služiti kao prognostički čimbenik neovisno o kliničkim prognostičkim faktorima (78).

1.2.8.Liječenje

Liječenje karcinoma bubrega je operacijsko, liječenje zračenjem i medikamentozno. Za sada je jedino operacijskim liječenjem moguće postići izlječenje.

1.2.8.1. Operacijsko liječenje

Radikalna nefrektomija i dalje je „zlatni standard“ u terapiji RCC. Ona sadržava:

nefrektomiju zajedno sa Gerotinom fascijom, istostranu adrenalektomiju, te regionalnu limfadenektomiju. Operacija se može učiniti otvorenim, „klasičnim“ putem (lumbotomijom ili transabdominalno) ili laparoskopski. U najnovije vrijeme adrenalektomija se radi samo kod tumora gornjeg pola bubrega (rizik od direktne invazije) i tumora koji su veći od 7 cm (rizik od metastatskog širenja u nadbubrežnu žlijezdu), naravno uz negativan nalaz slikovnih metoda. Također danas se preporuča učiniti samo perihilarnu limfadenektomiju radi određivanja tumorskog stadija dok sama limfadenektomija, pa bila i proširena, nema utjecaja na preživljenje (17,32,79-82).

Parcijalna nefrektomija (enukleacija tumora, segmentalna polarna nefrektomija, klinasta resekcija ili heminefrektomija) odnosno poštedna nefrektomija („nephron sparing surgery“) ima slijedeće indikacije:

- apsolutne: tumor na solitarnom bubregu, agenezija kontralateralnog bubrega, obostrani tumor bubrega, multifokalni tumori u bolesnika s obiteljskim RCC (von Hippel-Lindau bolest),
- relativne: tumor jednog bubrega uz značajnu patologiju kontralateralnog bubrega kao stenoza renalne arterije, hidronefroza, učestali pijelonefritisi, značajna ili recidivirajuća nefrolitijaza, dijabetes, nefroskleroza, stenoza pijeloureteričnog vrata,
- elektivne: slučajni nalaz tumora manjeg od 4 cm uz uredan kontralateralni bubreg (83).

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) (83). Odluke o parcijalnoj nefrektomiji su uvijek individualne, shodno statusu bolesnika, te učinjenim slikovnim pretragama.

Postoje i minimalno invazivne tehnike liječenja karcinoma bubrega: perkutana radiofrekventna ablacija, krioablacija, ablacija mikrovalovima, laserska ablacija i ablacija

ultrazvukom (HIFU), koje su alternativa klasičnom operacijskom liječenju. Prednosti ovih metoda su smanjen morbiditet, kraći boravak u bolnici i mogućnost da se liječe bolesnici s visokim operativnim rizikom. Nedostatak je što se ne uklanja tumor i nema patohistološkog nalaza. Generalna preporuka je da se na taj način liječe bolesnici koji nisu sposobni za klasični ili laparoskopski operacijski zahvat (84-86).

Kod uznapredovalog RCC postavlja se pitanje opravdanosti operacijskog liječenja. Naime postoje čimbenici koji govore za i protiv operacije (tablica 6) (87).

Tablica 6. Prikaz stavova o operaciji kod uznapredovalog karcinoma bubrega (87)

ZA	PROTIV
Prevenција komplikacija (krvarenje, bolovi) Moguće spontano smanjenje metastaza pa čak i njihov nestanak Otklanjanje uzroka novim metastazama Smanjenje tumorske mase zbog boljeg djelovanja dodatne terapije Kvaliteta života	Postoje druge, manje agresivne metode (embolizacija, zračenje, HIFU) Opasnost (perioperativni morbiditet i mortalitet) Ne produžuje se preživljenje Može oslabiti imunološki sustav Kvaliteta života

Iako dileme postoje, naročito obzirom na preživljenje i kvalitetu života, u bolesnika s metastatskom bolesti preostaju sljedeće mogućnosti: nefrektomija s ili bez uklanjanja metastaza a nakon toga medikamentozna terapija, smanjivanje tumorske mase (nefrektomija) nakon koje slijedi medikamentozna terapija, inicijalna medikamentozna terapija uz nefrektomiju u slučaju primjerenog odgovora ili samo medikamentozna terapija. Pokazalo sa da istovremeno korištenje više načina liječenja usporava progresiju bolesti i produžava preživljenje (87).

Iz tablice 7 vidljiva je shema praćenja bolesnika operiranih zbog RCC, a prema preporukama Europskog urološkog udruženja (EAU) (32).

Tablica 7. Prikaz načina praćenja bolesnika operiranih zbog karcinoma prostate

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

1.2.8.2 Liječenje zračenjem

Radijacijsko liječenje se koristi kao adjuvantna terapija nakon radikalne nefrektomije i za palijacijsko liječenje metastaza. Većina studija nije pokazala da zračenje poboljšava preživljenje ili smanjuje nastanak lokalnog recidiva. Iz toga razloga smatra se da su tumori bubrega radiorezistentni i preporuča se korištenje zračenja u liječenju metastatskih promjena (prvenstveno moždanih i koštanih) (32, 88-90).

1.2.8.3. Medikamentozna terapija metastatskog karcinoma bubrega

Medikamentozna terapija se može podijeliti na:

- hormonalnu terapiju,
- kemoterapiju,
- imunoterapiju,
- tzv. „ciljanu terapiju“.

Hormonalna terapija se počela koristiti osamdesetih godina prošlog stoljeća kada se pokazalo da davanje dietilstilbestrola eksperimentalnim životinjama (sirijski hrčci) dovodi do nastanka karcinoma bubrega, a davanje progesteronskih preparata inhibira rast tumorskih stanica. Međutim, klinička praksa nije pokazala nikakvu korist u njihovoj primjeni (najčešće medroksiprogesteron-acetata) te se danas više ta terapije ne koristi (91,92).

Kemoterapija se, do sada, nije pokazala kao uspješni oblik liječenja bolesnika s RCC jer je pozitivan odgovor prisutan samo u 9% bolesnika, a i kod njih kratkotrajno (93). Većina RCC je podrijetla stanica proksimalnih tubula koje posjeduju protein koji je odgovoran za rezistenciju na kemoterapeutike (MDR, multiple-drug resistance protein), a u većine ovih tumora MDR protein je jako eksprimiran te shodno tome radi se o karcinomu čije su stanice rezistentne na većinu kemoterapeutika (94). Brojni se kemoterapeutici koriste u liječenju RCC (vinblastin, karboplatin, 5-fluorouracil, gemcitabin, docetaksel, retinoidi) od kojih je jedino kombinacija 5-fluorouracila s gemcitabinom pokazala pozitivan učinak na preživljenje (95).

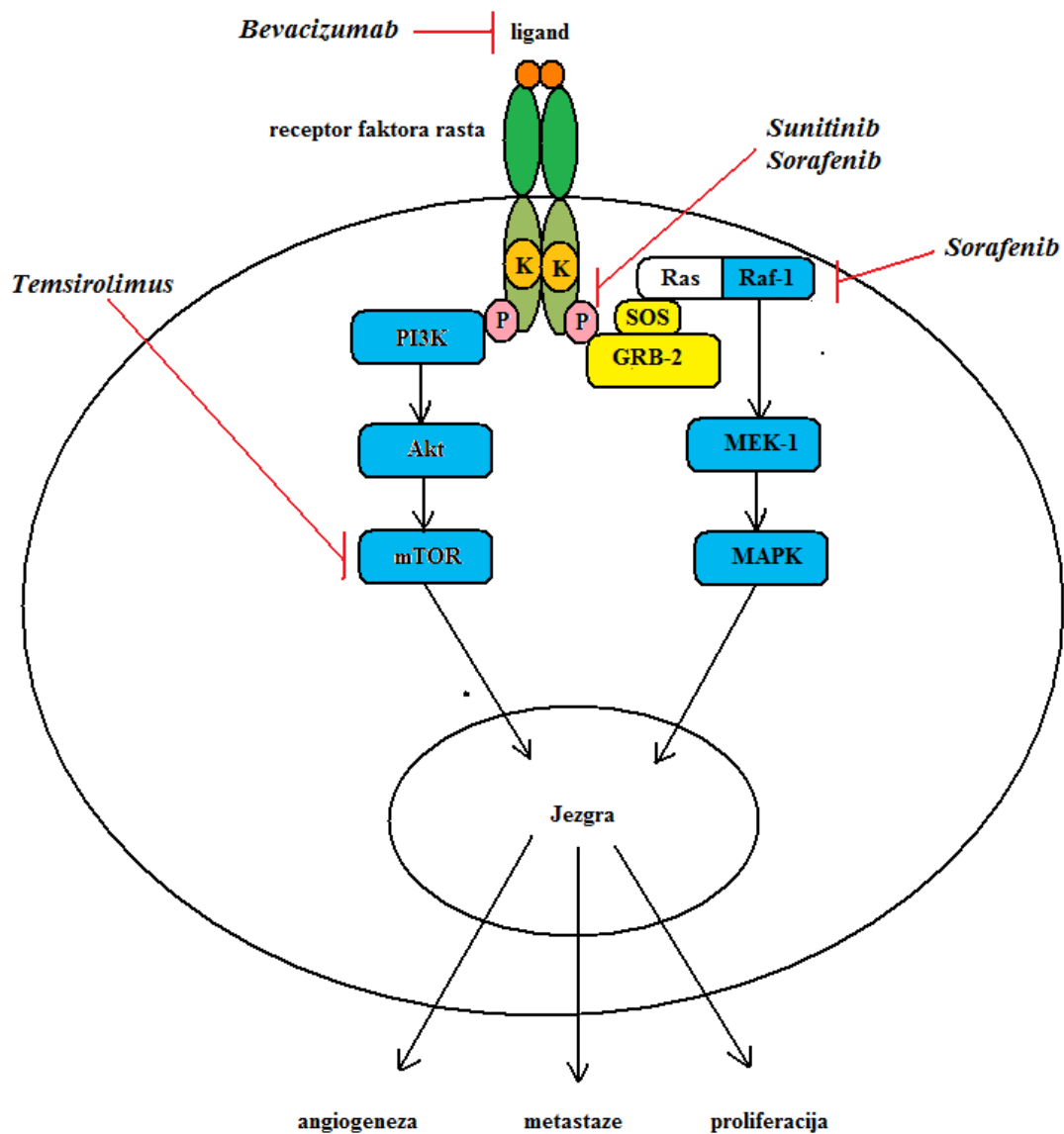
Imunoterapija se u bolesnika s RCC sastoji od primjene interferona alfa (INF- α), interleukina-2 (IL-2) i njihove kombinacije. Pacijenti koji mogu očekivati povoljan učinak su oni s učinjenom nefrektomijom, dobrim općim statusom, uz prisustvo manjih plućnih ili metastaza mekih tkiva te bez ili s minimalnim simptomima. Odgovor na terapiju s INF- α je 13,7%, s IL-2 15,4% a njihovom kombinacijom 20,6%, međutim utjecaj na poboljšanje preživljenja je minimalan (32,96).

„Ciljana terapija“ predstavlja najnoviji vid liječenja RCC, a nastala je na osnovi rezultata istraživanja molekularnih zbivanja u patogenezi bubrežnog karcinoma. Radi se o lijekovima koji blokiraju točno određenu molekulu koja ima ulogu u tumorigenezi. Posebno se izdvajaju lijekovi koji djeluju putem VEGF-a i oni koji djeluju putem TGF- α .

VEGF je snažno eksprimiran u svjetlostaničnom karcinomu bubrega i izrazito je važan faktor u tumorskoj angiogenezi. Istraživanje kod bolesnika s metastatskim karcinomom bubrega koje je ispitivalo efikasnost bevacizumaba, humaniziranih protutijela na VEGF, pokazalo je da primjena ove terapije produžuje interval do tumorske progresije za 4,8 mjeseci za razliku od placeba (2,5 mjeseca) (97). Inhibitori VEGF receptora (točnije njegove tirozin kinaze) su lijekovi koji su danas, u razvijenim zemljama svijeta, postali neizostavni dio liječenja bolesnika s metastatskim karcinomom bubrega. U tu skupinu lijekova spadaju sorafenib i sunitinib. Sunitinib je inhibitor tirozin kinaze koja selektivno inhibira PDGFR, VEGFR, c-Kit i Flt-3 (51). Sorafenib je multikinazni inhibitor koji inhibira Raf kinazu, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, Flt-3 i c-Kit (51). Odgovor na terapiju ovim lijekovima se postiže u 34-40% bolesnika uz dulje preživljenje u odnosu na kemoterapiju i imunoterapiju (32,51,98).

TGF- α je snažan čimbenik rasta za epitelne stanice koji djeluje putem receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR). EGFR je receptorska tirozin kinaza. VHL djeluje inhibitorno na TGF- α (99). TGF- α je snažno eksprimiran u stanicama svjetlostaničnog karcinoma bubrega. Povećanje njegove ekspresije je rani događaj u tumorigenezi karcinoma bubrega, a i rast tumorskih stanica, in vitro, ovisi o TGF- α koji ga potiče (100,101). Antitijela protiv EGFR se vežu za ovaj receptor i smanjuju njihov broj na površini stanice. Humanizirana monoklonalna antitijela za EGFR, panitumumab, međutim nisu pokazala ohrabrujuće rezultate u liječenju bolesnika s RCC kao niti inhibitori EGFR tirozin kinaze gefitinib i erlotinib (102).

Na slici 6 vidi se mehanizam djelovanja najčešćih lijekova koji se koriste u liječenju karcinoma bubrega (kao i nekih drugih tumora poput karcinoma kolona i pluća) (103).



Slika 6. Shematski prikaz signalnih puteva u tumorskim stanicama karcinoma bubrega i ciljane terapija kojom se oni mogu blokirati. Bevacizumab djeluje direktno na ligand (VEGF) i neutralizira ga. Sunitinib i sorafenib inhibiraju aktivnost tirozin-kinaze (K) u nekoliko vrsta receptora. Sorafenib također inhibira i protein kinazu Raf-1. Temsirolimus inhibira mTOR kinazu. Modificirano prema: *De Mulder PHM, Patard JJ, Szczylik C, Otto T, Eisen T. Current status of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. Eur Urol Supl 2007;6:665-71. (103)*

Iz tablice 8 vide se lijekovi tzv. „ciljane terapije“ kod karcinoma bubrega od kojih su neki još u fazi kliničkog ispitivanja (102,103).

Tablica 8. Lijekovi tzv. „ciljane terapije“

Vrsta lijekova	Mehanizam djelovanja
Protutijela: -WX-250 -bevacizumab -panitumumab ABX-EGF -MDX-010 -cetuximab IMC-C225	-protutijela za CAIX -neutralizirajuća protutijela za VEGF -protutijela za EGFR -protutijela za UTLA-4 -protutijela za EGFR
Inhibitori angiogeneze: -talidomid -analog talidomida (CC5013) -antagonist receptora za endotelin-1 (atrasentan) -indolinon (SU-01248) -VEGFR+EGFR inhibitori (ZD6474) -VEGFR inhibitori (PTK 787) -trombospondin-1 nalik supstance (ABT-510)	-imunomodulatorni učinak uz inhibiciju VEGF -kao talidomid -selektivni antagonist receptora za endotelin-1 -inhibira VEGFR, PDGFR, c-kit -inhibira VEGFR i EGFR -selektivno inhibira VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3 tirozin kinazu -sintetski peptid koji poput trombospondina-1 ima antiangiogenu ulogu
Inhibitori malih molekula: -rapamicin i njegovi analozi -temsirolimus (CCI-779) -RAD001	-inhibiraju PI3K-AKT-mTOR signalni put
Inhibitori Raf kinaze (BAY 43-9006)	-inhibira Raf kinazu i VEGFR-2
Inhibitori proteosoma (bertezomib, PS-341)	-inhibira 26S proteosomsku katalitičku aktivnost i time sprečava proteolizu
Inhibitori EGFR tirozin kinaze: -gefitinib, ZD1839 -erlotinib, OSI 774	-inhibira EGFR tirozin kinazu -inhibira EGFR tirozin kinazu

1.3. Koštani morfo-genetski proteini

1.3.1. Uvod

Desetljećima je poznata činjenica kako demineralizirana kost ima sposobnost stvaranja novog koštanog tkiva. Huggins je 1931. zamijetio kako demineralizirana kost, ali i prijelazni epitel uropoetskog sustava, imaju sposobnost stvaranja ektopičnog koštanog tkiva (104). Prvi koji je to ekstenzivno istraživao bio je ortopedski kirurg dr. Marshall Urist početkom šezdesetih godina 20. stoljeća. On je dokazao kako je za to zaslužna organska

komponentna kostiju odnosno određeni proteini koje je zbog njihove aktivnosti imenovao koštani morfogenetski proteini (BMP: bone morphogenetic protein). Spoznao je kako implantacija proteinskog dijela koštanog matriksa u mišićno tkivo dovodi do nakupljanja mezenhimalnih stanica te dolazi do indirektnog (preko hrskavice) ili direktnog stvaranja koštanog tkiva (105-107). Sve do 80-tih godina prošlog stoljeća nisu se uspjeli identificirati pojedinačni proteini. Korištenjem DNA tehnologije otkrilo se da koštani matriks sadržava BMP-2 do BMP-8 koji imaju osteoinduktivnu ulogu te da pripadaju nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β) (108). Kasnije su otkriveni i drugi članovi BMP obitelji uz spoznaju kako su oni ubikvitarni u organizmu i imaju važnu ulogu u embrionalnom razvoju brojnih organskih sustava kao i značajnu ulogu u postnatalnom razdoblju (108). Spoznaja kako se radi o čimbenicima rasta i diferencijacije, kao i da nisu prisutni samo u koštanom tkivu, dovela je do uporabe novog termina za ove proteine: GDF (growth and differentiation factors- čimbenici rasta i diferencijacije) (109).

Nadobitelj transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β) se sastoji od nekoliko obitelji signalnih molekula: BMP, aktivini i inhibini, TGF- β obitelji te GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (110). Radi se o većem broju faktora rasta i diferencijacije koji su povezani preko sličnog primarnog slijeda aminokiselina, a ujedno su svi i dimerne molekule. Svaka njihova podjedinica sadržava tri disulfidne veze unutar lanaca a podjedinice su međusobno vezane četvrtom vezom. Izuzetak je BMP-1 koji je proteaza prokolagena C i ne spada u ovu obitelj. Velika većina ove nadobitelji, uključujući i BMP, nastaje kao prekursor molekule, a propeptid se odvaja od definitivnog proteina prilikom njegovog izlaska iz stanice (111).

BMP su jedna od najvećih obitelji, unutar nadobitelji TGF- β , s više od 20 proteina koji su pronađeni u različitim vrstama od morskih ježeva do sisavaca. Oni su također pronađeni i u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) gdje su produkti gena dpp (decapentaplegic), 60A i Scw (Screw). U vinske mušice imaju važnu ulogu u morfogenezi tijekom embrionalnog razdoblja (112).

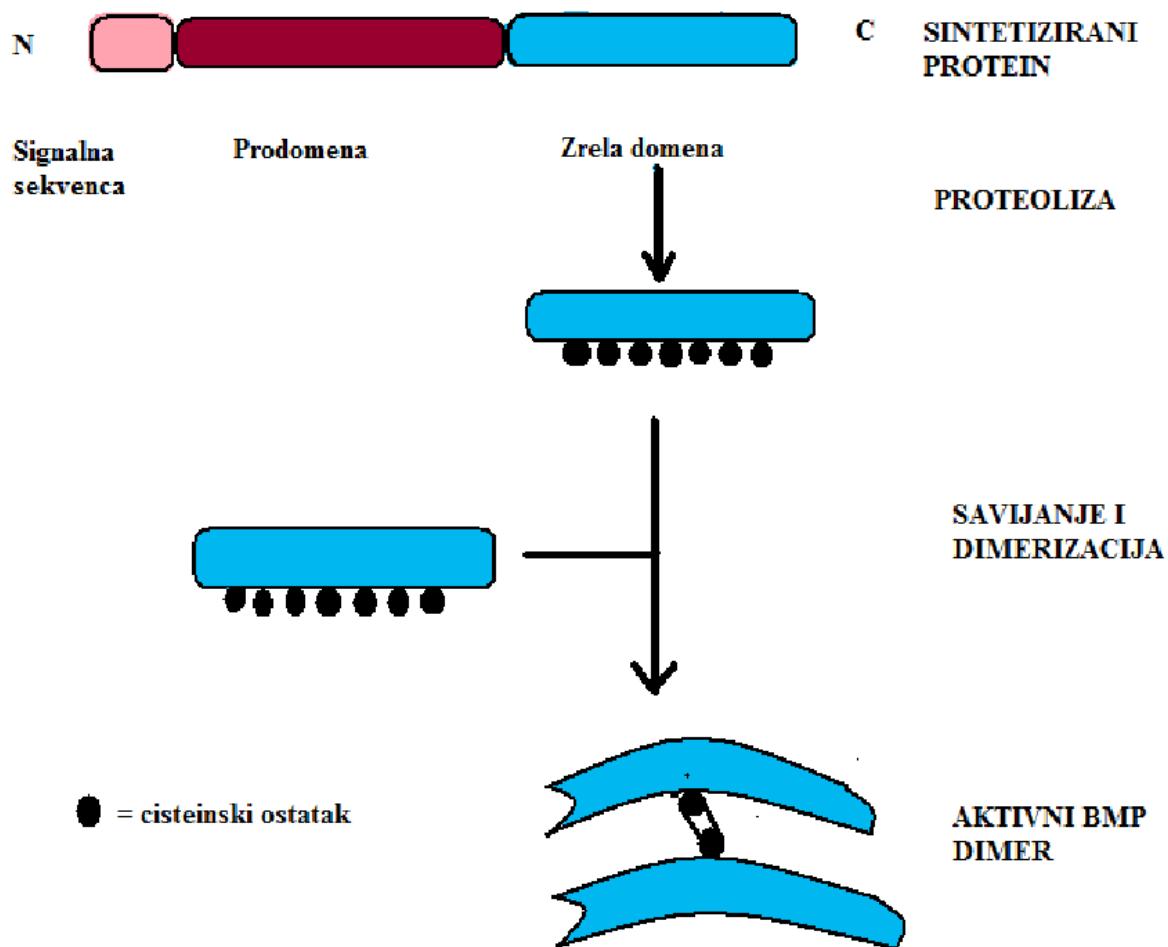
1.3.2. Struktura koštanih morfogogenetskih proteina

BMP propeptid se sastoji od aminoterminalnog kraja veličine 15-25 aminokiselina, prodomene veličine 50-375 aminokiselina te karboksiterminalne domene veličine 110-140 aminokiselina (113). Proteolitičkim djelovanjem karboksiterminalna domena se odvaja od prodomene i time se oslabađa aktivni BMP peptid (slika 7). Aktivni BMP peptid sadrži 7 cistinskih ostataka što je karakteristika članova TGF- β nadobitelji. Kada se protein savija, 6 cistinskih ostataka formira tri disulfidne veze unutar lanaca stvarajući tzv. cisteinski čvor, a sedmi cistinski ostatak sudjeluje u stvaranju mosta između dvije molekule čime nastaje dimer (dakle dimer ima dvije molekule BMP proteina). Dimerizacija daje proteinu konveksnu i konkavnu stranu, što je neophodno za ostvarivanje njegove biološke funkcije, a ujedno mu daje i potrebnu stabilnost.

Aktivni BMP možemo pronaći u obliku homodimera (dvije identične BMP molekule) ili heterodimera (dvije različite BMP molekule) s biološkom aktivnošću koja je jača kod heterodimera (113). BMP možemo otkriti intracelularno, u ekstracelularnom matriksu te u malim količinama i u krvi (114). Aktivirani BMP imaju molekularnu težinu 20-30 kDa i vežu se na svoje membranske receptore (115).

S obzirom na slijed aminokiselina mogu se podijeliti u nekoliko grupa. Prvu grupu čine BMP-2 i BMP-4, drugu BMP-5, -6, -7 i -8, treću BMP-3, četvrtu BMP -9 i -10, petu BMP-12 i -13 i šestu BMP-11 i GDF-8 (111). Svaki BMP ima specifična strukturalna obilježja.

Ove molekule sudjeluju u regulaciji različitih bioloških procesa poput stanične proliferacije, apoptoze, stanične diferencijacije i morfogeneze (116). Jedna od njihovih najvažnijih karakteristika je da sudjeluju u razvoju različitih tkiva i organa, a koja nastaju interakcijom između mezenhima i epitela (117). Koštane morfogogenetske proteine pronalazimo ne samo u kostima odraslog čovjeka, već praktički i u svim ostalim organima i tkivima ljudskog tijela.



Slika 7. Nastajanje aktivnog BMP dimera. BMP proprotein ima tri domene iz kojih se odvaja karboksiterminalna domena. Ona ima sedam cisteinskih ostataka od kojih šest služi za stvaranje disulfidnih veza unutar BMP proteina a sedma služi za spajanje dva BMP proteina te nastaje BMP dimer.

Kao i svaki drugi proteini i BMP imaju svoje gene koji ih kodiraju. Uloge pojedinih BMP su se najbolje pokazale u eksperimentalnim životinjama koje su imale defektan gen za točno određeni protein. Sintezom dobivenih rezultata pokazalo se da BMP ima značajnu ulogu u razvoju skeleta, živčanog sustava, oka, bubrega i srca. Iz tablice 9 može se vidjeti kromosomska lokalizacija određenog BMP-a i bolest vezana uz njegov nedostatak (u ljudi), a iz tablice 10 u miša (110,118).

Tablica 9. Kromosomska lokalizacija koštanih morfogenetskih proteina i pripadajuće bolesti u ljudi (110)

BMP	Kromosomsko mjesto	Bolest (u ljudi)
BMP-2	20p12	Holt-Oramov sindrom
BMP-3	4p14.8-q21	Dentinogenesis imperfecta II
BMP-3B	10	/
BMP-4	14q22-23	Holt-Oramov sindrom
BMP-5	6	/
BMP-6	6	/
BMP-7	20	Holt-Oramov sindrom
BMP-8A	1	/
BMP-8B	1	/
GDF-1	19	/
BMP-14 (GDF-5)	20	Grebe-ov sindrom, Hunter-Thompsonova bolest
BMP-13 (GDF-6)	2	/
BMP-15 (GDF-7)	2	/
GDF-8	2	/
GDF-9	2	/
GDF-10	10	/
GDF-11	12	/

Holt-Oramov sindrom: defekt u razvoju srca i skeleta što dovodi do razvoja septalnog defekta srca kao i anomalnog razvitka gornjih ekstremiteta; Dentinogenesis imperfecta: poremećaj razvoja zubiju; Grebe-ov sindrom i Hunter-Thompsonova bolest spadaju u hondrodisplazije.

Tablica 10. Kromosomska lokalizacija koštanih morfogenetskih proteina i pripadajuće anomalije u miševa (110,118)

BMP	Kromosomsko mjesto	Bolest (u miševa)
BMP-2	2	Maleni alantoidis, nedostatak amniona, srčani defekti
BMP-3	5	Povećana gustoća kostiju
BMP-4	14	Defekti srca, cistični bubrezi, kraniofacijalne malformacije, mikroftalmija, polidaktilija
BMP-5	9	Kratke uši, defekti skeleta, pluća i bubrega
BMP-6	13	Hidrocefalus, odgođena osifikacija sternuma
BMP-7	2	Poremećen razvoj bubrega i oka, defekti skeleta
BMP-8A	4	Poremećaj u spermatogenezi i u razvoju epididimisa
BMP-8B	4	Poremećaj u razvoju testisa, funikulusa spermatikusa te poremećaj spermatogeneze
GDF-1	16	Asimetrija tijela
BMP-14 (GDF-5)	2	Brahipodizam
BMP-13 (GDF-6)	4	/
BMP-15 (GDF-7)	12	Poremećen razvoj leđne moždine
GDF-8	1	Uvećana mišićna masa
GDF-9	11	Infertilitet, poremećena folikulogeneza
GDF-10	14	/
GDF-11	10	Defekt u razvoju aksijalnog skeleta

Osim samih koštanih morfogenetskih proteina i oštećenje njegova signalna puta može pridonijeti razvoju određenih bolesti kako pre- tako i postnatalno. Tako primjerice nedostatak BMPR-IA i Smad4 dovodi do juvenilne polipoze kolona koja može progredirati u karcinom što

govori u prilog tome kako BMP-Smad signalni put ima, potencijalnu, tumor supresijsku ulogu kod karcinoma kolona. Nedostatak BMPR-IB dovodi do brahidaktilije, BMPR-II do primarne plućne hipertenzije, a noggina do simfalangizma i sindroma multiple sinostoze (114).

1.3.3. Receptori koštanih morfogogenetskih proteina

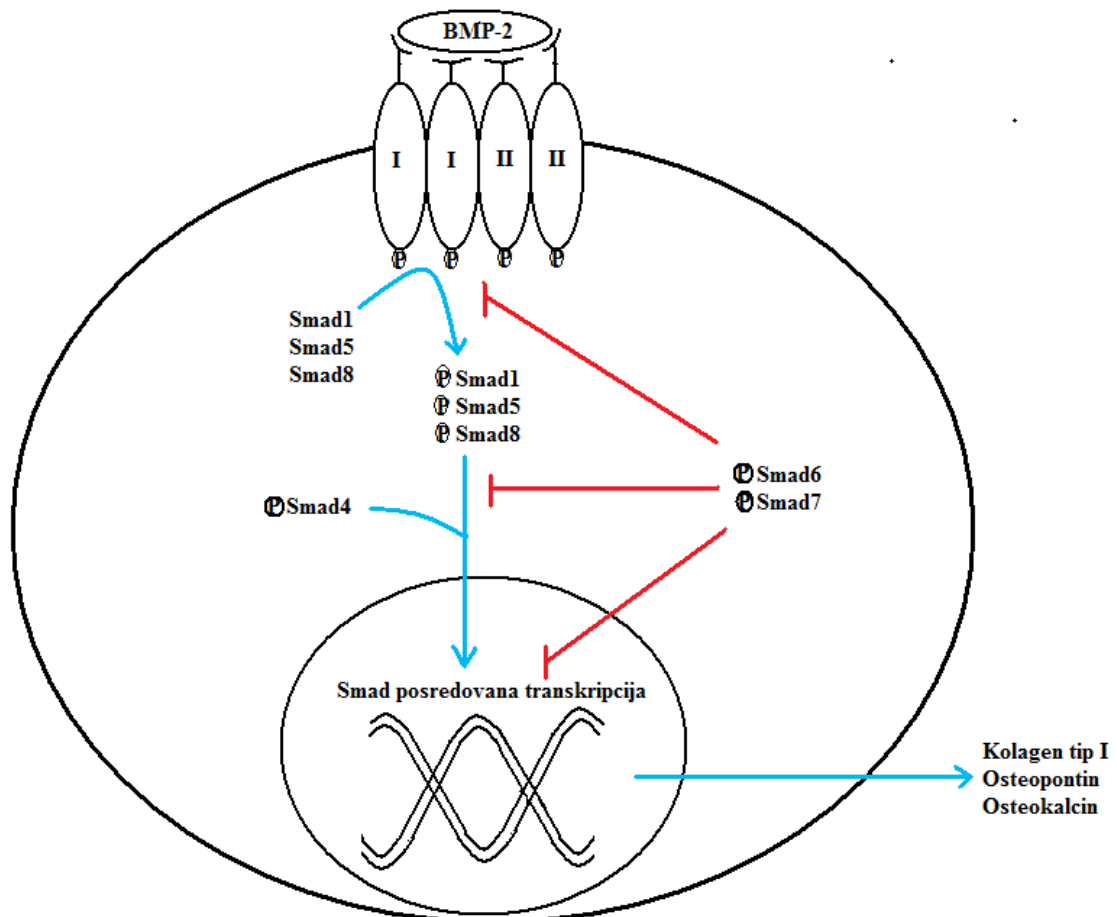
Biološki efekt BMP ostvaruju vezanjem na receptore koji se nalaze na staničnoj membrani. Iako postoje 3 tipa TGF- β receptora koštani morfogogenetski proteini se vežu za receptore tipa I i II (104). Struktura oba tipa receptora je slična. Oni imaju kratki ekstracelularni dio, transmembranski dio i intrastanični dio koji ima serin/treonin kinazu. Na N-terminalnom kraju intrastaničnog dijela receptora tipa I, a ne i receptora tipa II, nalazi se GS domena (glicin-serin domena) (110). Potrebna je aktivacija oba tipa receptora kako bi signal bio adekvatno prenesen. Receptor tipa II (odnosno njegova kinaza) je trajno aktiviran dok se receptor tipa I aktivira ligandom, ali i djelovanjem receptora tipa II (fosforilira GS domenu koja aktivira kinazu). Iz toga razloga možemo reći da je specifičnost prijenosa intrastaničnog signala određena aktivacijom receptora tipa I. Receptori tipa I za koje se vežu BMP su ALK-2 (activin receptor-like kinase ili Act-RI), ALK-3 (BMPR-IA) i ALK-6 (BMPR-IB). Receptori tipa II za koje se vežu BMP su: BMPR-II, ActR-II (activin type II receptor) i ActR-IIB (119). Preko receptora BMPR-IA, BMPR-IB te BMPR-II djeluju svi koštani morfogogenetski proteini dok preko drugih receptora djeluju samo pojedini BMP. Receptori su različito zastupljeni u različitim tkivima. Receptori oba tipa se nalaze na staničnoj membrani kao monomeri (jedan tip I ili II receptor), homodimeri (dva receptora tipa I ili II) ili preformirani receptorski kompleks (dva receptora tipa I + dva receptora tipa II). Općenito, tip I receptora je receptor s visokim afinitetom za BMP, a tip II ima relativno nizak afinitet. Nakon vezanja liganda za receptore nastaje heterotetramerni kompleks od dva para receptora tipa I i II. Aktivirani receptor tipa I tada šalje signal unutar stanice do jezgre. BMP se mogu vezati na receptore kao homodimeri (npr. dvije molekule BMP-2), ali je aktivacija BMP receptora daleko snažnija ako se veže heterodimer (primjerice jedna molekula BMP-2 i jedna molekula BMP-7) (104).

1.3.4. Signalni put

BMP signalni put započinje vezanjem BMP liganda za kompleks receptora tipa I i tipa II nakon čega receptor tipa I procesuirá BMP signal u stanicu i pokreće jedan od dva signalna puta.

Prijenos signala unutar TGF- β nadobitelji se dominantno provodi putem Smad signalnog puta. On se sastoji od tri tipa Smad molekula: R-Smad (Smad aktivirani receptorima; Smad1, 2, 3, 5 i 8), koje fosforiliraju i time aktiviraju TGF- β receptori, Co-Smad (Smad kostimulatori; Smad4) koji nisu fosforilirani BMP receptorima, ali pomažu R-Smad-ovima u prenošenju signala i I-Smad (inhibitorne Smad molekule; Smad 6 i 7) koji su antagonisti za R-Smad i Co-Smad. BMP signalni put koristi Smad1, 5 ili 8, a Smad2 i Smad3 sudjeluju u prenašanju signala aktivina i TGF- β 1. Co-Smad i I-Smad molekule su im zajedničke. Aktivirani tip I BMP receptora fosforilira Smad1, 5 ili 8 (koji su supstrat kinaze receptora tipa I) koji se spaja sa Smad 4 u jedan heterodimerski kompleks. Fosforilacija Smad1, 5 ili 8 ovisi o vezanom ligandu. Taj heterodimerski kompleks ulazi u jezgru i veže se za SME („Smad DNA binding element“) odnosno BRE („BMP responsive elements“) koji regulira transkripciju ciljnih gena (120-122). Smad kompleks može transkripciju potaknuti (aktivacija transkripcijskih aktivatora) ili je suzbiti (aktivacija transkripcijskih supresora). Ciljni transkripcijski faktori su FoxH, Runx2, Gli3, Stat3, β -catenin, a ciljni geni su: Id1-Id4, Osterix, Msx1, Msx2, Smad6, Smad7, Prx2, TIEG, Hey1 i Tcf7 (114). Regulacijom transkripcije određenih gena koštani morfogenetski proteini utječu na slijedeća stanična zbivanja: proliferaciju, diferencijaciju, morfogenezu i apoptozu. Njihovo djelovanje je specifično za određeni tip stanice kao i za određeni stanični stadij. BMP djeluje na različite tipove stanice kao što su: mioblasti, epitelne stanice, osteoblasti, hondrociti, neuroni, embrionalne matične stanice i neke somatske matične stanice. Primjerice, BMP-2 kod mezenhimalnih matičnih stanica koštane srži dovodi do stvaranja kolagena tipa I, osteopontina i osteokalcina (slika 8) (104). Ova različitost je jedna od važnih karakteristika BMP-Smad signalnog puta (104,123,124). Inhibitorni Smad-ovi svoj učinak postižu vezanjem na intrastanični dio receptora (BMPRII), inhibicijom fosforilacije R-

Smadova, Smad-6 je kompetitivni antagonist za Smad-4 i inhibiraju Smad-ovima posredovanu transkripciju gena (125). Ekspresija I-Smadov-ova je potaknuta djelovanjem različitih čimbenika poput EGF, TGF- β 1, aktivina i BMP-7 (126).



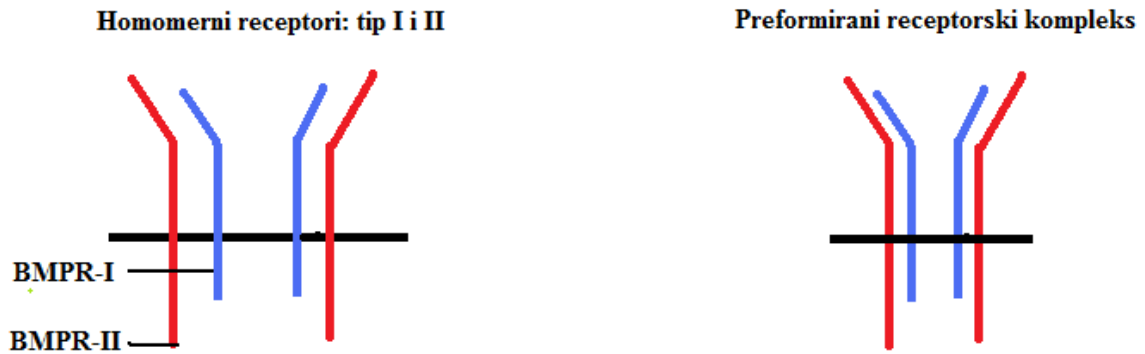
Slika 8. Prikaz djelovanja BMP-2 u mezenhimalnim matičnim stanicama koštane srži. BMP-2 se najprije veže za receptorski kompleks na staničnoj membrani. Signal dalje putuje unutar stanice putem Smad signalnog puta (Smad 1, 5, 8 uz pomoć Smad4) i ulazi u jezgru. Tamo se Smad kompleks veže za DNA i dolazi do prepisivanja ciljnih gena koji kodiraju određene proteine (kolagen tip I, osteopontin, osteokalcin). Modificirano prema: *Samartzis D, Khanna N, Shen FH, Howard SA. Update on bone morphogenetic proteins and their application in spine surgery. J Am Coll Surg 2005;200:236-48. (104)*

Postoje i drugi signalni putevi preko MAPK („Mitogene-activated protein kinase“) uključujući ERK (extracellular signal-regulated kinases) i p38 kinazu (127). Kod p38 najprije dolazi do aktivacije TAK1 (Tak binding protein), koji je indirektno vezan za receptor tipa I putem proteina XIAP (član obitelji inhibitora apoptoze – inhibitor of apoptosis= IAP) i TAB1, i on

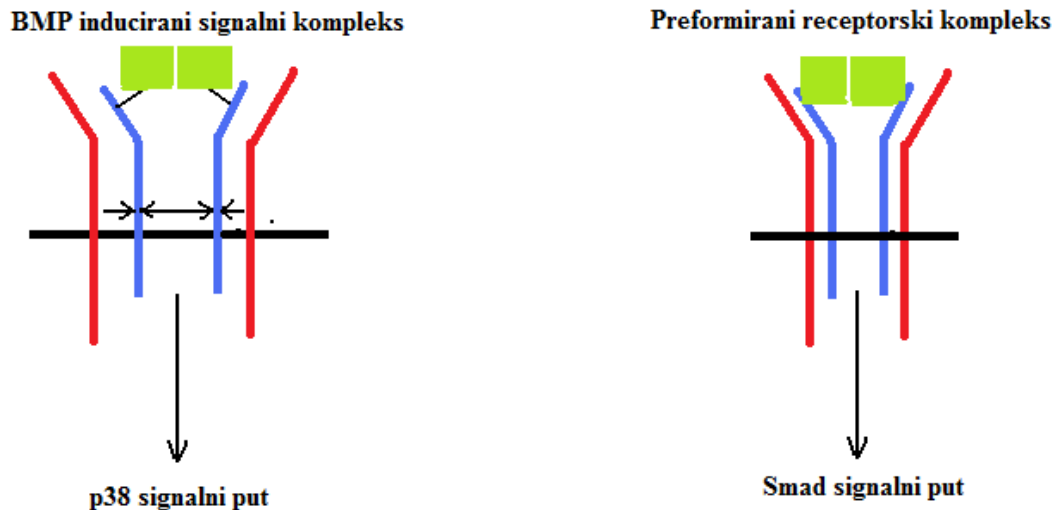
dalje aktivira p38. Inhibitorni Smad6 djeluje na oba signalna puta blokirajući Smad1 (Smad put) i TAK1 (p38 put) (127).

Odabir prijenosa signala se vrši na temelju oligomerizacije BMP receptora. Kada postoji preformirani receptorski kompleks signal se prenaša Smad signalnim putem. Alternativno, vezanjem za visokoafinitetni monomerni receptor tipa I nastaje njihova homodimerizacija kojoj se kasnije priključuje i receptor tipa II. Taj kompleks se zove BISC (BMP-2 induced signaling complex – dokazan kod BMP-2) i dovodi do aktivacije Smad neovisnog p38 signalnog puta (127). Smatra se kako receptori tipa II određuju strukturu i organizaciju receptora tipa I, a time utječu i na signalni put. Naime u prisustvu receptora tipa II, nakupine receptora tipa I se preformiraju i stvara se preformirani heterotetramerni kompleks koji dovodi do aktivacije Smad signalnog puta (slika 9) (127).

BMP RECEPTORI PRIJE VEZIVANJA LIGANDA



BMP RECEPTORI NAKON VEZIVANJA LIGANDA



Slika 9. Prenašanje BMP signala Smad ovisnim i Smad neovisnim putem. BMP receptori na staničnoj membrani mogu biti prisutni kao homomeri tipa I i II ili kao preformirani receptorski kompleks. Ako se BMP veže najprije za visokoafinitetni receptor tipa I uslijedit će udruživanje s receptorom tipa II i aktivirati će se p38 signalni put (Smad neovisni). Ako se BMP veže za preformirani receptorski kompleks aktivira se Smad signalni put. Modificirano prema: *Hassel S, Schmitt S, Hartung A i sur. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. J Bone Joint Surg Am 2003;85:44-51. (127)*

BMP signalni put je kontroliran na nekoliko nivoa: vanstaničnom, membranskom i unutarstaničnom. Vanstanični antagonisti se nalaze u ekstracelularnom matriksu, a djeluju tako što sprečavaju vezanje BMP za njihov receptor. Do danas poznati BMP antagonisti su DAN (differential screening-selected gene aberative in neuroblastoma), Cer1/cerberus, coco,

PRDC (protein related to DAN and cerberus), gremlin, USAG-1 (uterine sensitization-associated gene 1), sclerostin, chordin, noggin, Tsg i follistatin (tablica 11) (128). Transmembranska kontrola se provodi putem pseudoreceptora tipa I (BMP and activin membrane-bound inhibitor - BAMBI) koji vezanjem na receptor tipa II sprječava prenašanje signala u stanicu (122). Unutar stanica postoji nekoliko molekula koje kontroliraju BMP (112,122,129,130). To je Smad 6 i 7 (vidi gore), Tob (veže se za R-Smad i receptor tipa I i inhibira ih) i Smurf 1 (potiče razgradnju Smad-ova, inhibira receptor tipa I i deaktivira transkripcijske faktore u jezgri).

Pojedine molekule BMP-a mogu inhibirati djelovanje drugih (primjerice BMP-3 inhibira djelovanje BMP-2, -4, -6 i -7) (123).

Tablica 11. Vanstanični BMP antagonisti i njihovi ciljni proteini (128)

BMP antagonist	BMP na koji djeluje
DAN	BMP-2, -4, GDF-5
Cer1/cerberus	BMP-4
Coco	nije definirano
PRDC	BMP-2, -4
Gremlin	BMP-2, -4
USAG-1	BMP-7
Sclerostin	BMP-2, -4, -6, -7
Chordin	BMP-2, -4
Noggin	BMP-2, -4, -7
Tsg	BMP-4
Follistatin	BMP-4, -7

1.3.5. Koštani morfogenetski proteini i razvoj bubrega

BMP imaju značajnu ulogu u razvoju bubrega, točnije u razvoju definitivnog bubrega ili metanefrosa (124). On se razvija iz metanefrogenog mezoderma, a njegovi odvodni kanali iz mokraćovodnog pupoljka. Među njima nastaje recipročna induktivna interakcija kojom naposljetku od mokraćovodnog pupoljka nastaje mokraćovod i sustav odvodnih kanala bubrega, a od metanefrogenog mezoderma nefron. Čimbenici rasta i geni koji sudjeluju u recipročnoj mezenhimo-epitelnoj indukciji su s strane metanefrogenog tkiva WT1, GDNF i BMP-4, a s strane epitelnih stanica mokraćovodnog pupoljka FGF-2, Wnt-4, Wnt-11, BMP-7 i LIF (116). Najvažniju ulogu ima BMP-7 koji je u najranijem embrionalnom razdoblju

dominantno eksprimiran u stanicama mokraćovodnog pupoljka, a u daleko manjoj mjeri i u metanefrogenom mezodermu (109). Kasnije se on eksprimira i u podocitima glomerula (109). Pod utjecajem koštanih morfogenetskih proteina (pogotovo BMP-7) dolazi do recipročne interakcije između stanica mokraćovodnog pupoljka i metanefrogenog mezoderma što ima za posljedicu indukciju mezenhimalnih stanica u neposrednoj blizini ureteralnog pupoljka te nastaju epitelne stanice koje se kasnije organiziraju i nastaje osnovna funkcionalna jedinica bubrega: nefron. Miševi koji nemaju BMP-7 gen rađaju se s displastičnim bubrezima i umiru ubrzo nakon rođenja (124). Histološka analiza je pokazala kako su njihove metanefričke mezenhimalne stanice blokirane u diferencijaciji (124). Smatra se kako nedostatak BMP-7 dovodi do poremećaja interakcije između epitela i mezenhima što dovodi do smrti metanefričkih mezenhimalnih stanica. Ujedno BMP-7 je jedan od najbitnih čimbenika u stvaranju glomerula što dokazuje i podatak da miševi bez gena za BMP-7 na histološkom presjeku imaju prosječno samo 3 glomerula u odnosu na 100 glomerula u normalne populacije. Ulogu u razvoju bubrega imaju i BMP -2, -3, -4, -5, i -6, ali je jedino nedostatak BMP-7 letalan. Eksperimentalne životinje koje nemaju Smad4 imaju poremećenu organizaciju nefrogenog mezenhima te oštećenje mezenhimalne indukcije (124).

1.3.6. Koštani morfogenetski proteini u adultnom bubregu

Bubreg je mjesto gdje se vrši sinteza BMP-7, kako prenatalno tako i nakon rođenja. U adultnim bubrezima štakora ekspresija BMP-7 mRNA je prisutna u cijelom nefronu. Najsnažnija ekspresija je prisutna u tubulima vanjske medule, umjerena u tubulima unutarnje medule, slabija u glomerulima (epitelne stanice parijetalnog i visceralnog lista) i jedva prisutna u korteksu. Snažna ekspresija je prisutna i u adventiciji renalnih arterija te u epitelnim stanicama pijelona i uretera (131,132). Prilikom davanja radioaktivnim jodom obilježenog BMP-7 on se dominantno vezao za epitelne stanice parijetalnog i visceralnog lista glomerula, za epitelne stanice proksimalnih tubula u korteksu te za stanice sabirnih kanalića u meduli (131). Na tim mjestima unutar nefrona je i izraženija ekspresija proteina i mRNA receptora za BMP-7 koji je nalik BMP-RII (131). Gore spomenuta mjesta unutar

nefrona imaju daleko veći broj posebnih, visokoafinitetnih receptora za BMP-7 (131). Davanje BMP-7 kulturi mezangijskih stanica dovodi do razvoja diferenciranih epitelnih stanica (132).

Do sada jedino publicirano ispitivanje na normalnom humanom bubregu (analiza šest bubrega) pokazalo je da se mRNA BMP-7 pretežno eksprimira u distalnom dijelu nefrona (distalni tubuli i sabirni kanalići), u glomerulima postoji jedva detektibilna aktivnost (negativna imunohistokemijskim bojenjem), a u proksimalnim tubulima aktivnost nije dokazana niti jednom metodom (133). Najjače bojenje je bilo prisutno u citoplazmi luminalne strane tubularnih epitelnih stanica. BMP receptori i Smad1/5/8 su bili eksprimirani ne samo u distalnim dijelovima nefrona (dominantno), nego i u proksimalnim tubulima (133). Autori smatraju da u normalnom adultnom humanom bubregu BMP-7 glavnu ulogu ima u distalnom nefronu. Luminalna distribucija upućuje na mogućnost urinarne ekskrecije što dodatno govori u prilog djelovanja BMP-7 u distalnom nefronu.

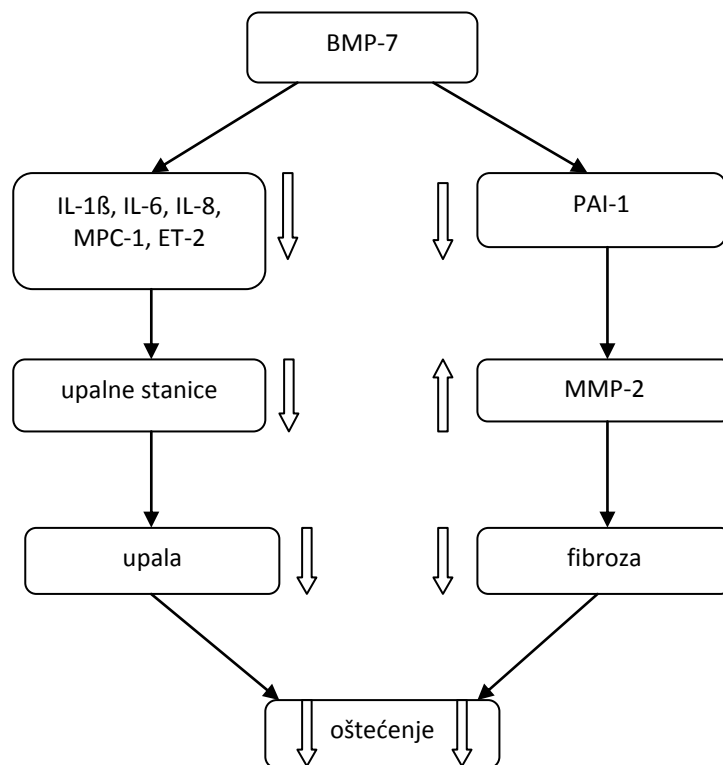
BMP su endogene molekule koje sudjeluju u održavanju homeostaze bubrega. One štite bubreg od oštećenja, a koja mogu nastati kao posljedica djelovanja genetskih oštećenja, autoimunih reakcija, metaboličkih poremećaja i utjecaja faktora okoliša. U osnovi se bubrežna oštećenja mogu podijeliti u akutna i kronična (134).

Kod akutnog oštećenja bubreg se može potpuno oporaviti, a regeneracija se provodi putem stanica koje reagiraju na stimulse različitih čimbenika rasta oponašajući proces koji se odvija i u embrionalnom razdoblju. Ti čimbenici rasta djeluju autokrino i parakrino, a tu spadaju inzulinu nalik čimbenici rasta (IGFs: insulin-like growth factors), epidermalni čimbenik rasta (EGF: epidermal growth factor), fibroblastni čimbenik rasta (FGF : fibroblast growth factor), TGF- α i - β te HGF (124). Od članova TGF- β nadobitelji najvažniju ulogu ima BMP-7. Istraživanja su pokazala kako stanice bubrega imaju sposobnost regeneracije ,ali prije toga one moraju biti potaknute s npr. citokinima ili nekim drugim stimulusom (134). Eksperimentalni modeli akutne renalne insuficijencije izazvani ishemijsko/reperfuzijskim oštećenjem (privremena ligatura renalne arterije) pokazali su da davanje BMP-7 ima

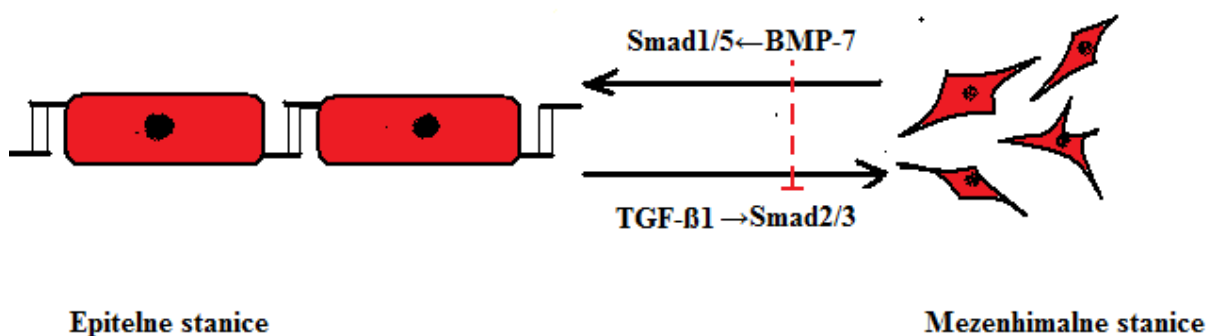
povoljan učinak na razmjere oštećenja kao i na regeneraciju bubrežne funkcije (135). Životinje koje su tijekom ispitivanja dobivale BMP-7 imale su bolje očuvanu bubrežnu funkciju (mjereći vrijednost ureje i kreatinina) uz povećano preživljenje (135). Histološki gledano, BMP-7 je smanjio područja tubularne nekroze kao i infarkta tkiva, upalni odgovor je bio manji zbog slabije ekspresije međustaničnih adhezivnih molekula i slabijeg nakupljanje neutrofila (uz slabiju aktivnost tkivne mijeloperoksidaze) i konačno snizio je stopu apoptoze bubrežnih stanica tijekom oporavka. BMP-7 je inhibirao nastajanje proinflammatornih citokina IL-1 i TNF- α u proksimalnim tubularnim stanicama i glatkim mišićnim stanicama unutar stijenke krvnih žila. Također životinje koje su dobivale BMP-7 imale su manji tubulointersticijski volumen, slabije nakupljanje kolagena IV u tubulointersticijskom prostoru, promjer tubula je bio bliži normalnom a također je i renalna funkcija bila očuvanija (135). Promatrajući ekspresiju BMP-7 (i drugih čimbenika rasta poput TGF- β 1, EGF i IGF-1) tijekom akutnog oštećenja otkriveno je kako je odmah po ozljedi prisutna njegova minimalna ekspresija i to prvenstveno u području epitela sabirnih kanalića (odgovara stanju bubrega bez oštećenja) kako bi unutar prvih 24 sata došlo do progresivnog rasta njegove aktivnosti, dominantno u glomerulima i zavijenim kanalićima korteksa. Nakon toga ekspresija BMP-7 značajno pada, a slično je zamijećeno i s ostalim čimbenicima rasta (132,135). Smatra se da smanjenje ekspresije BMP-7 pogoduje progresiji bubrežnog oštećenja. Današnja istraživanja govore u prilog tome da je akutno bubrežno oštećenje uzrokovano ishemijsko-reperfuzijskim oštećenjem, barem djelomično, upalna bolest koja dovodi do oštećenja endotela, infiltracije leukocita i stvaranja medijatora upala od strane tubularnih stanica (136). Prema tome, BMP-7 bi imao važnu ulogu u ishemičnom akutnom bubrežnom oštećenju sprječavajući oštećenje tkiva posredovano neutrofilima (124). Eksperimentalni modeli akutnog bubrežnog oštećenja uzrokovanog nefrotoksičnim tvarima (živa, cisplatin) također su pokazali da BMP-7 smanjuje oštećenje bubrega i pospešuje oporavak bubrežne funkcije kao i preživljenje (124).

Problem kroničnog bubrežnog oštećenja je njezin progresivni tijek prema terminalnom bubrežnom oštećenju i tubulointersticijskoj fibrozi kao osnovnom patohistološkom supstratu.

Terminalno bubrežno oštećenje je nespojivo s životom bez nadomjesnog liječenja (hemodijaliza, peritonealna dijaliza, transplantacija bubrega). Stoga se provode brojna istraživanja kako bi se pronašla supstancija koja bi usporila ili zaustavila propadanje bubrežne funkcije ili čak obnovila funkcionalnu sposobnost bubrega. U štakora s malom nefronskom masom (tzv. „5/6 nefrektomija“) davanje BMP-7 dovodi do manjeg porasta koncentracije ureje i kreatinina u krvi uz višu glomerularnu filtraciju u odnosu na kontrolu (137). To je pogotovo izraženo u prvim tjednima nakon nefrektomije. Osamnaest tjedana nakon nefrektomije stopa preživljenja je bila 88% u štakora koji su dobivali BMP-7, a samo 32% u kontrolnoj skupini (137). Možemo zaključiti da BMP-7 usporava progresiju kroničnog bubrežnog oštećenja u životinja. Najvažnija je sposobnost BMP-7 da sprječava razvoj tubulointersticijske fibroze u bubregu na koju prvenstveno utječe TGF- β 1. TGF- β 1 potiče prijelaz epitelnih u mezenhimalne stanice u tubularnim stanicama bubrega, a to je proces koji se dešava u embrionalnom razdoblju, tijekom progresije tumora i razvoja fibroze (138). Osnov djelovanja TGF- β 1 je smanjenje koncentracije i aktivnosti matriks metaloproteinaze-2 (MMP-2) koja se dominantno luči putem mezangijskih stanica, a koja razgrađuje kolagen tip IV. TGF- β 1 također povećava količinu kolagena tipa IV, fibronektina i trombospondina u ekstracelularnom matriksu (134). Nasuprot tome BMP-7 ima sposobnost da vrati, *in vitro* i *in vivo*, prijelaz mezenhimalnih stanica u epitelne i zadrži aktivnost MMP-2 čime se sprječava nakupljanje ekstracelularnog matriksa, a ujedno ako se i stvori fibrotički matriks MMP-2 ga razgrađuje. Unutarstanični prijenos signala se kod TGF- β 1 provodi putem Smad2 i 3, a BMP-7 smanjuje nakupljanje Smad3 unutar jezgre mezangijskih stanica i time sprječava djelovanje TGF- β 1 (slika 10 i 11) (124).



Slika 10. BMP-7 i njegova protektivna uloga u akutnom i kroničnom bubrežnom oštećenju. MPC: monocyte chemotactic protein-1 , ET-2: endotelin-2, PAI-1: plasminogen aktivator-1, MMP-2: matriks metaloproteinaza-2. Modificirano prema: *Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:299-308. (124)*



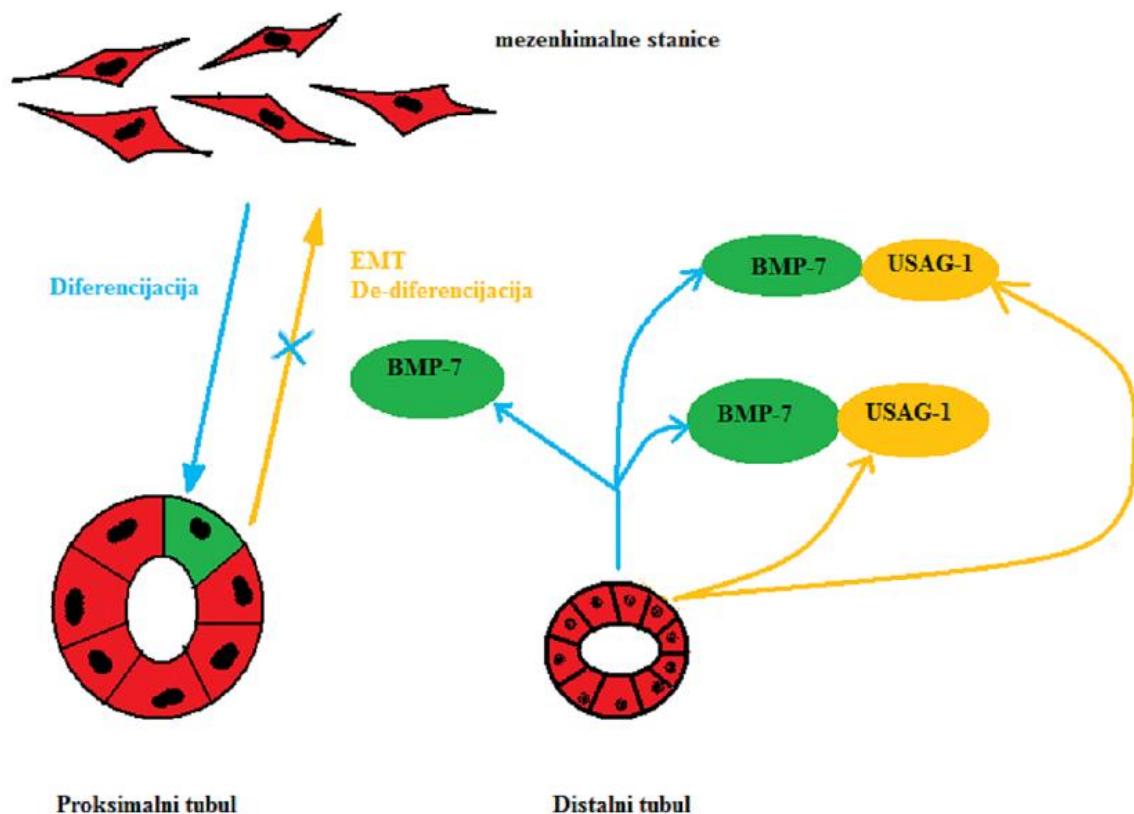
Slika 11. BMP-7 sprječava epitelno-mezenhimalnu tranziciju blokirajući aktivnost TGF-β1. Modificirano prema: *Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:299-308. (124)*

Posebno je interesantna uloga BMP-7 u dijabetičkoj nefropatiji koja je danas vodeći uzrok terminalnog bubrežnog zatajenja u razvijenim zapadnim zemljama svijeta. Dijabetička nefropatija je karakterizirana zadebljanom glomerularnom membranom uz povećanje volumena mezangija zbog nakupljanja vanstaničnog matriksa te tubulointersticijskom fibrozom (139). Smatra se da hiperglikemija dovodi do otpuštanja različitih citokina i to prvenstveno od strane mezangijskih stanica. Pogotovo je bitna aktivacija TGF- β 1 koji je odgovoran za povećanje vanstaničnog matriksa (vidi gore). U kulturi proksimalnih tubularnih stanica gdje je streptozotocin inducirao razvoj dijabetičke nefropatije došlo je do smanjenja ekspresije mRNA BMP-7 i njezina proteina u ispitivanim bubrezima za 50% u 15. tjednu, a u 30. tjednu ekspresija je pala na samo 10% (139). Također se smanjila ekspresija oba tipa receptora za BMP, a ekspresija BMP antagonista gremlina je porasla i to pogotovo u područjima tubulointersticijske fibroze (140). Davanjem TGF- β 1 dodatno se smanjila ekspresija BMP-7 (139). Životinje koje su dobivale BMP-7 nakon streptozotocinom inducirane dijabetičke nefropatije imale su očuvaniju bubrežnu funkciju, manju proteinuriju, manji stupanj glomeruloskleroze i bolje preživljenje u odnosu na kontrolnu skupinu (139,141,142). Sve gore navedeno govori u prilog činjenice da je BMP-7 renoprotektivni čimbenik te da postoji njegova potencijalna uloga u liječenju akutnog i kroničnog bubrežnog zatajenja (124,141).

Osim BMP-7, i ostali članovi BMP obitelji imaju ulogu u homeostazi u adultnom bubregu. Primjerice, BMP-6 je najefikasniji od svih članova TGF- β nadobitelji u smanjenju ekspresije proinflammatoryh citokina, a upravo je nakupljanje upalnih stanica i citokina važno u patofiziologiji akutnog i kroničnog bubrežnog oštećenja (143).

Od BMP antagonista, značajnu ulogu u razvoju bubrega ali i nastanku i progresiji bolesti bubrega imaju USAG-1 i gremlin (128). USAG-1 je antagonist BMP-7, snažno izražen u bubregu. U miševa najznačajnija ekspresija USAG-1 je u epitelnim stanicama distalnog tubula, isto kao i BMP-7. Kod bubrežnog oštećenja najprije dolazi do oštećenja epitelnih stanica proksimalnih tubula i putem epitelno-mezenhimalne tranzicije oštećene stanice

prelaze u mezenhimalne stanice. BMP-7 kojega dominantno luče epitelne stanice distalnoga tubula djeluje na epitelne stanice proksimalnog tubula i sprječava tranziciju epitelnih stanica u mezenhimalne te smanjuje fibrozu u intersticiju (renoprotektivni učinak). USAG-1, kojega također luče epitelne stanice distalnoga tubula, veže se za BMP-7 i inhibira njegovo djelovanje smanjujući količinu aktivnog BMP-7 (slika 12) (128,144). Gremlin je antagonist BMP-2, -4, a eksprimiran je u mezangijskim stanicama glomerula. Njime posredovan BMP antagonizam je izuzetno bitan u indukciji razvoja metanefričkog bubrega, a njegov nedostatak dovodi do promptne smrti postnatalno, u miševa, jer ne dolazi do razvoja bubrega. Njegova ekspresija je povećana prilikom visokog unosa glukoze (eksperimentalno dokazano u dijabetičkoj nefropatiji induciranoj streptozotocinom), mehaničkog pritiska i djelovanjem TGF- β (128). Iz svega gore navedenog možemo zaključiti da oba antagonista imaju značajnu ulogu u razvoju bubrega, ali i u nastajanju bubrežnih bolesti.



Slika 12. Renoprotektivni učinak BMP-7 i uloga BMP antagonista USAG-1. Kod oštećenja bubrega najviše stradaju epitelne stanice proksimalnog tubula, koje su i najosjetljivije na oštećenje, te one posredstvom epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) prelaze u mezenhimalne stanice koje nalikuju fibroblastima. BMP-7 kojega luče epitelne stanice distalnog tubula inhibiraju EMT (renoprotektivni učinak). USAG-1, kojega također luče epitelne stanice distalnog tubula, veže se na BMP-7 i smanjuje količinu aktivnog BMP-7 te time inhibira protektivni učinak BMP-7. Modificirano prema: Yanagita M. *BMP antagonists: Their roles in development and involvement in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:309-17. (128)

Možemo reći da su BMP endogene molekule s važnom funkcijom u razvoju bubrega, ali i u održavanju homeostaze u adultnom bubregu. BMP-7 regulira diferencijaciju bubrežnog mezenhima i čuva bubrežnu funkciju na način da sprječava inflamatorni i fibrotički učinak koji se ispoljava prilikom akutnog ili kroničnog bubrežnog oštećenja.

1.3.7. Koštani morfogenetski proteini u tumorskim bolestima

S obzirom da su koštani morfogenetski proteini čimbenici rasta i diferencijacije, istraživana je njihova uloga i u različitim tumorima (145-149). Općenito, oni mogu imati inhibitorne, ali i stimulatívne učinke na rast malignih stanica. Primjerice BMP-2 potiče rast tumorskih stanica karcinoma pluća (150) dok inhibira proliferaciju stanične linije karcinoma

dojke (151). Ovakva razlika u djelovanju istog čimbenika rasta je posljedica složenog djelovanja BMP-ova i tkivne različitosti.

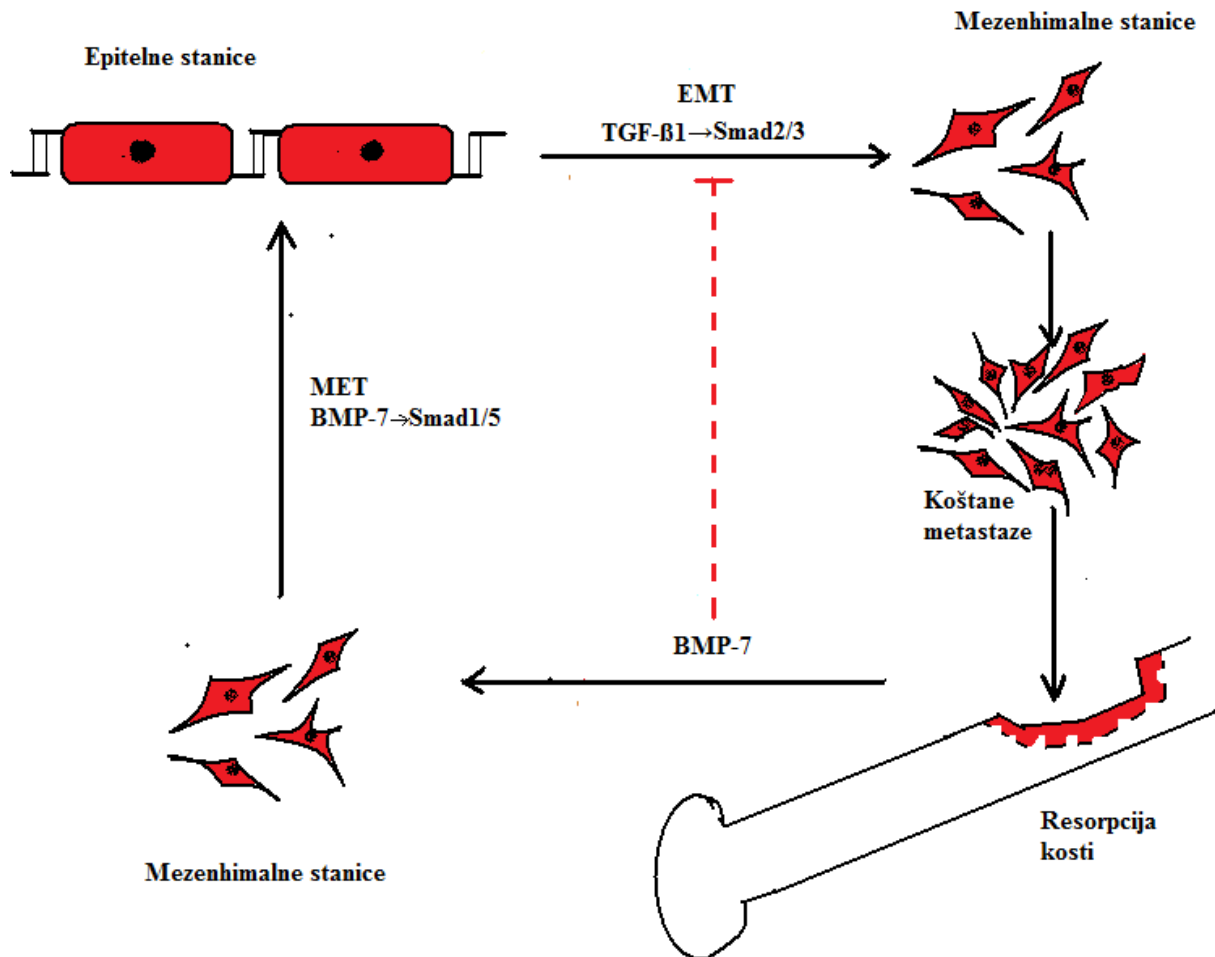
Finska grupa je pronašla da BMP-7 ima pojačanu ekspresiju u malignim stanicama karcinoma dojke. Ujedno ekspresija BMP-7 je bila viša u stanicama karcinoma dojke s višim histološkim stadijem i visokom proliferacijskom sposobnošću. S obzirom na gore spomenuto BMP-7 možda ima ulogu u nastanku karcinoma dojke (147).

U stanicama adenokarcinoma kolona zamijećena je pojačana ekspresija BMP-4 dok ekspresija oba tipa receptora za BMP nije bila promijenjena. Maligne stanice s pojačanom ekspresijom BMP-4 su pokazivale invazivniji fenotip, imale su veći stupanj migratorne sposobnosti i invazije te bile otpornije na apoptozu. Davanjem protutijela za BMP-4 smanjila se migracijska sposobnost kao i invazivnost malignih stanica. Sve to nam govori u prilog da BMP-4 potiče invazivno ponašanje stanica adenokarcinoma kolona (148).

Langenfeld je istraživao ekspresiju BMP-ova u stanicama karcinoma pluća (149). BMP-2 je značajno eksprimiran u stanicama ovog karcinoma, dok BMP-4, BMP-6 i BMP-7 nisu pokazivali značajniju aktivnost. Aktivnost BMP-2 u normalnom tkivu pluća je bila izrazito malena. Shodno tome nameće se zaključak da je BMP-2 bitan u karcinogenezi karcinoma pluća. Visoka ekspresija BMP-2 u karcinomu, a skoro zanemariva u normalnom plućnom parenhimu ukazuje na mogućnosti ciljane terapije s protutijelom na BMP-2 (149).

U istraživanju provedeno na našem fakultetu, u bolesnika s metastatskim karcinomom prostate, pronađena je smanjena ekspresija BMP-7 i gotovo gubitak BMPR-II receptora u karcinomskih stanica u odnosu na normalne stanice prostate (152). Ide je analizirao utjecaj BMP-2 na maligne stanice prostate te je dokazao njegov inhibitorni učinak na androgen-osjetljive stanice dok na stanice koje nisu imale androgeni receptor inhibitorni učinak nije postojao (153). Ekspresija BMP receptora u normalnom tkivu prostate je izuzetno visoka, kod dobro diferenciranog karcinoma prostate je prisutna, ali smanjena, dok u slabo diferenciranom karcinomu prostate samo jedan od 10 karcinoma ima receptore za BMP. Ovi rezultati govore u prilog tome da gubitak BMP receptora kod stanica karcinoma prostate ima

bitnu ulogu u progresiji karcinoma prostate (154). Grupa iz Leidena, Nizozemska, pokazala je kako davanje BMP-7 stanicama karcinoma prostate ima inhibitorni učinak na njihov rast i to prvenstveno blokadom TGF- β 1 (slika 13). Taj učinak ne samo da je vidljiv na karcinomskim stanicama primarnog tumora, već i na metastatskim stanicama (155).



Slika 13. Moguća uloga BMP u tumorskoj biologiji. BMP-7 potiče mezenhimalno-epitelnu tranziciju (MET) a ujedno inhibira epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) koja je potaknuta s TGF- β 1 te time BMP-7 inhibira tumorski rast i metastaziranje. Metastatske tumorske stanice otpuštaju čimbenike rasta koji potiču resorpciju kostiju putem osteoklasta. Osteoklasti razgradnjom kosti otpuštaju BMP iz koštanog matriksa što dovodi do inhibicije tumorskog rasta. Modificirano prema: *Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G i sur. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. Am J Pathol 2007;171:1047-57. (155)*

Bitna obilježja malignih tumora su sposobnost stvaranja novih krvnih žila (angiogeneza) i sposobnost metastaziranja u čemu određenu ulogu imaju i BMP. Davanje BMP-2 kulturi tumorskih stanica dovelo je do značajnog povećanja broja krvnih žila unutar tumora. Mogući

mehanizam djelovanja je stimulacija endotelih stanica putem BMP-2. Davanjem noggina (BMP antagonista) izgubio se proangiogenetski učinak BMP-2 (156). BMP imaju značajnu ulogu u nastajanju koštanih metastaza kod karcinoma prostate, pogotovo BMP-6 dok BMP-7 inihbitorno djeluje na razvoj metastaza (155,157).

Iz gore navedenoga vidljivo je da se isti BMP različito ponašaju u različitim tumorima. Stoga samo određeni tipovi tumori mogu biti moguća „meta“ za potencijalnu ciljanu terapiju koja bi obuhvaćala BMP odnosno njegov signalni put.

1.3.8. Koštani morfogenetski proteini i karcinom bubrega

Istraživanja o ekspresiji BMP, njihovih receptora i Smad signalnog puta kod RCC su u začetku (145,146). Kwak je uz pomoć imunohistokemijskih metoda pokazao ekspresiju BMP-4, BMP-6 i BMP-7 u RCC uz određivanje njihove potencijalne prognostičke vrijednosti (145). Od 185 uzoraka tumorskog tkiva BMP-4 je bio izražen u njih 44,3%, BMP-6 u 20% te BMP-7 u 34,1%. Nije pronađena statistička značajna povezanost između ekspresije različitih BMP te starosti, ECOG statusa i TNM stadija. BMP-4, -6 i -7 su bili izraženiji u kromofobnom i papilarnom tipu karcinoma u odnosu na svjetlostanični tip. Ekspresija BMP-4 je bila jača u malignih stanica koje su bile slabije diferencirane (viši Fuhrman stadij). U žena je bila jača ekspresija BMP-7 nego u muškaraca. Preživljenje je bilo duže u bolesnika s kromofobnim karcinomom koji su eksprimirali BMP-7 te bi u ove skupine bolesnika on mogao predstavljati novi prognostički čimbenik (145).

Kim (146) je istraživao ekspresiju BMP receptora u staničnim linijama RCC (stanične linije 112, 117 i 181). Dokazao je gubitak ekspresije tipa II receptora u staničnim linijama 117 i 181 dok je u staničnoj liniji 112 tip II receptora prisutan. Proliferacija stanične linije 112 je bila inhibirana s BMP-6 i to ovisno o dozi. Dakle BMP-6 ima potencijalni inhibitorski efekt na stanice karcinoma bubrega i to u stanica koje imaju prisutan tip II receptora. Zaključak autora je da neke od karcinomskih stanica postižu otpornost na inhibitorski učinak BMP-6 kroz abnormalnu ekspresiju odnosno gubitak BMP receptora tipa II. S obzirom da su BMP jako

rasprostranjeni u bubregu, gubitak osjetljivosti na BMP može značiti kritičnu točku tijekom razvoja i progresije RCC (146).

Bašić-Jukić i suradnici su pokazali snažnu ekspresiju mRNA BMP-6 u 20 uzoraka normalnog tkiva bubrega te u karcinomu bubrega (svjetlostanični tip) dok je detekcija njegova proteina bilo nešto niža (65% u zdravom tkivu i 90% u karcinomu). Ekspresija BMP-6 mRNA je bila snažnija u karcinomskom tkivu, ali nije bila u korelaciji s preživljenjem i kliničkopatološkim karakteristikama ispitanika (158).

SOSTDC1 (SclerOSTinDomain-Containing-1) je BMP antagonist izražen u svim dijelovima nefrona, ali najviše u podocitima, epitelnim stanicama distalnih tubula te prijelaznom epitelu bubrega. Dokazana je njegova smanjena ekspresija u stanicama karcinoma bubrega u odnosu na normalni bubreg, ali samo u svjetlostaničnom tipu. Transfekcija s SOSTDC1 u karcinomskim stanicama svjetlostaničnog tipa dovela je do supresije proliferacije malignih stanica. On djeluje blokirajući BMP-7 i njime izazvanu fosforilaciju Smad-1, -5 i -8 kao i Wnt-3a signalnog puta. S obzirom da SOSTDC1 suprimira proliferaciju stanica karcinoma bubrega, povrat SOSTDC1 signaliziranja može predstavljati novu mogućnost u liječenju svjetlostaničnog karcinoma bubrega (159).

Yamasaki i suradnici su prikazali slučaj bolesnice s karcinomom bubrega i s opsežnom osifikacijom unutar njega. Pronašli su snažno izražen BMP-2 u citoplazmi tumorskih stanica dok u drugim tumorskim stanicama (iz drugih tumora bubrega bez osifikacije) nisu uspjeli detektirati BMP-2. Poznata je činjenica da BMP-2 ima važnu ulogu u nastajanju koštanog tkiva zbog snažnog osteoinduktivnog učinka. Autori smatraju da je osifikacija nastala metaplazijom pluripotentnih matičnih stanica u osteoblaste, a potaknuta je bila parakrinom sekrecijom BMP-2 iz okolnih tumorskih stanica (160).

TGF- β 1, bliski srodnik BMP, te njegovi receptori TGF β -RI i TGF β -RII su jače eksprimirani u stanicama karcinoma bubrega (svjetlostanični tip) nego u normalnom tkivu bubrega, a obrnuto vrijedi za proteine njegovog signalnog puta Smad2 i Smad3 (56). Njihova ekspresija nije korelirala s TNM stadijem niti gradusom. TGF β -RII nije bio proporcionalno povećan kao

TGF- β 1 i TGF β -RI. Očigledno u stanicama karcinoma bubrega dolazi i do alteracije TGF- β /Smad signalnog puta što može dovesti do poremećaja u regulaciji stanične proliferacije (161).

1.3.9. Klinička primjena koštanih morfogenetskih proteina

Klinička primjena BMP, za sada, se temelji na njegovoj osteoinduktivnoj ulozi u ortopediji i stomatologiji (111,113,162). Tu se koristi njihova sposobnost kao čimbenika diferencijacije (sazrijevanje matičnih stanica u hondrocite, osteoblaste i osteocite) i čimbenika rasta (stimuliranje angiogeneze i proliferacije matičnih stanica). U osnovi, može se koristiti za nadomještanje ili remodeliranje koštanog tkiva. Potrebite količine BMP dobivaju se rekombinantnim tehnikama ili pak direktnom ekstrakcijom iz kostiju. Prvom metodom se dobiva točno određeni BMP (najčešće BMP -2 i -7), a drugom „koktel“ više koštanih morfogenetskih proteina (111,113). Bez obzira na kliničku primjenu, odgovor domaćina na uneseni BMP je ovisan o dozi i obrnuto proporcionalan njegovom položaju na filogenetskoj skali. Za postizanje kemotaksije potrebne su femtomolarne koncentracije BMP, viša doza je potrebna za podržavanje mitoze i staničnu diferencijaciju *in vitro*, a još viša (u mikrogramima) dovodi do koštane diferencijacije *in vivo* (163).

BMP imaju važnu ulogu u patofiziologiji različitih bolesti poput osteoporoze, artritisa, bolesti bubrega, plućne hipertenzije, cerebrovaskularnih bolesti i tumorskih bolesti (128). Dobro je poznato da koštani morfogenetski proteini imaju izuzetno važnu ulogu u razvitku kostiju, njihovom rastu i remodeliranju. BMP svoj učinak ostvaruju putem osteoblasta tako što promiču njihovu proliferaciju, diferencijaciju i poboljšava njihovu funkciju potičući sintezu kolagena i odlaganje anorganskih tvari. Disfunkcija BMP-Smad signalnog puta dovodi do redukcije koštanog tkiva te do razvoja osteopenije odnosno osteoporoze. Iz gore navedenog nastala je zamisao o ulozi BMP u liječenju osteoporoze te će korištenje BMP ili BMP agonista možda predstavljati terapiju osteoporoze u budućnosti (114).

2.CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja je utvrditi koji se koštani morfogenetski proteini ispoljavaju u zdravom tkivu bubrega te u tkivu karcinoma bubrega kao i promjene njihove ekspresije između zdravog tkiva i tkiva karcinoma u usporedbi s patološko-kliničkim značajkama ispitanika.

To uključuje slijedeće:

a) imunohistokemijskom metodom istražiti u kojim dijelovima nefrona i odvodnih kanalića bubrega se u zdravom bubregu eksprimiraju koštani morfogenetski proteini (BMP - 6, -7), njihovi receptori (BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II) te pSmad 1/5/8,

b) imunohistokemijskom metodom dokazati ekspresiju koštanih morfogenetskih proteina (BMP -6, -7), njihovih receptora (BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II) te pSmad 1/5/8 u stanicama karcinoma bubrega te na granici između karcinoma i normalnog tkiva bubrega,

c) Western blot metodom utvrditi ekspresiju proteina BMP-6 i BMP-7, receptora BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8 u tkivu zdravog bubrega i različitim tipovima karcinoma bubrega s ciljem utvrđivanja razlike između normalnog bubrega i pojedinih tipova karcinoma bubrega,

d) metodom RT-PCR utvrditi ekspresiju BMP-2 mRNA, BMP-4 mRNA, BMP-6 mRNA i BMP-7 mRNA te BMPR-IA mRNA, BMPR-IB mRNA i BMPR-II mRNA u normalnom tkivu bubrega, tkivu različitih tipova karcinoma bubrega i kvantificirati rezultate,

e) istražiti postoji li povezanost između ekspresije mRNA pojedinih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma bubrega s obzirom na tumorski stadij bolesti (TNM), stupanj diferencijacije tumorskih stanica (Fuhrman) te histološki subtip tumora,

f) utvrditi postoji li povezanost između ekspresije mRNA pojedinih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma bubrega s obzirom na spol i dob bolesnika,

g) pokazati postoji li povezanost između ekspresije mRNA pojedinih koštanih morfogogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma bubrega s obzirom na stupanj opće tjelesne sposobnosti (ECOG status).

3.ISPITANICI I METODE

3.1.Ispitanici

Istraživanje je prospektivno, a istražili smo tkivo bubrega u 64 ispitanika u kojih je učinjena nefrektomija zbog karcinoma bubrega. Studija je obuhvatila bolesnike s karcinomom bubrega koji su liječeni na Klinici za urologiju, KBC Rijeka. Osnovni podaci (dob, spol, ECOG status, dijagnostičke metode, patohistološka dijagnoza) dobiveni su pregledom povijesti bolesti bolesnika pohranjenih u arhivi Klinike za urologiju. Iz patohistološkog nalaza odredili smo histološki tip tumora, stupanj diferencijacije stanica karcinoma bubrega (Fuhrman) i patološki stadij tumora na osnovu TNM klasifikacije (tablica 12) (38,39). Niti u jednog bolesnika nije se radilo o karcinomu bubrega s metastazama.

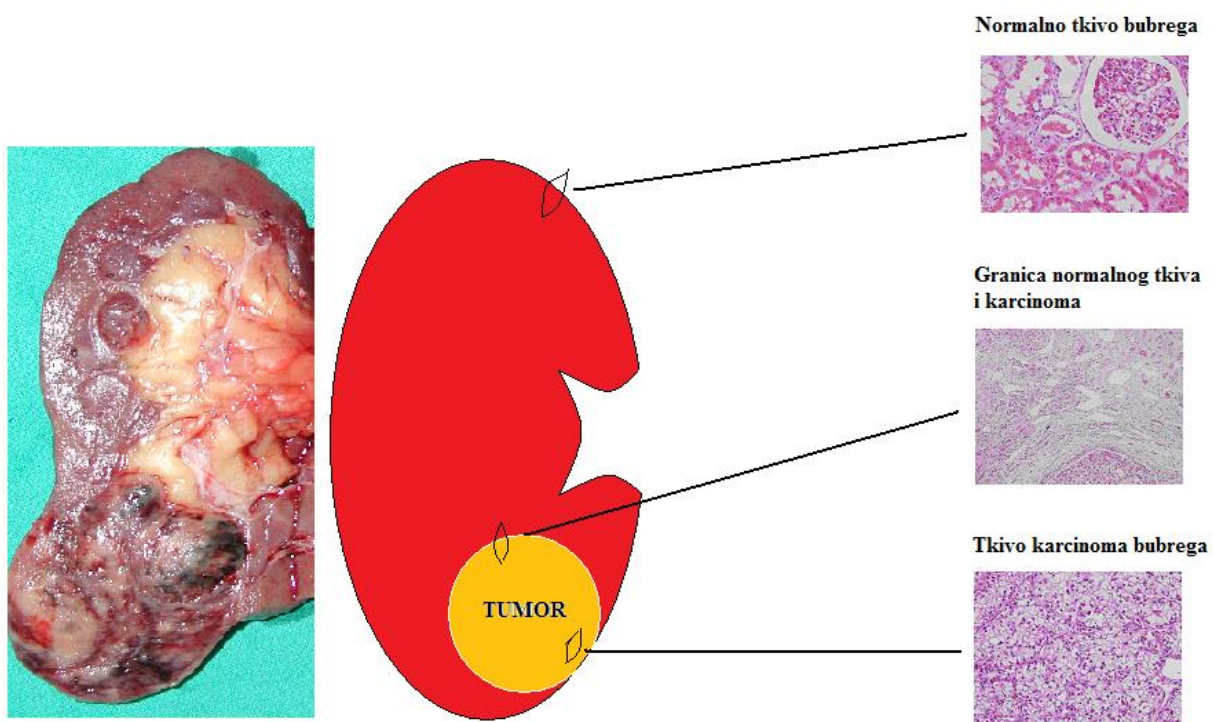
Tablica 12. Osnovni podaci o bolesnicima i kliničkopatološkim karakteristikama tumora (N=64)

Obilježje	N (%)
Dob (godine): ≤ 60 > 60	27 (42,2%) 37 (57,8%)
Spol: -muški -ženski	47 (73,4%) 17 (26,6%)
Tip karcinoma: -svjetlostanični -nesvjetlostanični	43 (67,2%) 21 (32,8%)
Stadij tumora: -T ₁₋₂ -T ₃₋₄	49 (76,6%) 15 (23,4%)
Fuhrman: -I,II -III,IV	36 (56,3%) 28 (43,7%)
ECOG: -0 -1,2,3	42 (65,6%) 22 (34,4%)

3.2.Metode

Svi uzorci tkiva dobiveni su nefrektomijom zbog karcinoma bubrega. Odmah nakon što je bubreg izvađen iz tijela, uzdužno smo ga prerezali i ekscidirali tkivo normalnog bubrega, tkivo na granici tumora i normalnoga bubrega te tumorsko tkivo, a sve temeljem

makroskopskog pregleda. Normalno tkivo smo ekscidirali prvo i to što dalje od tumorskog tkiva, a kod tumorskog tkiva smo za analizu uzimali solidni dio, a ne nekrotične dijelove tumora. Naposljetku smo ekscidirali granično tkivo između normalnog bubrežnog parenhima i karcinoma. Pojam graničnog tkiva označava tumorsku pseudokapsulu i nekoliko milimetara tkiva unutar tumora i unutar zdravog tkiva (makroskopski gledano) (slika 14).



Slika 14. Prikaz tri vrste tkiva koje je analizirano: normalno tkivo bubrega, tkivo karcinoma bubrega te granično tkivo.

Za imunohistokemijsku metodu ekscidirali smo tkivo veličine 1x1 cm. Tkivo smo fiksirali u 4% paraformaldehidu, uklopili u parafin i time je ono bilo spremno za hemalaun-eozin (HE) bojenje kao i za imunohistokemiju. Za Western blot i RT-PCR uzeli smo manje komadiće tkiva te koristili posebni transportni medij za Western blot te poseban transportni medij za RT-PCR. Tkivo za Western blot i RT-PCR smo nakon pohrane u transportnom mediju zamrznuli u tekućem dušiku na -80 °C.

Obrada tkiva urađena je u laboratoriju Zavoda za anatomiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci.

3.2.1. Imunohistokemija

Tkivne uzorke smo analizirali uz pomoć tkivnih mikroareja („tissue microarrays“). Njih smo dobili tako što smo na svakom uzorku tkiva, s histološki reprezentativnih mjesta, učinili pet ciljanih biopsija. Dobiveni cilindar tkiva je bio dužine oko 1 cm, a promjera 2 mm. U jednu parafinsku kocku smo uklopili šest različitih uzoraka, svaki je bio zastupljen sa po pet tkivnih cilindara te su tako formirani tkivni mikroareji.

Imunohistokemijsko ispitivanje učinili smo uz pomoć uobičajenog postupka imunodetekcije s imunoperoksidazom. Iz parafinskih blokova izrezali smo odgovarajuće uzorke serijskim rezovima debljine 3-4 μm na *Leica RM550* rotirajućem mikrotomu. Longitudinalne rezove postavili smo na stakalca silanizirana s 3-aminopropiltrioksi silanom (APES; *Sigma, St. Louis, MO, USA*), osušili na zraku i pohranili na $+4^{\circ}\text{C}$ do imunohistokemijske analize. Primarna antitijela kupili smo od *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)*. Anti-BMP-6,-7 te anti-BMP-1A, -1B i -1C su kozja poliklonalna IgG antitijela čiji se epitopi nalaze na molekulama odgovarajućih humanih koštanih morfogenetskih proteina. Također smo koristili pSmad1/5/8 zečja poliklonalna antitijela kupljena od *Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)*.

Tkivne uzorke smo deparafinizirali u ksilenu i rehidrirali u etanolu. Endogenu peroksidazu kao i nespecifična mjesta vezanja antitijela blokirali smo inkubacijom u 0,3% vodikovom peroksidu tijekom 10 minuta, te potom obilno isprali u fosfatnom puferu (PBS). Prije inkubacije s primarnim antitijelom, a s ciljem smanjenja pozadinskog bojenja, uzorke smo inkubirali u vlažnoj komori tijekom 30 minuta s 10% neimunim serumom. Uzorke smo inkubirali s kozjim poliklonalnim protutijelima koja su se vezala za humane BMP-6, -7, BMP-1A, -1B i -1C, u razrjeđenju 1:100, tijekom noći na 4°C . Kako bismo olakšali vezanje zečjih poliklonalnih antitijela na pSmad1/5/8 uzorke smo najprije izložili 0,1M limunskoj kiselini uz pH 7,2, kuhanjem u parnoj kupelji na 95°C tijekom 15 minuta. I ovdje smo

primjenili protutijela u razrjeđenju 1:100, tijekom noći, na 4 °C. Nakon inkubacije s primarnim antitijelom uzorke smo isprali u PBS-u i inkubirali sa sekundarnim biotiniziranim antitijelom (konjugirana zečja protutijela s peroksidazom) prema protokolu proizvođača (*DakoCytomation, Glostrup, Denmark*) u trajanju od 30 minuta. Uzorke smo potom izložili djelovanju streptavidin vezane peroksidaze također u trajanju od 30 minuta. Kao kromogen smo koristili 3,3'-diaminobenzidin tetraklorida (DAB). Rezultirajuća pozitivna reakcija je bila smeđe boje. Naposljetku su stakalca sa parafinskim rezovima kontrastno obojena hematoksilinom. Prilikom izrade negativne kontrole izostavljeno je primarno antitijelo, a uzorci su odgovarajući vremenski period inkubirani u PBS-u.

Uzorke smo potom analizirali uz pomoć *Olympus BX 50* optičkog mikroskopa (*Olympus, Tokyo, Japan*), te smo učinili mikrofotografije različitih vidnih polja koristeći *Olympus OM-4 Ti* digitalnu kameru (*Olympus, Tokyo, Japan*).

Ovom metodom smo prikazali tkivnu lokalizaciju BMP -6, -7, BMPR-IA, -IB, -II te pSmad1/5/8 u ispitivanom tkivu.

3.2.2. Western blot

Tkivo smo homogenizirali u lizirajućem puferu (1% Triton x-100, 0,5 natrijev deoksikolat, 0,1% SDS, 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluorid) i pohranili na 4 °C tijekom 30 minuta. Nakon centrifugiranja (13.000 okretaja/minuti na 4 °C kroz 30 minuta) supernatant je izdvojen, a koncentraciju proteina odredili smo prema metodi po Bradfordu na spektrofotometru. Uzorci su se kuhali 5 minuta u kipućoj vodi i potom smo jednaku količinu proteina svakog uzorka (40 µg) nanosili na 12% SDS (natrijev duodecil sulfat) poliakrilamidni gel i učinili elektroforezu (200V, 35 minuta). Nakon elektroforeze, proteine smo prenijeli na nitroceluloznu membranu (100V, 60 minuta) i inkubirali sa 5% nemasnim mlijekom, uz dodatak TBS („tris buffered saline“) koji je sadržavao 0.05% Tween-20, tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi. Primarna antitijela smo razrijedili (1:200 za BMP-6, -7, BMPR-IA, -IB, -II te 1:1000 za pSmad1/5/8) na djelatnu koncentraciju u 5% nemasnom mlijeku i u njemu smo ostaviti nitroceluloznu membranu na 4 °C preko noći. Slijedila je inkubacija sa sekundarnim

antitijelom obilježenim peroksidazom, u razrjeđenju 1:2000, tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Membrane smo isprali 3 puta po 15 minuta u TBS-Tweenu između dva prethodna koraka. Signal u obliku imunoreaktivnih bendova na membrani detektirali smo uz pomoć kemiluminescencijskog reagensa ECL („enhanced chemiluminescent“; *Amersham, Buckinghamshire, UK*) i vizualizirali koristeći *Kodak Image Station 440 (LabImage, Halle, Germany)*. Za kontrolu koncentracije proteina koristili smo β -aktin (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA*). Intenzitet signala za određeni protein kvantificiran je uz pomoć denzitometrije (*Kodak Image Station 440 LabImage, Halle, Germany*) uz pomoć računalnog programa *Kodak 1D 3.6 (LabImage, Halle, Germany)*. Relativna ekspresija ispitivanih proteina je izračunata kao omjer između njihove ekspresije i ekspresije β -aktina te pomnožena s sto.

Ovom metodom smo prikazali kvantitativnu razliku proteinske ekspresije BMP -6, -7, BMPR-IA, -IB, -II i pSmad1/5/8 u ispitivanom tkivu (16 uzoraka zdravog tkiva i 16 uzoraka RCC).

3.2.3. Lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije (RT-PCR)

Prisustvo mRNA BMP liganada (BMP -2,-4,-6,-7) i njihovih receptora (BMPR-IA,-IB,-II) odredili smo uz pomoć RT-PCR metode (lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije) u 64 uzoraka tkiva karcinoma bubrega te 25 uzoraka normalnog tkiva bubrega. Dobiveno tkivo homogenizirali smo pomoću *MagNALyser-a (Roche Applied Science, Rotkreuz, Switzerland)* 2 puta po 30 sekundi, na 6500 okretaja u minuti, sa jednom minutom hlađenja između prvog i drugog koraka. Ukupnu RNA smo izolirali uz pomoć Nucleospin RNA II izolacijskog seta prema uputama proizvođača (*Macherey-Nagel, Düren, Germany*), a nakon toga smo na spektrofotometru učinili njezinu kvantifikaciju. Za sintezu komplementarne DNA (cDNA) reverzno smo prepisali 1 mikrogram RNA pomoću RNA PCR seta AMV 3.0 (*TaKaRa Bio Europe S.a., Gennevilliers, France*) ukupnog volumena 20 μ l. Za nastajanje cDNA koristili smo 25mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl (pH 8,3), 500mM KCl, dNTP mješavinu 10mM, 40 jedinica inhibitora RNAze, 5 jedinica reverzne transkriptaze, 50pmol

nasumičnih početnica, 5 μ l DEPC H₂O (H₂O tretirana s dietilpirokarbonatom) i 0,25-1,30 μ g RNA uz ukupni volumen od 20 μ l. Nasumični heksanukleotidi su sparivani na temperaturi od 30 °C tijekom 10 minuta, dok je nakon toga sinteza cDNA učinjena na temperaturi od 45 °C tijekom 25 minuta te kroz 5 minuta na 99 °C. Za negativnu kontrolu smo koristili vodu umjesto RNA. cDNA nam je potom poslužila za PCR umnožavanje uz pomoć gen specifičnih početnica – oligonukleotida DNA (*Metabion, Martinsried, Germany*) (tablica 13). Za endogenu kontrolu tkiva koristili smo glicerol-3-fosfat dehidrogenazu (GPDH). U reakcijsku mješavinu unijeli smo 5 μ l cDNA, 10X PCR pufera, 2,5mM dNTP mješavine, 5 jedinica TaKaRa Taq HS, 0,2-1,0 μ M gen specifičnih primera i 50 μ l sterilne vode. Svi potrebni reagensi dobiveni su od *TaKaRa Bio Europe S.a., Gennevilliers, France*. PCR umnažanje napravili smo u *Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany)* slijedeći naredne parametre za BMP-2, -4, -6, -7: denaturacija na 94 °C tijekom 2 minute, 35 ciklusa amplifikacije: denaturacija na 94 °C tijekom 30 sekundi, vezivanje oligonukleotidnih početnica na DNA na 58 °C tijekom 45 sekundi, elongacija na 72 °C tijekom 1 minute sa završnom elongacijom na 72°C tijekom 7 minuta. PCR program za BMPr-IA, -IB i -II sastojao se od denaturacija na 94 °C tijekom 2 minute, 35 ciklusa amplifikacije: denaturacija na 94 °C tijekom 30 sekundi, vezivanje oligonukleotidnih početnica na DNA na 55 °C tijekom 45 sekundi, elongacija na 72 °C tijekom 45 sekundi sa završnom elongacijom na 72°C tijekom 7 minuta. Za negativnu kontrolu koristili smo PCR mješavinu bez cDNA. Produkte lančane reakcije polimeraze smo analizirali elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu, a vizualizirali uz pomoć UV-transiluminatora. Kvantifikaciju smo učinili na *Kodak Image Stationu* uz pomoć računalnog programa *Kodak 1D 3.6 (LabImage, Halle, Germany)*. Relativni nivo mRNA ekspresije odredili smo dijeljenjem ekspresije pojedinačne mRNA BMP-ova liganada i receptora s ekspresijom GPDH i pomnožili s sto.

Tablica 13. Gen specifične početnice za ispitivane BMP, njihove receptore i GPDH

	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	bp
BMP-2	CCCCTACATGCTAGACCTGTATCG	CACTCGTTTCTGGTAGTTCTTCCA	149
BMP-4	TGGTCTTGAGTATCCTGAGCG	GCTGCTGAGGTTAAAGAGGAAACGA	134
BMP-6	CGGGTCTCCAGTGCTTCAGATT	GCATCCACAAGCTCTTACAACC	351
BMP-7	CCAGGAGCGGCGGGAGATGC	AGTGGTTGCTGGTGGCTGTGA	236
BMPR-IA	CATTCGATGGCTGGTTTTG	TCCATATCGGCCTTTACCAA	298
BMPR-IB	CATGCTTTTGCGAAGTGCAG	CAGGCAACCCAGAGTCATCC	197
BMPR-II	AAGCGAGGTTGGCACTATCA	TTTGGCACACGCCTATTATGT	495
GPDH	TTGGTATCGTGGAAGGACTCA	TGTCATCATATTTGGCAGGTTT	270

3.3. Etički aspekti istraživanja

Tijekom istraživanja osigurali smo poštivanje temeljnih, etičkih i bioetičkih principa: osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost, a u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Svi podaci su bili prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima, te smo osigurali privatnost (medicinska tajna) bolesnika uključenih u istraživanje kao i zaštitu tajnosti podataka.

S obzirom da se radi o prospektivnoj studiji koja uz uobičajene medicinske podatke uključuje i dodatna istraživanja bolesnici su s time upoznati, a svoj pristanak na sudjelovanju u istraživanju potvrdili su potpisivanjem informirane suglasnosti.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Rijeka kao i Povjerenstvo za etička pitanja Medicinskog fakulteta u Rijeci.

3.4. Statistička obrada podataka

Statističku obradu podataka učinili smo standardnim metodama uporabom kompjuterskog programa *Statistica 8* (StatSoft., Inc., Tulsa, OK, USA). Raspodjela rezultata dobivenih WB bila je normalna te smo iz toga razloga koristili parametrijski Student t-test (tablica 14). Rezultati dobivenim RT-PCR-om imali su nenormalnu raspodjelu te smo koristili neparametrijski Mann-Whitney test (tablica 15).

Tablica 14. Testiranje distribucije rezultata različitih BMP i njihovih receptora dobivenih Western blot metodom (Kolmogorov-Smirnovljev test).

BMP i njegovi receptori	p-vrijednost
BMP-6	p=0,926
BMP-7	p=0,058
BMPR-IB	p=0,472
BMPR-II	p=0,981
pSmad1/5/8	p=0,737

*=statistička značajna razlika ako je $p < 0,05$ tj. radi se o nenormalnoj raspodjeli rezultata

Tablica 15. Testiranje distribucije rezultata različitih BMP i njihovih receptora dobivenih RT-PCR metodom (Kolmogorov-Smirnovljev test).

BMP i njegovi receptori	p-vrijednost
BMP-2	p=0,03*
BMP-4	p<0,01*
BMP-6	p=0,012*
BMP-7	p=0,03*
BMPR-IA	p=0,057
BMPR-IB	p=0,026*
BMPR-II	p=0,001*

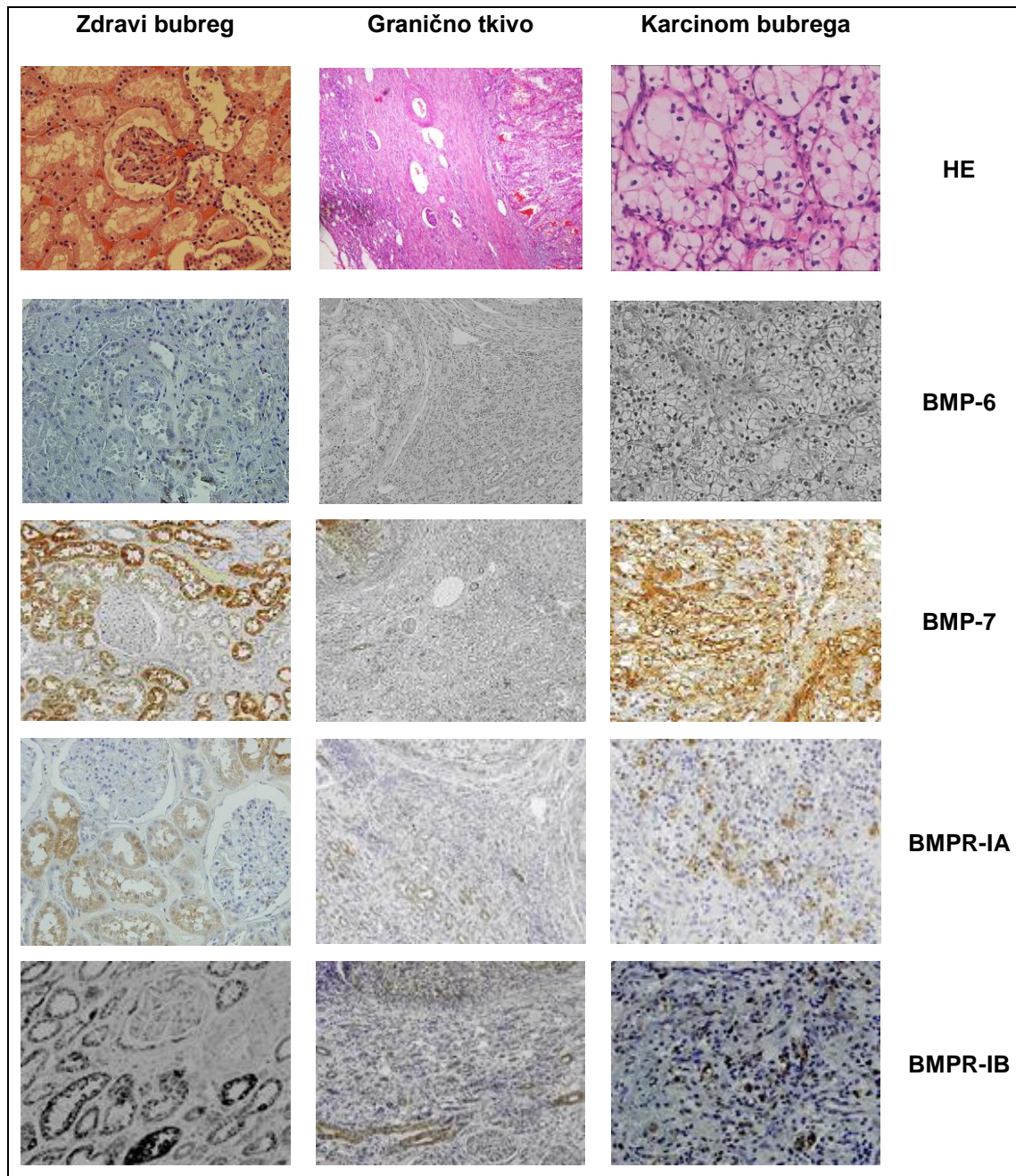
*=statistička značajna razlika uz $p < 0,05$ tj. radi se o nenormalnoj raspodjeli rezultata

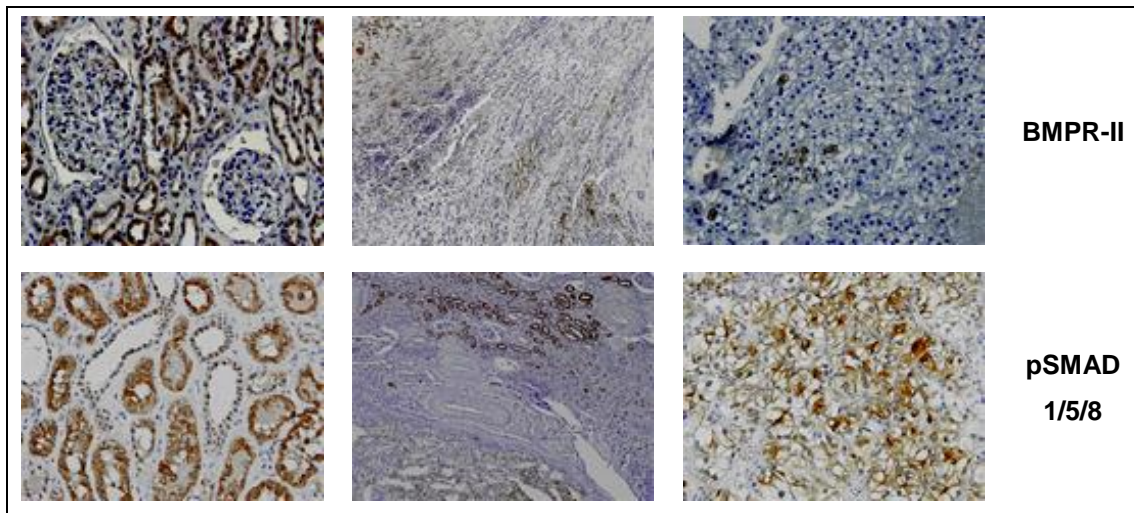
Razliku u ekspresiji BMP i njegovih receptora između ispitivanih grupa (normalno tkivo, karcinom bubrega i njegovi subtipovi) utvrdili smo korištenjem Student t-testa (WB) i Mann-Whitney testa (RT-PCR). Povezanost kliničkopatoloških karakteristika karcinoma bubrega i relativne ekspresije BMP liganada i receptora odredili smo uz pomoć Mann-Whitney testa. Statistička značajnost je na nivou $p < 0,05$.

4.REZULTATI

4.1.Imunohistokemija

Imunohistokemijskom metodom prikazali smo lokalizaciju BMP-6, BMP-7, njihovih receptora i pSmad1/5/8 u normalnom bubregu, graničnom tkivu i karcinomu bubrega (slika 15).





Slika 15. U prvom redu je uz pomoć hemalaun-eozin (HE) bojenja prikazano zdravo tkivo bubrega, tkivo na granici između karcinoma i normalnog bubrega te tkivo karcinoma bubrega. U slijedećim redovima je, uz pomoć imunohistokemije, prikazana ekspresija BMP-6, BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II te pSMAD1/5/8 u normalnom bubregu (povećanje 400x), graničnom tkivu (povećanje 200x) te u karcinoma bubrega (povećanje 400x).

U normalnom tkivu bubrega imunohistokemijska reakcija na BMP-6 je bila negativna. Unutar tkiva normalnog bubrega BMP-7 je dominantno prisutan u citoplazmi epitelnih stanica proksimalnih tubula. U citoplazmi epitelnih stanica distalnih tubula je prisutna daleko slabija ekspresija kao i veoma oskudna ekspresija u glomerulima. Isto vrijedi za BMPR-IA, BMPR-IB i BMPRII u kojih smo najveću pojavnost zabilježili u epitelnim stanicama proksimalnih tubula. BMP signalni put (pSmad1/5/8) dokazali smo pozitivnom reakcijom u epitelnim tubularnim stanicama i to u citoplazmi i jezgri. I ovdje je dominantna ekspresija u proksimalnom tubulu. Uspoređujući sve proteine koje smo ispitali, u normalnom tkivu bubrega, najjača je bila ekspresija BMP-7, svi ostali su imali slabiju ekspresiju (pogotovo BMPR-IA), a kod BMP-6 je nismo niti uspjeli dokazati.

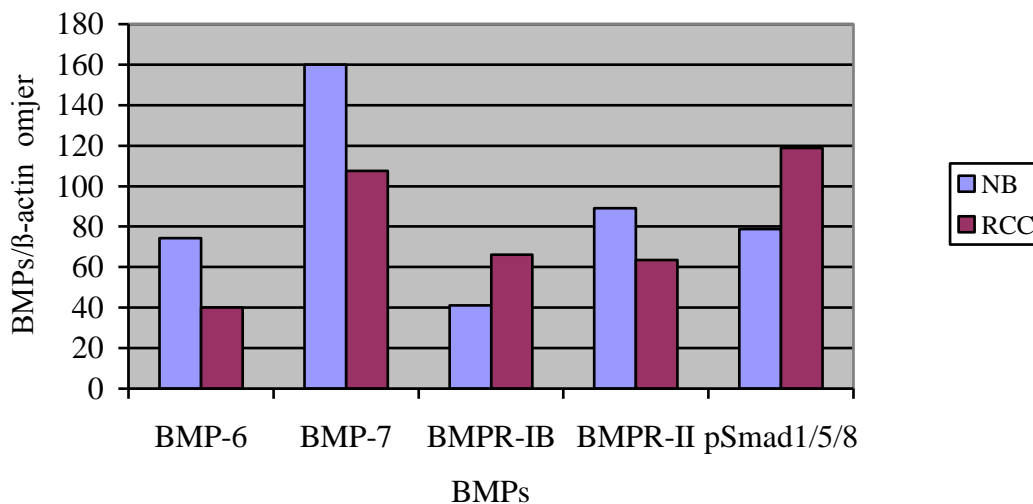
U stanicama karcinoma bubrega BMP-6 nije bio eksprimiran. BMP-7 i receptori su detektirani kao difuzno bojenje citoplazme, kako u svjetlostaničnom tako i u nesvjetlostaničnom tipu. BMP-7 je pokazivao snažnu ekspresiju u većini uzoraka tumorskog tkiva. Umjerenu ekspresiju su imali BMPR-IA i BMPR-IB dok je ekspresija BMP-RII bila slabo izražena. pSmad1/5/8 u stanicama karcinoma su bili lokalizirani u citoplazmi i jezgri, potvrđujući da je Smad signalni put aktivan i kod karcinoma bubrega.

U graničnom tkivu BMP-7 i pSmad 1/5/8 su prikazivali isti oblik i intenzitet ekspresije kao i u normalnom tkivu odnosno karcinomu bubrega (ovisno o kojem dijelu graničnog tkiva se radilo). Imunohistokemijska reakcija na BMP-6 je bila negativna u graničnom tkivu. Receptori su bili slabije izraženi u dijelu graničnog tkiva koji je poput normalnog bubrežnog parenhima. U području pseudokapsule nismo uspjeli dokazati ekspresiju BMP-6, BMP-7, pSmad 1/5/8 niti BMP receptora.

S obzirom da područje graničnog tkiva histološki i imunohistokemijski ima karakteristike normalnog bubrežnog tkiva, iako s određenim razlikama prvenstveno u smislu manjeg broja glomerula i tubula, odnosno karcinoma bubrega, a i nismo bili u mogućnosti učiniti mikrodisekciju tkiva, u daljnjem istraživanju ovo tkivo nismo analizirali Western blot i RT-PCR metodom.

4.2. Western blot

Ovom metodom prikazali smo ekspresiju BMP-6, BMP-7, njihovih receptora i pSmad1/5/8 u normalnom bubregu i karcinomu bubrega. Njihova ekspresija je prisutna u svim tipovima RCC. Ekspresija BMPRI-B i pSmad1/5/8 je povećana, a ekspresija BMPRII, BMP-6 i BMP-7 je snižena u RCC u odnosu na normalni bubreg, ali razlike nisu statistički značajne (slika 16 i tablica 16).



Slika 16. Relativna ekspresija BMP-6, BMP-7, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8 u tkivu normalnog bubrega (NB) i u tkivu karcinoma bubrežnih stanica (RCC) dobivena Western blot metodom. Termin BMPs označava BMP-6, BMP-7, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8.

Tablica 16. Relativna ekspresija BMP-6, BMP-7, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8 u normalnom bubregu i karcinomu bubrežnih stanica (RCC) dobivena Western blot metodom

	BMP-6 (X±SEM)	BMP-7 (X±SEM)	BMPR-IB (X±SEM)	BMPR-II (X±SEM)	pSmad1/5/8 (X±SEM)
Normalni bubreg	74,4±20,7	160,0±48,9	41,0±16,1	89,2±16,7	78,8±20,1
RCC	40,1±28,7	107,6±53,2	66,1±30,3	63,4±20,4	118,8±30,2
p-vrijednost	0,269(NS)	0,482(NS)	0,486(NS)	0,350(NS)	0,297(NS)

Student t-test; RCC=karcinom bubrežnih stanica; NS=razlika statistički nije značajna, X±SEM=aritmetička sredina±standardna pogreška aritmetičke sredine

BMPR-IA se nije prikazao adekvatnim signalom te nije bila moguća analiza njegova signala.

BMP-6 i BMP-7 su slabije eksprimirani i u svjetlostaničnom i u nesvjetlostaničnom tipu karcinoma bubrega u odnosu na normalno tkivo. BMP receptori IB i II su prikazali različitu ekspresiju u normalnom tkivu i karcinomu bubrega pokazujući veću ekspresiju u nesvjetlostaničnim tipovima karcinoma, manju u svjetlostaničnom karcinomu, a normalno bubrežno tkivo je pokazivalo vrijednost između njih. Ekspresija pSmad1/5/8 je najslabija bila

u normalnom bubrežnom tkivu, nešto snažnija u svjetlostaničnom tipu te najveća u nesvjetlostaničnom tipu

4.3.Lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije (RT-PCR)

Ovom metodom prikazali smo ekspresiju BMP-2 mRNA, BMP-4 mRNA, BMP-6 mRNA i BMP-7 mRNA te BMPR-IA mRNA, BMPR-IB mRNA i BMPR-II mRNA u normalnom tkivu bubrega te tkivu različitih tipova karcinoma bubrega (svjetlostanični i nesvjetlostanični tip).

U svim uzorcima nismo uspjeli dokazati mRNA ispitivanih BMP (tablica 17).

Tablica 17. Prikazan je broj i postotak uzoraka u kojima je prisutna ekspresija ispitivanih mRNA koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora

BMP	Normalni bubreg (N=25)	Karcinom bubrega (N=64)
	N (%)	N (%)
BMP-2	12 (48%)	28 (43,8%)
BMP-4	8 (32%)	26 (40,6%)
BMP-6	11 (44%)	25 (39,1%)
BMP-7	7 (28%)	22 (34,4%)
BMPR-IA	11 (44%)	23 (35,9%)
BMPR-IB	12 (48%)	18 (28,1%)
BMPR-II	11 (44%)	32 (50%)

Ekspresija mRNA u svih gore navedenih BMP-ova i njihovih receptora je bila viša u karcinomskom tkivu u odnosu na normalno tkivo bubrega (tablica 18). Također je ta razlika bila statistički značajna osim kod BMPR-IB.

Tablica 18. Relativna ekspresija mRNA ispitivanih BMP i njihovih receptora u normalnom tkivu bubrega i karcinomu bubrega

BMP	Normalni bubreg		Karcinom bubrega		p
	Medijan	Interkvartilni raspon	Medijan	Interkvartilni raspon	
BMP-2	52	30,5-89,5	1398	308,5-2996,5	p<0,0001*
BMP-4	30	15-49,5	90,5	41-379	p=0,0166*
BMP-6	74	35,25-127,5	422	54,25-2517,75	p=0,0377*
BMP-7	77	51,5-93,25	249	101-597	p=0,0116*
BMPR-IA	82	65,5-121,75	803	110,5-1508,75	p=0,0036*
BMPR-IB	45	31,5-86	94	35,75-348,5	p=0,1840
BMPR-II	68	51,5-155,5	588	127,75-2446,75	p=0,0003*

Mann-Whitney test; *p<0,05

U tablicama 19-25 možemo vidjeti odnos ekspresije BMP i njihovih receptora između normalnog bubrega te svjetlostaničnog (RCC-CC) i nesvjetlostaničnoga karcinoma bubrega (RCC-NCC).

Nivo ekspresije mRNA BMP-2 je bila najveća u svjetlostaničnom tipu karcinoma, nešto manja u nesvjetlostaničnom tipu, a najmanja u normalnom bubregu (razlika je statistički značajna između sva tri ispitivana tkiva) (tablica 19).

Izražaj mRNA BMP-4 je podjednak u oba tipa karcinoma, a u normalnom tkivu je daleko slabiji (statistički značajna razlika između RCC-CC i normalnog bubrega) (tablica 20).

Kod mRNA BMP-6 najsnažniju ekspresiju smo pronašli u RCC-CC dok su zabilježene vrijednosti kod RCC-NCC i normalnog bubrega bile niže (statistički značajna razlika između između RCC-CC i RCC-NCC te RCC-CC i normalnog tkiva bubrega) (tablica 21).

mRNA BMP-7 se najsnažnije prikazala u RCC-CC, a slabije kod RCC-NCC i najslabije kod normalnog bubrega (statistički značajna razlika između RCC-CC i normalnog bubrega) (tablica 22).

Izražaj mRNA BMP-IA je najveći kod RCC-NCC, nešto niži kod RCC-CC, a daleko slabiji kod normalnog bubrega (statistički značajna razlika između normalnog bubrega i oba tipa karcinoma) (tablica 23).

Ekspresija mRNA BMP-IB je snažna u RCC-NCC, a daleko slabija u normalnom bubregu i RCC-CC (razlika nije statistički značajna) (tablica 24).

Kod mRNA BMP-II ekspresija u RCC-NCC je visoka, u RCC-CC slabija i najslabija u normalnom bubregu (statistički značajna razlika između RCC-NCC i normalnog bubrega te RCC-NCC i RCC-CC) (tablica 25).

Tablica 19. Relativna ekspresija mRNA BMP-2 u normalnom bubregu i tkivu različitih tipova karcinoma bubrega

Tkivo	Ekspresija BMP-2		p-vrijednost između tkiva	
	Medijan	Interkvartilni raspon	RCC-CC	RCC-NCC
Normalni bubreg	52	30,5-89,5	<0,0001*	0,0101*
RCC-CC	2730	941-3320	/	0,0011*
RCC-NCC	267	82-377	0,0011*	/

RCC-CC=svjetlostanični tip karcinoma bubrega; RCC-NCC=nesvjetlostanični tip karcinoma bubrega; Mann-Whitney test; *=p<0,05

Tablica 20. Relativna ekspresija mRNA BMP-4 u normalnom bubregu i tkivu različitih tipova karcinoma bubrega

Tkivo	Ekspresija BMP-4		p-vrijednost između tkiva	
	Medijan	Interkvartilni raspon	RCC-CC	RCC-NCC
Normalni bubreg	30	15-49,5	0,0144*	0,0927
RCC-CC	87	45,5-200,5	/	0,8715
RCC-NCC	94	32,5-998,75	0,8715	/

RCC-CC=svjetlostanični tip karcinoma bubrega; RCC-NCC=nesvjetlostanični tip karcinoma bubrega; Mann-Whitney test; *=p<0,05

Tablica 21. Relativna ekspresija mRNA BMP-6 u normalnom bubregu i tkivu različitih tipova karcinoma bubrega

Tkivo	Ekspresija BMP-6		p-vrijednost između tkiva	
	Medijan	Interkvartilni raspon	RCC-CC	RCC-NCC
Normalni bubreg	74	35,25-127,5	0,0012*	0,8977
RCC-CC	1814	750-4973	/	0,0018*
RCC-NCC	75	30,25-154,75	0,0018*	/

RCC-CC=svjetlostanični tip karcinoma bubrega; RCC-NCC=nesvjetlostanični tip karcinoma bubrega; Mann-Whitney test; *=p<0,05

Tablica 22. Relativna ekspresija mRNA BMP-7 u normalnom bubregu i tkivu različitih tipova karcinoma bubrega

Tkivo	Ekspresija BMP-7		p-vrijednost između tkiva	
	Medijan	Interkvartilni raspon	RCC-CC	RCC-NCC
Normalni bubreg	77	51,5-93,25	0,0089*	0,0712
RCC-CC	476	120,5-1327,5	/	0,1710
RCC-NCC	169	82-305	0,1710	/

RCC-CC=svjetlostanični tip karcinoma bubrega; RCC-NCC=nesvjetlostanični tip karcinoma bubrega; Mann-Whitney test; *=p<0,05

Tablica 23. Relativna ekspresija mRNA BMPR-IA u normalnom bubregu i tkivu različitih tipova karcinoma bubrega

Tkivo	Ekspresija BMPR-IA		p-vrijednost između tkiva	
	Medijan	Interkvartilni raspon	RCC-CC	RCC-NCC
Normalni bubreg	82	65,5-121,75	0,0072*	0,0268*
RCC-CC	583,5	112-1423	/	0,5930
RCC-NCC	953	265,25-1508,75	0,5930	/

RCC-CC=svjetlostanični tip karcinoma bubrega; RCC-NCC=nesvjetlostanični tip karcinoma bubrega; Mann-Whitney test; *=p<0,05

Tablica 24. Relativna ekspresija mRNA BMPR-IB u normalnom bubregu i tkivu različitih tipova karcinoma bubrega

Tkivo	Ekspresija BMPR-IB		p-vrijednost između tkiva	
	Medijan	Interkvartilni raspon	RCC-CC	RCC-NCC
Normalni bubreg	45	31,5-86	0,6009	0,0813
RCC-CC	65	33,25-106,75	/	0,0782
RCC-NCC	418	99-604	0,0782	/

RCC-CC=svjetlostanični tip karcinoma bubrega; RCC-NCC=nesvjetlostanični tip karcinoma bubrega; Mann-Whitney test; *=p<0,05

Tablica 25. Relativna ekspresija mRNA BMPR-II u normalnom bubregu i tkivu različitih tipova karcinoma bubrega

Tkivo	Ekspresija BMPR-II		p-vrijednost između tkiva	
	Medijan	Interkvartilni raspon	RCC-CC	RCC-NCC
Normalni bubreg	68	51,5-155,5	0,0005*	0,0037*
RCC-CC	361	119,25-921,5	/	0,0779
RCC-NCC	1761	588-4006	0,0779	/

RCC-CC=svjetlostanični tip karcinoma bubrega; RCC-NCC=nesvjetlostanični tip karcinoma bubrega; Mann-Whitney test; $*=p<0,05$

Iz tablica 26-29 vidljiva je povezanost ekspresije BMP i njihovih receptora te kliničkopatoloških karakteristika bolesnika. U tablici 26 uočavamo da BMP-2 u bolesnika s karcinomom bubrega ima snažniju ekspresiju u bolesnika stadija T₃₋₄ ($p=0,0100$), a BMP-6 kod starijih od 60 godina ($p=0,0144$) te ECOG statusa 1-3 ($p=0,0417$).

Ispitujući povezanost kliničkopatoloških obilježja i ekspresije mRNA BMP i njihovih receptora u bolesnika s RCC-CC našli smo povezanost samo kod ekspresije BMP-4 i ECOG statusa te ekspresije BMP-7 u odnosu na spol. mRNA BMP-4 je snažnije izražena kod bolesnika s ECOG statusom 1-3 u odnosu na ECOG 0. Također mRNA BMP-7 je snažnije izražena u žena s RCC-CC (tablica 27).

Nismo uspjeli dokazati povezanost kliničkopatoloških obilježja i ekspresije mRNA BMP i njihovih receptora u bolesnika s RCC-NCC (tablica 28).

Usporedba povezanosti kliničkopatoloških obilježja i ekspresije mRNA BMP i njihovih receptora između RCC-CC i RCC-NCC nije dokazala nikakvu razliku u ekspresiji kod BMP-4 i BMPR-IA (tablica 29).

Ekspresija mRNA BMP-2 je bila snažnija u bolesnika s RCC-CC u odnosu na RCC-NCC u osoba mlađih od 60 godina, u muškaraca, u stadiju karcinoma T₁₋₂, Fuhrman stadiju I,II te kod ECOG statusa 0. Kod drugih obilježja ekspresija je također bila jača u RCC-CC, ali nije bila statistički značajna (tablica 29).

Izražaj mRNA BMP-6 je bio snažniji u bolesnika s RCC-CC koji su bili mlađi od 60 godina, u muškaraca, u stadiju karcinoma T₁₋₂, Fuhrman stadiju I,II ali i III,IV te kod ECOG statusa 0 ($p<0,05$).

Kod mRNA BMP-7 razlika u ekspresiji je zabilježena kod žena, Fuhrman stadija III,IV te ECOG statusa 0 (sve jače izraženo u RCC-CC, $p<0,05$).

Ekspresija mRNA BMPR-IB je bila snažnija kod bolesnika s RCC-CC koji su bili mlađi od 60 godina ($p<0,05$).

Izražaj mRNA BMPR-II je bio snažniji u bolesnika s RCC-NCC koji su mlađi od 60 godina, u stadiju karcinoma T₁₋₂, te ECOG statusu 0 ($p<0,05$).

Tablica 26. Relativna ekspresija mRNA BMP i njihovih receptora u ovisnosti o kliničkopatološkim karakteristikama bolesnika s RCC.

Obilježje	BMP-2		BMP-4		BMP-6		BMP-7		BMPR-IA		BMPR-IB		BMPR-II	
	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p
Dob: ≤ 60 > 60	531 1926	0,3220	65 98	0,6857	86 1483	0,0144*	293 169	0,8938	861 511,5	0,9020	279 65	0,2179	590,5 450	0,9379
Spol: -muški -ženski	1926 1398	0,6695	98 74	0,8293	422 556	0,9535	169 2724	0,0549	953 466	0,3853	69,5 414,5	0,0752	472 605	0,5434
Stadij tumora: -T ₁₋₂ -T ₃₋₄	644 3851	0,0100*	94 67	0,7450	422 /	/	249 /	/	716 861	0,6885	111 65	0,2604	605 264	0,2667
Fuhrman: -I,II -III,IV	1890,5 900	0,7828	107 69	0,8170	1301 392	0,5056	169 476	0,3084	629 836	0,9509	73,5 361,5	0,2234	593 588	0,9548
ECOG: -0 -1,2,3	569 2703	0,1384	69,5 136,5	0,1486	161 2637,5	0,0417*	306,5 135	0,5553	716 1101	0,4884	94 99	0,7962	605 132	0,1266

Mann-Whitney test ; * = p<0,05

Tablica 27. Relativna ekspresija mRNA BMP i njihovih receptora u ovisnosti o kliničkopatološkim karakteristikama bolesnika s RCC-CC.

Obilježje	BMP-2		BMP-4		BMP-6		BMP-7		BMPR-IA		BMPR-IB		BMPR-II	
	Medijan	P	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p
Dob: ≤ 60 > 60	2757 2703	0,7914	53 116	0,1129	971 3753	0,2398	536,5 320	0,9399	670,5 511,5	0,6354	88 57	0,5818	362 295	0,5491
Spol: -muški -ženski	2778 2224	0,9722	82,5 87	0,3638	1814 3847	0,5395	233,5 3338	0,0070*	629 538	0,9182	47 94	0,1939	295 605	0,4176
Stadij tumora: -T ₁₋₂ -T ₃₋₄	2259,5 3851	0,0610	92,5 67	0,7518	1814 /	/	476 /	/	538 861	0,5360	82 36	0,3273	361,5 368	0,8378
Fuhrman: -I,II -III,IV	2703 2757	0,9291	116 69,5	0,4747	2929,5 860,5	0,3450	233,5 597	0,2867	629 538	0,7577	61 173	0,3758	362 264	0,3329
ECOG: -0 -1,2,3	2771,5 2730	0,9654	65 260	0,0145*	1136 3805,5	0,1878	536,5 101	0,4685	538 1101	0,4079	82 51	0,6623	417 198	0,5851

Mann-Whitney test ; * = p<0,05

Tablica 28. Relativna ekspresija mRNA BMP i njihovih receptora u ovisnosti o kliničkopatološkim karakteristikama bolesnika s RCC-NCC.

Obilježje	BMP-2		BMP-4		BMP-6		BMP-7		BMPR-IA		BMPR-IB		BMPR-II	
	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p	Medijan	p
Dob: ≤ 60 > 60	285,5 184,5	0,7619	1628 68	0,5476	56 161	0,1939	205 145,5	0,7302	1289 447,5	0,1905	550 328	0,8571	890 3534	0,8413
Spol: -muški -ženski	184,5 389	0,2571	235 22	0,1111	75 82	0,7879	169 214,5	0,8889	1121 58	/	328 550	0,8571	1761 2063,5	0,8889
Stadij tumora: -T ₁₋₂ -T ₃₋₄	267 /	/	94 /	/	75 /	/	169 /	/	953 /	/	557 99	/	2632 38	/
Fuhrman: -I,II -III,IV	247 330	0,5476	94 835	0,6667	86 56	0,5273	169 190,5	0,8889	832,5 953	0,8571	553,5 279	0,6286	741,5 3083	0,7619
ECOG: -0 -1,2,3	194 377	0,1167	235 68	0,6667	58 765	0,2182	163,5 169	0,9048	953 832,5	0,8571	441,5 550	0,6286	2632 81	0,1167

Mann-Whitney test ; * = p<0,05

Tablica 28. Usporedba ekspresija mRNA BMP i njihovih receptora u ovisnosti o kliničkopatološkim karakteristikama između bolesnika s RCC-CC i RCC-NCC.

Obilježje	BMP-2	BMP-4	BMP-6	BMP-7	BMPR-IA	BMPR-IB	BMPR-II
	P	p	p	p	p	p	p
Dob:							
≤ 60	0,0140*	0,6286	0,0451*	0,1905	0,8413	0,0286*	0,0480*
> 60	0,1059	0,3805	0,1000	0,5035	0,6061	0,3301	0,5127
Spol:							
-muški	0,0027*	0,2698	0,0250*	0,6009	0,5338	0,2141	0,1967
-ženski	0,0667	0,0556	<0,0001*	<0,0001*	0,0727	0,7000	0,5000
Stadij tumora:							
-T ₁₋₂	0,0056*	0,7223	0,0018*	0,1710	0,4698	0,0879	0,0376*
-T ₃₋₄	/	/	/	/	/	/	/
Fuhrman:							
-I,II	<0,0001*	0,9015	0,0076*	0,5362	0,5273	0,1535	0,8208
-III,IV	0,0829	0,6061	0,0293*	<0,0001*	0,4818	0,6857	0,1135
ECOG:							
-0	0,0012*	0,4789	0,0056*	0,0420*	0,1898	0,4127	0,0170*
-1,2,3	0,2788	0,0714	0,0667	0,6857	0,5000	0,2619	0,3758

Mann-Whitney test ; * = p<0,05

5.RASPRAVA

Koštani morfogenetski proteini utječu na morfogenezu, staničnu proliferaciju i diferencijaciju, apoptozu te razvoj različitih tkiva i organa, uključujući i bubrege. Iako je u razvoj bubrega uključeno nekoliko različitih BMP, samo BMP-7 je apsolutno potreban za pravilno formiranje bubrega. Bubrezi su ujedno mjesto najveće sinteze BMP-7 kako u embrionalnom razdoblju tako i postnatalno (124,131,132). Nakon rođenja BMP imaju važnu ulogu u očuvanju bubrežne funkcije kao i u odgovoru na oštećenje bubrega. Pogotovo je značajan BMP-7 koji sprječava transformaciju epitelnih stanica tubula u mezenhimalne i njihovu apoptozu uz antiinflamatorni učinak. Učinak BMP-7 je izražen i kod akutnog i kod kroničnog bubrežnog oštećenja. Također je bitna uloga BMP u tumorskim bolestima, pa moguće i kod karcinoma bubrega (145,146,158). S obzirom na prije navedeno smatrali smo kako je vrijedno ispitati ulogu BMP, njihovih receptora kao i njihovog unutarstaničnog signalnog puta u stanicama normalnog bubrežnog parenhima, stanicama karcinoma bubrega te na granici normalnog bubrežnog tkiva i samog tumora. Utvrđivanje razlike u ekspresiji između karcinoma i normalnoga tkiva može nam otkriti da li je neki od koštanih morfogenetskih proteina specifičan za RCC. Upravo taj podatak može imati bitan klinički značaj radi potvrđivanja tumora bubrega, ciljane terapije (primjerice davanje protutijela na dotični protein), prognoze (mogući prognostički čimbenik) te praćenja (prisutnost određenog tumorskog markera može govoriti u prilog agresivnijem tipu bolesti što zahtijeva pojačano praćenje).

U ispitivanim uzorcima normalnog bubrežnog tkiva dominantna je bila ekspresija BMP-7 što i potvrđuje činjenicu da se u bubregu vrši najveći dio njegove sinteze (124,131,132). Western blot metodom smo prikazali da je njegova relativna ekspresija najveća u odnosu na sve ostale ispitivane proteine. On se prvenstveno ispoljavao u proksimalnom dijelu nefrona (najviše u epitelnim stanicama proksimalnih tubula), a taj obrazac ekspresije su pratili i receptori i proteini Smad signalnog puta. U štakora ekspresija BMP-7 mRNA je bila najsnažnija u tubulima vanjske medule, umjerena u tubulima unutarnje medule, slabija u

glomerulima i jedva prisutna u korteksu (124,131,132). Njihovu ekspresiju su djelomično pratili i receptori za BMP jer je izražaj receptora snažniji u korteksu, nego u meduli (131). Wetzel je na adultnim humanim bubrezima prikazao dominantnu ekspresiju mRNA i proteina BMP-7 u distalnom dijelu nefrona (distalni tubuli i sabirni kanalići) uz jedva prisutnu aktivnost u glomerulima (negativna imunohistokemijskim bojenjem) (133). U proksimalnim tubulima aktivnost nije dokazao niti jednom metodom. BMP receptori i Smad1/5/8 su bili pretežno eksprimirani u distalnim dijelovima, ali su bili prisutni i u proksimalnim tubulima. Autor smatra da u normalnom adultnom humanom bubregu BMP-7 glavnu ulogu ima u distalnom dijelu nefrona (prisutnost proteina i receptora). Stanice proksimalnih tubula nisu imale BMP-7, ali imaju BMP receptore uz prisutan Smad signalni put što znači da mogu reagirati na BMP. Moguća špekulacija je da kod štetnog utjecaja (npr. hipoksije) BMP-7 djeluje kao fiziološki zaštitnik distalnog tubula, ali ne i proksimalnog tubula (poznato je da se radi o najosjetljivijem dijelu nefrona na štetni čimbenik). BMP-7, po Wetzelu, ima fiziološku ulogu u području distalnoga nefrona, dok proksimalne tubularne stanice mogu odgovoriti na BMP-7 ali on ne dolazi do njih autokrinim ili parakrinim putem (133). Kako smo gore i napisali, u našim tkivnim uzorcima BMP-7, njegovi receptori i pSmad1/5/8 su bili prisutni u cijelom nefronu, ali najviše u proksimalnim tubulima. Kwak je također zabilježio ekspresiju BMP-7 pretežno u epitelnim stanicama proksimalnih tubula (145). Takvi proturječni rezultati mogu biti posljedica analize relativno malog broja uzoraka (šest uzoraka tkiva bubrega kod Wetzela), korištenja imunohistokemije bez mikrodisekcije tkiva (naša studija i Kwak), odnosno činjenica da je u sva tri istraživanja normalno tkivo uzeto prilikom nefrektomije zbog tumora. Moguće je da tumor utječe na okolno zdravo tkivo i da dovede do promjene ekspresije određenih proteina pa tako i BMP i njegovih receptora. Smatramo da bi pravi odgovor dala studija koja bi bila multiinstitucionalna, s velikim brojem uzoraka, uz korištenje mikrodisekcije tkiva a bubrezi bi morali biti zdravi, bez ikakvog popratnog patološkog nalaza.

Činjenica da je BMP-7 izražen u svjetlostaničnom i papilarnom tipu RCC (podrijetlo iz epitelnih stanica proksimalnog tubula) kao i u kromofobnom RCC (podrijetlo iz distalnih

tubula) govori u prilog tome da je on, najvjerojatnije, prisutan u proksimalnom i distalnom tubulu.

Ekspresija BMP-7 je bila snažno prisutna i u normalnom tkivu bubrega i u karcinomu bubrega. U stanicama karcinoma bubrega BMP-7 se prikazao difuznim bojenjem citoplazme, kako u svjetlostaničnom tako i u nesvjetlostaničnom tipu. Također Western blot metoda je prikazala njegovu snažnu ekspresiju kod karcinoma, a od ispitivanih proteina, u karcinoma je snažnija bila samo ekspresija pSmad1/5/8. Kwak je pokazao snažniju ekspresiju proteina BMP-7 kod nesvjetlostaničnog tipa karcinom bubrega dok je u našoj studiji ona bila podjednaka (145). mRNA BMP-7 je bila snažnije izražena u karcinomskom, nego normalnom tkivu bubrega ($p=0,0116$) pogotovo zbog snažnog izražaja u tkivu RCC-CC. Iako je protein BMP-7 bio snažno eksprimiran u našim normalnim tkivnim uzorcima njegova mRNA je bila zastupljena u samo 28% uzoraka (najmanje od svih). No, kada se u pozitivnim uzorcima gleda ekspresija BMP-7 mRNA ona je, uz ekspresiju mRNA BMPR-IA, na samom vrhu. Ovaj nesrazmjer može biti posljedica stabilnosti molekule mRNA BMP-7 (vidi poslije).

Mogući utjecaj BMP-7 na različite karcinome je već opisan. Tako primjerice BMP-7 ima, ovisno o dozi, inhibitoran učinak na karcinom štitnjače i stanične linije mijeloma te sposobnost indukcije apoptoze mijelomskih stanica (164,165). U metastatskom i primarnom melanomu BMP-7 je daleko snažnije izražen u odnosu na normalni nevus (166). Kod karcinoma prostate BMP-7 je snažno izražen u koštanim metastazama, a ujedno inducira ekspresiju VEGF u stanicama karcinoma prostate što govori u prilog ulozi BMP-7 u angiogenezi i metastaziranju karcinoma prostate (167,168). Ujedno kod karcinoma prostate BMP-7 inhibira apoptozu karcinomskih stanica čime se pospješuje tumorski rast (169). U tkivnim uzorcima karcinoma dojke BMP-7 je snažno eksprimiran, ali ne i u normalnim stanicama dojke (147). Također u stanicama karcinoma dojke ekspresija BMP-7 korelira s ekspresijom estrogenskih i progesteronskih receptora, a koji su pak bitni terapijski i prognostički čimbenik (170). U staničnom modelu karcinoma dojke dokazano je kako BMP-7 aktivacijom transkripcijskog faktora Runx2 potiče nastajanje osteolitičkih metastaza (171). S

obzirom da je u ispitivanim uzorcima karcinoma bubrega ekspresija BMP-7 relativno visoka određeni učinak BMP-7 na tumorigenezu karcinoma bubrega najvjerojatnije postoji, ali je potrebno više dokaza. Buduća istraživanja koja bi uključivala stanične linije karcinoma bubrega mogla bi ukazati na potencijalni stimulatorni ili inhibitorni učinak BMP-7 na karcinomske stanice RCC.

U normalnom i tkivu karcinoma bubrega ekspresiju BMP-6 nismo uspjeli dokazati imunohistokemijskom metodom, ali jesmo Western blot metodom. Kwak, koristeći imunohistokemijsku metodu, nije uspio dokazati prisustvo BMP-6 u normalnom bubregu, ali ju je dokazao u 20% tumorskih uzoraka (145). Drukčije rezultate pokazala je studija iz Zagreba gdje od 20 ispitivanih normalnih uzoraka u njih 7 (35%) nije bilo ekspresije proteina BMP-6, a u ostalima je zabilježena ekspresija i to dominantno u citoplazmi stanica tubula dok prisutnost u glomerulima nije zamijećena (158). Ekspresiju BMP-6 proteina su zamjetili u 90% tumorskih uzoraka. U tumorskim stanicama su aktivnost prikazali u citoplazmi i membrani tumorskih stanica, a uspoređujući međusobno njihovu ekspresiju ona je bila viša u tumorskom tkivu u odnosu na normalno tkivo (158). U našoj studiji mRNA BMP-6 je bila prisutna u 44% normalnih uzoraka te u 39% tumorskih uzoraka dok je zagrebačka grupa pronašla mRNA BMP-6 u svim uzorcima normalnog i karcinomskog tkiva (158). U našim uzorcima BMP-6 je snažnije bio prisutan u normalnom bubregu, nego karcinomu bubrega (WB) dok je RT-PCR metodom ekspresija BMP-6 bila snažnija u karcinomskom tkivu ($p=0,0377$) i to dominantno u svjetlostaničnom tipu. Drugi autori su pokazali da je protein BMP-6 izraženiji kod nesvjetlostaničnog tipa karcinoma bubrega (145).

Kim je prikazao, u staničnim linijama karcinoma bubrega, kako BMP-6, ovisno o dozi, inhibira njihovu proliferaciju, ali jedino ako je prisutan BMPR-II (146). Usprkos tome bolesnici s prisutnim BMP-6 nisu imali bolje preživljenje od onih gdje je njegov izražaj slab (145). Ovdje se ipak otvara mogućnost terapijske primjene BMP-6 u karcinoma bubrega koji ima dokazano prisustvo BMPR-II jer učinak BMP-6 ovisi o dozi. U našoj studiji ekspresija mRNA BMP-6 je bila viša u karcinomskim stanicama, pogotovo kod RCC-CC. I u stanicama

prostate njegova ekspresija je veća u karcinomskim stanicama nego u benignoj hiperplaziji prostate, a ekspresija se pojačava što je karcinom slabije diferenciran (172). Pojačana ekspresija BMP-6 u stanicama karcinoma prostate povezana je s invazivnošću i agresivnošću karcinomskih stanica te pojačanom sklonošću metastaziranja (172). Jedan od mehanizama kojima to čini je aktivacija matriks metaloproteinaza -1 i -9 i aktivaciju Id-1 proteina (173). Analiza koštanih metastaza je pokazala snažnu ekspresiju mRNA BMP-6 kod karcinoma prostate dok u ostalih karcinoma ekspresija je bila slabija (174). S druge strane BMP-6 je snažnije eksprimiran u normalnim stanicama dojke, nego u stanicama karcinoma dojke (175). Kod karcinoma dojke BMP-6 potiče stvaranje E-kadherina, time potiče adhezivnost između stanica i otežava nastajanje metastaza (176). Kod karcinoma pluća ekspresija BMP-6 je nešto izraženija nego u normalnom plućnom parenhimu, a mogući njegov utjecaj na karcinogenezu se objašnjava aktivacijom Ras signalnog puta (149,177).

mRNA BMP-2 smo pronašli u tkivnim uzorcima normalnog bubrega (48%) i karcinoma bubrega (43%). Njegova ekspresija je snažnija u karcinomu ($p < 0,0001$), snažnija od svih ostalih ispitivanih BMP-ova i njihovih receptora, i to pogotovo u svjetlostaničnom tipu (52x veća u odnosu na normalno tkivo). BMP-2 mRNA se može pronaći u tkivu karcinoma dojke kao i staničnim linijama karcinoma dojke (178). Davanje BMP-2 dovodi do smanjenja proliferacije staničnih linija karcinoma dojke putem stimulacije inhibitora ciklin kinaze p21 te stimulacijom proteina retinoblastoma (151). S druge strane BMP-2 povećava sposobnost migracije i invazije stanične linije karcinoma dojke MCF-7, a aktivacijom MAP kinaze ERK1/2 i transkripcijskog faktora Id-1 sprječava apoptozu karcinomskih stanica (179,180). Razina ekspresije BMP-2 ne utiče na preživljenje oboljelih od karcinoma dojke (180). BMP-2 je snažno izražen u stanicama karcinoma pluća dok je u normalnom plućnom parenhimu njegova ekspresija niska što bi potencijalno moglo imati terapijsku primjenu (149). Davanje rekombinantnog BMP-2 stanicama karcinoma pluća i karcinoma prostate stimulira njihovu invazivnost i migracijsku sposobnost (150,181). Također BMP-2 potiče, aktivacijom endotelnih stanica, angiogenezu u karcinoma pluća (156). BMP-2 stimulira rast stanica

karcinoma prostate u odsutnosti androgena dok u slučaju njihove prisutnosti djeluje inhibitorno (153). BMP-2 smanjuje proliferaciju stanica karcinoma želuca, a također je metilacijom epigenetski „utišan“ kod karcinoma želuca što može dovesti do progresije tumora i može predstavljati model koji je prisutan i u drugim karcinomima (182). Prema našim spoznajama ovo je prvi puta da se u literaturi prikazuje ekspresija BMP-2 u karcinoma bubrega. S obzirom da BMP-2 ima proturječne učinke na tumorske stanice, vidi gore, bilo bi interesantno, u staničnom modelu, istražiti kakav je njegov obrazac djelovanja kod karcinoma bubrega. Ujedno, snažna ekspresija u svjetlostaničnom tipu, a izuzetno malena kod normalnog tkiva mogla bi predstavljati potencijalnu terapijsku metu u bolesnika s RCC-CC.

BMP-4 protein se može pronaći u epitelnim stanicama proksimalnog i distalnog tubula normalnog bubrega (145). U našim uzorcima ekspresija njegove mRNA nije bila visoka u odnosu na ostale BMP i receptore (najniža relativna ekspresija od svih ispitivanih). BMP-4 mRNA smo pronašli u 32% normalnih uzoraka te 40% karcinoma uz snažniju ekspresiju u tumorskom tkivu ($p=0,0166$) i to pogotovo u RCC-NCC što se podudara s drugim studijama (145). Ekspresija BMP-4 je korelirala s Fuhrman stadijem što mi u našoj studiji nismo uspjeli dokazati (145).

BMP-4 mRNA je snažno izražena u staničnim linijama kao i u tkivu karcinomu dojke u odnosu na normalno tkivo dojke (175). Ekspresija proteina i mRNA BMP-4 je snažnija u adenokarcinomu kolona u odnosu na adenom kolona ili normalnu sluznicu debelog crijeva (148). Također maligne stanice kolona s pojačanom ekspresijom BMP-4 su pokazivale invazivniji fenotip, imale su veći stupanj migratorne sposobnosti i invazije te bile otpornije na apoptozu (148). BMP-4 je izraženiji u nekim staničnim linijama melanoma u odnosu na standardne nevuse, a ujedno stanice melanoma koje su imale BMP-4 su pokazivale veću sposobnost migracije i invazije (166). Davanje rekombinantnog BMP-4 stanicama karcinoma prostate (PC-3) stimulira njihovu sposobnost invazije i migracije, a inhibira invazivnost

stanične linije LNCaP (181,183). Kod karcinoma pluća ekspresija proteina BMP-4 je niska i u karcinomu i u normalnom parenhimu (149).

U našoj studiji sva tri tipa receptora su se dominantno ispoljavala u epitelnim stanicama tubula, što se slaže s drugim studijama (146). Ekspresija proteina receptora je bila podjednaka u normalnom bubregu i karcinomu, ali slabija u odnosu na BMP-7. Pogotovo se to odnosi na BMPR-IA kojega Western blotom nismo uspjeli dokazati (ali jesmo imunohistokemijom). Ekspresija svih mRNA BMP receptora u našim uzorcima je bila snažnija u karcinomu bubrega u odnosu na normalno tkivo dok je Kim prikazao izuzetno smanjenu ekspresiju i proteina i mRNA receptora BMPR-II u stanicama karcinoma bubrega (146). Davanje BMP-6 staničnim linijama karcinoma bubrega dovelo je do smanjenja proliferacije tumorskih stanica, ali samo u onih koje su imale ispoljen receptor BMPR-II (146). U tumorskim stanicama u kojih je BMPR-II bio jedva mjerljiv, nakon transfekcije s adenovirusom koji je sadržavao BMPR-II došlo je obnavljanja BMP signalnog puta i one su bile senzitivne na učinak BMP-6 (146). Iz toga se može zaključiti da BMP-6 ima negativan učinak na proliferaciju tumorskih stanica karcinoma bubrega, ali samo u prisustvu receptora tipa II. U našim uzorcima je protein BMPR-II imao nešto slabiju ekspresiju kod karcinoma ($p=0,350$) ali je zato njegova mRNA bila prisutna u najvećem broju uzoraka karcinoma. Također je mRNA BMPR-II bila snažnije eksprimirana u karcinomu, nego normalnom tkivu ($p=0,0003$). Moguće objašnjenje proizlazi iz činjenice što su naši rezultati dobiveni na tkivu karcinoma bubrega, a Kim je svoju studiju bazirao na staničnim linijama karcinoma bubrega. No, zamjetili smo kako je samo u jednog bolesnika (od njih 14) s RCC-CC i stadijem T3-4 bila prisutna ekspresija BMPR-IB, dok u RCC-NCC to nismo mogli adekvatno ispitati (samo jedan bolesnik s tim stadijem). Moguće je stoga da u uznapredovalom tumorskom stadiju (T3 i T4) bolesnika s RCC-CC dolazi do gubitka ekspresije BMPR-IB. Slične promjene receptora mogu se pronaći i u drugim karcinomima te primjerice blokiranje BMPR-II receptora dovodi do zastoja u rastu T-47D staničnih linija karcinoma dojke (184), kod karcinoma prostate ekspresija BMPR-IA, BMPR-IB i BMPR-II se postepeno gubi s progresijom karcinoma dok je

gubitak BMPR-II u vezi s povratom bolesti i smanjenim 5-godišnjim preživljenjem, a gubitak receptora BMPR-IA u stanicama crijeva dovodi do stvaranja polipa crijeva uz povećanu mogućnost nastanka karcinoma crijeva (148,154,184,185). Poznato je kako su koštani morfogenetski proteini članovi nadobitelji TGF- β koji imaju sposobnost inhibicije stanične proliferacije. Promjena u ekspresiji ili čak gubitak određenog BMP receptora (BMPR-IB ili BMPR-II kod karcinoma bubrega) može značiti „bijeg“ iz uobičajenog fiziološkog mehanizma koji sprječava nekontroliranu proliferaciju stanica i time dovodi do nekontroliranog rasta (karakteristika tumorskih stanica). Gubitak receptora može biti posljedica gubitka jednog alela genomske DNA (no genetske studije nisu to uspjele dokazati) ili posljedica smanjenja transkripcije i/ili mRNA stabilnosti (146).

Proteine BMP signalnog puta (pSmad1/5/8) smo dokazali u stanicama normalnog bubrega ali i karcinoma, potvrđujući da je Smad signalni put aktivan i kod karcinoma bubrega. Štoviše, ekspresija pSmad1/5/8 je bila snažnija kod karcinoma u odnosu na normalno tkivo ($p=0,297$). Također je već prikazano da Smad signalni put pojačava invazivnost i koštano metastaziranje stanica karcinoma dojke (186). Pojačana aktivnost pSmad1/5/8 u ispitivanim uzorcima RCC pokazuje da je Smad signalni put, barem u naših ispitanika, aktivniji u karcinomu bubrega nego u normalnom tkivu. S druge strane istraživanja Smad signalnih molekula vezanih uz TGF- β 1, člana TGF β nadobitelji i jednog od najjačih inhibitora stanične proliferacije, pokazala su smanjenu ekspresiju kod karcinoma a pojačanu u normalnom parenhimu bubrega (161). Poremećaj u BMP-Smad signalnom putu može doprinijeti nekontroliranoj staničnoj proliferaciji i progresiji karcinoma bubrega. No, molekularni mehanizmi koji se kriju ispod toga su još uvijek nejasni.

U našem istraživanju zamjetna je razlika u ekspresiji proteina (prikazana imunohistokemijskom metodom i Western blotom) i njegove mRNA (prikazane RT-PCR metodom). Slične rezultati su nađeni i kod drugih karcinoma, npr. različita ekspresija proteina i mRNA BMP-7 kod karcinoma dojke (147). Bašić-Jukić i suradnici su u svom istraživanju na 20 RCC-CC prikazali kako ekspresija mRNA i proteina BMP-6 pozitivno koreliraju (158). Ova

razlika može biti posljedica stabilnosti BMP proteina odnosno njegove mRNA. Primjerice, mRNA BMP-7 ima dugačak 3'UTR segment koji značajno pridonosi stabilnosti mRNA, a što za posledicu može imati translaciju proteina iz malog broja kopija mRNA. S druge strane BMP se sintetiziraju kao proproteini iz kojih se odvaja prodomena (slika 7) te ostaje zrela domena iz koje nastaje aktivni BMP protein. Prodomena može utjecati, pozitivno ili negativno, na stabilnost BMP proteina čime opet dolazi do različite ekspresije BMP proteina (147). Jedno od objašnjenja visoke razine mRNA, a niske proteina može biti niska stopa translacije ili reduciran poluživot proteina u karcinomskim stanicama u odnosu na normalne stanice.

Alarmo i suradnici su prikazali povezanost BMP-7 i kliničkopatoloških karakteristika kod karcinoma dojke (187). Ekspresija BMP-7 je bila različita u tumorskim podtipovima (najveća 57% u lobularnom karcinomu, a 37% u duktalnom karcinomu). Također BMP-7 ekspresija je bila pozitivno povezana s pojavom koštanih metastaza, a multivarijantna analiza je pokazala da je njegova ekspresija neovisni prognostički čimbenik u razvoju koštanih metastaza (187). Gledano s kliničke strane prisustvo BMP-7 u stanicama karcinoma dojke upućuje na povećani rizik od koštanih metastaza, čija se pojavnost može reducirati uporabom bifosfonata o čijoj se uporabi u ovih bolesnika svakako treba razmisliti (187).

Korejska studija je pokazala kako ekspresija proteina BMP-4, -6 i -7 nije povezana s kliničkopatološkim značajkama (spol, dob, ECOG status, T stadij, histološki subtip tumora i Fuhrman) u bolesnika s nemetastatskim karcinomom bubrega osim što je ekspresija BMP-7 viša u žena, a ekspresija BMP-4 korelira s Fuhrman stadijem (145). Također ekspresija BMP je bila viša u nesvjetlostaničnom u odnosu na svjetlostanični tip. Preživljenje je bilo značajnije duže u bolesnika s kromofobnim karcinomom koji su imali ekspimiran BMP-7 te se u te skupine bolesnika on može smatrati prognostičkim čimbenikom (145). U drugoj studiji nije pronađena povezanost između kliničkopatoloških karakteristika i ekspresije BMP-6 mRNA kod bolesnika s karcinomom bubrega (158).

Usporedba ekspresije mRNA i kliničkopatoloških karakteristika u naših bolesnika s karcinomom bubrega pokazala je da BMP-2 ima snažniju ekspresiju u bolesnika stadija T₃₋₄ (p=0,0100), a BMP-6 kod starijih od 60 godina (p=0,0144) te ECOG statusa 1-3 (p=0,0417) dok druge povezanosti nismo uspjeli pronaći (tablica 26). Za spomenuti je da je razlika u ekspresiji BMP-7 između spolova umalo značajna (p=0,0549), a u korist snažnije ekspresije u ženskoga spola (u RCC-CC ta razlika je i statistički značajna).

Ispitujući povezanost kliničkopatoloških obilježja i ekspresije mRNA BMP i njihovih receptora u bolesnika s RCC-CC našli smo povezanost samo kod ekspresije BMP-4 i ECOG statusa te ekspresije BMP-7 u odnosu na spol. mRNA BMP-4 je snažnije izražena kod bolesnika s ECOG statusom 1-3 u odnosu na ECOG 0. Također mRNA BMP-7 je snažnije izražena u žena s RCC-CC (tablica 27).

Nismo uspjeli dokazati povezanost kliničkopatoloških obilježja i ekspresije mRNA BMP i njihovih receptora u bolesnika s RCC-NCC (tablica 28).

Usporedba ekspresije BMP-ova i kliničko patoloških karakteristika između bolesnika s RCC-CC i RCC-NCC nam je pokazala da razlika postoji kod BMP-2 (u mlađih od 60 godina, u muškaraca, u stadiju tumora T₁₋₂, u Fuhrman stadiju I-II te ECOG statusa 0), BMP-6 (u mlađih od 60 godina, u oba spola, u tumorskog stadija T₁₋₂, u Fuhrman stadiju I-II i III-IV, ECOG statusa 0), BMP-7 (u žena, u Fuhrman stadiju III i IV te ECOG statusa 0), BMP-IB (u mlađih od 60 godina) te kod BMP-RII (u mlađih od 60 godina, u stadiju tumora T₁₋₂ i ECOG statusa 0) (tablica 29).

Ako gore navedeno koreliramo s dva najvažnija prognostička čimbenika karcinoma bubrega, a to su tumorski stadij i nuklearni gradus po Fuhrmanu vidimo da njihova povezanost postoji samo između BMP-2 i stadija tumora. Porast ekspresije mRNA BMP-2 s porastom stadija tumora kao i gore navedena činjenica da je on i do 52x izraženiji u karcinomskim stanicama govori u prilog važne uloge BMP-2 u karcinoma bubrega. Ovdje moramo napomenuti da je većina naših tumorskih uzoraka stadija T1 i T2 (76%), a što je u suglasju s podatkom da se u najnovije vrijeme, prvenstveno zbog proširenosti i dostupnosti

dijagnostičkih sredstava, većina tumora bubrega otkriva u najranijem, asimptomatskom stadiju (58-60). Također karcinomi RCC-NCC su rjeđi u odnosu na RCC-CC te nismo imali dovoljno uzoraka za adekvatnu analizu ekspresiju BMP u RCC-NCC u tumorskom stadiju T3-4 (samo jedan bolesnik).

Zamjetili smo i da u niti jednoga bolesnika (od njih 14) s RCC-CC i stadijem T3-4 nije bilo ekspresije BMP-6 i BMP-7, a u samo jednoga je bila prisutna ekspresija BMP-1B, dok u RCC-NCC to nismo mogli adekvatno ispitati (samo jedan bolesnik koji nije imao ekspresiju BMP-6 i BMP-7, a ekspresija BMP-1B je bila prisutna). Stoga smatramo da u uznapredovalom tumorskom stadiju (T3 i T4) bolesnika s RCC-CC dolazi do gubitka ekspresije BMP-6, BMP-7 i BMP-1B, a pojačane ekspresije BMP-2.

U našoj studiji je većina mRNA BMP (osim BMP-4) bila snažnije izražena u RCC-CC, a receptora u RCC-NCC. I u našoj studiji je bio BMP-7 izraženiji u žena kod RCC-CC ($p=0,0070$), ali i RCC-NCC ($p=0,7879$). Snažnija ekspresija BMP-7 u žena je pronađena i kod karcinoma dojke (u pozitivnoj korelaciji s ekspresijom estrogenskih i progesteronskih receptora) što može govoriti u prilog određene hormonske uloge na njegovu ekspresiju (170).

Graničnim tkivom nazvali smo dio bubrega koji se sastoji od pseudokapsule, priležećeg tkiva karcinoma bubrega s jedne strane, a normalnog tkiva bubrega s druge strane. Pseudokapsula se sastoji od zgusnutog vezivnog tkiva, bez staničnih elemenata, prosječne debljine 0,39 mm a obavija tumorsko tkivo (188). Tkivo karcinoma bubrega u tom području je histološki istovjetno glavnini tumorske mase. Normalno tkivo, odnosno preciznije tkivo bez tumora, sastoji se od smanjenog broja atrofičnih i spljoštenih glomerula, smanjenog broja tubula uz izraženu vezivnu stromu u kojoj se vidi limfocitna infiltracija.

U graničnom tkivu BMP-6, BMP-7, BMP receptori i pSmad 1/5/8 su prikazivali isti oblik i intenzitet ekspresije kao i u normalnom tkivu odnosno karcinomu bubrega, a u području pseudokapsule nismo uspjeli dokazati njihovu ekspresiju. S obzirom da područje graničnog tkiva histološki i imunohistokemijski ima karakteristike normalnog bubrežnog tkiva, iako s

određenim razlikama prvenstveno u smislu manjeg broja glomerula i tubula, odnosno karcinoma bubrega, a i nismo bili u mogućnosti učiniti mikrodisekciju tkiva u daljnjem istraživanju ovo tkivo nismo analizirali Western blot i RT-PCR metodom. Međutim opažanje kako ta tkiva uglavnom dijele karakteristike ekspresije koštanih morfogenetskih proteina u zdravom ili karcinomskom tkivu sugeriraju da se u tom području ipak ne zbivaju veće promjene u ekspresiji dotičnih proteina i njihovih receptora.

Evaluacija graničnog tkiva ima bitnu ulogu prilikom parcijalne nefrektomije odnosno enukleacije tumora. To se prvenstveno odnosi na pseudokapsulu koja ima značajnu ulogu prilikom enukleacije tumora bubrega jer omogućuje da se tumor tupo odljušti od okolnog zdravog bubrežnog parenhima. Pseudokapsula može biti intaktna (bez ulaska tumora u nju) ili može biti infiltrirana s njime. Minervini i suradnici su prikazali 90 bolesnika s lokalno ograničenim tumorom bubrega u kojih je učinjena enukleacija tumora, a u 66,7% bolesnika pseudokapsula nije bila invadirana tumorom (188). Međutim u svim slučajevima gdje je pseudokapsula bila invadirana tumorom, kirurški rubovi su bili bez tumora jer se prilikom enukleacije ipak odstrani i tanak sloj (prosječne debljine 1,05 mm) tkiva bubrega bez tumora. Rizik invazije pseudokapsule je bio veći što je tumor veći. Niti u jednog bolesnika nije došlo, tijekom dvogodišnjeg praćenja, do povrata bolesti. Autori zaključuju da je enukleacija tumora, u bolesnika s lokalno ograničenim tumorom bubrega (prvenstveno pT1a i rjeđe pT1b), jednakovrijedna metoda liječenja kao i parcijalna nefrektomija (188).

Ispitivanje graničnog tkiva smo odabrali jer smo se nadali kako bi nam određivanje ekspresije BMP i njihovih receptora u tom području moglo dati potencijalno primjenjive rezultate prilikom određivanja dubine kirurške resekcije kod parcijalne nefrektomije. Naime, kada bi postojala razlika u ekspresiji određenih biomarkera (npr. BMP) između tumorskog i zdravog dijela graničnog tkiva u odnosu na normalno tkivo to bi moglo govoriti u prilog nedostatno široke (ili duboke) resekcije te bi istu trebalo zamijeniti proširenom resekcijom ili čak totalnom nefrektomijom. Međutim, kako to nije slučaj, već zdravi dio graničnog tkiva dijeli podjednaku ekspresiju BMP kao i glavnina zdravog tkiva, smatramo da se ekspresija

koštanih morfogenetskih proteina ne može koristiti za evaluaciju dubine kirurške resekcije kod parcijalne nefrektomije.

BMP i Smad proteini su involvirani u tumorigenezu brojnih tumora. U prilog tome nam govore brojne genetske studije, studije na tkivnim uzorcima kao i na staničnim linijama. Smanjenje aktivnosti BMP-Smad puta može olakšati transformaciju stanica i pospješiti tumorigenezu. To potvrđuju neke animalne, ali i humane genetske studije. Tako mutacije BMPR-IA i Smad4 u ljudi dovode do razvoja polipoze kolona koja može progredirati u karcinom (189,190). U miševa pojačana ekspresija BMP antagonista noggina u epitelnim stanicama crijeva dovodi do nastajanja polipa (191). Delecija Smad4 dovodi do razvoja gastrointestinalnog tumora (192). Simultana delecija Smad1 i Smad5 u stanicama ovarija i testisa dovodi do razvoja njihovog metastatskog tumora (193). Gubitak BMPR-IA dovodi do razvoja tumora kože (194). Ovi genetski dokazi govore u prilog tome da BMP-Smad signalni put, u određenih tumora, ima tumor supresijsku ulogu, ali za sada sam mehanizam nije poznat.

Studije na tkivnim uzorcima karcinoma i staničnim linijama karcinoma u ljudi također govore u prilog važnosti BMP-Smad puta u karcinogenezi. Dokazalo se da proteini ovog puta imaju različitu ekspresiju ovisno o karcinomu. Neki od tih tumora imaju pojačanu aktivaciju BMP-Smad signalnog puta te tako BMP-4 ima pojačanu ekspresiju u adenokarcinomu debelog crijeva, BMP-2 je snažno izražen u karcinoma pluća i u stanicama karcinoma ovarija, BMP-2, BMPR-IA i BMPR-II su jače izraženi u karcinoma gušterače, BMP-4 i -7 su snažnije eksprimirani u stanicama mijeloma, BMP-4 je povišen kod prolaktinoma, a chordin je snižen u tumora ovarija (114,148,149,195-198). Postoje tumori gdje je smanjena aktivnost BMP-Smad signalnog puta: BMPR-II ima smanjenu ekspresiju kod karcinoma mokraćnog mjehura (prijelaznog epitela), BAMBI je povećan kod kolorektalnog karcinoma, nije zabilježen izražaj BMP-2 kod mikroadenoma u familijarne polipoze crijeva, BMP-3b i BMP-6 su smanjeni kod karcinoma pluća, BMP receptori su smanjeni kod karcinoma prostate, Smad1 signaliziranje je slabije kod karcinoma prostate, a gremlin je jače eksprimiran u

bazalioma kože (185,199-204). Smanjenje aktivnosti BMP-Smad puta može olakšati transformaciju stanica i pospješiti tumorigenezu što potvrđuju gore navedene kao i genetske studije. Pojačana aktivnost BMP-Smad molekula može također imati pozitivan utjecaj na tumorigenezu. Njihovo pojačano djelovanje poticajno djeluje na proliferaciju tumorskih stanica. To mogu djelomično postići putem utjecaja na matične stanice čiju obnovu potiču, prvenstveno mezenhimalnih i matičnih stanica zametnog epitela. Također moguće je da pojačana ekspresija BMP-Smad signalnog puta služi kao kompenzacija za gubitak tumor supresorskih puteva kao što su p53 i Rb. Treća mogućnost je da pojačanje BMP-Smad signalnog puta može pospješiti metastaziranje zbog njihove sposobnosti da potiču angiogenezu i migratornu sposobnost stanica (114,205).

Brojne su studije koje su istraživale utjecaj različitih BMP na stanice karcinoma i to prvenstveno na njihovu sposobnost stanične proliferacije i apoptoze. Tako davanje BMP-2 staničnim linijama neuroblastoma SH-SY5Y i RTBM1, BMP-2 staničnim linijama karcinoma kolona HCT116, BMP-2 stanicama karcinoma gušterače COLO-357, BMP-4 stanicama IL-6 ovisnog multiplog mijeloma dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa i do apoptoze (196,199,204,206-209). Svoj efekt BMP postižu stimulirajući određene gene poput p27, ciklin G, p21, Puma i Bax preko p53 ovisnog i neovisnog puta (154, 206, 208, 210). Nasuprot tome BMP mogu poticati proliferaciju stanica karcinoma kao BMP-2 u staničnim linijama karcinoma pluća A549, BMP-2 stanice karcinoma gušterače ASPC-1 i CAPAN-1 te prolaktinoma (196,197,211). Točan mehanizam kojim se to dešava nije poznato. Osim toga migratornu sposobnost karcinomskih stanica, njihovu invazivnost i metastaziranje potiče BMP-2 u stanicama karcinoma pluća A549 i H1299, BMP-2 i BMP-6 kod stanica karcinoma prostate LuCaP 23.1 te BMP-2 kod stanica karcinoma ovarija TOV-223, TOV-1946 i TOV-112D (195,212,213). Jedan od mehanizama kojim BMP potiču metastaziranje je pojačanje ekspresije Id1-Id4 koji potiču angiogenezu (114). Svi gore navedeni rezultati govore u prilog tome da BMP imaju specifičan učinak na pojedine vrsta karcinomskih stanica. Također kako se unutar karcinoma određenog histološkog sijela nalaze različite karcinomske stanice (npr.

u karcinoma gušterače COLO-357 i CAPAN-1) na koje BMP različito utječu, eventualni terapijski učinak davanjem BMP mogao bi se očekivati samo u određenim karcinomskim stanicama (npr. COLO-357 i BMP-2) gdje bi se ispoljio njihov negativan utjecaj na proliferaciju stanica.

Suvremeno liječenje karcinoma je multimodalitetno što znači da uključuje kirurško liječenje, radioterapiju, kemoterapiju, imunoterapiju, hormonsku i gensku terapiju. Konvencionalna kemoterapija, osim što ima mnogobrojne nuspojave, ima i limitiranu efikasnost. Osim u liječenju akutnih leukemija u djece i tumora zametnih stanica, gdje postoji visok postotak izliječenja, u većini ostalih tumora kemoterapija ipak ima daleko manju ulogu (214). To je jedan od razloga zbog čega su recentna istraživanja usmjerena prema ciljanoj terapiji karcinoma. Ciljana terapija, u najširem smislu, ima za cilj uništiti stanice karcinoma uz očuvanje normalnih stanica. Točnije, ona ima za cilj djelovati na točno određenu molekulu koja ima ulogu u patogenezi nastanka određenog karcinoma (214,215). Da bi to bilo moguće neophodno je poznavanje molekularnih mehanizama koji sudjeluju u patogenezi pojedinačnih karcinoma. Te molekule su većinom signalne molekule. Ciljana terapija je daleko selektivnija od klasične kemoterapije i stoga ima manje nuspojava. Ujedno liječenje može biti individualizirano prema specifičnim promjenama unutar karcinoma svakog pacijenta zasebno. Jedan od takvih, češće primjenjivanih lijekova je i imatinib mesilat (Gleevec®), koji se koristi u liječenju kronične mijeloične leukemije inhibirajući onkoprotein Bcr-Abl odgovoran za ovu bolest (216). Sličan primjer je i trastuzumab, anti-HER2 monoklonoalno protutijelo, koje blokira receptor za humani epidermalni čimbenik rasta (HER) odnosno jednu njegovu izoformu ErbB2 a koristi se kod bolesnika s karcinomom dojke koji imaju njegovu pozitivnu ekspresiju (oko 30% bolesnika) (114,217). Jedan od ciljeva našeg istraživanja je bio i ispitati mogućnost korištenja BMP u ciljanoj terapiji karcinoma bubrega. Naime, Langenfeld je dokazao snažnu ekspresiju BMP-2 kod karcinoma pluća dok ga normalni parenhim pluća praktički nije ispoljavao što ga je navelo na mogućnost ciljane terapije s protutijelom na BMP-2 (149). Našim ispitivanjem pokazali smo, kod karcinoma

bubrega, da je BMP-2 moguća meta za ciljanu terapiju. Naime, njegova mRNA je daleko snažnije eksprimirana u stanicama karcinoma (preko 50x u odnosu na normalno tkivo), a ekspresija mu se povećava s tumorskim stadijem. Mislimo da bi budućim istraživanjem trebalo pokazati da li i ekspresija proteina BMP-2 prati ovaj obrazac jer bi se time otvorila mogućnost za primjenu ciljane terapije.

Razvoj karcinoma, u većini slučajeva, zahtijeva, nekoliko mutacija na različitim genima. Inicijalne mutacije koje aktiviraju onkogene ili mutacije koje deaktiviraju tumor supresorske gene ili gene zadužene za popravak DNA su dovoljne za razvoj predispozicije prema nastanku karcinoma. U karcinoma se često pronalaze i sekundarne mutacije koje dovode do njegovog nastanka i progresije. Brojni dokazi pokazuju da alteracija u ekspresiji onkogenih ili tumor supresor gena, bez DNA mutacije u tim genima, može pridonijeti karcinogenezi. To se postiže prvenstveno putem epigenetske regulacije, a najčešće promjene su „utišavanje“ gena putem DNA metilacije (npr. p16) ili histonske acetilacije (npr. p21) (114,218,219). S obzirom kako su i DNA metilacija i histonska deacetilacija reverzibilni procesi mogu se koristiti za epigenetsku terapiju karcinoma. Inhibitori histonske deacetilacije i histonske metiltransferaze su pokazali učinak u eksperimentalnoj terapiji nekih tumora, prvenstveno putem inhibicije ekspresije onkoproteina odnosno pojačanja ekspresije tumor supresora (220).

Iako su humane genetske studije pokazale prisutnost mutacija BMP-Smad puta u tumorskim bolestima ljudi, njihove mutacije ipak nisu česte u većini karcinoma. Za razliku od toga, ekspresija BMP-Smad molekula je promijenjena u većine tumora. U karcinoma gdje je smanjena ekspresija tih molekula potencijalni terapijski pristup bi se sastojao u aktivaciji ili pojačanju ovih molekula. Pojačanje ekspresije ovih molekula nije jednostavno, pogotovo ako nisu pod epigenetskom kontrolom. Do danas međutim nije potvrđeno da je bilo koja od ovih molekula pod epigenetskom kontrolom niti je poznato da li inhibitori histonske deacetilacije i histonske metiltransferaze reguliraju ekspresiju ovih molekula (114). Kako bilo, BMP-Smad signalni put se može aktivirati i infuzijom BMP dobivenih rekombinantnim tehnikama. Na taj

način možemo brzo prekinuti negativnu ekspresiju BMP-Smad signalnog puta. Tako primjerice svakodnevne injekcije BMP-7 sprječavaju razvoj koštanih metastaza u miševa, a injekcije BMP-4 inhibiraju rast stanica preteča glioblastoma u ljudi (155,221). Neki od kemoterapijskih lijekova, koji su još u kliničkim studijama, pokazali su da mogu uništiti tumorske stanice koristeći BMP-Smad signalni put, npr. statini uništavaju stanice kolorektalnog karcinoma aktivacijom BMP-Smad puta, a davanje noggina ili nedostatak Smad4 dovodi do blokade tog efekta (222). Retinoidi imaju sličan efekt na stanice meduloblastoma, genistein na stanice karcinoma prostate, a sve pomoću aktivacije prije spomenutog signalnog puta (114,223,224).

Ovim istraživanjem prikazali smo ekspresiju BMP i njihovih receptora u normalnom tkivu bubrega kao i u karcinomu bubrega, a sve s ciljem da se dobije uvid u ulogu prije spomenutih proteina i njihovih receptora u nastanku i razvoju ove bolesti. Također smo prikazali odnos između kliničkopatoloških karakteristika ispitanika i razine ekspresije. Prema našim saznanjima ovo istraživanje je, po prvi puta u literaturi, prikazalo ekspresiju BMP-2 i pSmad1/5/8 u RCC. Daljnja istraživanja koja bi bila bazirana na pojedinačnim staničnim linijama i na ulozi BMP-2 mogla bi pridonijeti još boljem uvidu o ulozi ovih proteina i njihovih receptora u tumorigenezi karcinoma bubrega.

6.ZAKLJUČCI

Osnovni zaključak je kako postoji ekspresija koštanih morfogogenetskih proteina i njihovih receptora u zdravom tkivu bubrega te u tkivu karcinoma bubrega kao i da smo uspjeli pronaći povezanost između razine njihove ekspresije i određenih patološko-kliničkih značajki ispitanika.

To uključuje slijedeće:

- 1.U normalnom bubregu proteini BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB i BMPR-II dominantno su prisutni u epitelnim stanicama proksimalnih tubula, slabije prisutni u distalnim tubulima, a najslabije u glomerulima. pSmad1/5/8 je prisutan u tubulima (prvenstveno proksimalnim), a ekspresiju BMP-6 nismo uspjeli dokazati imunohistokemijskom metodom.
- 2.Tkivo karcinoma bubrega pokazuje ekspresiju proteina BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II te pSmad 1/5/8. Ekspresiju BMP-6 u tkivu karcinoma bubrega nismo dokazali imunohistokemijskom metodom.
- 3.Granično tkivo pokazuje obrazac ekspresije normalnog tkiva bubrega odnosno karcinoma bubrega u ovisnosti o kojem dijelu graničnog tkiva se radi. Razlike u ekspresiji koštanih morfogogenetskih proteina i njihovih receptora, u odnosu na glavninu tumorskog i zdravog tkiva, nismo pronašli.
- 4.Western blot metodom dokazali smo ekspresiju proteina BMP-6 i BMP-7, BMPR-IB, BMPR-II i pSmad1/5/8 u tkivu zdravog bubrega i u karcinomu bubrega. Ekspresija BMPR-IB i pSmad1/5/8 je povećana a ekspresija BMPR-II, BMP-6 i BMP-7 je snižena u bolesnika s karcinomom bubrega, ali razlike nisu statistički značajne. BMPR-IA se nije prikazao ovom metodom.
- 5.RT-PCR metodom utvrdili smo postojanje ekspresije BMP-2 mRNA, BMP-4 mRNA, BMP-6 mRNA i BMP-7 mRNA te BMPR-IA mRNA, BMPR-IB mRNA i BMPR-II mRNA u normalnom tkivu bubrega kao i u karcinomu bubrega. Ekspresija mRNA svih gore navedenih BMP-ova i njihovih receptora je bila viša u karcinomskom tkivu u odnosu na normalno tkivo bubrega a najveća razlika je bila u ekspresiji BMP-2.

6. Ispitujući povezanost između razine ekspresije mRNA pojedinih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma bubrega s obzirom na tumorski stadij bolesti (TNM), stupanj diferencijacije tumorskih stanica (Fuhrman) te histološki subtip tumora, pronašli smo snažniju ekspresiju BMP-2 u bolesnika s višim tumorskim stadijem.

7. Utvrdili smo da postoji povezanost ekspresije mRNA BMP-6 i dobi (ekspresija je viša u bolesnika starijih od 60 godina). Također je ekspresija mRNA BMP-7 veća u žena.

8. Ispitujući povezanost između stupnja opće tjelesne sposobnosti (ECOG status) i ekspresije mRNA pojedinih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma bubrega dokazali smo da je veća ekspresija BMP-6 u bolesnika s ECOG statusom 1-3.

9. Pronašli smo da u uznapredovalom tumorskom stadiju (T3 i T4) bolesnika s RCC-CC dolazi do gubitka ekspresije BMP-6, BMP-7 i BMP-1B uz pojačanu ekspresiju BMP-2.

Smatramo da je ovo istraživanje poticaj za daljnja istraživanja uloge koštanih morfogenetskih proteina u karcinogenezi karcinoma bubrega. Buduća istraživanja koja bi bila temeljena na staničnim linijama u kojima bi se mogla testirati uloga pojedinih BMP-ova bi mogla pridonijeti još boljem uvidu u patogenezu karcinoma bubrega. Također smatramo da bi saznanja o ekspresiji BMP-2, dobivena ovom studijom, mogla predstavljati okosnicu budućih istraživanja.

7.LITERATURA

- 1.Križan Z. Kompendij anatomije čovjeka III dio: Pregled građe grudi, trbuha, zdjelice, noge i ruke. Zagreb: Školska knjiga; 1997, str. 120-4.
- 2.Kabalin JN. Surgical anatomy of the retroperitoneum, kidneys and ureters. U: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, ur. Campbell's urology. 8. izd. Philadelphia: Saunders; 2002, str. 3-40.
- 3.Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 7. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1996, str. 273-310.
- 4.Vainio S, Müller U. Inductive tissue interactions, cell signaling and the control of kidney organogenesis. Cell 1997;90:975-8.
- 5.Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. 7. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1999, str. 373-95.
- 6.Stanton BA, Koeppen BM. Bubrež. U: Berne RM, Levy MN, ur. Fiziologija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 1996, str. 662-747.
- 7.AC Guyton, JE Hall. Medicinska fiziologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2006, str. 291-418.
- 8.Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. JAMA 1999;281:1628-31.
- 9.Patard JJ, Tazi H, Bensalah K i sur. The changing evolution of renal tumours: a single center experience over a two-decade period. Eur Urol 2004;45:490-3.
- 10.Ficarra V, Prayer-Galetti T, Novela G i sur. Incidental detection beyond pathological factors as prognostic predictor of renal cell carcinoma. Eur Urol 2003;43:663-9.
- 11.Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin 1999;49:8-31.
- 12.Wood CG. Multimodal approaches in the management of locally advanced and metastatic renal cell carcinoma: combining surgery and systemic therapies to improve patient outcome. Clin Cancer Res 2007;13:727-32.

- 13.Lohse CM, Cheville JC. A review of prognostic pathologic features and algorithms for patients treated surgically for renal cell carcinoma. *Clin Lab Med* 2005;25:433-64.
- 14.Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
- 15.Vaishampayan UN, Do H, Hussanin M i sur. Racial disparity in incidence patterns and outcome of kidney cancer. *Urology* 2003;62:1012-7.
- 16.Jemal A, Murray T, Ward E i sur. Cancer statistics 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30.
- 17.Novick AC, Campbell SC. Renal tumors. U: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, ur. *Campbell's urology*. 8. izd. Philadelphia: Saunders; 2002, str. 2672-731.
- 18.Kreiger N, Marett LO, Dodds L, Hilditch S, Oarlington G. Risk factors for renal cell carcinoma: results of a population-based. *Cancer Causes Control* 1993;4:101-10.
- 19.McLaughlin JK, Hrubec Z, Heineman EF, Blot WJ, Fraumeni Jr JF. Renal cancer and cigarette smoking: 26-year follow-up of US veterans. *Public Health Rep* 1990;105:535-7.
- 20.Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF i sur. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* 2000;343:1305-11.
- 21.Amling CL. The association between obesity and the progression of prostate and renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2004;22:478-84.
- 22.Grossman E, Messerli FH, Boyko V, Goldbourt U. Is there an association between hypertension and cancer mortality. *Am J Med* 2002;112:479-86.
- 23.Shapiro JA, Williams MA, Weiss NS, Stergachis A, LaCroix AZ, Barlow WE. Hypertension, antihypertensive medication use, and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol* 1999;149:521-30.
- 24.Mellemgaard A, Niwa S, Mehl ES, Engholm G, McLaughlin JK, Olsen JH. Risk factors for renal cell carcinoma in Denmark: role of medication and medical history. *Int J Epidemiol* 1994;23:923-30.

25. Chow WH, McLaughlin JK, Linet MS, Niwa S, Mandel JS. Use of analgesics and risk of renal cell cancer. *Int J Cancer* 1994;59:467-70.
26. Maclure M, Willett W. A case-control study of diet and risk of renal adenocarcinoma. *Epidemiology* 1990;1:430-40.
27. Wolk A, Lindblad P, Adami HO. Nutrition and renal cell cancer. *Cancer Causes Control* 1996;7:5-18.
28. Adami HO, McLaughlin JK, Hsing AW i sur. Alcoholism and cancer risk: a population-based study. *Cancer Causes Control* 1992;3:419-25.
29. Enterline PE, Hartley J, Henderson V. Asbestos and cancer: a cohort follow-up to death. *Br J Ind Med* 1987;44:396-401.
30. Buzio L, Tondel M, De Palma G i sur. Occupational risk factors for renal cell cancer. An Italian case-control study. *Med Lav* 2002;93:303-9.
31. Hu J, Mao Y, White K. Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada. *Occup Med (Lond)* 2002;52:157-64.
32. Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA i sur. EAU guidelines on renal cell carcinoma. *European Association of Urology* 2008.
33. Boice JD, Engholm G, Kleinerman RA i sur. Radiation dose and second-cancer risk in patients treated for cancer of the cervix. *Radiat Res* 1988;116:3-55.
34. Gnarr JR, Lerman MI, Zbar B, Linelan WM. Genetics of renal-cell carcinoma and evidence for a critical role for von Hippel-Lindau in renal tumorigenesis. *Semin Oncol* 1995;22:3-8.
35. Sasaki M, Tanaka Y, Okino ST i sur. Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2015-9.
36. Parker AS, Cerhan JR, Lynch CF i sur. History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol* 2004;159:42-8.
37. Barbaric ZL. *Principles of Ghenitourinary Radiology*, 2. izd. New York: Thieme Medical; 1994, str. 154.

- 38.Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ i sur. The Heidelberg classification of renal cell tumors. J Pathol 1997;183:131-3.
- 39.Eble JN, Togashi K, Pisani P. Renal cell carcinoma. U: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, ur. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: IARC Press; 2004, str. 12-43.
- 40.Yin-Goen Q, Dale J, Yang WL i sur. Advances in molecular classification of renal neoplasms. Histol Histopathol 2006;21:325-39.
- 41.Lopez-Beltran A, Scarpeli, Montironi R i sur. WHO classification of the renal tumors of the adults. Eur Urol 2006;49:798-805.
- 42.Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC i sur. Histologic coagulative necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. Cancer 2005;104:511-20.
- 43.Reiter RE, Anglard P, Liu S, Gnarra JR, Linehan WM. Chromosome 17p deletions and p53 mutations in renal cell carcinoma. Cancer Res 1996;56:27-30.
- 44.Osipov V, Keating JT, Faul PN, Loda M, Datta MW. Expression of p27 and VHL in renal tumors. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002;10:344-50.
- 45.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: a Swiss experience with 588 tumors. Cancer 2000;89:604-14.
- 46.Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2005;353:2477-90.
- 47.Huo L, Sugimura J, Tretiakova MS i sur. C-kit expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. Hum Pathol 2005;36:262-8.
- 48.Speicher MR, Schoell B, du Manoir S i sur. Specific loss of chromosomes 1,2,6,10,13,17 and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1994;145:356-64.
- 49.Lam JS, Leppert JT, Figlin RA, Beldegrun AS. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. Urology 2005;66:1-9.

50. Gunaratnam L, Morley M, Franovic A i sur. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL (-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003;278:44966-74.
51. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2006;49:633-43.
52. Störkel S, Kristiansen G, Moch H. The importance of pathology and genetics for the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. *Eur Urol Supl* 2007;6:603-10.
53. Di Lorenzo, G, Autorino R, Sternberg CN. Metastatic renal cell carcinoma: recent advances in the targeted therapy era. *Eur Urol* 2009;56:959-71.
54. Kessler O, Mukamel E, Hadar H i sur. Effect of improved diagnosis of renal cell carcinoma on the course of the disease. *J Surg Oncol* 1994;57:210.
55. Jayson M, Saunders H. Increased of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* 1994;51:203-5.
56. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol* 2002;7:135-40.
57. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 1996;14:216-22.
58. André M, Helenon O, De Fromont M i sur. Tumeur du rein: données anatomo-cliniques et détection. *J Radiol* 2002;83:773-83.
59. Davidson AJ, Hartman DS, Choyke PL i sur. Radiologic assessment of renal masses: implications for patient care. *Radiology* 1997;202:297-305.
60. Helenon O, Correas JM, Balleyguier C i sur. Ultrasound of renal tumors. *Eur Radiol* 2001;11:1890-1.
61. Campbell SC, Fichtner J, Novick AC i sur. Intraoperative evaluation of renal cell carcinoma: a prospective study of the role of ultrasonography and histopathological frozen sections. *J Urol* 1996;155:1191-5.

62. Sheth S, Scatarige JC, Horton KM i sur. Current concepts in the diagnosis and management of renal cell carcinoma: role of multidetector CT and three-dimensional CT. *Radiographics* 2001;21:237-54.
63. Pretorius ES, Wickstrom ML, Siegelman ES. MR imaging of renal neoplasms. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2000;8:813-36.
64. Roy C, El Ghali S, Buy X i sur. Significance of the pseudocapsule on MRI of renal neoplasms and its potential application for local staging: a retrospective study. *Am J Roentgenol* 2005;184:113-20.
65. Sobin LH, Wittekind CH, ur. International Union Against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours. 6. izd. New York: Wiley-Liss; 2002, str.193-5.
66. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;6:655-63.
67. Lang H, Lindner V, de Fromont M i sur. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: assessment of 241 patients with >15-year follow-up. *Cancer* 2005;103:625-9.
68. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histological subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27:612-24.
69. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N i sur. Prognostic value of histological subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 2005;23:2763-71.
70. Delahunt B, Eble JN, McCedie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol* 2001;32:590-5.
71. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG i sur. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implication for prognosis. *J Urol* 2003;170:1742-6.
72. Kim HL, Han KR, Zisman A, Figlin RA, Belldegrun AS. Cachexia-like symptoms predict a worse prognosis in localized T1 renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;171:1810-3.

73. Patard JJ, Leray E, Cindolo L i sur. Multi-institutional validation of a symptom based classification for renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;172:858-62.
74. Bensalah K, Leray E, Fergelot P i sur. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol* 2006;175:859-63.
75. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guille F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003;44:226-32.
76. Oken MM, Creech RH, Tormey DC i sur. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982;5:649-55.
77. Furge KA, Lucas KA, Takahashi M i sur. Robust classification of renal cell carcinoma based on gene expression data and predicted cytogenetic profiles. *Cancer Res* 2004;64:4117-21.
78. Zhao H, Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T, Tibshirani R, Brooks JD. Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS Med* 2006;3:e13. [Epub 2005 Dec 6].
79. Kuczyk M, Wegener G, Jonas U. The therapeutic value of adrenalectomy in case of solitary metastatic spread originating from primary renal cell cancer. *Eur Urol* 2005;48:252-7.
80. Kuczyk M, Munch T, Machtens S i sur. The need for routine adrenalectomy during surgical treatment for renal cell cancer: the Hannover experience. *BJU Int* 2002;89:517-22.
81. Giberti C, Oneto F, Martorana G, Roviola S, Carmignani G. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors on a series of 328 cases. *Eur Urol* 1997;31:40-8.
82. Bissada NK, Yakout HH, Babanouri A i sur. Long-term experience with management of renal cell carcinoma involving the inferior vena cava. *Urology* 2003;61:89-92.
83. Nieder AM, Taneja SS. The role of partial nephrectomy for renal cell carcinoma in contemporary practice. *Urol Clin North Am* 2003;30:529-42.

- 84.Lui KW, Gervais DA, Mueller PR. Radiofrequency ablation: an alternative treatment method of renal cell carcinoma. *Chang Gung Med J* 2004;27:618-23.
- 85.Gill IS, Remer EM, Hasan WA i sur. Renal cryoablation: outcome at 3 years. *J Urol* 2005;173:1903-7.
- 86.Hines-Peralta A, Goldberg SN. Review of radiofrequency ablation for renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:6328-34.
- 87.Mickisch GHJ. Rational selection of a control arm for randomized trials in metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003;43:670-9.
- 88.Cutuli BF, Methlin A, Teissier E i sur. Radiation therapy in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 1990;348:179.
- 89.Geiz E, Libes M, Bar-Deroma R, Rubinov R, Stein M, Kuten A. Postoperative irradiation in localized renal cell carcinoma: the Rambam Medical Center experience. *Tumori* 2002;88:500-2.
- 90.Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW i sur. Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet* 2004;363:1665-72.
- 91.Harris DT. Hormonal therapy and chemotherapy of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 1983;10:422-30.
- 92.Kjaer M. The role of medroxyprogesterone acetate (MPA) in the treatment of renal adenocarcinoma. *Cancer Treat Rev* 1988;15:195-209.
- 93.Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol* 1995;22:42-60.
- 94.Goldstein L, Galski H, Fojo A et al. Expression of a multi-drug resistance gene in human tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1988;29:298.
- 95.Stadler WM, Huo D, George C i sur. Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer. *J Urol* 2003;170:1141-5.
- 96.Bukowski RM. Immunotherapy in renal cell carcinoma. *Oncology* 1999;13:801-10.

97. Yang JC, Haworth L, Sherry RM i sur. A randomized trial of bevacizumab, an antivasular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:427-34.
98. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P i sur. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:115-24.
99. Knebelmann B, Ananth S, Cohen HT, Sukhatme VP. Transforming growth factor alpha is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 1998;58:226-31.
100. Everitt JI, Walker CL, Goldsworthy TW, Wolf DC. Altered expression of transforming growth factor-alpha: an early event in renal cell carcinoma development. *Mol Carcinog* 1997;19:213-9.
101. de Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC i sur. Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL) (-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1387-92.
102. Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.
103. De Mulder PHM, Patard JJ, Szczylik C, Otto T, Eisen T. Current status of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol Suppl* 2007;6:665-71.
104. Samartzis D, Khanna N, Shen FH, Howard SA. Update on bone morphogenetic proteins and their application in spine surgery. *J Am Coll Surg* 2005;200:236-48.
105. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
106. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL i sur. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:3511-5.
107. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1828-32.
108. Wozney JM, Rosen V, Celeste AL i sur. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.

109. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney international* 2000;57:2207-14.
110. Martinovic S, Simic P, Borovecki F, Vukicevic S. Biology of bone morphogenetic proteins. U: Vukicevic S, Sampath TK ur. Bone morphogenetic proteins: regeneration of bone and beyond. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag; 2004. str. 45-72.
111. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002;27:2-8.
112. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by morphogenetic protein. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:49-61.
113. Chen D, Zhao M, Harris SE, Zenghui MI. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 2004;9:349-58.
114. Li B. Bone morphogenetic protein-SMAD pathway as drug targets for osteoporosis and cancer therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2008;8:208-19.
115. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35.
116. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins – multifunctional regulators of vertebrate development. *Gen Develop* 1996;10:1580-94.
117. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Gen Dev* 1996;6:432-8.
118. Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 2003;35:43-56.
119. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:251-63.
120. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1998;106:160-6.
121. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:15-22.

- 122.Harrison CA, Wiater E, Gray PC, Greenwald J, Choe S, Vale W. Modulation of activin and BMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225:19-24.
- 123.Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. *Spine* 2002;27:10-5.
- 124.Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:299-308.
- 125.Hata A, Lagna G, Massague J i sur. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 1998;12:186-97.
- 126.Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 2004;16:291-9.
- 127.Hassel S, Schmitt S, Hartung A i sur. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:44-51.
- 128.Yanagita M. BMP antagonists: Their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rew* 2005;16:309-17.
- 129.Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005;19:2783-810.
- 130.Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-41.
- 131.Bosukonda D, Shih MS, Sampath KT, Vukicevic S. Characterization of receptors for osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 (OP-1/BMP-7) in rat kidneys. *Kidney Int* 2000;58:1902-11.
- 132.Simon M, Maresh JG, Harris SE i sur. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol* 1999;276:382-9.
- 133.Wetzel P, Haag J, Câmpean V i sur. Bone morphogenetic protein-7 expression and activity in the human adult normal kidney is predominantly localized to the distal nephron. *Kidney Int* 2006;70:717-23.

134. Borovecki F, Simic P, Grgurevic L, Vukicevic S. The role of bone morphogenetic proteins in developing and adult kidney. U: Vukicevic S, Sampath TK ur. Bone morphogenetic proteins: regeneration of bone and beyond. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag; 2004. str. 213-43.
135. Vukicevic S, Basic V, Rogic D i sur. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 1998;102:202-14.
136. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease. *Kidney Int* 2004;66:480-5.
137. Vukicevic S, Grgic M, Stavljenic A, Sampath TK. Recombinant human OP-1 (BMP-7) prevents rapid loss of glomerular function and improves mortality associated with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:A3102.
138. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN i sur. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 2002;61:1714-28.
139. Wang SN, Lapage J, Hirschberg R. Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2392-9.
140. Dolan V, Murphy M, Sadlier D i sur. Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2005;45:1034-9.
141. Klahr S. The bone morphogenetic proteins (BMPs). Their role in renal fibrosis and renal function. *J Nephrol* 2003;16:179-85.
142. Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenetic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* 2007;56:1825-33.
143. Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2002;61:51-60.
144. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H i sur. BMP-7 counteracts TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003;9:964-8.

- 145.Kwak C, Park YH, Kim IY, Moon KC, Ku JH. Expression of bone morphogenetic proteins, the subfamily of the transforming growth factor- β superfamily, in renal cell carcinoma. *J Urol* 2007;178:1062-7.
- 146.Kim IY, Lee DH, Lee DK i sur. Decreased expression of bone morphogenetic protein (BMP) receptor type II correlates with insensitivity to BMP-6 in human renal cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:6046-51.
- 147.Alarmo EL, Rauta J, Kauraniemi P, Karhu R, Kuukasjärvi T, Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 7 is widely overexpressed in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:411-9.
- 148.Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS, Dong H, Yang W, Yang WL. Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp Cell Res* 2007;313:1033-44.
- 149.Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg* 2005;80:1028-32.
- 150.Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Lengenfeld J. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1445-54.
- 151.Ghosh-Choudhury N, Ghosh-Choudhury G, Celeste A i sur. Bone morphogenetic protein-2 induces cyclin kinase inhibitor p21 and hypophosphorylation of retinoblastoma protein in estradiol-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2000;1497:186-96.
- 152.Bobinac D, Maric I, Zoricic S i sur. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. *Croat Med J* 2005;46:389-96.
- 153.Ide H, Yoshida T, Matsumoto N i sur. Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res* 1997;57:5022-7.

154. Kim IY, Lee DH, Ahn HJ i sur. Expression of bone morphogenetic protein receptors type-IA, -IB, and -II correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Cancer Res* 2000;60:2840-4.
155. Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G i sur. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am J Pathol* 2007;171:1047-57.
156. Langenfeld EM, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2004;2:141-9.
157. Keller ET, Zhang J, Cooper CR i sur. Prostate carcinoma skeletal metastases: cross-talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20:333-49.
158. Basic-Jukic N, Radic-Antolic M, Hudolin T i sur. Immunolocalization and mRNA expression of bone morphogenetic protein-6 in human clear cell renal carcinoma. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:445-50.
159. Blish KR, Wang W, Willingham MC i sur. A human bone morphogenetic protein antagonist is down-regulated in renal cancer. *Mol Biol Cell* 2008;19:457-64.
160. Yamasaki M, Nomura T, Mimata H, Nomura Y. Involvement of bone morphogenetic protein 2 in ossification of renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;172:475-6.
161. Cardillo MR, Lazzereschi D, Gandini O, Di Silverio F, Colletta G. Transforming growth factor- β pathway in human renal cell carcinoma and surrounding normal-appearing renal parenchyma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001;23:109-17.
162. White AP, Vaccaro AR, Hall JA, Whang PG, Friel BC, McKee MD. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop* 2007;31:735-41.
163. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Del Rev* 2000;43:65-92.
164. Franzén A, Heldin NE. BMP-7 induced cell cycle arrest of anaplastic thyroid carcinoma cells via p21(CIP1) and p27(KIP1). *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:773-81.

- 165.Ro TB, Holt RU, Brenne AT i sur. Bone morphogenetic protein -5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene* 2004;23:3024-32.
- 166.Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff AK. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res* 2005;65:448-56.
- 167.Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Takezawa Y, Csuzuki T, Yamanaka H. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate* 2003;54:268-74.
- 168.Dai J, Kitagawa Y, Zhang J i sur. Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein. *Cancer Res* 2004;64:994-9.
- 169.Yang S, Zhong C, Frenkel B, Reddi AH, Roy-Burman P. Diverse biological effect and Smad signaling of bone morphogenetic protein 7 in prostate tumor cells. *Cancer Res* 2005;65:5769-77.
- 170.Schwalbe M, Sanger J, Eggers R i sur. Differential expression and regulation of bone morphogenetic protein 7 in breast cancer. *Int J Oncol* 2003;23:89-95.
- 171.Barnes GL, Hebert KE, Kamal M i sur. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res* 2004;64:4506-13.
- 172.Yuen HF, Chan YP, Cheung WL, Wong YC, Wang X, Chan KW. The prognostic significance of BMP-6 signaling in prostate cancer. *Mod Pathol* 2008;21:1436-43.
- 173.Darby S, Cross SS, Brown NJ, Hamdy FC, Robson CN. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *J Pathol* 2008;214:394-404.
- 174.Autzen P, Robson CN, Bjarteli A i sur. Bone morphogenetic protein 6 in skeletal metastases from prostate cancer and other common human malignancies. *Br J Cancer* 1998;78:1219-23.

175. Alarmo EL, Kuukasjärvi T, Karhu R, Kallioniemi A. A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of BMP4 and BMP7. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103:239-46.
176. Yang S, Du J, Wang Z i sur. BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing delta EF1 in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007;7:211.
177. Kraunz KS, Nelson HH, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. Interaction between the bone morphogenetic proteins and Ras/MAP-kinase signalling pathways in lung cancer. *Br J Cancer* 2005;93:949-52.
178. Arnold SF, Tims E, Mcgrath BE. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2. *Cytokine* 1999;11:1031-7.
179. Clement JH, Raida M, Sanger J i sur. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol* 2005;27:401-7.
180. Raida M, Clement JH, Ameri K, Han C, Leek RD, Harris AL. Expression of bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cells inhibits hypoxic cell death. *Int J Oncol* 2005;26:1465-70.
181. Feeley BT, Krenek L, Liu N i sur. Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 2006;38:154-66.
182. Wen XZ, Akiyama Y, Baylin SB, Yuasa Y. Frequent epigenetic silencing of the bone morphogenetic protein 2 gene through methylation in gastric carcinoma. *Oncogene* 2006;25:2666-73.
183. Brubaker KD, Corey E, Brown LG, Vessella RL. Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2004;91:151-60.
184. Pouliot F, Blais A, Labrie C. Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:277-81.

- 185.Kraunz KS, Nelson HH, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. Interaction between the bone morphogenetic proteins and Ras/MAP-kinase signalling pathways in lung cancer. *Br J Cancer* 2005;93:949-52.
- 186.Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H i sur. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene* 2008;27:6322-33.
- 187.Alarmo EL, Korhonen T, Kuukasjarvi T, Huhtala H, Holli K, Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 7 expression associates with bone metastasis in breast carcinomas. *Ann Oncol* 2008;19:308-14.
- 188.Minervini A, di Cristofano C, Lapini A i sur. Histopathologic analysis of peritumoral pseudocapsule and surgical margin status after tumor enucleation for renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2009;55:1410-8.
- 189.Howe JR, Bair JL, Sayed MG i sur. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet* 2001;28:184-7.
- 190.Howe JR, Roth S, Ringold JC i sur. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998;280:1086-8.
- 191.Haramis AP, Begthel H, van den Born M i sur. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 2004;303:1684-6.
- 192.Kim BG, Li C, Qiao W i sur. Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature* 2006;441:1015-9.
- 193.Pangas SA, Li X, Umans L i sur. Conditional deletion of Smad1 and Smad5 in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice. *Mol Cell Biol* 2008;28:248-57.
- 194.Ming Kwan K, Li AG, Wang XJ, Wurst W, Behringer RR. Essential roles of BMPR-IA signaling in differentiation and growth of hair follicles and in skin tumorigenesis. *Genesis* 2004;39:10-25.

195. Le Page C, Puiffe ML, Meunier L i sur. BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis. *J Ovarian Res* 2009;2:4.
196. Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T i sur. Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. *Gastroenterology* 1999;116:1202-16.
197. Paez-Pereda M, Giacomini D, Refojo D i sur. Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1034-9.
198. Moll F, Millet C, Noël D i sur. Chordin is underexpressed in ovarian tumors and reduces tumor cell motility. *FASEB J* 2006;20:240-50.
199. Kim IY, Lee DH, Lee DK i sur. Restoration of bone morphogenetic protein receptor type II expression leads to a decreased rate of tumor growth in bladder transitional cell carcinoma cell line TSU-Pr1. *Cancer Res* 2004;64:7355-60.
200. Sekiya T, Adachi S, Kohu K i sur. Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem* 2004;279:6840-6.
201. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA i sur. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 2004;126:111-21.
202. Kim IY, Lee DH, Lee DK i sur. Loss of expression of bone morphogenetic protein receptor type II in human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;73:7651-9.
203. Qiu T, Grizzle WE, Oelschlager DK, Shen X, Cao X. Control of prostate cell growth: BMP antagonizes androgen mitogenic activity with incorporation of MAPK signals in Smad1. *EMBO J* 2007;26:346-57.
204. Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K i sur. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14842-7.

- 205.Miyazono K, Miyazawa K. Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* 2002;2002:40.
- 206.Nakamura Y, Ozaki T, Koseki H, Nakagawara A, Sakiyama S. Accumulation of p27 KIP1 is associated with BMP2-induced growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:206-13.
- 207.Beck SE, Jung BH, Fiorino A i sur. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:135-45.
- 208.Beck SE, Jung BH, Del Rosario E, Gomez J, Carethers JM. BMP-induced growth suppression in colon cancer cells is mediated by p21WAF1 stabilization and modulated by RAS/ERK. *Cell Signal* 2007;19:1465-72.
- 209.Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Börset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induce apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood* 2001;97:516-22.
- 210.Okamoto K, Prives C. A role of cyclin G in the process of apoptosis. *Oncogene* 1999;18:4606-15.
- 211.Langefeld EM, Kong Y, Langefeld J. Bone morphogenetic protein 2 stimulation of tumor growth involves the activation of Smad-1/5. *Oncogene* 2006;25:685-92.
- 212.Langefeld EM, Kong Y, Langefeld J. Bone morphogenetic protein-2 induced transformation involves the activation of mammalian target of rapamycin. *Mol Cancer Res* 2005;3:679-84.
- 213.Dai J, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z, Keller ET. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res* 2005;65:8274-85.
- 214.Green MR. Targeting targeted therapy. *N Engl J Med* 2004;350:2191-3.
- 215.Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004;432:294-7.
- 216.Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002;8:14-8.

- 217.Ménard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* 2001;61:67-72.
- 218.Miremedi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet* 2007;16:28-49.
- 219.Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007;16:50-9.
- 220.Smith LT, Otterson GA, Plass C. Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy. *Trends Genet* 2007;23:449-56.
- 221.Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N i sur. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 2006;444:761-5.
- 222.Kodach LL, Bleuming SA, Musler AR i sur. The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer. *Cancer* 2008;112:300-6.
- 223.Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA i sur. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nat Med* 2003;9:1033-8.
- 224.Craft CS, Xu L, Romero D, Vary CP, Bergan RC. Genistein induces phenotypic reversion of endoglin deficiency in human prostate cancer cells. *Mol Pharmacol* 2008;73:235-42.

8. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME

Dean Markić

DATUM I MJESTO ROĐENJA

31. svibnja 1972., Rijeka, Republika Hrvatska

ADRESA

Zvoneća 1, Zvoneća, 51 213 Jurdani

RADNO MJESTO

Klinika za urologiju, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

ŠKOLOVANJE

1991.-1997. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (prosječna ocjena 4.2, 1998. položen državni ispit);

1997.- Upisao Poslijediplomski znanstveni studij iz Biomedicine na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Rijeci;

2001.- Obranio magistarski rad na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Rijeci pod naslovom *Intraepitelna neoplazija u reseciranom tkivu prostate;*

2003. - 2004. Poslijediplomski stručni studij iz Urologije, Medicinski fakultet Zagreb

2007. - Položen specijalistički ispit iz urologije pred komisijom Ministarstva zdravstva

2008. - Položen europski specijalistički ispit iz urologije pred komisijom Europskog urološkog udruženja (Atena)

POZNAVANJE JEZIKA

Aktivno: engleski i talijanski jezik;

AKADEMSKI STUPNJEVI

01. srpnja 1997. Doktor medicine, Medicinski fakultet u Rijeci (1998. položen državni ispit);

18. srpnja 2001. Magistar znanosti, Medicinski fakultet u Rijeci;

ZNANSTVENI STUPNJEVI

18. srpnja 2001. Magistar znanosti, Medicinski fakultet u Rijeci;

ČLANSTVO U STRUKOVNIM UDRUŽENJIMA

Hrvatska liječnička komora, Zagreb (od 1998.);

Hrvatsko društvo za hitnu medicinu, Rijeka (od 2000.);

European Urological Association (od 2003.)

NASTAVNA DJELATNOST

1993.-1995. - Student-demonstrator, Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski

fakultet u Rijeci

RADNO ISKUSTVO

2001.-2002. - Hitna medicinska služba, KBC Rijeka

2002.-2010. - Klinika za urologiju, KBC Rijeka

PUBLIKACIJE

CC

1.Zamolo G, Čoklo M, Štifter S, Bosnar A, Markić D, Pavlović-Ružić I. Solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma of the spermatic cord. Wien Klin Wochenschr 2005;117:323.

2.Valenčić M, Španjol J, Maričić A, Markić D, Fučkar D, Bobinac M. Cystocoele and sensory urgency – our experience. Coll Antropol 2008;32:207-9.

3.Bobinac D, Španjol J, Marinović M, Zoričić Cvek S, Marić I, Cicvarić T, Fučkar D, Markić D, Vojniković B. Expression of bone morphogenetic proteins, cartilage-derived morphogenetic proteins and related receptors in normal and osteoarthritic human articular cartilage. Coll Antropol 2008;32:83-7.

4.Ivančić A, Saftić I, Cicvarić T, Španjol J, Štalekar H, Marinović M, Markić D. Initial experience with external thoracic stabilization by the „Figure of Eight“ osteosynthesis in polytraumatized patients with flail chest injury. Coll Antropol 2009;33:51-6.

5.Markić D, Čelić T, Španjol J, Gršković A, Bobinac D, Fučkar Ž. Expression of bone morphogenetic protein-7, it's receptors and Smad1/5/8 in normal human kidney and renal cell cancer. Coll Antropol 2010;34:149-53.

EMBASE/Excerpta medica

1.Smokvina M, Markić D, Tomulić V. Retrospektivna studija 111 djece s idiopatskom trombocitopeničnom trombotičnom purpustom na Pedijatrijskoj klinici Kantrida. Paediatr Croat 1998;42 (suppl 2):81A.

2. Zeidler F, Jakljević T, Hauser G, Markić D, Tomulić V, Bobić I. Computer support and systemic triage of patients in emergency service using Australian national triage scale-first results. *Neurol Croat* 2001;50(3):254A.
3. Markić D, Fučkar Ž, Đorđević G. Učestalost i klinička značajnost prostatične intraepitelijske neoplazije u biopsiji prostate. *Acta Fac Med Flum* 2002;27:1-4.
4. Markić I, Katić M, Markić D. Zbrinjavanje bolesnika s hipertenzivnom krizu u Centru za hitnu medicinsku pomoć Doma zdravlja Opatija. *Liječ Vjesn* 2004;126:234-40.
5. Orlić P, Vukas D, Ćuruvija D, Markić D, Merlak-Prodan Ž, Živčić-Ćosić S, Orlić L, Blečić G, Valenčić M, Španjol J, Budiselić B. Pseudoaneurizma nakon transplantacije bubrega. *Acta Med Croatica* 2008; 62:86-9.
6. Markić D, Fučkar Ž, Valenčić M, Maričić A, Oguić R, Sotošek S, Španjol J, Orlić P. Perkutana nefrostomija u bolesnika s transplantiranim bubregom. *Acta Med Croatica* 2008; 62:156A.
7. Španjol J, Bobinac D, Markić D, Ćelić T, Fučkar Ž. Ekspresija BMP-7 prilikom akutnog odbacivanja u transplantiranom bubregu kod štakora. *Acta Med Croatica* 2008; 62:152A
8. Maričić A, Orlić P, Valenčić M, Oguić R, Sotošek S, Markić D, Španjol J, Fučkar Ž. Operative technique and urological complications in kidney transplantation: our experiences. *Acta Med Croatica* 2008; 62:148A.
9. Markić D, Valenčić M, Velčić G, Maričić A, Oguić R, Sotošek S, Španjol J, Fučkar Ž. Transplantacija bubrega u bolesnika s urinarnom diverzijom. *Liječ Vjesn* 2009;131:308-311.

Znanstvena kongresna priopćenja

1. Markić D, Mozetić V. The role of ultrasonography in the following of pathological conditions of soft-tissue. *Croatian International Scientific Symposium for medical students and young doctors, Rijeka, December 2-5, 1996:30.*

2.Španjol J, Markić D, Sotošek S, Oguić R, Fučkar Ž, Bobinac D. BMP-7 expression in renal inflammatory diseases. 4th Urological Alpe Adria Meeting Graz, Austria September 16, 2006:3.

3.Španjol J, Markić D, Valenčić M, Maričić A, Oguić R, Ahel J, Fučkar Ž. Bone morphogenetic protein-7: a growth factor in renal cell cancer. 5th Urological Alpe Adria Meeting Verona, 2007:9.

4.Bobinac D, Marić I, Markić D, Cvijanović O, Španjol J, Ćelić T, Fučkar Ž. The expression of bone morphogenetic protein 7 and its receptors in the human normal kidney and kidney cancer. Calcified Tissue International 2007;80(Suppl 1):S61 (34th European symposium on calcified tissues, Kopenhagen, Danska).

5.Bobinac D, Ćelić T, Markić D, Španjol J, Gršković A, Fučkar Ž. Expressions of bone morphogenetic proteins and their receptors in normal human kidney and renal cell carcinoma. 35th European Symposium on Calcified Tissues, May, Barcelona; 2008:P57.

6.Ćelić T, Markić D, Španjol J, Gršković A, Marić I, Fučkar Ž, Bobinac D. PSMAD 1/5/8 is expressed in normal human kidney as well as in renal cell carcinoma. 36th European Symposium on Calcified Tissues, May, Beč; 2009:P.

Znanstveno istraživački projekti:

1.Koštani morfogenetski proteini u tumorskim i upalnim bolestima neskeletnih tkiva (0062075).

2.Promjene koštanog metabolizma u bolestima bubrega i jetre (062-0620226-0207).