

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Gorana Z. Nikolić

**ULOGA IMUNOFLUORESCENCIJE,  
IMUNOHISTOHEMIJE I NELINEARNE  
SKENIRAJUĆE MIKROSKOPIJE U  
SAVREMENOJ DIJAGNOSTICI TUMORA  
POREKLA BUBREŽNOG PARENHIMA,  
PREMA NOVOJ KLASIFIKACIJI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dr Gorana Z. Nikolić

**THE ROLE OF IMMUNOFLUORESCENCE,  
IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND  
NONLINEAR SCANNING MICROSCOPY IN  
DIAGNOSIS OF RENAL CELL TUMORS  
ACCORDING TO NEW CLASSIFICATION**

PhD thesis

Belgrade, 2024.

Mentor 1:

**Prof. dr Sanja Radojević Škodrić**

*Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

Mentor 2:

**Prof. dr Tatjana Pekmezović**

*Institut za epidemiologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

Članovi komisije:

**Prof. dr Svetislav Tatić**

*Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

**Prof. dr Zoran Džamić**

*Klinika za urologiju Univerzitetskog centra Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

**Doc. dr Gorica Marić**

*Institut za epidemiologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

**Prof. dr Lidija Matija**

*Katedra za biomedicinsko inženjerstvo, Mašinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

**Prof. dr Ljibinka Veličković-Janković**

*Katedra za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu*

## Zahvalnica

Zahvaljujem se svom mentoru, Prof. dr Sanji Radojević Škodić na decenijskoj saradnji protkanoj prenošenjem znanja i iskustva, poverenju koje mi je ukazala tokom mog rada sa njom, brojnim korisnim sugestijama i neizmernim razumevanjem.

Zahvalnost dugujem i Prof. dr Tatjani Pekmezović, na nesebičnoj pomoći i ogromnoj podršci koju mi je ukazala proteklih godina.

Zahvaljujem se mojoj velikoj prijateljici i bivšem mentoru, Prof. dr Lidiji Matiji, na svim satima, danima i nedeljama koje mi je posvetila u trenucima kada mi je bilo najpotrebnije, svim sugestijama koje su mi bile neprocenjive.

Zahvalna sam mojoj prijateljici i kolegici Doc. dr Maji Životić, na nesebičnoj pomoći i velikoj podršci koju mi je pružila u teškom periodu i bez koje ova disertacija ne bi bila završena kada je završena.

Zahvaljujem se Veri Luković, laborantu sa Instituta za patologiju, koja mi je izlazila u susret za svaku molbu koju sam imala i koja je ostajala na poslu i posle radnog vremena kako bi pripremila i tehnički obradila materijal koji mi je bio neophodan za izradu disertacije.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za fiziku, koji su mi omogućili da deo eksperimentalnog istraživanja, ako i analizu slika odradim kod njih.

Zahvaljujem se i doc. dr Sanji Despotović na nesebičnoj pomoći tokom snimanja i analize slika kako na Institutu za histologiju, tako i na Institutu za fiziku.

Takođe, zahvaljujem se Prof. dr Svetislavu Tatiću i Prof. dr Zoranu Džamiću na ogromnoj podršci i svim lepim rečima koje su mi uputili.

Ova disertacija je prenstveno posvećena mojim sinovima, Mihajlu i Đorđu, kao i mojim roditeljima i porodici za nesebičnu podršku i za ogromno razumevanje zbog vremena koje sam posvetila poslu i izradi ove disertacije, a koje nisam bila sa njima.

**Takođe se zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u:**

1. Kreiranju koncepta teze: prof. dr Sanja Radojević Škodrić, prof. dr Tatjana Pekmezović;
2. Prikupljanju podataka: doc. dr Maja Životić, doc. dr Sanja Despotović, dr Sanja Ćirović;
3. Formalnoj analizi: prof. dr Duško Dunderović, doc. dr Maja Životić;
4. Istraživanju: doc. dr Maja Životić, doc. dr Sanja Despotović, dr Sanja Ćirović;
5. Metodologiji: doc.dr Maja Životić;
6. Superviziji: prof. dr Sanja Radojević Škodrić, prof. dr Tatjana Pekmezović;
7. Pisanju – originalni nacrt: doc. dr Maja Životić, doc. dr Sanja Despotović, dr Sanja Ćirović;
8. Pisanju- recenzija i uređivanje: prof. dr Sanja Radojević Škodrić, prof. dr Tatjana Pekmezović, prof. dr Duško Dunderović.

## Sažetak

**Uvod:** Karcinomi porekla bubrežnog parenhima (RCC) čine 2,4% svih malignih neoplazmi odraslih. Češće se javlja kod muškaraca između 60 i 70 godina starosti. Zahvaljujući ranom otkrivanju, petogodišnje preživljavanje je preko 93%, dok je kod pacijenata sa uznapredovalim karcinomom i metastazama petogodišnje preživljavanje svega 12% i sa terapijom. Patohistološka analiza predstavlja zlatni standard u dijagnostici tumora bubrega (RCT). Imunohistohemijska bojenja (IHH) kao dodatne analize koriste se za dijagnostiku RCT. Decenijama se istražuju i druge metode kao što su spektroskopske za dijagnostiku RCT. Poslednje dve decenije značajan napredak u mikroskopskom oslikavanju različitih vrsta ćelija i tkiva donela je upotreba femtosekundnih lasera koji su temelji nelinearne mikroskopije (NLM).

**Ciljevi:** Cilj studije je poređenje rezultata optičke, konfokalne (KM), NLM u različitim RCT sa akcentom na detekciji mitohondrija koje predstavljaju ključne organele kod pojedinih RCT-ova.

**Materijal i metoda:** Istraživanjem je obuhvaćeno 100 nefrektomisanih pacijenata u periodu 2019-2021. godine od kojih su četiri izuzeta zbog dijagnoze urotelnog karcinoma. Od 96 uzoraka, 43 su dijagnostikovana kao svetloćelijski RCC (ccRCC), 15 kao papilarni RCC (pRCC), 20 kao hromofobni RCC (chRCC) i 18 kao onkocitom (RO). Od IHH koristili smo Mitohondria i Prohibitin antitelo za detekciju mitohondrije. Iste uzorke smo analizirali i na KM, dok smo na NLM analizirali nebojene uzorke. Statistička analiza je izvršena korišćenjem statističkog paketa za društvene nauke, verzija 17 (SPSS).

**Rezultati:** Kliničke i patohistološke karakteristike 96 pacijenata su analizirane u tri različite grupe, na osnovu IHH bojenja antimitohondrijalnog antitela. Pacijenti su bili slične starosne dobi, bez statističke značajnosti ( $p=0.960$ ). Poređenjem lokalizacije tumora sa distribucijom IHH bojenja nismo dobili statističku značajnost ( $p=0.478$ ). Prosečne vrednosti dimenzija tumora se nisu statistički razlikovale ( $p=0.865$ ). Između RCT uočeni su statistički značajno različiti obrasci ekspresije. ccRCC je dijagnostikovao sa grubim oskudnim IHH bojenjem, sa izuzetkom dva slučaja sa višim nuklearnim gradusom sa difuznim granularnim obrascima bojenja umerenog intenziteta ( $p = 0,005$ ). Svi pRCC i RO su imali difuzno granularno citoplazmatsko bojenje, pri čemu je razlika u distribuciji bojenja, dok je umereno granularan obrazac uočen kod chRCC. Ove razlike među pokazale su statističku značajnost ( $p<0,001$ ). Poređenjem histopatološkog stadijuma bolesti i pola, uočeno je da se pT1 stadijum se češće dijagnostikovao kod muškaraca, bez statističke značajnosti ( $p=0.804$ ). Analizom slika dobijenih NLM, uočeni su jasni obrasci rasta tumora, i karakteristike signala u različitim RCT. Harmonikom druge generacije detektovali smo kolagensku mrežu, kako u bubrežnom parenhimu tako i u, i pored tumora.

**Zaključak:** Upotreba antimitohondrijalnog antitela je pokazala visoku specifičnost u određivanju podtipa RCT, sa jedinstvenim intenzitetom bojenja i distribucijom. IF analiza KM potvrđuje ovu specifičnost, omogućavajući jasnu vizualizaciju mitohondrija u RCT-ovima. NLM analiza pokazuje efikasnost za vizualizaciju uzoraka bez pripreme tkiva. Svaki analizirani podtip RCT-a ima specifične karakteristike koje se mogu prepoznati na osnovu signala, što olakšava preciznu dijagnozu.

**Ključne reči:** RCC, RCT, konfokalna mikroskopija, nelinearna skenirajuća mikroskopija

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Epidemiologija, Patologija

**UDK broj:** \_\_\_\_\_

## Abstract

**Introduction:** Renal cell carcinomas (RCC) account for 2.4% of all malignant neoplasms in adults. It occurs more frequently in men between the ages of 60 and 70. Due to early detection, the five-year survival rate is over 93%, while in patients with advanced carcinoma and metastases, the five-year survival rate is only 12% with therapy. Pathohistological analysis represents the gold standard in the diagnosis of renal cell tumors (RCT). Immunohistochemical staining (IHC) as additional analysis is used for the diagnosis of RCT. For decades, other methods have been researched, such as spectroscopy for the diagnosis of RCT. The last two decades have brought significant progress in microscopic imaging of different types of cells and tissues with the use of femtosecond lasers, which are the basis of nonlinear microscopy (NLM).

**Objectives:** The aim of the study is to compare the results of optical, confocal (CM), NLM in different RCTs with an emphasis on detecting mitochondria, which are key organelles in certain RCTs.

**Material and methods:** The study included 100 nephrectomized patients from 2019-2021, with four excluded due to a diagnosis of urothelial carcinoma. Of the 96 samples, 43 were diagnosed as clear cell RCC (ccRCC), 15 as papillary RCC (pRCC), 20 as chromophobe RCC (chRCC), and 18 as renal oncocytoma (RO). For IHC Mitochondria and Prohibitin antibodies are used for mitochondria detection. The same samples were analyzed on CM, while on NLM, unstained samples were used. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 17 (SPSS).

**Results:** Clinical and pathohistological characteristics of 96 patients were analyzed in three different groups, based on IHC staining of antimitochondrial antibody. Patients were similar in age, with no statistical significance ( $p=0.960$ ). Comparing tumor localization with the distribution of IHC staining did not yield statistical significance ( $p=0.478$ ). The average tumor dimension did not differ statistically ( $p=0.865$ ). Statistically significant different expression patterns were observed between RCTs. ccRCC was diagnosed with coarse sparse IHC staining, except for two cases with higher nuclear grade showing diffuse granular staining patterns of moderate intensity ( $p=0.005$ ). All pRCC and RO showed diffuse granular cytoplasmic staining, with differences in staining distribution, while moderate granular patterns were observed in chRCC. These differences were statistically significant ( $p<0.001$ ). Comparing the histopathological stage of the disease and gender, pT1 stage was more frequently diagnosed in males, without statistical significance ( $p=0.804$ ). NLM image analysis revealed distinct tumor growth patterns and signal characteristics in different RCTs. Second-generation harmonic detected the collagen network, both in renal parenchyma and in, and around the tumor.

**Conclusion:** The use of antimitochondrial antibodies showed high specificity in determining the subtype of RCT, with a unique staining intensity and distribution. CM analysis confirms this specificity, allowing clear visualization of mitochondria in RCTs. NLM analysis shows efficacy in visualizing tissue-prepared samples. Each analyzed subtype of RCT has specific characteristics that can be recognized based on signals, facilitating precise diagnosis.

**Keywords:** RCC, RCT, confocal microscopy, nonlinear scanning microscopy

**Scientific area:** Medicine

**Scientific sub-area:** Epidemiology, Pathology

**UDK number:** \_\_\_\_\_

# Sadržaj

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>EPIDEMIOLOGIJA</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>FAKTORI RIZIKA</b>	<b>1</b>
<b>1.3</b>	<b>TUMORI BUBREGA</b>	<b>2</b>
1.3.1	Svetloćelijski karcinom bubrega	3
1.3.2	Papilarni karcinom bubrega	5
1.3.3	Hromofobni karcinom bubrega	6
1.3.4	Renalni onkocitom	8
1.3.5	Imunohistohemijski profil	9
1.3.5.1	ccRCC	11
1.3.5.2	pRCC	11
1.3.5.3	chRCC	11
1.3.5.4	RO	13
1.3.6	Gradiranje i stadiranje karcinoma bubrega	14
1.3.7	Druge metode dijagnostike	16
1.3.7.1	Konfokalna mikroskopija	17
1.3.7.2	Multifotonska (nelinearna skenirajuća) mikroskopija	18
1.3.8	Elektronska mikroskopija	21
1.3.9	Terapijski pristupi u lečenju tumora bubrega	22
1.3.10	Preživljavanje	27
<b>2</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>UZORAK</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE</b>	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>NELINEARNA SKENIRAJUĆA MIKROSKOPIJA (MULTIFOTONSKA MIKROSKOPIJA)</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA</b>	<b>33</b>
<b>3.6</b>	<b>IMUNOHISTOHEMIJSKA EVALUACIJA</b>	<b>33</b>
<b>3.7</b>	<b>STATISTIČKA ANALIZA</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>OBRAZAC EKSPRESIJE I DISTRIBUCIJA ANTI-MITOHONDRIJALNIH ANTITELA U TUMORIMA BUBREŽNIH ĆELIJA U POREĐENJU SA DEMOGRAFSKIM PODACIMA PACIJENATA, TIPOM I STADIJUMOM TUMORA</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>EKSPRESIJA MITOHONDRIA ANTITELO AB-2, KLON MTC02</b>	<b>39</b>
4.2.1	Vizuelizacija mitohondrija u uzorcima zdravog bubrega	39
4.2.2	Ekspresija mitohondrijalnog bojenja u ccRCC	40
4.2.3	Ekspresija mitohondrijalnog antitela u pRCC	42
4.2.4	Ekspresija mitohondrijalnog antitela kod chRCC	43
4.2.5	Ekspresija mitohondrijalnog antitela u RO	45
<b>4.3</b>	<b>EKSPRESIJA PROHIBITIN ANTITELA</b>	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>NELINEARNA SKENIRAJUĆA MIKROSKOPIJA</b>	<b>47</b>
4.4.1	TPEF vizuelizacija zdravog bubrežnog parenhima	47



4.4.2	TPEF vizuelizacija ccRCC.....	47
4.4.3	TPEF vizuelizacija pRCC.....	48
4.4.4	TPEF vizuelizacija chRCC .....	49
4.4.5	TPEF vizuelizacija RO .....	50
4.4.6	SHG za vizuelizaciju kolagena u tumorima bubrega i kapsuli .....	52
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>63</b>

# 1 UVOD

## 1.1 EPIDEMIOLOGIJA

Karcinomi porekla bubrežnog parenhima (engl. *Renal cell carcinoma-RCC*) čine 2,4% svih malignih neoplazmi odraslih. Prema podacima GLOBOCAN-a 2020. godine je dijagnostikovano preko 400.000 novih slučajeva, dok je registrovano preko 180.000 smtnih slučajeva na svetskom nivou (1,2). Karcinom bubrega se češće javlja kod muškaraca (odnos muškarci: žene je 1,5:1) i predstavlja sedmi po redu najčešći karcinom, dok kod žena predstavlja deseti najčešći karcinom po učestalosti (3). Takođe, stopa smrtnosti je veća kod muškaraca nego kod žena. RCC se najčešće javlja u dobu između 60 i 70 godina starosti, mada su registrovani i slučajevi RCC i pre 60. godine života. Iako su opisani slučajevi RCC i posle 70-te godine života, njegova incidencija ipak opada. Razlog opadanju incidencije RCC nakon 70-te godine može da bude zbog ređe upotrebe agresivnih dijagnostičkih procedura u ovoj starosnoj grupi (4).

Većina epidemioloških podataka se odnosi na maligne neoplazme bubrega uopšteno, dok histološki gledano, karcinomi bubrega (RCC) čine većinu (90%) slučajeva. Svetloćelijski karcinom bubrega (ccRCC) je najzastupljeniji tip karcinoma (70%), zatim papilarni tip (pRCC) koji čini 10-15% karcinoma bubrega i hromofobni tip (chRCC) kao treći najzastupljeniji tip koji čini 5% (5). Preostali podtipovi su retki, svaki sa ukupnom incidencijom do 1%.

Zahvaljujući ranom otkrivanju, petogodišnje preživljavanje je preko 93% (6,7), dok je kod pacijenata sa uznapredovalim karcinomom i metastazama petogodišnje preživljavanje svega 12%, čak i sa terapijom (8). Uprkos povećanju ukupne incidencije u protekle tri decenije, posebno u razvijenim zemljama, zbog rane dijagnoze i terapije, stopa smrtnosti od RCC-a se smanjuje (9). Međutim, iako postoji značajan napredak u kontroli bolesti i preživljavanju, lokalno uznapredovala bolest i udaljene metastaze se i dalje javljaju kod mnogih pacijenata (10). Približno 20-30% pacijenata ima metastaze u ranom stadijumu dijagnoze, 30-50% pacijenata razvije metastaze uz lokalnu bolest, a skoro 40% pacijenata sa lokalizovanim RCC-om ima udaljene metastaze čak i nakon hirurškog zahvata (11). Uobičajeni simptomi RCC-a uključuju hematuriju, bol u boku i opipljivu abdominalnu masu koji se javljaju samo kod 4-17% slučajeva (11). Najčešće lokalizacije udaljenih metastaza su pluća, kosti i mozak, ali mogu biti zahvaćene i nadbubrežna žlezda, suprotni bubreg i jetra (12).

## 1.2 FAKTORI RIZIKA

Najjači faktori rizika za nastanak RCC su starost i pol (4). Ostali potencijalni faktori rizika uključuju teritorijalnu i etničku pripadnost (13), istoriju pušenja (14,15), hipertenziju (16) i gojaznost (17). Međutim, nedavna istraživanja su sugerisala da prekomerna telesna težina kod pacijenata sa RCC-om ima povoljniju prognozu, što je suprotno ulozi gojaznosti kao faktora rizika za RCC i zahteva dalja istraživanja (18). Neki manji faktori rizika koji mogu biti povezani sa RCC-om uključuju hroničnu bolest bubrega (HBI), stečenu cističnu bolest bubrega, bubrežnu bolest u terminalnom stadijumu, hroničnu upotrebu pallijativa,

izloženost kadmijumu i trihloroetilenu, konzumiranje crvenog i prerađenog mesa, virusni hepatitis, nivo vitamina D, dijabetes tipa 2, povećane triglicerida, smanjenu fizičku aktivnost i genetske sindrome (19).

### 1.3 TUMORI BUBREGA

RCC je heterogeni karcinom koji može poticati iz različitih struktura nefrona. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) klasifikuje RCC u različite podvrste na osnovu morfoloških, molekularnih i genetskih karakteristika (20). Na osnovu morfoloških karakteristika, najčešće podvrste RCC-a su svetloćelijski karcinom, papilarni karcinom (niskog i visokog gradusa) i hromofobni karcinom, koji čine 70-90%, 10-15% odnosno 3-5% maligniteta bubrega, respektivno. Svetloćelijski i papilarni karcinom bubrega vode poreklo od epitela proksimalnih tubula, dok hromofobni karcinom nastaje od epitela distalnih tubula i sabirnih kanalića, posebno interkalatnih ćelija (5). Većina karcinoma bubrega je sporadična (95%), dok je samo 5% povezano sa naslednim sindromima kao što su von Hipel-Lindauova bolest i tuberozna skleroza (21,22). Ovaj tip karcinoma ima visoku stopu rasta i sklon je metastaziranju u jetru, pluća, kosti, a posebno u limfne čvorove (do 15%). U tabeli 1 je prikazana nova klasifikacija tumora bubrega (engl. *Renal cell tumors - RCT*) prema SZO iz 2022. godine.

**Tabela 1:** Klasifikacija RCT prema svetskoj zdravstvenoj klasifikaciji iz 2022. godine

<b>Tumori bubrega sa svetlim ćelijama (Clear cell tumors)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Svetloćelijski karcinom bubrežnog parenhima (Clear cell renal cell carcinoma)</li> <li>• Multilokularna cistična neoplazma bubrega niskog malignog potencijala (Multilocular cystic renal cell neoplasm of low malignant potential)</li> </ul>
<b>Papilarni tumori bubrega</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Papilarni adenom (Papillary adenoma)</li> <li>• Papilarni karcinom (Papillary renal cell carcinoma)</li> </ul>
<b>Onkocitni i hromofobni tumori bubrega</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onkocitom (Oncocytoma)</li> <li>• Hromofobni karcinom (Chromophobe renal cell carcinoma)</li> <li>• Drugi onkocitni tumori (izuzev onkocitoma i hromofobnog karcinoma) (Other oncocytic tumours of the kidney)</li> </ul>
<b>Tumori porekla sabirnih kanalića</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Karcinom porekla sabirnih kanalića (Collecting duct carcinoma)</li> </ul>
<b>Drugi tumori bubrega</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Svetloćelijski papilarni tumor bubrega (Clear cell papillary renal cell tumour)</li> </ul>

- Mucinozni, tubularni i vretenastoćelijski karcinom bubrega (Mucinous tubular and spindle cell carcinoma)
- Tubulocistični karcinom bubrega (Tubulocystic renal cell carcinoma)
- Karcinom bubrega udružen sa stečenom cističnom bolesti bubrega (Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma)
- Eozinofilni solidni i cistični karcinom bubrega (Eosinophilic solid and cystic renal cell carcinoma)
- Karcinom bubrega, neklasifikovan (Renal cell carcinoma, NOS)

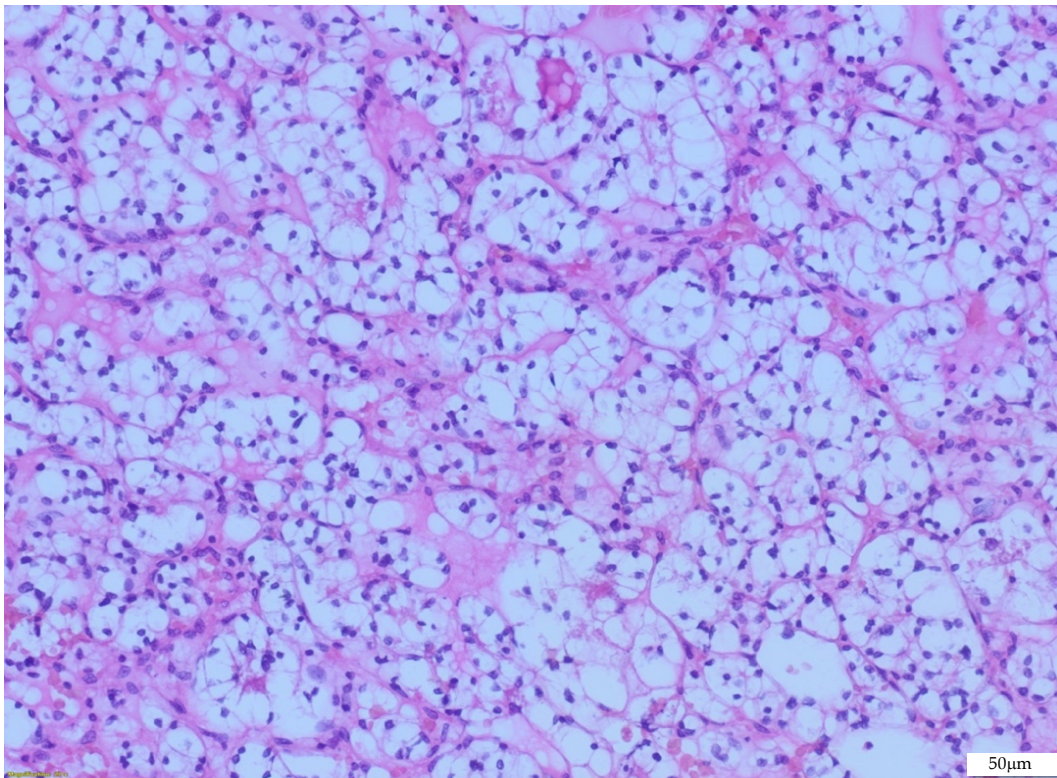
#### Molekulano klasifikovani tumori bubrega (molecularly defined renal carcinomas)

- Karcinom bubrega sa rearanžmanom TFE3 gena (TFE3-rearranged renal cell carcinomas)
- Karcinom bubrega sa alteracijom TFEB gena (TFEB-altered renal cell carcinomas)
- Eloc mutirani karcinom bubrega (ELOC (formerly TCEB1)-mutated renal cell carcinoma)
- Karcinom bubrega sa deficijencijom fumarat-dehidrogenaze (Fumarate hydratase-deficient renal cell carcinoma)
- Sindrom nasledne leiomiomatoze udružena sa karcinomom bubrega (Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome-associated renal cell carcinoma)
- Karcinom bubrega sa deficijencijom sukcinat-dehidrogenaze (Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma)
- Karcinom bubrega sa alk rearanžmanom (Alk-rearranged renal cell carcinomas)
- Medularni karcinom, neklasifikovan (Medullary carcinoma, nos)
  - SMARCB1 deficijentni medularni karcinom (SMARCB1-deficient medullary renal cell carcinoma)

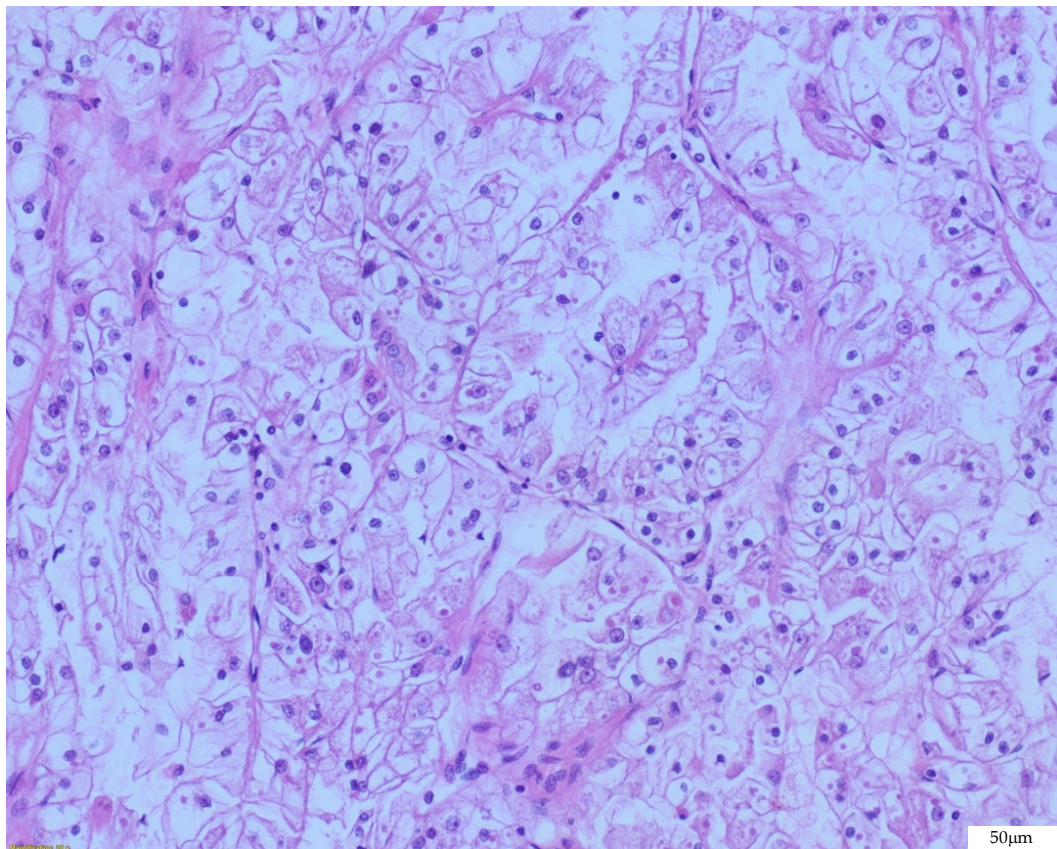
### 1.3.1 Svetloćelijski karcinom bubrega

Svetloćelijski karcinom bubrega (engl. *Clear cell renal cell carcinoma - ccRCC*) je dobio ime po citoplazmi koja je svetla jer je bogata lipidima deponovanim u intracitoplazmatske lipidne kapljice i glikogenom, a siromašna drugim organelama kao što su mitohondrije, koje mogu da budu čak i odsutne (23,24). Ove dinamične organele su odgovorne za unos i skladištenje lipida, homeostaznu podršku, proizvodnju energije i biogenezu membrane tokom brzog rasta i transformacije tumorskih ćelija (25–27).

Ćelije ccRCC-a najčešće grade alveolarne i acinarne strukture (slika 1), ali mogu da se vide i tubularne i cistične strukture. Često su prisutna sveža polja krvarenja i nekroza. Prisustvo nekroze u karcinomu govori u prilog agresivnijeg biološkog ponašanja karcinoma.



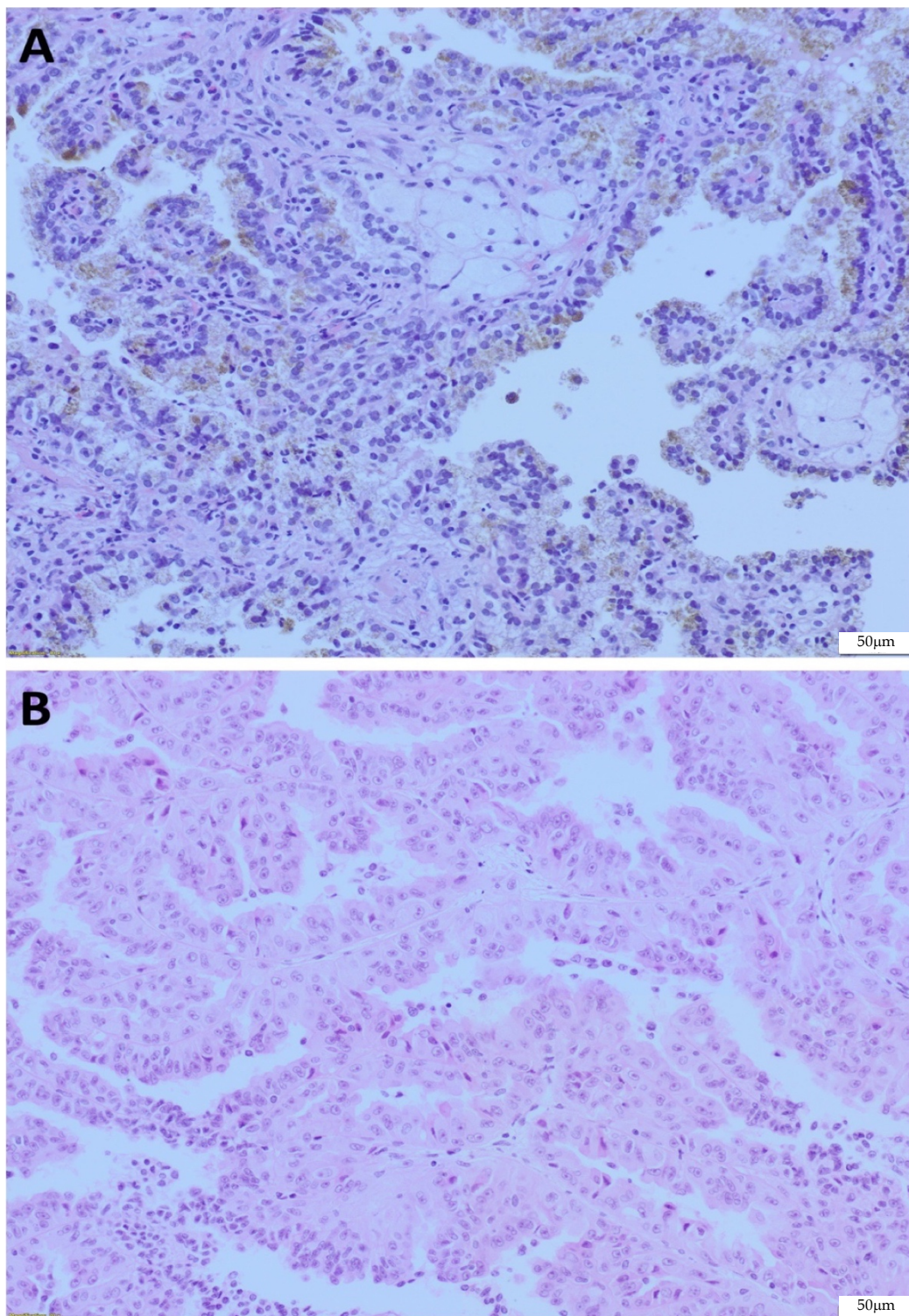
**Slika 1:** Mikrofotografija svetloćelijskog karcinoma bubrenih ćelija, hematoksilin&eozin (H&E) bojenje, nuklearni gradus II po WHO/ISUP-u, uveličanje 20x.



**Slika 2:** Mikrofotografija ccRCC sa eozinofilnom citoplazmom i papilarnim obrascem rasta, nuklearnog gradusa III po WHO/ISUP-u, H&E bojenje, uveličanje 20x.

Citoplazma u ccRCC-u može da bude i eozinofilna što govori u prilog povećanog broja mitohondrija koje su nabubrele i pleomorfne sa atenuacijom kristi koje se vide isključivo elektronskom mikroskopijom (28). ccRCC sa ćelijama sa eozinofilnom citoplazmom imaju lošiju prognozu u odnosu na klasični tip ccRCC (29), slika 2.

### 1.3.2 Papilarni karcinom bubrega



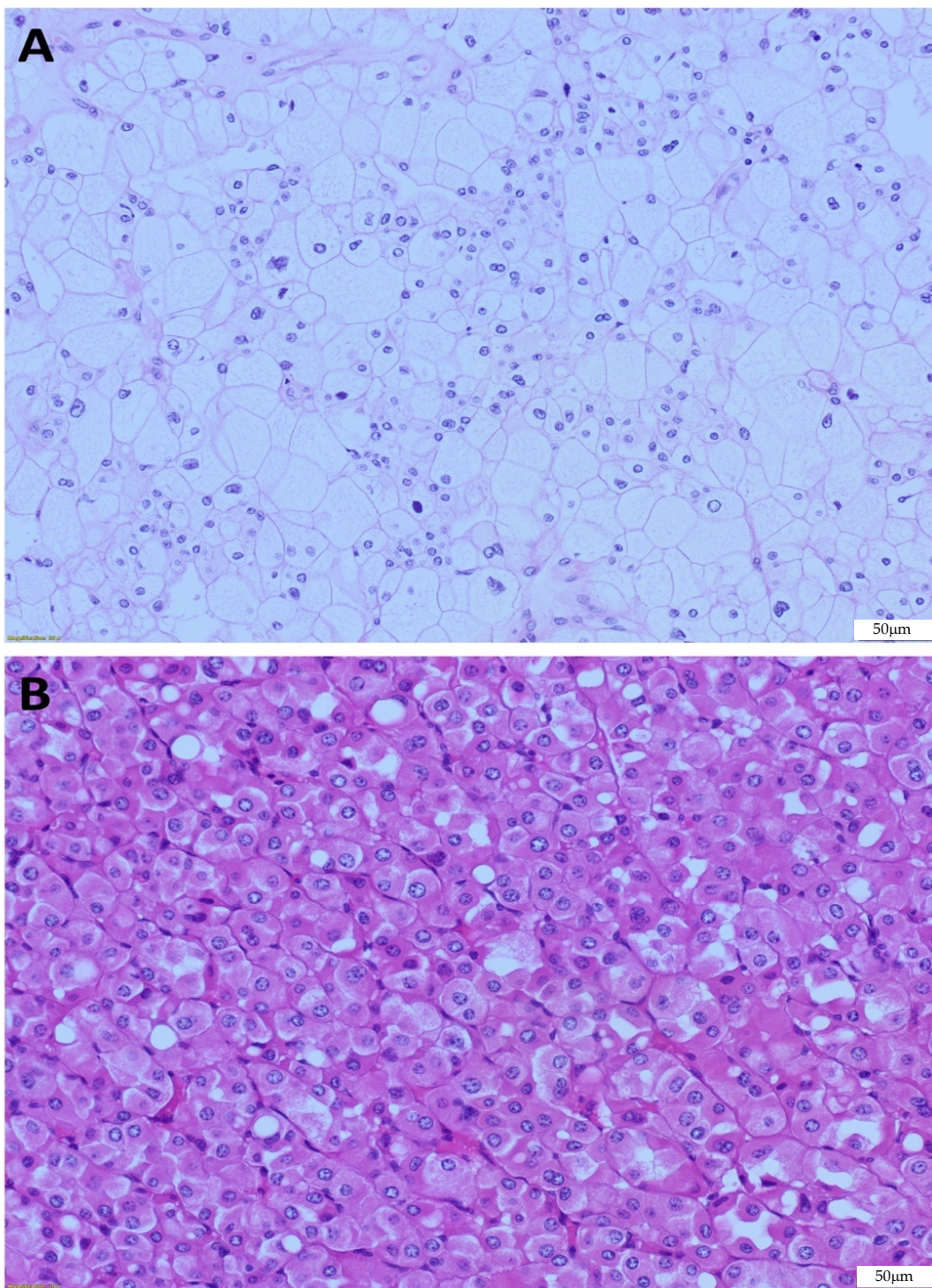
**Slika 3:** Mikrofotografije (A) pRCC niskog gradusa, H&E bojenje, uveličanje 20x, i (B) pRCC visokog gradusa, H&E bojenje, uveličanje 20x.

Papilarni RCC (engl. *Papillary renal cell carcinoma - pRCC*) je biološki manje agresivan karcinom koji se, po staroj klasifikaciji SZO klasifikovao kao tip I i tip II (30), tj na pRCC niskog gradusa (koji predstavlja klasičan tip pRCC-a) i pRCC visokog gradusa po novoj klasifikaciji SZO (22), slika 3. pRCC klasičan tip (ranije kategorisan kao pRCC tip I) se odlikuje prisustvom tubularnih ili papilarnih formacija, čiju osnovu čini fibro-vaskularna potka obložena kockastim ćelijama, bazofilne citoplazme, lakog jedarnog pleomorfizma (nuklearnog gradusa I po WHO/ISUP-u). pRCC visokog gradusa (ranije kategorisan kao pRCC tip II) karakteriše prisustvo papilarnih formacija sa fibro-vaskularnom potkom, koja je obložena cilindričnim, delom stratifikovanim voluminoznijim ćelijama, eozinofilne citoplazme, umerenog do izraženog jedarnog pleomorfizma (nuklearnog gradusa II-IV po WHO/ISUP-u).

PRCC koji su ranije bili kategorisani kao pRCC "tip II" imaju značajnu morfološku varijabilnost i spektar kliničkog ponašanja. Važno je da se istakne da mnogi tumori sa izraženom papilarnom strukturom, prethodno smatrani kao PRCC "tip II", su sada prepoznati kao posebni i odvojeni entiteti, kao što su sporadični RCC sa nedostatkom fumarat dehidrogenaze (engl. *Fumarate hydratase-deficient renal cell carcinoma -FH - RCC*), translokacijski RCC koji pripadaju MiTF familiji karcinoma (engl. *TFE3/TFEB-rearranged renal cell carcinomas*), RCC sa rearanžmanom ALK gena (engl. *ALK-rearranged RCC*), RCC povezan sa stečenom cističnom bolešću (engl. *Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma - ACD-RCC*) i eozinofilni solidni i cistični RCC (31). Morfološki spektar pRCC takođe je proširen da bi obuhvatio nekoliko različitih oblika PRCC koji su nedavno opisani, kao što su *dvofazni (alveolarni/squamoidni) pRCC* koji često može imati solidan rast, zatim *papilarni renalni tumor sa obrnutom polaritetom*, prethodno opisan kao "onkocitni pRCC niskog stepena", i *Warthinu sličan pRCC* koji imitira Warthin-ov tumor pljuvačnih žlezda. Neki od ovih oblika su povezani sa specifičnim imunohistohemijskim karakteristikama i molekularnim promenama. Na primer, papilarni renalni tumor sa obrnutom polaritetom konstantno je pozitivan na GATA3 i negativan na vimentin, i ima ponavljajuće KRAS mutacije, čak i u veoma malim tumorima (32,33). Imunohistohemijski profil u pRCC je klasičan i čini ga pozitivnost na citokeratin 7 (engl. *Cytokeratin 7 - CK7*), alfa-metilacil-CoA racemazu (engl. *alpha-methylacyl-CoA racemas - AMACR*), vimentin i CD10. Bojenje na karbon anhidrazu IX (engl. *carbonic anhydrase IX - CAIX*) je negativno. Svako odstupanje od imunoprofila bi trebalo da ukaže na neki drugi podtip karcinoma bubrega sa papilarnom arhitekturom koji, u najvećem slučaju zahteva dodatna molekularna i genetska ispitivanja.

### 1.3.3 Hromofobni karcinom bubrega

Hromofobni RCC (engl. *Chromophobe renal cell carcinoma - chRCC*) se najčešće javlja u šestoj deceniji života. Ovaj tip RCC-a je biološki manje agresivan od ccRCC-a i ima najbolju prognozu od svih karcinoma bubrega (4,34). Opisane su dve varijante chRCC-a: klasičan tip i eozinofilna varijanta. Klasičan tip chRCC-a se sastoji iz voluminoznih, svetlih ćelija i u manjoj meri ćelija srednje veličine sa eozinofilnom citoplazmom. Eozinofilna varijanta chRCC-a se sastoji iz relativno uniformnih ćelija, srednje veličine sa eozinofilnom, granuliranom citoplazmom i karakterističnim perinuklearnim haloom, slika 4.

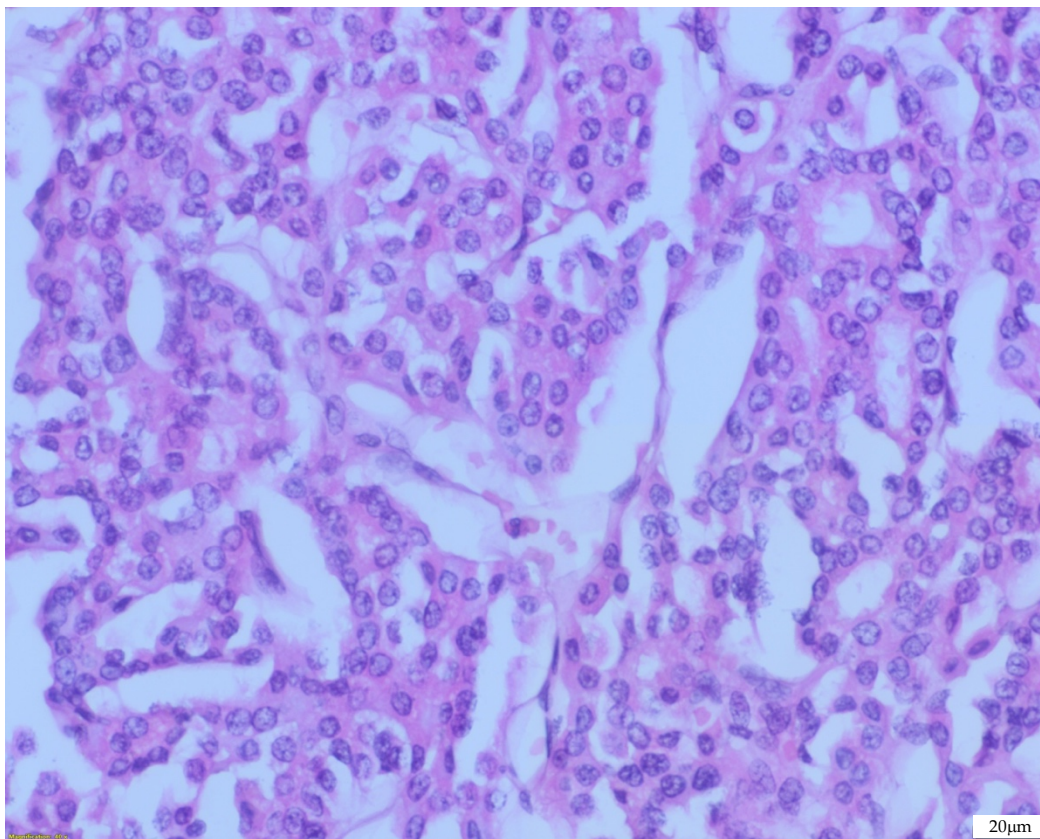


**Slika 4:** Mikrofotografije (A) - klasične varijante chRCC koga čine dominantno velike, voluminozne ćelije svetle citoplazme, naglašenih ćelijskih membrana i ćelije srednje veličine, eozinofilne citoplazme, (B) - eozinofilne varijante chRCC koga čine ćelije eozinofilne citoplazme, izrazito eozinofilne, granulirane citoplazme, naglašenih ćelijskih membrana. Oko jedra se uočava perinuklearni halo.

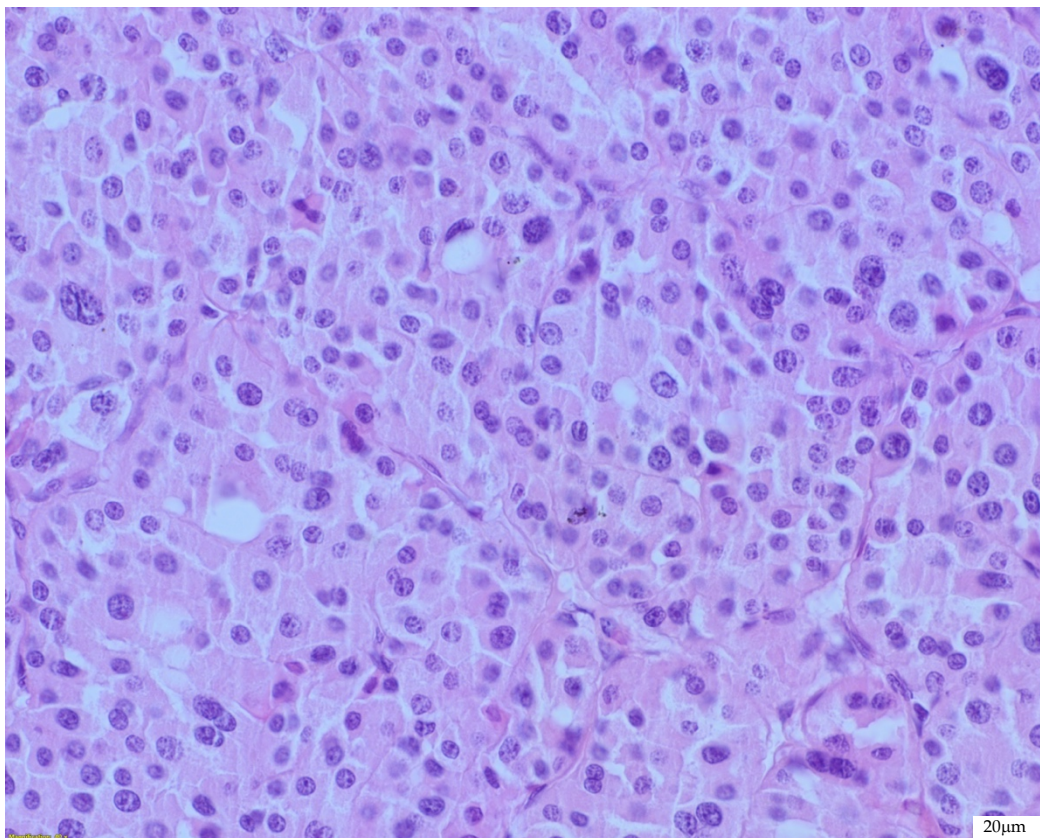
Ćelijska membrana je kod oba tipa istaknuta i naglašena. Morfološke osobine koje olakšavaju prepoznavanje većinu chRCC-ova uključuju hiperhromatska i nepravilno naborana jedra, perinuklearno rasvetljenje (haloi) i binuklearnost. Elektronskom mikroskopijom se dokazalo prisustvo većeg broja mitohondrija, ali i intracitoplazmatskih vezikula koje su periferno lokalizovane i zbog toga se stiče utisak postojanja perinuklearnog haloa na optičkoj mikroskopiji (28,35).



### 1.3.4 Renalni onkocitom



Slika 5: Mikrofotografija renalnog onkocitoma sa trabekularnim aranžmanom, H&E bojenje, uveličanje 20x.



Slika 6: Mikrofotografija renalnog onkocitoma, H&E bojenje, uveličanje 20x.

Renalni onkocitom (engl. *Renal oncocytoma* – RO) je najčešći benigni tumor i čini 6-9% svih tumora bubrega (30,36). Razvija se iz interkalatnih epitelnih ćelija distalnih tubula i sabirnih kanalića (37). Češće se javlja kod muškaraca (m:ž=2:1). Etiologija je nepoznata (34). Retke nasledne forme RO su vezane za Birt-Hogg-Dube sindrom (38). RO se sastoji iz okruglih do poligonalnih ćelija sa gustom eozinofilnom citoplazmom koja sitno granulirana. Jedra su okrugla, uniformna, sa disperznim hromatinom i neupadljivim jedarcetom. RO su bogati mitohondrijama, zbog kojih se na optičkoj mikroskopiji vide sitne eozinofilne granule (39), slika 5. Ćelije mogu biti i diskohezivne sa multinuklearnim jedrima i pleomorfizmom (34,40), slika 6. Bez obzira na benigne karakteristike, zabeleženi su slučajevi vaskularne invazije (41).

Ostali tipovi tumora su veoma retki i nisu predmet ove disertacije.

### 1.3.5 Imunohistohemijski profil

Imunohistohemijska bojenja koriste se za identifikaciju specifičnih proteina ili molekula u tkivu tumora bubrega. Evo pregleda nekih uobičajenih imunohistohemijskih bojenja koja se koriste u dijagnostici tumora bubrega, zajedno sa njihovom ulogom i ciljnim strukturama:

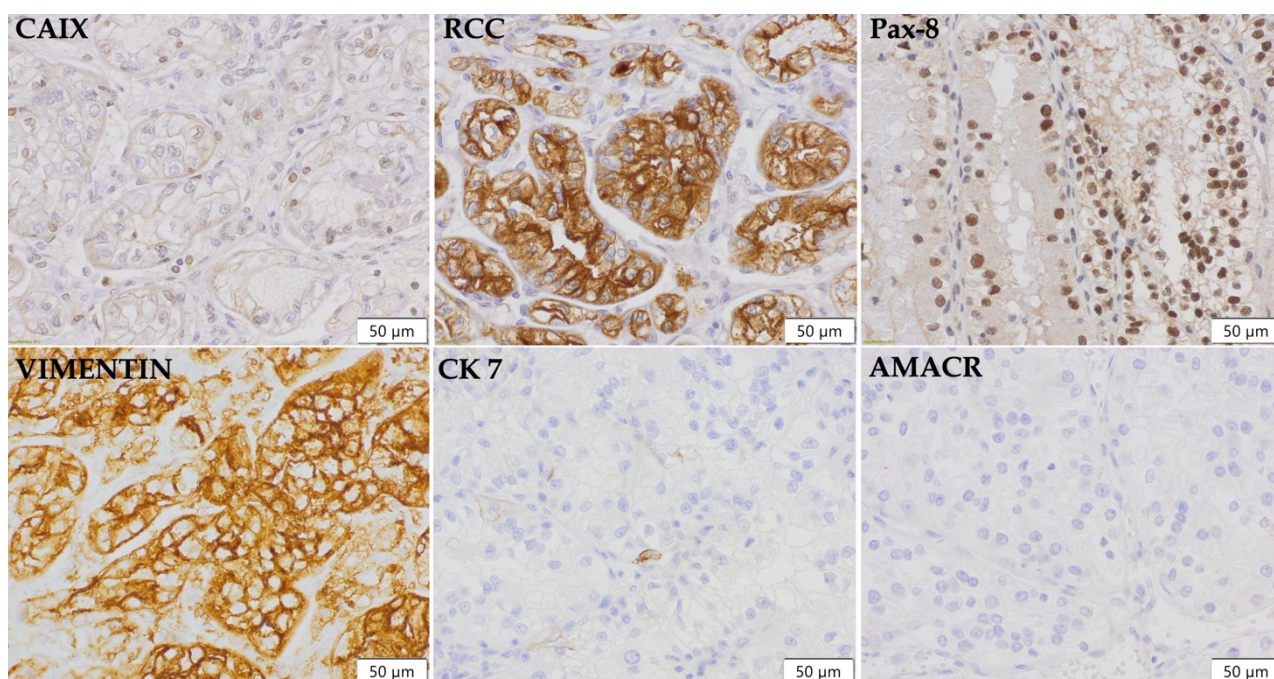
- Paired box gene 8 (Pax-8) je protein koji pripada porodici transkripcionih faktora. U imunohistohemijskom bojenju, Pax-8 se koristi za identifikaciju prisustva i lokalizaciju PAX-8 proteina u tkivu tumora bubrega. Uloga Pax-8 bojenja je prepoznavanje diferencijacije i identifikacija ćelija bubrega. Uglavnom se eksprimira u epitelu tubula kako u embrionalnim tako i u odraslim. Pax-8 bojenje je posebno korisno u dijagnostici različitih podtipova tumora bubrega, kao što su ccRCC, pRCC i chRCC. Ovi podtipovi tumora često pokazuju specifičnu ekspresiju PAX-8 proteina, što olakšava njihovu identifikaciju i klasifikaciju (42).
- Paired box gene 2 (Pax-2) je protein koji pripada porodici transkripcionih faktora kao i Pax-8. Uloga Pax-2 bojenja je prepoznavanje diferencijacije i identifikacija ćelija bubrega. Pax-2 se ekspresira u embrionalnom razvoju bubrega i održava se u zrelih tubulima, a posebno je prisutan u distalnim tubulima bubrega (43).
- CD10 je membranski enzimski protein koji se često koristi kao marker u imunohistohemijskom bojenju za identifikaciju prisustva CD10 proteina u tkivu tumora bubrega. Bojenje na CD10 se često koristi za identifikaciju i diferencijaciju PRCC od drugih histoloških tipova tumora. PRCC obično pokazuje pozitivnu reakciju na CD10, dok drugi tipovi tumora bubrega, poput ccRCC ili ChRCC, obično nemaju izraženu ekspresiju CD10 proteina. Osim toga, CD10 bojenje može da bude korisno u razlikovanju metastatskih tumora bubrega od primarnih tumora bubrega. Na primer, metastatski tumori bubrega koji potiču iz drugih mesta, poput gastrointestinalnog trakta ili pluća, često pokazuju negativnu reakciju na CD10, dok primarni tumori bubrega mogu biti pozitivni (44,45).

- Pancitokeratin (engl. *Cytokeratin AE1/AE3* - CKAE1/AE3) Citokeratini su porodica intermedijarnih filamenata koji se eksprimiraju u epitelnim ćelijama (46,47). Citokeratini variraju po svojoj veličini molekularnom težinom koja se kreće od otprilike 40 kDa do 68 kDa. Epitelne ćelije eksprimiraju više podtipova citokeratina koji mogu da se koriste za klasifikaciju vrste ili diferencijacije epitelnih ćelija kao i za procenu napredovanja tumora ili dijagnozu (47). CKAE1/AE3 je koktel antitela koga čine citokeratini 1-8, 10, 14-16 i 19 (48).
- CK 7 je osnovni citokeratin niske molekularne težine tipa II koji se eksprimira u jednorednom epitelu u različitim organima, uključujući i sve epitele u ženskom genitalnom traktu. Ovaj karakteristični obrazac bojenja tumora može se koristiti, obično u kombinaciji sa bojenjem sa drugim citokeratinima kao što je citokeratin 20 (engl. *Cytokeratin 20* - CK20), da bi se razlikovali adenokarcinomi. Često se koristi kao marker u imunohistohemijskom bojenju za identifikaciju RCC-a, pogotovo sa papilarnim obrascem rasta. Negativna reakcija na CK7 obično ukazuje na prisustvo drugih histoloških tipova tumora bubrega, ccRCC ili onkocitoma, pri čemu, ako je u ccRCC prisutan papilarni obrazac rasta sa eozinofilnom citoplazmom u tim regionima će CK7 da pokaže imunopozitivnost (49).
- Vimentin je fibroblastni intermedijarni filament koji pripada familiji međufilamenata koji se nalazi u fibroblastima, endotelnim ćelijama, makrofagima, melanocitima, Švanovim ćelijama i limfocitima (50). Vimentin se sastoji od jedne podjedinice i ima molekulsku težinu od približno 57 kD. In vivo, vimentin obično nije prisutan u normalnim epitelnim ćelijama; međutim, kultivisan je *in vitro* u epitelnim ćelijama i takođe može pokazati ekspresiju u tumorskim ćelijama epitelnog porekla, obično u parafinskom tkivu nakon uzimanja antigena. Mezenhimalne i endotelne ćelije obično boje vimentin pozitivno i na taj način čine unutrašnju pozitivnu kontrolu u analiziranom tkivu. Odsustvo imunološkog bojenja u ovim oblastima često ukazuje da postoji značajno oštećenje tkivnih antigena i gubitak strukturalne arhitekture ili tehnički neadekvatnog bojenja. U tumorima bubrega, zbog epitelno-mezenhimalne transformacije, vimentin u većini RCC-a pokazuje imunopozitivnost.
- CD117 (c-kit) je transmembranski receptor faktora rasta tirozin kinaze koji je proizvod ekspresije c-kit gena. Prisutan je u različitim tipovima ćelija, uključujući u epitelu dojke, germinativnim ćelijama, melanocitima, nezrelim mijeloidnim ćelijama i mastocitima. CD117 se membranski eksprimira u različitim tipovima tumora. Iako je ključno antitelo u gastrointestinalnim stromalnim tumorima, kod tumora bubrega se pokazalo kao korisno antitelo u dijagnostici chRCC i RO (51).
- Alfa-metil acil-CoA racemaza (AMACR) katalizuje racemizaciju koenzima A tioestra a-metil razgranate karboksilne kiseline (52) i pretvara (S)-izomer (2R)-metil razgranatog lanca masnog acil-CoA. Takođe indukuje ove stereoizomere da napreduju kroz put b-oksidacije. AMACR konvertuje (2R)-metil razgranati lanac masnog acil-CoA u (S)-stereoizomere da bi katalizovao ove stereoizomere da nastave kroz put b-oksidacije. Ekspresija AMACR je važna za oksidativni metabolizam i biosintezu ovih masnih kiselina razgranatog lanca i žučnih kiselina, a ekspresija AMACR se primećuje u peroksizomima i mitohondrijama. b-oksidacija ovih masnih kiselina razgranatog lanca zahteva enzim AMACR koji

se nalazi u mitohondrijima i peroksizomima. AMACR promotor može da izazove ekspresiju reporterskog gena specifičnu za tumore, uključujući i karcinome bubrega (53).

### 1.3.5.1 ccRCC

Tumorske ćelije pokazuju imunopozitivnost na Pax-8, Pax-2, CAIX, RCC, CKAE1/AE3, CD10 i vimentin, dok su negativne na CK7, AMACR, CD117. Pax8 i Pax 2 će pokazati jedarnu imunopozitivnost, CAIX i RCC membransku, a CD10, vimentin i citokeratin citoplazmatsku. Treba napomenuti da u zavisnosti od nuklearnog gradusa tumora, diferencijacije, ali i citoplazme ova imunopozitivnost može da varira. Kod ccRCC sa papilarnim rastom i eozinofilnom citoplazmom može da se javi imunopozitivnost na CK7 i AMACR u tim regionima. Ili kod ccRCC sa sarkomatoidnom diferencijacijom može da se izgubi imunopozitivnost na epitelne markere u regijama diferencijacije. CD117 antitelo je tipično negativno, slika 7.



**Slika 7:** Imunohistohemijski profil ccRCC-a. CAIX pokazuje membransku imunopozitivnost, RCC citoplazmatsku, Pax-8 nuklearnu, Vimentin citoplazmatsku imunopozitivnost, dok su bojenja na CK 7 i AMACR negativna.

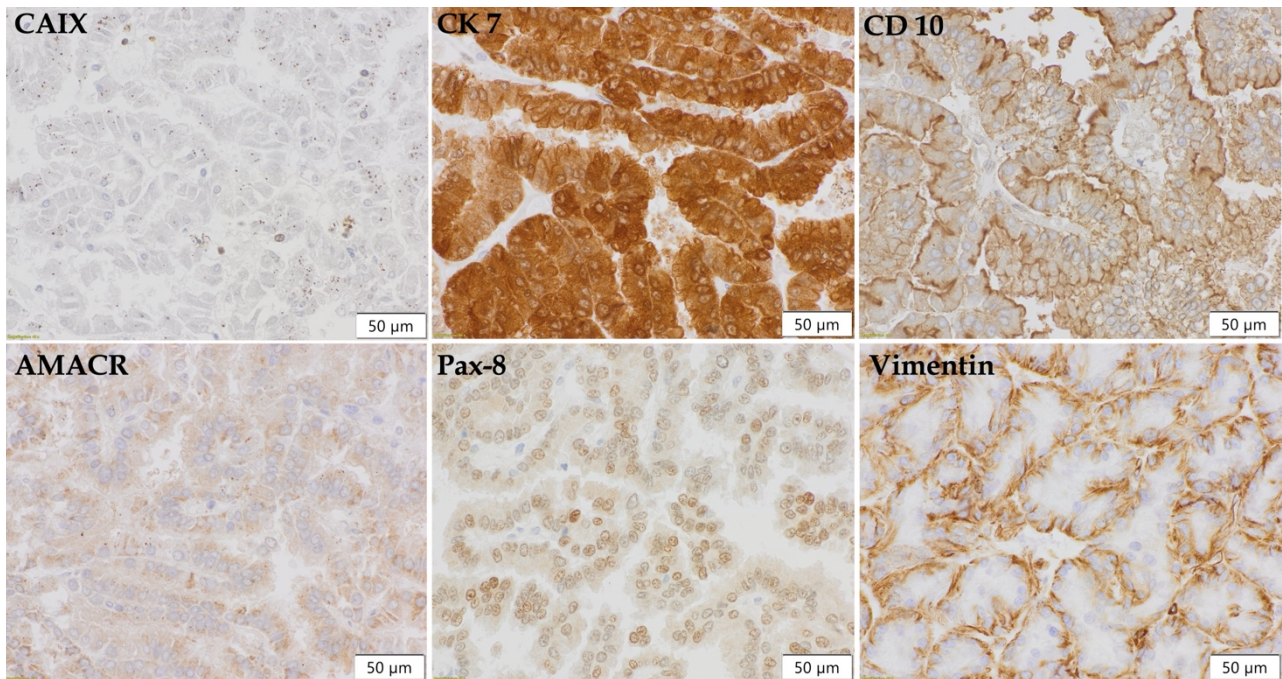
### 1.3.5.2 pRCC

Papilarni karcinom bubrega pokazuje difuznu pozitivnost na Pax-8, AMACR i CK 7, mada se intenzitet CK 7 smanjuje ili je odsutna kod eozinofilnih tumora (54). Vimentin i CD 10 takođe pokazuju imunopozitivnost koja može da varira. CAIX pokazuje imunonegativnost, slika 8.

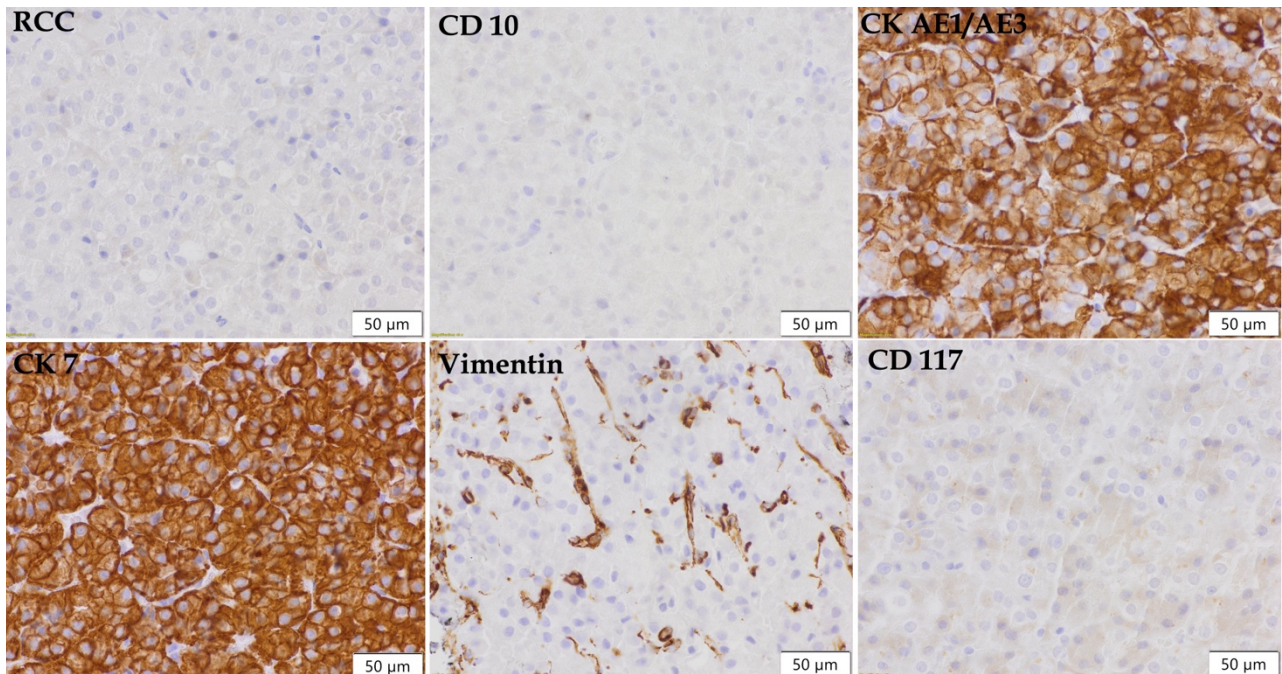
### 1.3.5.3 chRCC

Hromofobni karcinom bubrega pokazuje imunopozitivnost na CK7 i CD117, dok je negativna na vimentin, RCC, CAIX i CD10. pored imunohistohemijske analize, radi se

histohemijsko bojenje na Haleovo koloidno gvožđe (HKFe) koji se detektuje gvožđe u citoplazmi u vidu granula, slika 9.



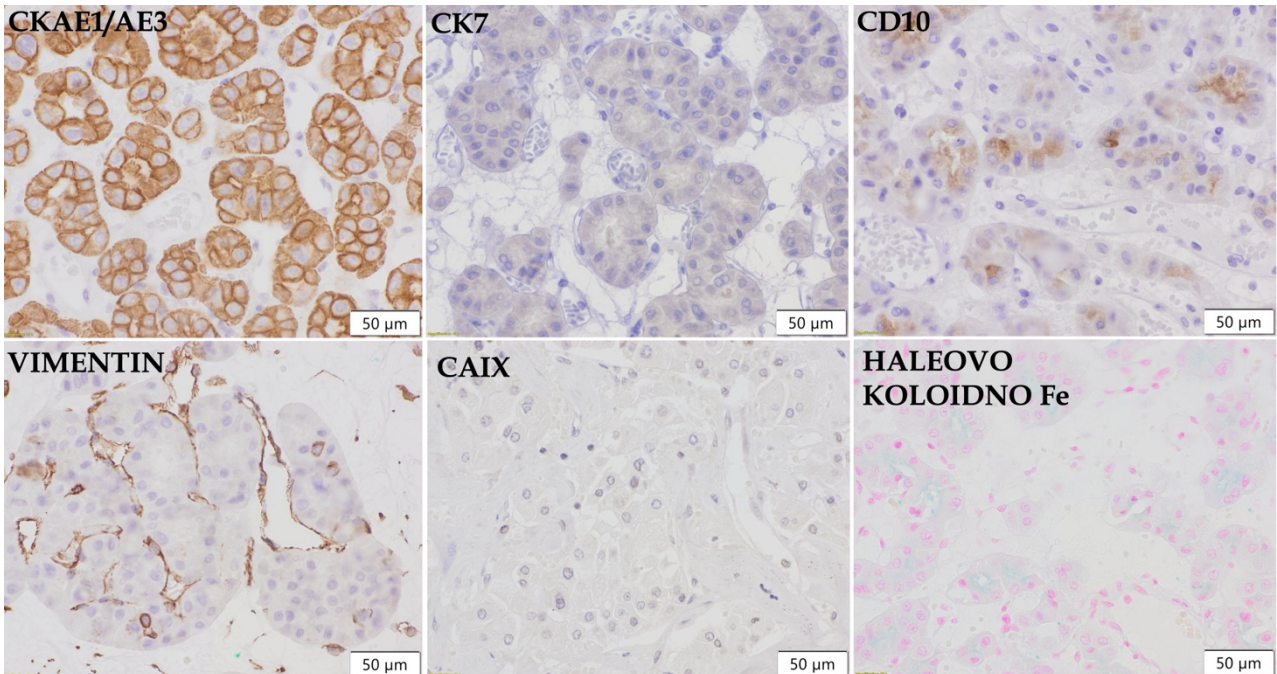
**Slika 8:** Imunohistehemijski profil pRCC-a. CAIX pokazuje negativnu imunopozitivnost, mada može da bude i pozitivno. CK 7 pokazuje difuznu citoplazmatsku imunopozitivnost. CD 10 pokazuje citoplazmatsku imunopozitivnost akcentuiranu ka membrani. AMACR pokazuje citoplazmatsku imunopozitivnost, kod Pax-8 pokazuje nuklearnu imunopozitivnost. Vimentin pokazuje citoplazmatsku imunopozitivnost slične distribucije kao CD10.



**Slika 9:** Imunohistehemijski profil chRCC-a. Bojenje na RCC, CD10 i vimentin je negativno, dok su bojenja na CKAE1/ AE3 i CK7 difuzno, citoplazmatski pozitivna. CD 117 pokazuje slabu membransku imunopozitivnost, koje može da bude i negativno.

#### 1.3.5.4 RO

Renalni onkocitom pokazuje imunopozitivnost na CD 117, dok je u malom broju slučajeva fokalno pozitivan na CK7, čak i retke pojedinačne ćelije, a u većini slučajeva je negativan. Pored navedenog RO je imunonegativan na vimentin, CD10, a histohemijskom analizom na HKFe se ne detektuju granule koje sadrže gvožđe, slika 10.



**Slika 10:** Imunohistohemijski profil RO. Bojenje na CKAE1/AE3 je difuzno, citoplazmatski pozitivno, dok je bojenje na CK7, vimentin i CAIX negativno. CD 10 može da bude negativno ili fokalno pozitivno, kao što je prikazano na slici. Histohemijsko bojenje na Haleovo koloidno gvožđe je negativno.

U tabeli 2 je shematski prikazana imunopozitivnost i imunonegativnost najčešće korišćenih markera u najučestalijim tipovima RCT.

**Tabela 2:** Prikaz imunopozitivnosti i imunonegativnosti u najučestalijim tipovima RCT-a.

Antitela	ccRCC	pRCC	chRCC	RO
CK7	-	+	+	-
p63	-	-	-	-
CD10	+	+	-/+	-/+
PAX2/PAX8	+	+	+/-	+
RCCMa	+	+	-/+	-
CD117	-	-	-	+
S100	+	+/-	+/-	+
VIMENTIN	+	+/-	+/-	-
CA IX	+	+/-	-	-
AMACR	-/+	+	-	-

### 1.3.6 Gradiranje i stadiranje karcinoma bubrega

Od svih sistema za gradiranje koji su predloženi, gradiranje po Fuhrman se najduže koristio. Međutim, zbog problema u interpretaciji, potvrđivanju i ponovljivosti po Furman sistemu, 2016. godine se uveo novi sistem za gradiranje po WHO/ISUP sistemu. Prema WHO/ISUP sistemu, gradusi 1-3 se definišu na osnovu prominencije nukleolusa; Gradus 4 se definiše na osnovu prisustva izraženog jedarnog pleomorfizma, prisustva tumorskih gigantskih ćelija i/ili rabdoidnih i/ili sarkomatoidnih diferencijacija (Tabela 3).

**Tabela 3:** Određivanje nuklearnog gradusa prema WHO/ISUP sistemu

Gradus	Opis
<b>Gradus 1</b>	Nukleolusi odsustvuju ili su neupadljivi i bazofilni na uvećanju x400
<b>Gradus 2</b>	Nukleolusi su upadljivi i eozinofilni na uvećanju x400, vidljivi ali ne i istaknuti na uvećanju x100
<b>Gradus 3</b>	Nukleolusi su upadljivi i eozinofilni na uvećanju x100
<b>Gradus 4</b>	Postoji izrazit jedarni pleomorfizam, višejedarne gigantske ćelije i/ili rabdoidna i/ili sarkomatoidna diferencijacija

Prema novoj klasifikaciji, definisalo se 7 kategorija tumora bubrega i njihova korelacija sa nuklearnim gradusom. U tabeli 4 su prikazane kategorije tumora i njihova korelacija nuklearnim gradusom.

**Tabela 4:** Kategorije tumora bubrega i korelacija sa nuklearnim gradusom

Kategorija	Opis
<b>Kategorija 1</b>	ccRCC i pRCC spadaju u prvu kategoriju u kojoj nuklearni gradus <b>mora</b> da se odredi prema gore navedenoj tabeli.
<b>Kategorija 2</b>	U kategoriju 2 spada chRCC, za koji se smatra da određivanje nuklearnog gradusa nije primenjiv.
<b>Kategorija 3</b>	Kategorija 3 čine određeni podtipovi karcinoma bubrega kao što su RCC sa deficijencijom sukcinat dehidrogenaze, mucinozni tubularni i vretenastoćelijski RCC, ELOC-RCC, RCC neklasifikovan i RCC sa deficijencijom fumarat dehidrogenazom za koje je nuklearno gradiranje <b>potencijalno korisno</b> , zato se savetuje da se prilikom dijagnostike ovih tipova tumora <b>odredi i nuklearni gradus</b> .
<b>Kategorija 4</b>	U kategoriju 4 spada karcinom sabirnih kanalića koji je sam po sebi veoma agresivan karcinom, tako da određivanje nuklearnog gradusa nije od značajnosti.
<b>Kategorija 5</b>	U kategoriju 5 spadaju tubulocistični RCC, RCC udružen sa stečenom cističnom bolešću bubrega i eozinofilni solidni i cistični RCC za koje se smatra da određivanje nuklearnog gradusa može pogrešno da se protumači ili je značajnost određivanja nuklearnog gradusa još uvek nepoznata.

<b>Kategorija 6</b>	U kategoriju 6 spadaju tumori niskog gradusa za koje je određivanje nuklearnog gradusa esencijalno za postavljanje tačne dijagnoze. U ovu kategoriju spadaju papilarni adenom, multilokularna cistična neoplazma niskog malignog potencijala i svetloćelijski papilarni karcinom.
<b>Kategorija 7</b>	U kategoriju 7 spadaju RCC sa rearanžmanom ALK gena i drugi onkocitni tumori za koje je značajnost određivanja nuklearnog gradusa još nepoznata. Morfološki drugi onkocitni tumori se klasifikuju na onkocitne tumore niskog i visokog gradusa, ali je klinički ishod za njih još uvek nepoznat.

Stadiranje karcinoma bubrega se vrši prema TNM klasifikaciji. TNM klasifikacija je sistem za klasifikaciju maligniteta. Prvenstveno se koristi kod solidnih tumora i može da se koristi kao pomoć u određivanju prognostičkog stadijuma malignog tumora. Sistem ima svoju osnovu na proceni tumora, regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza (55).

T predstavlja primarni tumor, N predstavlja regionalno i udaljeno zahvatanje limfnih čvorova i M predstavlja postojanje udaljenih metastaza. U tabeli 5 su prikazani kriterijumi za određivanje T- stadijuma.

**Tabela 5:** Parametri za određivanje T stadijuma u TNM klasifikaciji karcinoma bubrega

<b>T-primarni tumor</b>	
<b>Tx</b>	Postojanje primarnog tumora ne može da se utvrdi
<b>T0</b>	Tumor nije prisutan
<b>T1</b>	Prisustvo tumora koji je najvećih dimenzija do 7 cm, lokalizovan u bubregu
<b>T1a</b>	Tumor je maksimalne dimenzije do 4 cm
<b>T1b</b>	Tumor je veće dimenzije od 4 cm, a najveće do 7 cm, lokalizovan u bubregu
<b>T2</b>	Tumor je većih dimenzija od 7 cm, lokalizovan u bubregu
<b>T2a</b>	Tumor je većih dimenzija od 7 cm, ali ne većih od 10 cm, lokalizovan u bubregu
<b>T2b</b>	Tumor je većih dimenzija od 10 cm, lokalizovan u bubregu
<b>T3</b>	Tumor zahvata renalnu venu ili se širi u perirenalno masno tkivo, ali ne infiltriše istostranu nadbubrežnu žlezdu niti probija Gerota fasciju
<b>T3a</b>	Tumor zahvata renalnu venu, perirenalno masno tkivo, pijelokaliksni sistem ili renalni sinus, ali ne i Gerota fasciju
<b>T3b</b>	Tumor se širi kroz venu kavu ispod dijafragme
<b>T3c</b>	Tumor se širi kroz venu kanu iznad dijafragme ili infiltriše njen zid
<b>T4</b>	Tumor infiltriše Gerota fasciju sa infiltracijom istostrane nadbubrežne žlezde



U tabeli 6 su prikazani kriterijumi za određivanje N stadijuma TNM klasifikacije.

**Tabela 6:** Parametri za određivanje N stadijuma u TNM klasifikaciji karcinoma bubrega

N-regionalni limfni čvorovi	
<b>Nx</b>	Limfni čvorovi nisu uočeni
<b>N0</b>	Metastatski depoziti nisu prisutni u limfnim čvorovima
<b>N1</b>	Metastatski depoziti su prisutni u limfnim čvorovima

U tabeli 7 su navedeni kriterijumi za određivanje M stadijuma TNM klasifikacije.

**Tabela 7:** Parametri za određivanje M stadijuma u TNM klasifikaciji karcinoma bubrega

M-udaljene metastaze	
<b>M0</b>	Udaljene metastaze nisu prisutne
<b>M1</b>	Udaljene metastaze su prisutne

### 1.3.7 Druge metode dijagnostike

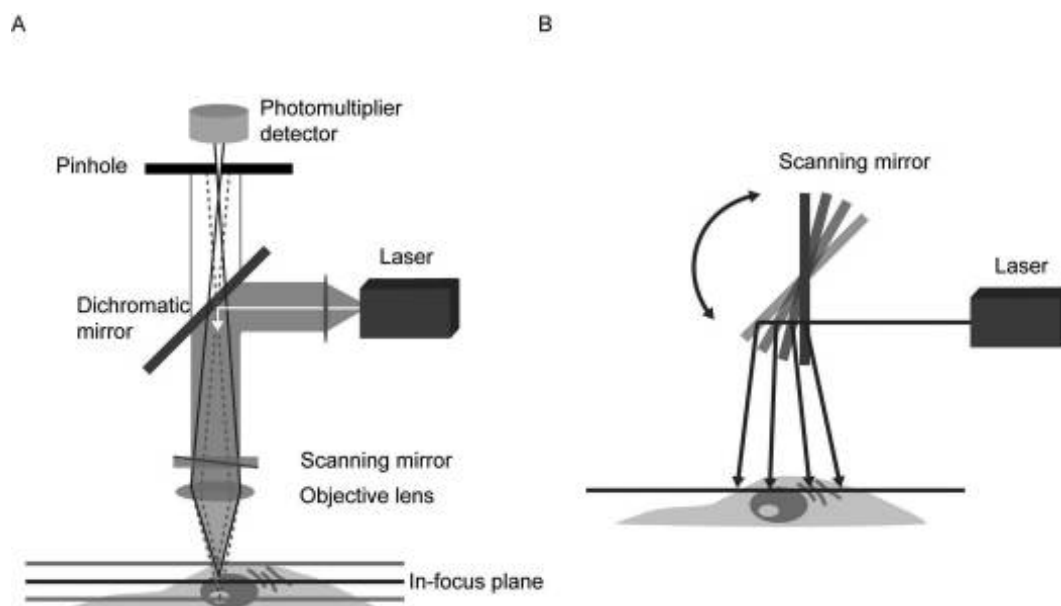
Već decenijama se istražuju i druge metode za preciznu dijagnostiku tumora bubrega. Spektroskopske metode su korisne metode u proučavanju tumora bubrega, omogućavajući detaljnu analizu molekularnih karakteristika tkiva i identifikaciju specifičnih metaboličkih promena povezanih sa tumorskim procesima. Dalje u tekstu će biti prikazane najčešće spektroskopske metode koje se koriste u proučavanju tumora bubrega:

- I. Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - NMRS) je tehnika koja koristi magnetno polje i radio talase za analizu hemijskih komponenti u tkivu (56–58). NMRS se može koristiti za identifikaciju različitih metabolita prisutnih u tkivu tumora bubrega, uključujući lipide, aminokiseline, mlečnu kiselinu i druga jedinjenja. Ova tehnika može pružiti informacije o metaboličkom profilu tumora i omogućiti praćenje promena u metabolizmu tokom tumorigeneze (59).
- II. Infracrvena spektroskopija (NIRS) koristi infracrveno zračenje za analizu molekularnih vibracija u tkivu (60,61). IRS spektroskopija se može koristiti za identifikaciju specifičnih molekula i hemijskih veza prisutnih u tumorskom tkivu bubrega. Ova tehnika može pružiti informacije o strukturi i sastavu tkiva, kao i o promenama u biohemijskim procesima povezanim sa tumorskim razvojem (62).
- III. Ramanova spektroskopija (RS) je tehnika koja koristi raspršeno svetlo za analizu vibracijskih modova molekula. Raman spektroskopija može identifikovati specifične molekule i hemijske veze u tumorskom tkivu bubrega. Ova tehnika može pružiti informacije o sastavu tkiva, prisustvu biomarkera i metaboličkim

promenama koje se javljaju tokom tumorigeneze. Takođe, može da da informacije o linijama resekcije i prisustvu kapsule (63).

- IV. Fluorescentna spektroskopija (FS) koristi svetlost za analizu fluorescentnih svojstava molekula. Ova tehnika se može koristiti za identifikaciju autofluorescentnih molekula (64), prisutnih u tumorskom tkivu bubrega. Autofluorescentnost može biti povezana sa metaboličkim promenama, oksidativnim stresom i drugim tumorskim karakteristikama. Fluorescentna spektroskopija može pružiti informacije o prisustvu i raspodeli specifičnih molekula i pomoći u karakterizaciji tumora bubrega (65).

Ove spektroskopske metode pružaju jedinstven uvid u molekularnu i biohemijsku prirodu tumora bubrega. Kombinacija spektroskopskih tehnika sa konvencionalnim histološkim analizama i kliničkim podacima može doprineti boljem razumevanju tumorske biologije, identifikaciji novih biomarkera, praćenju terapijskog odgovora i razvoju personalizovanih pristupa lečenju tumora bubrega.



**Slika 11:** Komponente konfokalnog mikroskopa. (A). Svetlost iz laserskog izvora prolazi kroz kolimirajuću optiku do promenljivog dihromatskog ogledala ili AOBS i odbija se do sočiva objektivna koje fokusira snop na tačku u uzorku. Ogledala za skeniranje prelaze ekscitacioni snop preko uzorka tačku po tačku da bi izgradili sliku. Emitovana fluorescencija prolazi nazad kroz sočivo objektivna, dihromatsko ogledalo ili AOBS, i detektuje je PMT(i). Rupa postavljena u ravni konjugovane slike do fokusne tačke u uzorku služi za odbijanje svetlosti van fokusa, koju detektor ne hvata. U ovoj konfiguraciji epifluorescencije, osvetljenje i emisionno svetlo prolaze kroz isto sočivo, tako da je potrebna samo rupica na strani detektora. Promena veličine rupice menja količinu prikupljene svetlosti i debljinu optičkog preseka. Spektralno snimanje se može postići nizom PMT-a i difrakcionom rešetkom, ili prizmom, postavljenom na putanju emisionog svetla. (B). Šema ogledala za skeniranje korišćenih od strane konfokalnih mikroskopa da pomeraju ekscitaciono svetlo preko uzorka (slika preuzeta iz rada autora *Elliott AD, 2020*).

### 1.3.7.1 Konfokalna mikroskopija

Konfokalna mikroskopija (engl. Confocal microscopy - CM) je visoko specifična i visoko rezolucijska tehnika koja se koristi za vizualizaciju tkiva i ćelija na molekularnom nivou. Ova tehnika omogućava detaljno proučavanje strukture, organizacije i interakcija

unutar tkiva tumora bubrega. Dalje u tekstu se opisuju ključni aspekti konfokalne mikroskopije u proučavanju tumora:

*Princip rada:* CM koristi lasersku svetlost za snimanje uzoraka na vrlo tankim presecima, maksimalno do 3  $\mu\text{m}$  debljine. Ova tehnika eliminiše zamućenost i poboljšava rezoluciju u poređenju sa tradicionalnim mikroskopijama. Uzorak se seče serijskim sečenjem, što omogućava da se napravi trodimenzionalna slika.

*Vizualizacija ćelijskih struktura:* CM omogućava vizualizaciju ćelijskih struktura sa visokom rezolucijom. Mogu se detaljno proučavati morfološke karakteristike ćelija, uključujući njihovu veličinu, oblik, organele i interakcije unutar tkiva (66).

CM se često koristi u kombinaciji sa imunofluorescentnim bojenjima. Imunofluorescentne boje se vezuju za specifične molekule ili strukture u tumorskom tkivu, omogućavajući njihovu selektivnu vizualizaciju. Ovakva interakcija omogućava proučavanje specifičnih proteina, markera za ćelijske procese ili metaboličke promene povezane sa tumorskim razvojem.

*Trodimenzijska analiza:* Svaki presek se analizira tačku po tačku, koristeći detektor za skeniranje, što omogućava stvaranje trodimenzionalne slike uzorka. Ova funkcionalnost omogućava detaljno proučavanje strukturnih i prostornih odnosa unutar tumora. Takođe, omogućava analizu raspodele ćelija, infiltracije ćelija imunog sistema ili vizuelizaciju angiogeneze u tumorskog tkivu.

CM pruža visoku rezoluciju i detaljan uvid u strukturu i organizaciju tumorskog tkiva bubrega. Ova tehnika je od suštinskog značaja za istraživanje tumorske biologije, identifikaciju biomarkera, evaluaciju terapijskog odgovora i razvoj novih pristupa lečenju tumora bubrega. Kombinacija CM sa drugim analitičkim metodama pruža sveobuhvatno razumevanje tumorske patologije i omogućava individualizovan pristup lečenju (67).

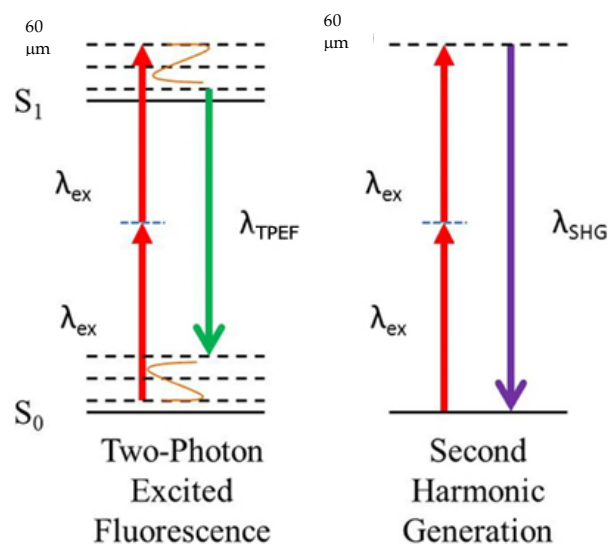
### 1.3.7.2 Multifotonska (nelinearna skenirajuća) mikroskopija

Značajan napredak u mikroskopskom oslikavanju različitih vrsta ćelija i tkiva u biološkim i medicinskim naukama donela je upotreba femtosekundnih lasera. Ovi uređaji emituju koherentno svetlosno zračenje u obliku povorke elektromagnetnih impulsa izuzetno kratkog trajanja, u opsegu od nekoliko do par stotina femtosekundi (1 fs =  $10^{-15}$  s). Iako energija po jednom impulsu može da iznosi nekoliko desetina nanodžula, njegova optička snaga dostiže vrednosti koje su reda veličine megavata. Ukoliko se laserski snop fokusira na uzorak, intenzitet po jednom impulsu postaje veoma visok što dovodi do pojave multifotonske apsorpcije ili drugih nelinearnih efekata u fokalnoj zapremini. Rezultat ovih interakcija je fluorescentno zračenje koje nosi informacije o uzorku koji ga emituje. Na temelju ovih fizičkih efekata razvijen je veći broj novih mikroskopskih metoda koje su objedinjene kao tehnike *multifotonske mikroskopije* (engl. *Multiphoton microscopy* - MPM). One se odlikuju sofisticiranim metodama pobude i detekcije fluorescencije iz uzorka čime je značajno poboljšana mikroskopska rezolucija i mogućnost za trodimenzionalno (3D) oslikavanje u odnosu na klasičnu optičku mikroskopiju. Prednost kod MPM tehnika je i redukovano fotoizbeljivanje, fototoksičnost i oštećenje uzorka (u odnosu na konfokalnu mikroskopiju) zato što se odgovarajuće nelinearne interakcije događaju samo u fokalnoj zapremini gde je intenzitet laserskog snopa dovoljno veliki.

Dodatno, upotreba pobudnog infracrvenog laserskog zračenja dovodi do dubljeg prodiranja svetlosti u tkivo zbog manjeg rasejanja i smanjene apsorpcije u ćelijskim proteinima (68).

Zbog svega navedenog, MPM tehnike su odličan izbor za slikanje živih i netaknutih bioloških tkiva na talasnim dužinama u opsegu od molekularnog nivoa do dimenzija celog uzorka. MPM je posebno pogodna za izvođenje eksperimentalnih merenja sa minimalnom invazijom tokom dužeg vremenskog perioda, pružajući tako izuzetne detalje inherentno dinamičkih bioloških procesa koji se odvijaju u vremenskom rasponu od mikrosekunde do nekoliko dana ili nedelja. Kao rezultat, velike količine podataka postaju dostupne kako bi se dodatno poboljšalo naše razumevanje složenih bioloških interakcija. Analiza najpoznatijih MPM tehnika sledi u nastavku teksta.

*Dvofotonski ekscitovana fluorescentna mikroskopija* (engl. *Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy - TPEF*) je tehnika fluorescentnog oslikavanja koja se temelji na pobuđivanju fluorescentnih molekula (fluorofora) u uzorku pomoću simultane apsorpcije dva fotona. Svetlost koja pobuđuje fluorofore je tako na većoj talasnoj dužini (odnosno manjoj optičkoj frekvenciji i energiji) od signala fluorescencije koji se snima i daje informaciju o uzorku. Skeniranjem laserskog snopa, odnosno kontrolisanim pomeranjem njegovog fokusa u uzorku, dobija se fluorescentna slika željene oblasti. Fizički mehanizam TPEF-a se objašnjava nelinearnom interakcijom elektromagnetnog zračenjem visokog intenziteta sa elektronima u molekulu koji imaju gusta i kompleksna kvantno-mehanička energetska stanja sa brojnim rotacionim i vibracionim podnivoima (molekulske trake). Naime, istovremenom apsorpcijom dva fotona elektron prelazi sa jednog podnivoa osnovnog stanja ( $S_0$ ) na jedan od podnivoa pobuđenog stanja ( $S_1$ ). Nakon kratkog vremena života, elektron se neradijativnim prelazima spušta u niže podnivoie u  $S_1$  odakle se deekscituje optičkim prelazom (emitovanjem fotona fluorescencije talasne dužine  $\lambda_{TPEF}$ ) na više podnivoie osnovne trake  $S_0$ . Ovaj proces je prikazan dijagramom Jablonskog na slici 12 levo.



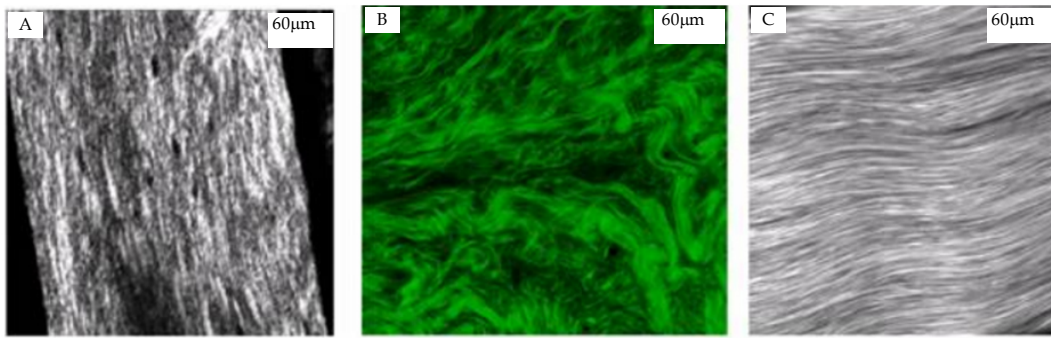
**Slika 12:** Dijagrami Jablonskog kod efekata (levo) dvofotonske ekscitacije i (desno) generisanja drugog harmonika. Na slikama su obeleženi rotaciono-vibracioni podnivoima u osnovnom ( $S_0$ ) i pobuđenom elektronskom stanju ( $S_1$ ) kod fluorescentnog molekula. (levo) Ekscitacija elektrona se ostvaruje simultanom apsorpcijom dva fotona talasne dužine  $\lambda_{ex}$ , dok se signal fluorescencije odlikuje kraćom talasnom dužinom  $\lambda_{TPEF}$ . (desno) U slučaju generisanja drugog harmonika frekvencija signala je tačno jednaka dvostrukoј vrednosti optičke učestanosti laserske svetlosti (ili  $\lambda_{SHG} = \lambda_{ex}/2$ ).

Bez ulaženja u detalje i fizičko izvođenje, može se reći da je broj fluorescentnih fotona koji se emituju u jedinici vremena (fotonski fluks) proporcionalan efikasnom preseku za dvofotonsku apsorpciju, kvantnom doprinosu (odnos broja emitovanih fluorescentnih fotona prema broju parova apsorbovanih fotona) i kvadratu intenziteta svetlosti. Ovde se još jednom vidi neophodnost primene femtosekundnih laserskih impulsa: njihov intenzitet za nekoliko redova veličina premašuje intenzitet kod dugačkih impulsa ili kontinualnih lasera što omogućava da fotonski fluks bude dovoljno visok za efikasnu detekciju. Treba napomenuti da fluorescentni signal može biti generisan od egzogenih sonde (Hoechst, AlexaFluor488, itd.) koje se primenjuju na tkivo ili endogenih molekula (NAD(P)H ili transficiranih fluorescentnih proteina) koji su prirodno izraženi.

*Generisanje drugog harmonika* (engl. *Second Harmonic Generation* - SHG) je još jedan optički proces u kojem dva fotona iste frekvencije interaguju sa uzorkom specifične molekulske strukture pogodne za ostvarivanje nelinearne interakcije. U određenim materijalima (poput kolagena, miozina i skroba) dolazi do kombinovanja dva fotona iz laserskog snopa u jedan foton sa dvostruko većom optičkom frekvencijom. Elektron sa osnovnog elektronskog stanja apsorpcijom tog novog fotona prelazi na virtuelno stanje sa beskonačno kratkim vremenom života. Momentalna deekscitacija rezultuje emisijom fotona na upola manjoj talasnoj dužini od laserske emisije koji je identičan pobudnom "kombinovanom" fotonu. U ovom procesu održava se koherencija zračenja i nema deponovanja energije u uzorku. SHG efekat je prikazan pomoću dijagrama Jablonskog na slici 12 desno. Vrlo sažeto, udvajanje frekvencije je uzrokovano nelinearnom zavisnošću indukovanih dipolnih momenata molekula od upadnog električnog polja lasera. Makroskopski gledano, dolazi do pojave nelinearne polarizacije u uzorku koja je proporcionalna optičkoj susceptibilnosti drugog reda  $\chi^{(2)}$  i kvadratu električnog polja laserske emisije. Jasno je da je samo u uzorcima kod kojih je  $\chi^{(2)} \neq 0$  moguće postići SHG efekat. Analogno kao za TPEF, veći intenzitet zračenja kod femtosekundnih impulsa indukuje jače električno polje čime se dobija merljiv signal drugog harmonika. Na ovom mestu može da se napomene jasna razlika između TPEF i SHG fenomena. U TPEF procesu pobuda elektrona se odvija sa stanja  $S_0$  na jedno od realnih pobuđenih molekulskih stanja  $S_1$ , dok je kod SHG više energetska stanje isključivo virtuelno. Deekscitacijom elektrona u TPEF procesu dobija se fluorescencija, dok se kod SHG fenomena pojavljuje signal drugog harmonika.

SHG je veoma efikasna tehnika za biofizička ispitivanja modela membrana (69) i fiziologije membrana kod živih ćelija (70). Još jedna inovativna primena SHG efekta je za veoma precizno snimanje potencijala membrana (71). Na slici 13 je prikazana visoko rezoluciona SHG slika koja potiče od kolagena tipa I iz različitih humanih tkiva (kosti 13A, kože 13B i tetiva 13C). Ovaj rezultat je preuzet iz publikacije (72) i ovde je prikazan kao ilustracija mogućnosti SHG tehnike za oslikavanje medicinskih uzoraka bez obeležavanja.

U tumorima bubrega, MPM u kombinaciji sa SHG se koristio za detekciju kolagena u pseudokapsuli, kao i intra i inter-tumorske varijacije karakteristika kolagena (73). Pored detekcije kolagena, MPM se koristio za detekciju tumorskog od netumorskog tkiva, delom na osnovu arhitekture, gde su se tumori klasifikovali na papilarne i nepapilarne tumore, a delom i na osnovu citoplazmatskih karakteristika gde su se kod ccRCC detektovale lipidne kapi, kod chRCC se lipidne kapi nisu detektovale, već je citoplazma bila homogenija sa prisutnim intracitoplazmatskim granulama (74).



**Slika 13:** SHG slike dobijene snimanjem humanih (A) kostiju, (B) kože i (C) tetiva gde signal potiče od kolagena tipa I.

### 1.3.8 Elektronska mikroskopija

Elektronska mikroskopija (engl. *Electron microscopy* - EM) je moćna tehnika za vizualizaciju struktura koji su mnogo manji od onoga što je moguće videti pomoću konvencionalnih svetlosnih mikroskopa. Ova tehnika koristi snopove elektrona umesto snopove svetlosti za osvetljavanje uzoraka, što omogućava veći stepen uvećanja i bolju rezoluciju.

Postoje dve osnovne vrste elektronske mikroskopije:

- I. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM): SEM koristi snop elektrona koji skenira površinu uzorka. Ovo stvara 3D-like slike sa visokom dubinom polja, što je korisno za proučavanje morfoloških karakteristika uzorka, poput oblika i teksture.
- II. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) je vrsta elektronske mikroskopije koja omogućava vizualizaciju unutrašnje strukture uzorka, kao što su ćelijske organele, kristalne rešetke materijala ili nanomaterijali. TEM koristi snopove elektrona koji prolaze kroz tanki presek uzorka kako bi stvorili visokokvalitetnu 2D sliku unutrašnjosti uzorka (75).

Na slici 14 se može videti TEM sa Instituta za histologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji je korišćen u ovoj disertaciji. Princip rada TEM-a:

- Izvor elektrona: TEM koristi elektrone kao izvor svetlosti umesto fotona (svetlosti). U TEM-u se koristi elektronska cev koja emituje snop elektrona.
- Kondenzacioni sistem: Elektronski snop se fokusira pomoću elektromagnetskih sočiva kako bi se dobio uski i kružni snop.
- Presecanje uzorka: Uzorak koji se posmatra mora biti vrlo tanki kako bi elektronski snop mogao da prođe kroz njega. Tipično, uzorak se priprema postupkom sečenja, koristeći uređaje poput ultra-tankih mikrotoma.
- Interakcija sa snopom elektrona: Kada snop elektrona prolazi kroz uzorak, oni interaguju sa strukturama i atomima unutar uzorka. Elektroni mogu biti

raspršeni, apsorbovani ili prolaziti kroz uzorak bez interakcije, što stvara kontrast na slici.



**Slika 14:** Transmisioni elektronski mikroskop (uz dozvolu i zahvalnost prof. dr Tamare Kravić Stevović, slika preuzeta sa insituta za histologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu)

- Projekcija na ekran: Nakon što snop elektrona prođe kroz uzorak, formira se 2D projekcija unutrašnjosti uzorka na ekranu detektora. Ovde se beleže informacije o apsorpciji i raspršenju elektrona kako bi se stvorila slika.
- Detekcija i analiza: Detektor snima projekciju elektrona i pretvara je u digitalni signal. Ovi signali se obrađuju kako bi se stvorila konačna slika unutrašnjosti uzorka.

### 1.3.9 Terapijski pristupi u lečenju tumora bubrega

Terapijski modaliteti za tretiranje tumora bubrega uključuju:

- Operacija uklanjanja dela ili celog bubrega se koristi za lečenje raka bubrežnih ćelija. U zavisnosti od dimenzija tumora i njegove lokalizacije u bubregu, može da se primeni enukleacija, parcijalna i totalna nefrektomija. Totalna nefrektomija se deli na jednostavnu i radikalnu nefrektomiju.

- Enukleacija tumora ili jednostavna enukleacija je procedura koja se odlikuje uklanjanjem tumora koji je < 4 cm tupom ekscizijom bez jasnih margina, prateći ravan koja se nalazi između tumorske kapsule i zdravog parenhima. Ovu tehniku je moguće izvesti samo ako je tumor lokalizovan kortikalno, malih dimenzija i imponuje da ima svoju kapsulu (76,77). Na slici 15 je prikaza enukleisan tumor bez kapsule i okolnog zdravog bubrežnog parenhima, dimenzija oko 3,5 cm.

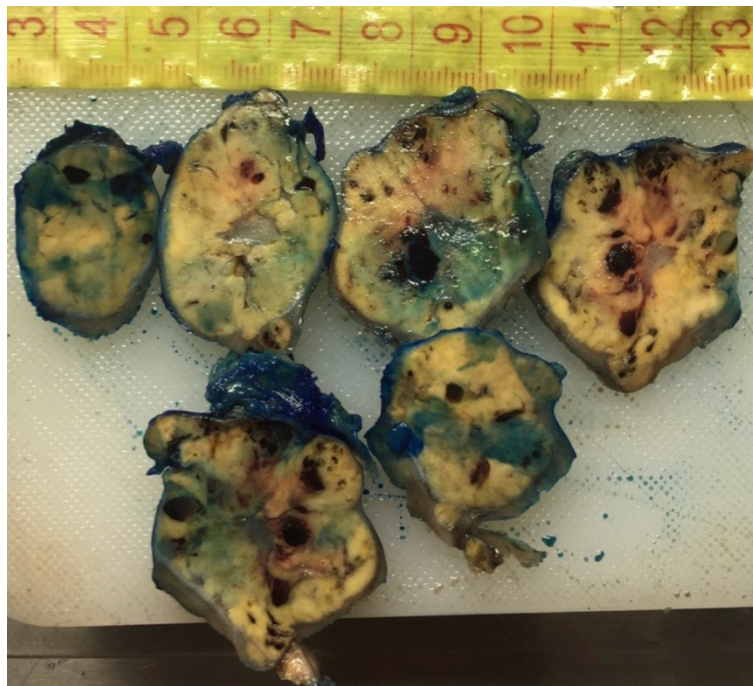


**Slika 15:** Enukleacija tumora bubrega uklanjanje tumora bez okolnog bubrežnog parenhima.

Parcijalna nefrektomija predstavlja hiruršku proceduru kojom se otklanja tumorska masa sa manjim delom okolnog tkiva bubrega. Uvedena je pre više od dve decenije kao standardna terapijska procedura kod tumora koji su lokalizovani na polu i samim tim pristupačni za otklanjanje i ako dimenzija tumora, verifikovana dijagnostičkim procedurama kao što su ultrazvuk, CT i MRI, ne prelazi 7 cm (78,79). Parcijalna nefrektomija je preporučljiva da bi se sprečio gubitak funkcije bubrega kada je drugi bubreg oštećen ili je već uklonjen, pod uslovom da su ispunjeni kriterijumi za dimenziju i lokalizaciju tumora. Na slici 16 je prikazan makroskopski izgled tumora urađen metodom parcijalne nefrektomije.

Jednostavna nefrektomija predstavlja hiruršku proceduru kojom se uklanja samo tumor sa bubregom, bez uklanjanja nadbubržne žlezde i regionalnih limfnih čvorova (80). Na slici 17 je prikazan makroskopski izgled bubrega sa tumorom urađen metodom jednostavne nefrektomije.

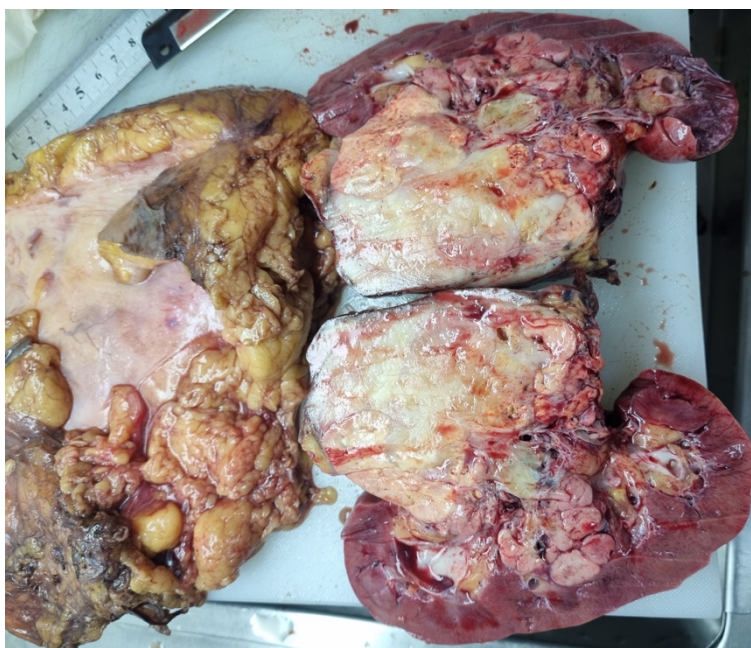




**Slika 16:** Parcijalna nefrektomija koja podrazumeva uklanjanje tumora sa delom okolnog zdravog bubrežnog tkiva



**Slika 17:** Jednostavna nefrektomija koja podrazumeva uklanjanje bubrega bez nadbubrežne žlezde i regionalnih limfnih čvorova



**Slika 18:** Radikalna nefrektomija koja podrazumeva uklanjanje bubrega sa nadbubrežnom žlezdom

Radikalna nefrektomija predstavlja hiruršku proceduru za uklanjanje bubrega, nadbubrežne žlezde, okolnog tkiva i, obično, regionalnih limfnih čvorova. Na slici 18 je prikazan makroskopski izgled bubrega sa tumorom, okolnim masnim tkivom i nadbubrežnom žlezdom urađena metodom radikalne nefrektomije.

Kada operacija nije moguća, procedura koja može da se primeni je arterijska embolizacija koja za cilj ima da prekine dotok krvi i hranjivih materija tumoru. Pravi se mali rez na arterijskom krvnom sudu i kateter se ubacuje u lumen krvnog suda. Postoje različite supstance koje se koriste za embolizaciju i nije dokazano da je neka supstanca bolja od druge (81), a njihova primena zavisi od dostupnosti supstanci za embolizaciju.

Nakon nefrektomije, može da se primeni hemioterapija ili radioterapija kao vid adjuvantne terapije da bi se sprečio rizik za recidiv.

- Radioterapija koristi visokoenergetsko zračenje kako bi ciljano uništile tumorske ćelije. Međutim, radioterapija se retko koristi kao primarna terapija za tumore bubrega, već se češće koristi kao dopunska terapija nakon hirurškog uklanjanja ili za kontrolu simptoma kod metastatske bolesti.
- Hemioterapija se koristi za lečenje tumora koji su otporni na druge terapijske modalitete. Međutim, većina tumora bubrega nije osetljiva na konvencionalnu hemoterapiju, pa se ova terapija retko koristi za njihovo lečenje, izuzev ako ne postoji ni jedna druga uspešna terapija, pa se koristi kao palijativno lečenje.

Poslednjih godina uvedena je imunološka terapija koja je pokazala pozitivne efekte u lečenju RCC-a. Nažalost, imunološka terapija ne reaguje isto kod svih tipova RCC-a. Sledeće vrste imunološke terapije se koriste u lečenju RCC-a:

- I. Terapija inhibitorima imunološke kontrolne tačke (engl. *Checkpoint inhibitors*): Neke vrste imunih ćelija, kao što su T ćelije, i neke ćelije raka imaju određene proteine,

nazvane proteini kontrolnih tačaka. Ukoliko ćelije raka imaju velike količine ovih proteina, T ćelije domaćina ih neće napasti i ubiti. Inhibitori imunološke kontrolne tačke blokiraju ove proteine i povećava se sposobnost T ćelija da ubijaju ćelije raka. Ovaj tip terapije se koriste za lečenje RCC-a kod pacijenata kod koji su tumori inoperabilni (82). Postoje dve vrste terapije inhibitorima imunske kontrolne tačke:

- ❖ Terapija inhibitorom citotoksičnog T limfocitnog antigena 4 (engl. *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4* - CTLA-4) CTLA-4 je protein na površini T ćelija koji pomaže u održavanju imunoloških odgovora tela pod kontrolom. Kada se CTLA-4 veže za drugi protein koji se zove B7 na ćeliji raka, on sprečava T ćeliju da ubije ćeliju raka. CTLA-4 inhibitori se vezuju za CTLA-4 i omogućavaju T ćelijama da ubijaju ćelije raka. Ipilimumab je vrsta CTLA-4 inhibitora.
- ❖ Terapija inhibitorima ćelijske smrti (engl. *Programmed cell death 1* - PD-1 and *programmed cell death 1 ligand 1* - PD-L1): PD-1 je takođe protein na površini T ćelija koji pomaže u održavanju imunoloških odgovora tela pod kontrolom. PD-L1 je protein koji se nalazi na nekim vrstama ćelija raka. Kada se PD-1 veže za PD-L1, sprečava T ćeliju da ubije ćeliju raka. PD-1 i PD-L1 inhibitori sprečavaju PD-1 i PD-L1 proteine da se vežu jedan za drugi. Na taj način omogućavaju T ćelijama da ubijaju ćelije raka. Nivolumab i pembrolizumab su tipovi inhibitora PD-1. Avelumab je vrsta inhibitora PD-L1.

- II. Interferoni (IFN) su proteini koje proizvode različite ćelije u inflamatornom odgovoru na infekcije. Njihovu proizvodnju pokreće imuni sistem kao odgovor na patogene ili citokine. Jednom kada se aktiviraju, izazivaju brojne molekularne promene koje utiču na ćelijske odgovore uključujući rast i upalu ćelija. Interferoni se već dve decenije koriste kao prva linija odbrane u lečenju uznapredovalih i metastatskih RCC-a (83–85).

### Ciljna terapija

Ciljna terapija je vrsta lečenja koja koristi lekove ili druge supstance za identifikaciju i napad na specifične ćelije tumora. Ciljna terapija antiangiogenim agensima se koristi za lečenje uznapredovalog RCC-a. Antiangiogena sredstva sprečavaju neoangiogenezu, i na taj način sprečavaju dalji rast tumora ili dovode do smanjenja volumena tumora.

Monoklonska antitela i inhibitori kinaze su dve vrste antiangiogenih agenasa koji se najčešće koriste za lečenje RCC-a.

- I. Monoklonska antitela (mAt) i njihovi derivati su najveća grupa proteina koji se koriste u terapiji lečenja tumora. To su proteini imunog sistema. Ova antitela mogu da se vežu za određeni segment na tumorskoj ćeliji ili pak na drugim ćelijama koje podstiču rast tumora. Na ovaj način, primenom mAt se sprečava rast i širenje tumora. Mogu se primenjivati kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim terapijskim modalitetima. U terapiji RCC-a se koriste da blokiraju neoangiogenezu. Bevacizumab je monoklonsko antitelo koje se koristi u lečenju RCC-a.
- II. Inhibitori kinaze zaustavljaju deobu ćelija i mogu sprečiti rast novih krvnih sudova koji su tumorima potrebni za rast. Inhibitori vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor* - VEGF) i mamarna meta proteina

rapamicina (engl. *Mammalian target of rapamycin* -mTOR) inhibitori su najčšći inhibitori kinaze koji se koriste za lečenje RCC-a.

- VEGF je jedan od primarnih regulatora angiogeneze i može pokrenuti mrežu signalnih procesa koji stimulišu rast, kretanje i preživljavanje endotelnih ćelija nakon aktivacije puta VEGF-receptora. Trenutno se inhibitori angiogeneze obično kombinuju sa hemoterapijom. Bevacizumab je bio prvi antiangiogeni agens odobren u Sjedinjenim Državama za lečenje kolorektalnog karcinoma u kombinaciji sa hemoterapijom. Od tada, drugi antiangiogeni agensi su odobreni za lečenje različitih maligniteta, uključujući i RCC-a (86).
- mTOR pripada porodici kinaza povezanih sa fosfatidilinozitol-3-kinazom (PI3K). Članovi ove porodice su velike veličine (>2.500 aminokiselina) i imaju domen kinaze na svojim C-terminalima koji deli sličnost sekvence sa fosfatidilinozitol-3-kinazom (PI3K) (87). Uprkos tome što ima potpis sekvence lipidne kinaze, mTOR je protein kinaza koja fosforiliše ostatke treonina i serina u svojim supstratima. U ćelijama mTOR služi kao katalitičke podjedinice dva multi-proteinska kompleksa nazvana mTOR kompleks 1 (mTORC1) i kompleks 2 (mTORC2) (88-90). TORC1 je glavna nizvodna komponenta PI3K/AKT puta koja prenosi signale iz tumorskih supresora PTEN, LKB1 i TSC1/2, i onkoproteina PI3K i AKT. Nizvodno mTORC1 kontroliše ćelijsku biogenezu kroz regulaciju sinteze i prometa proteina. On fosforiliše eIF4E vezujući protein 1 (4EBP1) i ribozomalni protein S6 kinazu (S6K), dva faktora uključena u inicijaciju translacije (91). Njegova aktivnost kontroliše promet proteina kroz potiskivanje autofagije (92). mTORC2 je takođe uključen u PI3K/AKT put, ali njegova funkcija je nezavisna od mTORC1. On fosforiliše i stimuliše AKT aktivaciju, i stoga igra ključnu ulogu u preživljavanju ćelija posredovanom AKT (93). Put mTOR može biti od posebnog značaja za RCC jer je pokazano da ekspresija HIF proteina zavisi od mTOR u određenim ćelijskim kontekstima. Veruje se da je neodgovarajuća akumulacija HIF-1a i HIF-2a kao rezultat bialelnih promena u von Hippel-Lindau (VHL) genu uočenih u većini RCC svetlih ćelija kritičan korak u tumorigenezi RCC kao rezultat povećane ekspresije HIF-regulisanih genskih proizvoda uključujući VEGF, PGFDGFa. Zato inhibitori mTOR-a imaju ključnu ulogu u terapiji RCC-a.

Važno je napomenuti da se terapijski pristup određuje na osnovu stadijuma tumora, veličine tumora, prisustva metastaza i drugih faktora koji se uzimaju u obzir prilikom donošenja odluke o optimalnom lečenju za svakog pacijenta. Takođe, kombinacija različitih terapijskih modaliteta može se primeniti u određenim slučajevima radi postizanja najboljih rezultata lečenja.

### 1.3.10 Preživljavanje

Stadijum bolesti, nuklearni gradus, sarkomatoidna i rabdoidna diferencijacija kao i nekroza predstavljaju značajne prediktore ishoda kod ccRCC-a (94). Različite forme nekroze mogu se vidjeti kod ccRCC-a. Tromboembolijski infarkt dovodi do koagulacione nekroze (95) koja se razlikuje od tumorske nekroze (96). Opsežna nekroza u slučaju RCC niskog nuklearnog gradusa je povezana sa povoljnijom prognozom (95). Tumorska

nekroza tipa granularne nekroze pokazala se kao nezavistan značajan prediktor manje povoljnog ishoda kod ccRCC-a (96,97).

Sarkomatoidna diferencijacija u RCC-u predstavlja bifazični tumor sa varijabilnom količinom vretenastih ćelija, pleomorfne, nediferentovane ili neklasifikovane morfologije. Heterologna diferencijacija poput hondrosarkoma, osteosarkoma ili rabdomiosarkoma se retko viđa (94,98).

Rabdoidna diferencijacija se karakteriše prisustvom okruglih do poligonalnih ćelija sa eozinofilnim globulama u citoplazmi i ekscentrično lokalizovanim i pleomorfnim jedrima. Nije retkost da su i sarkomatoidna i rabdoidna diferencijacija prisutne u tumoru istovremeno. Obe diferencijacije su povezane sa lošim ishodom, pri čemu 5-to godišnje preživljavanje pacijenata kojima se dijagnostiku ccRCC sa sarkomatoidnom diferencijacijom je od 15-22% (94,99). Pacijenti kojima se dijagnostikuje ccRCC sa rabdoidnom diferencijacijom imaju jako nepovojnu prognozu sa stopom preživljavanja od 8-31 meseci (94,100).

pRCC ima povoljniju prognozu od ccRCC-a. Nuklearni gradus se određuje kao i u ccRCC-u.

ChRCC ima povoljniju prognozu u odnosu na ccRCC ili pRCC sa stopom petogodišnjeg preživljavanja od 78-100% (101,102). Stadijum, sarkomatoidna diferencijacija i nekroza u tumoru smanjuju stopu petogodišnjeg preživljavanja (101,103-105).

Karcinom sabirnih kanalića (Collecting duct carcinoma - CDC) je agresivan tumor i ima jako lošu prognozu. Pacijenti slabo reaguju na hemioterapiju i imunoterapiju. Dve trećine pacijenata premine unutar 2 godine od postavljanja dijagnoze. Pored CDC, lošu prognozu imaju i neklasifikovani RCC, RCC sa nedostatkom fumarat dehidrogenaze, RCC sa TFE-3 rearanžmanom pogotovo kod starijih pacijenata i medularni karcinom koji u 95% slučajeva u trenutku postavljanja dijagnoze već ima udaljenje metastaze (106).

## 2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Prema dosadašnjim literaturnim podacima, poređenje rezultata optičke, konfokalne, nelinearne skenirajuće i elektronske mikroskopije nije rađeno. To je iniciralo naše istraživanje, najviše zbog primene pomenutih metoda u *ex tempore* biopsijama ili bunkcionim biopsijama bubrega, prvenstveno zbog zahteva za uštedom materijala.

Prva ključna ideja u pozadini ovog rada je primena IF i nelinearne skenirajuće mikroskopije koja je uspešno primenjena za analizu RCT, ali je iz literature delovalo nejasno da li bi mogla da se primeni na detekciju mitohondrija koje predstavljaju ključne organele kod pojedinih RCT-ova, što je već publikovano (107).

Precizno formulisani ciljevi istraživanja koji finalno čine ovu tezu su:

- Ispitati specifičnost i senzitivnost imunohistohemijskog bojenja na mitohondrije kod tumora porekla bubrežnog parenhima u cilju da se ustanovi da li na osnovu bojenja na mitohondrije mogu da se razlikuju podtipovi tumora, prema novoj klasifikaciji SZO.
- Utvrditi da li na osnovu imunofluorescentne mikroskopije, a upotrebom bojenja na mitohondrije, može da se postavi precizna dijagnoza kod uzoraka tkiva koji se uzimaju tokom operacije (*ex tempore*), a za koje je neophodno da se postavi dijagnoza od koje zavisi strategija hirurškog tretmana.
- Utvrditi da li nelinearna skenirajuća mikroskopija pomoću dvofotonske ekscitacione fluorescencije može da koristi, kako kao pomoćna dijagnostička metoda u cilju razlikovanja podtipova tumora porekla bubrežnog parenhima, tako i kao paralelna metoda kod *ex tempore* biopsija.

# 3 MATERIJAL I METODE

## 3.1 UZORAK

Istraživanje je sprovedeno po tipu retrospektivne studije. Istraživanjem je obuhvaćeno 100 pacijenata kojima je urađena nefrektomija, parcijalna ili totalna, na Klinici za urologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2019 do januara 2021. godine. Dostavljeni operativni materijal u navedenom periodu je preuzet u Službi za patohistologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, a dijagnoza je postavljena od strane dva uropatologa Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a na osnovu evaluacije HE obojenih pločica i histochemijske i imunohistochemijske analize. Kompletno ispitivanje je sprovedeno na 96 uzoraka, 54 pacijenta muškog pola i 42 pacijenta ženskog pola. Od 96 uzoraka, 43 uzorka su dijagnostikovana kao ccRCC, 15 uzoraka kao pRCC, 20 uzoraka kao chRCC i 18 uzoraka kao RO. Iz studije su izbačena 4 slučaja dijagnostikovana kao invazivni urotelni karcinom pijelona bubrega. Kliničke karakteristike (pol, starost i lokalizacija) ispitivanih uzoraka su prikazane u tabeli 8. Za dva uzorka nije dobijen podatak koji bubreg je zahvaćen tumorom.

**Tabela 8:** Demografski podaci o pacijentima i lokalizacija i dimenzija tumora

Kliničke karakteristike		
<b>Pol</b> n (%)	muško	54 (56,25%)
	žensko	42 (43,75%)
<b>Godine</b> (srednje godine ± SD)		61.2 ± 10.3
<b>Strana</b> n (%)	levo	53 (55,2%)
	desno	41 (42,7%)
<b>Najveća dimenzija tumora</b> (srednja vrednost u mm ± SD)		64.8 ± 36.5

## 3.2 IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE

Za imunohistochemijsku analizu sa parafinskih blokova svih 96 uzoraka, isečena su po tri preseka debljine 4 µm i nanošeni su na pločice. Pločice sa presecima su sušene na temperaturi od 60°C u trajanju od 2h. Uzorci su nakon toga deparafinirani i hidratirani u etanolu u različitim opadajućim koncentracijama i na kraju su ostavljeni u destilovanoj vodi. U tabeli 9 je prikazana detaljna procedura za deparafinizaciju uzoraka.

Demaskiranje antigena izvršeno je u Target Retrieval Solution Low ph (6.0) i High ph (9.0) firme DAKO, 20 minuta na 98°C u PT Modulu. Nakon demaskiranja i hlađenja sledi

blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom u trajanju od 10 minuta. Sledi ispiranje u destilovanoj vodi pa u PBS-u. Inkubacija uzoraka sa primarnim antitelom je vr-

**Tabela 9:** Procedura za deparafinizaciju uzoraka

I ksilol	5 minuta
II ksilol	5 minuta
III ksilol	5 minuta
100% alkohol	4 minuta, dva puta
96% alkohol	4 minuta, dva puta
70% alkohol	4 minuta, dva puta
Destilovana voda	5 minuta

šena na sobnoj temperaturi u trajanju od 45 minuta. Uzorci su onda tretirani EnVision™ detekcionim sistemom (DAKO, Nemačka) koristeći 3,3'-diaminobenzidin ili 3-amino-9-etil karbazol kao supstrat sa kontrastnim bojenjem hematoksilinom. Dva antitela koja boje mitohondrije u ćelijama su korišćena. Mitohondria antitelo Ab-2 (klon MTC02, Thermo Scientific, rastvor 1:100) koji prepoznaje 60kDa neglikoziliranu proteinsku komponentu mitohondrija koja se normalno nalazi i u zdravim i u mitohondrijama tumorskih ćelija. Drugo antitelo, Prohibitin (II-14-10, MA5-12858, Thermo Scientific, rastvor 1:50) se vezuje sa protein koji se nalazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija.

Evaluacija imunohistohemijskih pločica se vršila na optičkom mikroskopu marke Olympus BX51, a sa Olympus C5060A-ADU digitalnom kamerom i analySIS 5.0 softverom (Soft Imaging System, Olympus) su načinjene mikrofotografije.

### 3.3 IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE

Za imunofluorescentnu analizu sa parafinskih blokova isečena su po tri uzorka, debljine 3  $\mu$ m. Demaskiranje antigena izvršeno je u Target Retrieval Solution low ph (6.0) i high ph (9.0) firme DAKO, 20 minuta na 98°C u PT Modulu. Nakon demaskiranja i hlađenja sledi blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom u trajanju od 10 minuta. Sledi ispiranje u destilovanoj vodi pa u PBS-u. Korišćena su dva primarna antitela: mišije monoklonalno Mitochondria Ab-2 antitelo (klon MTC02, Thermo Scientific, rastvor 1:100) i mišije monoklonalno Prohibitin antitelo (klon II-14-10, Thermo Scientific, rastvor 1:50). Inkubacija primarnim antitelima je trajala 2h na sobnoj temperaturi nakon čega su uzorci isprani PBS-om. Sekundarno antitelo anti-mišije IgG-Aleka 488 (ab150113, Abcam) je stajalo preko noći, nakon čega se ispiralo u PBS-u 2x5 minuta i pokrilo glicer gelom. Uzorci su se čuvali u frižideru na temperaturi do 4°C.

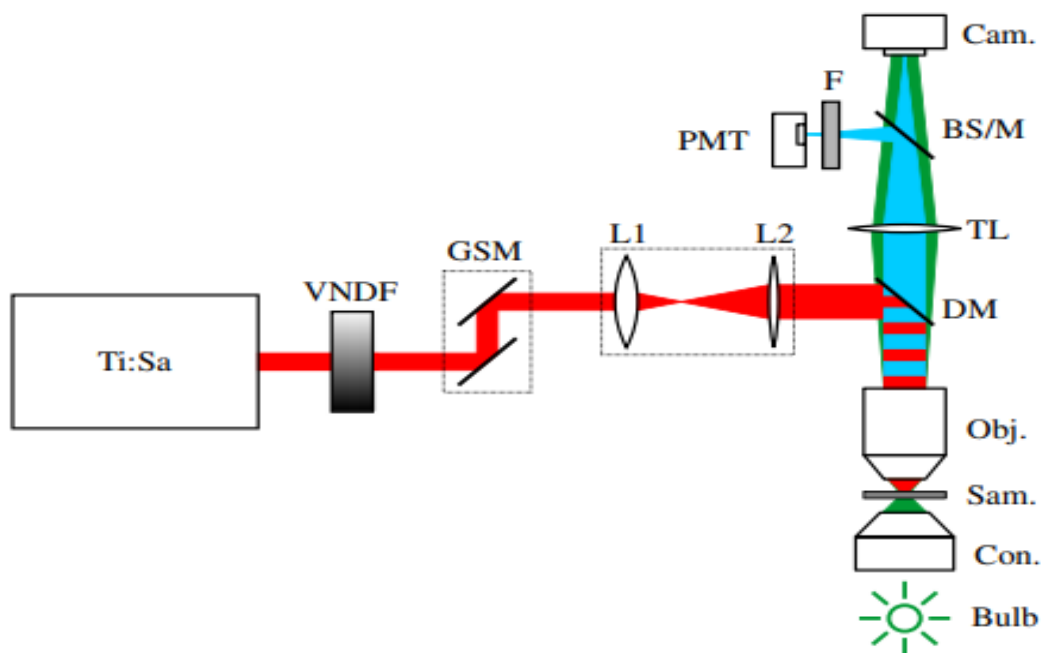
Svi uzorci su analizirani konfokalnom mikroskopijom korišćenjem Leica TCS SP2 mikroskopa (Leica Microsistem, Vetzlar, Nemačka) k63/NA 1.49 objektivom sa imerzionim uljem i Leica Confocal Softvarom za mikrofotografije. Za FITC-konjugovana sekundarna antitela, talasna dužina ekscitacije bila je 488 nm, dok je emisija detektovana kroz dugopropusni filter iznad 520 nm.



### 3.4 NELINEARNA SKENIRAJUĆA MIKROSKOPIJA (MULTIFOTONSKA MIKROSKOPIJA)

Za potrebe istraživanja iz ove doktorske disertacije sproveden je eksperiment iz nelinearne laserske skenirajuće mikroskopije (engl. *Nonlinear Laser Scanning Microscopy - NLSM*) razvijen u Laboratoriji za biofiziku na Institutu za fiziku u Beogradu. Mikroskopska slika se dobija merenjem signala TPEF ili SHG. Eksperimentalna šema je predstavljena na slici 19.

Ti:Safirni laser (Coherent, Mira 900-F) je korišćen za generisanje povorke femtosekundnih impulsa sa talasnom dužinom u opsegu od 700 do 1000 nm, sa trajanjem impulsa od 160 fs i frekvencijom ponavljanja od 76 MHz. Takođe, upotrebljen je i Yb:KGW femtosekundni laser (Time-Bandwidth Products AG, Yb GLX) sa talasnom dužinom emisije od 1040 nm. Filter sa promenljivom optičkom gustinom je postavljen ispred laserske aperture i korišćen za podešavanje optičke snage. Sistemom sočiva se proširuje prečnik laserskog snopa koji se potom usmerava na dihroično ogledalo. Dihroično ogledalo (Thorlabs, M254H45) se koristi u dve svrhe: da reflektuje laserski snop prema objektivu i da propusti TPEF i SHG signale ka fotomultiplikatoru (PMT) (RCA, PF1006).



**Slika 19:** Eksperimentalna postavka u TPEF i SHG konfiguraciji. Ti:Sa - Ti:Safir laser, VNDF - filteri sa promenljivom optičkom gustinom, GSM - galvo ogledala za skeniranje, L1 i L2 - sočiva, DM - dihroično ogledalo, BS/M - optička komponenta koja deluje kao delitelj snopa ili ogledalo u zavisnosti od talasne dužine svetlosti, PMT - fotomultiplikator za merenje signala fluorescencije, Cam. - fotoaparata za podešavanje i kalibraciju optičkog sistema, Obj. - objektiv mikroskopa, Sam. - uzorak, Con. - kondenzator za svetlo polje, Bulb - sijalica. Slika je preuzeta iz rada (108).

Korišćena su i dva ogledala na galvanometrima (Cambridge Technologies, 6215H) za rastersko skeniranje snopa po uzorku. Na taj način se prikuplja signal iz različitih tačaka u ravni uzorka i generiše dvodimenzionalna slika. Za analizu u NLSM merenjima je sa svih uzoraka isečen jedan presek debljine 10  $\mu\text{m}$ . Pločice su deparafizovane i hidratizovane, nakon čega su glicer gelom prekrivene pokrovnim staklom i stavljene u frižider. Laserski

zrak se upotrebom objektiva (Carl Zeiss, EC Plan-NEOFLUAR, 40× / 1,3 ulje) fokusira na uzorak. Kamera (Canon EOS 50D) se koristi za snimanje uzorka u svetlom polju. Da bismo izvršili poravnavanje sistema, uklonili smo infracrveni filter za blokiranje sa naše komercijalne kamere da bismo videli povratno rasejanje/povratnu refleksiju laserske tačke sa uzorka/pokrovnog stakla. Ovo je moguće jer se mali deo laserske svetlosti propušta kroz dihroično ogledalo. Zatim, ogledalo ili delitelj snopa se koristi da reflektuje deo signala ili ceo signal na PMT. Ispred PMT-a je postavljen filter da bi se propustio koristan signal i uklonila rasejana laserska svetlost. Prilikom detekcije TPEF signala korišćeni su različiti širokopojasni filtri (oko 40 nm) providni u oblasti vidljive svetlosti, dok su talasne dužine u IR i UV oblasti blokirane. Kada se detektuje SHG signal, koristi se uskopojasni filter koji je providan samo za talasnu dužinu dva puta kraću od talasne dužine lasera ( $\pm 5$  nm).

Talasna dužina ekscitacije je odabrana na takav način da fluorescentni signal dolazi pretežno iz bubrežnih struktura od interesa. Zato je za TPEF merenja korišćen širokopojasni filter koji obezbeđuje da se sakupi sva fluorescentna svetlost, čak i sa krila fluorescentnog spektra. Ovo je važno u slučaju relativno niske efikasnosti pobude i obezbeđuje dobar odnos signala prema šumu i visok kontrast slika. TPEF slika je snimljena korišćenjem laserske emisije sa talasnom dužinom u opsegu od 730 - 980 nm i sa optičkom snagom od 8,2 do 20 mW u ravni uzorka. Ovaj opseg snage je izabran da bi se što više smanjilo fotooštećenje uzoraka tkiva bubrega. Različite kombinacije talasnih dužina laserske pobude i filtera su testirane kako bi se prvenstveno pobudio NADH ili FAD i dobila najoštija slika. U merenjima je najčešće korišćena ekscitacija na 730 nm i upotreba VIS filtera (od 415 do 685 nm), zbog najboljeg kvaliteta slike (maksimalan odnos signala prema šumu).

### 3.5 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Analiza transmissionom elektronskom mikroskopijom (TEM) je izvršena od parafinskih blokova. Uzoci su isečeni na manje komade, veličine približno 2x2 mm, deparafinizovani u ksilolu (2 minuta, četiri puta), rehidrirani u etanolu opadajućih vrednosti (100% - 2 promene, 96%, 70%, 50%, 50% vodenog rastvora), i isprani u vodi u trajanju od 5 minuta vode. Uzorci su ponovo fiksirani u 3% glutaraldehidu u kakodilatnom puferu, naknadno fiksirani u 1% OsO<sub>4</sub> i 4,8% uranil-acetatu, dehidrirani u etanolu opadajućih vrednosti i ugrađeni u epoksidni medijum, prema standardnoj proceduri (109). Ultratanki preseći su obojeni uranil acetatom i olovnim citratom i pregledani transmissionim elektronskim mikroskopom (TEM) (Morgagni 268D FEI, Hillsboro, OR, SAD).

### 3.6 IMUNOHISTOHEMIJSKA EVALUACIJA

Evaluaciju imunohistohemijskog bojenja na Mitochondria antitelo i Prohibitin su analizirala dva iskusna patologa. Imunopozitivnost ova dva antitela je gradirana na dva načina:

- I. Na osnovu distribucije mitohondrijalnog bojenja i
- II. Morfometrijskom metodom određivanja intenziteta ekspresije mitohondrijalnog antitela.

Obrasci distribucije su definisani kao:

- 0- Odsutno citoplazmatsko bojenje
- 1- Oskudno granulirano citoplazmatsko bojenje
- 2- Umereno granulirano citoplazmatsko bojenje
- 3- Difuzno granularno citoplazmatsko bojenje

Ekspresija intenziteta bojenja je definisana kao:

- 1- Laka ekspresija
- 2- Umerena ekspresija
- 3- Izražena ekspresija

### 3.7 STATISTIČKA ANALIZA

Deskripcija numeričkih obeležja će biti urađena klasičnim metodama opisne statistike (aritmetičkom sredinom ili medijanom, kao i odgovarajućim merama varijabiliteta - standardnom devijacijom ili minimalnom i maksimalnom vrednošću). Analiza raspodela posmatranih varijabli će biti primenjena testom slaganja po Kolmogorov - Smirnovu u cilju primene parametarskih analitičkih metoda. U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, planira se primena Studentovog t-testa kod parametarskih podataka i Mann-Whitney U testa sume rangova za poređenje razlike između dve grupe neparametarskih podataka po jednom obeležju. Ako obrada podataka zahteva više od dva obeležja, biće korišćena ili parametarska analiza varijansnog količnika (ANOVA). Za analizu atributivnih obeležja koristiće se Pearsonov Hi kvadratni test u obliku tablica kontingencije.

## 4 REZULTATI

### 4.1 OBRAZAC EKSPRESIJE I DISTRIBUCIJA ANTI-MITOHONDRIJALNIH ANTITELA U TUMORIMA BUBREŽNIH ČELIJA U POREĐENJU SA DEMOGRAFSKIM PODACIMA PACIJENATA, TIPOM I STADIJUMOM TUMORA

Studijom je obuhvaćeno 96 pacijenata sa dijagnostikovanim najčešćim patohistološkim podtipovima RCT-a. Njihove kliničke i patohistološke karakteristike su analizirane u tri različite grupe, na osnovu IHH obrasca bojenja antimitohondrijalnog antitela (Tabela 10). Distribuciju anti-mitohondrijalnog bojenja smo podelili na grubo, oskudno citoplazmatsko bojenje, umereno granulirano i difuzno granulirano citoplazmatsko bojenje. Većina muškaraca (51,9%) imala je grubo oskudno citoplazmatsko bojenje, dok su žene imale sličnu distribuciju sva tri uzorka bojenja. Pacijenti su bili slične starosne dobi u svim grupama, bez značajne statističke razlike ( $p=0.960$ ), (Tabela 10). Levostrana nefrektomija je urađena u 53 slučaja, a desnostrana u 44 slučaja i nismo dobili statističku značajnost u korelaciji sa distribucijom anti-mitohondrijalnog bojenja ( $p=0.478$ ). Za dva pacijenta nije bilo kliničkih podataka o strani tumora, stoga su isključeni iz statističke analize. Prosečne vrednosti najvećih dimenzija tumora nisu se statistički razlikovale unutar grupa i obično su bile oko 60 mm ( $p=0.865$ ). Najveći tumor je dijagnostikovao kao ccRCC sa maksimalnom dimenzijom od 200 mm, a najveći prečnik najmanjeg, takođe dijagnostikovao kao ccRCC, bio je 13 mm. Od 96 obrađenih uzoraka, 43 uzorka su dijagnostikovani kao ccRCC, 15 uzoraka kao pRCC, 20 uzoraka kao chRCC i 18 uzoraka kao RO. Između podtipova tumora uočeni su statistički značajno različiti obrasci ekspresije. Među njima, ccRCC je uglavnom dijagnostikovao sa grubim oskudnim bojenjem mitohondrija otkrivenim IHH-om, sa izuzetkom dva slučaja pronađena sa difuznim granularnim obrascima bojenja umerenog intenziteta. Ova dva slučaja ccRCC su imala viši nuklearni gradus ( $p = 0,005$ ). Svi pRCC i RO su imali difuzno granularno citoplazmatsko bojenje, dok je chRCC dijagnostikovano isključivo sa umerenim granularnim obrascem bojenjem. Ove razlike među patohistološkim tipovima pokazale su statističku značajnost ( $p < 0,001$ ). Stadiranje tumorske bolesti je takođe istraženo u vezi sa ekspresionim obrascima mitohondrijalnog IHC bojenja; međutim, značajna razlika nije uočena ( $p = 0,764$ ). Sve u svemu, primećeno je da je intenzitet bojenja IHH-om povećan u grupama sa umerenim i difuznim granularnim obrascima ( $p < 0,001$ ), kao što je prikazano u tabeli 10.

Za poređenje pola i histološkog podtipa RCT-a koristili smo Hi- kvadratni test. Dobijeni rezultati su pokazali da se ccRCC i pRCC češće dijagnostikovao kod muške populacije u odnosu na žensku, za razliku od chRCC-a koji se češće dijagnostikovao kod ženske populacije, što je pokazalo statističku značajnost ( $p=0.002$ ). Na grafikonu 1 je prikazana korelacija pola i tipa RCT-a.

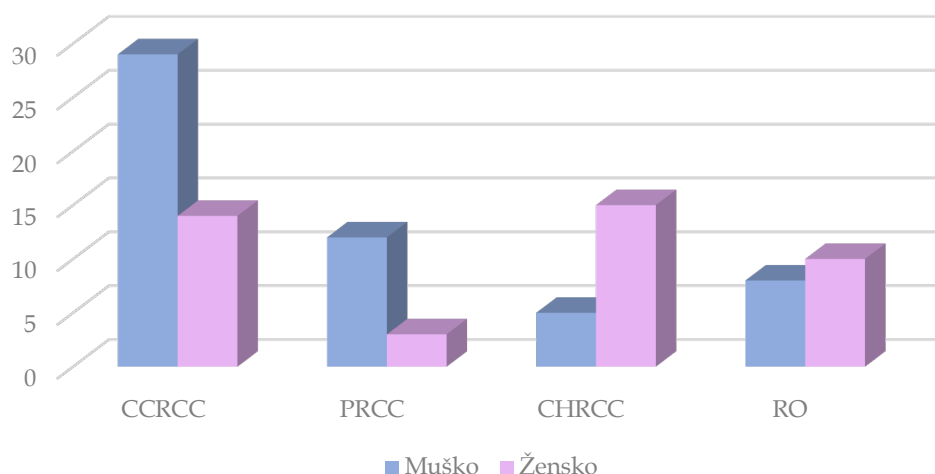
Poređenjem pola i nuklearnog gradusa ccRCC-a po WHO/ISUP-u, rezultati su pokazali da se nuklearni gradus 2 češće dijagnostikovao kod muške populacije, (51,2%) dok je zastupljenost gradusa 4 bila podjednaka kod oba pola (4,7%), grafikon 2. Statistička značajnost nije pronađena ( $p=0.448$ ).

**Tabela 10:** Kliničke i patološke karakteristike kohorti pacijenata sa tri različita mitohondrijalna obrasca bojenja.

Kliničke i patološke karakteristike		Distribucija mitohondrijalnog bojenja			<i>p</i>
		Oskudno, grubo	Umereno granulirano	Difuzno granulirano	
<b>Pol</b> n (%)	<i>muško</i>	28 (51.9 %)	5 (9.3 %)	21 (38.9 %)	p=0.005
	<i>žensko</i>	13 (31.0%)	15 (35.7 %)	14 (33.3 %)	
<b>Godine</b> (prosečne godine ± SD)		60.9 ± 9.0	61.6 ± 8.3	61.2 ± 10.3	p=0.960
<b>Strana tumora</b> n (%)	<i>levo</i>	23 (43.4 %)	9 (17.0 %)	21 (39.6%)	p=0.478
	<i>desno</i>	17 (41.5 %)	11 (26.8%)	13 (31.7%)	
<b>Najveća dimenzija tumora</b> (prosečno mm ± SD)		64.8 ± 36.5	59.8 ±26.2	63.9 ± 34.2	p=0.865
<b>Tip tumora</b> n (%)	<i>Svetloćelijski RCC</i>	41 (95.3 %)	0 (0.0 %)	2 (4.7 %)	p<0.001
	<i>Papilarni RCC</i>	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	15 (100 %)	
	<i>Hromofobni RCC</i>	0 (0.0 %)	20 (100 %)	0 (0.0 %)	
	<i>Onkocitom</i>	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	18 (100 %)	
<b>Nuklearni gradus-ccRCC#</b> n (%)	<i>Niski gradus (NG I. II)</i>	30 (100 %)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	p=0.005
	<i>Visoki gradus (NG III. IV)</i>	11 (84.6 %)	0 (0.0%)	2 (15.4 %)	
<b>T stadijum</b> n (%)	<i>T1a</i>	8 (44.4 %)	4 (22.2 %)	6 (33.3 %)	p=0.764
	<i>T1b</i>	20 (71.4 %)	7 (25.0 %)	1 (3.6 %)	
	<i>T2a</i>	5 (35.7 %)	5 (35.7 %)	4 (28.6 %)	
	<i>T2b</i>	0 (0.0%)	1 (50.0 %)	1 (50.0%)	
	<i>T3a</i>	6 (50.0 %)	3 (25.0 %)	3 (25.0 %)	
	<i>T3b</i>	1 (100.0 %)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	<i>T4</i>	1 (100.0 %)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
<b>Intenzitet ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela</b>	<i>slabo</i>	41 (95.3 %)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	p<0.001
	<i>umereno</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (4.7 %)	
	<i>jako</i>	0 (0.0%)	20 (37.7 %)	33 (62.3 %)	

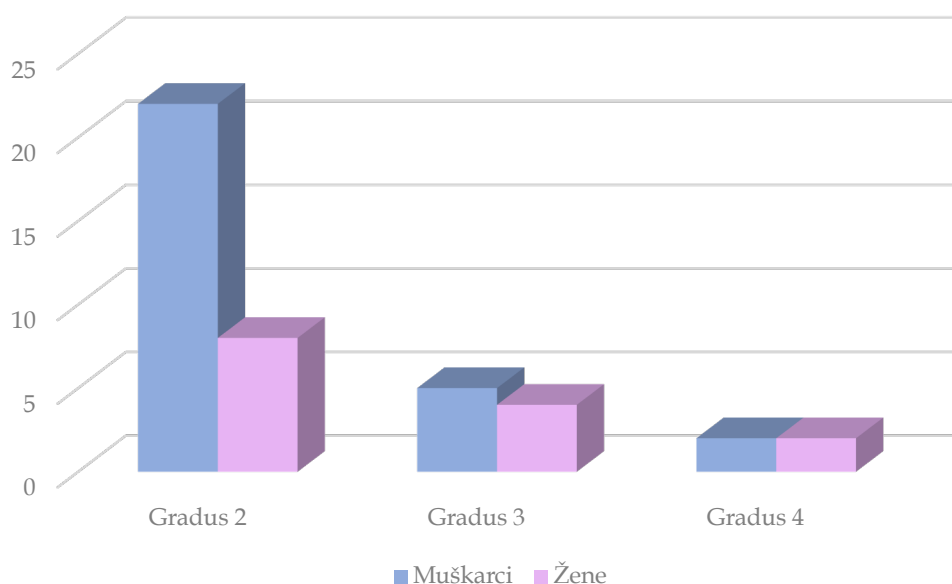
#- nuklearni sistem gradiranja prema WHO/ISUP za ccRCC

## Distribucija RCT-a po polovima



**Grafikon 1:** Prikaz korelacije pola i histološkog podtipa RCT-a.

## Distribucija nuklearnog gradusa po polovima

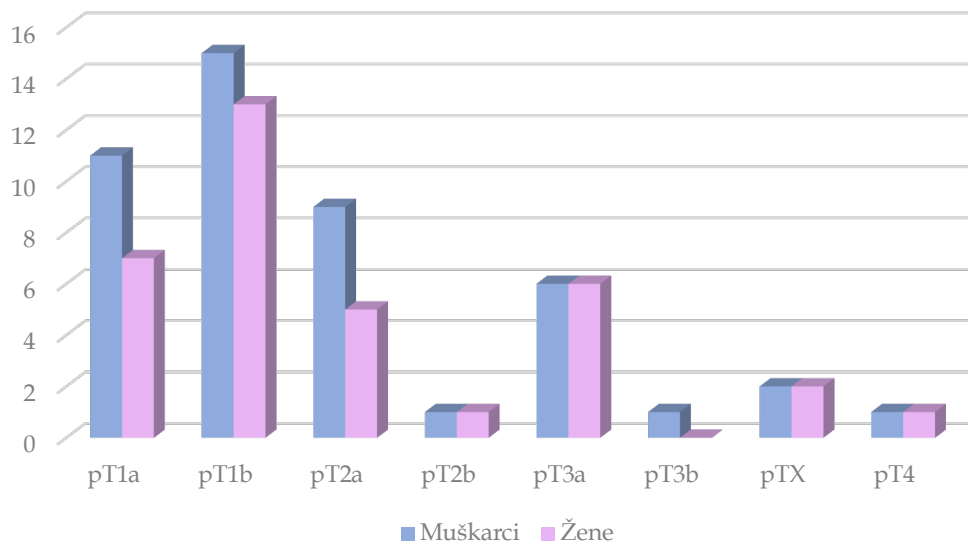


**Grafikon 2:** Prikaz korelacije pola i nuklearnog gradusa ccRCC-a.

Poređenjem histopatološkog stadijuma bolesti i pola, uočeno je da se pT1 (a, b) stadijum najčešće dijagnostikovao, nešto više kod muške populacije (14,1%, 19,2%) u odnosu na žensku populaciju (9,0%, 16,7%), ali bez statističke značajnosti ( $p=0.804$ ), grafikon 3.

Pored distribucije RCT, nuklearnog gradusa i stadijuma bolesti po polovima, sve ispitanike smo po godinama podelili u dve grupe (grupa 1 su bili ispitanici od 40-60 godina starosti, grupa 2 su bili ispitanici od 61-80 godina starosti) i uporedili smo distribuciju RCT, nuklearnog gradusa i stadijuma bolesti po grupama koji su prikazani na grafikonima 4-6.

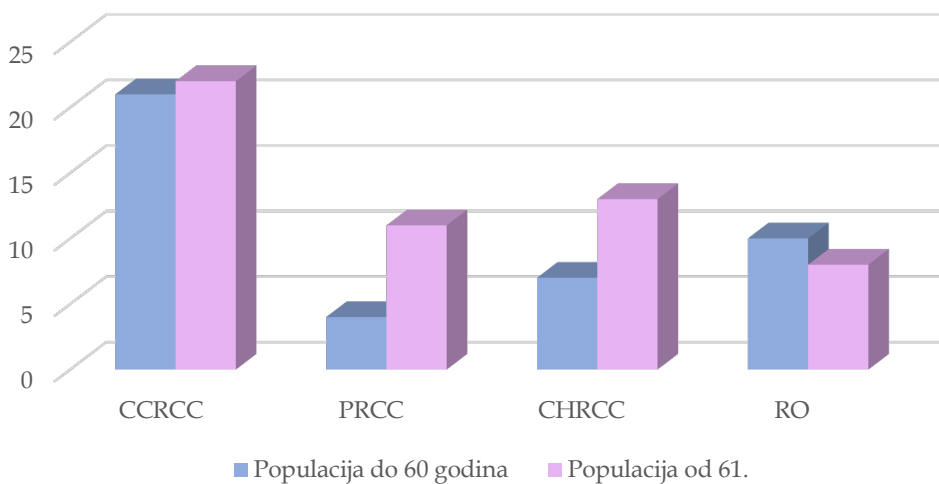
### Distribucija stadijuma po polovima



**Grafikon 3:** Distribucija stadijuma po polovima.

Rezultati su pokazali da je ccRCC bio najzastupljeniji tumor kako u grupi 1 (51,3%), tako i u grupi 2 (46,5%). Nešto učestaliji tipovi RCT u grupi 2 su bili pRCC (19,3%) i chRCC (24,6%), dok je distribucija RO bila podjednako zastupljena, grafikon 4. Statistička značajnost nije uočena ( $p=0.331$ ).

### Distribucija RCT po godinama

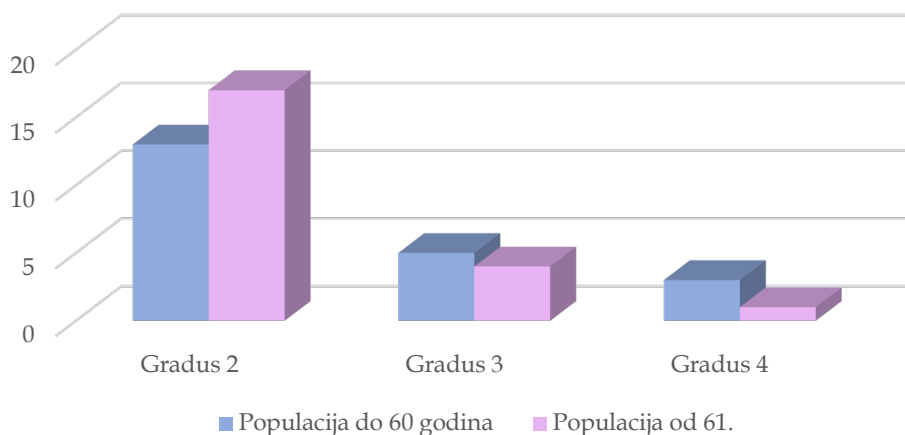


**Grafikon 4:** Distribucija RCT po godinama.

Rezultati distribucije nuklearnog gradusa ccRCC između grupa su pokazali da je nuklearni gradus 2 najčešće dijagnostikovani gradus u obe grupe (grupa 1- 65%, grupa 2- 73,9), učestaliji kod starije grupe ispitanika. Nuklearni gradus 3 je bio podjednako zastupljen između grupa, dok je nuklearni gradus 4 bio zastupljeniji u mlađoj grupi (15%), za razliku od starije (4,3%), grafikon 5. Statistička značajnost nije uočena ( $p=486$ ).

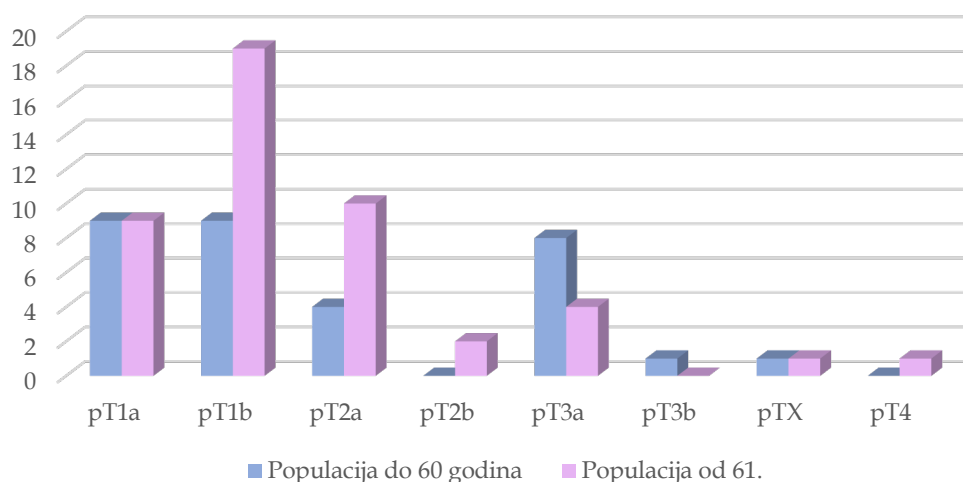
Rezultati distribucije stadijuma bolesti po grupama su pokazali da je pT1b češće dijagnostikovano kod starije grupe, dok su ostali stadijumi relativno podjednako distribuirani između grupa, bez statističke značajnosti ( $p=0.438$ ), grafikon 6.

### Distribucija nuklearnih gradusa ccRCC po godinama



**Grafikon 5:** Distribucija nuklearnih gradusa ccRCC po godinama

### Distribucija stadijuma po godinama



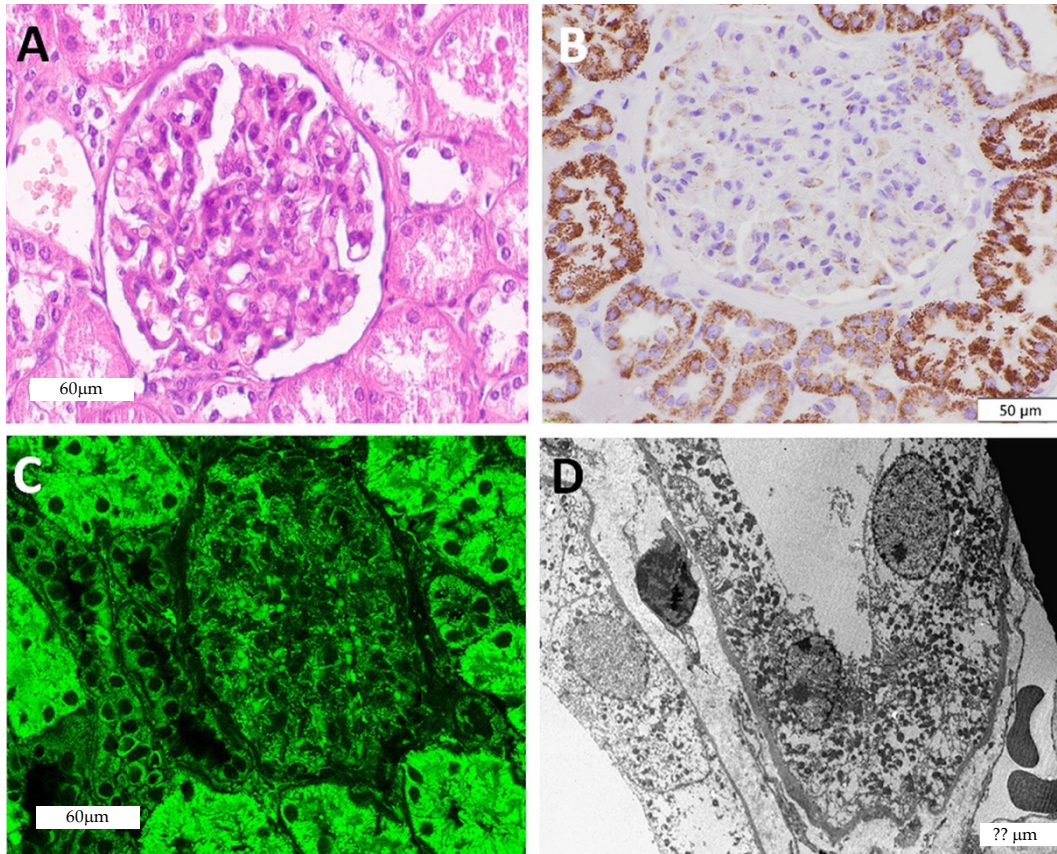
**Grafikon 6:** Distribucija stadijuma po godinama.

## 4.2 EKSPRESIJA MITOHONDRIA ANTITELO AB-2, KLON MTC02

### 4.2.1 Vizuelizacija mitohondrija u uzorcima zdravog bubrega

Zdravo tkivo bubrežnog parenhima prikazano je na slici 20A, obojeno rutinskim H&E bojenjem. Primenjeno Mitochondria antitelo imunohistohemijski i imunofluorescentno, detektuje mitohondrije u proksimalnim i u distalnim tubulima, pokazujući intenzi-





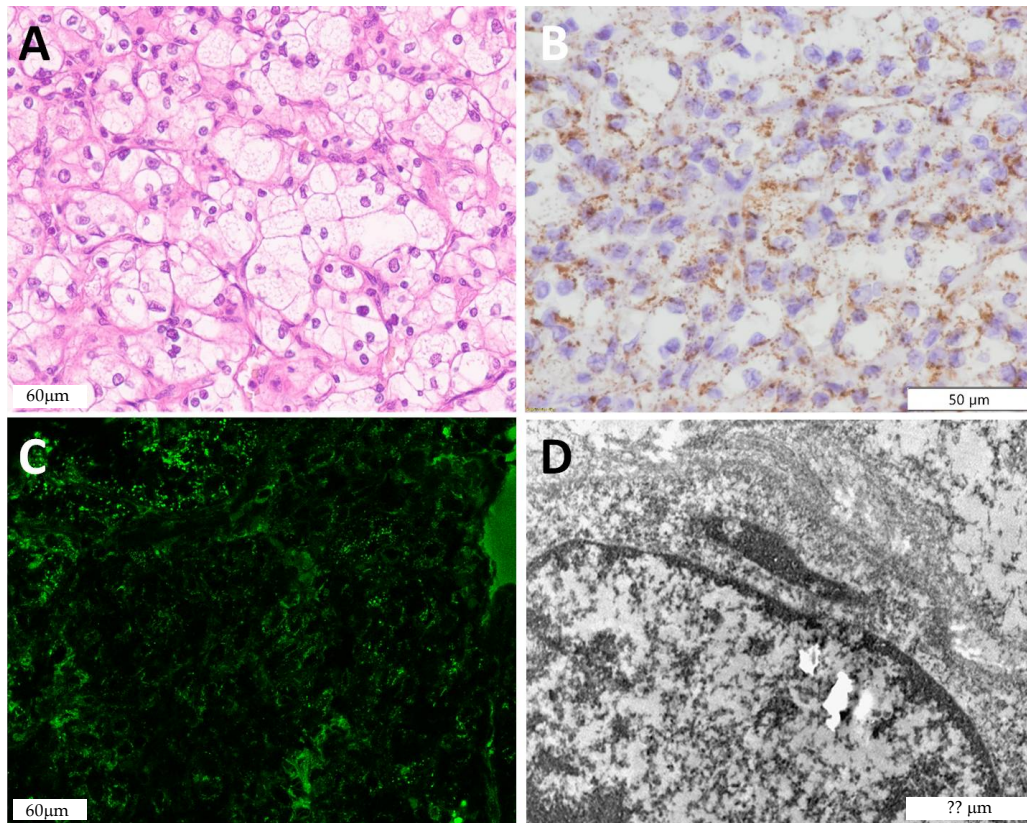
**Slika 20:** Vizualizacija mitohondrija u normalnom bubregu. (A) H&E, (B) IHC (Mitohondrijsko antitelo Ab-2, klon MTC02), (C) IF i (D) TEM mikrofotografija distribucije mitohondrija u normalnom ljudskom bubregu, ilustruje veću gustinu mitohondrija u proksimalnim tubulima nego u distalnim tubulima.

van obrazac granularnog bojenja. Intenzitet imunohistohemijskog bojenja je jači u proksimalnim tubulima nego u distalnim, što je dokazano i elektronskom mikroskopijom. Glomeruli pokazuju odsustvo imunoekspresije anti-mitohondrijalnog antitela (slika 20B,C).

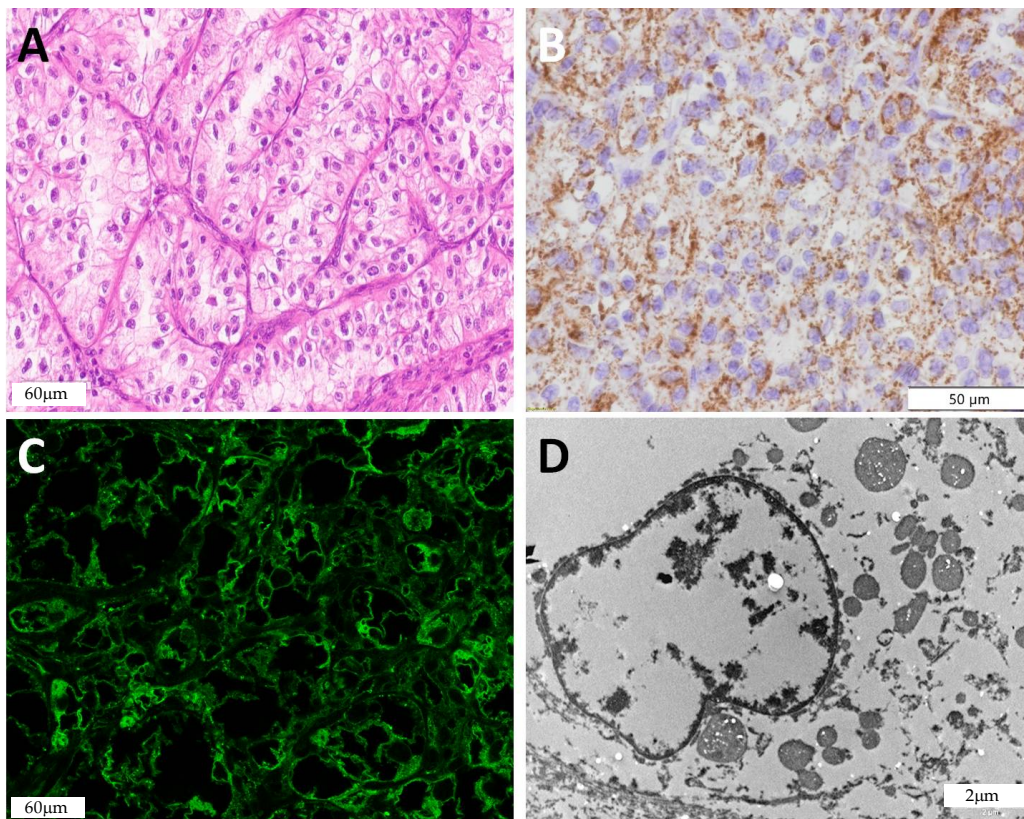
Na TEM mikrofotografiji, urađenoj sa parafinskog kalupa (slika 20D) se uočava veći broj mitohondrija u proksimalnom tubulu, što bi se moglo uporediti sa jačim intenzitetom bojenja dobijenim IHH (slika 20B) i IF (slika 20C) bojenjima.

#### 4.2.2 Ekspresija mitohondrijalnog bojenja u ccRCC

Slika 21 ilustruje morfologiju ccRCC niskog nuklearnog gradusa po WHO/ISUP-u (Slika 21A). ccRCC niskog gradusa odlikuje svetla citoplazma bogata lipidima i glikogenom. Koristeći anti-mitohondrijalno antitelo (Mitochondria Ab-2), grubo i oskudno IHH bojenje se videlo u svim ccRCC. Obojene granule su disperzne i nasumično raspoređene, što može da se vidi na slicu 21B. Na IF su detektovani veoma slabi signali, takođe disperzno raspoređeni (slika 21C). Morfološki, ccRCC sa nižim nuklearnim stepenom i svetlom citoplazmom pokazao je manje mitohondrija otkriveni TEM-om (slika 21D). Ultrastrukturalne karakteristike mitohondrija na TEM-u nismo mogli da analiziramo, zbog neadekvatne fiksacije tkiva, koje je prethodno bilo u parafinskom bloku.



**Slika 21:** Vizuelizacija mitohondrija u ccRCC niskog nuklearnog gradusa (A-D), (A) H&E, (B) IHC (antitelo mitohondrija Ab-2, klon MTC02), (C) IF i (D) TEM mikrofotografije distribucije mitohondrija ilustruju morfologiju i smanjen broj mitohondrija.

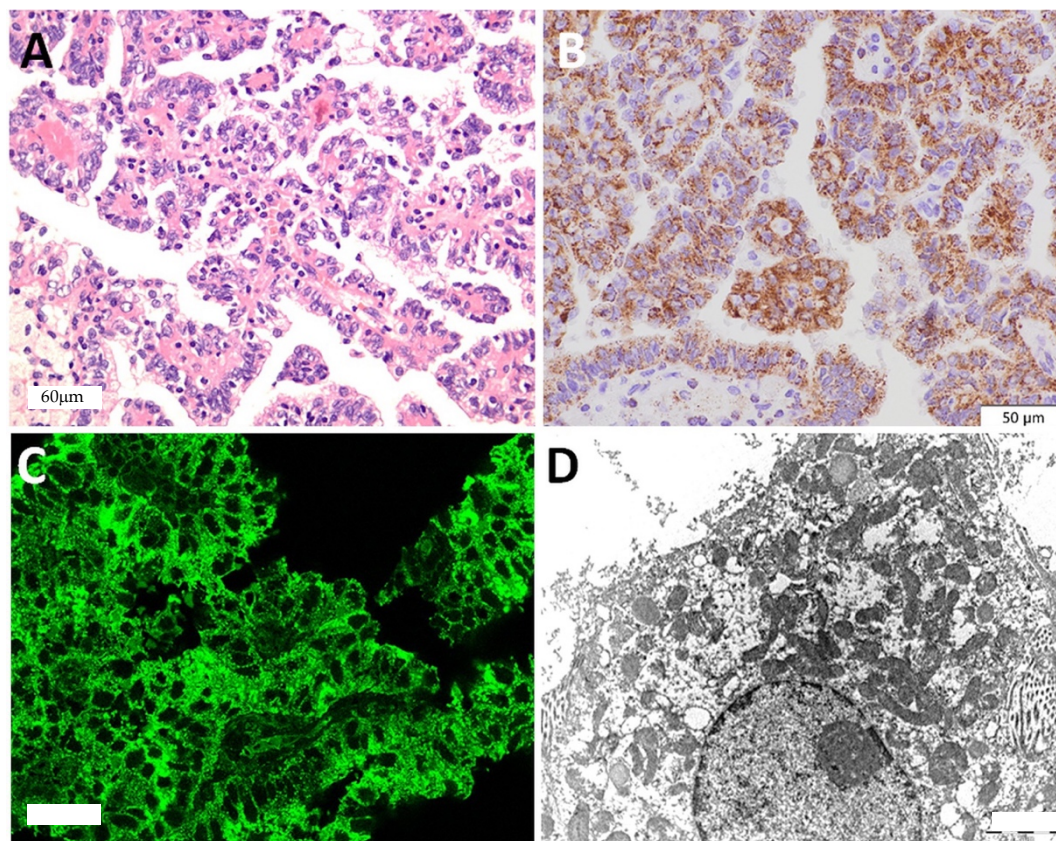


**Slika 22:** Vizuelizacija mitohondrija u ccRCC visokog gradusa (A-D), (A) H&E, (B) IHC (antitelo mitohondrija Ab-2, klon MTC02), (C) IF i (D) TEM mikrofotografije distribucije mitohondrija ilustruju morfologiju i povećan broj mitohondrija.

Slika 22A ilustruje morfologiju ccRCC visokog nuklearnog gradusa po WHO/ISUP-u, koga odlikuje kako svetla tako i eozinofilna citoplazma koja pored lipida i glikogena sadrži i mitohondrije u manjoj meri. IHH analiza je pokazala disperzno, grubo bojenje, intenzivnijeg karaktera u odnosu na ccRCC niskog gradusa (slika 22B). ccRCC sa višim nuklearnim gradusom na imunofluorescenciji je pokazao jači signal, isto disperzno raspoređen (slika 22C). Uprkos povećanim mitohondrijama u ccRCC sa višim nuklearnim stepenom na TEM-u (slika 22D), precizne ultrastrukturne analize nisu mogle da se analiziraju zbog loših rezolucija TEM slika koje predstavljaju posledicu neadekvatne fiksacije tkiva pošto su napravljene od parafinskih uzoraka.

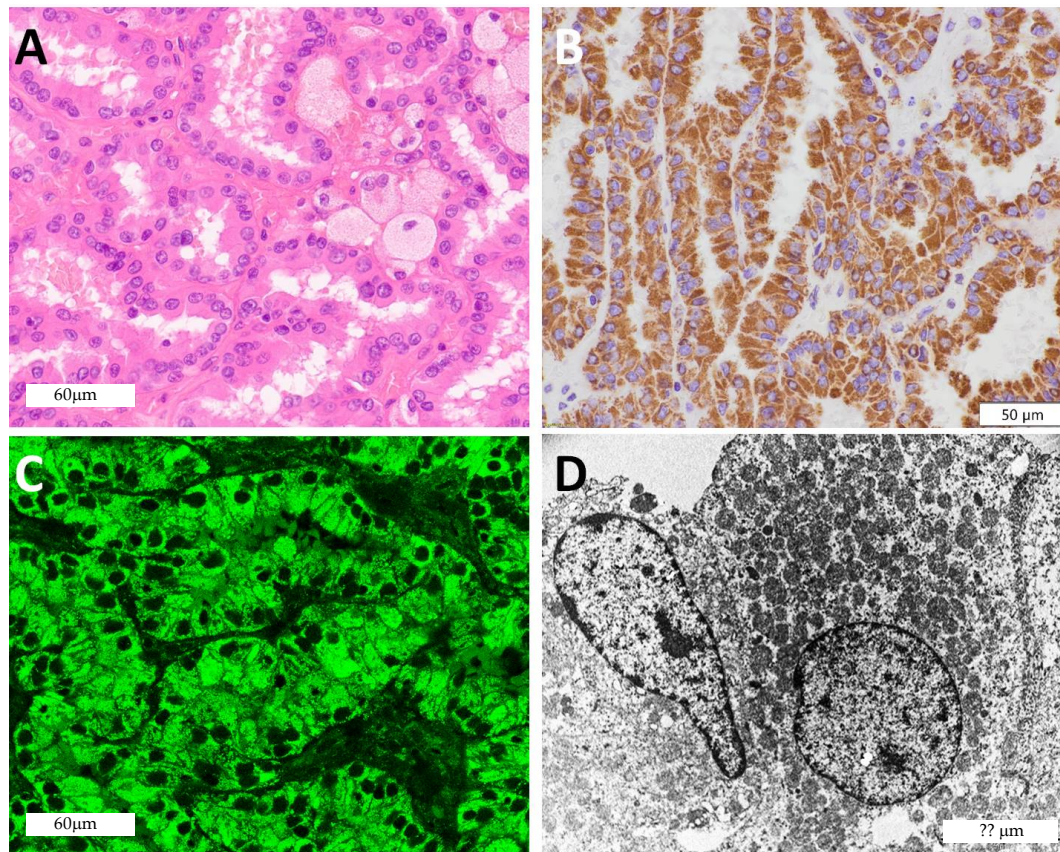
#### 4.2.3 Ekspresija mitohondrijalnog antitela u pRCC

Imunohistohemijska analiza svih dijagnostikovanih pRCC-ova je pokazala difuzan granularan obrazac bojenja. Međutim, u zavisnosti od morfologije pRCC, primećene su male razlike u obrascima ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela. pRCC niskog stepena tj. klasičan tip pRCC po novoj klasifikaciji SZO iz 2022. (definisan kao tip 1 prema prethodnom izdanju klasifikacije SZO iz 2016. godine), prikazan na slici 23A, imao je difuzni granularni uniformni obrazac u čitavoj citoplazmi i na IHH (slika 23B) i IF (slika 23C) slikama. Na TEM slici, takođe može da se uoči ujednačena i disperzna distribucija mitohondrija u citoplazmi, slika 23D.



**Slika 23:** Vizualizacija mitohondrija u pRCC niskog stepena i visokog stepena. pRCC niskog stepena (A-D), (A) H&E, (B) IHC (antitelo na mitohondrije Ab-2, klon MTC02), (C) IF i (D) TEM mikrofotografije distribucije mitohondrija, ilustruju difuzno bojenje mitohondrija, ali sa manje izraženim pERC detektovani apikalni akcenat, (HP-H visok) IHC (Mitohondrijsko antitelo Ab-2, klon MTC02), (G) IF i (H) TEM mikrofotografije distribucije mitohondrija.

pRCC visokog stepena (definisan kao tip 2 prema prethodnom izdanju klasifikacije SZO iz 2016. godine), prikazan na slici 24A, IHH je imao difuzni granularni obrazac sa blagom do umerenom apikalnom akcentuacijom (slika 24B). Na IF slikama, uočava se papilarni obrazac rasta kao i granulirana citoplazma, nešto gušća apikalno. Morfološki, voluminozne eozinofilne ćelije vidljive na optičkoj mikroskopiji (slika 24A) su pokazale tesno upakovane mitohondrije na TEM analizi (slika 24D), pogotovo naglašene apikalno.

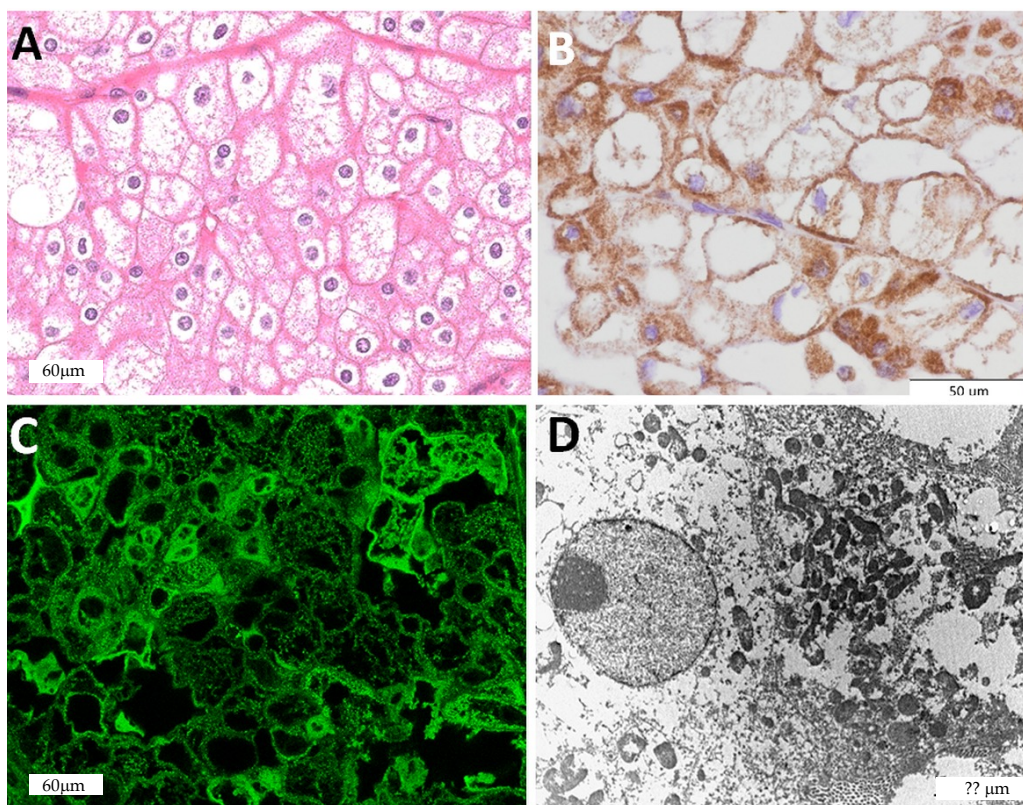


**Slika 24:** Mikrofotografije pRCC, high grade (A) H&E, (B) IHC (antitelo na mitohondrije Ab-2, klon MTC02), (C) IF i (D) TEM, ilustruju difuzno bojenje mitohondrija, sa apikalnom akcentuacijom.

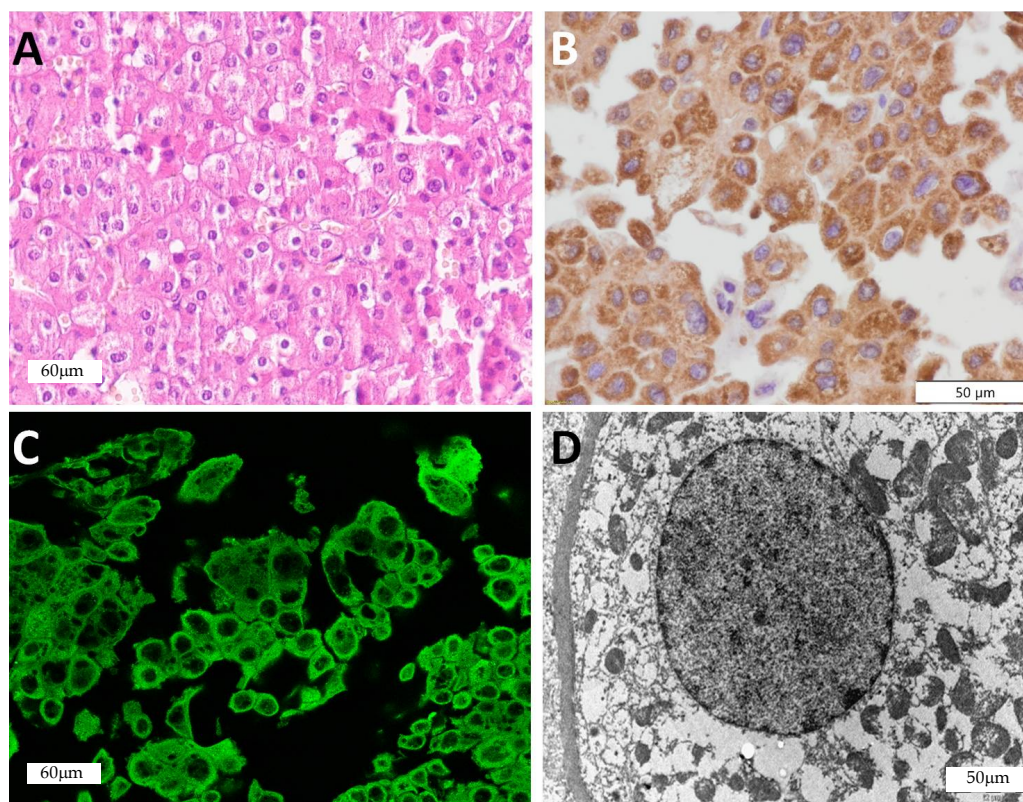
#### 4.2.4 Ekspresija mitohondrijalnog antitela kod chRCC

chRCC se po svojim morfološkim karakteristikama deli na *klasičan tip* koga odlikuju najpre voluminozne ćelije sa svetlom citoplazmom, naglašenih ćelijskih membrana (slika 25A) i *eozinofilnu varijantu* (slika 26A) koja se odlikuje prisustvom ćelija srednje veličine, izrazito eozinofilne citoplazme sa naglašenim perinuklearnim haloom i ćelijskom membranom. chRCC uključeni u našu analizu uglavnom su pripadali eozinofilnoj varijanti, a samo tri slučaja su pripadala klasičnoj varijanti chRCC-a koje su imale i svetlu i eozinofilnu komponentu.

IHH analiza klasične varijante chRCC-a je pokazala umereno, grubo granularno citoplazmatsko bojenje, lokalizovano uglavnom duž ćelijske membrane u voluminoznim, velikim ćelijama, dok se je bojenje u srednjim ćelijama sa eozinofilnom citoplazmom bilo intenzivnije, najvećim delom ekcentrično lokalizovano, tako da su područja oko jedra ostala nebojena, što odgovara prinuklearnom halou (slika 25B). U srednjim ćelijama, pored gru bog citoplazmatskog bojenja, uočeno je fino, disperzno granularno bojenje, sla-



**Slika 25:** Mikrofotografije chRCC- klasična varijanta sa voluminoznim svetlim ćelijama i disperznom citoplazmom (A) H&E bojenje, (B) IHH bojenje (antitelo na mitohondrije Ab-2, klon MTC02), (C)- IF bojenje, (D)- TEM.



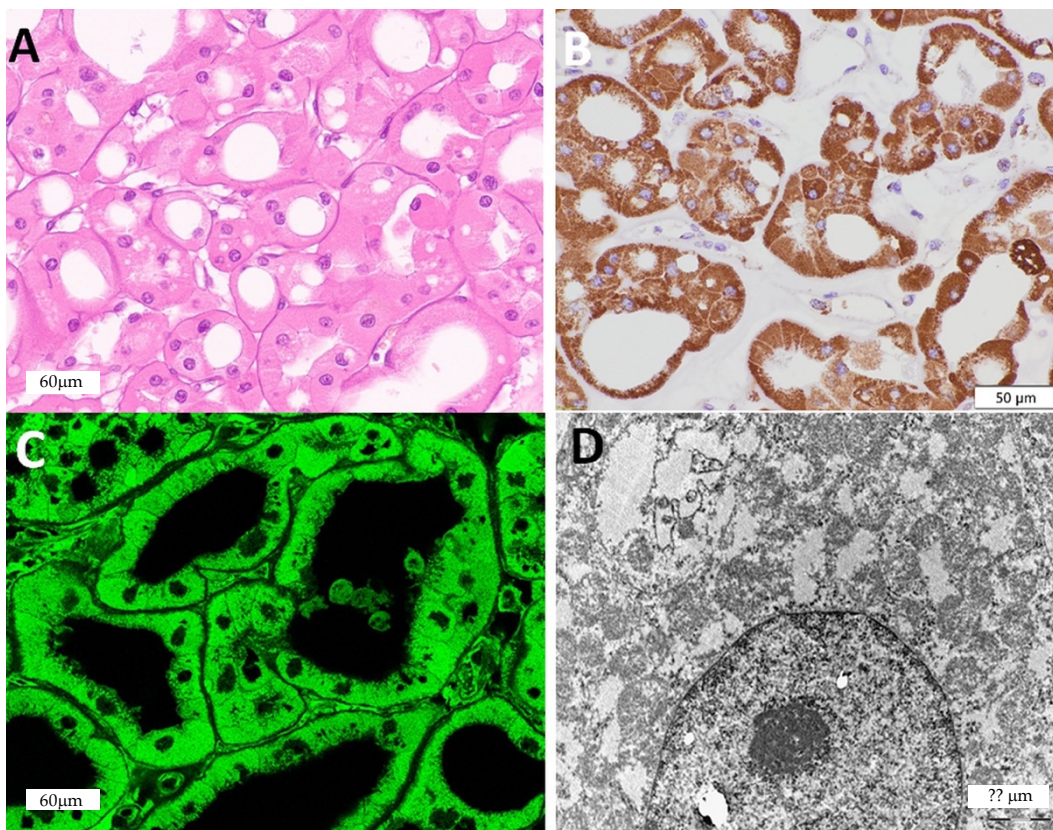
**Slika 26:** Mikrofotografije eozinofilne varijante chRCC (E) H&E bojenje, (F) IHH bojenje (antitelo na mitohondrije Ab-2, klon MTC02), (G) IF bojenje, (H) TEM. Na mikrografijama TEM-a uočava se izražena ćelijska membrana, brojne mitohondrije, ali i mirkovezikule.

bijeg intenziteta. Brojne granule su takođe uočene pomoću IF-a sa heterogenim intenzitetom signala, ali u manjoj meri u poređenju sa IHH bojenjem (slika 25C). Na TEM-u, u citoplazmi se uočavaju brojne mitohondrije, ali i intracitoplazmatke vezikule (slika 25D).

Kod eozinofilne varijante chRCC-a, takođe se uočava izražena ćelijska membrana sa izrazito granuliranom, eozinofilnom citoplazmom. IHH analizom se uočava umereno citoplazmatsko, grubo granulirano bojenje, ali i fino, disperzno granularno bojenje, slabijeg intenziteta (slika 26B). Distribucija bojenja je periferno naglašena, tako da se u većini ćelija detektuje i perinuklearni halo. IF analizom se uočava heterogeni signal, granularnog izgleda, jačeg intenziteta i prašinstog izgleda slabijeg intenziteta (slika 26C). TEM analize su takođe potvrdile distribuciju mitohondrija i omogućile detekciju nekih intracitoplazmatskih mikrovezikula nepoznatog porekla predstavljenih kao bleđe strukture (slika 26D), posebno pronađene u chRCC.

#### 4.2.5 Ekspresija mitohondrijalnog antitela u RO

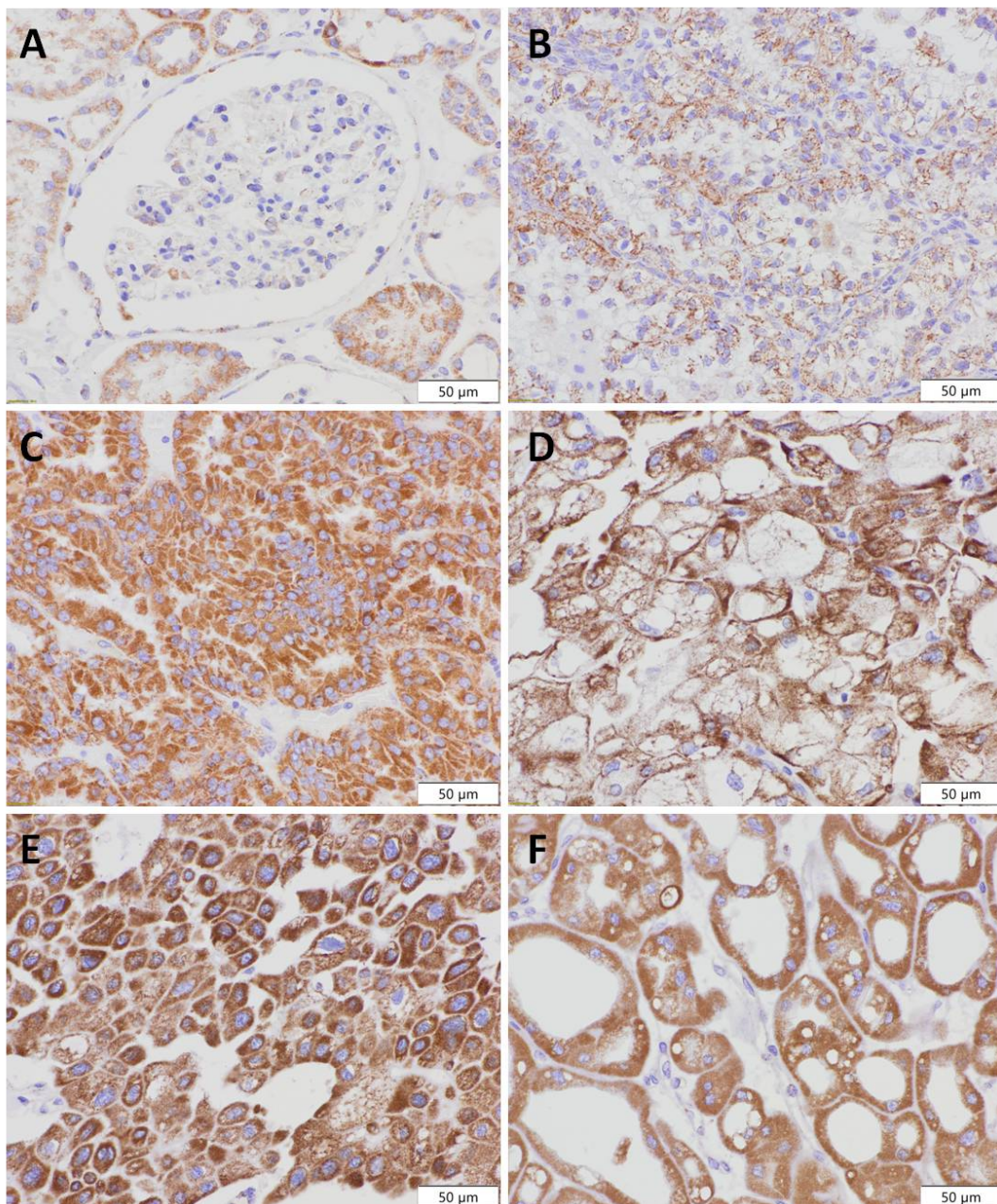
IHH bojenje u RO je bilo difuzno, granularno jakog intenziteta (slika 27B). Isti obrazac je potvrđen IF bojenjem (slika 27C). Imajući u vidu da je elektronska mikroskopija potvrdila da je RO bogat mitohondrijama (slika 27D), naše analize imunološkog bojenja, i IF i IHC, potvrdile su da bojenje anti-mitohondrija može biti specifično i senzitivno za RO. Štaviše, takođe je potvrđeno da je "onkocitna" ćelijska morfologija (slika 27A) jasna posledica brojnih mitohondrija difuzno lokalizovanih unutar citoplazme.



**Slika 27:** Mikrofotografije RO, (A) H&E, (B) IHC (Mitohondrijsko antitelo Ab-2, klon MTC02), (C) IF i (D) TEM, ilustruju mitohondrije koje su distribuirane po čitavoj citoplazmi, bez akcentuacije.

### 4.3 EKSPRESIJA PROHIBITIN ANTITELA

Prohibitin je antitelo koje se vezuje za unutrašnju stranu ćelijske membrane mitohondrija. Na slici 28 se uočava isti obrazac bojenja kao na slikama 21-27. Intenzitet IHH bojenja je nešto slabiji u odnosu na Mitochondria antitelo, distribucija pokazuje izrazita preklapanja, dok je IF bojenje istog intenziteta i obrasca signala. Kod zdravog bubrega, uočava se jači intenzitet bojenja u proksimalnim tubulima nego u distalnim. Na slici 28B, kod ccRCC visokog gradusa, grub, granulirani obrazac bojenja je periferno akcentuiran, ali oskudan. Kod pRCC niskog gradusa, je prisutna uniformna granulirana ekspresija antitela dok se kod pRCC visokog gradusa uočava granulirana ekspresija sa apikalnom akcentuaci-



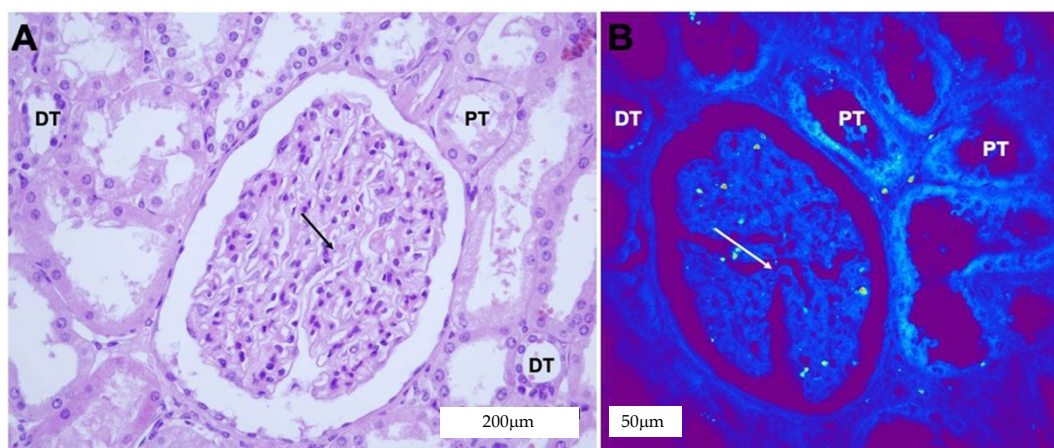
**Slika 28:** Mikrofotografije Prohibitin antitela na uzorku (A) zdravog bubrežnog parenhima, (B) ccRCC high grade, (C) pRCC high grade, (D-E) chRCC klasična i eozinofilna varijanta i (F) RO.

jom, slika 28C. ChRCC klasična i eozinofilna varijanta pokazuju jači intenzitet bojenja u odnosu na bojenje Mitochondria Ab-2 klonom, ali je obrazac bojenja isti. U RO je intenzitet bojenja slabiji u odnosu na Mitochondria Ab-2 klon sa istim obrazcem bojenja. Razlog razlike je nestandardizacija protokola bojenja, s obzirom da se ovaj klon koristio samo kao kontrola.

## 4.4 NELINEARNA SKENIRAJUĆA MIKROSKOPIJA

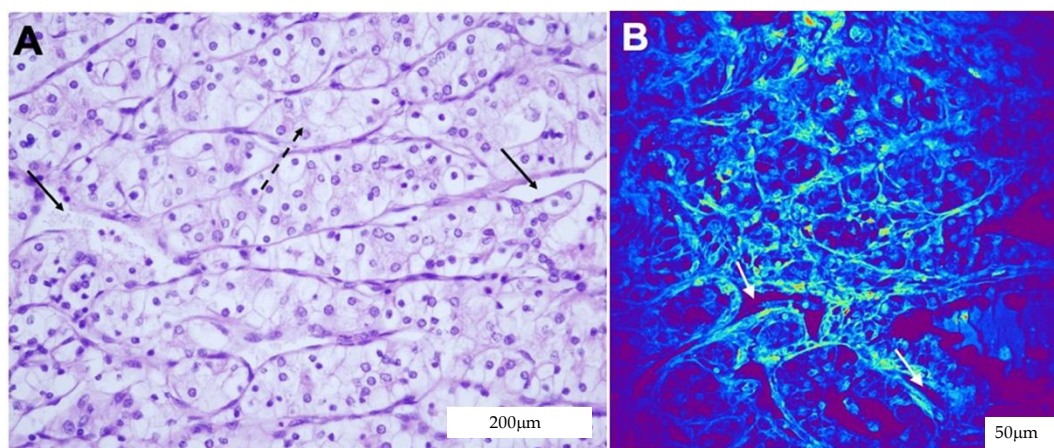
### 4.4.1 TPEF vizuelizacija zdravog bubrežnog parenhima

Na slici 29A uočava se zdravo tkivo bubrežnog parenhima, bojeno standardnim H&E bojenjem, koga čine glomerularno klube (centralno postavljeno na slici) oko koga se nalaze proksimalni i distalni tubuli (PT- proksimalni tubul; DT- distalni tubil). Na TPEF slikama (slika 29B) uzorka zdravog bubrežnog parenhima jasno se vizualizuje glomerularno klube, kao i tubuli, što može da se upoređi sa slikom A.



**Slika 29:** Bubrežni parenhim (A) hematoksilin-eozinom, svjetlosna mikroskopija. Glomerul (crna strelica) je vidljiv u centralnom delu slike, okruženo proksimalnim (PT) i distalnim tubulima (DT); (B) TPEF slika - Glomerul (bela strelica) i tubuli (PT, DT) su upoređivi i dobro prepoznati na neobojenim TPEF slikama.

### 4.4.2 TPEF vizuelizacija ccRCC



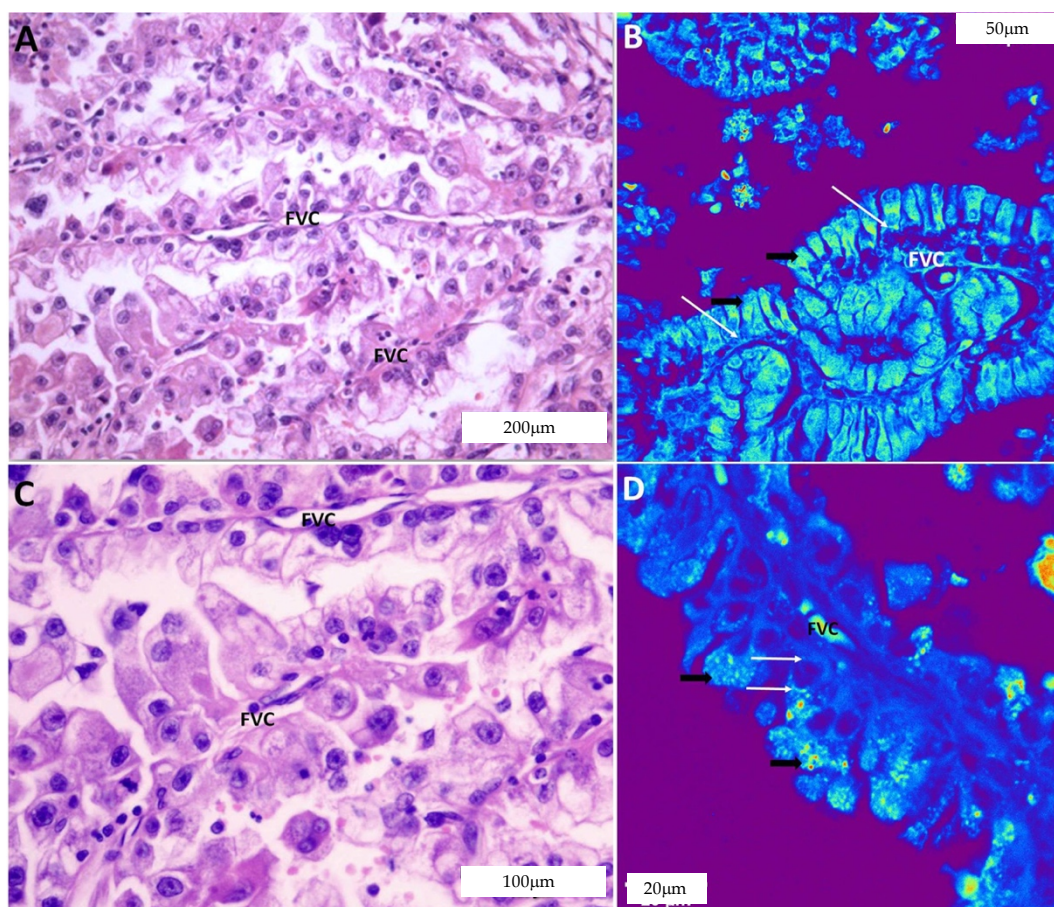
**Slika 30:** CcRCC (A) H&E, svjetlosna mikroskopija. Tumorske ćelije formiraju alveolarne strukture okružene delikatnom fibrovaskularnom mrežom, označene crnom strelicom. Ćelije su okrugle do ovalne, sa umerenim jedarnim pleomorfizmom. (B) TPEF- Vidljiv je alveolarni obrazac rasta tumorskih ćelija, sa debelim fibroznim septama koje ga okružuju. Ćelijska membrana nije jasno definisana između ćelija. TPEF signal iz cito-



plazme tumorske ćelije je nizak u većini ćelija. Jedra su različitih veličina, pretežno ekscentrično locirana i vide se kao svetle regije. Vaskularni prostori su označeni belom strelicom.

Na slici 30A je prisutno tkivo ccRCC, na H&E bojenom preparatu, u kome se uočavaju ćelije svetle citoplazme, umerenog jedarnog pleomorfizma koje grade alveolarne strukture (isprekidana crna strelica na slici 30A), okružene delikatnom fibrovaskularnom mrežom (crna strelica na slici 30A). TPEF slike uzoraka ccRCC (slika 30B) pokazuju alveolarni/acinarni obrazac rasta tumorskih ćelija. Jedra su varijabilne veličine i pretežno ekscentrično locirana, koje se vide kao relativno svetle regije zbog jačeg TPEF signala. TPEF signal iz citoplazme tumorske ćelije je nizak u većini ćelija. Čelijska membrana je slabo prepoznatljiva i tumorske ćelije su okružene tankim fibrovaskularnim septama i mrežom malih krvnih sudova (bela strelica na slici 30B).

#### 4.4.3 TPEF vizuelizacija pRCC

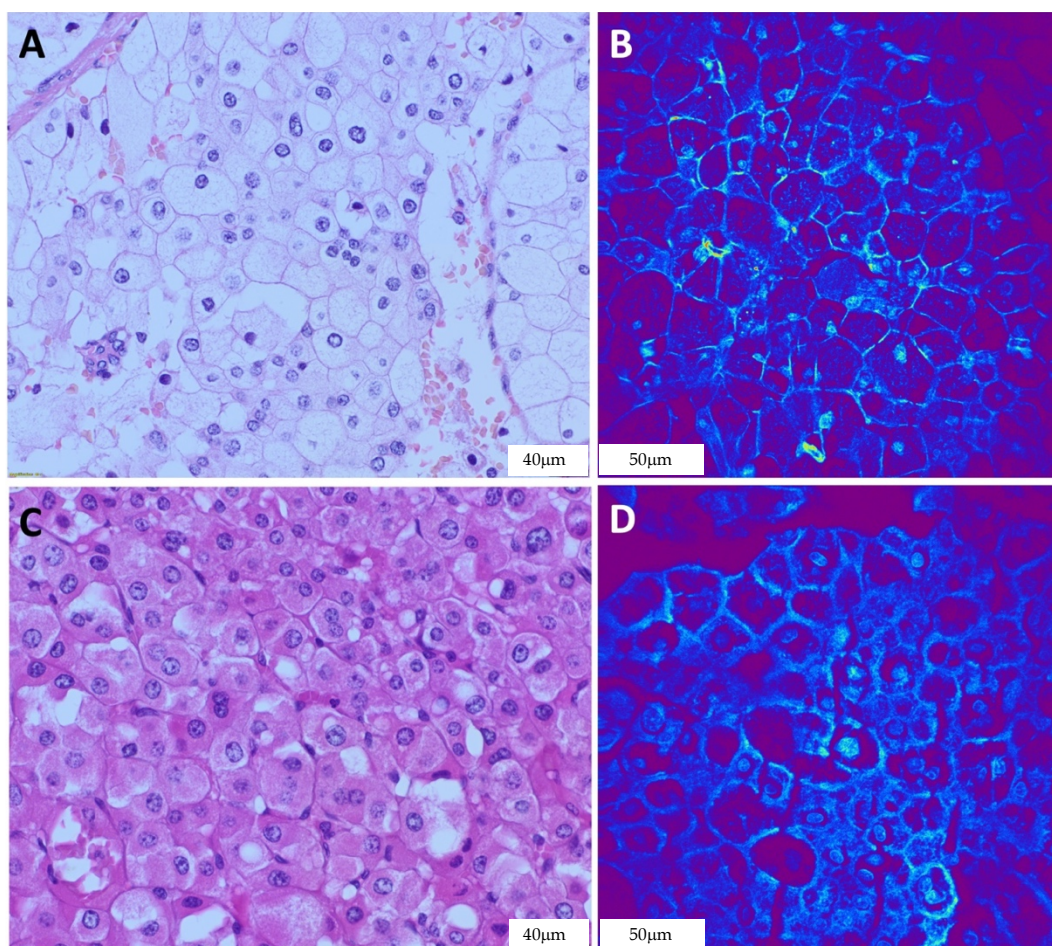


**Slika 31:** pRCC na H&E bojenom preparatu (A, C), svetlosna mikroskopija. Tumorske ćelije formiraju papilarne strukture sa fibrovaskularnom peteljkom. Na TPEF slikama (B, D) vide se papilarne formacije sa tankom fibrovaskularnom peteljkom, obložene cilindričnim ćelijama. Najjači TPEF signal se detektuje apikalno u citoplazmi tumorskih ćelija, granuliranog izgleda. Blagi do umereni TPEF signal se vidi u perinuklearnom regionu. FVC - fibrovaskularno jezgro; crne strelice - tačkasti signali u apikalnoj citoplazmi; bele strelice - blagi perinuklearni TPEF signali.

Na H&E bojenom preparatu pRCC čine ćelije eozinofilne citoplazme, umerenog do izraženog jedarnog pleomorfizma koje grade papilarne formacije, a čija je osnova fibrovaskularna peteljka (Slike 31A,C). U fibrovaskularnoj peteljci se često vide penušavi makrofagi. Pored makrofaga, može da budu prisutna i psamozna telašca, kao i hemosiderin (30).

Na TPEF slikama (slika 31B,D) se uočavaju papilarne strukture, sa fibrovaskularnom osnovom i ćelijama cilindričnog izgleda. U ćelijama se uočavaju dva signalna obrasca: 1) TPEF signal sa više autofluorescence, apikalno akcentuiran u citoplazmi, i 2) blagi do umereni signal duž jedra i bazalno. Signal je zrnastog karaktera. Jedra su identifikovana kao regioni sa slabim signalom, i na slici B i D se vide kao tamna područja (slike 31 B,D).

#### 4.4.4 TPEF vizuelizacija chRCC



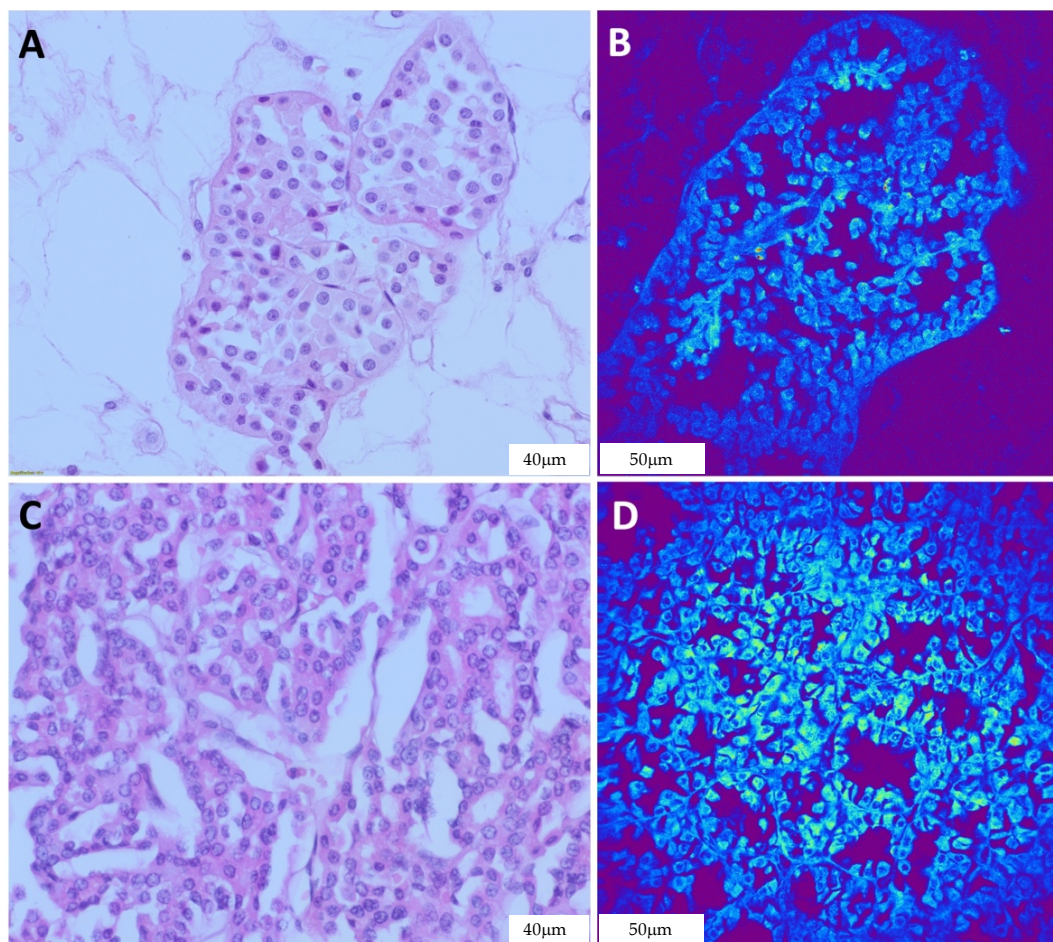
**Slika 32:** chRCC klasična varijanta (A) bojenje hematoksin-eozinom, svetlosna mikroskopija, eozinofilna varijanta (C). TPEF slike (B) chRCC, klasična varijanta, i eozinofilna varijanta (D). Skala na slikama A i B su 400 µm i 50 µm, respektivno.

U klasičnoj varijanti chRCC-a, na H&E bojenim pločicama uočavaju se dva tipa ćelija: velike, voluminozne ćelije svetle, prašinate citoplazme, naglašene ćelijske membrane koje grade solidna polja (slika 32A) i ćelije srednje veličine, eozinofilne, granulirane citoplazme. Perinuklearni halo je prisutan, ali nije naglašen. U eozinofilnoj varijanti chRCC-a (slika 32C), ćelije su srednje veličine, izrazito eozinofilne, granulirane citoplazme sa perinuklearnim haloom. Na svim analiziranim TPEF slikama chRCC dobijenim NLM-om može se uočiti izraženo naglašena ćelijska membrana i jak TPEF signal u jedrima, koji se vide kao centralno lokalizovana svetla područja (slike 32 B,D). Perinuklearni halo se uglavnom vidi u ćelijama srednje veličine. Na slici 32D ćelije su uniformnije, srednje veličine, naglašene ćelijske membrane, perinuklearni halo je izraženiji, s obzirom da je eozinofilna varijanta chRCC slikana. TPEF signal u citoplazmi je

je jači u ćelijama srednje veličine, u odnosu na voluminozne koje se vide kao tamna područja.

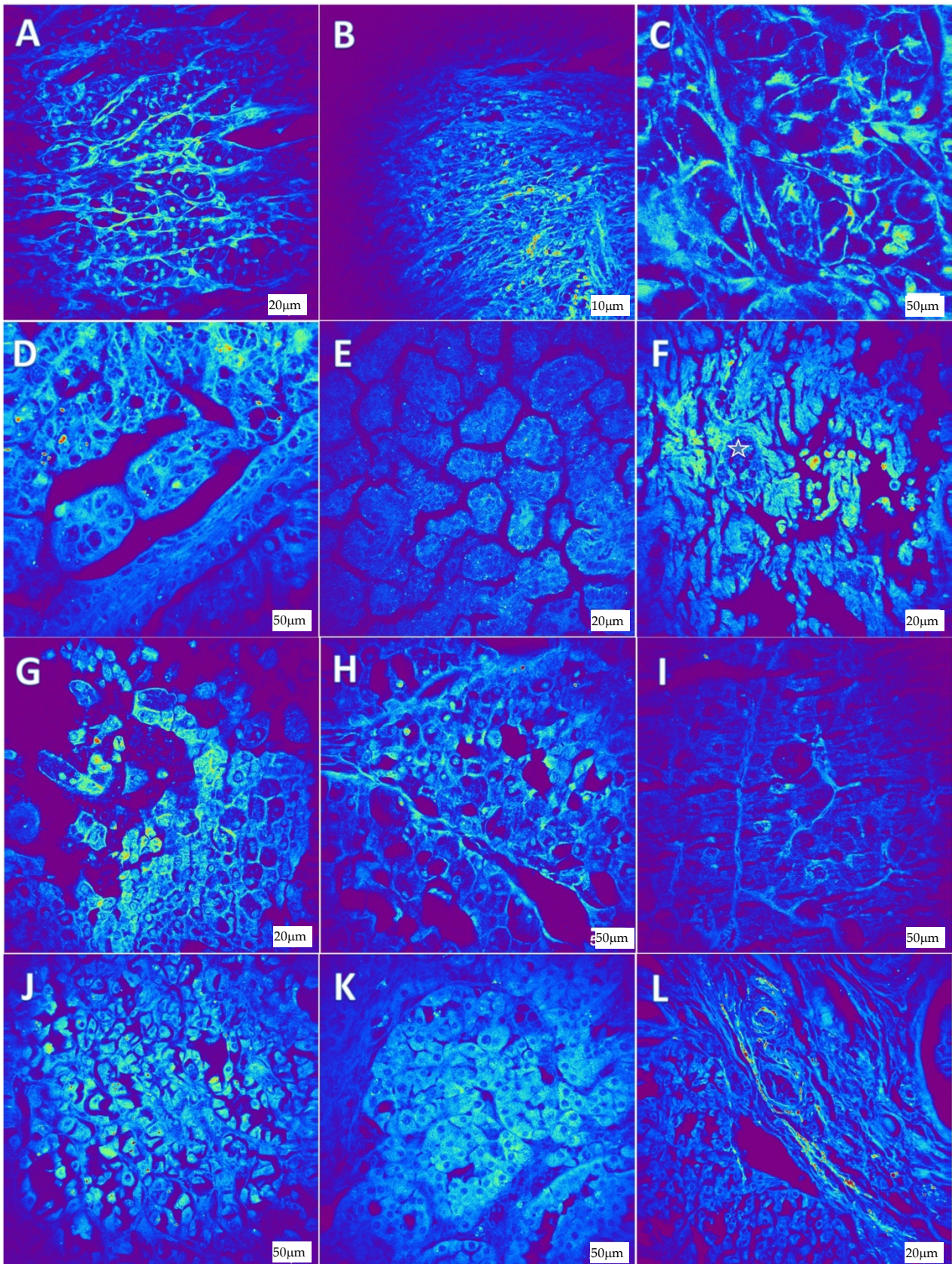
#### 4.4.5 TPEF vizuelizacija RO

RO čine ćelije sa eozinofilnom granularnom citoplazmom. Morfologija može biti veoma varijabilna formirajući solidna gnezda smeštena u hipocelularno vezivno tkivo, kao što se vidi na slici 33A ili trabekularnog izgleda, prikazano na slici 33C. Tubularni i delom solidni obrazac se uočava na TPEF slikama. Za razliku od drugih tipova tumora izuzev pRCC, izmerili smo nizak signal (tj. tamne regije na TPEF slikama) u jedrima (slika 33B).



**Slika 33:** RO (A, C) bojenje hematoksilin-eozinom, svetlosna mikroskopija. Tumorske ćelije sa eozinofilnom, granularnom citoplazmom. TPEF slike (B, D) na kojima se uočavaju ćelije uglavnom uniformnog izgleda sa jakim TPEF signal u citoplazmi i slabim signalom u jedrima pa se jedra vide kao tamne regije.

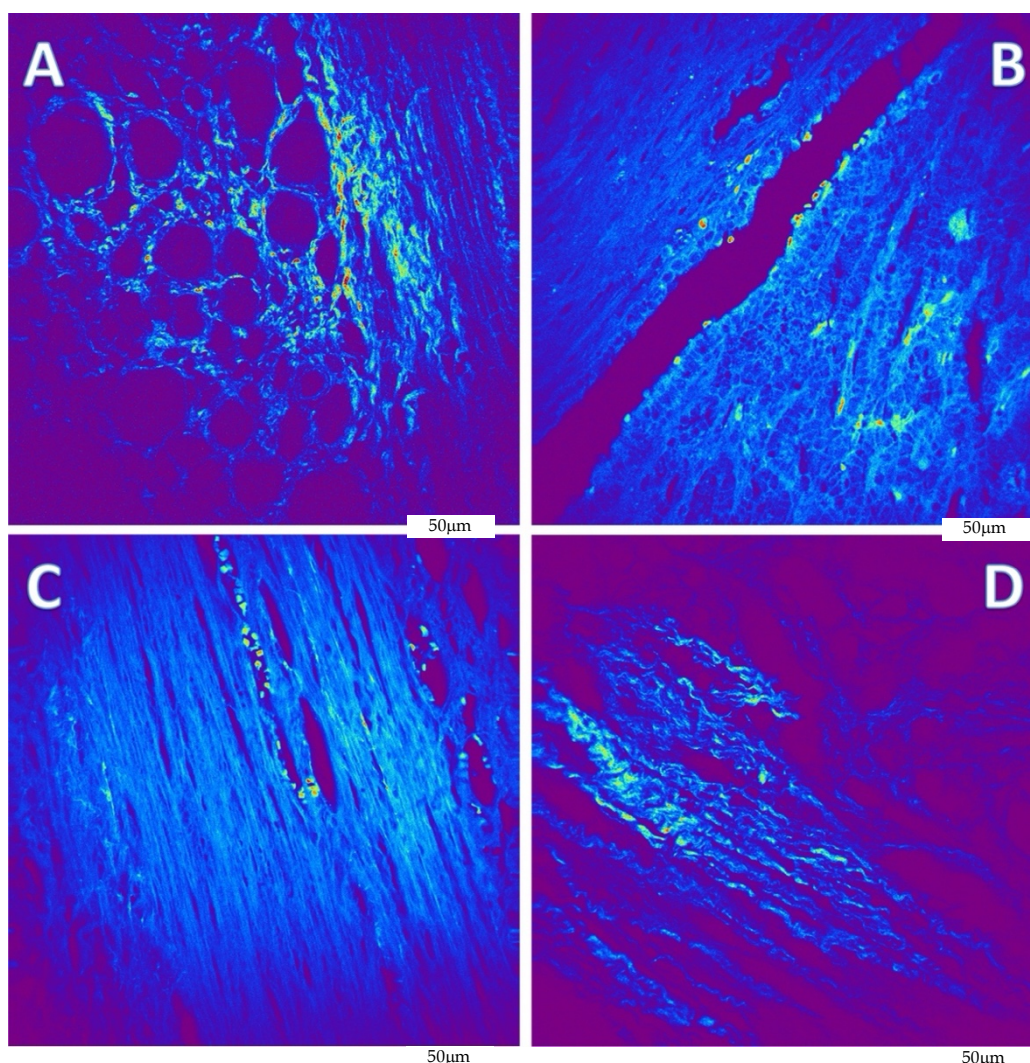
Na slici 34 se nalazi po još tri uzorka od svakog podtipa RCT-a. Bez obzira na morfološku heterogenost tumora, TPEF signal zadržava opisane karakteristike i po tome mogu da se razlikuju podtipovi RCT-a.



**Slika 34:** TPEF slike podtipova RCT-a - (A) ccRCC niskog nuklearnog gradusa, (B) ccRCC visokog nuklearnog gradusa sa sarkomatoidnom diferencijacijom, (C) ccRCC visokog nuklearnog gradusa. (D-E)- pRCC visokog nuklearnog gradusa, (F)- pRCC niskog nuklearnog gradusa sa vidljivim penušavim makrofagima u fibrovaskularnom jezgri, obeležen belom zvezdicom. (G-I)- chRCC, (J-K) RO sa različitim obrascem rasta i (L)-RO sa delom fibrozne kapsule koja okružuje tumor, a prazni prostori unutar kapsule predstavljaju vaskularne prostore.

#### 4.4.6 SHG za vizuelizaciju kolagena u tumorima bubrega i kapsuli

Primenom SHG metode, detektovali smo kolagensku mrežu koja pruža veoma dinamičnu podršku, kako u bubrežnom parenhimu tako i u i pored tumora (slika 35A). Zbog samog prisustva tumora, narušena je struktura okolnog bubrežnog parenhima, koja se najčešće viđa kao fokalna fibroza intersticijuma, dok glomeruli mogu da budu sklerotično izmenjeni. Stepenn izemenjenog bubrežnog parenhima zavisi od veličine tumora i dužine trajanja bolesti. Na istoj slici se uočava i deo tumorske kapsule koju čine tanka do umereno debela kolagena vlakna, pravilno organizovana. Količina i organizacija kolagena varira između različitih tipova od tumora bubrega. Mogu da se vide kao talasasta vlakna ili kao debela, gusto pakovana kolagena vlakna. Takođe, varijacije, dominantno u količini kolagena postoje između različitih pacijenata sa istim podtipom tumora (73). SHG signal u pRCC je detektovan u vidu veoma tankih kolagenih niti u fibrovaskularnoj osnovi. Vlakna su detektovana i u kapsuli koja okružuje tumor, paralelno organizovana, gusto pakovana.



**Slika 35:** SHG - A) U bubrežnom parenhimu pored tumora uočavaju se kolagena vlakna u intersticijumu koja okružuju tubule i krvne sudove. U gornjem desnom uglu uočava se deo tumorske kapsule. (B) U pRCC, pored detekcije finih kolagenih vlakana u fibrovaskularnoj osnovi, uočava se i debela kapsula koju čine organizovana kolagena vlakna. (C) U kapsuli oko pRCC, kolagena vlakna su debela, uglavnom paralelna i uredno organizovana. Izdužen tamni prostori obloženi kolagenim vlaknima predstavljaju intrakapsularne krvne sudove. (D) Kolagena vlakna koja okružuju tumorske ćelije i nemaju urednu organizaciju koja se vidi u kapsuli.

U kapsuli takođe mogu da se vide intrakapsularni krvni sudovi, okruženi pravilno organizovanim snopovima kolagena (slika 35 B, C). U ccRCC, SHG signal je bio jak: kolagen je organizovan u mreže oko gnezda tumorskih ćelija, u vidu talasastih snopova (slika 35D), u ovom slučaju dijagnoza je bila ccRCC, nuklearni gradus II, ali je tumor bio malih dimenzija (<4 cm), akcidentalno pronađen, na rutinskoj kontroli. S toga se može zaključiti da SHG-om mogu da se detektuju kako mlada, tek formirana kolagena vlakna tako i kolagena vlakna kod uznapredovalih tumora koji su otkriveni kasnije i koji su većih dimenzija.

## 5 DISKUSIJA

Po literaturnim podacima iz sveta (3) karcinom bubrega se češće javlja kod muške populacije nego kod ženske. Analiza podataka o incidenci raka širom sveta za godine 1978–2007. pokazala je da je odnos incidencije slučajeva kod muškaraca/žena bio 2:1 i bio je konstantan prema starosti, godini i regionu (110). Analiza baze podataka o nadzoru, epidemiologiji i krajnjim rezultatima (engl. *The Surveillance, Epidemiology, and End Results - SEER*) za godine 2001–2016. pokazuje sličnu stopu kod muškaraca, pri čemu je stopa incidencije prilagođena uzrastu dvostruko veća od one kod žena u SAD (111). Podaci iz globalnih vitalnih registara otkrili su porast od 23,04% u starosnoj standardizovanoj incidencije raka bubrega u periodu od 1990. do 2013. godine širom sveta, što je odgovaralo porastu od 31,19% kod muškaraca, u poređenju sa 8,79% kod žena (112).

Prema Globalnoj opservatoriji za rak: „Cancer Today” (<https://gco.iarc.fr/todai/home>, septembar 2021. godine), procenjena stopa incidencije karcinoma bubrega standardizovana po starosti u 2020. godini u svetu bile su 4,6 za oba pola, odnosno 6,1 za muškarce i 3,2 za žene. Centar za statistiku raka Američkog društva za rak prijavio je stope incidencije (prosečna godišnja stopa na 100.000, starost prilagođena standardnoj populaciji SAD-a iz 2000.) od 16,9 za oba polova, odnosno 22,9 za muškarce i 11,7 za žene, za period od 2013–2017. godine (<https://cancerstatisticscenter.cancer.org/>, septembar 2021.). Evropski informacioni sistem o raku (<https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>, septembar 2021.) registrovao je stopu incidencije za 2020. godine (prosečna godišnja stopa na 100.000, prilagođena starosnoj grupi) za Evropu od 18,4 za oba pola, odnosno 25,9 za muškarce i 12,5 za žene.

Statistički podaci naših uzoraka po pitanju pola su u korelaciji sa podacima iz sveta. Od ukupno 96 uzoraka pacijenata koji su bili deo istraživanja, 54 pacijenta je pripadalo muškom polu (56,25%). Statistička značajnost nije pronađena ( $p=0.005$ ), ali to može da se objasni malim uzorkom za analizu. Iako u našem istraživanju nije pokazana statistička značajnost u starosnoj dobi, postoji korelacija sa podacima iz svetske literature, gde se navodi da su prosečne godine za pojavu karcinoma bubrega između 65-te i 74-te godine života (113), a naši rezultati pokazuju srednju vrednost godina  $61.6 \pm 8.3$ , što se poklapa sa literaturom.

Brojne svetske studije su pokazale da je ccRCC najčešći karcinom od svih histoloških podtipova RCT-a. U našem istraživanju postoji statistička značajnost između podtipova RCT-a ( $p<0.001$ ) gde je najučestaliji podtip ccRCC (95.3%) što je u korelaciji sa literaturnim podacima.

Fateh i saradnici su u njihovom istraživanju pokazali da je dominantno zahvaćena strana bubrega tumorom bila desnostrana (32/59) (114), što se razlikuje od naših podataka koji pokazuju dominantno zahvaćenu levu stranu bubrega tumorom (53/96), pri čemu za dva uzorka nismo imali podatak o strani. Ni kod Fateh i saradnika, a ni kod nas nema statističke značajnosti koja se odnosi na stranu bubrega zahvaćenu tumorom. Razlog je najverovatnije posledica nedovoljnog broja ispitanika u uzorku. Veličina tumora u našem istraživanju nema statističku značajnost jer nismo korelirali sa 5-ogodišnjim preživljavanjem.

Prema bazi podataka multicentričnog *Collaborative Research on Renal Neoplasms Association* (CORONA), na uzorku od 6234 pacijenta (3751 muškaraca i 2483 žena), ženama

se češće dijagnostikovao ccRCC (82,4% naspram 78,6%;  $p < 0,001$ ) i chRCC (5,2% prema 3,5%;  $p = 0,001$ ), dok se muškarcima češće dijagnostikovao pRCC (9,7% prema 15,2%;  $p < 0,001$ ) (115). I druge studije su pokazale slične rezultate, čak i na manjem uzorku (116,117).

Naši rezultati su pokazali da je ccRCC češće dijagnostikovano u muškoj populaciji ( $p < 0,002$ ) što je suprotno literaturnim podacima, dok se rezultati učestalosti dijagnostikovanja pRCC-a i chRCC-a poklapaju sa svetskom literaturom, gde je pRCC dominantno češće dijagnostikovano kod muškaraca, a chRCC kod žena. RO prema literaturi se češće dijagnostikuje kod muške populacije (118), dok naši rezultati pokazuju sličnu učestalost dijagnostikovanja RO između polova ( $m=8,3\%$ ,  $ž=10,4\%$ ). Naše istraživanje je pokazalo da većina dijagnostikovanih tumora pripada pT1 a i b stadijumu (46/96), što govori u prilog boljoj prognozi i petogodišnjem preživljavanju (119,120), s obzirom da literaturni podaci navode da je petogodišnje preživljavanje kod pacijenata u stadijumu I (pT1) 90–95%, u stadijumu II (pT2) 75–85% u stadijumu III (pT3) 60–70%, a u stadijumu IV (pT4) 20–30% (121,122).

Prema literaturnim podacima (123,124) stadijum pT1 je najčešće dijagnostikovano stadijum u odnosu na druge stadijume, što se poklapa sa našim rezultatima. Uvidom u literaturu nismo našli rezultate koji se odnose na poređenje nuklearnog gradusa, tipu tumora i stadijum bolesti u odnosu na godine podeljene po grupama kao što je prikazano u rezultatima. Iako statistička značajnost nije uočena u našim rezultatima, a što je najverovatnije posledica nedovoljnog broja ispitanika, uočili smo da se pT1b stadijum češće dijagnostikovao u starijoj populaciji ( $> 60$  godina), a pT3 (a i b) kod mlađe populacije ( $< 60$  godina). Nuklearni gradus 2 ccRCC-a je najčešće dijagnostikovano gradus i kod mlađe i starije grupe, ali je nuklearni gradus 4 daleko češće dijagnostikovano kod mlađe grupe. Svi navedeni rezultati govore da kod mlađe populacije, životne i radne navike kao i kasni odlasci kod lekara imaju veliki uticaj na stadijum bolesti.

Poznato je da klasični ccRCC i low grade pRCC imaju specifične karakteristike koje omogućavaju da se morfološki lakše razlikuju. Glavni izazovi i dalje ostaju u razlikovanju eozinofilne varijante chRCC i RO zbog svojih morfoloških preklapanja, pogotovo kada se dijagnoza postavlja na H&E bojenim pločicama. Zbog toga se već decenijama koriste dodatne dijagnostičke metode, kao što su IHH, HH bojenje, TEM i molekularno profilisanje. Osim što su ove metode dugotrajne i zahtevaju različitu fiksaciju tkiva, imaju i dodatna ograničenja.

Uzimajući u obzir važnost kvaliteta IHH bojenja iz parafinskih blokova, IHH bojenje u velikoj meri zavisi od adekvatnosti preanalitičke faze, kao što su procedure fiksacije tkiva, kao i uspostavljanje protokola bojenja, balansiranje između peroksidaze i blokade proteina, procedure preuzimanja antigena, klonovi antitela, njihova razblaženja antigen-antitela reakcija. Stoga, rezultati IHH bojenja i njihova interpretacija ponekad mogu biti izazovni za patologe (125,126). Ovo se prevashodno odnosi na to kada visoko specijalizovane patohistološke laboratorije primaju uzorke prethodno fiksirane i ukalupljene u parafinske blokove iz drugih ustanova, jer ne postoji jedinstven način za standardizaciju i uspostavljanje protokola (126). Ovaj problem se odnosi i na standardne H&E bojene pločice iz drugih ustanova, a koje se konsultativno evaluiraju, ukoliko patolog nije siguran u dijagnozu.

Između ostalog, neadekvatan odnos hematoksilina i eozina mogu da navedu na pogrešnu dijagnozu. Zbog nestandardizovane i varijabilne pripreme parafinskih blokova



među laboratorijama, kao što su različiti rastvori za fiksiranje, trajanje parafinske obrade, itd., dalji postupci bojenja pločica sa tkivima mogu dovesti do lažne negativnosti ili čak nespecifične pozitivnosti u IHH (126). Ukoliko preanalitička priprema tkiva nije adekvatna, HH bojenja takođe mogu da pokažu lažnu negativnost ili nespecifičnost. Na primer, HH bojenje kao što je Haleovo koloidno gvožđe, koje se često koristi za diferencijaciju između benignog tumora kao što je RO i malignog tumora kao što je chRCC, može da pokaže lažnu negativnost u chRCC i da se time postavi pogrešna dijagnoza zbog neadekvatnog bojenja (28,127). Štaviše, tumori bubrega sa fokalnim promenama sličnim mucinu, kao što su onkocitomi i papilarni tumori bubrega, mogu biti blago do umereno obojeni Haleovim koloidnim gvožđem. Dakle, tumori bubrega sa ekstenzivnim karakteristikama sličnim hromofobnim ćelijama mogu predstavljati diferencijalno dijagnostički problem sa chRCC kada se patohistološka dijagnoza zasniva na HH bojenju (128). U tom slučaju, TEM je zlatni standard za razlikovanje ovih vrsta tumora.

Prema literaturnim podacima, tumorske ćelije RO su ispunjene brojnim mitohondrijama koje daju granulirani, eozinofilni izgled citoplazme. Mitohondrije su tesno pakovane u citoplazmi i njihova veličina je veća od onih u chRCC. Pored mitohondrija, mogu da budu prisutne i rasute mikrovezikule čiji broj varira od ćelije do ćelije, ali su jako retke ako su prisutne. Kod chRCC, izgled citoplazme koja je takođe eozinofilna i granulirana, zavisi kako od broja i oblika mitohondrija, tako i od broja mikrovezikula kojih je mnogo više nego u RO. Njihova distribucija može biti difuzna ili lokalizovana ekscentrično u citoplazmi (129,130).

TEM se ne koristi široko u svakodnevnoj praksi, jer zahteva posebno obučene tehničare i patologe, a i sama oprema je veoma skupa, i troškovi servisa i amortizacije nisu zanemarljivi [23]. Takođe je važno koristiti adekvatnu proceduru fiksacije za TEM jer se svi potrebni fini ultrastrukturni detalji kao što su kriste mitohondrija i mikrovezikule ne mogu interpretirati na TEM slikama dobijenim iz parafinskih blokova, kao što smo primetili u našim rezultatima. Na našim TEM slikama koji su rađeni iz parafinskih blokova smo mogli samo da vizuelizujemo prisustvo mitohondrija, njihov broj, lokalizaciju i delimično njihov oblik, ali nismo mogli da vidimo sve pomenute važne detalje njihove strukture, kao što je prisustvo lamelarnih cristi u mitohondrijama RO (129), dok se u chRCC-u vide tubulovesikalne kriste. Razlika koje se još uočava na TEM-u kod adekvatno fiksiranih uzoraka između eozinofilne varijante chRCC-a i RO je u gustini matriksa između mitohondrija, gde je kod RO matriks izrazito gust sa lamelarnim kristama u mitohondrijama dok se u eozinofilnoj varijanti chRCC-a vide lamelarne kriste u mitohondrijama, ali matriks nije gust i kondenzovan (131). Na našim TEM uzorcima, zaista se ne vidi lamelacija kristi u mitohondrijama, ali vidi se razlika u broju i može da se uoči gustina matriksa u RO. Da bi se TEM koristio u dijagnostičke svrhe u uropatologiji, uzorak tumora bubrega treba čuvati u odgovarajućem fiksativu.

Pored standardnih H&E i HH pločica i rutinski korišćenog širokog spektra IHH antitela i TEM analize, mnogi autori su istraživali upotrebu i korisnost različitih anti-mitohondrijalnih antitela, s obzirom da je glavna ultrastrukturna diferencijacija RTC zasnovana na ovim razlikama ćelijskih organela detektovanim pomoću TEM-a u glavnim tipovima RCT. Stoga, su Mete i saradnici, koristili anti-mitohondrijalno antitelo (AMA, NeoMarkers), izveštavajući da je obrazac imunoreaktivnosti uglavnom bio difuzan u RO, dok je u većini chRCC bio difuzan, ali periferno naglašen; stoga su predložili veoma visoku osetljivost (96%) i specifičnost (94%) AMA bojenja za diferencijaciju chRCC od RO

(132). Ozcan i saradnici su takođe pokazali da sa AMA anti-mitohondrijalno antitelo, RO može da se razlikuje od chRCC-a po distribuciji bojenja sa naglašavanjem da se kod oba tipa tumora uočava difuzno granularno bojenje, s tim da je u chRCC-u sa bojenje sa perifernom akcentuacijom i grubo je granulirano, dok je u RO bojenje difuzno, ali fino granulirano (133). Slično tome, Kuroda i sarad. su detektovali mitohondrije MIA antitelom (Biogenek) gde su prikazali da se u eozinofilnoj varijanti chRCC uočava jaka i difuzna imunopozitivnost, ali bez opisa obrasca bojenja (134). Tickoo i sarad. opisuju difuznu i fino granularnu imunopozitivnost antimitohondrijalnog antitela 113-1 u svim ispitivanim RO dok se u chRCC-u uočava periferna akcentuacija grubih citoplazmatskih granula. Drugi eozinofilni i granularni podtipovi tumora uglavnom su pokazivali nepravilno grubo granularno i difuzno bojenje (135).

U našoj studiji koristili smo dva mitohondrijska antitela (mitohondrijalno antitelo Ab-2, klon MTC02 i prohibitinsko monoklonsko antitelo, II-14-10, MA5-12858). Rezultati korišćenjem mitohondrijalno antitelo Ab-2 su pokazali prisustvo difuznog, fino granularnog citoplazmatskog bojenja u svim analiziranim RO. U svim analiziranim chRCC-u je primećena umerena citoplazmatska imunopozitivnost, uglavnom periferno lokalizovana, pri čemu se uočavaju dva tipa granulacije. Gruba granulacija, izraženijeg intenziteta bojenja i fina granulacija slabijeg intenziteta bojenja. U analiziranim uzorcima ccRCC, u većini slučajeva primećeno je grubo, oskudno citoplazmatsko bojenje. Međutim, sa povećanjem nuklearnog gradusa i prisustvom eozinofilne citoplazme u ccRCC-u, uočili smo povećanu ekspresiju anti-mitohondrijalnog bojenja. Obrazac bojenja je isti kao i u ccRCC nižeg nuklearnog gradusa. Svi analizirani uzorci pRCC-a su pokazali difuzan, granularni IHH obrazac bojenja. U svim pRCC niskog gradusa, granularno citoplazmatsko bojenje je bilo difuzno, ravnomerno distribuirano. U pRCC visokog gradusa, smo uočili dvostruk obrazac bojenja: intenzivna gruba citoplazmatska granuliranost lokalizovana apikalno, i blaga do umereno fina citoplazmatska granuliranost lokalizovana oko jedra i bazalno. Bojenje Prohibitin antitelom u svim analiziranim uzorcima je pokazala isti obrazac citoplazmatskog bojenja, samo slabijeg intenziteta u odnosu na gore opisani klon. Time naši rezultati, koji su u skladu sa literaturnim podacima, pokazuju da bez obzira na klon koji se koristi, mitohondrijska antitela mogu biti uključena u standardni IHH panel za diferencijaciju RCT-ova, jer mogu pružiti dodatne informacije za preciznu dijagnozu. Uzimajući u obzir da se primenom iglene biopsije savetuje primena što manjeg broja antitela u cilju postavljanja adekvatn patohistološke dijagnoze, u slučaju eozinofilnih tumora, antimitohondrijalno antitelo može da bude veoma korisno.

Kao što je poznato, imunofluorescencija se rutinski široko koristi u netumorskoj patologiji bubrega, prevashodno za dijagnostiku glomerulopatija (136-139). Imunofluorescencija može da se primenjuje kako na zamrznutom tako i na tkivu ugrađenom u parafin (140,141). Poslednjih godina, IF je počela da se koristi u dijagnostici tumora pankreasa, prostate, kolorektalnog karcinoma kao metoda koja je precizna, brza i pouzdana (142-145). Međutim, njegove mogućnosti nisu u potpunosti istražene u dijagnostici tumora bubrega.

Phung i sarad. su koristili imunofluorescentnu konfokalnu mikroskopiju u cilju detekcije zdravog tkiva bubrega i tumora. Pokazali su da primenom akridin oranž boje, (engl. *acridine orange*) koja se vezuje za nukleinske kiseline, mogu da se obeleže jedra u tumoru i na taj način da se detektuje povećana celularnost i jedarna heterogenost u odnosu na normalan parenhim bubrega (146). U drugoj studiji, Su i sarad. su pokazali da *ex vitro*

primenom konfokalne mikroskopije mogu da se razlikuju strukture kako u normalnom bubrežnom parenhimu tako i u tumoru (147). Uzimajući u obzir da se najistaknutije ultrastrukturne razlike između najčešćih tipova RCT-a oslanjaju u najvećoj meri na broj i obrazac distribucije mitohondrija koje je dokazano TEM-om, po našim saznanjima, do sada nije ispitivano prisustvo mitohondrija u tumorima bubrega primenom imunofluorescentne konfokalne mikroskopije u cilju potencijalne diferencijacije između različitih podtipova RTC-a. U našem istraživanju, svi uzorci su bojeni sa oba anti-mitohondrijalna antitela i analizirani konfokalnom mikroskopijom.

Komparativno sa IHH bojenjem, u ccRCC-u niskog gradusa se nisu detektovale mitohondrije, ali su se strukturalno uočavale kohezivne tumorske ćelije različite veličine. Kod ccRCC-a visokog gradusa, mitohondrije su se vizuelizovale, ali su bile oskudne i dispergovane. Kod pRCC-a, niskog gradusa, pored jasne vizuelizacije papilarne strukture, u tumorskim ćelijama su se vizuelizovale mitohondrije koje su bile ravnomerno distribuirane. Kod pRCC visokog gradusa mitohondrije su detektovane u čitavoj citoplazmi sa apikalnom akcentuacijom. Između chRCC i RO se takođe uočila razlika u distribuciji i broju mitohondrija. U odnosu na IHH bojenje kod chRCC, pogotovo eozinofilne varijante, gde se uočio dvostruki intenzitet bojenja, intenzivniji, grubo granuliran i manje intenzivan, fino granuliran obrazac bojenja, na IF se vidi samo gruba granuliranost, periferno naglašena. U odnosu na ultrastukturalne karakteristike chRCC-a vizuelizovane TEM-om, u citoplazmi chRCC-a koja je bogata mitohondrijama su prisutne i mikrovezikule, nepoznatog porekla (39). To objašnjava dvostruki intenzitet bojenja na IHH-u, gde su fino obojene granule, manjeg intenziteta bojenja mikrovezikule, a grube granule, jačeg intenziteta mitohondrije.

U RO, mitohondrije se vide kao fine granule koje difuzno ispunjavaju čitavu citoplazmu. Na ovaj način smo pokazali slaganje između IF rezultata i rezultata dobijenih imunohistohemijskim bojenjem, koji opisuje obrasce bojenja mitohondrija u različitim tipovima RCT-a. Uočene razlike, u pogledu prisustva i distribucije mitohondrija, potvrđene su TEM-om sa parafinskih kalupa. Svi ovi podaci sugerišu da bi primena jednog antitela mogla da pomogne u brzom i preciznoj dijagnozi, izbegavajući primenu širokog i skupog IHH panela koji se trenutno koristi za diferencijaciju RCT-a. IF analiza se ne koristi široko u rutinskoj dijagnostici bubrežnih neoplazmi jer priprema i evaluacija imunofluorescentnih slika zahteva stručnost. Međutim, pripravniku nije potrebno mnogo vremena (148). Štaviše, standardni *ex tempore* H&E patohistološki pregled nije uvek tačan i precizan, s obzirom na to da sveže smrznuti uzorci tkiva nemaju očuvanu morfologiju. Dakle, ovaj tip nefiksiranog sveže zamrznutog uzorka tkiva omogućava visoku osetljivost i visoku specifičnost u procedurama IF bojenja, omogućavajući jasno pozicioniranje, upotrebu više antitela i lepo bojenje (142,149-152), što dovodi do brze i precizne identifikacije mitohondrija i na taj način omogućava brzo postavljanje precizne dijagnoze. Brzo postavljanje precizne dijagnoze je uglavnom korisno za diferencijaciju kada kliničke, radiološke i morfološke karakteristike mogu biti slične kod benignih i malignih tumora, kao što su RO i chRCC.

Tokom poslednje decenije, nelinearna (multifotonska) mikroskopija se koristi za otkrivanje različitih tipova tumora kao što su urotelni karcinom, prostatični karcinom, karcinom dojke i kolorektalni karcinom itd. (153-158). Posebno zanimljivo polje istraživanja su tumori bubrega zbog njihovog morfološkog preklapanja na H&E slajdovima, posebno između pojedinih podtipova tumora bubrega kao što su chRCC i RO. Jain i sarad. su u svojoj studiji pokazali da se NLM može koristiti za: 1) razlikovanje

neoplastičnog od zdravog tkiva bubrega koristeći sveže tkivo, i 2) identifikaciju tipova tumora na osnovu njihovog TPEF signala, sa tačnošću od 95% (74). U drugoj studiji, Jain i saradnici su istraživali mogućnost razlikovanja RO od chRCC na parafinskim blokovima pri subćelijskoj rezoluciji, koristeći isti metod. Rezultati dobijeni korišćenjem NLM zasnovani su na pronalaženju granula u oba tipa tumora, za koje se činilo da se razlikuju na osnovu njihove veličine, oblika, citoplazmatske distribucije i talasnih dužina autofluorescencije. Za RO i chRCC, prijavljene su visoke dijagnostičke tačnosti od 100% i 83,3% (159). Tan i sarad. su koristili NLM u kombinaciji sa harmonikom druge generacije (engl. *Second harmonic generation* - SHG) za detekciju kolagena koji se sastavni deo kapsule tj. pseudokapsule kada se radi parcijalna nefrektomija ili enukleacija tumora, zbog linija resekcije (73). Vu i sarad. su pomoću NLM-a detektovali granule u citoplazmi koje su koristili dalje u različitim statističkim programima kao što je ROC za predikciju između chRCC-a i RO. Specifičnost i senzitivnost su bili oko 80% (160). Best i sarad. su u svom istraživanju ispitivali organizaciju kolagena u tumorima bubrega pomoću SHG i kao rezultat su dobili da je gustina kolagena manja u RCC-u sa nuklearnim gradusom 1 po WHO/ISUP-u, za razliku od RCC-a sa nuklearnim gradusom 2. Detektovana kolagena vlakna u RCC-u niskog gradusa su bila pravilnije raspoređena u odnosu na RCC visokog gradusa. Što je nuklearni gradus bio veći, kolagena vlakna su haotičnije bila raspoređena (161).

Naši uzorci analizirani NLM-om, a zasnovani na karakteristikama TPEF signala su pokazali da je ccRCC identifikovan po slabo prepoznatljivoj ćelijskoj membrani i tumorskim ćelijama okruženim tankim fibroznim septama koje sadrže kolagena vlakna, kao što se vidi na SHG slikama. U ccRCC detektujemo slabu ili nultu autofluorescenciju u citoplazmi zbog prisustva lipida i glikogena i zbog smanjenog broja mitohondrija, tako da je na TPEF slikama citoplazma tamnog izgleda. Jedra su slabijeg signala pa se vide kao svetla područja i u većini slučajeva su ekscentrično lokalizovana.

U pRCC-u, fibrovaskularno jezgro se lako može vizuelizovati pomoću SHG, dok sa TPEF-om možemo posmatrati i ćelije koje oblažu fibrovaskularna jezgra, raspoređene u jednom sloju ili više pseudoslojeva, a i samo fibrovaskularno jezgro. Jedra u pRCC-u su jačeg signala pa se vide kao tamna područja. Kod pRCC visokog gradusa, autofluorescencija je jačeg intenziteta apikalno.

Na TPEF slikama, glavna karakteristika chRCC je istaknuta ćelijska membrana sa perinuklearnim haloom. Za razliku od ccRCC i pRCC, citoplazma chRCC pokazuje jači TPEF signal, posebno na periferiji. Pri većem uvećanju, detektovani signal se vidi u obliku brojnih malih granula. Jedra u chRCC su centralno pozicionirana, nižeg TPEF signala, tako da se vide kao svetla područja.

Iako postoje morfološka preklapanja između chRCC i RO na H&E slikama, TPEF signal u jedrima RO su jačeg intenziteta pa se vizualizuje kao tamna područja, centralno pozicionirano za razliku od chRCC. Druga razlika između chRCC i RO je TPEF signal u citoplazmi koji je jači u RO, relativno ravnomerno distribuiran bez akcentuacije ka periferiji i vidljivog perinuklearnog haloa. Pri većem uvećanju, detektovani signal za RO je opisan brojnim granulama koje se mogu razlikovati po veličini, za razliku od slučajeva chRCC gde su granule uglavnom male i ujednačene. U korelaciji sa IHH i IF bojenjem, detektovane granule u chRCC-u i RO mogu odgovarati mitohondrijama, s obzirom na distribuciju i intenzitet signala.

## 6 ZAKLJUČCI

Na osnovu demografskih podataka i postavljenih dijagnoza RCT, zaključili smo da:

- ⇒ Postoji statistička značajnost između distribucije RCT po polovima, gde se histološki podtipovi ccRCC I pRCC češće javljaju u muškoj populaciji nego u ženskoj, dok se chRCC I RO češće javljaju kod ženske populacije.
- ⇒ Najčešće dijagnostikovani stadijum bolesti je bio pT1 i zastupljeniji je kod muške populacije. pT3 stadijum je takođe češće bio dijagnostikovani kod muškaraca.
- ⇒ Nuklearni gradus 2 ccRCC češće je dijagnostikovani u starijoj grupi, dok su veći gradusi češće dijagnostikovani kod mlađih.
- ⇒ pT1 stadijum, koji ima povoljniju prognozu je češće dijagnostikovani kod starijih, dok je pT3 stadijum sa lošijom prognozom, češće dijagnostikovani kod mlađe grupe, što govori o načinu života, radnim navikama i kasnom javljanju lekaru kod mlađih.

Na osnovu analiza IHH ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela u odnosu na ispitivane histološke podtipove tumora bubrega, sledeći zaključci su izvedeni:

- ⇒ Anti-mitohondrijalno bojenje je pokazalo visoku specifičnost u određivanju podtipa tumora bubrega. Intenzitet bojenja anti-mitohondrijalnog je takođe jedinstven sa svaki podtip RCT-a.
- ⇒ Distribucija bojenja anti-mitohondrijalnog antitela je jedinstven za svaki podtip RCT-a.
- ⇒ Postoji statistička značajnost u distribuciji i u intenzitetu ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela između podtipova RCT.
- ⇒ U ccRCC visokog gradusa, intenzitet ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela je jači, ali je distribucija bojenja je ista kao i kod ccRCC niskog gradusa. Kod oba gradusa je prisutno grubo, granulirano citoplazmatsko bojenje.
- ⇒ Kod pRCC-a niskog gradusa, intenzitet ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela je jak, ravnomerno distribuiran u citoplazmi. Kod pRCC-a visokog gradusa uočena je jak intenzitet ekspresije a distribucija bojenja pokazuje apikalnu akcentuaciju.
- ⇒ U chRCC-u, distribucija i intenzitet ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela su umereni, pri čemu je distribucija anti-mitohondrijalnog bojenja pretežno periferno akcentuirana, uz membranu, tako da se oko jedra vidi halo.
- ⇒ U RO se uočava difuzna citoplazmatska granuliranost, a intenzitet ekspresije anti-mitohondrijalnog antitela je jak.
- ⇒ Na osnovu svih analiza, zaključili smo da anti-mitohondrijalno antitelo može da se koristi u standardnoj IHH analizi, a ukoliko se radi o punkcionoj biopsiji bubrega gde postoji diferencijalna dijagnoza između chRCC I RO poželjno je da anti-mitohondrijalno antitelo bude urađeno.

Na osnovu IF analize konfokalnom mikroskopijom anti-mitohondrijalnim antitelom, sledeći zaključci su izvedeni:

- ⇒ IF konfokalnom mikroskopijom sa aplikovanjem anti-mitohondrijalnog antitela, jasno mogu da se vizuelizuju mitohondrije u svim RCT-ovima.
- ⇒ U ccRCC-u IF analizom, distribucija mitohondrija je oskudna i grubo zrnasta.

- ⇒ U pRCC-u niskog gradusa distribucija mitohondrija je ravnomerna i intenzivnog bojenja, dok se u pRCC-u visokog gradusa uočava intenzivno bojenje sa apikalnom akcentuacijom, što se poklapa sa distribucijom i intenzitetom ekspresije sa IHH bojenjem.
- ⇒ U chRCC-u uočava se umerena ekspresija anti-mitohondrijalnog antitela, sa perifernom, membranskom akcentuacijom.
- ⇒ Čelijska membrana u eozinofilnoj varijanti chRCC se jasno vizualizuje IF analizom.
- ⇒ U RO distribucija anti-mitohondrijalnog bojenja je difuzna, jakog intenziteta, zrnastog karaktera.
- ⇒ Naglašavamo da se verifikacija dijagnoze RO i chRCC na IF mikroskopu primenom mitohondrijalnog antitela veoma preporučuje. Ovo je zbog činjenice da RO sadrži brojne mitohondrije i značajno manji broj mikrovezikula, za razliku od chRCC koji se odlikuje približno jednakim brojem mitohondrija i mikrovezikula.
- ⇒ IF može da se koristi i kod drugih RCT-ova jer pored distribucije mitohondrija i ekspresije antitela, jasno se vide citološke karakteristike i obrazac rasta tumora.
- ⇒

Na osnovu TEM slika, utvrdili smo da:

- ⇒ Primena elektronske mikroskopije kod RCT-a sa parafinskih kalupa je moguća, ali zbog neadekvatne fiksacije ultrastrukturne osobine mitohondrija i drugih organela ne mogu da se detektuju, ali broj i oblik mogu.
- ⇒ Elektronska mikroskopija je dugotrajna i skupa metoda, koja zahteva obučen kadar, adekvatnu fiksaciju i pripremu uzorka, te nije primenjiva u svakodnevnoj rutinskoj dijagnostici.

Primenom NLM došli smo do sledećih zaključaka:

- ⇒ Prednost NLM-a je u mogućnosti efikasne vizualizacije uzoraka bez pripreme tkiva. Na ovaj način se precizna dijagnoza može dati za nekoliko minuta.
- ⇒ Svaki analizirani podtip RCT ima specifične karakteristike koje na osnovu signala mogu da se prepoznaju.
- ⇒ Kod ccRCC-a signal u citoplazmi je slab, a u jedru jači, a mogu jasno da se vizuelizuju plaže tumorskih ćelija, kao i delikatnu vaskularnu mrežu.
- ⇒ NLM-om može da se vidi i sarkomatoidna diferencijacija, pa čak i ako u uzorku nije prisutna primarna komponenta, zna se da se radi o karcinomu visokog gradusa.
- ⇒ Kod pRCC-a se uočava papilarni rast sa jačim signalom u citoplazmi, a slabim u jedru. Signal u citoplazmi je apikalno naglašen što se poklapa sa IF i IHH analizom, koja nam ukazuje na distribuciju mitohondrija.
- ⇒ U chRCC-u, NLM-om je naglašena ćelijska membrana sa slabijim signalom u citoplazmi (koji je jači nego u ccRCC-u), a sa jačim signalom u jedru. Pokazali smo da se vidi i perikunuklearni halo gde je signal veoma slab.
- ⇒ U RO, signal u citoplazmi je veoma jak i ravnomeran, dok je u jedru slab.
- ⇒ Svaki RCT ima svoje NLM karakteristike i uz obuku koja ne zahteva puno vremena, možemo da damo preciznu dijagnozu.
- ⇒ SHG tehnika je pokazala da tumorska kapsula koja deli bubrežni parenhim od tumora može jasno da se vizualizuje, što implicira da se može koristiti za detekciju hirurških margina.

## PERSPEKTIVE

- Bez obzira što statistička značajnost između uzrasne grupe pacijenata i nuklearnog gradusa ccRCC, kao i uzrasne grupe i stadijuma bolesti nije pronađena, smatramo da bi bilo korisno da se poveća broj ispitanika, jer su naši podaci pokazali da se kod mlađe grupe češće dijagnostikovao ccRCC višeg nuklearnog gradusa, ali i veći stadijum bolesti, što prema našem saznanju još nije publikovano.
- IF rezultati dobijeni primenom anti-mitohondrijalnog antitela sa parafinskog kalupa su pokazali odlične rezultate, s toga smatramo da bi u budućnosti IF mogla da se koristi i u *ex-tempore* biosijama.
- Analiza TPEF je pokazala da pouzdano mogu da se razlikuju podtipovi RCT-a te takođe u daljem istraživanju može da se analizira sveže tkivo bubrega kako bi se videlo da li je struktura tkiva očuvana da li može da se koristi kao pomoćna dijagnostička metoda u *ex-tempore* biopsijama s obzirom da za TPEF analizu nije potrebna prethodna priprema uzoraka izuzev da se tkivo smrzne i na kriotomu iseče.

## 7 LITERATURA

1. Global health estimates: Leading causes of death [Internet]. [cited 2023 Aug 1]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
2. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 Mar 9;3:17009.
3. Sung WW, Wang SC, Hsieh TY, Ho CJ, Huang CY, Kao YL, et al. Favorable mortality-to-incidence ratios of kidney Cancer are associated with advanced health care systems. *BMC Cancer*. 2018 Aug 6;18:792.
4. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2019 Jan;75(1):74–84.
5. Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol*. 2018 Dec;36(12):1913–26.
6. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol*. 2015 May;67(5):913–24.
7. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan;71(1):7–33.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):7–30.
9. Medina-Rico M, Ramos HL, Lobo M, Romo J, Prada JG. Epidemiology of renal cancer in developing countries: Review of the literature. *Can Urol Assoc J J Assoc Urol Can*. 2018 Mar;12(3):E154–62.
10. Vasudev NS, Wilson M, Stewart GD, Adeyoju A, Cartledge J, Kimuli M, et al. Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer. *BMJ Open*. 2020 May 11;10(5):e035938.
11. Pavlakis GM, Sakorafas GH, Anagnostopoulos GK. Intestinal metastases from renal cell carcinoma: a rare cause of intestinal obstruction and bleeding. *Mt Sinai J Med N Y*. 2004 Mar;71(2):127–30.
12. Ather MH, Masood N, Siddiqui T. Current management of advanced and metastatic renal cell carcinoma. *Urol J*. 2010;7(1):1–9.
13. Gansler T, Fedewa S, Amin MB, Lin CC, Jemal A. Trends in reporting histological subtyping of renal cell carcinoma: association with cancer center type. *Hum Pathol*. 2018 Apr;74:99–108.
14. Theis RP, Dolwick Grieb SM, Burr D, Siddiqui T, Asal NR. Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *BMC Cancer*. 2008 Dec 24;8:387.



15. Scelo G, Larose TL. Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Dec 20;36(36):3574–81.
16. Kim CS, Han KD, Choi HS, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Association of Hypertension and Blood Pressure With Kidney Cancer Risk: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2020 Jun;75(6):1439–46.
17. Johansson M, Carreras-Torres R, Scelo G, Purdue MP, Mariosa D, Muller DC, et al. The influence of obesity-related factors in the etiology of renal cell carcinoma-A mendelian randomization study. *PLoS Med*. 2019 Jan;16(1):e1002724.
18. Gluba-Brzózka A, Rysz J, Ławiński J, Franczyk B. Renal Cell Cancer and Obesity. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 21;23(6):3404.
19. Choueiri TK, Je Y, Cho E. Analgesic use and the risk of kidney cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Int J Cancer*. 2014 Jan 15;134(2):384–96.
20. Rizzo M, Caliò A, Brunelli M, Pezzicoli G, Ganini C, Martignoni G, et al. Clinico-pathological implications of the 2022 WHO Renal Cell Carcinoma classification. *Cancer Treat Rev*. 2023 May 1;116:102558.
21. Kim E, Zschiedrich S. Renal Cell Carcinoma in von Hippel-Lindau Disease-From Tumor Genetics to Novel Therapeutic Strategies. *Front Pediatr*. 2018;6:16.
22. Henske EP, Cornejo KM, Wu CL. Renal Cell Carcinoma in Tuberous Sclerosis Complex. *Genes*. 2021 Oct 8;12(10):1585.
23. Lucarelli G, Ferro M, Loizzo D, Bianchi C, Terracciano D, Cantiello F, et al. Integration of Lipidomics and Transcriptomics Reveals Reprogramming of the Lipid Metabolism and Composition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Metabolites*. 2020 Dec 13;10(12):509.
24. Petan T, Jarc E, Jusović M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Mol Basel Switz*. 2018 Aug 3;23(8):1941.
25. Liu S, Liu X, Wu F, Zhang X, Zhang H, Gao D, et al. HADHA overexpression disrupts lipid metabolism and inhibits tumor growth in clear cell renal cell carcinoma. *Exp Cell Res*. 2019 Nov 1;384(1):111558.
26. Ackerman D, Tumanov S, Qiu B, Michalopoulou E, Spata M, Azzam A, et al. Triglycerides Promote Lipid Homeostasis during Hypoxic Stress by Balancing Fatty Acid Saturation. *Cell Rep*. 2018 Sep 4;24(10):2596-2605.e5.
27. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. 2015 Apr;17(4):351–9.
28. Tickoo SK, Lee MW, Eble JN, Amin M, Christopherson T, Zarbo RJ, et al. Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2000 Sep;24(9):1247–56.
29. Upton MP, Parker RA, Youmans A, McDermott DF, Atkins MB. Histologic predictors of renal cell carcinoma response to interleukin-2-based therapy. *J Immunother Hagerstown Md 1997*. 2005;28(5):488–95.

30. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93–105.
31. Cancer Genome Atlas Research Network, Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2016 Jan 14;374(2):135–45.
32. Al-Obaidy KI, Eble JN, Nassiri M, Cheng L, Eldomery MK, Williamson SR, et al. Recurrent KRAS mutations in papillary renal neoplasm with reverse polarity. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2020 Jun;33(6):1157–64.
33. Al-Obaidy KI, Saleeb RM, Trpkov K, Williamson SR, Sangoi AR, Nassiri M, et al. Recurrent KRAS mutations are early events in the development of papillary renal neoplasm with reverse polarity. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2022 Sep;35(9):1279–86.
34. Gudbjartsson T, Thoroddsen A, Petursdottir V, Hardarson S, Magnusson J, Einarsson GV. Effect of incidental detection for survival of patients with renal cell carcinoma: results of population-based study of 701 patients. *Urology*. 2005 Dec;66(6):1186–91.
35. Lee W. Imprint cytology of the chromophobe renal cell carcinoma: Correlation with the histological and ultrastructural features. *J Cytol Indian Acad Cytol*. 2011;28(2):77–80.
36. Abualjadayel MH, Safdar OY, Banjari MA, El Desoky S, Mokhtar GA, Azhar RA. A Rare Benign Tumor in a 14-Year-Old Girl. *Case Rep Nephrol*. 2018 Jan 31;2018:1548283.
37. Lieber MM, Tomera KM, Farrow GM. Renal oncocytoma. *J Urol*. 1981 Apr;125(4):481–5.
38. Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM, et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2002 Dec;26(12):1542–52.
39. Johnson NB, Johnson MM, Selig MK, Nielsen GP. Use of electron microscopy in core biopsy diagnosis of oncocytic renal tumors. *Ultrastruct Pathol*. 2010 Aug;34(4):189–94.
40. Wobker SE, Williamson SR. Modern Pathologic Diagnosis of Renal Oncocytoma. *J Kidney Cancer VHL*. 2017;4(4):1–12.
41. Williams GM, Lynch DT. Renal Oncocytoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Aug 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537263/>
42. Barr ML, Jilaveanu LB, Camp RL, Adeniran AJ, Kluger HM, Shuch B. PAX-8 expression in renal tumours and distant sites: a useful marker of primary and metastatic renal cell carcinoma? *J Clin Pathol*. 2015 Jan;68(1):12–7.
43. Gokden N, Gokden M, Phan DC, McKenney JK. The utility of PAX-2 in distinguishing metastatic clear cell renal cell carcinoma from its morphologic mimics: an immunohistochemical study with comparison to renal cell carcinoma marker. *Am J Surg Pathol*. 2008 Oct;32(10):1462–7.
44. Ortiz-Rey JA, Gómez De María C, Peláez Boismorand E, Fernández Costas A, Barbosa Barreiro MJ, Antón Badiola I. [Expression of CD10 and renal cell carcinoma marker in clear cell renal cell carcinoma: analysis on tissue arrays]. *Actas Urol Esp*. 2006 Mar;30(3):281–6.

45. Martignoni G, Pea M, Brunelli M, Chilosi M, Zamò A, Bertaso M, et al. CD10 is expressed in a subset of chromophobe renal cell carcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2005 Jan 1;17:1455–63.
46. Belaldavar C, Hallikerimath S, Kale A. Cytokeratins: Its role and expression profile in oral health and disease. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.* 2015 Oct 1;28.
47. Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz LK. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol.* 1999 Apr;14(2):657–64.
48. Ordóñez NG. Broad-spectrum immunohistochemical epithelial markers: a review. *Hum Pathol.* 2013 Jul 1;44(7):1195–215.
49. Gonzalez ML, Alaghebandan R, Pivovarcikova K, Michalova K, Rogala J, Martinek P, et al. Reactivity of CK7 across the spectrum of renal cell carcinomas with clear cells. *Histopathology.* 2019 Mar;74(4):608–17.
50. Colvin CR, Block J, Funder DC. Overly positive self-evaluations and personality: negative implications for mental health. *J Pers Soc Psychol.* 1995 Jun;68(6):1152–62.
51. Krüger S, Sotlar K, Kausch I, Horny HP. Expression of KIT (CD117) in renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Oncology.* 2005;68(2–3):269–75.
52. molinié V, Balaton A, Rotman S, Mansouri D, Pinieux I, Homsy T, et al.  $\alpha$ -Methyl CoA racemase expression in renal cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2006 Jul 1;37:698–703.
53. Eichelberg C, Minner S, Isbarn H, Burandt E, Terracciano L, Moch H, et al. Prognostic value of alpha-methyl CoA racemase (AMACR) expression in renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2013 Aug;31(4):847–53.
54. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 1997 Jun;10(6):537–44.
55. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Aug 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
56. Bollard ME, Holmes E, Lindon JC, Mitchell SC, Branstetter D, Zhang W, et al. Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high-resolution (1)H NMR spectroscopy of urine and pattern recognition. *Anal Biochem.* 2001 Aug 15;295(2):194–202.
57. Gao H, Dong B, Liu X, Xuan H, Huang Y, Lin D. Metabonomic profiling of renal cell carcinoma: high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis. *Anal Chim Acta.* 2008 Aug 29;624(2):269–77.
58. Mäkinen VP, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K, et al. Diagnosing diabetic nephropathy by 1H NMR metabonomics of serum. *Magma N Y N.* 2006 Dec;19(6):281–96.
59. Süllentrop F, Hahn J, Moka D. In Vitro and In Vivo 1H-MR Spectroscopic Examination of the Renal Cell Carcinoma. *Int J Biomed Sci IJBS.* 2012 Jun;8(2):94–108.

60. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res*. 2011 Nov 22;2(1):1–21.
61. Taylor SE, Cheung KT, Patel II, Trevisan J, Stringfellow HF, Ashton KM, et al. Infrared spectroscopy with multivariate analysis to interrogate endometrial tissue: a novel and objective diagnostic approach. *Br J Cancer*. 2011 Mar 1;104(5):790–7.
62. Urboniene V, Pucetaite M, Jankevicius F, Zelvys A, Sablinskas V, Steiner G. Identification of kidney tumor tissue by infrared spectroscopy of extracellular matrix. *J Biomed Opt*. 2014 Aug;19(8):087005.
63. He C, Wu X, Zhou J, Chen Y, Ye J. Raman optical identification of renal cell carcinoma via machine learning. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021 May 5;252:119520.
64. Valdés PA, Kim A, Leblond F, Conde OM, Harris BT, Paulsen KD, et al. Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery. *J Biomed Opt*. 2011 Nov;16(11):116007.
65. Bogomolov A, Belikova V, Zabarylo UJ, Bibikova O, Usenov I, Sakharova T, et al. Synergy Effect of Combining Fluorescence and Mid Infrared Fiber Spectroscopy for Kidney Tumor Diagnostics. *Sensors*. 2017 Nov 5;17(11):2548.
66. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020 Mar;92(1):e68.
67. Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems | BioTechniques [Internet]. [cited 2023 Aug 6]. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112089>
68. Parodi V, Jacchetti E, Osellame R, Cerullo G, Polli D, Raimondi MT. Nonlinear Optical Microscopy: From Fundamentals to Applications in Live Bioimaging. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Oct 9;8:585363.
69. Bouevitch O, Lewis A, Pinevsky I, Wuskell JP, Loew LM. Probing membrane potential with nonlinear optics. *Biophys J*. 1993 Aug;65(2):672–9.
70. Peleg G, Lewis A, Linial M, Loew LM. Nonlinear optical measurement of membrane potential around single molecules at selected cellular sites. *Proc Natl Acad Sci*. 1999 Jun 8;96(12):6700–4.
71. Moreaux L, Pons T, Dambrin V, Blanchard-Desce M, Mertz J. Electro-optic response of second-harmonic generation membrane potential sensors. *Opt Lett*. 2003 Apr 15;28(8):625–7.
72. [PDF] Non linear imaging of biological structures by employing femtosecond lasers George Filippidis - Free Download PDF [Internet]. [cited 2023 Aug 8]. Available from: <https://silo.tips/download/non-linear-imaging-of-biological-structures-by-employing-femtosecond-lasers-geor>
73. Tan YQ, Tay WK, Ooi LY, Thamboo TP, Tiong HY. Multiphoton Microscopic Study of the Renal Cell Carcinoma Pseudocapsule: Implications for Tumour Enucleation. *Urology*. 2020 Oct;144:249–54.
74. Jain M, Robinson BD, Aggarwal A, Shevchuk MM, Scherr DS, Mukherjee S. Multiphoton microscopy for rapid histopathological evaluation of kidney tumours. *BJU Int*. 2016 Jul;118(1):118–26.

75. Herdson PB. General principles of electron microscopy. *Hosp Top*. 1968 Apr;46(4):79–82.
76. García AG, León TG. Simple Enucleation for Renal Tumors: Indications, Techniques, and Results. *Curr Urol Rep*. 2016 Jan;17(1):7.
77. Xu C, Lin C, Xu Z, Feng S, Zheng Y. Tumor Enucleation vs. Partial Nephrectomy for T1 Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2019 Jun 4;9:473.
78. Fergany AF, Hafez KS, Novick AC. Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup. *J Urol*. 2000 Feb;163(2):442–5.
79. Moll V, Becht E, Ziegler M. Kidney preserving surgery in renal cell tumors: indications, techniques and results in 152 patients. *J Urol*. 1993 Aug;150(2 Pt 1):319–23.
80. Campbell Walsh Wein Urology - 12th Edition [Internet]. [cited 2023 Aug 2]. Available from: <https://shop.elsevier.com/books/campbell-walsh-wein-urology/partin/978-0-323-54642-3>
81. Li D, Pua BB, Madoff DC. Role of Embolization in the Treatment of Renal Masses. *Semin Interv Radiol*. 2014 Mar;31(1):70–81.
82. Xu W, Atkins MB, McDermott DF. Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2020 Mar;17(3):137–50.
83. deKernion JB, Sarna G, Figlin R, Lindner A, Smith RB. The treatment of renal cell carcinoma with human leukocyte alpha-interferon. *J Urol*. 1983 Dec;130(6):1063–6.
84. Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am*. 2000 Feb;6 Suppl 1:S55-57.
85. Yamamoto T, Kitamura H, Masumori N. Complete response to interferon-alpha in a patient with metastatic renal cell carcinoma after unsuccessful molecular-targeted therapies. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. 2014 Aug;21(8):839–40.
86. Escalante CP, Zalpour A. Vascular endothelial growth factor inhibitor-induced hypertension: basics for primary care providers. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:816897.
87. Lempiäinen H, Halazonetis TD. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J*. 2009 Oct 21;28(20):3067–73.
88. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K ichi, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002 Jul 26;110(2):177–89.
89. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002 Jul 26;110(2):163–75.
90. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol CB*. 2004 Jul 27;14(14):1296–302.
91. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 May;10(5):307–18.

92. Jewell JL, Guan KL. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci.* 2013 May;38(5):233–42.
93. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans.* 2009 Feb;37(Pt 1):217–22.
94. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol.* 2013 Oct;37(10):1490–504.
95. Collins J, Epstein JI. Prognostic significance of extensive necrosis in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2017 Aug;66:108–14.
96. Samaratunga H, Delahunt B, Srigley JR, Berney DM, Cheng L, Evans A, et al. Granular necrosis: a distinctive form of cell death in malignant tumours. *Pathology (Phila).* 2020 Aug;52(5):507–14.
97. Assessment of tumour-associated necrosis provides prognostic information additional to World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading for clear cell renal cell carcinoma - Dagher - 2019 - *Histopathology* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2023 Aug 2]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/his.13737>
98. Ro JY, Ayala AG, Sella A, Samuels ML, Swanson DA. Sarcomatoid renal cell carcinoma: clinicopathologic. A study of 42 cases. *Cancer.* 1987 Feb 1;59(3):516–26.
99. Kara O, Maurice MJ, Zargar H, Malkoc E, Akca O, Andrade HS, et al. Prognostic implications of sarcomatoid and rhabdoid differentiation in patients with grade 4 renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol.* 2016 Aug;48(8):1253–60.
100. Kuroda N, Karashima T, Inoue K, Kasajima A, Ohe C, Kawakami F, et al. Review of renal cell carcinoma with rhabdoid features with focus on clinical and pathobiological aspects. *Pol J Pathol Off J Pol Soc Pathol.* 2015 Mar;66(1):3–8.
101. Amin MB, Paner GP, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Lyles RH, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 145 cases. *Am J Surg Pathol.* 2008 Dec;32(12):1822–34.
102. Beck SDW, Patel MI, Snyder ME, Kattan MW, Motzer RJ, Reuter VE, et al. Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2004 Jan;11(1):71–7.
103. Cheville JC, Lohse CM, Sukov WR, Thompson RH, Leibovich BC. Chromophobe renal cell carcinoma: the impact of tumor grade on outcome. *Am J Surg Pathol.* 2012 Jun;36(6):851–6.
104. Akhtar M, Tulbah A, Kardar AH, Ali MA. Sarcomatoid renal cell carcinoma: the chromophobe connection. *Am J Surg Pathol.* 1997 Oct;21(10):1188–95.
105. Ged Y, Chen YB, Knezevic A, Casuscelli J, Redzematovic A, DiNatale RG, et al. Metastatic chromophobe renal cell carcinoma: Presence or absence of sarcomatoid differentiation determines clinical course and treatment outcomes. *Clin Genitourin Cancer.* 2019 Jun;17(3):e678–88.

106. Çalışkan S, Gökçe AM, Gümrükçü G, Önenerk M. Renal Medullary Carcinoma; A Rare Entity. *Iran J Med Sci.* 2017 Mar;42(2):215–8.
107. Nikolic G, Zivotic M, Cirovic S, Despotovic S, Radojevic Skodric S. The Utility of Mitochondria Detection Methods Applied as an Additional Tool for the Differentiation of Renal Cell Tumour. *Diagnostics.* 2023 Jul 9;13(14):2319.
108. Bukara K, Jovanic S, Drvenica IT, Stancic A, Ilic V, Rabasovic MD, et al. Mapping of hemoglobin in erythrocytes and erythrocyte ghosts using two photon excitation fluorescence microscopy. *J Biomed Opt.* 2017 Feb 1;22(2):26003.
109. Vujičić M, Despotović S, Saksida T, Stojanović I. The Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor on Intestinal Permeability: FITC-Dextran Serum Measurement and Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2020;2080:193–201.
110. Scelo G, Li P, Chanudet E, Muller DC. Variability of Sex Disparities in Cancer Incidence over 30 Years: The Striking Case of Kidney Cancer. *Eur Urol Focus.* 2018 Jul;4(4):586–90.
111. Palumbo C, Pecoraro A, Knipper S, Rosiello G, Luzzago S, Deuker M, et al. Contemporary Age-adjusted Incidence and Mortality Rates of Renal Cell Carcinoma: Analysis According to Gender, Race, Stage, Grade, and Histology. *Eur Urol Focus.* 2021 May;7(3):644–52.
112. Dy GW, Gore JL, Forouzanfar MH, Naghavi M, Fitzmaurice C. Global Burden of Urologic Cancers, 1990-2013. *Eur Urol.* 2017 Mar;71(3):437–46.
113. SEER [Internet]. [cited 2023 Aug 2]. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. Available from: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/index.html](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/index.html)
114. Fateh SM, Arkawazi LA, Tahir SH, Rashid RJ, Rahman DH, Aghaways I, et al. Renal cell carcinoma T staging: Diagnostic accuracy of preoperative contrast-enhanced computed tomography. *Mol Clin Oncol.* 2023 Feb;18(2):11.
115. May M, Aziz A, Zigeuner R, Chromecki T, Cindolo L, Schips L, et al. Gender differences in clinicopathological features and survival in surgically treated patients with renal cell carcinoma: an analysis of the multicenter CORONA database. *World J Urol.* 2013 Oct;31(5):1073–80.
116. Lipworth L, Morgans AK, Edwards TL, Barocas DA, Chang SS, Herrell SD, et al. Renal cell cancer histological subtype distribution differs by race and sex. *BJU Int.* 2016 Feb;117(2):260–5.
117. Zaitso M, Toyokawa S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Kawachi I. Sex-specific analysis of renal cell carcinoma histology and survival in Japan: A population-based study 2004 to 2016. *Health Sci Rep.* 2019 Dec 20;3(1):e142.
118. Mauermann J, de Martino M, Waldert M, Haitel A, Klingler HC, Remzi M, et al. Gender differences in benign renal masses. *World J Urol.* 2013 Oct;31(5):1051–7.
119. Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol.* 2005 Jun;173(6):1853–62.
120. Lam JS, Breda A, Belldegrun AS, Figlin RA. Evolving principles of surgical management and prognostic factors for outcome in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006 Dec 10;24(35):5565–75.

121. Gettman MT, Blute ML. Update on pathologic staging of renal cell carcinoma. *Urology*. 2002 Aug;60(2):209–17.
122. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol*. 2000 Apr;163(4):1090–5; quiz 1295.
123. Buja A, De Luca G, Gatti M, Cozzolino C, Rugge M, Zorzi M, et al. Renal cell carcinoma: the population, real world, and cost-of-illness. *BMC Urol*. 2022 Dec 19;22(1):206.
124. Chen SH, Xu LY, Wu YP, Ke ZB, Huang P, Lin F, et al. Tumor volume: a new prognostic factor of oncological outcome of localized clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2021 Jan 19;21(1):79.
125. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*. 2016 Nov;50(6):411–8.
126. Libard S, Cerjan D, Alafuzoff I. Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 2019;151(1):91–6.
127. Abrahams NA, MacLennan GT, Khoury JD, Ormsby AH, Tamboli P, Doglioni C, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: a comparative study of histological, immunohistochemical and ultrastructural features using high throughput tissue microarray. *Histopathology*. 2004 Dec;45(6):593–602.
128. Mai KT, Burns BF. Chromophobe cell carcinoma and renal cell neoplasms with mucin-like changes. *Acta Histochem*. 2000 Feb;102(1):103–13.
129. Pradhan D, Kakkar N, Bal A, Singh SK, Joshi K. Sub-typing of renal cell tumours; contribution of ancillary techniques. *Diagn Pathol*. 2009 Jun 28;4:21.
130. Yusenko MV. Molecular pathology of chromophobe renal cell carcinoma: a review. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. 2010 Jul;17(7):592–600.
131. Krishnan B, Truong LD. Renal epithelial neoplasms: the diagnostic implications of electron microscopic study in 55 cases. *Hum Pathol*. 2002 Jan;33(1):68–79.
132. Mete O, Kilicaslan I, Gulluoglu MG, Uysal V. Can renal oncocytoma be differentiated from its renal mimics? The utility of anti-mitochondrial, caveolin 1, CD63 and cytokeratin 14 antibodies in the differential diagnosis. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2005 Dec;447(6):938–46.
133. Ozcan A, Karshioğlu Y, Onguru O, Kurt B, Gunal A, Gunhan O, et al. Cytokeratin 7 and Antimitochondrial Antibody Expressions in the Differential Diagnosis of Renal Epithelial Neoplasms with Eosinophilic Cytoplasm. *J Interdiscip Histopathol*. 2012 Feb 1;1:1.
134. Kuroda N, Tanaka A, Yamaguchi T, Kasahara K, Naruse K, Yamada Y, et al. Chromophobe renal cell carcinoma, oncocytic variant: a proposal of a new variant giving a critical diagnostic pitfall in diagnosing renal oncocytic tumors. *Med Mol Morphol*. 2013 Mar;46(1):49–55.
135. Tickoo SK, Amin MB, Linden MD, Lee MW, Zarbo RJ. Antimitochondrial antibody (113-1) in the differential diagnosis of granular renal cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 1997 Aug;21(8):922–30.



136. Jain S, Chauhan S, Dixit S, Garg N, Sharma S. Role of Direct Immunofluorescence Microscopy in Spectrum of Diffuse Proliferative Glomerulonephritis: A Single-Center Study. *J Microsc Ultrastruct*. 2021 Feb 9;9(4):177–82.
137. Buch AC, Sood SK, Bamanikar SA, Chandanwale SS, Kumar H, Swapnil K. Role of direct immunofluorescence in the diagnosis of glomerulonephritis. *Med J Dr Patil Univ*. 2015 Jul 1;8(4):452.
138. Joshi K, Sakhuja V, Minz RW, Chhabra S, Khirwadkar N, Pasricha N, et al. Direct Immunofluorescence of Renal Biopsy: Perspective of an Immunopathologist. *J Postgrad Med Educ Res*. 2015 Mar;49(1):10–7.
139. Singh G, Singh L, Ghosh R, Nath D, Dinda AK. Immunofluorescence on paraffin embedded renal biopsies: Experience of a tertiary care center with review of literature. *World J Nephrol*. 2016 Sep 6;5(5):461–70.
140. Messias NC, Walker PD, Larsen CP. Paraffin immunofluorescence in the renal pathology laboratory: more than a salvage technique. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2015 Jun;28(6):854–60.
141. Nasr SH, Fidler ME, Said SM. Paraffin Immunofluorescence: A Valuable Ancillary Technique in Renal Pathology. *Kidney Int Rep*. 2018 Nov;3(6):1260–6.
142. Sheng W, Zhang C, Mohiuddin TM, Al-Rawe M, Zeppernick F, Falcone FH, et al. Multiplex Immunofluorescence: A Powerful Tool in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 4;24(4):3086.
143. Rios-Colon L, Kim S, Su Y, Kumar D, Deep G. Immunofluorescence-Based Method to Assess Cancer Biomarker in the Hypoxic Region of the Tumor. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2022;2413:37–43.
144. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun*. 2020;40(4):135–53.
145. Lin HI, Chang YC. Colorectal cancer detection by immunofluorescence images of circulating tumor cells. *Ain Shams Eng J*. 2021 Sep 1;12(3):2673–83.
146. Phung MC, Rouse AR, Pangilinan J, Bell RC, Bracamonte ER, Mashi S, et al. Investigation of confocal microscopy for differentiation of renal cell carcinoma versus benign tissue. Can an optical biopsy be performed? *ASIAN J Urol [Internet]*. 2020 Oct [cited 2023 Aug 1]; Available from: <https://repository.arizona.edu/handle/10150/657572>
147. Su LM, Kuo J, Allan RW, Liao JC, Ritari KL, Tomeny PE, et al. Fiber-Optic Confocal Laser Endomicroscopy of Small Renal Masses: Toward Real-Time Optical Diagnostic Biopsy. *J Urol*. 2016 Feb;195(2):486–92.
148. Piña R, Santos-Díaz AI, Orta-Salazar E, Aguilar-Vazquez AR, Mantellero CA, Acosta-Galeana I, et al. Ten Approaches That Improve Immunostaining: A Review of the Latest Advances for the Optimization of Immunofluorescence. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 26;23(3):1426.
149. Locke D, Hoyt CC. Companion diagnostic requirements for spatial biology using multiplex immunofluorescence and multispectral imaging. *Front Mol Biosci [Internet]*. 2023 [cited 2023 Aug 3];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2023.1051491>

150. Advantages of Immunofluorescence (IF/ICC) | Sino Biological [Internet]. [cited 2023 Aug 3]. Available from: <https://www.sinobiological.com/category/advantages-of-if-icc>
151. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1897:299–311.
152. Honvo-Houéto E, Truchet S. Indirect Immunofluorescence on Frozen Sections of Mouse Mammary Gland. *J Vis Exp JoVE*. 2015 Dec 1;(106):53179.
153. Katz MJ, Huland DM, Ramasamy R. Multiphoton microscopy: applications in Urology and Andrology. *Transl Androl Urol*. 2014 Mar;3(1):77–83.
154. Treacy PJ, Khosla A, Kyprianou N, Falagario U, Tsavaras N, Wiklund P, et al. Value of multiphoton microscopy in uro-oncology: a narrative review. *Transl Androl Urol*. 2023 Mar 1;12.
155. Xi G, Cao N, Guo W, Kang D, Chen Z, He J, et al. Label-Free Imaging of Blood Vessels in Human Normal Breast and Breast Tumor Tissue Using Multiphoton Microscopy. *Scanning*. 2019 Jun 25;2019:5192875.
156. Yang Q, Xu Z, Liao C, Cai J, Huang Y, Chen H, et al. Epithelium segmentation and automated Gleason grading of prostate cancer via deep learning in label-free multiphoton microscopic images. *J Biophotonics*. 2020 Feb;13(2):e201900203.
157. Burke K, Brown E. The Use of Second Harmonic Generation to Image the Extracellular Matrix During Tumor Progression. *IntraVital*. 2015 Jan 6;3(3):e984509.
158. Desa DE, Wu W, Brown RM, Brown EB, Hill RL, Turner BM, et al. Second-Harmonic Generation Imaging Reveals Changes in Breast Tumor Collagen Induced by Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers*. 2022 Feb 9;14(4):857.
159. Jain M, Robinson BD, Wu B, Khani F, Mukherjee S. Exploring Multiphoton Microscopy as a Novel Tool to Differentiate Chromophobe Renal Cell Carcinoma from Oncocytoma in Fixed Tissue Sections. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 Dec 8;142(3):383–90.
160. Wu B, Mukherjee S, Jain M. A new method using multiphoton imaging and morphometric analysis for differentiating chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma kidney tumors. 2016 Mar 1; 9712:971210.
161. Best SL, Liu Y, Keikhosravi A, Drifka CR, Woo KM, Mehta GS, et al. Collagen organization of renal cell carcinoma differs between low- and high-grade tumors. *BMC Cancer*. 2019 May 23;19(1):490.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Gorana (Zoran) Nikolić rođena je 03.07.1984. godine, u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu - III beogradsku gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 2003. godine, a diplomirala 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,00. Nakon završetka lekarskog staža, radila je istraživač u Inovacionom centru Mašinskog fakulteta na katedri za Biomedicinsko inženjerstvo. Specijalističke studije iz oblasti patologije, upisala je 2014. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gde je i položila specijalistički ispit 2018. godine sa odličnim uspehom. Od 2018.godine zaposlena je kao saradnik u nastavi na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Užu specijalizaciju iz Kliničke patologije upisala je 2019.godine. Autor i koautor je u više naučnih radova u domaćim i stranim časopisima. Redovni je član Udruženja patologa i citologa Srbije (UPCS), kao i Evropskog udruženja patologa (ESP). Trenutno radi kao asistent na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta. Posедуje aktivno znanje engleskog jezika.

**Publikovani radovi iz teze:**

1. Nikolic G, Zivotic M, Cirovic S, Despotovic S, Dundjerovic D, Radojevic Skodric S. The Utility of Mitochondrial Detection Methods Applied as an Additional Tool for the Differentiation of Renal Cell Tumors. *Diagnostics*. 2023 Jul 9;13(14):2319. M21, IF: 3.9
2. Nikolić G, Pekmezović T, Radojević Škodrić S. Tumori porekla bubrežnog parenhima - nova klasifikacija prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (2022). *Medicinski podmladak*, 2024; 75(4). DOI 10.5937/mp75-45467

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Горана Николић

Број индекса : ДС5181/21

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Улога имунофлуоресценције, имунохистохемије и нелинеарне скенирајуће микроскопије у савременој дијагностици тумора порекла бубрежног паренхима, према новој класификацији”**

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

**Потпис аутора**

У Београду, 05.04.2024.

---

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Горана Никоић

Број индекса ДС5181/21

Студијски програм Епидемиологија

Наслов рада **„Улога имунофлуоресценције, имунохистохемије и нелинеарне скенирајуће микроскопије у савременој дијагностици тумора порекла бубрежног паренхима, према новој класификацији”**

Ментор 1 Проф. Др Сања Радојевић Шкодрић

Ментор 2 Проф. Др Татјана Пекмезовић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 05.04.2024.

---

## Изјава о коришћењу

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

**„Улога имунофлуоресценције, имунохистохемије и нелинеарне скенирајуће микроскопије у савременој дијагностици тумора порекла бубрежног паренхима, према новој класификацији”**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.