

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.04.2024. godine, broj 19/XXIII-4/3-ΓH, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uloga imunofluorescencije, imunohistohemije i nelinearne skenirajuće mikroskopije u savremenoj dijagnostici tumora porekla bubrežnog parenhima, prema novoj klasifikaciji “

kandidata dr Gorane Nikolić, zaposlene u Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Mentori su Prof. dr Sanja Radojević Škodrić i Prof. dr Tatjana Pekmezović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Zoran Džamić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Gorica Marić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Lidija Matija, profesor Mašinskog fakulteta u Beogradu
5. Prof. dr Ljubinka Janković Veličković, profesor Medicinskog fakulteta u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Gorane Nikolić napisana je na ukupno 73 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci, i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 tabela, 6 grafikona i 35 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji i zahvalnicu.

U **uvodu** je definisana učestalost epitelnih tumora porekla bubrežnih ćelija, najčešće dijagnostikovani tipovi tumora, etiološki faktori i preživljavanje pacijenata. Navedena je

detaljna klasifikacija svih tumora bubrega epitelnog porekla prema novoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije. Opisane su histomorfološke karakteristike najčešće dijagnostikovanih tumora bubrega, kao i njihov imunohistohemijski profil. Navedeni su i kriterijumi za određivanje nuklearnog gradusa tumora kao i stadijum bolesti prema novoj klasifikaciji.

Takođe je prikazan detaljan osvrt na druge metode detekcije tumora bubrega kao što su spektroskopske metode, koje se istražuju poslednje dve decenije. Pored standardnih spektroskopskih metoda koje se koriste (nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija, infracrvena spektroskopija, Ramanova spektroskopija i fluorescentna spektroskopija) poslednju deceniju, primena nelinearne skenirajuće mikroskopije se pokazala kao obećavajuća metoda za razlikovanje različitih tipova tumora bubrega.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja 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. Takođe, ispitivalo se 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), i da li primenom nelinearne skenirajuće mikroskopije kao pomoćne dijagnostičke metode mogu da se razlikuju podtipovi tumora porekla bubrežnog parenhima.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o retrospektivnoj studiji koja je sprovedena na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta, Institutu za histologiju Medicinskog fakulteta i Institutu za fiziku u Beogradu. Parafinski kalupi su preuzeti iz arhive Službe za urološku patohistologiju UKCS. Detaljno je opisan način obrade uzoraka, priprema za imunohistohemijsko i imunofluorescentno bojenje kao i priprema uziraka za snimanje nelinearnom skenirajućom mikroskopijom. Pored opianih metoda, navedeni su i kriterijumi za uključanje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. S obzirom da se radi o retrospektivnoj studiji i uzorcima tkiva pacijenata koji su već dobili dijagnozu, pisani pristanak nije bio neophodan.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 161 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorske disertacije koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaze se u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije kandidata dr Gorane Nikolić, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi 7%. Ovaj stepen podudaranja je posledica citata, ličnih imena kao i prethodno publikovanih rezultata doktorantovih istraživanja, koji su proistekli iz disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Studijom je obuhvaćeno 96 pacijenata sa dijagnostikovanim najčešćim patohistološkim podtipovima tumora bubrega. Od 96 obrađenih uzoraka, 43 uzorka su dijagnostikovani kao svetloćelijski karcinom (ccRCC), 15 uzoraka kao papilarni karcinom (pRCC), 20 uzoraka kao hromofobni karcinom (chRCC) i 18 uzoraka kao onkocitom bubrega (RO). Njihove kliničke i patohistološke karakteristike su analizirane u tri različite grupe, na osnovu imunohistohemijskog obrasca bojenja antimitohondrijalnog antitela. Distribuciju anti-mitohondrijalnog bojenja je podeljena 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 ($p=0.960$). Levostrana nefrektomija je urađena u 53 slučaja, a desnostrana u 44 slučaja i nije dobijena statističku značajnost u korelaciji sa distribucijom anti-mitohondrijalnog bojenja ($p=0.478$). Prosečne vrednosti najvećih dimenzija tumora nisu se statistički razlikovale unutar grupa ($p=0.865$). Između podtipova tumora uočeni su statistički značajno različiti obrasci ekspresije. Među njima, ccRCC je uglavnom dijagnostikovao sa grubim oskudnim bojenjem mitohondrija, sa izuzetkom dva slučaja u koja je pronađen difuzan granularni obrazac bojenja umerenog intenziteta. Oba slučaja su bili ccRCC sa visokim nuklearnim gradusom ($p = 0,005$). 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 bojenja; međutim, značajna razlika nije uočena ($p = 0,764$). Sve u svemu, primećeno je da je intenzitet imunohistohemijskog bojenja povećan u grupama sa umerenim i difuznim granularnim obrascima ($p < 0,001$).

Za poređenje pola i histološkog podtipa tumora bubrega (RCT) korišćen je 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 koji se češće dijagnostikovao kod ženske populacije, što je pokazalo statističku značajnost ($p=0.002$). 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%), iako statistička značajnost nije pronađena ($p=0.448$).

Poredio se histopatološki stadijum bolesti i pol, i dobijeni rezultati su pokazali da se pT1 (a, b) stadijum najčešće dijagnostikovao, nešto češće kod muške populacije (14,1%, 19,2%) u odnosu na žensku populaciju (9,0%, 16,7%). Pored distribucije tumora bubrega, nuklearnog gradusa i stadijuma bolesti po polovima, svi ispitanici su po godinama podeljeni u dve grupe (grupa 1 su bili ispitanici od 40-60 godina starosti, grupa 2 su bili ispitanici od 61-80 godina starosti). 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 karcinoma bubrega u grupi 2 su bili pRCC (19,3%) i chRCC (24,6%), dok je distribucija RO bila podjednako zastupljena. Rezultati distribucije nuklearnog gradusa svetloćelijskog karcinoma između grupa su pokazali da je nuklearni gradus 2 najčešće dijagnostikovano 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%).

Analiza tumora bubrega primenom konfokalne imunofluorescentne mikroskopije je pokazala da je u ccRCC prisutan veoma slab signal, dok se je u ostalim tumorima signal jači, sa različitom distribucijom. U pRCC, pogotovo visokog gradusa uočena je apikalna akcentuacija signala, koja pokazuje gušću distribuciju mitohondrija, dokazanu i na elektronskom mikroskopu. Kod chRCC, signal je heterogen, što dokazuje da se pored detektovanih mitohondrija koje su pokazivale jači signal, detektovale i mikrovezikule koje su bile slabijeg intenziteta, dokazane

elektronskom mikroskopijom. U RO, koji je najbogatiji mitohondrijama, signal je bio jak, gusto granuliran, ravnomerno raspoređen što je pokazalo specifičnost i senzitivnost bojenja.

Upotrebom nelinearne skenirajuće mikroskopije, definisane su karakteristike ispitivanih tumora bubrega. Kod ccRCC, alveolarni obrazac rasta tumorskih ćelija se uočava, sa debelim fibrozim septama koje ih okružuju. Ćelijska membrana nije jasno definisana između ćelija. TPEF signal iz citoplazme tumorske ćelije je nizak u većini ćelija. Jedra su različitih veličina, pretežno ekscentrično locirana i vide se kao svetle regije. Kod pRCC vide se papilarne formacije sa tankom fibrovaskularnom peteljkom, obložene cilindričnim ćelijama. U ćelijama se uočavaju dva signalna obrasca: 1) TPEF signal sa više autofluorescencije, 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. Kod chRCC, može se uočiti izraženo naglašena ćelijska membrana i jak TPEF signal u jedrima, koji se vide kao centralno lokalizovana svetla područja. Signal u citoplazmi se razlikuje u klasičnoj varijanti u odnosu na eozinofilnu varijantu chRCC. Intenzitet signala je jači u eozinofilnoj citoplazmi, granuliranog izgleda, sa označavanjem perinuklearnog haloa. Kod RO, vizuelizovane ćelije su uniforme, sa jačim citoplazmatskim signalom, granuliranog izgleda i jedrom slabog signala koji se vizualizuje kao tamna područja.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Po literaturnim podacima iz sveta (Sung WW, 2018) karcinom bubrega se češće javlja kod muške populacije nego kod ženske. Prema Globalnoj opservatoriji za rak (2021) 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. Evropski informacioni sistem o raku (<https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>, septembar 2021.) registrovao je stopu incidencije za 2020. godine za Evropu od 18,4 za oba pola, odnosno 25,9 za muškarce i 12,5 za žene. Statistički podaci uzoraka u ovom istraživanju 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 ovom 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 (Palumbo C, 2021), a dobijeni rezultati pokazuju srednju vrednost godina 61.6 ± 8.3 , što se poklapa sa literaturom. Brojne svetske studije su pokazale da je ccRCC najčešći karcinom od svih

histoloških podtipova RCT-a. U ovom 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 (2023) su u njihovom istraživanju pokazali da je dominantno zahvaćena strana bubrega tumorom bila desnostrana (32/59), što se razlikuje od dobijenih podataka koji pokazuju dominantno zahvaćenu levu stranu bubrega tumorom (53/96), pri čemu za dva uzorka nismo imali podatak o strani.

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%; $p < 0,001$) (May M, 2013). I druge studije su pokazale slične rezultate, čak i na manjem uzorku (Zaitu M, 2019). Dobijeni rezultati u ovoj studiji su pokazali da je ccRCC češće dijagnostikovao 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 dijagnostikovao kod muškaraca, a chRCC kod žena. RO prema literaturi se češće dijagnostikuje kod muške populacije (Mauermann J, 2013), dok rezultati aktuelne studije pokazuju sličnu učestalost dijagnostikovanja RO između polova (m=8,3%, ž=10,4%).

Prema literaturnim podacima (Buja A, 2022, Chen SH, 2022) stadijum pT1 je najčešće dijagnostikovao stadijum u odnosu na druge stadijume. Predmetno istraživanje je pokazalo da većina dijagnostikovanih tumora pripada pT1 a i b stadijumu (46/96), što se poklapa sa literaturnim rezultatima.

Iako statistička značajnost nije uočena u dobijenim rezultatima, a što je najverovatnije posledica nedovoljnog broja ispitanika, zapaženo je 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 dijagnostikovao gradus i kod mlađe i starije grupe, ali je nuklearni gradus 4 daleko češće dijagnostikovao kod mlađe grupe. Uvidom u literaturu nisu pronađeni rezultati 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. Svi navedeni rezultati govore da kod mlađe populacije, životne i radne navike kao i kasni odlasci kod lekara imaju veliki uticaj na stadijum bolesti.

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 (Pradhan D, 2009; Yusenko MV, 2010). S obzirom na morfološka preklapanja RO i eozinofilne varijante chRCC nekada je teško dati adekvatnu dijagnozu, čak i uz standardnu imunohistohemijsku analizu. Upotrebom elektronske mikroskopije (TEM), ovaj problem može da se prevaziđe. 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. 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. Na TEM slikama u predmetnom istraživanju, koji su rađeni iz parafinskih blokova moglo je samo da se vizuelizuje prisustvo mitohondrija, njihov broj, lokalizaciju i delimično njihov oblik, ali nije bilo moguće uočiti sve važne detalje njihove strukture. 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 (Krishnan B, 2002). Na m TEM uzorcima u ovoj studiji, 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.

Mete i saradnici (2005) su koristili anti-mitohondrijalno antitelo, izveštavajući da je obrazac imunoreaktivnosti uglavnom bio difuzan u RO, dok je u većini chRCC bio difuzan, ali periferno naglašen (osetljivost-96% i specifičnost-94% za diferencijaciju chRCC od RO) (132). Ozcan i saradnici (2012) 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. Slično tome, Kuroda i sarad. (2013) 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. Tickoo i sarad. (1997) 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.

U ovoj studiji, analizirani su uzorci korišćenjem dva mitohondrijska antitela. Ab-2 antitelo pokazalo je difuzno, fino granularno bojenje u RO, dok su u chRCC-u zapažene dve vrste granulacija, uglavnom periferno lokalizovane. ccRCC uzorci su imali oskudno, grubo bojenje, koje sa povećanjem gradusa bilo pojačane ekspresije. pRCC niskog gradusa su pokazali difuzno granularno bojenje, dok se kod pRCC visokog gradusa uočio dvostruk obrazac bojenja: intenzivna gruba citoplazmatska granuliranost lokalizovana apikalno, i blaga do umereno fina citoplazmatska granuliranost lokalizovana oko jedra i bazalno. Prohibitinsko antitelo pokazalo je sličan, ali slabiji obrazac bojenja. Time ovi rezultati, 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.

Imunofluorescencija može da se primenjuje kako na zamrznutom tako i na parafinskom tkivu (Messias NC, 2015, Nasr SH, 2018). Međutim, njegove mogućnosti nisu u potpunosti istražene u dijagnostici tumora bubrega. Phung i sarad. (2020) su koristili imunofluorescentnu konfokalnu mikroskopiju u cilju detekcije zdravog tkiva bubrega i tumora. U drugoj studiji, Su i sarad. (2016) su pokazali da ex vitro primenom konfokalne mikroskopije mogu da se razlikuju strukture kako u normalnom bubrežnom parenhimu tako i u tumoru. Po saznanjima, do sada nije ispitivano prisustvo mitohondrija u tumorima bubrega primenom imunofluorescentne konfokalne mikroskopije u cilju potencijalne diferencijacije između različitih podtipova RTC-a. U ovom istraživanju, analizirani su uzorci ccRCC-a niskog i visokog gradusa, pRCC-a niskog i visokog gradusa, chRCC i RO koristeći antimitohondrijska antitela i imunofluorescentnu konfokalnu mikroskopiju. U ccRCC-u niskog gradusa mitohondrije nisu detektovane, dok su u visokog gradusa bile oskudne i disperzne. U pRCC-u niskog gradusa mitohondrije su bile ravnomerno distribuirane, a u visokog gradusa prisutne u celoj citoplazmi. 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, prisustvom mitohondrija i mikrovezikula može da se objasni dvostruki intenzitet bojenja na IHH-u. IF

analiza i TEM potvrdili su ove nalaze, sugerišući da bi upotreba jednog antitela mogla poboljšati dijagnostiku RCT-a.

Tokom poslednje decenije, nelinearna (multifotonska) mikroskopija se koristi za otkrivanje različitih tipova tumora. Jain i sarad. (2016) 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%. U drugoj studiji, Jain i saradnici (2017) su istraživali mogućnost razlikovanja RO od chRCC na parafinskim blokovima, koristeći isti metod. Za RO i chRCC, prijavljene su visoke dijagnostičke tačnosti od 100% i 83,3%. Tan i sarad. (2020) 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. Vu i sarad. (2016) 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%. Best i sarad. (2019) 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). Uzorci u aktuelnoj studiji 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 je detektovana slaba autofluorescencija u citoplazmi zbog prisustva lipida i glikogena i zbog smanjenog broja mitohondrija. 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 može 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. Citoplazma chRCC pokazuje jači TPEF signal, posebno na periferiji. Jedra u chRCC su centralno pozicionirana, nižeg TPEF signala, tako da se vide kao svetla područja. 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.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

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

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

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uloga imunofluorescencije, imunohistohemije i nelinearne skenirajuće mikroskopije u savremenoj dijagnostici tumora porekla bubrežnog parenhima, prema novoj klasifikaciji“ dr Gorane Nikolić, predstavlja originalni naučni doprinos u diferencijaciji različitih tipova bubrežnih tumora (RCT-ova) koristeći mitohondrijska antitela u imunohistohemijskoj (IHH) analizi. Istraživanje je pružilo nove uvide u obrasce bojenja mitohondrija u različitim tipovima i gradusima RCT-ova, omogućavajući detaljnije razlikovanje između niskog i visokog gradusa ccRCC-a i pRCC-a, kao i između chRCC-a i RO. Između ostalog, različiti obrasci antimitohondrijalnog IHH bojenja su objašnjeni primenom imunofluorescentne mikroskopije, čime je pokazano prisustvo specifičnih organela u citoplazmi RCT-ova. Doakzano je da primena IF mikroskopije takođe može da se koristi u dijagnostici RCT-ova. Primenom nelinearne skenirajuće mikroskopije pokazano je da svaki analizirani podtip RCT ima specifične karakteristike koje na osnovu signala mogu da se prepoznaju, sa posebnim akcentom na raspoznavanje chRCC i RO.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Gorane Nikolić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 05.04.2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Svetislav Tatić

Prof. dr Zoran Džamić

Doc. dr Gorica Marić

Prof. dr Lidija Matija

Prof. dr Ljubinka Janković Veličković

Mentor 1:

Prof. dr Sanja Radojević Škodrić

Mentor 2:

Prof. dr Tatjana Pekmezović
