

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Sofija Đ. Glumac

**Značaj poremećaja gena regulatora ćelijskog
ciklusa i ekspresije njihovih proteina u
rabdomiosarkomu**

doktorska disertacija

Beograd, 2015. god.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dr Sofija Đ. Glumac

**Significance of disorder of the cell cycle regulator
genes and expression of their proteins in
rhabdomyosarcoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR: Prof. dr Jelena Sopta, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Jovan D. Vasiljević- redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Gordana Basta- Jovanović- redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

3. Prof. dr Vera Bunjevački- redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

4. Doc. dr Sanja Radojević-Škodrić- docent Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

5. Prof. dr Dragoljub Bacetić- profesor u penziji Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: ____/____/_____

ZAHVALNICA

Najsrdačnije se zahvaljujem svom mentoru Prof. dr Jeleni Sopti na ukazanom poverenju i pruženoj pomoći u toku izrade doktorske disertacije.

Članovima komisije, Prof. dr Dragoljubu Bacetiću, Prof. dr Jovanu Vasiljeviću, Prof. dr Gordani Basti Jovanović, Prof. dr dr Veri Bunjevački i Doc. dr Sanji Radojević Škodrić sam iskreno zahvalna na predusretljivosti, dragocenim kritikama i sugestijama prilikom izrade ove teze.

Radoslavu Davidoviću, se zahvaljujem na velikom i nesebičnom zalaganju i pomoći u svim fazama izrade teze. Njegova stručnost i prijateljska podrška su umnogome doprineli kvalitetu ove teze.

Hvala i mojoj porodici koja me je podržavala i pružala mi oslonac i ljubav.

Značaj poremećaja gena regulatora ćelijskog ciklusa i ekspresije njihovih proteina u rabdomiosarkomu

SAŽETAK:

Cilj: Rabdomiosarkom (RMS) je tumor visokog stepena maligniteta. Poslednje dve decenije prognoza pacijenata sa ovim tumorom je značajno poboljšana, osim kod pacijenata iz visokorizične grupe. U cilju utvrđivanja novih prognostičkih faktora ispitivali smo imunohistohemijsku ekspresiju proteina regulatora ćelijskog ciklusa i apoptoze, kao i obrasce metilacije promotora gena p16 u slučajevima RMS, i dobijene rezultate korelirati sa kliničko-patološkim parametrima.

Metodologija: Ova studija je obuhvatila 67 slučajeva RMS dijagnostikovanih na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u periodu od 1994-2014 godine. Analizirani su sledeći kliničko-morfološki podaci: pol, starost, lokalizacija i veličina tumora, histološki tip i gradus, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa i postojanje metastatske bolesti.

Rezultati: Evaluacijom ekspresije ciklina A u odnosu na kliničko-patološke parametre pacijenata sa RMS, uočena je statistička značajnost samo u odnosu na histološki tip tumora ($p=0.047$). U ćelijama RMS, ciklin D1 je pokazivao jedarnu ekspresiju i aberantna ekspresija ovog markera nije pokazivala značajnu korelaciju sa ispitivanim parametrima. Rezultati različite ekspresija p57 u ovom tumoru su pokazivali statističku značajnost u odnosu na histološki tip ($p=0,042$), gradus tumora ($p=0,026$) i u odnosu na ishod bolesti ($p=0,021$). Ekspresija survivina u tumorskim ćelijama RMS bila je citoplazmatska i jedarna, Za razliku od citoplazmatske ekspresije survivina gde nije uočena njena povezanost sa prognostičkim faktorima, jedarna ekspresija ovog markera je bila statistički značajna u odnosu na starosne grupe, histološki tip i gradus tumora ($p=0.009$, $p=0.008$, $p=0.010$, redom). Analiza ekspresije nestina je pokazala statistički značaj u odnosu na starost pacijenta ($p = 0,028$) i gradus tumora ($p = 0,022$). Analiza

metilacionog statusa promotora gena *p16* je bila u saglasnosti sa imunohistochemijskom ekspresijom njegovog proteina. Prisustvo hipermetilacije promotora gena *p16* je detektovano samo u jednom slučaju. Gubitak funkcije $p16^{\text{INK4A}}$ nije nastao metilacijom promotora gena. Od analiziranih markera uticaj na preživljavanje pacijenata imali su p57 ($p=0,045$) i nestin ($p=0,044$). Univarijantnom regresionom analizom kao značajni prediktivni faktori bolesnika sa RMS izdvojili su se starost, histološki tip, gradus tumora, prisustvo regionalnih i udaljenih metastaza. Od ispitivanih markera jedino je p57 bio blizu konvencionalnog nivoa značajnosti

Zaključak: Ekspresija proteina regulatora ćelijskog ciklusa i apoptoze i metilacioni status *p16* promotor gena se nisu izdvojili kao nezavisni prognostički faktori. Ipak, njihova udruženost sa značajnim prognostičkim parametrima ukazuje da oni ipak mogu imati značaja u patogenezi RMS.

KJUČNE REČI: *Rabdomiosarkom, ćelijski ciklus, apoptoza, metilacija, preživljavanje.*

Significance of disorder of the cell cycle regulator genes and expression of their proteins in rhabdomyosarcom

SUMMARY

Objective: Rhabdomyosarcoma (RMS) is a tumor of high-grade malignancy. During the last two decades the prognosis of patients with this tumor has been significantly improved, except in patients from the high-risk group. In order to determine new prognostic factors, we investigated the immunohistochemical expression of proteins, the regulators of cell cycles and apoptosis as well as the patterns of methylation of the p16 gene promoter in cases of RMS, and the results obtained were to be correlated with clinicopathological parameters.

Methodology: This study included 67 cases of RMS diagnosed at the Institute of Pathology, School of Medicine, University of Belgrade, in the period from 1994 to 2014. The following clinical and morphological data were analyzed: gender, age, tumor size and localization, histological type and grade, affected regional lymph nodes and the presence of metastatic disease.

Results: By evaluation of the expression of cyclin A in relation to the clinicopathological parameters of patients with RMS, it was found a statistical significance only in relation to the histological type of tumor ($p = 0.047$). In the RMS cells, cyclin D1 showed a nuclear expression and the aberrant expression of this marker did not show any significant correlation with the studied parameters. Results of different expressions of p57 in this tumor showed a statistical significance in relation to the histological type ($p = 0.042$), tumor grade ($p = 0.026$) and in relation to the disease outcome ($p = 0.021$). The survivin expression in RMS tumor cells was cytoplasmic and nuclear. Unlike cytoplasmic survivin expression where no correlation with prognostic factors was found out, the nuclear expression of this marker was statistically significant in relation to the age groups, histological type of tumor and tumor grade ($p = 0.009$, p

= 0.008, p = 0.010, respectively). Analysis of the expression of nestin showed statistical significance in relation to the age of patients (p = 0.028) and tumor grade (p = 0.022). Analysis of the methylation status of the p16 gene promoter was in agreement with the immunohistochemical expression of its protein. The presence of p16 gene promoter hypermethylation was detected in only one case. The loss of function of p16^{INK4A} was not caused by methylation of the promoter gene. Of the analyzed markers those which had an impact on the survival of patients were p57 (p = 0.045) and nestin (p = 0.044). Using an univariate regression analysis, as significant predictors in patients with RMS were found to be age, histological type, tumor grade, the presence of regional and distant metastases. Of the tested markers only the p57 was close to conventional levels of significance.

Conclusion: Expression of cell cycle regulatory proteins and apoptosis and the methylation status of p16 gene promoter did not appear as independent prognostic factors. However, their association with significant prognostic parameters indicates that they can still be of significance in the pathogenesis of RMS.

KEY WORDS: *Rhabdomyosarcoma, cell cycle, apoptosis, methylation, survival.*

Sadržaj:

1.Uvod	1
1.1. Poreklo rabdomiosarkoma	2
1.2. Epidemiologija rabdomiosarkoma	3
1.3. Lokalizacija i kliničke karakteristike rabdomiosarkoma	4
1.4. Makroskopski izgled rabdomiosarkoma	5
1.5. Histopatološke karakteristike i tipovi rabdomiosarkoma	5
1.5.1. Embrionalni rabdomiosarkom	6
1.5.1.1. Genetske karakteristike embrionalnog rabdomiosarkoma	9
1.5.2. Alveolarni rabdomiosarkom	10
1.5.2.1. Genetske karakteristike alveolarnog rabdomiosarkoma	11
1.5.3. Pleomorfni rabdomiosarkom	13
1.5.3.1. Genetske karakteristike pleomorfnog rabdomiosarkoma	13
1.5.4. Vretenasto ćelijski/sklerozirajući rabdomiosarkom	14
1.5.4.1. Genetske karakteristike vretenasto ćelijskog rabdomiosarkoma	15
1.6. Stadijumi rabdomiosarkoma	16
1.6.1. Klinički i biološki faktori za određivanje prognostičkih grupa	16
1.7. Ćelijski ciklus	19
1.7.1. Regulacija ćelijskog ciklusa	20
1.8. Genetski mehanizmi kancerogeneze	22
1.9. Epigenetički mehanizmi kancerogeneze	23
1.9.1. Metilacija DNK	24
1.9.2. Uloga metilacije DNK u kancerogenezi	24
1.10. Funkcija ciklina A i njegov značaj u kancerogenezi	25
1.11. Funkcija ciklina D1 i njegov značaj u kancerogenezi	26
1.12. Funkcija p57 i njegov značaj u kancerogenezi	27
1.13. Funkcija p16 i njegov značaj u kancerogenezi	28
1.14. Apoptoza	29
1.14.1. Regulacija apoptoze	30
1.15. Funkcija survivina i njegov značaj u kancerogenezi	31
1.16. Funkcija nestina i njegov značaj u kancerogenezi	35
2. Ciljevi istraživanja	36
3. Materijal i metode	38
3.1. Ispitivani bolesnici	39
3.2. Metode	39
3.2.1. Histološka obrada uzoraka rabdomiosarkoma	39
3.2.2. Konstruisanje tkivnog mikroniza	40
3.2.3. Imunohistohemijske metode	41

3.2.4. Genetske analize	44
3.2.5. Statistička obrada podataka	50
4. Rezultati	51
4.1. Distribucija bolesnika prema polu i starosti	52
4.2. Distribucija bolesnika prema lokalizaciji tumora	52
4.3. Distribucija bolesnika prema histološkom tipu i gradusu tumora	52
4.4. Distribucija bolesnika prema veličini tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i prisustvu udaljenih metastaza (M)	52
4.5. Ishod bolesti	53
4.6. Ukupno preživljavanje obolelih od rabdomiosarkoma	54
4.7. Uticaj kliničko-patoloških parametara na ukupno preživljavanje pacijenata sa rabdomiosarkomom	57
4.8. Imunohistohemijska ekspresija Ciklina A	62
4.9. Imunohistohemijska ekspresija Ciklina D1	64
4.10. Imunohistohemijska ekspresija p57	68
4.11. Imunohistohemijska ekspresija p16	71
4.12. Analiza metilacionog statusa promotora gena p16	72
4.13. Imunohistohemijska ekspresija survivina	73
4.13.1. Citoplazmatska ekspresija survivina	73
4.13.2. Jedarna ekspresija survivina	76
4.14. Imunohistohemijska ekspresija nestina	80
5. Diskusija	85
6. Zaključci	100
7. Literatura	103

1. UVOD

Rabdomiosarkomi (RMS) predstavljaju jedinstvenu grupu meko-tkivnih tumora poreklom od primitivnog mezenhima sa izraženom sklonošću ka nepotpunoj miogenezi. RMS se smatra malignim tumorom skeletnog mišića, jer uglavnom nastaje iz samog mišića ili u njegovoj neposrednoj blizini a građeni su od ćelija u različitim stadijumima mišićne diferencijacije. Može nastati i na onim lokalizacijama kod kojih normalno nema skeletne muskulature (bilijarni i genitourinarni trakt), tako da se u novijim istraživanjima postavlja pitanje o pravom poreklu ovog tumora (1).

RMS prvi put u literaturi pominje Stafford u prvoj polovini 19. veka, kada je prikazao slučaj RMS prostate kod petogodišnjeg dečaka. Nešto kasnije, Guersant prvi opisuje botrioidni tip RMS. Berard prikazujući tumor koji definiše kao "Tumeur embryonnaire du muscle striè", praktično uvodi termin embrionalnog mišićnog tumora (2), a Zenker, 1864., misleći na sarkome poprečno prugaste muskulature predlaže termin rabdomiom (3). Najbliži današnjoj definiciji bio je Borst, koji ga naziva mioblastični sarkom (4). Entitet pleomorfni RMS predložio je Adami 1898. godine (4). Posle više od 100 godina, 1958. godine, Horn i Enterline predlažu da se RMS klasifikuje na embrionalni, botrioidni, alveolarni i pleomorfni tip (5).

1.1. Poreklo rabdomiosarkoma

Fenotip RMS ćelije još uvek je kontroverzan. Morfološki nalaz, ekspresija skeletnomišićnih proteina (dezmin i miozin), kao i detekcija ultrastrukturnih elemenata poput aktin/miozinskog kompleksa su dugogodišnja zapažanja koja podržavaju skeletno mišićno poreklo RMS (6, 7, 8, 9).

Međutim, činjenica je da se ovaj tumora javlja i na mestima lišenim skeletne muskulature, kao što su paratestikularna regija, žučna kesa, parameningealna lokalizacija i druge. Stoga se sve češće postavlja pitanje da li postoji RMS stem ćelija ili neka druga vrsta ćelija od koje može nastati ovaj tumor.

Nekoliko studija je pokazalo prisustvo ćelijske populacije nalik stem ćeliji kod sarkoma, uključujući i RMS. Označene su kao "side population" (SP) (10). Međutim, neophodna su dodatna istraživanja koja bi dokazala da li su SP ćelije zaista rabdomiosarkomske stem ćelije i da li one postoje u humanom RMS.

Danas znamo da postoje različite vrste stem ćelija, embrionalne, germinativne, i tkivno specifične stem ćelije- mezenhimalna stem ćelija (MSC). MSC uprkos svojoj malobrojnosti, zadržavaju sposobnost da stvaraju različite ćelijske linije (11). Sve je više dokaza koji povezuju MSC sa specifičnim sarkomima, pa i sa alveolarnim RMS. U prilog ovoj teorije je tvrdnja da PAX3, koji je glavni regulator miogeneze, može biti u stanju da izazove diferencijaciju MSC u pravcu skeletne mišićne ćelije delujući na MyoD, Myf5 i miogenin. Nasuprot tome, pojedini autori ukazuju da njegova inaktivacija kod eksperimentalnih životinja dovodi do teških malformacija skeletne muskulature, ali ne i do razvoja tumora (12).

Pored ove hipoteze, brojni su dokazi koji podržavaju mišićno poreklo RMS. U tom pogledu, ne isključuju se embrionalni mioblasti, mišićne satelitske ćelije koje se nalaze uz zrela mišićna vlakna (13), a koje su u stanju mirovanja ali su i sposobne za proliferaciju u patološkim uslovima (14).

Uzevši sve u obzir možda ne treba isključiti mogućnost različitog porekla određenih histoloških podtipova RMS. Eksperimentalni dokazi podržavaju obe mogućnosti, pri čemu se one međusobno ne isključuju (13).

1.2. Epidemiologija rabdomiosarkoma

Maligni mezenhimalni tumori (sarkomi) su grupa retkih ali anatomski i histološki različitih neoplazmi. Čine oko 1% neoplazmi odraslih osoba i 7% pedijatrijskih tumora (15). RMS čini polovinu pedijatrijskih sarkoma (16). Oko 350 novih slučajeva dijagnostikuje se u Sjedinjenim Američkim Državama svake godine. Godišnja incidenca kod osoba mlađih od 20 godina je 4,3 slučaja na milion stanovnika (17). Uočena je bimodalna uzrasna distribucija kod dece, tako da se RMS javlja između 2. i 6. godine života, i kasnije između 10. i 18. godine starosti. Literaturni podaci pokazuju neznatno veću učestalost RMS kod dečaka (odnos dečaci:devojčice je 1.3:1.5) (16). Kod odraslih osoba RMS čini 3% svih malignih mekotkivnih tumora (18).

Embrionalni RMS (ERMS) se najčešće javlja do 15. godine života sa najvećom incidencom u petoj godini. Uglavnom je lokalizovan u predelu glave i vrata, genitourinarnog trakta ili retroperitonealno. Alveolarni RMS (ARMS) se javlja kod

adolescenata i mlađih odraslih osoba i to u predelu ekstremiteta, paraspinalno, perinealno, kao i u predelu paranazalnih sinusa. Pleomorfni RMS je najređi histološki tip, koji se gotovo isključivo dijagnostikuje kod odraslih osoba, i to uglavnom u predelu ekstremiteta, i ima najlošiju prognozu (17).

Većina RMS se javlja sporadično, ali se mogu javiti i u sklopu sa nekim familijarnim sindromima, kao što su neurofibromatoze, Li-Fraumeni sindrom, Beckwith-Wiedemann sindrom (BWS) i Costello sindrom (18, 20, 21, 22).

1.3. Lokalizacija i kliničke karakteristike rbdomiosarkoma

Za razliku od većine solidnih tumora dečje dobi, RMS se može razviti bilo gde na telu. Predeo glave i vrata opisan je u literaturi kao najčešća lokalizacija RMS (35%), a zatim slede genitourinarni trakt (24%) i ekstremiteti (19%) (22).

RMS glave i vrata se lokalizuje u tri prilično široka anatomska regiona: orbita, parameningealno i neparamingealno. Tumori orbite, koja je i najčešća lokalizacija (75%), imaju dobru prognozu nakon hemo i radio terapije (16). Parameningealna lokalizacija uključuje nazofarinks i nosnu šupljinu, paranazalne sinuse, infratemporalnu pterigopalatinalnu šupljinu i srednje uho. Tumori na ovoj lokalizaciji nisu podložni kompletnoj hiruškoj resekciji pa ove pacijente svrstavaju u III klinički stadijum. Kada se radi o neparamingealnim RMS terapija je prilično teška zbog ograničenog hirurškog pristupa (23).

RMS genitourinarnog trakta se uglavnom dijagnostikuje pre 5 godine života, češće kod dece muškog pola (24). Ova lokalizacija uključuje tumore poreklom iz mokraćne bešike, prostate, testisa i paratestikularne regije, penisa, perineuma, vagine i vulve (botrioidni tip) i uterusa. (25). U slučajevima kada tumor dostigne velike razmere otežana je kompletna hiruška resekcija, posebno kod RMS pelvične lokalizacije gde je agresivan hiruški pristup udružen sa značajnim morbiditetom (26).

Kao što je rečeno, RMS ekstremiteta, se nalaze na trećem mestu po učestalost. I ovde je prognoza pacijenata određena mogućnostima za potpunu resekciju tumora. Osnovni cilj hiruške terapije je poštediti od amputacije ekstremiteta. Većina pacijenata sa ovom lokalizacijom ima RMS alveolarne histologije, pa samim tim i nepovoljniju prognozu (16).

Pored navedenih lokalizacija, primarno mesto razvoja RMS može biti trup, odnosno trbušni zid i grudni koš. U predelu trupa RMS se javlja u 6-7% slučajeva ima lošu prognozu, jer je hiruška terapija prilično teška, naročito ako su zahvaćeni pleura i peritoneum.

Nešto ređa primarna lokalizacija RMS je bilijarni trakt gde se uglavnom javlja u mlađoj starosnoj grupi. RMS bilijarnog trakta imaju dobru prognozu s obzirom da sa odlični rezultati postižu već sa radio i hemo terapijom (16)

Izuzetno retko primarno mesto RMS može biti srce (27), perikard (28), pluća i pleura (29), plućna arterija (30), dojka (31), tibija (32), perianalno i pararektalno (33), kao i intrakranijalno (34).

Pored lokalizacije primarnog tumora, značajan uticaj na prognozu ima stepen lokalne i udaljene rasprostranjenosti bolesti. Kod 30% obolelih postoje sekundarni depoziti u regionalnim limfnim nodusima a kod jedne četvrtine bolesnika sa RMS prisutne su udaljene metastaze koje se najčešće dijagnostikuju u plućima, koštanoj srži i kostima (36, 37).

1.4. Makroskopski izgled rabdomiosarkoma

Makroskopski izgled RMS je nekarakterističan i ne razlikuje se od drugih sarkoma. U većini slučajeva radi se o ovalnim, periferno nejasno ograničenim tumorima, čvrste konzistencije. Karakterističan izgled ima jedino botrioidni RMS koji raste u vidu polipoidnih ili grozdastih struktura koje su u vezi sa telesnim šupljinama ili mukoznim membranama. Razlikovanje pojedinih histoloških tipova RMS na osnovu makroskopskog izgleda nije moguće izuzev kada se radi o botrioidnom RMS (37).

1.5. Histopatološke karakteristike i tipovi rabdomiosarkoma

Dijagnoza RMS se postavlja na osnovu izgleda karakterističnih ćelija koje su različitog stadijuma mišićne diferencijacije. Neoplastične ćelije često nemaju jasan morfološki izgled, te je zbog toga u rutinskoj dijagnostici neophodna primena imunohistohemijskih metoda. Najčešće korišćeni markeri za postavljanje dijagnoze RMS

su: mioglobin, kreatin kinaza M, dezmin, mišić specifični aktin, miozin, myo d, miogenin (2, 39).

Prema klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) postoje 4 osnovna histološka tipa: embrionalni (uključuje botrioidni i anaplastični podtip), alveolarni (uključuje solidni i anaplastični podtip), pleomorfni i "spindle" ćelijski/sklerozirajući RMS (39).

1.5.1. Embrionalni rabdomiosarkom

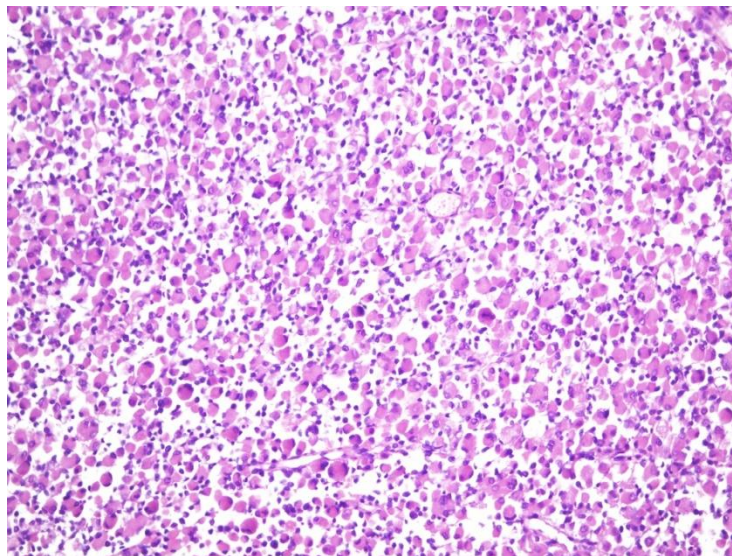
Embrionalni rabdomiosarkom (ERMS) se može definisati kao maligni tumor rabdomioblasta, koji rekapitulira fenotipske i biološke osobine embrionalne skeletno-mišićne ćelije. ERMS uključuje vretenasto ćelijsku, botrioidnu i anaplastičnu varijantu (39). Iz navedenog se može zaključiti da je morfološki izgled ovog histološkog tipa varijabilan i kreće se od slabo diferentovanog do dobro diferentovanog tumora koji se svojim izgledom približava slici fetalnog mišića (37).

Iako je ERMS građen od ćelija histološki identičnih embrionalnoj skeletnoj mišićnoj ćeliji (Slika 1), u manje od 9% slučajeva se ovaj histološki tip lokalizuje u predelu skeletne muskulature. Vretenasto ćelijska i botrioidna varijanta ERMS imaju ograničen broj organa u kojima mogu nastati, pa tako vretenasto ćelijski podtip nastaje u tkivu skrotuma i u predelu glave i vrata. Može se javiti i kod odraslih, u ne-paratestikularnoj regiji. Botrioidni ERMS po definiciji je lokalizovan u submukozi, tako da je njegova lokalizacija ograničena na organe kao što je mokraćna bešika, bilijarni trakt, farinks, konjuktiva, ušni kanal.

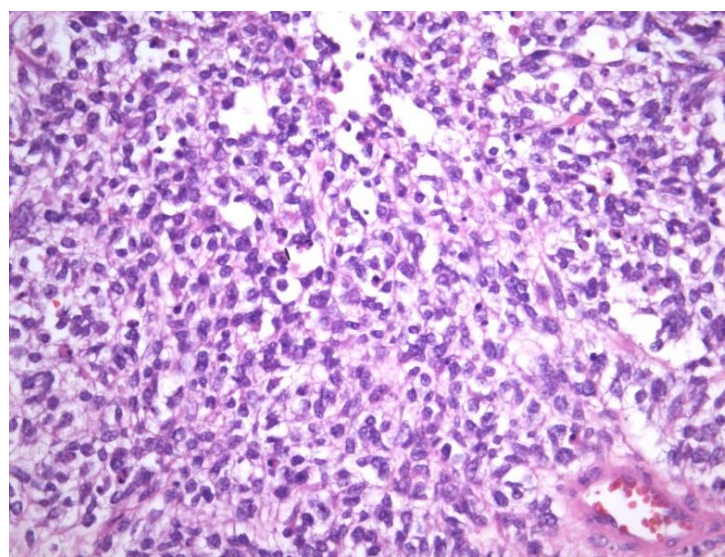
ERMS se karakteriše proliferacijom malih vretenastih ćelija sa okruglim, ovalnim ili izduženim hiperhromatičnim jedrom, neupadljivim jedarcetom i malom količinom blede citoplazme (Slika 2). Ćelije formiraju solidne plaže ili grade fascikuluse. Opisane ćelije predstavljaju najprimitivniji kraj ovog spektra. Krupnije ćelije, koje liče na trake, punoglavca ili pauka predstavljaju diferentovanije rabdomioblaste (Slika 3).

Diferencijacija postaje očiglednija nakon primenjene hemioterapije, kada su diferentovani oblici rabdomioblasta dominantna komponenta histološke slike, pored regresivnih promena indukovanih terapijom (39). Stroma se uglavnom sastoji od rastresitog

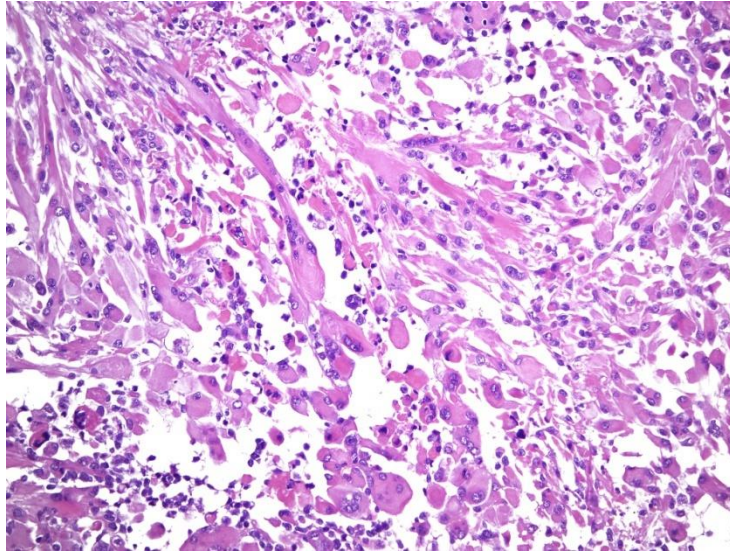
vezivnog tkiva, sa ili fokalnom ili opsežnom miksoidnom promenom (38). U retkim slučajevima u tipičnom ERMS, fokalno ili difuzno, mogu se videti velike atipične hiperhromatične ćelije (anaplastična varijanta) (Slika 4). Prisustvo anaplastične komponente se može videti i u ARMS, mada je češće kod ERMS i tada je udruženo sa lošijom prognozom (40).



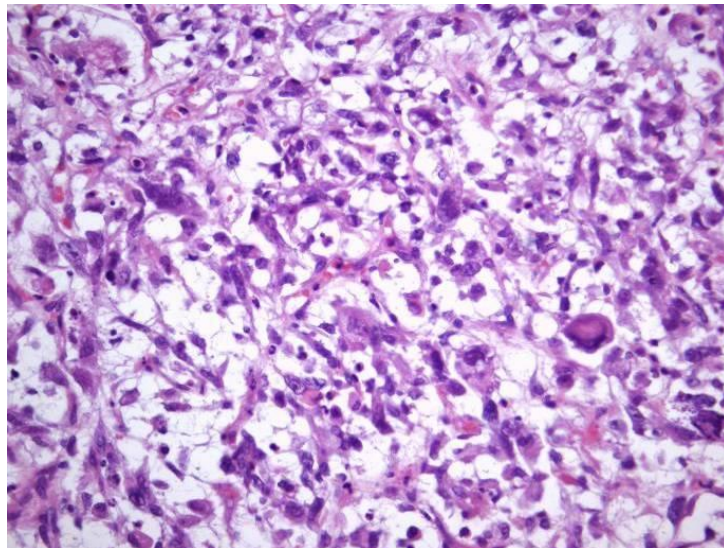
Slika 1. Embrionalni RMS; HE, x200.



Slika 2. Embrionalni RMS; HE, x400.



Slika 3. Embrionalni RMS; HE, x200.



Slika 4. Anaplastična varijanta embrionalnog RMS; HE, x400.

Kod botrioidne varijante ERMS može se reći da je tipična histološka slika submukozna zona povećane celularnosti koja se opisuje kao Nicholsonov kambijalni sloj. Čelije kambijalnog sloja su uglavnom vretenaste, sa relativno malo citoplazme, orjentisane paralelno sa površinom ili mogu biti sitne, limfocitima slične ćelije ispod mukoznih

membrana. U većini slučajeva u tumoru se nalaze razbacane vretenaste ili okrugle forme rabdomioblasta (37).

Vretenasto ćelijski ERMS, je sagrađen od vretenastih ćelija aražiranih u spirale ili fascikuluse. Ove ćelije mogu podsećati na glatko-mišićne ćelije sa bleđim jedrom i suženim krajevima, ali sa očuvanom poprečnom ispruganošću citoplazme.

ERMS ima daleko povoljniju prognozu u odnosu na ostale histološke tipove, posebno kada govorimo o botrioidnom i vretenasto-ćelijskom podtipu (39).

1.5.1.1. Genetske karakteristike embrionalnog rabdomyosarkoma

Citogenetskim studijama nisu ustanovljene karakteristične strukturne hromozomske aberacije, kao u slučaju ARMS. CGH (comparativna genomska hibridizacija) analiza je pokazala da kod ERMS postoje smanjenja i poremećaji količine genetičkog materijala i da se to odnosi uglavnom na cele hromozome, za razliku od ARMS gde se radi o hromozomskim segmentima. Najčešće su uključeni hromozomi 8, 2, 11, 12, 13 i 20. Trizomije 7 i 11 kao i duplikacije 7q i 11q su specifične za ERMS. Od monozomija najviše su zastupljene -10, -15 a od delecija -3p, -6p, -9p, -10q, -16p, -22q (42, 43).

U većini ERMS, gubitak hromozoma, delecije ili uniparentalna dizomija, rezultiraju gubitkom jednog od dva alela brojnih lokusa hromozoma 11 (44).

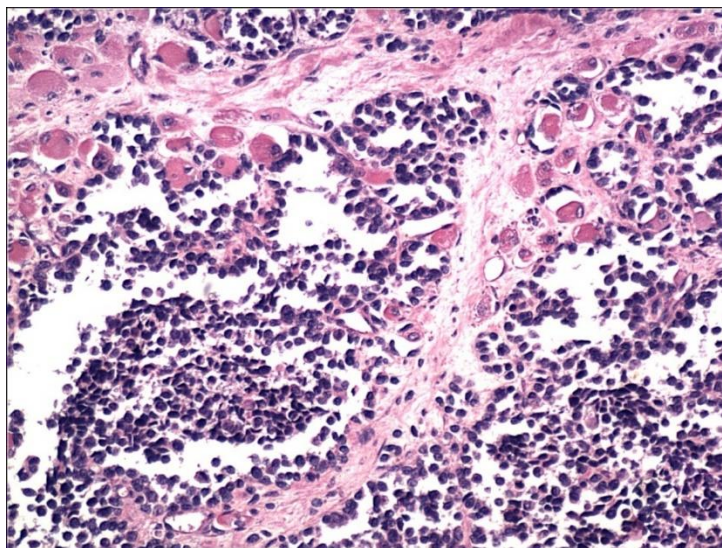
Kod ERMS-a je uočen gubitak heterozigotnosti na 11p15 lokusu. Ovaj gubitak heterozigotnosti lokalizovan na 11p15.5 hromozomu koji sadrži imprintovane gene (geni aktivni sa samo jednog alela u zavisnosti od toga od kojeg je roditelja taj alel nasleđen). Imprintovani geni kodiraju insulinu-sličan faktor rasta 2 (IGF2), negativni regulator ćelijskog rasta, inhibitor ciklin zavisne kinaze (p57, Kip2) i druge (48). Ovi dokazi ukazuju da je tokom tumorogeneze ERMS došlo do inaktivacije imprintovanog tumor supresor gena, tako što se dešava gubitak aktivnog alela a retencija inaktivnog, a što rezultira pojačanom ekspresijom IGF-II gena lociranog na kratkom kraku 11 hromozoma. Rezultat ove pojave je postojanje konstantnog signala za nekontrolisanu proliferaciju, najverovatnije već transformisane mišićne ćelije, kao i sprečavanje smrti iste (39).

Analizom individualnih gena kod sporadičnih ERMS došlo se do izdvajanja nekoliko važnih onkogenih puteva: poremećaj funkcije *Rb1* i *TP53* tumor - supresora (45),

(46),(47), *RAS* mehanizama signalizacije (48), aktivacija hedgehog signalnog puta (49), mutacije gena fibroblastnog faktora rasta 4 (*FGFR4*) (50), povećan broj kopija *ALK* genskog lokusa (54), i na kraju epigenetska inaktivacija metilacijom nekih tumor supresornih gena i gena povezanih sa diferencijacijom (54).

1.5.2. Alveolarni rabdomiosarkom

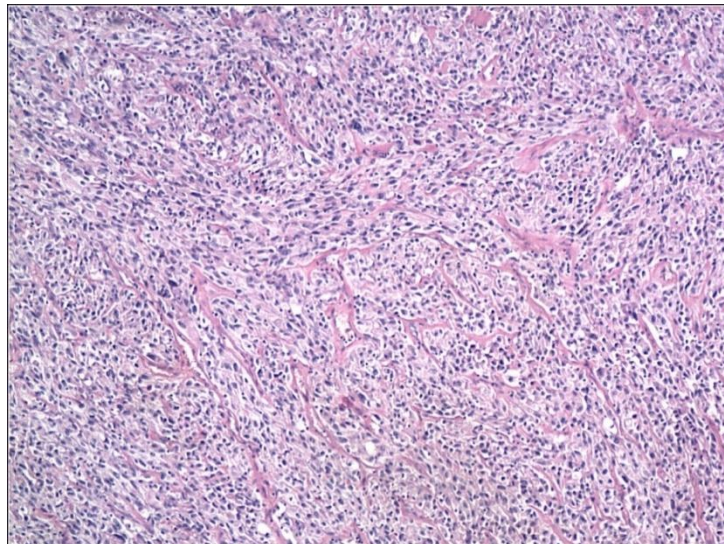
Alveolarni rabdomiosarkom (ARMS) morfološki predstavlja ekvivalent stadijuma miotubusa, u razvoju normalnog skeletnog mišića (37). To je izuzetno celularan tumor sastavljen od nepravilnih i često nejasno ograničenih grupa slabo diferentovanih ćelija, tako da liči na Ewing sarkom ili limfom (51), 53). Ćelije su obično velike i uniformne, sa okruglim hiperhromatičnim jedrom i naglašenim jedarcetom, sa malom do umerenom količinom citoplazme. Fokalno se mogu uočiti i rabdomioblasti koji sadrže obilniju svetlo eozinofilnu citoplazmu (38).



Slika 5. Alveolarni RMS; HE, x100.

Morfološki izgled ovog tumora je varijabilan u zavisnosti od količine fibrozne strome. Tipični ARMS karakteriše stvaranje fibrovaskularnih septi koje razdvajaju diskretna gnezda tumorskih ćelija, nalik plućnim alveolama (Slika 5). Na periferiji gnezda, karakteristično, ćelije gube kohezivnost. Ćelije koje oblažu septe imaju izgled drvene

ograde (39). Dijagnostički važnu karakteristiku ARMS predstavlja prisustvo multinuklearnih džinovskih ćelija, koje zbog periferne lokalizacije jedara liče na venac.



Slika 6. Solidna varijanta ARMS; HE, x200.

Solidna varijanta ARMS se odlikuje odsustvom fibrovaskularne strome i alveolarne tkivne arhitektonike, pri čemu ćelije pokazuju minimalan stepen rbdomioplastne diferencijacije (Slika 6) (39).

Tumori kod kojih postoji kombinacija embrionalne i alveolarne građe ranije su smatrani podtipom ARMS (53).

1.5.2.1. Genetske karakteristike alveolarnog rbdomiosarkoma

Citogenetska analiza pokazuje česte translokacije koje su posebno povezane sa ARMS. ARMS se karakteriše recipročnim translokacijama i to uglavnom $t(2; 13)(q35, q14)$, dok je $t(1; 13)(p36, q14)$ zabeležena u manjem broju slučajeva. Ove translokacije dovode do fuzionisanja *PAX3* gena na hromozomu 2 sa *FKHR (FOXO1)* genom na hromozomu 13, i do premeštanja *PAX7* gena na sa hromozoma 1 uz *FKHR (FOXO1A)* gen (54). Ovi himerni fuzioni proteini imaju snažnu funkciju transkripcionih aktivatora sa onkogenim efektom (55). *PAX3-FOXO1* fuzioni protein je prisutan u oko 55% ARMS, a *PAX7-FOXO1* u oko 22%, dok su preostali slučajevi označeni kao fuzija-negativni ARMS

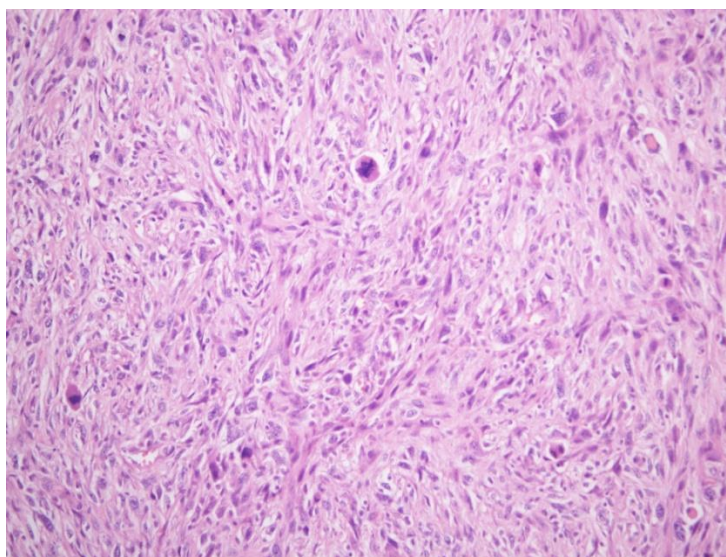
(56). Fuzija-negativni ARMS ne razlikuju se na nivou ekspresije gena i u pogledu kliničkog ishoda od ERMS, što dovodi do toga da neki autori smatraju da je fuzioni status faktor koji definiše ARMS (9, 58, 59).

Fuzija-pozitivni ARMS je poznat po pojavi čestih genomskih amplifikacija (43), na primer *MYCN* onkogen na 2p24 (i to i kod *PAX3-* i *PAX7-FOXO1* pozitivnih slučajeva) (59). Amplifikacija 12q13-14 regiona obuhvata 27 gena, uključujući i *CDK4* i karakteristična je samo za *PAX3-FOXO1* pozitivne slučajeve (59). Za amplifikaciju miR-17-92 micro RNA unutar 13q31 regiona može se reći da je obeležje *PAX7-FOXO1* pozitivnih slučajeva (60).

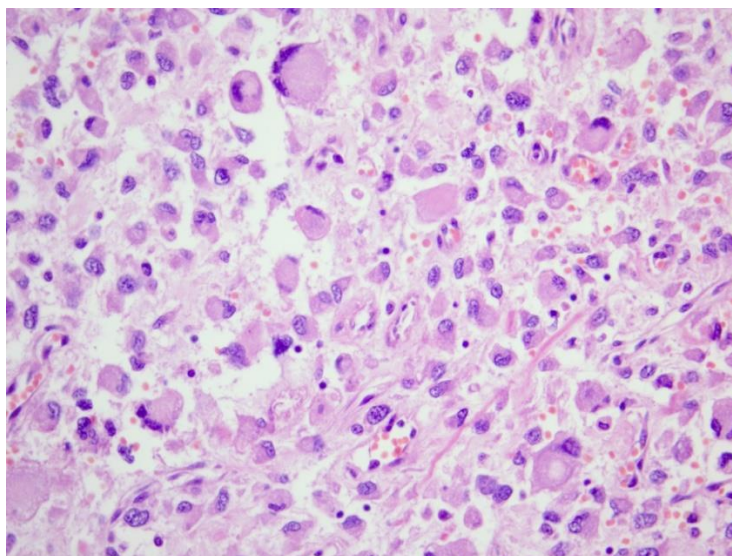
Analizom pojedinačnih gena u sporadičnim ARMS pokazano je da postoji nekoliko značajnih onkogenih mehanizama kao što su inaktivacione mutacije *TP53* i *CDKN2A/CDKN2B* (46), a u manjem broju slučajeva mutacije *FGFR4* (61).

Povećan broj kopija *ALK* gena i snažna citoplazmatska ekspresija *ALK* proteina je uočena kod velikog broja slučajeva ARMS (62). Nekoliko poznatih tumor supresornih gena (*RASSF1*, *HIC1* i *CASP8*) su hipermetilovani i time epigenetski inaktivirani (64, (64).

Unutar ARMS podtipa kod koga postoji *PAX3-FOXO1* fuzija povezan je sa lošijom prognozom, naročito ako je u pitanju diseminovana bolest (56).



Slika 7. Pleomorfni RMS; HE, x200.



Slika 8. Pleomorfni RMS; HE, x400.

1.5.3. Pleomorfni rhabdiosarkom

Pleomorfni RMS se odlikuje izraženim ćelijskim i tkivnim pleomorfizmom (Slika 7). Ćelije su različitog oblika (okrugle ili vretenaste) i veličine (sitnije ili krupnije), sa često jako eozinofilnom citoplazmom. U ovom histološkom tipu RMS prisutni rhabdioblasti su različitog izgleda (Slika 8). Kaišasti ili trakasti rhabdioblasti su najvoluminoznije ćelije sa više jedara i citoplazmom cik-cak izgleda. Reketasti rhabdioblasti su nepravilnih granica i vakuolizovane citoplazme sa ekscentrično postavljenim jedrom. Paučinasti rhabdioblasti su ćelije sa brojnim vakuolama i nitima u citoplazmi (37, 39, 38).

Prognoza ovog histološkog tipa je izuzetno loša i pouzdani prognostički faktori još uvek nisu ustanovljeni, a terapijske modalitete je teško odrediti zbog oskudnih podataka o pleomorfnom RMS koji se isključivo javlja u adultnoj populaciji (17).

1.5.3.1. Genetske karakteristike pleomorfnog rhabdiosarkoma

Citogenetske studije pleomorfnog RMS otkrivaju kompleksan kariotip koji se ne razlikuje mnogo od ostalih adultnih pleomorfni sarkoma (65) i spada u grupu sarkoma sa varijabilnim, kompleksnim genetskim alteracijama bez određenog obrasca (66). Numeričke i strukturne abnormalnosti su uobičajene sa viškom hromozoma 1, 5, 8, 14, 18, 20, i 22 i

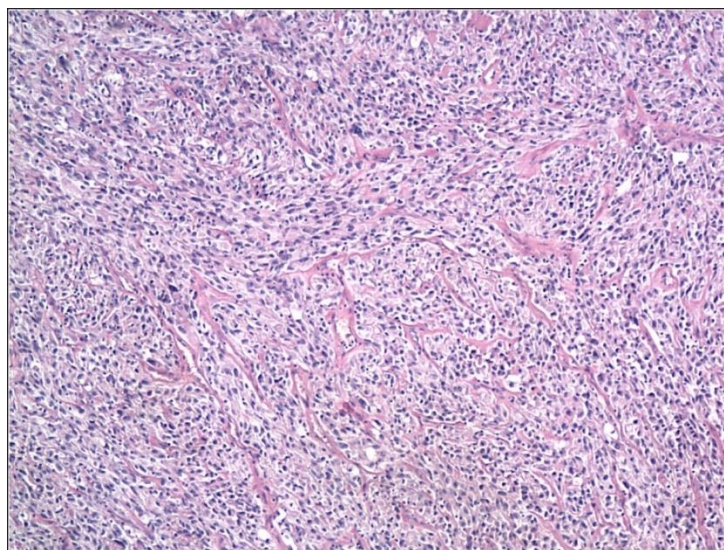
gubitkom hromozoma 2, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 15,16, 17, 18, 19 i Y, pri čemu je najčešće detektovan gubitak hromozoma 2, 13, 14, 15, 16, i 19. Kod pleomornog RMS nije uočena translokacija karakteristična za ARMS (66).

1.5.4. Vretenasto ćelijski/skleroizirajući rabdomyosarkom

Retka varijanta RMS sa vretenasto ćelijskom morfolologijom, prvi put je opisana u pedijatrijskoj populaciji sa paratestikularnom lokalizacijom (67).

Mikroskopski, to je tumor infiltrativnog rasta, sa storiformno ili fascikularno aranžiranim ćelijama (Slika 9). Dominanto se sastoji od vretenastih naeoplastičnih ćelija sa ovalnim ili izduženim jedrom, vezikularnim hromatinom, neupadljivim jedarcetom i eozinofilnom citoplazmom. Nuklearna atipija i mitotske figure su uobičajene. U tumoru se mogu uočiti retki, razbacani eozinofilni rbdomyoblasti sa hiperhromatičnim ekscentrično postavljenim jedrom. Poprečna ispruganost se povremeno može uočiti.

RMS ove morfologije može pokazivati i hijalinizaciju strome različitog intenziteta, sa ćelijama aranžiranim u gnezda, mikroalveole ili trabekule dajući pseudovaskularni izgled, pa se tada označava kao skleroizirajući RMS (39, 38).



Slika 9. Skleroizirajući tip RMS; HE, x100.

1.5.4.1. Genetske karakteristike vretenasto ćelijskog rabdomyosarkoma

Citogenetske studije ograničenog broja slučajeva, pokazale su aneuploidije sa najčešće viškom hromozoma, kao i nekarakteristične strukturne abnormalnosti. *PAX3- I PAX7-FOXO1* fuzija je uvek odsutna (39).

U pedijatrijskoj populaciji ova varijanta RMS obično se dijagnostikuje u ranom stadijumu (IRS- I ili II), i za razliku od ostalih histoloških tipova metastaze su prisutne u malom broju slučajeva (16%). Pacijenti u ovoj grupi imaju lokalizovanu bolest i povoljan ishod, pa je petogodišnje preživljavanje dosta visoko (95%). U adultnoj populaciji, prognoza je značajno lošija, sa recidivima i metastazama koje se dijagnostikuju kod skoro polovine pacijenata (39).

Očigledno je da se RMS sastoji od morfološki sličnih ali biološki raznovrsnih lezija. Postavljanje tačne dijagnoze odnosno histološkog tipa RMS, od presudne je važnosti u terapiji ovog tumora. Na osnovu prognostičkog značaja histoloških tipova RMS, predložena je Međunarodna Klasifikacija od strane Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG) (Tabela 1).

Tabela 1. Međunarodna Klasifikacija RMS

Povoljna prognoza	Botrioidni rabdomyosarkom
	Vretenasto ćelijski rabdomyosarkom
Intermedijarna prognoza	Embrionalni rabdomyosarkom
Loša prognoza	Alveolarni rabdomyosarkom
	Nediferentovani sarkom
Podtipovi bez procenjene prognoze	Rabdomyosarkom sa rabdoidnim izgledom

Lečenje RMS u adultnoj populaciji u velikoj meri se zasniva na principima Američkih i Evropskih Kooperativnih Grupa za lečenje dece s RMS, koja podrazumeva multimodalni pristup terapiji (hirurška, radio- i hemioterapija) (38).

1.6. Stadijumi rabdomiosarkoma

Ubikvitarna lokalizacija RMS rezultira različitim kliničkim manifestacijama i različitim putevima diseminacije bolesti. Postoje značajne razlike u ponašanju ovog tumora u zavisnosti od lokalizacije, histološkog tipa, veličine, diseminacije bolesti, mogućnosti kompletnog hirurškog uklanjanj i starosti pacijenta u vreme postavljanja dijagnoze. Na osnovu ovih utvrđenih prognostičkih faktora pacijenti se svrstavaju u prognostičke grupe (niskog, srednjeg i visokog rizika) što određuje dalju terapijski pristup.

Najšire primenjivan sistem za određivanje kliničkog stadijuma je IRSG. Od kada je formiran IRSG 1972 godine, ishod pacijenata obolelih od RMS značajno je poboljšan (68). Ukupno preživljavanje, za pacijente sa lokalizovanim RMS, se kreće od 55% kod IRSG-I do 71% kod IRSG-IV (69, 70). Međutim, uprkos nekoliko randomizovanih studija sistemska hemioterapija je uglavnom ostala nepromenjena od 1970 godine. Sa formiranjem Children's Oncology Group (COG) 2000 godine, naponi IRSG su nastavljani u okviru COG Soft-Tissue Sarcoma (COG-STS) komiteta (71).

1.6.1. Klinički i biološki faktori za određivanje prognostičkih grupa

Određivanje prognostičkih grupa se bazira i na preterapijskom TNM sistemu za određivanje stadijuma i na hirurško/patološkom kliničkom grupisanju prema pravilima utvrđenim od strane IRSG (72). Klinička grupa se određuje nakon inicijalne hirurške a pre primene sistemske terapije, i prvenstveno se temelji na tome da li postoji rezidualni tumor nakon operativnog zahvata kao i zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa (Tabela 2) (71).

IRSG sistem kliničkog grupisanja se pokazao kao izuzetan za predviđanje ishoda bolesti kod ovih pacijenata (73). Trogodišnje preživljavanje za pacijente grupisane prema IRSG-IV je bilo 83% u grupi I, 86% u grupi II, i 73% u grupi III (70). Pacijenti svrstani u IV prognostičku grupu RMS imali su stopu preživljavanja <30% (74, 75).

Pored kliničke grupe, i stadijum RMS je značajan prognostički faktor. Trogodišnje preživljavanje za pacijente IRSG-IV je bilo 86% u stadijumu 1, 80% u stadijumu 2, i 68% za stadijum 3.

Tabela 2. IRSG klinička (posthiruška) klasifikacija

Grupa	Proširenost bolesti
Grupa I	Lokalizovana bolest, kompletna resekcija
Grupa Ia	Ograničena na mesto porekla
Grupa Ib	Infiltrativan, izvan mesta porekla; negativni limfni čvorovi
Grupa II	Potpuna makroskopska resekcija sa regionalnim širenjem
Grupa IIa	Lokalizovan tumor sa ali sa mikroskopskim reziduama
Grupa IIb	<ul style="list-style-type: none"> • Makroskopski odstranjen tumor sa zahvatanjem regionalnih limfnih čvorova • Bez mikroskopskih rezidua
Grupa IIc	<ul style="list-style-type: none"> • Makroskopski odstranjen tumor sa zahvatanjem regionalnih limfnih čvorova • sa mikroskopskim reziduama
Grupa III	Nepotpuno makroskopski odstranjen tumor
Grupa IIIa	Lokalizovana ili regionalna bolest, Biopsija
Grupa IIIb	Lokalizovana ili regionalna bolest, Resekcija (resekcija više od 50% tumora)
Grupa IV	Udaljene metastaze

IRSG sistem za određivanje stadijuma zavisi od mesta primarnog tumora, veličine tumora, invazivnosti, zahvaćenosti limfnih čvorova i prisustva udaljenih metastaza (Tabela 3) (70). Kada govorimo o lokalizaciji RMS ona može biti povoljna: kada je primarno mesto tumora u predelu orbite, glave i vrata (osim parameningealno), genito-urinarnog trakta (izuzev mokraćne bešike ili prostate) ili nepovoljna: mokraćna bešika, prostata, ekstremiteti, parameningealno, trup, retroperitoneum. Veličina tumora preko 5cm, zahvaćenost limfnih čvorova, kao i diseminovana bolest predstavljaju loš prognostički znak (61).

Pored navedenog, prognostički faktor za RMS su godine u vreme postavljanja dijagnoze kao i histološki tip. Godine do neke mere koreliraju sa histološkim tipom i lokalizacijom tumora. Tako je ERMS češći u mlađoj starosnoj grupi, do 10 godine a kasnije

se češće javljaju ARMS i pleomorfni RMS, i to na lokalizacijama sa lošijom prognozom (76). Godine predstavljaju nezavistan prognostički faktor. Naime, kod dece starije od 10 godina života preživljavanje je kraće nego kod mlađih prema IRS-II i IRS-IV (77).

Tabela 3. TNM klasifikacija (preterapijska) RMS prema IRSG

Stadijum	Primarno mesto	T ^a	Veličina ^b	Limfni čvor ^c	Metastaze ^d
1	Orbita, glava i vrat (izuzev PM), GU (NE MB/P), bilijarni trakt	T ₁ ili T ₂	a ili b	N0 ili N1 ili Nx	M0
2	MB/P, ekstremiteti, PM, ostala (trup, retroperitoneum)	T ₁ ili T ₂	a	N0 ili Nx	M0
3	MB/P, ekstremiteti, PM, ostala (trup, retroperitoneum)	T ₁ ili T ₂	a b	N1 N0 ili N1 ili Nx	M0 M0
4	Bilo koja	T ₁ ili T ₂	a ili b	N0 ili N1 ili Nx	M1

PM, parameningealno; B/P, mokraćna bešika/prostata. ^aT: T₁, ograničen na mesto porekla, T₂, proširen izvan mesta porekla i/ili infiltrira okolinu. ^bVeličina, ≤5 cm u prečniku; b, >5 cm u prečniku;

U naporima da se odredi što efikasniji terapijski pristup COG-STS, je razvio sistem po kome se pacijenti svrstavaju u grupe rizika (niskog, srednjeg i visokog), a na osnovu preterapijskog stejdžinga (koga određuje primarna lokalizacija tumora i TNM status) i rasprotranjenosti bolesti nakon hiruške resekcije (klinička grupa). Pravila koja određuju u koju grupu će biti svrstani pacijenti sa RMS se konstantno menjaju a u zavisnosti od novih saznanja, posebno u domenu molekularno-genetskih ispitivanja. Trenutno važeći stratifikacioni sistem je prikazan u Tabeli 4. (16).

Tabela 4. Grupe rizika u odnosu na stadijum, kliničku grupu, lokalizaciju i histološki tip RMS

Grupe rizika	Preterapijski stadijum	Klinička grupa	Lokalizacija	Histološki tip
Niskog 1	1 ili 2	I ili II	Povoljna ili Nepovoljna	ERMS
	1	III	Orbita	ERMS
Niskog 2	1	III	Povoljna	ERMS
	3	I ili II	Nepovoljna	ERMS
Srednjeg	2 ili 3	III	Nepovoljna	ERMS
	1-3	I-III	Povoljna ili Nepovoljna	ARMS
Visokog	4	IV	Povoljna ili Nepovoljna	ERMS
	4	IV	Povoljna ili Nepovoljna	ARMS

1.7. Ćelijski ciklus

Ćelijski ciklus karakteriše serija cikličnih promena kroz koje prolazi ćelija stimulisana na deobu a koje su jasno definisane biohemijskim i morfološkim kriterijumima. Ćelijski ciklus je precizno organizovan proces koji obezbeđuje potpunu i tačnu replikaciju DNK pre deobe ćelije (78).

Ćelijski ciklus je podeljen u četiri faze: S, G₂, M i G₁.

Tokom **S faze** (S=sinteza), odvija se replikacija, odnosno sinteza nukleusne DNK. Trajanje S faze je različito, od nekoliko minuta u ranim embrionalnim ćelijama, do nekoliko sati u većini somatskih ćelija.

G₂ faza (G=gap, pukotina *engl.*) je period između S i M faze, kada ćelije imaju repliciranu DNK i spremaju se za deobu. Ova faza se automatski odvija u svim ćelijama koje uđu u S fazu.

U toku **M faze** (M=mitoze), dolazi do podele jedarnog materijala – kariokineze, i podele citoplazme – citokineze. Ovo je ujedno i najkraća faza ciklusa i kod tipične ćelije sisara traje oko jednog sata.

G₁ faza je period ćelijskog rasta tokom koje se obezbeđuje povećanje ćelijske mase. Trajanje ove faze varira, i zavisi od ćelijskog tipa i prisustva faktora rasta i osnovnih nutritivnih faktora. Ukoliko uslovi za proliferaciju nisu odgovarajući, ćelija ostaje u produženoj G₁ fazi. U slučajevima kada je neophodna brza ćelijska proliferacija, G₁ faza se skraćuje i ćelija odmah počinje da vrši sintezu DNK i ulazi u S fazu, bez obzira na veličinu.

1.7.1. Regulacija ćelijskog ciklusa

Postoje tri osnovne grupe proteina značajne za odvijanje ćelijskog ciklusa: ciklin-zavisne kinaze (*engl.* Cyclin-dependent kinases - CDKs), ciklini i inhibitori ciklin-zavisnih kinaza (Cyclin-dependent kinases inhibitors - CDKIs) (79). CDKs su familija protein kinaza koje su odgovorne za ključne prelaze između pojedinih faza ćelijskog ciklusa. Kada su aktivirane, CDKs fosforilišu druge proteine i na taj način obavljaju svoju specifičnu ulogu u ćelijskom ciklusu (80).

Ciklini su proteini koji kada su prisutni u dovoljnoj koncentraciji aktiviraju CDKs. Podeljeni su u tri klase: G₁-S, S i M cikline. U grupu G₁-S spadaju ciklin D i E, koji su važni za G₁ progresiju i G₁-S prelaz. S familija uključuje cikline A1 i A2, a M familija cikline B1 i B2. Do danas je poznato 10 vrsta ciklina (označenih od A-J). Među nekim vrstama postoji više podvrsta (ciklin D₁, D₂ itd.), tako da je kod sisara do sada identifikovano 15 vrsta ciklina. Prema funkciji, ciklini se dele na G₁ cikline i mitotičke cikline. U G₁ cikline spadaju ciklin C₁, D₁-D₃ i ciklin E, a u mitotičke ciklin A i B. Ciklini G₁ su odgovorni za prelaz iz G₁ u S fazu ćelijskog ciklusa. Ciklin B reguliše prelaz iz G₂ u M fazu. Do sada jedini opisan ciklin sa dvostrukom ulogom u ćelijskom ciklusu je ciklin A. On je neophodan za DNK replikaciju tokom S faze i aktivan je u inicijaciji mitoze (79).

Većina ciklina pokazuje fluktuacije u ekspresiji tokom ćelijskog ciklusa, za razliku od CDKs čiji je nivo ekspresije relativno konstantan (81).

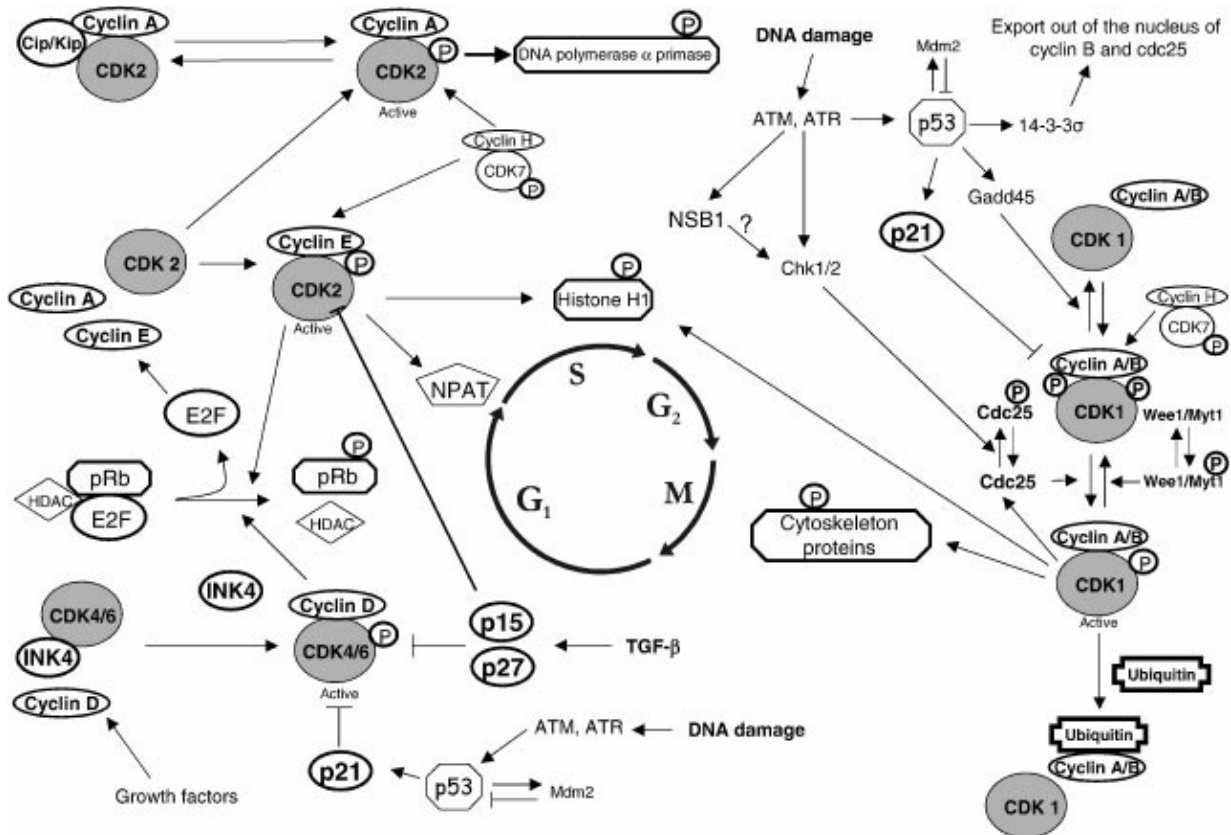
CDK su enzimi koji vrše fosforilaciju (dodavanje fosfatnih grupa na specifične aminokiseline u proteinima) određenih ključnih proteina, pa ih tako najčešće aktiviraju. Kod čoveka je identifikovano ukupno 9 različitih CDK, obeleženih brojevima od 1-9. Posle sinteze, ova kinaza je u inaktivnom stanju i za njenu aktivaciju potrebno je da se za nju veže odgovarajući ciklin. Pored toga, potrebna je i dodatna fosforilacija CDK, koju obavlja jedna druga kinaza.

CDKIs kontrolišu aktivnost kompleksa CDK-ciklina. Dok je ekspresija CDKs i ciklina ista u različitim tipovima ćelija i tkiva, ekspresija CDKIs je često specifična za određene ćelije i tkiva. Postoje dve familije CDKIs, INK4 (Inhibitori CDK4) koju čine: (*p15^{Ink4b}*, *p16^{Ink4a}*, *p18^{Ink4c}* i *p19^{Ink4d}*) i Cip/Kip (CDK interreagujući protein ili kinazni inhibitorski protein) koja ima tri člana: (*p21^{Cip1/Waf1}*, *p27^{Kip1}* i *p57^{Kip2}*). Molekuli INK4 porodice inhibitorski deluju na D-CDK4/CDK6 i tako inaktiviraju transkripciono-supresorsku funkciju *pRb* (80).

Ćelijski ciklus je regulisan nizom kontrolnih mehanizama koji mogu da spreče njegovo dalje odvijanje u slučaju neuspešnog završetka predhodne faze, delujući na dva najznačajnija kontrolna punkta i to prelaz iz G_1 u S fazu i prelaz iz G_2 u M fazu (Slika 10).

Prelaz iz G_1 u S fazu- zavisi od stanja fosforilacije pRb. pRb je u svojoj hipofosforilisanom formi, tokom G_1 faze, vezan u kompleks sa E2F transkripcionim faktorom čime ga inaktivira i onemogućava proliferaciju. Dejstvom mitogena dolazi do sinteze ciklina D. Kompleks ciklina D sa odgovarajućim CDK4 i 6 dovodi do fosforilacije pRb. To uslovljava oslobađanje transkripcionog faktora E2F koji započinje transkripcija gena neophodnih za sintezu DNK, kao i za ciklin E i ciklin A, čije prisustvo je neophodno za dalju progresiju ćelijskog ciklusa.

Prelaz iz G_2 u M fazu - zavisi od ciklina B, odnosno kompleksa ciklin B/CDK1. Ukoliko dođe do oštećenja DNK, aktivacijom p53 zaustavlja se progresija ćelijskog ciklusa. p53 dovodi do sinteze p21 koji sprečava aktivnost CDK i zaustavlja ćeliju u G_2 fazi ćelijskog ciklusa. Ukoliko se oštećenje DNK ne može popraviti p53 indukuje aktivaciju apoptoze (79).



Slika 10. Putevi regulacije ćelijskog ciklusa (81).

Nekontrolisana ćelijska proliferacija koja je u osnovi nastanka tumora se javlja kao posledica poremećaja ćelijskog ciklusa. Smatra se da su u tumorskim ćelijama inaktivirani mehanizmi koji sprečavaju ćelijsku deobu. Gubitak funkcije pRb-a i p53 stimuliše abnormalnu proliferaciju ćelija. I pozitivni (ciklini i CDKs) i negativni (CKI) regulatori ćelijskog ciklusa koji funkcionišu preko pRb-a takođe mogu biti izmenjeni tokom proliferativnih bolesti.

1.8. Genetski mehanizmi kancerogeneze

Maligne bolesti nastaju neoplastičnom transformacijom ćelija i tkiva. Neoplastična transformacija je proces narušavanja tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane

proliferacije ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. To je višestepeni proces genetskih izmena koje dovode do transformacije normalne ćelije u malignu.

Geni uključeni u procese maligne transformacije mogu se podeliti u dve grupe – onkogene i tumor-supresorske gene.

Onkogeni su geni čiji proteinski produkti stimulišu ćelijski rast i deobu tumorskih ćelija. Nastaju aktivacijom protoonkogenata. Protoonkogeni, predstavljaju normalne gene sa funkcijom u ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi, koji se vremenski i prostorno strogo kontrolisano eksprimiraju.

Mutacije protoonkogenata su dominantne- dovoljna je alteracija jednog alela da bi se ispoljio karcinogeni efekat. Te alteracije mogu biti: tačkaste mutacije, amplifikacije gena, hromozomski rearanžmani (najčešće translokacije). (43).

Tumor-supresorski geni su geni čiji proteinski produkti inhibiraju ili suprimiraju neoplastičnu transformaciju. Mutacije u njima dovode do supresije njihove ekspresije ili inaktivacije proteinskog produkta. Za razliku od protoonkogenata, mutacije su im recesivne – neophodna je izmena oba alela (homozigotno stanje) da bi došlo do karcinogenog efekta (82).

Na osnovu funkcije tumor-supresori mogu biti:

- regulatori ćelijskog ciklusa
- regulatori signalne transdukcije
- geni uključeni u međućelijske interakcije i interakcije ćelije i matriksa
- regulatori apoptoze
- DNK reparacije

1.9. Epigenetički mehanizmi kancerogeneze

Epigenetički procesi podrazumevaju promene u obrascu ekspresije gena, koje nisu posledica promena u sekvenci molekula DNK (83). Osnovna razlika u odnosu na genetičke promene je reverzibilnost (83). Glavni mehanizmi epigenetičke regulacije su metilacija DNK, modifikacija histona i regulacija ekspresije gena posredstvom regulatornih nekodirajućih molekula mikro RNK. Ovi mehanizmi deluju koordinisano u kontroli i uspostavljanju obrazaca genske ekspresije (84). Naime, epigenetičke modifikacije deluju

poput prekidača u kontroli aktivnosti gena, odnosno stišavaju gene čija ekspresija nije potrebna, a aktiviraju one koji su potrebni za diferencijaciju i funkciju određene vrste ćelija.

Pojava epigenetičkih lezija je često rani događaj u kancerogenezi, mada prisustvo aberantne metilacije samo za sebe ne mora da znači postojanje invazivnog tumora, pošto nije redak slučaj da se metilacione promene detektuju i u premalignim stanjima kao što je slučaj kod kolorektalnog adenoma, skvamozne metaplazije (84).

1.9.1. Metilacija DNK

Uloga metilacija molekula DNK je značajna za procese koji učestvuju u embrionalnom razvoju, diferencijaciji ćelija kao i u održavanju homeostaze u ćelijama. Regulacija ekspresije gena i održavanje stabilnosti genoma su mehanizmi koji obezbeđuju odvijanje navedenih procesa (85). Najznačajnija epigenetička modifikacija u humanom genomu je metilacija citozinskih ostataka u okviru CpG dinukleotida.

U genomu čoveka, 70-80% citozina u okviru pomenutih dinukleotida, je metilovano (86). Ostatak CpG dinukleotida nalazi se u okviru tzv. CpG ostrvaca (87). Ostrvca predstavljaju sekvence DNK duže od 200 baznih parova, sa sadržajem G+C iznad 50 % i odnosom uočene i statistički očekivane učestalosti CpG dinukleotida od najmanje 60% (88).

Metilacija DNK je postreplikativni proces (89). Regulacija transkripcije podrazumeva sinergističko delovanje metilacije DNK i modifikacije histona. Postoji više teorija koje se bave mehanizmima kojim metilacija CpG ostrvca onemogućava transkripciju gena. Jedna od opšte prihvaćenih je da metilovane CpG dinukleotide prepoznaju i za njih se vezuju proteini iz grupe metil-citozin vezujućih proteina (MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP1, MeCP2). Ovi proteini aktiviraju enzime histon-deacetilaze (HDAC), koje će ukloniti acetil grupe sa histona i stvoriti preduslove za formiranje zatvorene strukture hromatina (90).

1.9.2. Uloga metilacije DNK u kancerogenezi

U malignoj ćeliji gotovo da je uobičajeno da dolazi do narušavanja normalnih obrazaca metilacije DNK, i to u smislu globalne hipometilacije i region specifične

hipermetilacije (91). Proces demetilacije zahvata CpG dinukleotide koji nisu grupisani u CpG ostrvca, već su rasuti po genomu, što ima za posledicu hromozomsku nestabilnost, gubitak imprintinga, reaktivaciju transpozona i retrovirusa i aktivaciju pojedinih onkogeno (92).

Hipermetilacija predstavlja *de novo* metilaciju normalno nemetilovanih CpG ostrvaca u sastavu promotorskih regiona gena, što deluje kao snažan supresor genske ekspresije i povezano je sa formiranjem transkripciono neaktivnih struktura hromatina. Pokazano je da su pojedini geni u humanim tumorima inaktivirani isključivo na ovaj način, a metilacija DNK tako predstavlja alternativni mehanizam mutacijama i delecijama u suprimiranju ekspresije gena (93, 94).

1.10. Funkcija ciklina A i njegov značaj u kancerogenezi

Ciklin A je protein, koji je uključen u kontrolu replikacije molekula DNK i ćelijskog ciklusa. Poznato je da kod ljudi postoje dve forme ovog ciklina: A1 i A2. Gen *CCNA1* odgovoran za produkciju ciklina A1 lokalizovan je na hromozomu 13, dok je gen *CCNA2* koji kodira drugu formu smešten na hromozom 4. Ciklin A1 značajan je u procesima embriogeneze, kao i u regulaciju mejoze (95). S druge strane, ciklin A2 učestvuje u procesima vezanim za kontrolu ćelijskog ciklusa somatskih ćelija (96). Ovaj ciklin je zanimljiv zbog činjenice da može da formira komplekse sa dve ciklin zavisne kinaze: CDK1 i CDK2. Ova osobina omogućava proteinu da bude uključen u kontrolu nekoliko etapa ćelijskog ciklusa. Tokom S faze ciklin A formira kompleks sa ciklin zavisnom kinazom 2. Ovaj kompleks učestvuje u kontroli inicijacije replikacije molekula DNK. Takođe, fosforilacija CDC6, koji je deo replikacionog kompleksa, osigurava da će DNK biti replikovana samo jednom tokom S faze. Krajem S faze ciklin A se vezuje za CDK1 (97). Postojanje ovog kompleksa omogućava aktivaciju ciklina B i njegovo vezivanje za CDK1, što u krajnjoj liniji dovodi do degradacije ciklina A pre ulaska u metafazu. Ciklin B u kompleksu sa CDK1 bitan je za dalje odvijanje mitoze (98).

Kontrola ekspresije ciklina A obavlja se na nivou transkripcije. E2F je jedan od ključnih regulatora nivoa ciklina A u toku ćelijskog ciklusa. Ovaj transkripcioni faktor vezuje se za specifične sekvence u okviru promotora gena *CCNA2* i na taj način dovodi do

aktivacije transkripcije. Pokazano je da povećanje nivoa proteina p53 nakon oštećenja DNK, dovodi do inhibicije sinteze ciklina A, proteina p21. Ovaj protein sprečava delovanje kompleksa ciklin D-CDK4 što održava E2F u kompleksu sa proteinom Rb (99).

Pokazano je da poremećaj ekspresije ciklina A, može imati značajnu ulogu u tumorogenezi (100). Prekomerna ekspresija ciklina A je uočena u velikom broju humanih tumora, kao što su karcinom usne duplje (101), karcinom kolona (102), karcinom laringisa (103), maligni melanom (104), karcinom štitaste žlezde (105), karcinom pluća (106), adenokarcinom prostate, karcinom bubrega i uretera (107). Prekomerna ekspresija ciklina A u ovim tumorima je u korelaciji sa nepovoljnim prognostičkim faktorima. Nasuprot tome, pokazana je prekomerna ekspresija ciklina A u normalnoj sluznici kolona (102) i u karcinomu jajnika sa dužim periodom preživljavanja (108).

1.11. Funkcija ciklina D1 i njegov značaj u kancerogenezi

Gen *CCND1* lokalizovan je na hromozomu 11p13 i često podleže alteracijama tokom neoplastične transformacije (109). Proteinski produkt ovog gena, protein ciklin D1, značajna je karika p16-Rb signalnog puta, odgovornog za kontrolu ćelijskog ciklusa. Ciklin D1 svoju funkciju u ćeliji ostvaruje preko interakcije sa ciklin zavisnim kinazama 4 i 6. Vezivanje ciklina dovodi do aktivacije ovih enzima što dovodi do fosforilacije proteina Rb. Posledica je otpuštanje transkripcionog faktora E2F, koji je vezan za hipofosforilisani Rb. E2F dalje učestvuje u kontroli transkripcije gena koji su bitni za progresiju ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu. S druge strane, E2F indukuje transkripciju gena *p14*, značajnog tumor supresora. Na ovaj način stvara se sigurnosni mehanizam, koji bi trebalo da spreči nekontrolisanu deobu ćelija.

Studije koje su za temu imale ispitivanje uloge ciklina D1 u ćeliji pokazale su da ovaj protein svoje fiziološke funkcije može ostvarivati nezavisno od ciklin zavisnih kinaza. Sposobnost da ostvaruje interakciju sa preko 30 različitih transkripcionih faktora omogućuje ovom ciklinu da učestvuje u regulaciji metabolizma, diferencijacije i ćelijskog rasta (110).

Aberatna ekspresija ciklina D1 ustanovljena je u mnogim tipovima tumora. Ustanovljeno je da do promene u nivoima ciklina D1 dolazi u ranim fazama tumorogeneze.

Ove promene mogu biti posledica amplifikacije gena *CCND1* ili dejstva različitih onkogenih signala.(111).

Prognostički značaj povećane ekspresije ciklina D1 je ispitivan u mnogim tumorima kao što su tumori dojke, jetre, pluća, mozga, skeletnog mišića (112,(113),(114),116,117,47). Suprotno tome, smanjena ekspresija ciklina D1 je znak diferencijacije ćelije (118).

1.12. Funkcija p57 i njegov značaj u kancerogenezi

Humani gen *CDKN1C* lociran je na hromozomu 11p15.5 i podleže fenomenu genskog utiskivanja (119). Ovaj gen je odgovoran za kodiranje proteina p57^{KIP2}, koji pripada grupi Cip/Kip inhibitora ciklin zavisnih kinaza. Ovoj grupi pripadaju i p21^{CIP/WAF1} i p27^{KIP2} proteini. Ekspresija proteina p57 organizovana je vremenski i prostorno. Pokazano je da je ekspresija proteina tkivno najrasprostranjenija i najviša tokom organogeneze, pri čemu se maksimalne vrednosti dostižu u ključnim fazama diferencijacije organa. Nakon toga nivoi p57 u većini organa opadaju ispod nivoa detekcije. Međutim, neka tkiva kod čoveka, poput skeletnih mišića, pluća, bubrega i srca, zadržavaju visok nivo ekspresije p57 i u adultnom dobu (119).

U strukturnom smislu u okviru p57 mogu se razlikovati tri regiona: amino-terminalni, domen bogat ponovcima prolin-alanin (tzv. PAPA domen) i karboksi-terminalni domen. U okviru amino-terminalnog domena nalaze se regioni odgovorni za vezivanje ciklina i ciklin zavisnih kinaza, što omogućava inhibiciju delovanja kompleksa ciklin-ciklin zavisna kinaza. Ovaj domen kao i karboksi-terminalni su strukturno konzervirani, kako u okviru same familije proteina, tako i u okviru različitih vrsta.

Uloga proteina p57 tokom ćelijskog ciklusa uključuje kontrolu prelaska ćelije iz G1 u S fazu. Transfekcija proteina p57 u ćelije SAOS-2 u kulturi dovela je do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi. U skladu sa tim je i nalaz da p57 blokira ulazak džinovskih trofoblasta u S fazu ćelijskog ciklusa. Pored kontrole G1-S prelaza ustanovljena je uloga p57 u kontroli tranzicije iz M u G1 fazu. Ova funkcija se ostaruje preko aktivacije proteina p73 (120).

Pored uloge u kontroli ćelijskog ciklusa pokazano je da p57 učestvuje u regulaciji dinamike citoskeleta kao i u procesima programirane ćelijske smrti i ćelijskog starenja. Dosadašnje studije su pokazale da su promene u ekspresiji p57 bitne u patologiji Beckwith-Wiedemann-ovog sindroma (121), kardiovaskularnog sistema kao i u patogenezi karcinoma prostate, jetre, pankreasa, dojke, glave i vrata (119). Promene u ekspresiji su najvećim delom posledica gubitka heterozigotnosti ili promena u nivou metilacije promotora gena *CDKN1C*.

Smatra se da nivoi proteina p57 opadaju tokom razvoja tumora, što je povezano sa pojavom agresivnog fenotipa i lošijom prognozom (120).

1.13. Funkcija p16 i njegov značaj u kancerogenezi

Lokus *INK4a/ARF* nalazi se na hromozomu 9p21. Ovaj region tokom maligne transformacije često je deletiran ili hipermetilovan. Pored toga u pojedinim tipovima tumora detektovane su i tačkaste mutacije (122, 123).

Protein p16 ima esencijalnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa. Regulacija se zasniva na kontroli fosforilacije proteina retinoblastoma (pRb). Protein p16 se vezuje za ciklin-zavisne kinaze 4/6, na taj način sprečavajući vezivanje ciklina D1 i posledično aktiviranje kinaza. Smisao ovakve interakcije je sprečavanje fosforilacije pRb, što onemogućava ulazak ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa (124).

Eksperimentalno je dokazano da je *p16^{INK4a}*, pored uloge u kontroli ćelijskog ciklusa, učestvuje u procesima kao što su: angiogeneza, ćelijsko starenje, invazija tumora i apoptoza. Protein p16 ispoljava ove plejotropne efekte modulirajući ekspresiju ili funkciju različitih ciljnih molekula kao što su: vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), matriks metaloproteinaza 2 (MMP2), nuklearni faktor kB (NFkB), β 1,4-galaktoziltransferaza, integrin $\alpha_5\beta_3$ i pRb (125, 126).

Nasuprot tumorskoj ćeliji, normalna ćelija ima ograničen kapacitet za proliferaciju, i nakon određenog broja deoba doći će do njenog izlaska iz ćelijskog ciklusa (ćelijsko starenje) (127). Ćelijsko starenje mogu pokrenuti brojni mehanizmi koji uključuju skraćenje telomera, alteracije u signalnim putevima ARF/p53 i p16/RB i oštećenja molekula DNK (128).

p16, tumor-supresor gen je prvi od četiri otkrivena INK4 gena. Tri glavna mehanizma su zaslužna za inaktivaciju *p16* gena u malignim tumorima: homozigotne delecije, hipermetilacija CpG ostrvaca promotorskog regiona i tačkaste mutacije (129,130).

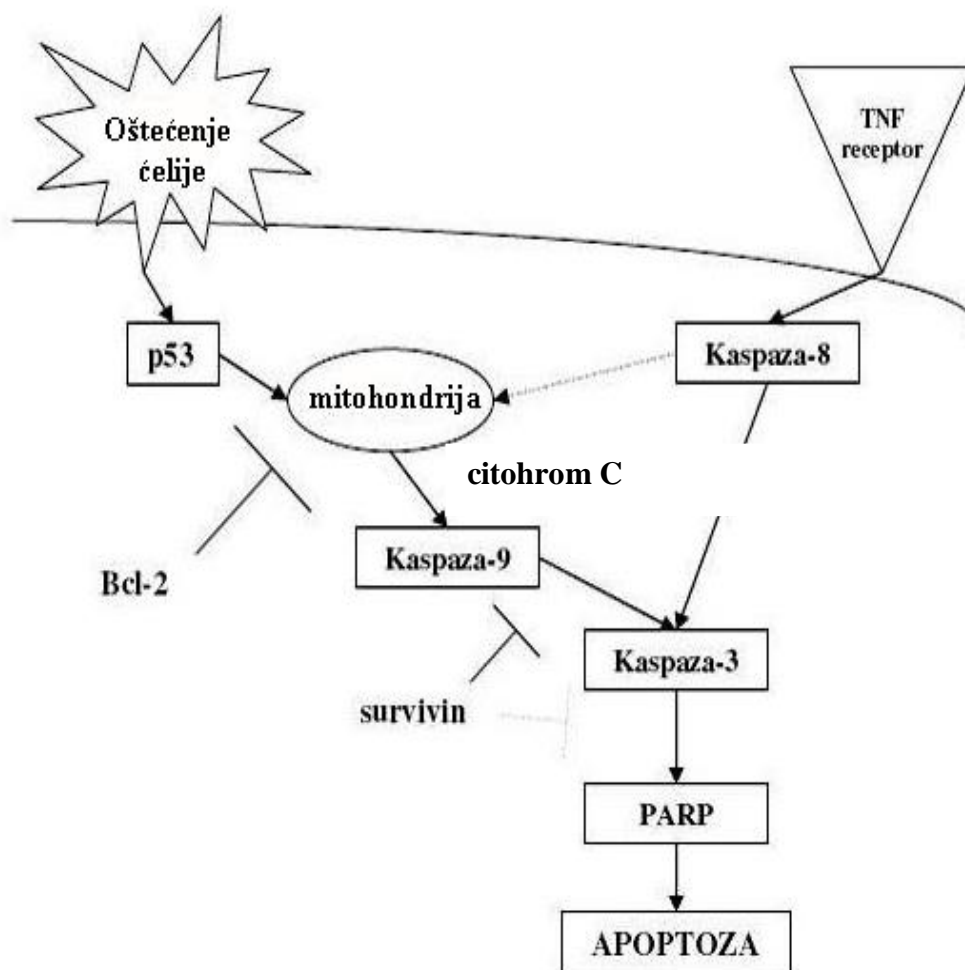
Signalni put p16-Rb je jedan od najčešće izmenjenih puteva u humanim malignitetima. S obzirom na gore opisane funkcije proteina p16 i pRb ovakva situacija nije iznenađujuća. Pokazano je da je gen *p16* deletiran ili hipermetilovan u mnogim tipovima tumora kao što su: tumori dojke, bešike, glioblastomi, sarkomi, pojedini hematološki tumori, tumori pluća i debelog creva (129, 122, 123).

1.14. Apoptoza

Apoptoza je aktivan genetski kontrolisan proces u kome se morfološke promene dešavaju po precizno određenom redosledu, zbog čega je i označena kao programirana ćelijska smrt. U mnogim slučajevima apoptoza nastaje spontano ili je indukovana raznim fiziološkim i patološkim faktorima. Proces apoptoze je neprekidno prisutan u organizmu i omogućava normalno razviće, tkivnu homeostazu i brojne fiziološke procese (131).

Stoga, jasno je da će poremećaji u regulaciji ovog procesa biti u osnovi patogeneze mnogih bolesti, od neurodegenerativnih poremećaja do malignih tumora (132). Jedna od najvažnijih karakteristika malignih ćelija jeste preživljavanje ćelije s oštećenjem DNK i nakupljanje novonastalih genskih mutacija. Zdrave ćelije imaju sposobnost prepoznavanja i brzog popravljavanja oštećenih mesta na DNK, a aktivacijom apoptoze sprečavaju deobu ćelije i umnožavanje mutiranih ćerki ćelija.

Apoptotička ćelijska smrt se odvija aktiviranjem kaskade enzima koji se nazivaju kaspaze (133). Opisana su dva različita ali konvergentna puta za aktivaciju kaspaza: spoljašnji, posredovan receptorima i unutrašnji (mitohondrijalni) put. Spoljašnji (receptorski) put apoptoze se odvija putem spoljašnjih receptora koji pripadaju familiji TNF (engl. tumor necrosis factor) i aktivacijom kaspaze-8. Unutrašnji put apoptoze odvija se preko mitohondrija i kaspaze-9. Na kraju, oba puta dovode do aktivacije kaspaze-3, što vodi aktivaciji PARP-a (poli-ADP-riboza polimeraza) i nukleosomalnoj DNA fragmentaciji (Slika 11). Osim što završavaju aktivacijom efektorske kaspaze, unutrašnji i spoljašnji put apoptoze se preklapaju i na drugim mestima (134,135).



Slika 11. Shema spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze (136).

1.14.1. Regulacija apoptoze

Apoptoza je proces koji je genski regulisan. Odvija se zahvaljujući finoj ravnoteži između antiapoptotskih i proapoptotskih gena tj. proteina. Jedna grupa molekula koja blokira apoptozu tako što se direktno vezuje za kaspaze je IAP (engl. Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP) (137,138,139). Do danas je identifikovano 8 članova IAP familije proteina: XIAP, cIAP1, cIAP2, melanom IAP (livin), IAP-u sličan protein 2, protein inhibitor neuronalne apoptoze, apolon (BRUCE), i survivin (140,(141). Ovi proteini imaju jedan od tri BIR domena (*engl.* Baculovirus IAP repeat –BIR domains) koji su važni za inhibiciju apoptoze i C-terminalni RING (*engl.* -Really Interesting New Gene - RING) domen ili

CARD domen (engl. Caspase activation recruitment domain- CARD) (142). Podeljeni su u 3 klase (137), na osnovu prisustva ili odsustva *RING* domena i homologije BIR domena (143). Proteini koji pripadaju klasi 1 (XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, MLIAP) imaju tri BIR i *RING* domena; proteini klase 2 (NAIP) sadrže 3 BIR domena ali nemaju *RING* domen; i proteini klase 3 IAP-a kojoj pripada survivin i BRUCE, ima samo jedan BIR domen, a nedostaje *RING* domen.

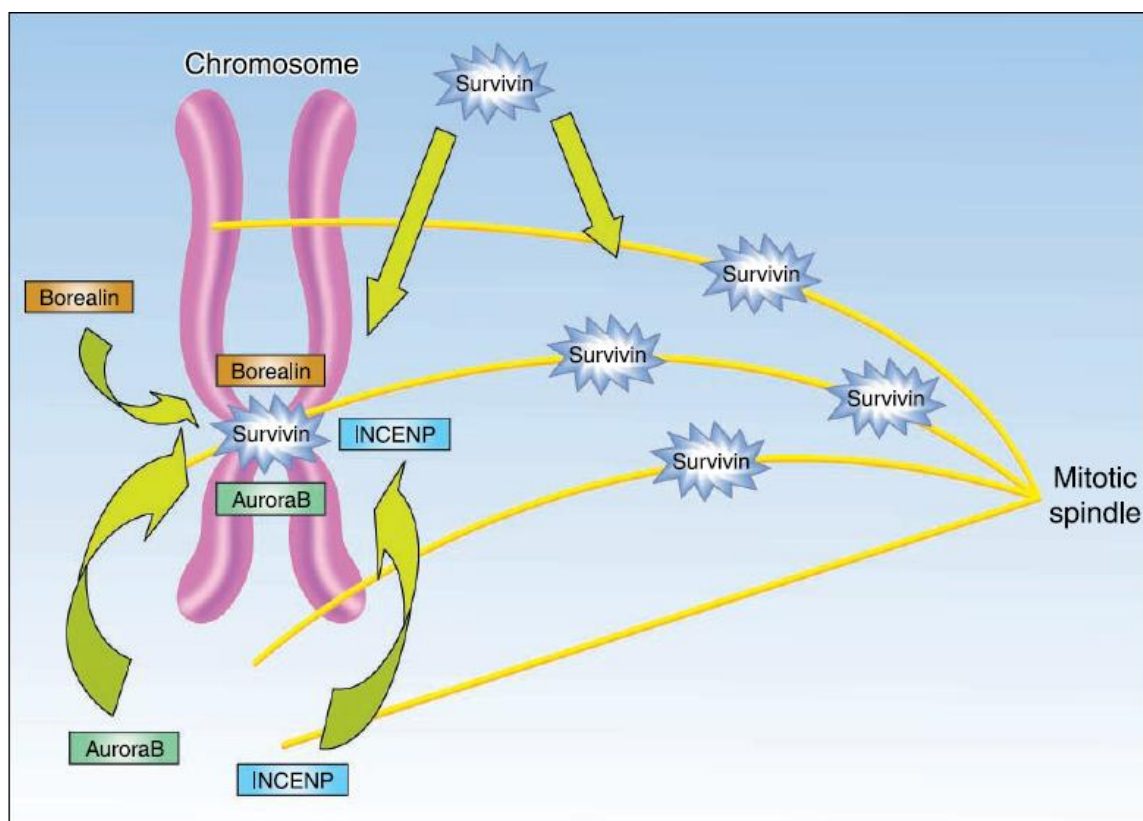
1.15. Funkcija survivina i njegov značaj u kancerogenezi

Survivin je bifunkcionalni protein, član familije inhibitora apoptoze (IAP-a) i regulator je ćelijskog ciklusa (98). To je najmanji član IAP-a, težine 16,5 kilodaltona, sastavljen iz 142 aminokiseline koga kodira jedan gen na 17q25 hromozomu. Survivin je po svojoj strukturi jedinstven među članovima IAP-a po tome što sadrži jednu kopiju BIR domena koji su neophodni za inhibiciju kaspaza, a nedostaju mu *RING* i *CARD* domeni (144, 145, 146).

Sinteza i degradacija survivina u normalnom tkivu se menja u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa. Translokacija survivina je kontrolisana specifičnim sekvencama u regionu promotora, raste tokom G1 faze i dostiže vrh u G2-M fazi (147, 148). Regulacija ekspresije i funkcije survivina je kompleksna, i nalazi se na različitim nivoima, uključujući transkripciju, degradaciju proteina, intracelularnu sekvencijaciju preko različitih liganda. Ekspresija survivina je povećana na transkripcionom nivou putem nuklearnog faktora kapa B (149). Pored toga, faktori rasta kao insulinu sličan faktor rasta-I/mTOR povećavaju ekspresiju survivina preko brzih promena u mRNA lokalizaciji (150). Drugi faktori koji su uključeni u povećanu ekspresiju survivina su članovi *RAS* familije protoonkogeni (151, 152, 153). Sa druge strane, survivin je jedan od gena koji je suprimiran na transkripcionom nivou divljim tipom *p53* i *p75* (154, 155, 156, 157).

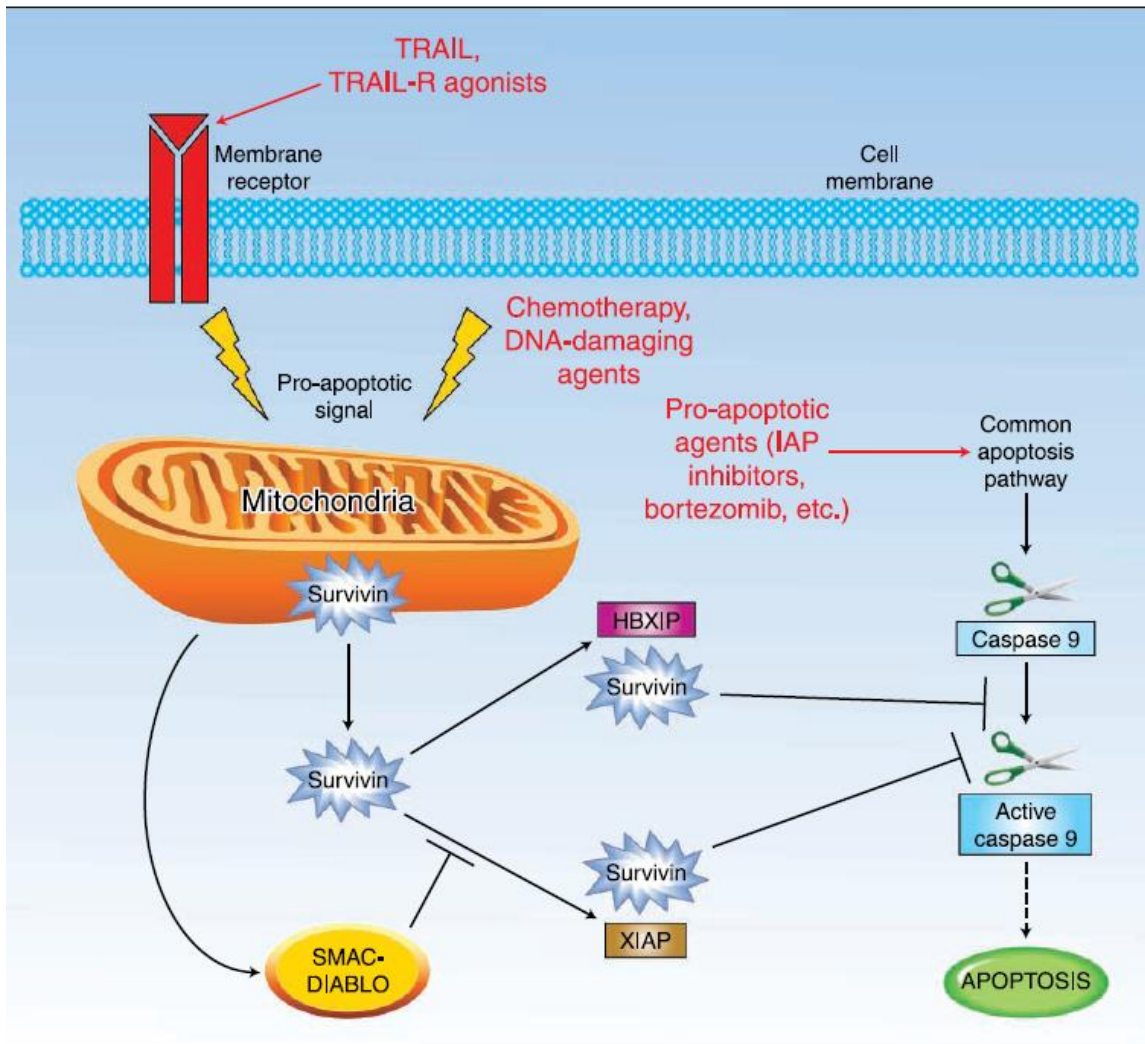
Glavna funkcija survivina je regulacija ćelijske deobe i inhibicija apoptoze (Slika 12 i 13). Tokom mitoze survivin deluje kratko u metafazi i anafazi. Nalazi se u dva subcelularna prostora. Jedan je direktno povezan sa polimerizovanim tubulinom (centrozomi, mikrotubule i ostatci mitotskog aparata) (145, 158, 159, 160). Drugi deo survivina je lokalizovan u kinetohorama hromozoma u metafazi gde je povezan sa

regulatorima kariokineze (161, 162, 163). Skorija teorija o ulozi survivina kao centralnog regulatora u formiranju deobnog vretena pomiruje dve naizgled suprotne uloge survivina. Prema ovom modelu, survivin posreduje u vezivanju hromozomskih proteina za kinetohore i stabilizuje mikrotubule i tako doprinosi bipolarnom formiranju vretena (160). Dakle, tokom regulacije ćelijskog ciklusa, survivin se vezuje za različite komponente mitotskog aparata-centrozom, mikrotubule metafaznog i anafaznog deobnog vretena.



Slika 12. Funkcija survivina u mitozu (164).

Uloga survivina u inhibiciji apoptoze je prihvaćena iako je mehanizam delovanja znatno složeniji od direktne inhibicije kaspaze i može uključivati zajedničku aktivnost survivina i drugih molekula (kao što je hepatitis B X interagujući protein ili X- povezan IAP). Svoju antiapoptotsku funkciju survivin obavlja inhibirajući kaspaze 3, 7 i 9. Inhibicija apoptoze je zavisna od mitohondrija (i citohroma C), preko Δ Ex3 varijante survivina, uz moguće učešće još nekih proteina (164).



Slika 13. Funkcija survivina kao inhibitora apoptoze (164).

Gubitak ćelijskog odgovora na indukovanu apoptozu mogao bi da bude jedan od mehanizama koji su uključeni u progresiju malignog tumora i pojavu rezistencije na hemioterapiju (145, 164, 165, 166, 167, 168). Zbog toga je u terapiji malignih tumora važno delovanje na molekule koji su uključeni u puteve apoptoze (169).

Survivin se eksprimira u plućima embriona i raznim organima fetusa u razvoju (fetalnoj jetri, bubregu, plućima i GIT-u) (137), ali se ne može detektovati u normalnom adultnom tkivu osim tkivu timusa, CD34+ stem ćelijama, placenti, bazalnim epitelnim

ćelijama kolona, hepatocitima, endotelnim ćelijama, epitelnim ćelijama debelog creva, endometrijumu i limfocitima (166, 169, 170, 171, 172, 173, 174).

Survivin se selektivno eksprimira u transformisanim ćelijama i u većini humanih malignih tumora kao što su karcinomi pluća, dojke, pankreasa i kolona, zatim mekotiivni sarkomi, melanomi, neuroblastom, limfoproliferativna oboljenja (166, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181). Ispitivanja genoma su pokazala poremećenu ekspresiju survivina u tumorima nasuprot ekspresiji u normalnim tkivima (180). Ekspresija survivina u tumorima može biti poremećena putem nekoliko mehanizama, uključujući amplifikaciju lokusa na hromozomu 17q25 (181), demetilaciju (136), povećanu aktivnost promotora (175) i povećanu ushodnu signalizaciju u fosfatidilinozitol 3-kinazi ili mitogen aktiviranim putevima u kojima učestvuju protein kinaze (148). Pored toga, povećana ekspresija survivina u ćelijama tumora je najverovatnije nezavisna od ćelijskog ciklusa, ukazujući na povećanje njegove antiapoptotske uloge u poređenju sa normalnim ćelijama u kojima je funkcija regulacije mitoze dominantna. Najzad, promenjiva intracelularna lokalizacija survivina u tumorima (citoplazmatska i nuklearna) može biti indikator aktivnosti survivina i može biti prognostički marker u nekoliko tipova tumora uključujući karcinom nazofarinksa i astroцитom (182, 183).

Osim navedenih tumora, povećana ekspresija survivina je marker nepovoljne prognoze koji korelira sa smanjenim preživljavanjem u još nekoliko malignih tumora kao što su sitnoćelijski karcinom pluća, karcinom želuca, kolorektalni karcinom, karcinom dojke, neuroblastom i limfoproliferativne bolesti. Povećana ekspresija survivina je takođe povezana sa povećanim rizikom od recidiva, infiltracijom limfnih žlezda malignim tumorima i sa pojavom metastaza (184, 185). Pored toga, povećana ekspresija survivina je prisutna kod pacijenata sa tumorima koji su rezistentni na hemio i radioterapiju kao što su karcinom mokraćne bešike (186), karcinom dojke (187), multipli mijelom (188) i limfom (189).

Survivin je eksprimiran u preko 80% RMS i pokazana je njegova uloga u nastanku, kao i moguća upotreba u imunoterapiji RMS (190, 191, 192, 193).

1.16. Funkcija nestina i njegov značaj u kancerogenezi

Nestin predstavlja intermedijerni filament protein klase VI i eksprimiran je u brojnim vrstama ćelija, uključujući ćelije neuralnog grebena i skeletno mišićne prekursorske ćelije (194, 195). U početku označen kao marker neuralne stem ćelije, kasnije je pokazano da ga ima u izobilju u embrionalnim stem ćelijama. Kod odraslih nestin je prisutan u tkivu samo u nekim reaktivnim uslovima, kao što je glijalni ožiljak nastao nakon traume centralnog nervnog sistema, i u toku regeneracije skeletnog mišića (196). Precizna funkcija nestina još uvek nije u potpunosti rasvetljena, mada studije sugerišu da on može imati ulogu u kontroli ćelijske proliferacije i diferencijacije. Nestin je potencijalni marker kancerske stem ćelije (197), a nedavna istraživanja su pokazala da je povećana ekspresija nestina u korelaciji sa nediferentovanim oblicima malignih tumora, kao što je slučaj kod glioma, malignog melanoma, RMS, gastrointestinalnog stromalnog tumora, stromalnog tumora testisa, tumora nadbubrežne žlezde (197, 198).

S druge strane, postoje studije koje nisu dokazale da je nestin značajan kao prognostički faktor (199, 200, 201, 202).

Zbog njegove povećane ekspresije u mnogim tipovima humanih solidnih tumora, nestin može poslužiti i kao eventualno prognostički parametar malignosti tumora. Detaljna analiza ekspresije nestina u različitim tumorskim tkivima uključujući i RMS će biti korisna za ispitivanje njegove uloge u mehanizmima tumorskog rasta i invazije, a u cilju pronalaženja novih terapijskih mogućnosti.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Primenom metode tkivnog mikroniza (engl. tissue microarray - TMA) analizirati imunohistohemijsku ekspresiju proteina regulatora ćelijskog ciklusa i apoptoze u slučajevima RMS.
2. Rezultate imunohistohemijske analize korelirati sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa RMS (lokalizacija, veličina tumora, histološki tip, starost, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa, metastaze i ukupno preživljavanje).
3. Analizirati obrasce metilacije promotora gena p16 metil-specifičnom PCR metodom
4. Utvrditi stepen korelacije između obrazaca metilacije promotora gena p16 i kliničko-patoloških karakteristika RMS.
5. Definisati nezavisne prognostičke faktore značajne za prognozu RMS na osnovu dobijenih rezultata imunohistohemijskog ispitivanja proteina ćelijskog ciklusa i apoptoze i metilacionog statusa promotora gena p16.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Ispitivani bolesnici

Za izradu doktorske disertacije korišćen je biopsijski materijal bolesnika sa RMS koji su dijagnostikovani na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u periodu od 1994-2014 godine. Naša studija je uključila ukupno 67 slučajeva RMS.

U ispitivanoj grupi bolesnika svi kliničko-morfološki parametri su analizirani iz uputnice za patohistološku analizu. Analizirani su sledeći kliničko-morfološki podaci: pol, starost, lokalizacija i veličina tumora, histološki tip i gradus, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa i postojanje metastatske bolesti. Prema starosnoj dobi, a u odnosu na prognostički značaj, ispitivani pacijenti su podeljeni u 2 grupe: ≤ 18 i > 18 godina starosti. Posmatrano je ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS na petogodišnjem nivou.

Histopatološka dijagnoza i histološki tip tumora su određeni u skladu sa Klasifikacijom meko-tkivnih i koštanih tumora SZO iz 2013 godine (40). Za postavljanje dijagnoze korišćena su primarna antitela: anti-dezmin, anti- vimentin, anti-miogenin, anti AE1/AE3.

3.2. Metode

3.2.1. Histološka obrada uzoraka rabdomiosarkoma

Po uzimanju biopsije tumora, uzorci su fiksirani 12-24h u 4% puferovanom formalinu, zatim ispirani vodom i dalje dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije (od 70% do apsolutnog alkohola, tokom 24h), da bi zatim bili lipofilizovani u ksilolu i dalje kalupljeni u parafin. Dobijeni parafinski blokovi su sečeni standardnim mikrotomom na isečke debljine 3-5 μ m. Preseci su dalje bojeni hematoksilin-eozinom (HE) (Tabela 5).

Tabela 5. Shematski prikaz recepture za hematoksilin-eozin bojenje

1. I ksilol.....	5 minuta
2. II ksilol.....	5 minuta
3. 100% alkohol.....	3 minuta
4. 100% alkohol	3 minuta

5. 96% alkohol.....	3 minuta
6. 70% alkohol.....	3 minuta
7. dobro isprati destilovanom vodom	
8. Mayer-ov hematoksin	5 minuta
9. dobro isprati destilovanom vodom	
10. amonijačna voda	uroniti 10 puta
11. dobro isprati destilovanom vodom	
12. Eosin (1% vodeni rastvor)	10-15 minuta
13. isprati dobro tekućom vodom	
14. 70% alkohol.....	2 minuta
15. 96% alkohol.....	2 minuta
16. 100% alkohol	3 minuta
17. 100% alkohol	3 minuta
18. I ksilol	5 minuta
19. II ksilol.....	5 minuta
20. III ksilol.....	5 minuta

Obrisati pločicu i montirati Canada balsam-om (60g u 100mL ksilola) ili DPX-om.

3.2.2. Konstruisanje tkivnog mikroniza

Po učinjenom pregledu svih pripadajućih pločica za svaki pojedinačni slučaj, selektovana je jedna reprezentativna HE obojena pločica. Pošto su izdvojene reprezentativne pločice u narednom aktu su obeležavane markerom zone od interesa na pločici, uz upotrebu mikroskopa (Olympus BX41).

Po odabiru i markiranju pločice, a s obzirom da su pločice numerisane na identičan način kao i odgovarajući parafinski kalupi (jedan kalup=jedan broj) iz arhive je odvajanje odgovarajući parafinski kalup („kalup donor“). Pošto su upareni odgovarajući donorski kalup i već markirana pločica, zone od interesa su prenete sa pločice na odgovarajući kalup. Instrumentom (šuplja igla prečnika 1.2mm) su uzeta 3 cilindra tkiva iz prethodno obeleženih kalupa donora i preneti u prethodno označena i kodirana mesta unutar kalupa

recipijenta. U recipijentni kalup su uvršćene i spoljašnje pozitivne kontrole, unete na isti način.

Recipijentni kalup se, nakon unošenja poslednjeg tkivnog cilindra, stavlja u odgovarajuću metalnu modlu, polaže u laboratorijsku pećnicu na 60 Celsius stepeni, i inkubira 50 minuta. Po vađenju iz pećnice, kalupi se prenose na ledenu podlogu i ostavljaju da leže 15 minuta. Napravljena su 3 recipijentna parafinska kalupa sa 6 redova i 13 kolona cilindara (66 inkorporiranih tkivnih cilindara), sa 5 kontrolnih tkiva u 12 i 13 koloni.

S obzirom da tokom izrade TMA može doći do osipanja i trošenja tkiva, svi slučajevi od kojih je prisutan minimalno jedan tkivni cilindar, na svim ispitivanim preseccima, su uključeni u istraživanje.

3.2.3. Imunohistohemijske metode

Imunohistohemijska obrada je obavljena u Laboratoriji za imunohistohemiju i histohemiju Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Imunohistohemijska tehnika u formalinu fiksiranih i u parafinu ukalupljenih uzoraka predstavlja višestepenu proceduru koja obuhvata sledeće postupke:

- deparafinizacija,
- proteolitička digestija
- blokiranje endogene peroksidaze
- imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike.

Preseci debljine 3-4 μ m, dobijeni sečenjem parafinskih kalupa su, nakon sušenja od 16h na 56⁰C *deparafinisani* po sledećoj proceduri:

I ksilol.....	5-7 minuta, ocediti
II ksilol.....	5-7 minuta, ocediti
100% alkohol.....	3 minuta, ocediti
100% alkohol.....	3 minuta, ocediti
96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
destilovana/dejonizovana voda.....	30 sekundi

Proteolitička digestija (demaskiranje antigena):

Deparafinisani preseći se prenose u plastičnu kivetu sa oko 250 ml radnog rastvora citratnog pufera (10mmol/L, pH 6.0) i kuvaju se u mikrotalasnoj pećnici 2x5 minuta na maksimalnoj temperaturi, a zatim se hlade u citratnom puferu 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju su isprani destilovanom vodom dva puta po 30 sekundi.

Blokiranje endogene peroksidaze:

Preparati se potope 5 minuta u 3% vodonik-peroksid (rastvoren u destilovanoj vodi), zatim isperu deastilovanom vodom i preliju fosfatnim puferom (PBS-phosphate-buffered saline, 0,02 mol/L, pH 7,0) 3x2 minuta.

Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike

Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (Labelled streptavidin-biotin-LSAB+ metoda, DAKO, Danska). Bojenje se odvija po sledećoj proceduri, koja je navedena u instrukcijama proizvođača:

FAZA I (primarno antitelo razblaženo po upustu proizvođača):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l) primarnog antitela,
3. inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi,
4. pažljivo isprati PBS iz špric-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA II (biotinizovano vezno antitelo)

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l) LINK antitela,
3. inkubacija 30 minuta
4. pažljivo isprati PBS iz špric-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA III (streptavidin-peroksidaza):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l) streptavidin- peroksidaze,
3. inkubacija 30 minuta
4. pažljivo isprati PBS iz špric-boce,
5. preliteri svežim puferom.

FAZA IV (supstrat hromogen):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l) hromogenadiaminobenzidina (DAB),
3. inkubacija 10 minuta
4. ispiranje destilovanom vodom,

FAZA IV (kontrastiranje):

1. Mayer-ov hematoksilin 5 do 10 minuta,
2. pažljivo isprati destilovanom vodom,
3. uroniti 10 puta u kivetu sa 0,037 mol/L amonijačne vode,
4. ispiranje destilovanom/dejonizovanom vodom 2 do 5 minuta.
Pokriti vodenim medijumom.

Mesta specifičnog vezivanja antitela su smeđe boje, dok hematoksilin, nespecifično vezan za jedra svih ćelija, boji ih plavo.

Imunohistohemijska procedura je korišćena za sledeća antitela, u odgovarajućim razblaženjima:

Ciklin A (H-432, Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:200,

Ciklin D1 (RM-9104-S, Klon SP4, Lab Vision Corporation, UK), 1:100,

Survivin (Pab, Neomarkers-Fremont, California, USA), 1:75

P16 (JC8, Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:300, preko noći

P57 (C-20, Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:600

Nestin (SP10, Abcam Inc, USA). 1:100

Za svako primenjeno antitelo je postojala pozitivna kontrola. Imunohistohemijsko bojenje je analizirano na svetlosnom mikroskopu (Bx50F4, Olympus Optical, Japan). Imunohistohemijsko bojenje RMS ocenjivano je semikvantitativno po sledećem principu: odsutno bojenje u svim ćelijama -, manje od 10% pozitivnih ćelija + (fokalna ekspresija), 10-50% pozitivnih ćelija ++ (umerena ekspresija) i preko 50% +++ (difuzna ekspresija) za antitela koja daju citoplazmatsko bojenje. Za antitela koja boje jedra ekspresija se ocenjuje i kvantitativno na sledeći način: broje se sve ćelije sa jedarnim bojenjem (bez obzira na intenzitet bojenja), na ukupno 300 izbrojanih tumorskih ćelija na polju velikog uveličanja (x400).

3.2.4. Genetske analize

Za analizu metilacionog statusa *p16* gena korišćene su sledeće metode molekularne genetike:

- izolacija DNK iz isečaka tkiva RMS i limfocita periferne krvi zdravih osoba;
- *in vitro* metilacija DNK izolovane iz limfocita periferne krvi zdravih osoba;
- bisulfitna modifikacija izolovane DNK;
- bioinformatička analiza prajmera specifičnih za metilovani alel;
- analiza metilacionog statusa promotora gena *p16*, metodom lančane reakcije polimeraze specifične za umnožavanje metilovanog alela, MSP, (eng. Methylation specific PCR);
- provera rezultata lančane reakcije polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) elektroforezom na agaroznom gelu;

Izolacija DNK iz parafinskih isečaka tkiva:

- svakom uzorku je dodato po 1 ml ksilola, kako bi se uklonio parafin, pa je lagano mućkano ručno 30 minuta, centrifugirano 5 min/15300 g, nakon čega je pažljivo uklonjen ksilol nastavkom;

- postupak sa dodavanjem ksilola je ponovljen, nakon mućkanja 15 min i centrifugiranja 5 min/17900 g ksilol je uklonjen;
- dodato je po 500 µl apsolutnog etanola, lagano mućkano 5 min, centrifugirano 5 min/17900 g, nakon čega je etanol, pažljivo, uklonjen
- postupak sa dodavanjem apsolutnog etanola je ponovljen;
- nakon centrifugiranja 5 min/17900 g, etanol je pažljivo uklonjen
- isečci tkiva su osušeni u otvorenim epruvetama pored plamenika,
- u svaki uzorak je dodato po 500 µl digestionog pufera koji u finalnoj koncentraciji sadrži 25 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 % SDS i 100 µg (19,6 mg/ml) proteinaze K (MBI, Fermentas, Litvanija);
- uzorci su inkubirani preko noći na temperaturi 50-55°C, uz povremeno mućkanje. Veći komadi tkiva su zahtevali duže vreme inkubacije (do dva dana), i dodatne količine digestionog pufera i proteinaze K;
- u svaki uzorak (500 µl) je dodata ista količina smeše koja sadrži fenol/hloroform /izoamil-alkohol (F/H/I) u odnosu 25:24:1, nakon čega je mućkano ručno 10 min, uzorci su zatim centrifugirani 5 min/10600g, pa je izdvojena vodena faza nastavkom sa odsečenim vrhom, i prebačena u novu epruvetu
- postupak sa fenolom je ponovljen još 1-2 x;
- vodenoj fazi je dodata ista zapremina smeše H/I (24:1), nakon čega je mućkano ručno 10 min i centrifugiramo 5 min/10600 g;
- vodena faza je izdvojena u novu epruvetu;
- svakom uzorku u vodenoj fazi je dodato po 1/2 zapremine 7.5M amonijum acetata (Serva 39751, Nemačka) i 2 zapremine izopropil-alkohola, nakon čega su uzorci ostavljeni na -20°C da se DNK taloži preko noći;
- uzorci su centrifugirani 20 min/12000g/4°C, odliven je supernatant i dodato je 1/2 zapremine hladnog 70 % etanola;
- uzorci su centrifugirani 15 min/12000g/4°C, odliven je supernatant, epruvete su ostavljene otvorene pored plamenika 15-30 min. dok sav etanol ne upari;
- DNK je rastvorena u odgovarajućoj zapremini (50-100 µl) ddH₂O, nakon čega je odložena na 4°C.

Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi

- Nakon fenolske ekstrakcije molekula DNK iz taloga limfocita periferne krvi, prethodno dobijenog prema protokolu koji je opisao (Boyum,1968), vodenoj fazi je dodata 1/10 zapremine 3 M natrijum acetata, pH 5,2 i 2 zapremine hladnog apsolutnog etanola, nakon čega je, uz ručno mućkanje, došlo do precipitacije molekula DNK u vidu končića;
- makroskopski vidljivi končići molekula DNK su zatim namotani na staklenu Pasterovu pipetu, zatopljenog i zakrivljenog vrha;
- DNK je isprana uranjanjem Pasterove pipete u 70 % etanol, a zatim je sušena na vazduhu 15 min, rastvorena u 100-200 µl ddH₂O i odložena na 4°C.

Merenje koncentracije izolovane DNK

Koncentracije rastvorene DNK merene su na aparatu Biospek-nano (Shimadzu corporation, Japan) prema uputstvu proizvođača.

In vitro metilacija molekula DNK izolovanih iz limfocita periferne krvi

U cilju dobijanja kontrolne DNK, koja bi bila metilovana na svim CpG pozicijama, DNK izolovana iz limfocita periferne krvi zdrave osobe tretirana je enzimom CpG metiltransferazom M.SssI (New England Biolabs M0226M). Metilovanje molekula DNK je izvedeno prema protokolu proizvođača.

Bisulfitna modifikacija izolovane DNK

Bisulfitna modifikacija je postupak kojom se konzervira metilacioni status molekula DNK. Tretiranje molekula DNK natrijum-bisulfitom dovodi do konverzije nemetilovanih citozina u uracil, dok metilovani citozini ne podležu takvoj promeni. Ceo postupak je izveden prema protokolu Hermana i sar (203), uz manje izmene u pojedinim koracima (204).

- 2 µg molekula DNK u zapremini od 50 µl je denaturisano dodavanjem 3 M NaOH (fin. 0,3 M) i inkubirano 30 min/42°C;

- prethodno denaturisanoj DNK dodato je 550 μ l sveže pripremljenog rastvora natrijum bisulfita (5,20-5,69 M HSO₃⁻; pošto je komercijalno dostupni natrijum bisulfit mešavina natrijum bisulfita i metabisulfita, procenjuje se da je finalna koncentracija HSO₃⁻ u napravljenom rastvoru 5,20- 5,69 M), pH 5,0, sa 10 mM hidrohionom, nakon čega je usledila inkubacija 18h/55°C.

Rastvori za bisulfitnu modifikaciju DNK:

- 0,2 M hidrohion (1 ml)
- 0,22 g hidrohiona (Sigma H – 9003, SAD) je rastvoreno u 1 ml ddH₂O
- NaHCO₃ pH 5,0 (10 ml)
- 5,41 g NaNSO₃ (Sigma S-8890, SAD) je rastvoreno u 8 ml ddH₂O i dodavanjem 10 M NaOH, pH vrednost je podešena na 5,0. Zatim je bisulfitnom rastvoru dodato 500 μ l sveže pripremljenog rastvora hidrohiona. Nakon kompletnog rastvaranja NaHSO₃, dodavanjem ddH₂O zapremina rastvora je podešena na 10 ml.
- nakon bisulfitnog tretmana, modifikovana DNK je prečišćena upotrebom kompleta za ekstrakciju DNK (MBI Fermentas K0512, Litvanija).

Postupak prečišćavanja se zasnivao na sledećem principu: u prisustvu halotropnih soli, 6 M rastvora natrijum jodida (u daljem tekstu RV-rastvor za vezivanje), molekul DNK se prvo vezuje za specijalno dizajnirane staklene čestice, a zatim se, da bi se dobili prečišćeni molekuli DNK, ove soli i zaostale nečistoće uklanjaju ispiranjem u odgovarajućem puferu koji sadrži u jednakom odnosu supstance Tris, NaCl, EDTA i 95% etanol (RI-rastvor za ispiranje). Nakon ispiranja, molekuli DNK se eluiraju sa staklenih čestica pomoću ddH₂O ili odgovarajućeg pufera.

- nakon bisulfitne modifikacije sadržaj svake epruvete podeljen je na dva jednaka dela i dodato je po tri zapremine RV rastvora i odgovarajuća zapremina resuspendovane suspenzije silicijum-dioksida koja sadrži staklene čestice za vezivanje DNK;
- uzorci su inkubirani 5-15 min na 55°C da bi se molekul DNK vezao za čestice SiO₂-pudera, uz vorteksovanje svaka 2 min kako bi se SiO₂-puder održao u suspenziji;

- nakon centrifugiranja 5 sekundi/13000 g i odlivanja supernatanta, epruvete su centrifugirane još jednom 2-3 sekunde i preostali RV je uklonjen nastavkom;
- dodato je po 500 µl hladnog RI, nakon čega je talog resuspendovan nastavkom i uzorci su centrifugirani 5 sekundi/13000 g;
- nakon odlivanja supernatanta postupak sa RI je ponovljen još 2 x;
- nakon poslednjeg ispiranja i odlivanja supernatanta, epruvete sa SiO₂-puder suspenzijom su centrifugirane još 1 x i preostali RI je uklonjen nastavkom; epruvete su ostavljene otvorene 10-15 min na vazduhu da se talog osuši;
- DNK je eluirana sa staklenih čestica dodavanjem 40 µl 1 mM Tris-HCl, pH 8,0, talog je resuspendovan nastavkom, nakon čega je usledilo inkubiranje 5 min/55°C;
- nakon centrifugiranja 30 sekundi/13000 g supernatant je prenesen u novu epruvetu, izbegavajući staklene čestice; postupak je ponovljen još 2 x sa istom količinom 1 mM Tris-HCl, pH 8,0; da bi se uklonile eventualno zaostale staklene čestice, epruvete sa eluiranom DNK su centrifugirane 30 sekundi/13000 g i supernatant je pažljivo prenet u nove epruvete;
- uzorcima je dodata odgovarajuća zapremina sveže pripremljenog 3 M NaOH (fin. 0,3 M) i uzorci su stavljeni na inkubaciju 20 minuta na temperaturi od 37°C;
- desulfonovanoj DNK je dodato 1/2 zapremine 7,5 M amonijum acetata Serva, Nemačka), pH 7,0, 2,5 zapremine hladnog apsolutnog etanola i 1 µg tRNK (tRNK kvasca, 1 mg/µl, Gibco BRL, SAD) kao nosača, nakon čega je usledilo taloženje na -20°C preko noći;
- nakon centrifugiranja od 20 min/13000 g/4°C, dekantovan je supernatant i dodata je 1/2 zapremine 70 % etanola;
- nakon centrifugiranja 10 min/13000 g/4°C, dekantovan je supernatant i epruvete su ostavljene otvorene 15-30 min dok sav etanol nije upario;
- DNK je rastvorena u 40 µl 1 mM Tris-HCl, pH 8,0 i odložena na -20°C.

Ovako modifikovana i prečišćena DNK je predstavljala uzorak za amplifikaciju MSP tehnikom.

Analiza metilacionog statusa promotora gena metodom MSP

Metilacioni status promotora gena *p16* ispitivan je metodom MSP. Metoda se zasniva na upotrebi dva para prajmera; jedan par umnožava nemetilovani, dok je drugi par specifičan za metilovani alel. Metoda je osetljiva i može da detektuje jedan metilovani alel u prisustvu hiljadu nemetilovanih. U Tabeli 6 nalaze se sekvence prajmera korišćenih u ovoj studiji.

Prilikom izvođenja lančane reakcije polimeraze korišćen je Hot start protokol. On podrazumeva korišćenje DNK polimeraze, koja je hemijski modifikovana, tako da je neaktivna na sobnoj temperaturi. Enzim se aktivira tokom faze inicijalne denaturacije (95°S/10 minuta). Benefiti korišćenja ovog protokola ogledaju se u smanjenju nespecifičnih amplifikacija (Paul i sar., 2010).

MSP reakcija je izvođena u finalnom volumenu od 25 µl, pri čemu je reakciona smeša pripremljena na sledeći način:

1. 1 h pufer (16,6 mM amonijum-sulfat/6,7 mM Tris, pH 8,8/6,7 mM MgCl₂/10 mM 2-merkaptoetanol)
2. dinukleotid-tri-fosfati (1,25 mM svaki)
3. prajmeri u finalnoj koncentraciji od 0,6 µM
4. DMSO u finalnoj koncentraciji od 5 %
5. GSA u finalnoj koncentraciji od 0,4 mg/ml
6. 1 jedinica HotStart Tak polimeraze (Quiagen, SAD).
7. 2,5 µl uzorka

Tabela 6. Receptura za pripremu 100ml 2% agaroznog gela.

Sastojak	10HTBE*	Agarozna	Etidijum-bromid	Dest. voda
Količina	10 ml	2 g	5 µl	90 ml

* 10 x HTBE pufer, pH 8,3 (108 g Trisc, 55 g H₃BO₃, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, dH₂O do 1000 ml).

Provera specifičnosti lančane reakcije polimeraze elektroforezom u agaroznom gelu

Provera specifičnosti lančane reakcije polimeraze urađena je elektroforezom u 2 % agaroznom, odnosno 6 % poliakrilamidnom gelu, bojenih etidijum-bromidom (Tabela 7).

Tabela 7. Sekvence prajmera koji su korišćeni u studiji

Parovi prajmera	Prajmerske sekvence (5'-3')	TX (o°C)	Dužina ampl. (bp)	Ref.
p16 n	C TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT A CAACCCCAAACCACAACCATAA	60.0	151	(203)
p16 m	C TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC A GACCCCGAACCGCGACCGTAA	65.0	150	(203)

m- prajmerski par specifičan za metilovani alel; n- prajmerski par specifičan za nemetilovani alel; S- sens; A-antisens; Tx- temperatura hibridizacije; bp- bazni par.

3.2.5. Statistička obrada podataka

U ovoj studiji korišćeni su deskriptivni i analitički statistički metodi. Od deskriptivnih, korišćeni su:

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

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza preživljavanja.

Od testova razlike korišćeni su neparametarski (hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test).

Za analizu preživljavanja korišćena je:

- Kaplan-Meierova kriva preživljavanja sa Log Rank testom
- Cox regresiona analiza je rađena kao univarijantna (za ispitivanje uticaja pojedinačnih prediktora na preživljavanje) i multivarijantna (ispitivanje zajedničkog uticaja više prediktora na preživljavanje).

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. P vrednost manja od 0,05 je korišćena kao vrednost za odbacivanje nulte hipoteze.

Svi podaci su obrađeni u SPSS 20.0 (IBM korporacija) softverskom paketu.

4. REZULTATI

Za izradu doktorske disertacije korišćen je biopsijski materijal 67 pacijenata sa RMS, koji su dijagnostikovani na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od 1994-2014 godine. Kliničko-patološki parametri pacijenata kod kojih je dijagnostikovano RMS su prikazani u Tabeli 1.

4.1. Distribucija bolesnika prema polu i starosti

U odnosu na pol bilo je zastupljeno 46 (68,7%) osoba muškog i 21 (31,3%) osoba ženskog pola (Tabela 8). Prosečna starost pacijenata je bila 35 godina (35,2±26,2). Naš najmlađi ispitanik je imao 0,8, a najstariji 77 godina. U odnosu na starosnu granicu bilo je 35,8% ispitanika mlađih od 18 godina i 64,2% pacijenata starijih od 18 godina (Tabela 8).

4.2. Distribucija bolesnika prema lokalizaciji tumora

RMS je bio najčešće lokalizovan u predelu ekstremiteta, i to kod 46 (68,7%) pacijenata. Trup i retroperitonealni prostor su bile znatno ređe lokalizacije (17,9%; 13,4% redom) ovog tumora u našem ispitivanju (Tabela 8).

4.3. Distribucija bolesnika prema histološkom tipu i gradusu tumora

Ispitivani slučajevi RMS su pokazivali približno ravnomernu distribuciju u odnosu na histološki tip. Pleomorfni i alveolarni RMS bili su zastupljeni kod 35,8% odnosno 34,3% pacijenata, dok je embrionalni bio dijagnostikovano kod 29,9% ispitanika.

U odnosu na gradus, RMS visokog stepena maligniteta je znatno češće bio dijagnostikovano (68,7%), dok su tumori niskog stepena maligniteta činili svega 31,3% obolelih.

4.4. Distribucija bolesnika prema veličini tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i prisustvu udaljenih metastaza (M)

Svi ispitivani slučajevi RMS su u odnosu na veličinu tumora podeljeni u dve grupe: tumori veličine do/i 5cm i tumori veličine preko 5cm. U skoro 60% slučajeva su bili zastupljeni tumori veći od 5cm.

Kod 62,7% pacijenata nisu bili zahvaćeni regionalni limfni čvorovi (N₀), a kod 52,2% slučajeva nije bilo prisustvo udaljenih metastaza (M₀).

Tabela 8. Kliničko-patološke karakteristike pacijenata sa RMS

		n	%
Pol	Muški	46	68,7%
	Ženski	21	31,3%
Starost	≤18	24	35,8%
	>18	43	64,2%
Lokalizacija	Ekstremiteti	46	68,7%
	Trup	12	17,9%
	Retroperitoneum	9	13,4%
Veličina	≤5	27	40,3%
	>5	40	59,7%
Regionalni limfni nodus	N ₀	42	62,7%
	N ₁	25	37,3%
Metastaze	M ₀	35	52,2%
	M ₁	32	47,8%
Histološki tip	Alveolarni	23	34,3%
	Embriionalni	20	29,9%
	Pleomorfni	24	35,8%
Gradus	Niski	21	31,3%
	Visoki	46	68,7%
Ishod bolesti	Živi	35	52,2%
	Umrli	32	47,8%

n(%)- broj pacijenata

4.5. Ishod bolesti

Nešto više od polovine ispitanika, 35/67 (52,2%), kod kojih je dijagnostikovan RMS, na kraju ispitivanja je bilo živo (Tabela 9). Odnos kliničko-patoloških parametara i ishoda bolesti je prikazan u tabeli 9. Statistički značajnim su se pokazali starost pacijenata, veličina tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, prisustvo udaljenih metastaza, histološki tip i gradus tumora. Pacijenti stariji od 18 godina su češće imali letalan ishod u odnosu na mlađe od 18 godina ($p < 0.001$). Povoljan ishod bolesti je bio kod pacijenata sa tumorom manjim od 5cm, dok je kod umrlih pacijenata u 96,9% slučajeva bio veći od 5cm ($p < 0.001$). Pacijenti sa prisustvom regionalnih ($p < 0.0019$ i udaljenih metastaza ($p = 0.001$)

su imali veći smrtni ishod. Pleomorfni RMS i ARMS su najčešći histološki tipovi kod umrlih pacijenata, dok je kod živih najčešće dijagnostikovano ERMS ($p < 0.001$). Kao i kod drugih maligniteta i kod RMS u ovoj studiji, visoki gradus je dominirao kod pacijenata sa smrtnim ishodom ($p < 0.001$) (Tabela 9).

Tabela 9. Ishod bolesti u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS

		Smrtni ishod				p-vrednost
		ne		da		
		n	%	n	%	
Pol	Muški	23	65.7%	23	71.9%	$X^2=0.295$ $p=0.587$
	Ženski	12	34.3%	9	28.1%	
Starost	<18	22	62.9%	2	6.2%	$X^2=23.300$ $p < 0.001^*$
	18+	13	37.1%	30	93.8%	
Lokalizacija	Ekstremiteti	24	68.6%	22	68.8%	$X^2=0.398$ $p=0.810$
	Trup	7	20.0%	5	15.6%	
	Retroperitoneum	4	11.4%	5	15.6%	
Veličina	≤ 5	26	74.3%	1	3.1%	$X^2=35.186$ $p < 0.001^*$
	> 5	9	25.7%	31	96.9%	
Regionalni limfni nodus	N_0	31	88.6%	11	34.4%	$X^2=20.992$ $p < 0.001^*$
	N_1	4	11.4%	21	65.6%	
Metastaze	M_0	25	71.4%	10	31.2%	$X^2=10.816$ $p=0.001^*$
	M_1	10	28.6%	22	68.8%	
Histološki tip	Alveolarni	9	25.7%	14	43.8%	$X^2=21.362$ $p < 0.001^*$
	Embriionalni	19	54.3%	1	3.1%	
	Pleomorfni	7	20.0%	17	53.1%	
Gradus	Niski	20	57.1%	1	3.1%	$X^2=22.667$ $p < 0.001^*$
	Visoki	15	42.9%	31	96.9%	

n(%)- broj pacijenata; *statistički značajna razlika

4.6. Ukupno preživljavanje obolelih od rabdomiosarkoma

U ovoj studiji je praćeno ukupno preživljavanje pacijenata u trajanju od 60 meseci od postavljanja dijagnoze RMS. Najkraće vreme praćenja je iznosilo 8 a najduže 60 meseci. Obzirom da je preživljavanje takvo da je ukupno preživljavanje 52,2%, medijanu nije moguće izračunati, a prosečno preživljavanje iznosilo je 47,21 meseca sa standardnom

greškom 2,19 i intervalom poverenja od 42,92 do 51,50 meseci. Period praćenja je podeljen na vremenske intervale od po 12 meseci (Tabela 10).

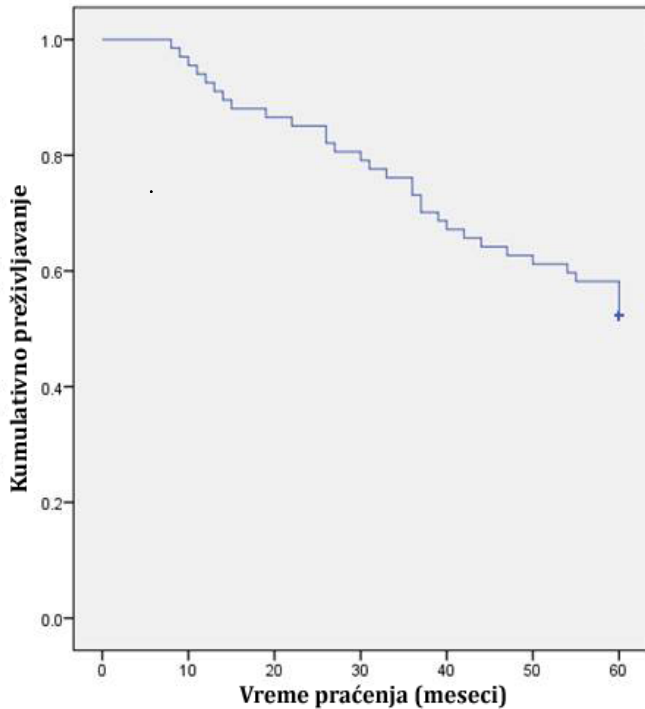
Tabela 10. Ukupno preživljavanje pacijenata u odnosu na kliničko-patološke parametre

	Meseci	Preživljavanje (%)					#p-vrednost
		12	24	36	48	60	/
Ukupno		92,5	85,1	73,1	62,7	52,2	/
Pol	Muški	89,1	80,4	67,4	56,5	50,0	$X^2=0,771$ $p=0,380$
	Ženski	100	95,2	85,7	76,2	57,1	
Starost	≤18	100	100	100	95,8	91,7	$X^2=21,831$ $p< 0,001^*$
	>18	88,4	76,7	58,1	44,2	30,2	
Lokalizacija	Ekstremiteti	89,1	78,3	67,4	60,9	52,2	$X^2=0,390$ $p=0,823$
	Trup	100	100	83,3	75,0	58,3	
	Retroperitoneum	100	100	88,9	55,6	44,4	
Veličina	≤5	100	100	100	100	96,3	$X^2=34,696$ $p< 0,001^*$
	>5	87,5	75,0	55,0	37,5	22,5	
Regionalni limfni nodusi	N ₀	100	97,6	85,7	85,7	73,8	$X^2=30,154$ $p< 0,001^*$
	N ₁	80,0	64,0	52,0	24,0	16,0	
Metastaze	M ₀	100	100	91,4	80,0	71,4	$X^2=13,314$ $p< 0,001^*$
	M ₁	84,4	68,8	53,1	43,8	31,3	
Histološki tip	Alveolarni	87,0	78,3	65,2	52,2	39,1	$X^2=18,632$ $p< 0,001^*$
	Embriionalni	100	100	100	95,0	95,0	
	Pleomorfni	91,7	79,2	58,3	45,8	29,2	
Gradus	Niski	100	100	100	95,2	95,2	$X^2=19,769$ $p< 0,001^*$
	Visoki	89,1	78,3	60,9	47,8	32,6	

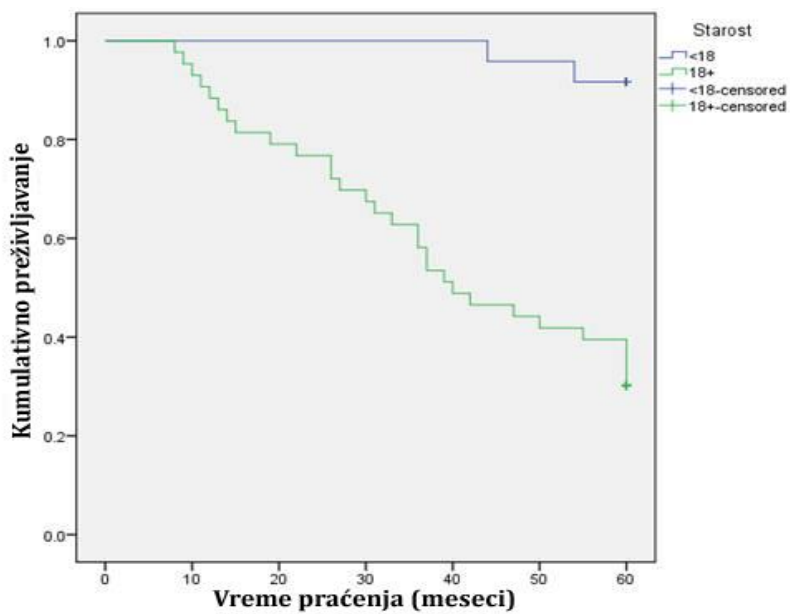
*statistički značajna razlika; #Long-rank test

Stopa ukupnog preživljavanja se kretala od 92,5% posle 12 meseci, 73,1 % posle 36 da bi na kraju perioda praćenja od 60 meseci iznosila 52,2%. (Tabela 10, Grafikon 1).

Grafikon 1. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS



Grafikon 2. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na starosne grupe pacijenata sa RMS



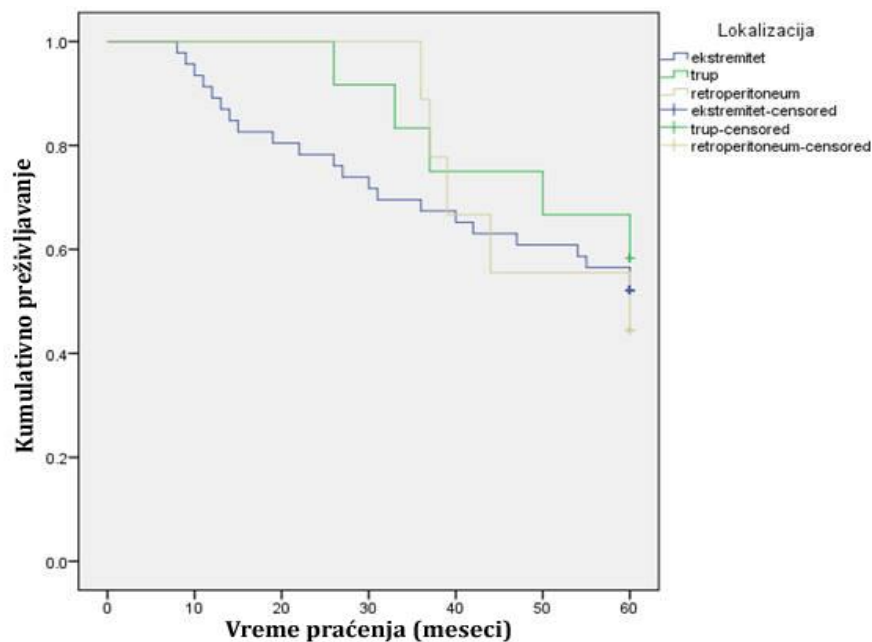
4.7. Uticaj kliničko-patoloških parametara na ukupno preživljavanje pacijenata sa rabdomiosarkomom

Ukupno preživljavanje u odnosu na pol je bilo duže kod žena, ali razlika nije bila statistički značajna ($p=0.380$).

Stope ukupnog preživljavanja su upadljivo niže kod bolesnika starijih od 18 godina (u trenutku postavljanja dijagnoze), ($p < 0.001$) (Tabela 10). Stope ukupnog preživljavanja za 12, 36- i 60 meseci za ≤ 18 godina su bile: 100%, 100% i 91,7%, a za starije od 18 godina: 88,4%, 58,1% i 30,2% (Grafikon 2).

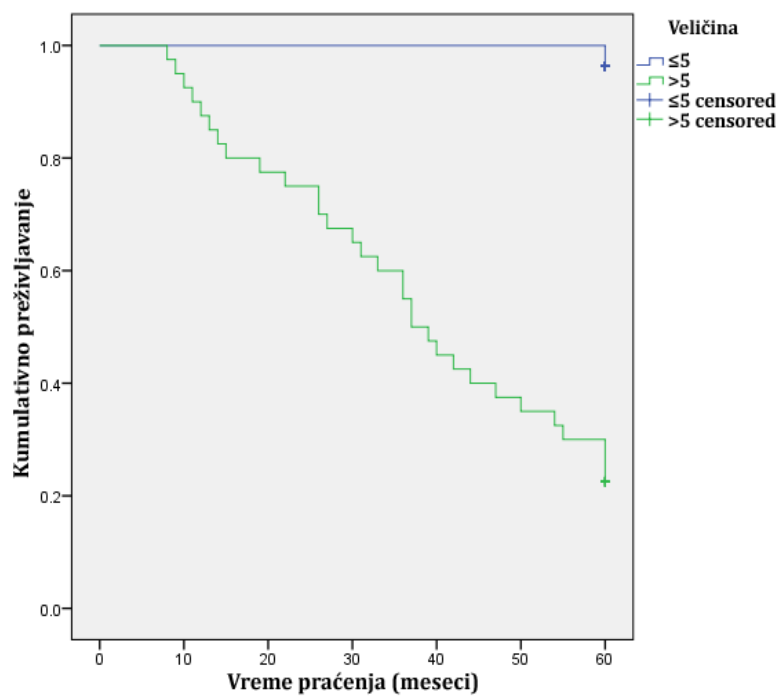
Razlika u ukupnom preživljavanju između bolesnika sa različitim primarnom lokalizacijom tumora nije bila statistički značajna ($p=0,823$) (Tabela 10). Pacijenti kod kojih je tumor bio lokalizovan u predelu trupa imali su najduže petogodišnje preživljavanje i iznosilo je 58,3%, dok je najkraće bilo kod pacijenata sa tumorom lokalizovanim u retroperitonealnom prostoru (44,4%) (Grafikon 3).

Grafikon . Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na lokalizaciju tumora.



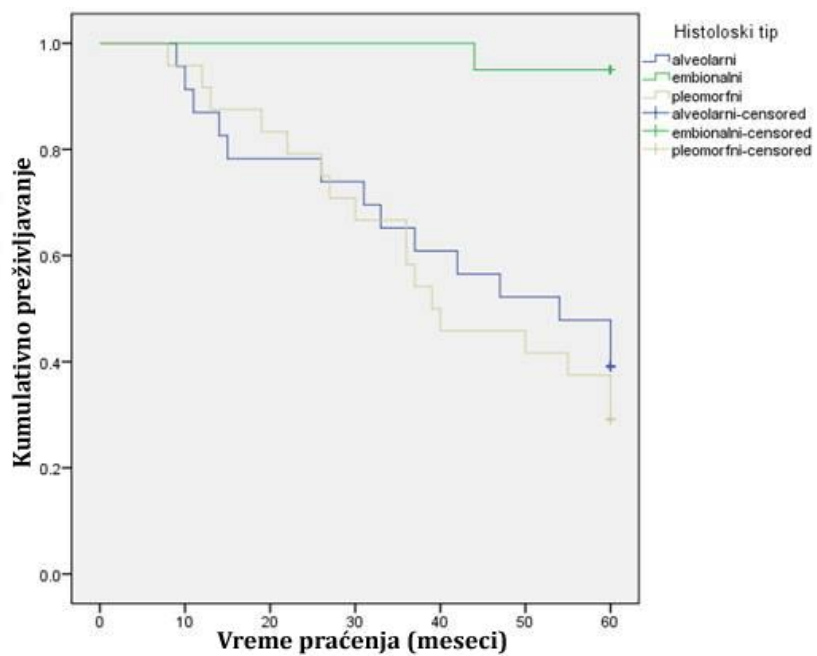
Veličina tumora se pokazala statistički značajnom u ovoj studiji ($p < 0.001$) (Tabela 10). Pacijenti sa tumorom dimenzija ≤ 5 cm imali su bolje preživljavanje u odnosu na pacijente sa tumorom > 5 cm. Posle pet godina praćenja čak 96,3% pacijenata sa RMS veličine ≤ 5 cm bilo je živo, dok je kod pacijenata sa tumorom dimenzija > 5 cm preživljavanje iznosilo svega 22,5% (Grafikon 4).

Grafikon 4. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na veličinu tumora.

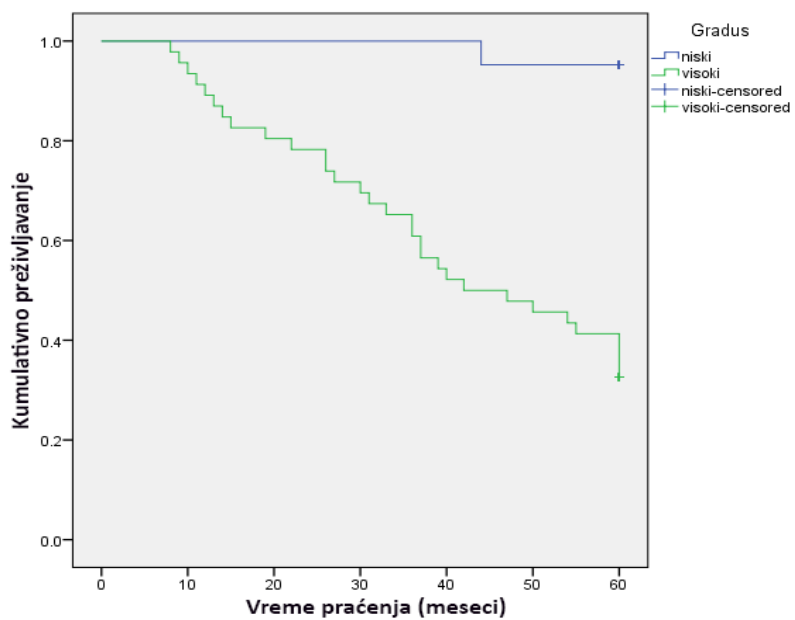


U tabeli 10 su prikazani i rezultati preživljavanja pacijenata sa različitim histološkim tipom tumora. Ova korelacija je pokazala statističku značajnost ($p < 0.001$). Najduže preživljavanje bilo je kod ispitanika sa ERMS, i za 12, 36 i 60 meseci iznosilo je: 100%, 100% i 95%. Kod pacijenata sa ARMS stope ukupnog preživljavanja za isti period bile su: 87%, 65,2% i 39,1%, a za pacijente sa pleomorfnim RMS 91,7%, 58,3% i 29,2% (Grafikon 5).

Grafikon 5. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na histološki tip.



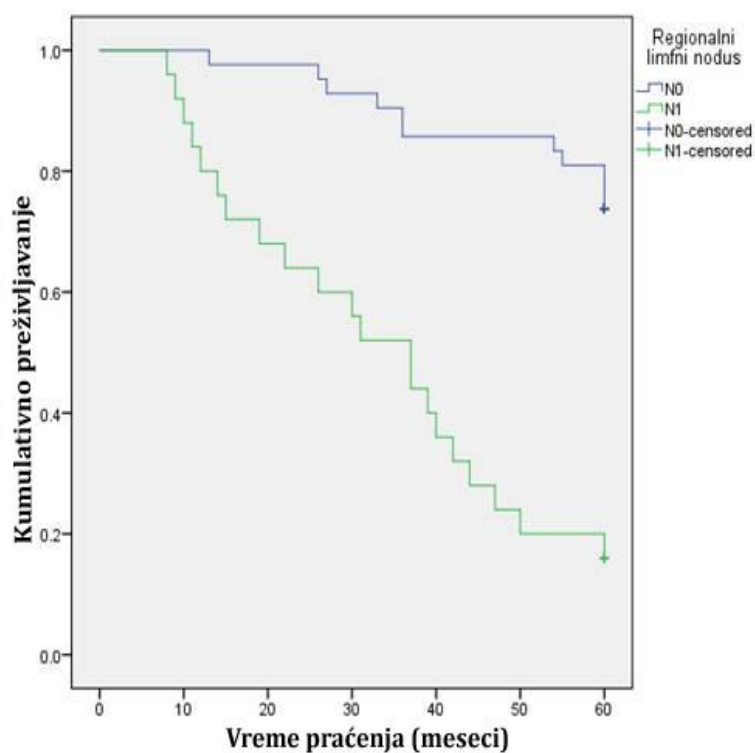
Grafikon 6. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na gradus tumora.



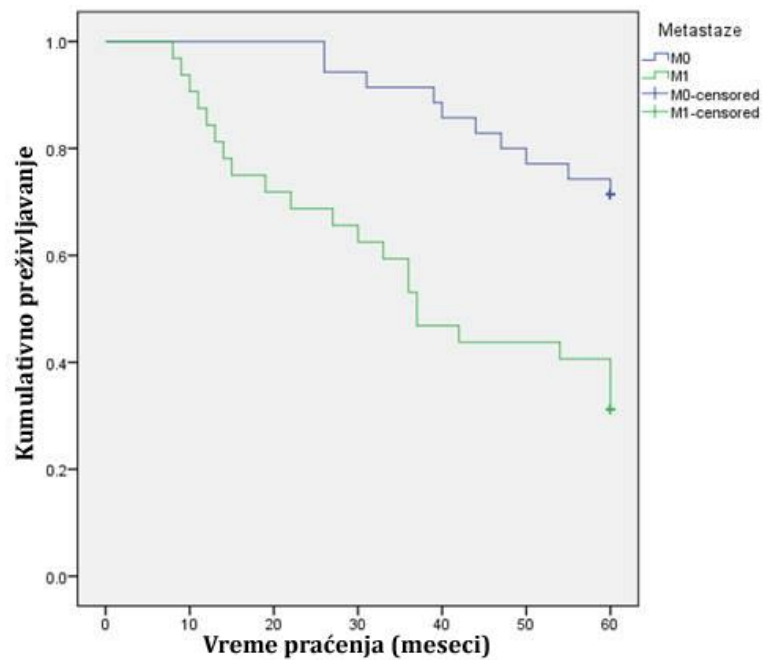
Gradus tumora se takođe pokazao kao relevantan faktor u odnosu na dužinu ukupnog preživljavanja. Pacijenti sa RMS niskog stepena maligniteta su imali duže preživljavanje u odnosu na obolele sa visokogradusnim RMS, ($p < 0.001$) (Tabela 10, Grafikon 6).

Dužina ukupnog preživljavanja zavisila je i od prisustva regionalnih (N), ($p < 0.001$), i udaljenih metastaza (M) ($p < 0.001$). Pacijenti bez regionalnih metastaza (N_0) imali su stopu preživljavanja 73,8% nakon petogodišnjeg perioda praćenja, a pacijenti bez udaljenih metastaza (M_0) 71,4% za isti period (Tabele 10, Grafikon 7 i 8).

Grafikon 7. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova.



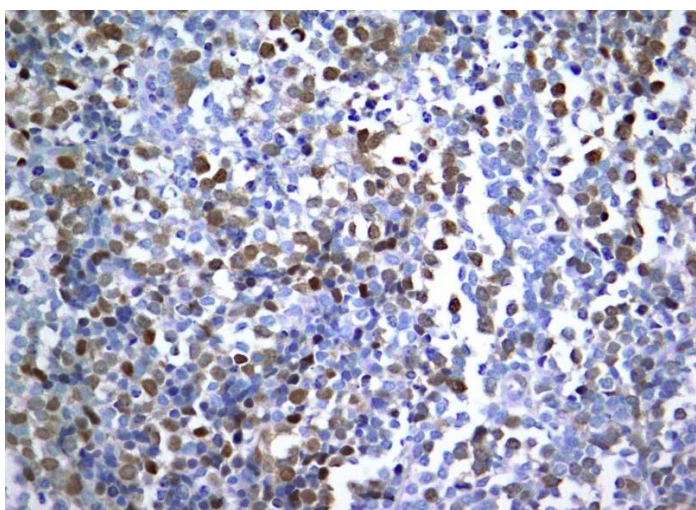
Grafikon 8. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na postojanje udaljenih metastaza.



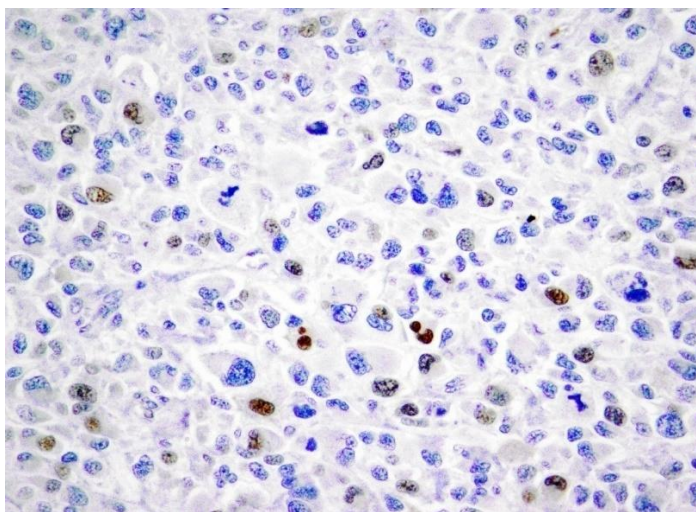
4.8. Imunohistohemijska ekspresija Ciklina A

Ciklin A je u tumorskim ćelijama RMS pokazivao jedarnu ekspresiju (Slika 14 i 15). Obzirom da je ciklin A numerička variabla koja nema “cut off” vrednost, karakteristike pacijenata u odnosu na ovaj marker predstavljene su, umesto apsolutnim i relativnim brojevima (n,%), merama centralne tendencije i merama disperzije.

Srednja vrednost imunohistohemijske ekspresije ciklina A u RMS iznosila je 18,82, sa standardnom devijacijom od 13,65 i medijanom 17,30.



Slika 14. Difuzna ekspresija ciklina A u tumorskim ćelijama, x400



Slika 15. Fokalna ekspresija ciklina A u tumorskim ćelijama, x400.

Evaluacijom ekspresije ciklina A u odnosu na kliničko-patološke parametre pacijenata sa RMS, uočena je statistička značajnost samo u odnosu na histološki tip tumora ($p=0.047$) (Tabela 11). Naime, pacijenti sa pleomorfim tipom imali su veću prosečnu vrednost i medijanu ekspresije u odnosu na ARMS i ERMS. Nešto veće prosečne vrednosti ekspresije ciklina A (20.37 ± 14.34) su pokazivali pacijenti stariji od 18 godina i tumori lokalizovani u predelu trupa ($23,75\pm 18,39$). Prosečne vrednosti ekspresije ovog markera su bile veće i kod pacijenta sa regionalnim i udaljenim metastazama.

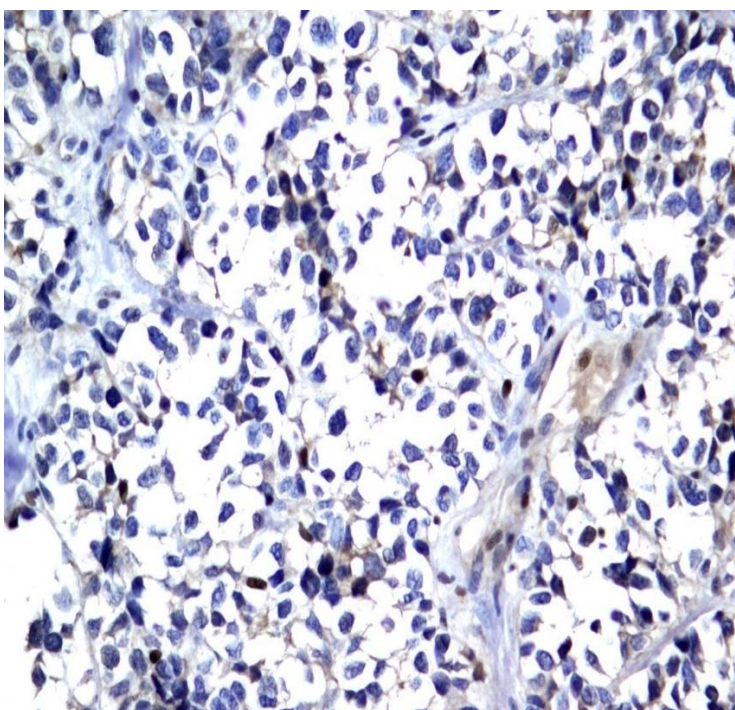
Tabela 11. Ekspresija ciklina A u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS.

		Cyclin A						p-vrednost
		Aritmetička sredina	SD	SE	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Pol	Muški	18.41	13.85	2.04	17.15	8.30	26.70	Z=-0.582
	Ženski	19.72	13.48	2.94	19.00	10.30	28.70	p=0.561
Starost	<18	16.04	12.10	2.47	17.00	5.04	23.85	Z=-1.179
	>18	20.37	14.34	2.19	19.00	10.30	30.00	p=0.239
Lokalizacija	Ekstremitet	18.89	12.50	1.84	17.42	8.30	28.70	$X^2=2.609$ p=0.271
	Trup	23.75	18.39	5.31	18.65	11.00	33.50	
	Retroperitoneum	11.89	10.13	3.38	17.00	3.30	19.00	
Veličina	≤5	18.93	10.51	2.02	17.30	11.00	26.70	Z=-0.320
	>5	18.75	15.54	2.46	17.42	4.64	28.50	p=0.749
Regionalni limfni nodus	N ₀	17.50	12.46	1.92	17.15	7.67	27.00	Z=-.753
	N ₁	21.04	15.46	3.09	19.00	10.30	31.30	p=0.451
Metastaze	M ₀	17.97	12.53	2.12	17.30	6.40	30.00	Z=-0.163
	M ₁	19.76	14.92	2.64	17.32	10.65	26.00	p=0.870
Histoloski tip	Alveolarni	17.45	15.29	3.19	15.30	7.67	23.30	$X^2=6.109$ p=0.047
	Embrionalni	16.87	12.91	2.89	17.15	5.04	27.70	
	Pleomorfni	21.77	12.62	2.58	21.00	14.35	29.15	
Gradus	Niski	16.59	12.65	2.76	17.00	6.40	26.70	Z=-0.778
	Visoki	19.84	14.10	2.08	18.05	10.30	27.00	p=0.436

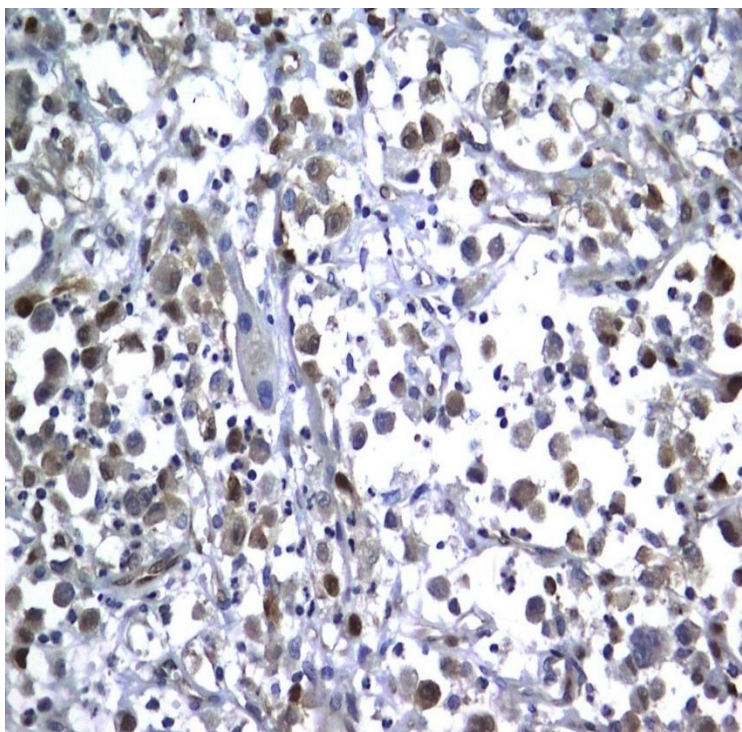
Procenu uticaja ekspresije ciklina A na preživljavanje pacijenata sa RMS, s obzirom da se radi o numeričkoj varijabli, nije bilo moguće ispitati Log-rank testom, kao ni grafički predstaviti. Zato je urađena Cox-ova regresiona analiza i utvrđeno je da ekspresija Ciklina A nema statističku značajnost u odnosu na preživljavanje pacijenata sa RMS ($p=0,246$; HR=1,015; 95% IP 0,990-1,040).

4.9. Imunohistohemijska ekspresija Ciklina D1

U ćelijama RMS, ciklin D1 je pokazivao jedarnu ekspresiju. S obzirom da je u normalnom mišićnom tkivu dokazana fokalna ekspresija ciklina D1, mi smo prisustvo do 5% pozitivnih ćelija, u analiziranim slučajevima RMS, posmatrali kao očuvanu ekspresiju, dok je ekspresija u preko 5% pozitivnih ćelija ocenjena kao povećana (Slika 16 i 17). Očuvana ekspresija ciklina D1 je uočena kod 14 (20,9%) bolesnika sa RMS, dok je kod 53 (79,1%) pacijenta ocenjena kao visoka, odnosno bila je prisutna u >5% tumorskih ćelija.



Slika 16. Ekspresija ciklina D1 u $\leq 5\%$ tumorskih ćelija, x100.



Slika 17. Ekspresija ciklina D1 u >5% tumorskih ćelija, x100.

Analiza ekspresije ciklina D1 u tumorskim ćelijama RMS u odnosu na kliničko-patološke parametre prikazana je u tabeli 12.

Povećana ekspresija ciklina D1 bila je češća kod osoba muškog pola, ali ta razlika nije statistički značajna ($p=0.751$). Takođe, ekspresija ovog markera nije bila statistički značajna ($p=0.993$) ni u odnosu na starosne grupe pacijenata, iako je ocenjena kao povećana kod znatno većeg broja pacijenata starijih od 18 godina

Ekspresija ciklina D1 u odnosu na lokalizaciju RMS, je bila blizu konvencionalnog nivoa značajnosti ($p=0.059$). Tumori lokalizovani u predelu ekstremiteta su češće, (69,8% slučajeva), pokazivali povećanu ekspresiju ciklina D1, u odnosu na tumore retroperitonealnog prostora i trupa.

Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti povećane ekspresije ciklina D1 između tumora manjih i većih od 5cm ($p=0.694$), kao ni u odnosu na prisustvo regionalnih ($p=0.889$) i udaljenih metastaza ($p=0.850$).

Tabela 12. Ekspresija Ciklina D1 u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS.

		Cyclin D1				#p-vrednost
		≤5		>5		
		n	%	n	%	
Pol	Muski	9	64.3%	37	69.8%	$X^2=0.157$ $p=0.751$
	Ženski	5	35.7%	16	30.2%	
Starost	≤18	5	35.7%	19	35.8%	$X^2=0.001$ $p=0.993$
	>18	9	64.3%	34	64.2%	
Lokalizacija	Ekstremiteti	9	64.3%	37	69.8%	$X^2=5.559$ $p=0.059$
	Trup	5	35.7%	7	13.2%	
	Retroperitoneum	0	0.0%	9	17.0%	
Veličina	≤5	5	35.7%	22	41.5%	$X^2=0.155$ $p=0.694$
	>5	9	64.3%	31	58.5%	
Regionalni limfni nodus	N ₀	9	64.3%	33	62.3%	$X^2=0.019$ $p=0.889$
	N ₁	5	35.7%	20	37.7%	
Metastaze	M ₀	7	50.0%	28	52.8%	$X^2=0.036$ $p=0.850$
	M ₁	7	50.0%	25	47.2%	
Histološki tip	Alveolarni	6	42.9%	17	32.1%	$X^2=1.602$ $p=0.487$
	Embrionalni	5	35.7%	15	28.3%	
	Pleomorfni	3	21.4%	21	39.6%	
Gradus	Niski	5	35.7%	16	30.2%	$X^2=0.157$ $p=0.751$
	Visoki	9	64.3%	37	69.8%	
Ishod bolesti	Živi	8	57.1%	27	50.9%	$X^2=0.171$ $p=0.680$
	Umrli	6	42.9%	26	49.1%	

n(%)- broj pacijenata; #Long-rank test

U odnosu na histološki tip, prisustvo ekspresije ciklina D1 u >5% tumorskih ćelija nije bilo statistički značajno. Najveći broj slučajeva sa pleomorfnim RMS (39.6%), je imao povećanu ekspresiju ciklina D1, dok je takva ekspresija kod ERMS i ARMS bila prisutna kod skoro istog broja ispitanika.

Nivo ekspresije ciklina D1 u tumorskom tkivu je bio sličan među pacijentima sa

različitim ishodom bolesti i ta razlika nije bila statistički značajna ($p=0.680$).

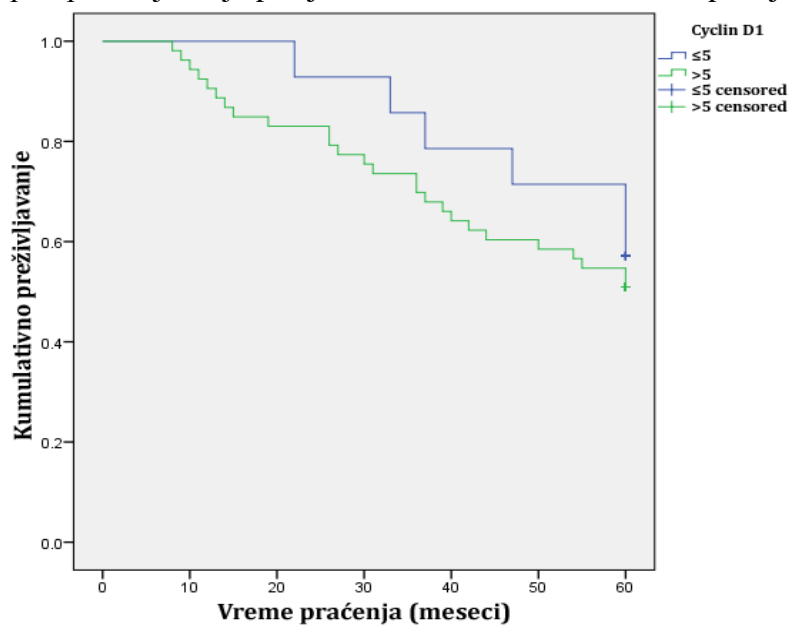
Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike ni u ukupnom preživljavanju u odnosu na stepen ekspresije ciklina D1 (log-rank, $p=0,499$). Stope ukupnog preživljavanja za 12, 36 i 60 meseci su bile 90,6%, 69,8% i 50,9% za ispitanike sa povećanom ekspresijom ciklina D1 i neznatno su se razlikovale od preživljavanja pacijenata sa očuvanom ekspresijom (Tabela 13).

Tabela 13. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na ekspresiju ciklina D1.

Ukupno preživljavanje										
		%					Prosek SE		95% IP	
meseci		12	24	36	48	60			Donji	Gornji
Ciklin D1	≤5	100	92,9	85,7	71,4	57,1	52,786	3,622	45,687	59,884
	>5	90,6	83,0	69,8	60,4	50,9	45,736	2,593	40,653	50,818

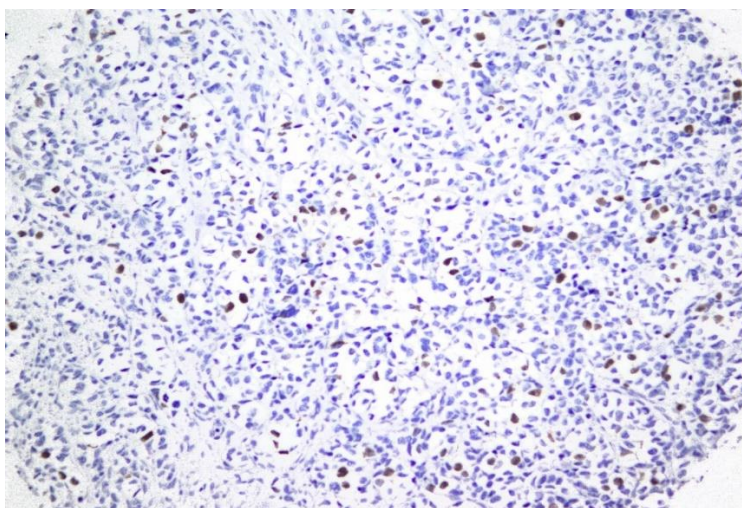
SE- standardna devijacija; IP- interval poverenja

Grafikon 9. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na ekspresiju ciklina D1.

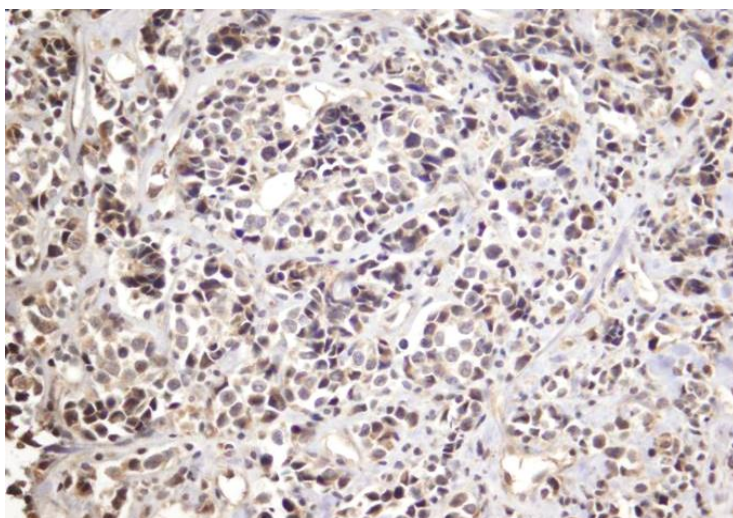


4.10. Imunohistohemijska ekspresija p57

U ćelijama RMS, p57 je pokazivao jedarnu ekspresiju. S obzirom da je u normalnom mišićnom tkivu prisutna difuzna ekspresija p57, mi smo prisustvo od preko 25% pozitivnih ćelija u analiziranim slučajevima RMS, posmatrali kao očuvanu ekspresiju, dok je ekspresija u manje od 25% pozitivnih ćelija ocenjena kao patološka (smanjena) (Slika 18 i 19). Na osnovu postavljenih parametara, kod 50 (74,6%) pacijenata ekspresija p57 bila je smanjena (<25% pozitivnih tumorskih ćelija), dok je kod 17 (25,4%) pacijenata ocenjena kao očuvana (\geq 25% pozitivnih tumorskih ćelija).



Slika 18. Ekspresija p57 u <25% tumorskih ćelija, x100.



Slika 19. Ekspresija p57 u \geq 25% tumorskih ćelija, x200.

Analiza ekspresije p57 u tumorskim ćelijama RMS u odnosu na kliničko-patološke parametre prikazana je u tabeli 14.

Rezultati različite ekspresija p57 u ovom tumoru nisu pokazivali statističku značajnost u odnosu na pol ($p=0,842$), lokalizaciju ($p=0,835$), nodalni status ($p=0,842$) i prisustvo udaljenih metastaza ($p=0,529$).

Smanjena ekspresija p57 bila je češće prisutna kod osoba muškog pola (68,0% slučajeva), dok je u odnosu na lokalizaciju RMS, patološka ekspresija je bila najzastupljenija kod tumora u predelu ekstremiteta (70,0%). Kod 62,0% ispitanika sa RMS bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima bila je smanjena ekspresija p57, dok je ona u odnosu na prisustvo ili odsustvo udaljenih metastaza bila zastupljena kod istog broja pacijenata.

Za razliku od gore navedenih rezultata, razlika između ekspresije p57 u odnosu na starosne grupe pacijenata sa RMS i veličinu tumora, bila je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti ($p=0,088$; $p=0,071$, redom). Kod pacijenata starijih od 18 godina, češće je bila smanjena ekspresija p57 (70,0%), kao i kod tumora čije su dimenzije bile veće od 5cm (66,0%).

Statistička značajnost različite ekspresije p57 bila je uočena u odnosu na histološki tip i gradus tumora, kao i u odnosu na ishod bolesti.

Smanjena ekspresija p57 bila je prisutna kod 42,0% pacijenata sa pleomorfim RMS a kod 36,0% pacijenata sa ARMS i 22,0% sa ERMS ($p=0,042$). Ispitanici kod kojih je dijagnostikovano RMS visokog gradusa, su češće imali smanjenu ekspresiju p57 u odnosu na tumore sa niskim gradusom ($p=0,026$).

Tabela 14. Ekspresija p57 u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS.

		p57				#p-vrednost
		≥25		<25		
		n	%	n	%	
Pol	Muški	12	70.6%	34	68.0%	X ² =0.039 p=0.842
	Ženski	5	29.4%	16	32.0%	
Starost	≤18	9	52.9%	15	30.0%	X ² =2.904 p=0.088
	>18	8	47.1%	35	70.0%	
Lokalizacija	Ekstremiteti	11	64.7%	35	70.0%	X ² =0.501 p=0.835
	Trup	4	23.5%	8	16.0%	
	Retroperitoneum	2	11.8%	7	14.0%	
Veličina	≤5	10	58.8%	17	34.0%	X ² =3.249 p=0.071
	>5	7	41.2%	33	66.0%	
Regionalni limfni nodus	N ₀	11	64.7%	31	62.0%	X ² =0.040 p=0.842
	N ₁	6	35.3%	19	38.0%	
Metastaze	M ₀	10	58.8%	25	50.0%	X ² =0.396 p=0.529
	M ₁	7	41.2%	25	50.0%	
Histološki tip	Alveolarni	5	29.4%	18	36.0%	X ² =6.330 p=0.042*
	Embrionalni	9	52.9%	11	22.0%	
	Pleomorfni	3	17.6%	21	42.0%	
Gradus	Niski	9	52.9%	12	24.0%	X ² =4.938 p=0.026*
	Visoki	8	47.1%	38	76.0%	
Ishod bolesti	Živi	13	76.5%	22	44.0%	X ² =5.361 p=0.021*
	Umrli	4	23.5%	28	56.0%	

n(%)- broj pacijenata ; *statistički značajna razlika; #Long-rank test

U odnosu na ishod bolesti, pacijenti sa smrtnim ishodom su češće pokazivali smanjenu ekspresiju ovog markera (56,0%), u odnosu na pacijente koji su bili živi na kraju perioda praćenja (p=0,021).

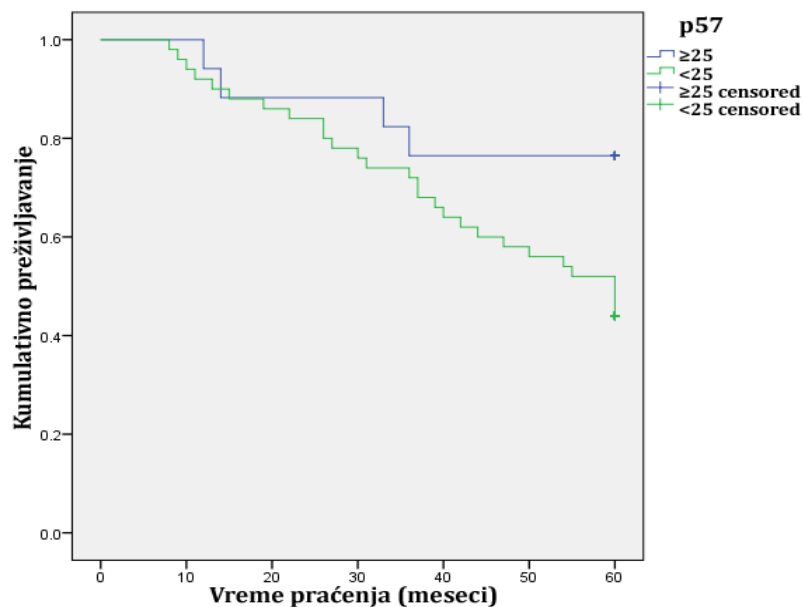
Analizom ekspresija p57 u odnosu na ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS, uočena je statistički značajna razlika ($p=0,045$). Stope ukupnog preživljavanja za 12, 36 i 60 meseci bile su 92,6%, 72,0% i 44,0% kod ispitanika sa smanjenom ekspresijom p57 (Tabela 15, Grafikon 10).

Tabela 15. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na ekspresiju p57

Ukupno preživljavanje										
		%					Prosek SE		95% IP	
meseci		12	24	36	48	60			Donji	Gornji
P57	<25	92,0	84,0	72,0	58,0	44,0	45,760	2,572	40,718	50,802
	≥25	94,1	88,2	76,5	76,5	76,5	51,471	3,941	43,747	59,195

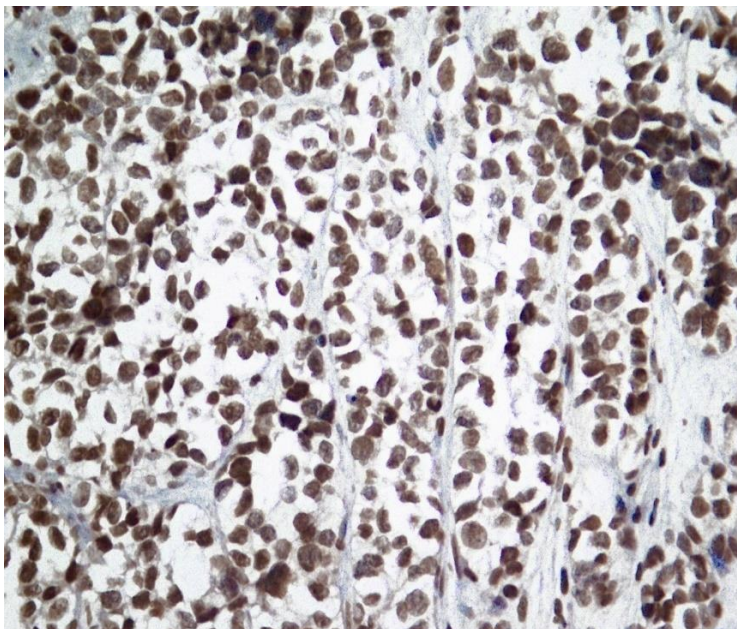
SE- standardna devijacija; IP- interval poverenja

Grafikon 10. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na ekspresiju p57.



4.11. Imunohistohemijska ekspresija p16

U ćelijama RMS, p16 je pokazivao jedarnu ekspresiju (Slika 20). Ovaj marker se u normalnom mišićnom tkivu fokalno eksprimira, zbog čega smo prisustvo do 5% pozitivnih ćelija u analiziranim slučajevima RMS, posmatrali kao očuvanu ekspresiju, a ekspresija u preko 5% pozitivnih ćelija kao povećanu.



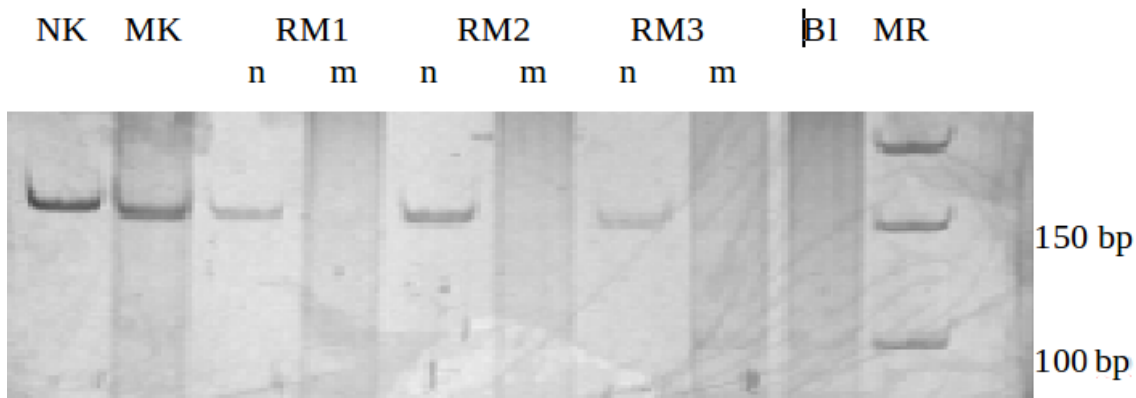
Slika 20. Difuzna ekspresija p16; x400.

Analizom rezultata ekspresije p16 u tumorskim ćelijama, uočili smo da je bila očuvana samo kod jednog pacijenta. U pitanju je bio pacijent muškog pola, mlađi od 18 godina, sa tumorom lokalizovanim na trupu veličine preko 5 cm. Radilo se o embrionalnom histološkom tipu tumora, niskog gradusa, bez zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza. Na kraju perioda praćenja ovaj pacijent je bio živ.

4.12. Analiza metilacionog statusa promotora gena p16

Analiza metilacionog statusa pokazala je prisustvo hipermetilacije promotora gena p16 u samo jednom slučaju (1/67) (Slika 21). U pitanju je bio pleomorfni tumor lokalizovan na donjem ekstremitetu. Takođe, kod istog pacijenta bile su prisutne udaljene

metastaze. Zanimljivo je da je ekspresija proteina p16 u datom uzorku bila, uprkos detektovanoj metilaciji promotora, vrlo visoka.



n-nemetilovani alel; m-metilovani alel; NK-nemetilovana kontrola; MK-metilovana kontrola; B1-blank; MR-marker; bp-bazni par

Slika 21. Metilaciona analiza promotora gena p16

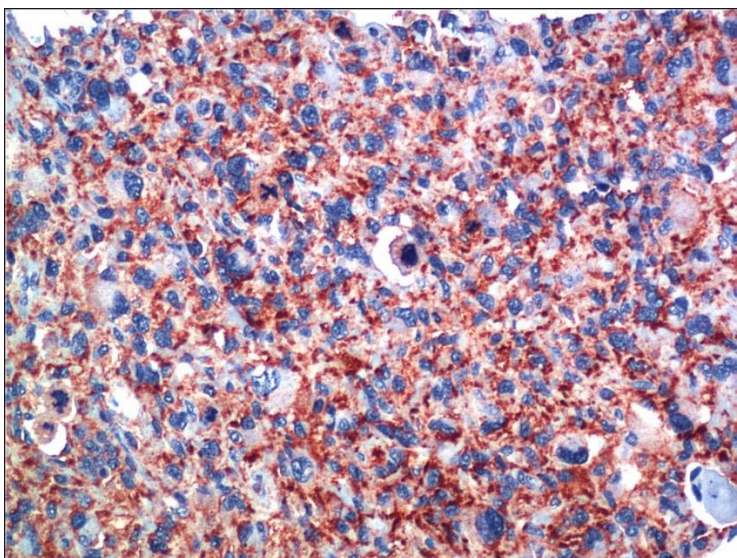
4.13. Imunohistohemijska ekspresija survivina

Imunohistohemijska ekspresija survivina u tumorskim ćelijama RMS bila je i citoplazmatska i jedarna.

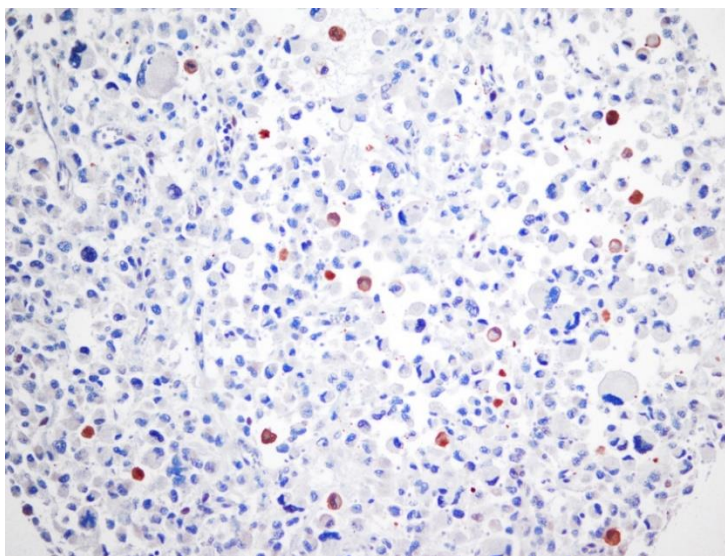
4.13.1. Citoplazmatska ekspresija survivina

U očuvanom skeletnom mišiću prisutna je difuzna citoplazmatska ekspresija survivina. Iz tog razloga, odsustvo i fokalna ekspresija ovog antitela u tumorskim ćelijama RMS se smatra patološkom (smanjenom) ekspresijom.

Difuzna citoplazmatska ekspresija survivina bila je prisutna kod više od polovine ispitivanih slučajeva RMS (53,7%) (Slika 22). Fokalna pozitivnost je bila zastupljena kod 25,4% a odusutna kod 20,9% ispitanika (Slika 23).



Slika 22. Difuzna citoplazmatska ekspresija survivina u tumorskim ćelijama, x400.



Slika 23. Fokalna citoplazmatska ekspresija survivina u tumorskim ćelijama, x400.

Analiza citoplazmatske ekspresije survivina u tumorskim ćelijama RMS, u odnosu na kliničko-patološke parametre nije imala statistički značaj, što je prikazano u tabeli 16.

Tabela 16. Citoplazmatska ekspresija survivina u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS.

		Survivin citoplazma						p-vrednost
		odsutno		fokalno		difuzno		
		n	%	n	%	n	%	
Pol	Muški	10	71.4%	10	58.8%	26	72.2%	$X^2=1.027$ p=0.599
	Ženski	4	28.6%	7	41.2%	10	27.8%	
Starost	≤18	5	35.7%	6	35.3%	13	36.1%	$X^2=0.003$ p=0.998
	>18	9	64.3%	11	64.7%	23	63.9%	
Lokalizacija	Ekstremitet	10	71.4%	12	70.6%	24	66.7%	$X^2=2.172$ p=0.718
	Trup	1	7.1%	3	17.6%	8	22.2%	
	Retroperitoneum	3	21.4%	2	11.8%	4	11.1%	
Veličina	≤5	7	50.0%	4	23.5%	16	44.4%	$X^2=2.792$ p=0.248
	>5	7	50.0%	13	76.5%	20	55.6%	
Regionalni limfni nodus	N ₀	9	64.3%	9	52.9%	24	66.7%	$X^2=0.949$ p=0.622
	N ₁	5	35.7%	8	47.1%	12	33.3%	
Metastaze	M ₀	10	71.4%	8	47.1%	17	47.2%	$X^2=6.612$ p=0.271
	M ₁	4	28.6%	9	52.9%	19	52.8%	
Histološki tip	Alveolarni	3	21.4%	5	29.4%	15	41.7%	$X^2=2.657$ p=0.627
	Embriionalni	4	28.6%	6	35.3%	10	27.8%	
	Pleomorfni	7	50.0%	6	35.3%	11	30.6%	
Gradus	Niski	5	35.7%	6	35.3%	10	27.8%	$X^2=0.460$ p=0.794
	Visoki	9	64.3%	11	64.7%	26	72.2%	
Ishod bolesti	Živi	9	64.3%	9	52.9%	17	47.2%	$X^2=1.181$ p=0.554
	Umrli	5	35.7%	8	47.1%	19	52.8%	

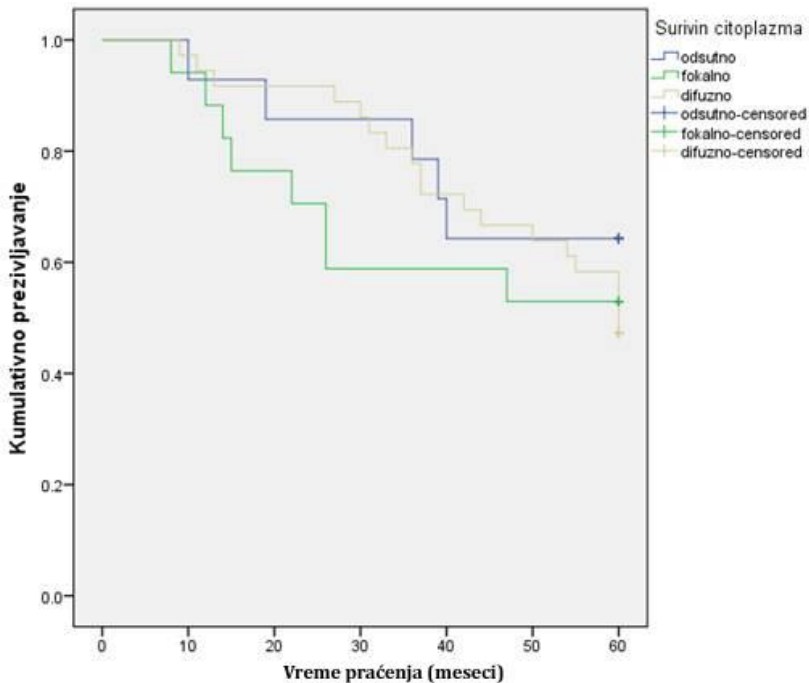
n(%)- broj pacijenata

U odnosu na pol pacijenata, fokalna i odsutna citoplazmatska ekspresija survivina češće je bila prisutna kod pacijenata muškog pola. Smanjena ekspresija ovog markera bila je zastupljenija kod pacijenata starijih od 18 godina, kod tumora lokalizovanih u predelu ekstremiteta, tumora većih od 5cm, i slučajeva bez zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova i bez udaljenih metastaza. U odnosu na histološki tip, pleomorfni RMS je najčešće pokazivao smanjenje ekspresije, što je bilo zapaženo i kod tumora visokog gradusa. Smanjena citoplazmatska ekspresija survivina bila je češća kod pacijenata koji su bili živi na kraju perioda praćenja.

Analizom odnosa citoplazmatske ekspresija survivina i ukupnog preživljavanja pacijenata sa RMS, nije uočena statistički značajna razlika (p=0,682). Stope ukupnog

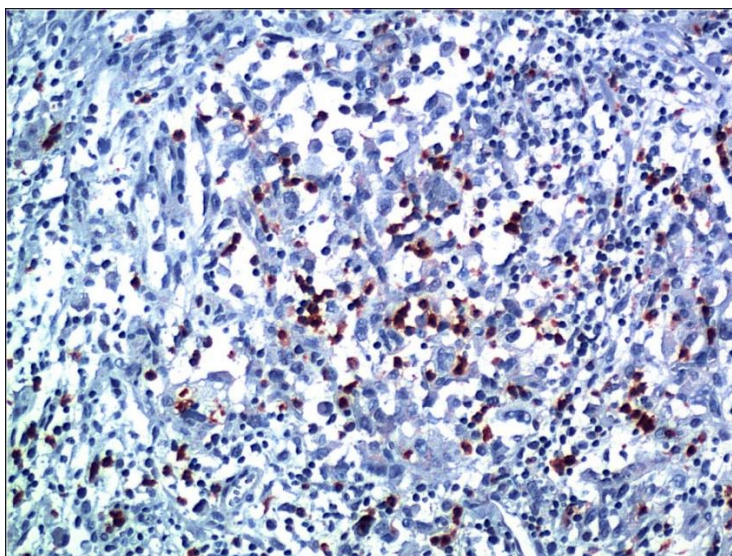
preživljavanja za 12-, 36- i 60 meseci su bile 90,3%, 67,7% i 58,1% za ispitanike sa smanjenom, odnosno, patološkom ekspresijom survivina (Grafikon 11).

Grafikon 11. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na citoplazmatsku ekspresiju survivina.

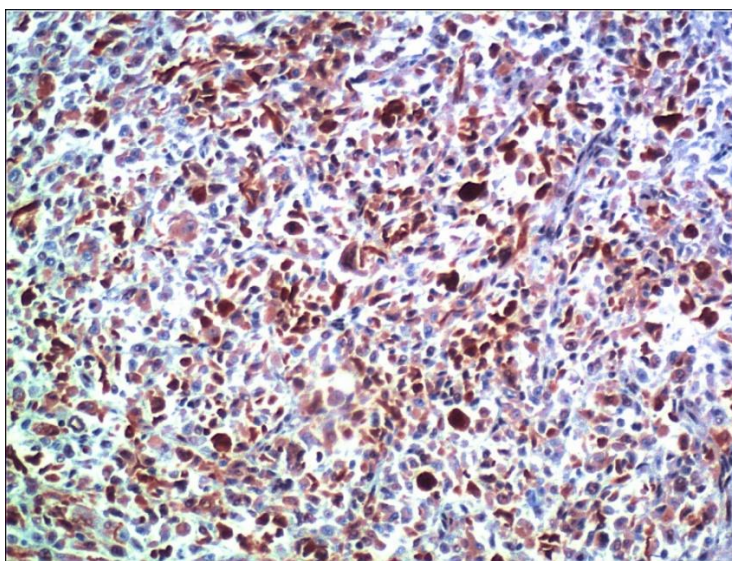


4.13.2. Jedarna ekspresija survivina

U očuvanom skeletnom mišićnom tkivu samo se fokalno uočava jedarna ekspresija survivina. Iz tog razloga mi smo prisustvo do 5% pozitivnih ćelija u analiziranim slučajevima RMS, posmatrali kao očuvanu ekspresiju, dok je ekspresija u preko 5% pozitivnih ćelija ocenjena kao povećana. Kod 18 (26,9%) bolesnika jedarna ekspresija survivina je bila očuvana ($\leq 5\%$ pozitivnih tumorskih ćelija) (Slika 24), dok je kod 49 (73,1%) pacijenata ocenjena kao visoka ($>5\%$ pozitivnih tumorskih ćelija) (Slika 25).



Slika 24. Jedarna ekspresija survivina u $\leq 5\%$ pozitivnih tumorskih ćelija, x 100.



Slika 25. Jedarna ekspresija survivina u $>5\%$ pozitivnih tumorskih ćelija, x 100.

Za razliku od citoplazmatske ekspresije survivina, korelacija jedarne ekspresije ovog markera i posmatranih kliničko-patoloških parametara je bila statistički značajna u odnosu na starosne grupe, histološki tip i gradus tumora (Tabela 17).

Povećana jedarna ekspresija survivina bila je kod pacijenata starijih od 18 godina u odnosu na mlađu starosnu grupu, (p=0.009).

Takođe, pokazano je da pleomorfni RMS češće pokazuje povećanu jedarnu ekspresiju survivina u odnosu na ARMS i ERMS, (p=0.008).

Pored histološkog tipa i starosti, statistički značajna razlika utvrđena je i odnosu jedarne ekspresije survivina i gradusa RMS (p=0.010). Povećana jedarna ekspresija je češće bila prisutna kod tumora visokog gradusa.

Povećana jedarna ekspresija survivina je češće bila prisutna kod pacijenata muškog pola, tumora lokalizovanih u predelu ekstremiteta, većih od 5cm, sa udaljenim metastazama, bez prisustva tumorskih depozita u regionalnim limfnim čvorovima, ali bez statistički značajne razlike. Približno isti broj pacijenata sa različitim ishodom bolesti je imao povećanu jedarnu ekspresiju ovog markera (p=0.378) (Tabela 17).

Tabela 17. Jedarna ekspresija survivina u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS

		Survivin jedarno				p-vrednost
		≤5		>5		
		n	%	n	%	
Pol	Muški	15	83.3%	31	63.3%	X ² =2.464 p=0.117
	Ženski	3	16.7%	18	36.7%	
Starost	≤18	11	61.1%	13	26.5%	X ² =6.847 p=0.009*
	>18	7	38.9%	36	73.5%	
Lokalizacija	Ekstremiteti	12	66.7%	34	69.4%	X ² =0.368 p=0.837
	Trup	4	22.2%	8	16.3%	
	Retroperitoneum	2	11.1%	7	14.3%	
Veličina	≤5	7	38.9%	20	40.8%	X ² =0.020 p=0.887
	>5	11	61.1%	29	59.2%	
Regionalni limfni nodus	N ₀	11	61.1%	31	63.3%	X ² =0.026 p=0.872
	N ₁	7	38.9%	18	36.7%	
Metastaze	M ₀	12	66.7%	23	46.9%	X ² =2.053 p=0.152
	M ₁	6	33.3%	26	53.1%	
Histološki tip	Alveolarni	6	33.3%	17	34.7%	X ² =9.650 p=0.008*
	Embrionalni	10	55.6%	10	20.4%	
	Pleomorfni	2	11.1%	22	44.9%	
Gradus	Niski	10	55.6%	11	22.4%	X ² =6.705 p=0.010*
	Visoki	8	44.4%	38	77.6%	
Ishod bolesti	Živi	11	61.1%	24	49.0%	X ² =0.777 p=0.378
	Umrli	7	38.9%	25	51.0%	

n(%)- broj pacijenata; *statistički značajna razlika

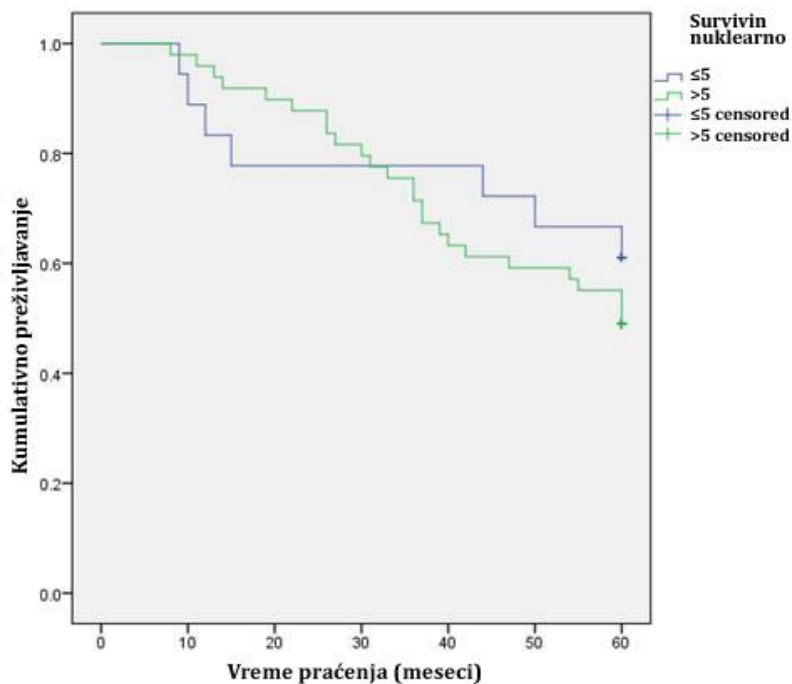
Analizom odnosa jedarne ekspresija survivina i ukupnog preživljavanja pacijenata sa RMS, nije uočena statistički značajna razlika ($p=0,461$). Stope ukupnog preživljavanja za 12-, 36- i 60 meseci bile su 95,9%, 71,4% i 49,0% za ispitanike sa povećanom jedarnom ekspresijom survivina (Tabela 18, Grafikon 12).

Tabela 18. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na jedarnu ekspresiju survivina.

Ukupno preživljavanje										
		%					Prosek SE		95% IP	
meseci		12	24	36	48	60			Donji	Gornji
Survivin (jedro)	≤5	83,3	77,8	77,8	72,2	61,1	47,778	5,055	37,870	57,686
	>5	95,9	87,8	71,4	59,2	49,0	47,000	2,442	42,213	51,787

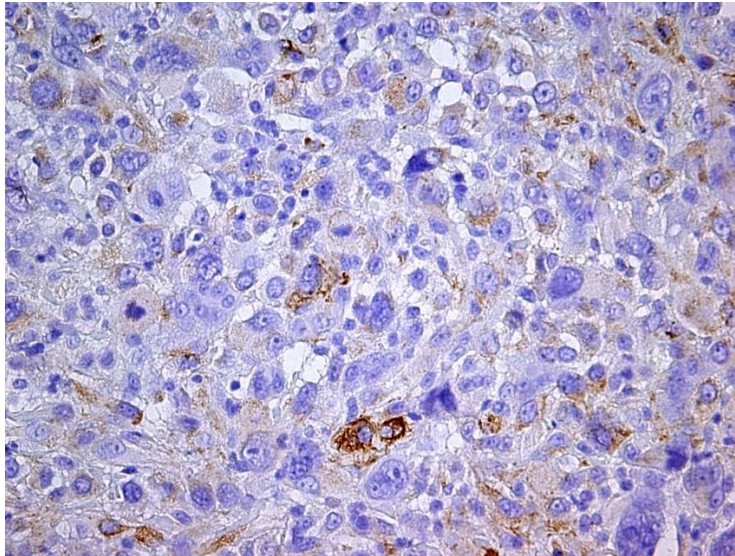
SE- standardna devijacija; IP- interval poverenja

Grafikon 12. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na jedarnu ekspresiju survivina

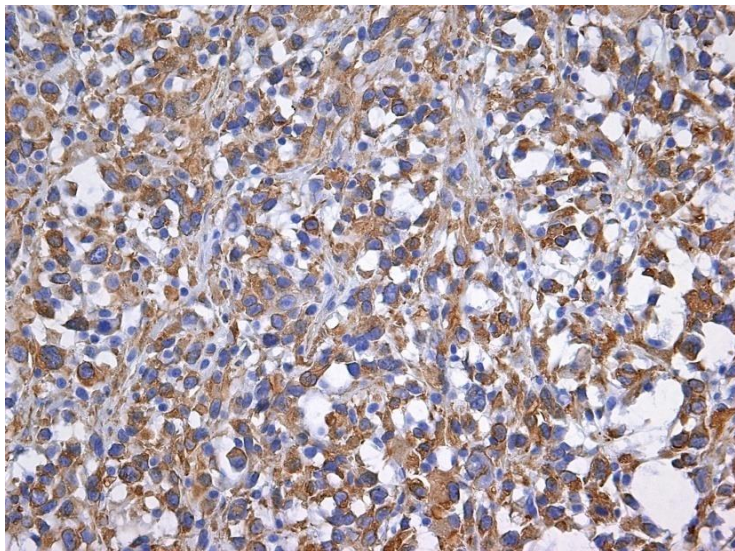


4.14. Imunohistohemijska ekspresija nestina

U ćelijama RMS nestin je pokazivao citoplazmatsku ekspresiju. S obzirom da su svi ispitivani slučajevi RMS pokazivali pozitivnost, grupisali smo slučajeve u grupu $\leq 50\%$ pozitivnih tumorskih ćelija (fokalna i umerena ekspresija), a slučajeve sa difuznom ekspresijom u grupu $> 50\%$ pozitivnih ćelija, radi dalje statističke obrade.



Slika 26. Ekspresija nestina u $\leq 50\%$ tumorskih ćelija, x 400.



Slika 27. Ekspresija nestina u $> 50\%$ tumorskih ćelija, x 400.

Kod 33,3% bolesnika ekspresija nestina je bila prisutna u $\leq 50\%$ tumorskih ćelija (Slika 26), dok je kod 66,7% pacijenata ekspresiju bila u $> 50\%$ tumorskih ćelija (Slika 27).

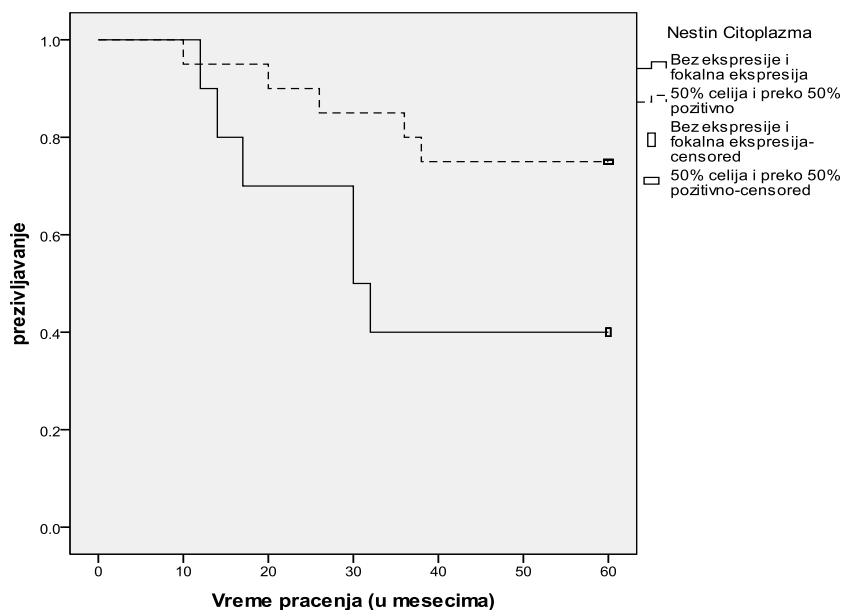
U tabeli 19 prikazani su rezultati odnosa ekspresije nestina i kliničko-patoloških parametara ispitivanih pacijenata. Analiza ekspresije nestina je pokazala statistički značaj u odnosu na starost pacijenata ($p = 0,028$) i gradus tumora ($p = 0,022$). Pozitivnost u $> 50\%$ pozitivnih tumorskih ćelija je bila povezana sa pacijentima mlađim od 18 godina i tumorima niskog gradusa. U odnosu na ostale posmatrane parametre nije bilo statističkog značaja.

Tabela 19. Ekspresija nestina u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS

Posmatrane karakteristike		Nestin		p-vrednost
		$\leq 50\%$	$> 50\%$	
Pol n (%)	Muški	8 (80,0%)	11 (55,0%)	^a p=0,246
	Ženski	2 (20,0%)	9 (45,0%)	
Starost (god.) (X_±SD)		43,60 _± 27,58	21,92 _± 22,23	^b p=0,028*
Lokalizacija n (%)	Ruka	5 (50,0%)	9 (45,0%)	^c p=0,923
	Noga	4 (40,0%)	8 (40,0%)	
	Trup	1 (10,0%)	3 (15,0%)	
Veličina n (%)	$\leq 5\text{cm}$	3 (30,0%)	6 (30,0%)	^a p=1,000
	$> 5\text{cm}$	7 (70,0%)	14 (70,0%)	
Metastaze n (%)	M ₀	6 (60,0%)	12 (60,0%)	^a p=1,000
	M ₁	4 (40,0%)	8 (40,0%)	
Histološki tip n (%)	Embrionalni	2 (20,0%)	10 (50,0%)	^c p=0,100
	Alveolarni	3 (30,0%)	7 (35,0%)	
	Pleomorfni	5 (50,0%)	3 (15,0%)	
Gradus n (%)	Niski	3 (30,0%)	12 (60,0%)	^a p=0.022*
	Visoki	7 (70,0%)	8 (40,0%)	
Ishod bolesti n (%)	Živi	4 (21%)	15 (79%)	^a p=0.108
	Umrli	6 (54.5%)	5 (45.5%)	

*statistički značajna razlika; ^aFisher-ov test; ^bt-test; ^c χ^2 -test

Grafikon 13. Ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u odnosu na ekspresiju nestina



Ekspresija nestina statistički značajno je uticala na ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS, ($p=0,044$). U grupi pacijenata sa $> 50\%$ pozitivnih ćelija, zabeleženo je bolje ukupno preživljavanje. Stope preživljavanja za 12-, 36- i 60 meseci su bile 95,0%, 80,0% i 75,0% za ovu grupu ispitanika. (Grafikon 13).

Na kraju, urađena je Cox-ova univarijantna i multivarijantna regresiona analiza, da bi se izdefinisali prediktori preživljavanja. U tabeli 20 prikazana je univarijantna analiza preživljavanja.

Iz tabele se vidi da su statistički značajni prediktori preživljavanja starost, histološki tip i gradus tumora, kao i zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa i prisustvo udaljenih metastaza. Od ispitivanih markera jedino je p57 na granici statističke značajnosti, dok ostali nisu statistički značajni.

Tabela 20. Univarijantna Cox-ova regresiona analiza uticaja analiziranih faktora na preživljavanje pacijenata sa RMS

	p-vrednost	HR	IP 95%	
			Donji	Gornji
Pol muški	0,385	1,407	0,651	3,043
Starost >18	<0,001*	13,617	3,244	57,170
Lokalizacija				
Ekstremiteti		1		
Trup	0,550	0,744	0,282	1,965
Retroperitoneum	0,964	1,022	0,387	2,704
Histološki tip				
Alveolarni		1		
Embionalni	0,005*	0,055	0,007	0,418
Pleomorfni	0,530	1,255	0,618	2,548
N ₁	<0,001*	6,341	3,001	13,399
M ₁	0,001*	3,662	1,729	7,759
Veličina ≥5	<0,001*	39,120	5,313	288,021
Gradus visoki	0,002*	22,342	3,043	164,027
p57 <25	0,057	2,768	0,970	7,899
Ciklin D >5	0,504	1,354	0,557	3,290
Survivin jedarno >5	0,466	1,366	0,590	3,163
Survivin citoplazma difuzno	0,702	1,148	0,567	2,325
Ciklin A	0,246	1,015	0,990	1,040

*statistički značajna razlika; HR- hazard ratio (srp.odnos šansi); IP- interval poverenja

Multivarijantna analiza rađena je u dva koraka. Prvo je urađena multivarijantna analiza sa statistički značajnim prediktorima u univarijantnoj analizi, dok su značajni prediktori iz te analize uzeti zajedno sa p57 u sledećem koraku. Rezultati su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Multivarijantna Cox-ova regresiona analiza uticaja analiziranih faktora na preživljavanje pacijenata sa RMS

	p-vrednost	HR	IP 95%	
			Donji	Gornji
Starost >18	0,978	0,970	0,119	7,900
N ₁	<0,001*	5,964	2,349	15,138
M ₁	0,013*	2,944	1,261	6,872
Veličina ≥5	0,003*	22,575	2,928	174,054
Gradus visoki	0,251	5,249	0,310	88,942
p57 <25	0,898	0,928	0,295	2,917
N ₁	<0,001*	7,739	3,107	19,280
M ₁	0,001*	3,792	1,683	8,547
Veličina ≥5	0,002*	29,923	3,571	250,78

*statistički značajna razlika; HR- hazard ratio (srp.odnos šansi); IP- interval poverenja

Evidentno je da su zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa, prisustvo udaljenih metastaza i veličina tumora ključni prediktori preživljavanja, kada se analiziraju rezultati multivarijantne analize. P57 nije se pokazao kao značajan prediktor preživljavanja kada se uzmu u obzir ostali klinički značajni prediktori.

5. DISKUSIJA

RMS predstavlja najčešći mekotkivni tumor dece i adolescenata. Više od polovine pedijatrijskih sarkoma do 15 godine života čine RMS, a u manje od 2% ovi tumori se javljaju u starijoj populaciji. Bimodalna starosna distribucija je uočena kod dece uzrasta između 2. i 6. godine života, i kasnije između 10. i 18. godine starosti (16, 23).

Utvrđeni prognostički faktori, kada je u pitanju RMS su lokalizacija, veličina tumora, histološki tip, starost pacijenata, odnos prema anatomo-hirurškim kompartmanima. Na osnovu ovih parametara pacijenti se svrstavaju u grupe rizika (visokog, srednjeg i niskog stepena), što određuje dalji terapijski pristup

U odnosu na pol, literaturni podaci pokazuju neznatno veću učestalost RMS kod muškog pola (16, 71, 37). Registrovana prevalenca RMS u našoj studiji je iznosila 2,1:1, u korist muškog pola, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Ređe su publikovani rezultati kod kojih se tumor čeće javljao kod ženskog pola (205).

Najveći broj studija ukazuju da se RMS najčešće javlja kod mlađih od 15 godina, i čini čak 60% svih sarkoma mekih tkiva u pedijatrijskoj onkologiji (2, 17, 206, 23). Podaci o starosti pacijenata u našem ispitivanju pokazuju veću učestalost RMS kod pacijenata prosečne starosti 35 godina (najmlađi pacijent je imao 0,8, a najstariji 77 godina). Objašnjenje za manju incidencu u mlađem životnom dobu nalazimo u činjenici da ova studija nije obuhvatala i materijal zdravstvenih ustanova specijalizovanih za pedijatrijsku patologiju. U odnosu na starosnu dob, a zbog prognostičkog značaja, ispitivani pacijenti su podeljeni u 2 starosne grupe, pacijente mlađe i starije od 18 godina života. RMS je registrovan kod starijih od 18 godina u čak 64,2% slučajeva.

Lokalizacija tumora u našoj seriji pokazala je odstupanja u odnosu na podatke iz literature. Dok je RMS u velikim serijama, gde se najčešće radilo o pedijatrijskim slučajevima, bio uglavnom lokalizovan u predelu glave i vrata i genito-urinarnom traktu (69, 71, 37), u našoj, su ekstremiteti bili najčešća lokalizacija (46 bolesnika- 68,7%). Trup (17,9%) i retroperitonealni prostor (13,4%) bili su ređa primarna lokalizacija. Ova odstupanja je moguće objasniti činjenicom da su uglavnom bili zastupljeni pacijenti iz starije starosne grupe (>18 god.), a kod odraslih pacijenata najčešća anatomska lokalizacija

RMS su ekstremiteti (73, 250). Veličina primarnog tumora je kod 60% obolelih bila veća od 5cm, kod dve trećine ispitanika nije postojala zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa a kod polovine su postojale udaljene metastaze.

Na osnovu morfoloških karakteristika, bila je približna zastupljenost sva tri histološka tipa RMS. Pleomorfni RMS je bio dijagnostikovao kod 24, ARMS kod 23, a ERMS kod 20 ispitanika. Nasuprot našem nalazu, Little DJ i saradnici, su na seriji od 82 slučaja RMS kod odraslih osoba, prikazali pleomorfni RMS kao najčešći tip (43%), dok su ARMS i ERMS bili ređi histološki tipovi (23% i 34%) (208). U drugom ispitivanju koje je obuhvatalo seriju od 26 pacijenata sa RMS starijih od 18 godina, ARMS je bio najzastupljeniji histološki tip (50%), a najređi ERMS i to kod samo 4 pacijenta (18). Međutim, studije koje su ispitivale ovaj tumora na velikom broju pedijatrijskih slučajeva RMS pokazuju da su dominantni histološki tipovi ERMS i ARMS, dok se pleomorfni tip izuzetno retko javlja (37, 209). U odnosu na gradus RMS, visokogradusni tumori su bili kod skoro 70% pacijenata, što je očekivan rezultat s obzirom da smo imali najveći broj slučajeva sa pleomofnim i ARMS (210).

Posmatrajući ishod bolesti pacijenata sa RMS, u našoj studiji, od 67 ispitanika 32 su imala povoljan ishod bolesti. Slične rezultate su prikazali Furlong MA i saradnici (211). Suprotno našim rezultatima, studija koja je obuhvatila i 1071 slučaj adultnih RMS, 73% pacijenata je imalo letalni ihod bolesti (17), dok je u studiji na 160 pacijenata sa RMS 65% pacijenata bilo živo na kraju ispitivanja (9).

Poslednje dve decenije prognoza pacijenata sa ovim tumorom je značajno poboljšana. Multimodalnim terapijskim pristupom, petogodišnje preživljavanje se danas kreće od 30% za grupu visokog rizika, 70% za grupu srednjeg rizika do 90% za grupu niskog rizika. Ipak, ovakav pristup terapiji RMS nije doveo do većeg napretka kada su u pitanju pacijenti iz visokorizične grupe (71, 208).

Ukupno petogodišnje preživljavanje pacijenata sa RMS u ovoj studiji je iznosilo 52,2%. Nešto kraće preživljavanje, prikazali su Ferrari i saradnici (45,7%) i Sultan i saradnici (46%), za isti period praćenja (212, 17). U literaturi postoje i podaci o dužem

preživljavanju obolelih od RMS, tako da je petogodišnje preživljavanje u jednoj studiji iznosilo 56,9% (213), a u radu Hosoi i saradnika 61,5% (214).

Kliničko-patološke karakteristike RMS, za koje je dokazano da su prognostički faktori (17, 78, 37), i u ovoj studiji su imale značajan uticaj na ishod bolesti i ukupno preživljavanje.

Kao što smo već rekli u poslednje dve decenije je postignuta značajno bolja prognoza za pacijente sa RMS, osim za pacijente iz grupe visokog rizika. Heterogenost ovog tumora sugerise da u njegovom nastanku važnu ulogu imaju brojni patobiološki fenomeni koji dele celularne i biološke karakteristike sa mišićem u razvoju. Za klinički ishod, kao i terapijski pristup od izuzetnog značaja je uočavanje i tumačenje ovih razlika. Zbog toga smo u našem radu pored već utvrdjenih prognostičkih faktora analizirali i regulatore ćelijskog ciklusa.

Nekontrolisana ćelijska proliferacija je jedna od najistaknutijih karakteristika tumora i povezana je sa poremećajima kontrole ćelijskog ciklusa. Danas znamo da su za odvijanje ćelijskog ciklusa najvažnije tri grupe proteina i to: ciklin-zavisne kinaze (CZK), ciklini i inhibitori ciklin-zavisnih kinaza. Ciklini su pozitivni regulatori ćelijskog ciklusa i njihova prekomerna ekspresija je povezana sa ubrzanom proliferacijom i nastankom tumora. Sa druge strane, smanjena ekspresija inhibitora ćelijskog ciklusa dovodi do ubrzane proliferacije ćelija (13). Objavljeno je nekoliko studija koji se odnose na ulogu regulatora ćelijskog ciklusa u RMS (47), a koje su pokazale značajnu ulogu proteina-regulatora ćelijskog ciklusa u tumorogenezi RMS, razvoju anaplazije i sposobnosti ka metastaziranju.

Imunohistohemijska ekspresija ciklina A u RMS

Dokazano je da proliferacija tumorskih ćelija predstavlja važan prognostički faktor u različitim tipovima malignih tumora, kao i to da se proliferativni indeks koristi za procenu osetljivosti tumorskog tkiva na hemioterapiju. Imunohistohemijska ekspresija ciklina A je jedna od brojnih metoda koje se koriste u tu svrhu. Ciklin A određuje frakciju tumorskih ćelija u S i G2 fazi ćelijskog ciklusa, a to su kritične tačke za delovanje hemoterapije na tumorske ćelije. Međutim, moramo istaći neka od ograničenja u evaluaciji ciklina A, kao što je postojanje različitih metoda za ocenu imunohistohemijske ekspresije odnosno nedostatak idealnih graničnih vrednosti (215). S obzirom da u literaturi postoje značajne razlike u određivanju graničnih vrednosti imunohistohemijske ekspresije ciklina A (216), u našoj analizi nije određen "cut off" za ovaj marker. Mi smo svaku jedarnu pozitivnost tumorskih ćelija smatrali povećanom ekspresijom bez obzira na intenzitet. Karakteristike pacijenata u odnosu na ovaj marker predstavljene su kroz aritmetičku sredinu, medijanu i mere centralne disperzije.

U našoj analizi ekspresija ciklina A se kretala od 0% do 66,7% pozitivnih ćelija, sa srednjom vrednošću od 18,82 i standardnom devijacijom od 13,65 dok je medijana imala vrednosti od 17,30. Odnos ekspresije ovog markera u odnosu na histološki tip RMS pokazao je statističku značajnost, za razliku od ostalih kliničko-patoloških parametara. Naime, pacijenti sa pleomorfim RMS imali su veće srednje vrednosti ekspresije ciklina A u odnosu na ARMS i ERMS.

Slično našim rezultatima, u seriji u kojoj je ispitivan 71 slučaj malignih tumora pluća pokazano je da planocelularni histološki tip tumora ima značajno veću ekspresiju ciklina A u odnosu na adenokarcinome, kao i niži stadijumi tumora (217). Dobashi i saradnici, takođe ukazuju na značajnu povezanost ekspresije ovog antitela u odnosu na histološki tip tumora. Navode i da je povećana ekspresija ovog markera bila značajno veća kod tumora sa metastazama u regionalnim limfnim nodusima, ali i kod loše diferentovanih karcinoma bez obzira na histološki tip (218). Analizirajući ekspresiju ciklina A u karcinomu dojke, Boström i saradnici, ukazuju na statistički značajnu povezanost između

povećane ekspresije ciklina A i gradusa tumora (219). Značajnost povećane ekspresije u odnosu na gradus ali i u odnosu na infiltrativan način rasta je uočena kod ispitivanih slučajeva urotelijalnog karcinoma (108) kao i kod miksofibrosarkoma (220) i invazivnih karcinoma dojke (221).

Ograničen je broj studija u dostupnoj literaturi koje ukazuju na prognostički značaj ekspresije ciklina A u sarkomima (220). U seriji od 126 mekotkivnih sarkoma, ekspresija ciklina A se pokazala kao značajan prognostički parametar, pri čemu je srednja vrednost ove ekspresije iznosila 11% pozitivnih tumorskih ćelija. Od ispitivanih kliničko–patoloških faktora jedino su gradus tumora i lokalizacija korelirale sa visokom ekspresijom ciklina A. Tumori su bili većeg gradusa i dublje lokalizacije (216). U istom tipu maligniteta ovu ekspresiju je ispitivao i Engellau J. na ukupno 140 različitih histoloških tipova sarkoma, i prikazao da je kod 60% tumora bila povećana imunoreaktivnost ciklina A. Ova povećana imunoreaktivnost je bila u značajnoj korelaciji sa pojavom lokalnih recidiva, kao i sa tumorima kod kojih postoje genetske abnormalnosti (pozitivni fuzioni status) (220).

Mnogi autori su analizirali uticaj ekspresije ciklina A na preživljavanje pacijenata sa tumorima različitog fenotipa. U većini slučajeva visoka ekspresija ovog markera povezana je sa lošim prognostičkim faktorima. Tako je uočeno smanjeno ukupno preživljavanje kod karcinoma dojke, (221, 219), ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća (218), karcinoma prelaznog epitela (108), kao i u sarkomima (216). Suprotno ovim rezultatima, u literaturi postoje dokazi da je niska ekspresija ciklina A povezana sa lošijim preživljavanjem što je prikazano kod obolelih od karcinoma ovarijuma (109) i non-Hodgkin limfomima (222).

U našoj grupi bolesnika ciklin A nije imao prognostički značaj, što je u saglasnosti sa radovima nekih autora. Oda i saradnici, nisu pokazali značaj povećane ekspresije ovog proteina kao nezavisnog prognostičkog parametra kod 61 slučaja miksofibrosarkoma sa "cut off-om" od >10% pozitivnih ćelija, u multivarijantnoj analizi. (220). Takođe, Noguchi i saradnici ne nalaze povezanost između ukupnog preživljavanja pacijenata sa

leiomyosarkomom i ekspresije ciklina A (223), kao ni autori koji su ekspresiju istog markera ispitivali na ne-sitnoćelijskim karcinomima pluća (107) (217).

Različiti rezultati mogu biti posledica nedostatka konsenzusa u vezi sa metodologijom procene ekspresije ciklina A, naročito pri definisanju "cut-off" vrednosti za visok/nizak proliferativni indeks u tumorskim ćelijama. Neke od ranijih studija su za graničnu vrednost postavljali srednju vrednost ekspresije za celu kohortnu studiju. Drugi autori su procenjivali ekspresiju semikvantitativno pa su rezultate podelili u kvartile, pri čemu je "cut-off" vrednost bila ona koja je prevazilazila ekspresiju ovog proteina u normalnom tkivu (224). Iz svega gore navedenog naša buduća istraživanja treba usmeriti ka definisanju optimalnih graničnih vrednosti za evaluaciju imunohistohemijske ekspresije ciklina A.

Imunohistohemijska ekspresija ciklina D1 u RMS

U našoj studiji, čak 79,1% RMS je pokazivao povećanu jedarnu ekspresiju ciklina D1, a što je definisano u odnosu na njegovu ekspresiju u očuvanom mišićnom tkivu. U literaturi su prikazani brojni rezultati povećane ekspresije ciklina D1 u humanim malignitetima kao što je kolorektalni karcinom (225), karcinomom dojke (226), oralni planocelularni karcinom (227), sinovijalni sarkom (228), karcinom prostate (229), ne-sitnoćelijski karcinom pluća (230). Suprotno ovim studijama, Fagone P i saradnici su ukazali na nisku ili odsutnu ekspresiju ciklina D1 u RMS (231) kao i Zhang J (232). Odsustvo ekspresije ovog markera je pokazano i u svim slučajevima hromofobnog i svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija (233).

Korelacija između imunohistohemijske ekspresije ciklina D1 i kliničko-patoloških parametara u literaturi prikazuju različit značaj. Rezultati naše analize ekspresije ciklina D1 u odnosu na kliničko-patološke parametre u RMS, nije pokazivala statistički značaj, osim u odnosu na lokalizaciju tumora gde je bila blizu konvencionalnog nivoa. Visoka ekspresija ciklina D1 je bila kod najvećeg broja tumora lokalizovanih u predelu ekstremiteta (69,8%). Znatno manji broj ispitanika sa RMS retroperitonealnog prostora i trupa je imao visoku

ekspresiju. Druge studije su takođe pokazale slične rezultate. Takahashi Y i saradnici, su pokazali značajnu povezanost između visoke ekspresije ovog markera i lokalizacije RMS (47), dok je ona imala granične vrednosti u odnosu na lokalizaciju kolorektalnih karcinoma (234).

Analizom naših rezultata ekspresije ciklina D1 a u odnosu na ostale kliničko-patološke parametre, uočili smo da je povećana ekspresija bila zastupljena kod tumora bez regionalnih i udaljenih metastaza, kao i kod slučajeva sa pleomorfim RMS. Brojne studije su pokazale da prekomerna ekspresija ovog markera ima značajnu ulogu u tumorogenzi, progresiji i metastaziranju. Međutim, u ne tako malom broju radova se navode i suprotni rezultati (235).

Fagone i saradnicu u svom radu nisu dokazali značaj različitih nivoa ekspresije ovog proteina u odnosu na histološki tip RMS. Uticaj ekspresije ciklina D1 na kliničko-patološke parametre je ispitivan i u drugim malignitetima. Tako u kolorektalnom karcinomu nije pokazan značaj ove ekspresije u odnosu na posmatrane parametre (225), a kod slučajeva sa karcinomom prostate nije imao uticaja na gradus tumora (229).

Ciklin D1 je pokazao statističku značajnost u korelaciji sa razvojem regionalnih metastaza kod oralnog planocelularnog karcinoma (227) i kod invazivnog lobularnog karcinoma dojke (236). Kod karcinoma Vaterove ampule, visoka ekspresija ovog antitela je bila povezana sa povećanim rizikom za pojavu recidiva (237).

Poznato je da ciklin D1 reguliše progresiju ćelijskog ciklusa, ali u poslednjih nekoliko godina mnogi autori ukazuju na njegovu ulogu u ćelijskoj migraciji, DNA reparaciji i hromozomskoj stabilnosti. Poremećaj regulacije ekspresije ovog proteina povezan je sa agresivnim ponašanjem i lošijom prognozom različitih humanih neoplazmi (237). Tobin i saradnici su na seriji od 775 invazivnih lobularnih karcinoma dojke zapazili da je povećana nuklearna pozitivnost ciklina D1 bila povezana sa lošijim preživljavanjem pacijenata (236), a u radu Lin H i saradnika, pokazano je da kod pacijenata sa invazivnim duktalnim karcinomom dojke on predstavlja nezavistan prognostički marker (226). Dokazan je i kao prediktor ukupnog preživljavanja kod pacijenata sa oralnim

planoćelularnim karcinomom (227). Suprotno ovim rezultatima u našem ispitivanju nije utvrđeno da ekspresija ciklina D1 ima uticaj na ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS, što je u saglasnosti sa rezultatima Zhang QL i saradnika (230), kao i Al-Maghrabi J i saradnika (234). Iste rezultate odnosa ciklina D1 i preživljavanja pacijenta sa RMS su prikazali Takahashi Y i saradnici (47).

Imunohistohemijska ekspresija p57 u RMS

U ćelijama RMS procenjavana je jedarna ekspresija p57. Nivo p57 varira tokom embriogeneze i diferencijacije, kao i u različitim fazama ćelijskog ciklusa. Ekspresija p57 opada ili se uopšte ne može detektovati kod nekih adultnih organa uključujući jetru i slezinu. Međutim, skeletni mišić, srce, mozak, pluća, bubreg, pankreas i testis su tkiva koja su zadržala i pokazuju difuznu ekspresiju ovog proteina u adultnom dobu (119). Stoga smo prisustvo od preko 25% pozitivnih ćelija u analiziranim slučajevima posmatrali kao očuvanu ekspresiju, dok je ekspresija u manje od 25% pozitivnih ćelija ocenjena kao smanjena (patološka) a koja je bila zastupljena kod većine naših ispitanika (74,6%).

Pored značaja p57 u ćelijskom ciklusu, novija istraživanja pokazuju da se radi o multifunkcionalnom proteinu, koji učestvuje u regulaciji brojnih procesa, a koji mogu biti poremećeni u tumorogenezi (120).

U odnosu na analizirane kliničko-patološke parametre u našoj studiji, smanjena ekspresija p57 pokazala se značajnom kada je u pitanju histološki tip i gradus tumora, kao i kod ishoda bolesti. Najveći broj alveolarnih i pleomorfnih RMS je pokazivao patološku ekspresiju p57, pa je i u odnosu na gradus najveći broj visoko gradusnih tumora imao ovaj vid ekspresije. Posmatrano u odnosu na ishod bolesti, pacijenti sa smrtnim ishodom su češće imali smanjenu ekspresiju ovog markera. Od ostalih ispitivanih parametara RMS, patološka ekspresija je bila blizu konvencionalnog nivoa značajnosti u odnosu na starost pacijenata i veličinu tumora.

Fan i saradnici su ispitivali razliku u ekspresiji p57 u premalignim i malignim oralnim lezijama i pokazali da je ona značajno smanjena u planocelularnom karcinomu. Takođe, ovi autori ističu značajnu povezanost smanjene ekspresije ovog proteina sa tumorima većih dimenzija, pojavom metastaza i višim kliničkim stadijumom (238). TNM status hepatocelularnog karcinoma je takođe bio povezan sa smanjenom ekspresijom p57 (239).

Analizom ekspresije p57 u različitim histološkim tipovima ne-sitnoćelijskih karcinoma pluća pokazano je da je njeno smanjenje u korelaciji sa histološkim tipom i pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (240). Karcinomi prostate višeg gradusa imali su izraženo smanjenje ekspresije proteina p57 u odnosu na normalno tkivo prostate, premaligne lezije, ali i karcinome sa višim Gleason skorom (241). Slične rezultate u odnosu na gradus tumora prikazuju i studije na malignim tumorima pankreasa, ovarijuma, kože (242).

Suprotno ovim rezultatima Li JQ i saradnici ne nalaze udruženost između različite ekspresije ovog antitela i kliničko patoloških karakteristika kolorektalnog karcinoma (243), što je slučaj i sa karcinom dojke (244).

U našoj grupi ispitanika ekspresija p57 je imala značajan uticaj na ukupno preživljavanje. Ispitanici kod kojih je bila zastupljena smanjena ekspresija p57 imali su tendencu kraćeg preživljavanja. Slični rezultati su prikazani u literaturi. Ispitujući uticaj ekspresije proteina p57 na preživljavanje pacijenata u 64 slučaja adultne akutne limfocitne leukemije, dokazano je da duže preživljavanje imaju slučajevi sa pozitivnom ekspresijom ovog proteina (245). Ukupno petogodišnje preživljavanje je bilo duže kod slučajeva oralnog karcinoma sa difuznom izraženom ekspresijom p57 (238) kao i kod hepatocelularnog karcinoma (239). Genetske studije koje su ispitivale metilacioni status *p57^{KIP2}* kod difuznog B-krupno-ćelijskog limfoma a u odnosu na preživljavanje pacijenata pokazuju iste rezultate (246).

U razvoju malignih tumora p57 je inicijalno smatran inhibitorom proliferacije, što je uticalo da se okarakteriše kao tumor supresorski gen. Danas, postoje dokazi da je p57 uključen u regulaciju drugih ćelijskih procesa u tumorogenezi, kao što su razvoj, apoptoza,

diferencijacija i migracija ćelija (119). Na osnovu naših rezultata, kao i rezultata brojnih kliničkih studija možemo pretpostaviti da je p57 marker agresivnog fenotipa i loše prognoze RMS.

Imunohistohemijska ekspresija p16 u RMS

Uloga proteina p16 u genezi neoplazmi je kontroverzna. Abnormalna ekspresija tumor supresor proteina p16 je identifikovana u različitim humanim malignitetima. Samo je nekoliko studija ispitalo značaj ekspresiju ovog antitela u mezenhimalnim neoplazmama. Takahashi Y i saradnici, su prikazali poremećenu (manje od 50% pozitivnih jedara) ekspresiju p16 u RMS u 66,6% slučajeva RMS, i to češće kod ARMS u odnosu na ERMS. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su prikazali Gao i saradnici, gde je gubitak ekspresije p16 bio kod 38,3% ispitivanih slučajeva RMS, i to češće kod ARMS (47). Poremećena ekspresija p16 je prikazana u 94% slučajeva mekotkivnih sarkoma. Ova studija je obuhvatila i 19 slučajeva RMS, od kojih je samo kod jednog bila očuvana ekspresija (247).

U novijoj literaturi, Knosel T i saradnici (123), su pokazali pozitivnu ekspresiju p16 u 74,3% slučajeva mekotkivnih i koštanih sarkoma različitog fenotipa. Slučajevi leiomiosarkoma, liposarkoma, sinoviosarkoma su u najvećem procentu pokazivali imunopozitivnost za ovaj protein, što je bilo u korelaciji sa dužim preživljavanjem pacijenata. Međutim kod slabije diferentovanih sarkoma nije postojala korelacija ekspresije ovog proteina sa preživljavanjem. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa teorijom da nediferentovani tumori imaju izuzetno kompleksan i poremećen kariotip i/ili proteinski obrazac, tako da ne postoje tačno regulisani biohemijski putevi.

U ćelijama RMS u našoj studiji, p16 je pokazivao jedarnu ekspresiju. Kod samo jednog slučaja je bila očuvana ekspresija p16, a što je definisano u odnosu na njegovu ekspresiju u očuvanom mišićnom tkivu. Radilo se o pacijentu muškog pola, mlađem od 18 godina kod kojeg je tumor veličine preko 5cm, bio lokalizovan u predelu trupa,

embrionalnog tipa, niskog gradusa, bez regionalnih i udaljenih metastaza, koji je na kraju perioda praćenja bio živ.

U RMS je pokazano da postoji gubitak funkcije $p16^{INK4A}$, koji je rezultat delecija ili metilacije INK4A promotora, pri čemu dolazi do izbegavanja senescencije, što bi moglo predstavljati rani onkogeni događaj koji na kraju dovodi do nastanka RMS (248,249, 48, 250).

Analiza metilacionog statusa promotora gena $p16$ je bila u saglasnosti sa imunohistohemijskom ekspresijom njegovog proteina. Prisustvo hipermetilacije promotora gena $p16$ je detektovano samo u jednom slučaju (1/67). U pitanju je bio pleomorfni tumor lokalizovan na donjem ekstremitetu uz prisustvo udaljenih metastaza. Poznato je da inaktivacija $p16$ uključuje četiri vrste genetskih promena, i to homozigotne delecije, hipermetilaciju promotora gena, gubitak heterozigotnosti i tačkaste mutacije (251). Uprkos činjenici da su hipermetilacija promotora gena i homozigotna delecija najčešće alteracije $p16$ u malignim tumorima, rezultati dobijeni u ovoj studiji isključuju hipermetilaciju promotora gena kao mehanizam njegove inaktivacije u RMS.

Danas postoje dva komplementarna modela za pojavu tumora sa visokom ekspresijom $p16^{ink4a}$. Prvi model, podržava indukciju $p16^{ink4a}$ onkogenim stresom, što ograničava progresiju tumora. Međutim, inhibicija tumorske progresije se može zaobići gubitkom funkcije RBI . Stoga inaktivacija RBI je sekundarni događaj nishodno od određenog onkogenog stresa. U drugom modelu se smatra da gubitak RBI doprinosi onkogenom stresu, što indukuje $p16^{ink4a}$. Budući da je funkcija RBI već kompromitovana, indukcija $p16^{ink4a}$ ne može zaustaviti tumorsku progresiju, što rezultira visokom ekspresijom ovog antitela u nekim tumorima. Bez obzira koji mehanizam je doveo do povećanog nivoa ekspresije $p16$ u tumorskim ćelijama, rezultat je poremećena funkcija RBI , što olakšava proliferaciju tumora (252).

U humanim malignitetima, kako smo prikazali, različito se tumače rezultati imunohistohemijskog bojenja $p16$. U pojedinim tumorima se ukazuje na povećanu ekspresiju $p16$ u odnosu na normalno tkivo, dok je kod drugih tumora prisutno njeno smanjenje. Između ove dve grupe neoplazmi, su tumori kod kojih je nivo $p16$ pozitivnosti u

skladu sa nivoom njegove ekspresije u tkivu porekla. Iz svega do sada prikazanog, nameće se zaključak da je jako teško definisati šta podrazumeva pozitivno bojenje za p16 antitelo. Stoga smatramo, da bi bilo neophodno ispitati i ekspresiju *RBI* u uzorcima RMS ispitivanim u ovom istraživanju radi postizanja preciznije procene p16 imunopozitivnosti, a što će biti cilj naših budućih istraživanja.

Imunohistohemijska ekspresija survivina u RMS

Svojstvo malignih ćelija da se odupru apoptotskim signalima može uticati na agresivnost i prognozu tumora. Veliki broj studija prikazuje rezultate ekspresije faktora apoptozne signalizacije, koji utiču na apoptoznu otpornost tumorskih ćelija ili ćelijskih linija u *in vitro* uslovima ili na životinjskim modelima. Međutim, veoma je značajno koreliranje ovih rezultata sa kliničko-patološkim parametrima i prognozom maligniteta.

U očuvanom skeletnom mišiću prisutna je difuzna citoplazmatska ekspresija survivina, dok je ona samo fokalno bila uočena u jedrima tumorskih ćelija. Zbog takvog načina ekspresije survivina, mi smo odvojeno analizirali značaj jedarne i citoplazmatske lokalizacije ovog antitela u odnosu na kliničko-patološke parametre i ukupno preživljavanje naših pacijenata. Odsustna ili fokalna citoplazmatska ekspresija i prisustvo više od 5% survivin pozitivnih jedara tumorskih ćelija su smatrani patološkim nalazom.

Do danas je objavljen veliki broj radova koji ukazuju da bi nuklearna lokalizacija survivina mogla imati uticaj na proliferaciju tumorskih ćelija, dok njegova prisutnost u citoplazmi ima značaj u opstanku ćelije (253).

Citoplazmatska ekspresija survivina u RMS

U našem radu, smanjena citoplazmatska pozitivnost nađena je kod 46,3% pacijenata. U skladu sa ovim nalazom, kod sitnoćelijskog kacinoma pluća prikazano je smanjenje ekspresije survivina (254). Međutim moramo istaći da se naši rezultati uglavnom razlikuju

od do sada prikazanih radova o ekspresiji survivina. Naime, kod većine maligniteta razičite histogeneze dolazi do povećanja citoplazmatske ekspresije u odnosu na tkivo porekla: nesitnoćelijski karcinom pluća (176), karcinom pankreasa (177), kolorektalni karcinom (178), mekotkivni sarkomi (180), neuroblastom (181). Malo je radova u kojima je analizirana ekspresija survivin proteina u sarkomima, pri čemu najveći broj autora nije korelirao rezultate ekspresije sa prognozom. Caldas i saradnici su pokazali da preko 80% primarnih RMS eksprimira survivin (190), a Tabone-Eglinger i saradnici su pokazali da svi slučajevi malignog tumora perifernog nerva eksprimiraju ovaj marker (255).

Odnos između patološke ekspresije survivina i posmatranih kliničko-patoloških parametara u našoj analizi nije pokazao statistički značaj. Međutim, istakli bi nešto češće smanjenje ekspresije kod pacijenata starijih od 18 godina i tumora lokalizovanih u predelu ekstremiteta. Takođe, u odnosu na histološki tip pleomorfni RMS je najčešće pokazivao patološku ekspresiju, kao i tumori koji nisu imali regionalne i udaljene metastaze.

Naši rezultati su u skladu sa studijom koja je obuhvatala slučajeve sa akutnom mijeloidnom leukemijom, gde nije nađena korelacija između jedarne i citoplazmatske ekspresije ovog markera i kliničkopatoloških faktora (256). Taubert H i saradnici su ispitivali lokalizaciju ekspresije survivina u slučajevima leiomiosarkoma i sinoviosarkoma, i pokazali da je ona češće bila citoplazmatska nego jedarna, kao i to da je bez obzira na lokalizaciju uticala na prognozu obolelih (255), a prikazani su slični rezultati odnosa citoplazmatske ekspresije i kliničko-patoloških parametara i na karcinomu timusa (257).

Suprotno, u studiji na malignim tumorima bubrega ekspresija survivina je značajno više bila prisutna u karcinomu bubrežnog parenhima sa sarkomatoidnom diferencijacijom (slabije diferentovan tip u odnosu na ostale) nego u drugim histološkim varijantama, ali nije uočena povezanost između te ekspresije i ostalih kliničko patoloških parametara (258). Poremećena ekspresija survivina u urotelijalnom karcinomu, bez obzira na subcelularnu lokalizaciju, je češće bila prisutna kod viših stadijuma, lošije diferentovanih tumora i slučajeva sa metastazom u regionalnim limfnim čvorovima (259). Liang Q i saradnici su analizirali citoplazmatsku ekspresiju survivina u kolorektalnom karcinomu i pokazali njenu

povezanost sa istim kliničkopatološkim parametrima kao i prethodni autor (gradus, stadijum i zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova) (260).

U aktuelnoj analizi, vrednosti citoplazmatske ekspresije survivina nisu se značajno razlikovale između grupe pacijenata sa nadživljavanjem i grupe sa letalnim ishodom. Odsutna ili fokalna ekspresija survivina je uočena kod pacijenata sa nešto dužim preživljavanjem. Petogodišnje praćenje za ove pacijente iznosilo je 58,1%, a za grupu sa očuvanom citoplazmatskom ekspresijom bilo je 47,2%.

Poremećena regulacija ekspresije survivina i njena uloga u karcinogenezi je dobro poznata i objašnjava se dvostrukom ulogom survivina. Većina literaturnih podataka ukazuje na to da survivin stimuliše ćelijsku proliferaciju ali ima i antiapoptotski uticaj. Objašnjenje za to autori nalaze u činjenici da ovaj protein, odnosno njegovi podtipovi imaju različitu intracelularnu lokalizaciju, pri čemu ukazuju da je citoplazmatska lokalizacija survivina odraz ćelijskog preživljavanja (175). U literaturi nailazimo na kontradiktorne rezultate u pogledu prognostičkog značaja citoplazmatske ekspresije survivina u različitim neoplazmama.

Umerena citoplazmatska ekspresija survivina je bila udružena sa većim rizikom za letalni ishod kod obolelih od leiomiosarkoma i sinoviosarkoma. Interesantno je da je ovaj intenzitet ekspresiju češće bio prisutan kod leiomiosarkoma lokalizovanih u retroperitoneumu, a to su tumori sa najlošijom prognozom. Takođe, i odsustvo ove ekspresije je bilo udruženo sa nepovoljnom prognozom ovih pacijenata (255).

Suprotno, ispitivanja prognostičkog značaja citoplazmatske ekspresije survivina kod pacijenata sa osteosarkomom nisu pokazala statistički značaj (255), kao ni u slučajevima ezofagealnog skvamocelularnog karcinoma, ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća, holangiokarcinoma (253), mantle ćelijskog limfoma (261).

Jedno od mogućih obrazloženja za ovakve rezultate je postojanje zamki u tumačenju imunohistohemijskog nalaza. Na osnovu našeg iskustva u ocenjivanju imunohistohemijske ekspresije survivina i njegove lokalizacije, kao i pregledane literature

mi smatramo da imunohistohemijski rezultati mogu dovesti do pogrešne procene oblika i lokalizacije ekspresije ovog markera u normalnom i tumorskom tkivu usled neodgovarajuće obrade tkiva. Zbog svega navedenog mišljenja smo da imunohistohemijske rezultate treba potvrditi alternativnim metodama, ukoliko se uoči potencijalni problem pogrešne interpretacije.

Jedarna ekspresija survivina u RMS

U našoj studiji, povećana jedarna ekspresija survivina je uočena kod 73,1% RMS, što je definisano u odnosu na njegovu ekspresiju u očuvanom mišićnom tkivu. Povećanu jedarnu ekspresiju survivina su pokazali Caldas H i saradnici (190), u slučajevima ARMS i ERMS a bila je uočena i u drugim tumorima, kao što je karcinom dojke (262), nesitnoćelijski karcinom pluća (263), hepatocelularni karcinom (172) i drugi. Aktuelni podaci sugerišu da survivin u citoplazmi tumorskih ćelija ima citoprotektivnu funkciju dok njegova nuklearna lokalizacija ukazuje na poremećaj u regulaciji ekspresije ovog proteina. (146).

Da bi se utvrdila mogućnost korišćenja jedarne ekspresije survivina kao prognostičkog markera, analizirana je njena ekspresija u odnosu na kliničko-patološke parametre. Za razliku od citoplazmatske lokalizacije, u ovom obliku ekspresije survivina uočili smo značajnu povezanost između povećanja ekspresije i starosti pacijenata sa RMS, histološkog tipa i gradusa tumora. Aberantna ekspresija je češće bila prisutna kod pacijenata starijih od 18 godina, kod tumora visokog gradusa i pleomorfno histološkog tipa.

Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima savremene literature. Analizom ekspresije survivina u ne-sitnoćelijskom karcinomu pluća, gde se histološki tip i gradus tumora pokazao značajnim kada je u pitanju povećana nuklearna imunoreaktivnost survivina (263, 264). U studiji na 732 slučaja urotelijalnog karcinoma, autori nisu određivali celularnu distribuciju ekspresije survivina, uočena je povezanost između poremećene ekspresije i stadijuma, regionalne proširenosti tumora i histološkog izgleda (259). Ispitujući ekspresiju survivina u ćelijama mantle ćelijskog limfoma, pokazana je njegova jedarna

lokalizacija i značajna povezanost sa agresivnijim histološkim podtipovima ovog tumora. Najveći broj survivin pozitivnih ćelija uočen je kod blastoidne varijante mantle ćelijskog limfoma (265). Diferentovanost, kao i godine pacijenta, su pokazivale značajnu povezanost sa povećanom ekspresijom survivina i kod slučajeva sa karcinomom želuca (253). Jedarna ekspresija survivina u ćelijama neuroblastoma bila je u korelaciji sa godinama pacijenata i stadijumom tumora (181).

Studija koja je ispitivala ekspresiju survivina u različitim tipovima mekotkivnih sarkoma, ukazuje na veću ekspresiju u agresivnijim tipovima ovih tumora, kao što je i RMS. Takođe, ona je značajno bila povezana sa gradusom i stadijumom ovih neoplazmi (266). Slično, povećana ekspresija survivina je bila prisutna u svim slučajevima ARMS i ERMS, ali je od svih ispitivanih parametara značajnost pokazivala samo u odnosu na lokalizaciju tumora (267). Gradus korelira sa ekspresijom kod osteosarkoma (268) kao i kod ependimoma i tumora horoidnog pleksusa ali u ovim slučajevima smanjena ekspresija survivina je bila karakteristična za slabo diferentovane tumore (253). Veličina tumora je korelirala sa povećanom ekspresijom survivina kod pacijenata obolelih od karcinoma želuca (269).

Analizom stope ukupnog preživljavanja pacijenata sa RMS u našem radu, pokazali smo da je preživljavanje kraće kod pacijenata sa povećanom jedarnom ekspresijom survivina, ali nije uočena statistički značajna razlika.

Pretežno lošije preživljavanje uočeno je kod pacijenta sa povećanom ekspresijom survivina u biopsijskim uzorcima ARMS I ERMS, ali bez statističke značajnosti (267). Jedarno ekspresiran survivin nije dokazan kao prognostički marker ni kod drugih humanih neoplazmi karcinom timusa (257), Wilms-ov tumor (270), non-Hodgkin limfom (271).

Značaj ekspresije survivina u odnosu na preživljavanje pacijenata sa mekotkivnim sarkomima u literaturi pokazuje različite rezultate. Dok Würfl P i saradnici (272), ne nalaze značajnu povezanost ove ekspresije sa preživljavanjem, Kappler M i saradnici (266), ukazuju da je on nezavistan prognostički parameter u istim tipovima tumora. Intenzitet nuklearne ekspresije ovog antitela je uticao na prognozu obolelih od leiomiosarkoma i

sinoviosarkoma, uočeno je da lošiju prognozu imaju slučajevi sa umerenim intenzitetom ekspresije (255).

Povećana imunohistohemijska ekspresija survivina bila je u korelaciji sa kraćim preživljavanjem pacijenata obolelih od mantle ćelijskog limfoma. Za ispitanike koji su imali ekspresiju u više od 20% tumorskih ćelija medijana preživljavanja je bila 8 meseci, a 60 meseci za ispitanike sa ekspresijom manjom od 20% ćelija (265).

Nivo ekspresije ovog proteina korelirao je sa nižom stopom preživljavanja pacijenta sa neuroblastomom i bržom pojavom recidiva (181). Slične rezultate u odnosu na preživljavanje i pojavu recidiva su prikazali Mathieu i saradnici kod slučajeva urotelijalnog karcinoma (259). Kraće preživljavanje pacijenata sa karcinomom jednjaka, ne-sitnoćelijskim karcinomom pluća i holangiokarcinomom je takođe bilo udruženo sa povećanom jedarnom ekspresijom survivina (253).

Nekoliko studija je pokazalo da povećana ekspresija survivina u jedrima tumorskih ćelija može biti povoljan prognostički faktor za predikciju ishoda bolesti. Duže preživljavanje je tako prikazano kod pacijenata sa karcinomom želuca (253), karcinomom prostate (273), ne-sitnoćelijskim karcinomom pluća (264), osteosarkomom (268).

Survivin se normalno eksprimira tokom embriogeneze, ali ga samo ograničeni broj zrelih adultnih tkiva eksprimira. Ekspresioni profil i lokalizacija survivina u adultnim tkivima za koja je poznato da su survivin pozitivna i dalje su nejasni. Rasvetljavanje ovih problema, ne samo da bi iskristalisalo tačnu ulogu survivina u normalnim tkivima već bi značajno unapredilo naša znanja u vezi uloge ovog proteina u onkogenezi (274).

Imunohistohemijska ekspresija nestina u RMS

U ćelijama RMS nestin je pokazivao citoplazmatsku ekspresiju. U našoj studiji povećana ekspresija nestina je bila uočena kod 66,7% pacijenata. U velikom broju malignih bolesti različitog porekla uočena je poremećena ekspresija ovog proteina (198) (275).

Analizirajući povećanu ekspresiju nestina u odnosu na posmatrane kliničko-patološke parametre dobili smo statističku značajnost u odnosu na starost pacijenata i gradus tumora. Naime, kod pacijenata iz mlađe starosne grupe i tumora niskog gradusa češće je bila uočena povećana ekspresija.

Suprotno našim rezultatima, u nekim tumorima je dokazana povezanost između aberantne ekspresije nestina i lošije diferentovanosti tumora, kao i stadijuma bolesti (276, 197, 277). S druge strane, neke kliničke studije ne nalaze da je nestin značajan prognostički faktor (201, 278, 202, 199). Rezultati dobijeni u našem istraživanju mogu se objasniti činjenicom da nismo analizirati morfološke podtipove RMS zbog malog broja pacijenata. Takođe, RMS obuhvata skup morfološki sličnih, ali biološki raznolikih lezija. Naime, embrionalni RMS koji je bio najčešći histološki tip u našem istraživanju je uglavnom tumor niskog stepena maligniteta, ali njegovi podtipovi imaju različit stepen diferentovanosti u rasponu od loše do dobro diferentovanih tumora (279, 40).

Samo nekoliko studija do sada je analiziralo ekspresiju nestina u RMS, pri čemu je pokazana izražena pozitivnost ovog proteina u većini ERMS i ARMS (280, 281) (282, 283). Međutim, nijedna od navedenih studija nije uključila u analizu i pleomorfni histološki tip. Osim toga, ove studije nisu ispitivale povezanost ekspresije nestina i utvrđenih prognostičkih parametara (kao što je primarna lokalizacija, veličina tumora, prisustvo udaljenih metastaza, starost i histološki tip) kao ni njenu povezanost sa preživljavanjem pacijenata sa RMS. Naši rezultati pokazuju da je povećana ekspresija nestina u korelaciji sa preživljavanjem. Naime, u grupi ispitanika sa povećanom ekspresijom uočeno je bolje preživljavanje. Suprotno, ekspresija nestina u slučajevima 152 maligna melanoma je bila značajan prognostički faktor u odnosu na preživljavanje ovih pacijenata (284). Slični rezultati uticaja povećane ekspresije nestina na kraće preživljavanje pokazani su i u slučajevima glioma (285), ne-sitnoćeliskog karcinoma pluća (286), karcinoma ovarijuma (287) i drugih tumora. Mnoga pitanja vezana za funkcionalnu ulogu i regulaciju ekspresije nestina u nediferentovanim tkivima su i dalje otvorena, kao i za mehanizme koji su uključeni u regulaciju ekspresije nestina u različitim solidnim tumorima.

Prediktori preživljavanja

I na kraju, u cilju definisanja prediktora preživljavanja pacijenata sa RMS, univarijantnom Cox-ovom regresionom analizom izdvojili su se kao značajni parametri starost, histološki tip, gradus tumora, prisustvo regionalnih i udaljenih metastaza. Od ispitivanih markera jedino je p57 bio blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Međutim, multivarijantnom Cox-ovom regresionom analizom veličina tumora, prisustvo regionalnih i udaljenih metastaza su se pokazali kao ključni prediktori preživljavanja pacijenata u ovoj studiji.

6. ZAKLJUČCI

1. Jedarna imunohistochemijska ekspresija ciklina A, p57 i survivina korelira sa histološkim tipom RMS. Pleomorfni podtip RMSa pokazuje veću ekspresiju ovih markera u poredjenju sa drugim histološkim varijantama.
2. Histološki gradus tumora je u korelaciji sa jedarnom ekspresijom p57, survivina, i citoplazmatskom pozitivnošću na nestin. Tumori visokog stepena maligniteta intenzivnije su pozitivni na ove markere.
3. Imunohistochemijska ekspresija p16 bila je očuvana u samo jednom slučaju RMS, zbog čega zaključujemo da on nije prognostički faktor u ovoj studiji.
4. Analiza metilacionog statusa promotora gena *p16* je bila u saglasnosti sa imunohistochemijskom ekspresijom njegovog proteina. Prisustvo hipermetilacije promotora gena p16 je detektovano samo u jednom slučaju. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da gubitak funkcije *p16^{INK4A}* nije nastao metilacijom promotora gena.
5. U odnosu na analizirane kliničko-patološke parametre imunohistochemijska ekspresija p57 je korelirala sa ishodom bolesti. Pacijenti sa smrtnim ishodom su češće imali aberantnu ekspresiju p57.
6. Preživljavanje pacijenata korelira sa ekspresijom p57 i nestina, dok pozitivnost na ciklin A, ciklin D1 i survivin nije značajna za preživljavanje. Bolesnici sa patološkom ekspresijom p57 su imali kraće preživljavanje. Povećana ekspresija nestina je uočena kod pacijenata sa dužim preživljavanjem.
7. Univarijantnom regresionom analizom kao nezavisni prediktori preživljavanja izdvojili su se starost, histološki tip, veličina, gradus tumora, prisustvo regionalnih i udaljenih metastaza i ekspresija p57.
8. Primena multivarijantne regresione analize na nezavisne prediktore pokazala je da su ključni prediktori preživljavanja pacijenata sa RMS veličina tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa i prisustvo udaljenih metastaza.

7. LITERATURA

1. Hettmer S, Wagers AJ. Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nat Med*. 2010;16(2):171–3.
2. Parham DM. Pathologic Classification of Rhabdomyosarcomas and Correlations with Molecular Studies. *Mod Pathol*. 2001;14(5):506–14.
3. de Trey LA, Schmid S, Huber GF. Multifocal Adult Rhabdomyoma of the Head and Neck Manifestation in 7 Locations and Review of the Literature. *Case Rep Otolaryngol*. 2013;2013:e758416.
4. Hajdu SI. Soft tissue sarcomas. *Cancer*. 2007;109(9):1697–704.
5. Horn RC, Enterline HT. Rhabdomyosarcoma: A clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer*. 1958;11(1):181–99.
6. Dias P, Parham DM, Shapiro DN, Webber BL, Houghton PJ. Myogenic regulatory protein (MyoD1) expression in childhood solid tumors: diagnostic utility in rhabdomyosarcoma. *Am J Pathol*. 1990;137(6):1283–91.
7. Sebire NJ, Malone M. Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *J Clin Pathol*. 2003;56(6):412–6.
8. Jostes B, Walther C, Gruss P. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev*. 1990;33(1):27–37.
9. Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, Lynch JC, Qualman SJ, Shimada H, et al. Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol*. 2009;174(2):550–64.
10. Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia Enhances Tumor Stemness by Increasing the Invasive and Tumorigenic Side Population Fraction. *STEM CELLS*. 2008;26(7):1818–30.
11. Sell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 1994;70(1):6–22.
12. Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Matushansky I, Ziman M. Alveolar rhabdomyosarcoma: Is the cell of origin a mesenchymal stem cell? *Cancer Lett*. 2009;279(2):126–36.
13. Saab R, Spunt SL, Skapek SX. Myogenesis and rhabdomyosarcoma the Jekyll and Hyde of skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94:197–234.

14. Wagers AJ, Conboy IM. Cellular and Molecular Signatures of Muscle Regeneration: Current Concepts and Controversies in Adult Myogenesis. *Cell*. 2005;122(5):659–67.
15. Abraham JA, Baldini EH, Butrynski JE. Management of adult soft-tissue sarcoma of the extremities and trunk. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(2):233–48.
16. Dasgupta R, Rodeberg DA. Update on rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg*. 2012;21(1):68–78.
17. Sultan I, Qaddoumi I, Yaser S, Rodriguez-Galindo C, Ferrari A. Comparing Adult and Pediatric Rhabdomyosarcoma in the Surveillance, Epidemiology and End Results Program, 1973 to 2005: An Analysis of 2,600 Patients. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3391–7.
18. Allen SD, Moskovic EC, Fisher C, Thomas JM. Adult Rhabdomyosarcoma: Cross-Sectional Imaging Findings Including Histopathologic Correlation. *Am J Roentgenol*. 2007;189(2):371–7.
19. Li FP, Fraumeni J, Joseph F. Soft-Tissue Sarcomas, Breast Cancer, and Other Neoplasms A Familial Syndrome? *Ann Intern Med*. 1969;71(4):747–52.
20. Narod SA, Stiller C, Lenoir GM. An estimate of the heritable fraction of childhood cancer. *Br J Cancer*. 1991;63(6):993–9.
21. Rothenberg A, Pilz CG. Unusual manifestations of rhabdomyosarcoma. *Arch Intern Med*. 1966;118(5):446–8.
22. Quezada E, Gripp KW. Costello syndrome and related disorders: *Curr Opin Pediatr*. 2007;19(6):636–44.
23. Van Gaal JC, De Bont ESJM, Kaal SEJ, Versleijen-Jonkers Y, van der Graaf WTA. Building the bridge between rhabdomyosarcoma in children, adolescents and young adults: the road ahead. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;82(3):259–79.
24. Daya H, Chan HL, Sirkin W, Forte V. Pediatric rhabdomyosarcoma of the head and neck: Is there a place for surgical management? *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 2000 ;126(4):468–72.
25. Paul A Merguerian, Lisa Cartwright, Antoine E Khoury. Genitourinary rhabdomyosarcoma and other bladder tumors. In: *The Kelalis-King-Belman Textbook of Clinical Pediatric Urology*. Informa Healthcare; 2007. p. 969–98.
26. Agrons GA, Wagner BJ, Lonergan GJ, Dickey GE, Kaufman MS. From the archives of the AFIP. Genitourinary rhabdomyosarcoma in children: radiologic-pathologic correlation. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc*. 1997;17(4):919–37.

27. Buckley KS. Pediatric genitourinary tumors. *Curr Opin Oncol*. 2011;23(3):297–302.
28. Castorino F, Masiello P, Quattrocchi E, Di Benedetto G. Primary Cardiac Rhabdomyosarcoma of the Left Atrium: An Unusual Presentation. *Tex Heart Inst J*. 2000;27(2):206–8.
29. Restrepo CS, Vargas D, Ocazonez D, Martínez-Jiménez S, Betancourt Cuellar SL, Gutierrez FR. Primary Pericardial Tumors. *RadioGraphics*. 2013;33(6):1613–30.
30. Ayadi L, Chaabouni S, Chabchoub I, Ayadi A, Kallel R, Fakhfakh I, et al. [Primary rhabdomyosarcoma of the pleura presenting as recurrent pneumothorax]. *Rev Mal Respir*. 2009;26(3):333–7.
31. Si D, Zhang B, Zhang X, Zhang M, Ni L, Yang P. Primary pulmonary artery rhabdomyosarcoma. *Acta Cardiol*. 2011;66(3):391–4.
32. Bhosale SJ, Kshirsagar AY, Sulhyan SR, Sulhyan SR. Rhabdomyosarcoma of the breast – a rare malignancy. *Am J Case Rep*. 2013;14:250–2.
33. Ray R, Kumar N, Das P, Ahuja A, Gupta C, Rastogi S. Primary rhabdomyosarcoma of proximal tibia in an adult: A rare entity. *Indian J Pathol Microbiol*. 2011;54(3):653.
34. Casey DL, Wexler LH, LaQuaglia MP, Meyers PA, Wolden SL. Patterns of Failure for Rhabdomyosarcoma of the Perineal and Perianal Region. *Int J Radiat Oncol*. 2014;89(1):82–7.
35. Paulus W, Slowik F, Jellinger K. Primary intracranial sarcomas: histopathological features of 19 cases. *Histopathology*. 1991;18(5):395–402.
36. Rodeberg D, Arndt C, Breneman J, Lyden E, Donaldson S, Paidas C, et al. Characteristics and outcomes of rhabdomyosarcoma patients with isolated lung metastases from IRS-IV. *J Pediatr Surg*. 2005;40(1):256–62.
37. Meza JL, Anderson J, Pappo AS, Meyer WH, Children’s Oncology Group. Analysis of prognostic factors in patients with nonmetastatic rhabdomyosarcoma treated on intergroup rhabdomyosarcoma studies III and IV: the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006;24(24):3844–51.
38. Dragoljub Bacetić. ‘Rabdomiosarkomi-mikroskopske karakteristike, klasifikacija i kliničko patološki varijeteti [Doktorska disertacija]. [Beograd]: Medicinski fakultet. Univerzitet u Beogradu; 1988.
39. Nascimento AF. Rhabdomyosarcomas in adults: classification and differential diagnosis. *Diagn Histopathol*. 2008 Nov;14(11):538–45.

40. Parham D.M, Barr F.G, Montgomery E.A, Nascimento A.F. Skeletal-muscle tumours. In: Fletcher C, Bridge JA, Hogendoorn P, editors. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. Lyon: IARC; 2013. p. 127–34.
41. Kodet R, Newton WA, Hamoudi AB, Asmar L, Jacobs DL, Maurer HM. Childhood rhabdomyosarcoma with anaplastic (pleomorphic) features. A report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Am J Surg Pathol*. 1993;17(5):443–53.
42. Bridge JA, Liu J, Qualman SJ, Suijkerbuijk R, Wenger G, Zhang J, et al. Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(3):310–21.
43. Gordon T, McManus A, Anderson J, Min T, Swansbury J, Pritchard-Jones K. Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: A United Kingdom cancer cytogenetics group study. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36(2):259–67.
44. Sun X, Guo W, Shen JK, Mankin HJ, Hornicek FJ, Duan Z. Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma*. 2015;2015:232010.
45. Sawyer JR, Sammartino G, Gokden N, Nicholas RW. A clonal reciprocal t(2;7)(p13;p13) in plantar fibromatosis. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;158(1):67–9.
46. Paulson V, Chandler G, Rakheja D, Galindo RL, Wilson K, Amatruda JF, et al. High-resolution array CGH identifies common mechanisms that drive embryonal rhabdomyosarcoma pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(6):397–408.
47. Takahashi Y, Oda Y, Kawaguchi K-I, Tamiya S, Yamamoto H, Suita S, et al. Altered expression and molecular abnormalities of cell-cycle-regulatory proteins in rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2004;17(6):660–9.
48. Iolascon A, Faienza MF, Coppola B, Rosolen A, Basso G, Della Ragione F, et al. Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996;15(4):217–22.
49. Martinelli S, McDowell HP, Vigne SD, Kokai G, Uccini S, Tartaglia M, et al. RAS signaling dysregulation in human embryonal Rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(11):975–82.
50. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom L-G, Toftgård R, Undén AB. Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol*. 2006;208(1):17–25.

51. Shukla N, Ameer N, Yilmaz I, Nafa K, Lau C-Y, Marchetti A, et al. Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18(3):748–57.
52. Lewis TB, Coffin CM, Bernard PS. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol*. 2007;20(3):397–404.
53. Ganesan P, Thulkar S, Rajan A, Bakhshi S. Solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma mimicking non-Hodgkin lymphoma: case report and review of literature. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30(10):772–4.
54. Harms D. Alveolar rhabdomyosarcoma: a prognostically unfavorable rhabdomyosarcoma type and its necessary distinction from embryonal rhabdomyosarcoma. *Curr Top Pathol Ergeb Pathol*. 1995;89:273–96.
55. Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. Fusion of PAX7 to FKHR by the Variant t(1;13)(p36;q14) Translocation in Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 1994;54(11):2869–72.
56. Keller C, Arenkiel BR, Coffin CM, El-Bardeesy N, DePinho RA, Capecchi MR. Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loss of function. *Genes Dev*. 2004;18(21):2614–26.
57. Marshall AD, Grosveld GC. Alveolar rhabdomyosarcoma - The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis. *Skelet Muscle*. 2012;2(1):25.
58. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, et al. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(13):2151–8.
59. Anderson JR, Barr FG, Hawkins DS, Parham DM, Skapek SX, Triche TJ. Fusion-negative alveolar rhabdomyosarcoma: modification of risk stratification is premature. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(29).
60. Barr FG, Duan F, Smith LM, Gustafson D, Pitts M, Hammond S, et al. Genomic and clinical analyses of 2p24 and 12q13-q14 amplification in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(8):661–72.
61. Reichert JL, Duan F, Smith LM, Gustafson DM, O'Connor RS, Zhang C, et al. Genomic and clinical analysis of amplification of the 13q31 chromosomal region in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(6):1463–73.

62. Taylor JG, Cheuk AT, Tsang PS, Chung J-Y, Song YK, Desai K, et al. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J Clin Invest*. 2009;119(11):3395–407.
63. van Gaal JC, Flucke UE, Roeffen MHS, de Bont ESJM, Sleijfer S, Mavinkurve-Groothuis AMC, et al. Anaplastic lymphoma kinase aberrations in rhabdomyosarcoma: clinical and prognostic implications. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30(3):308–15.
64. Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, et al. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene*. 2002;21(27):4345–9.
65. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, et al. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res*. 2002;62(20):5897–901.
66. Gordon A, McManus A, Anderson J, Fisher C, Abe S, Nojima T, et al. Chromosomal imbalances in pleomorphic rhabdomyosarcomas and identification of the alveolar rhabdomyosarcoma-associated PAX3-FOXO1A fusion gene in one case. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;140(1):73–7.
67. Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;3(4):416–28.
68. Cavazzana AO, Schmidt D, Ninfo V, Harms D, Tollot M, Carli M, et al. Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma. *Am J Surg Pathol*. 1992;16(3):229–35.
69. Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM, Maurer HM. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1995;13(8):2123–39.
70. Maurer HM, Beltangady M, Gehan EA, Crist W, Hammond D, Hays DM, et al. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report. *Cancer*. 1988;61(2):209–20.
71. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001;19(12):3091–102.
72. Malempati S, Hawkins DS. Rhabdomyosarcoma: Review of the Children’s Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee Experience and Rationale for Current COG Studies. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(1):5–10.
73. Lawrence W, Anderson JR, Gehan EA, Maurer H. Pretreatment TNM staging of childhood rhabdomyosarcoma: a report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study

- Group. Children's Cancer Study Group. Pediatric Oncology Group. *Cancer*. 1997;80(6):1165–70.
74. Crist W, Gehan EA, Ragab AH, Dickman PS, Donaldson SS, Fryer C, et al. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1995;13(3):610–30.
 75. Breneman JC, Lyden E, Pappo AS, Link MP, Anderson JR, Parham DM, et al. Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003;21(1):78–84.
 76. Oberlin O, Rey A, Lyden E, Bisogno G, Stevens MCG, Meyer WH, et al. Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(14):2384–9.
 77. Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: an overview. *The Oncologist*. 1999;4(1):34–44.
 78. Joshi D, Anderson JR, Paidas C, Breneman J, Parham DM, Crist W, et al. Age is an independent prognostic factor in rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;42(1):64–73.
 79. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2001;19(1):88–91.
 80. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003;36(3):131–49.
 81. J Bury SC. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part 1 – The cell cycle. *Curr Diagn Pathol*. 2003;9(4):266–75.
 82. Jacobs T. Control of the cell cycle. *Dev Biol*. 1992;153(1):1–15.
 83. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991;254(5035):1138–46.
 84. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol*. 2009;219(2):243–50.
 85. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001;61(8):3225–9.
 86. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*. 2007;128(4):669–81.

87. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 1982;10(8):2709–21.
88. Wan J, Oliver VF, Zhu H, Zack DJ, Qian J, Merbs SL. Integrative analysis of tissue-specific methylation and alternative splicing identifies conserved transcription factor binding motifs. *Nucleic Acids Res.* 2013 (18):8503–14.
89. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196(2):261–82.
90. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2000;1(1):11–9.
91. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(2):187–91.
92. Das PM, Singal R. DNA Methylation and Cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(22):4632–42.
93. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene.* 2001;20(24):3139–55.
94. Toyota M, Issa JP. The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis.* 2000;21(2):329–33.
95. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10(7):687–92.
96. Wolgemuth DJ, Lele KM, Jobanputra V, Salazar G. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. *Int J Androl.* 2004;27(4):192–9.
97. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):149–60.
98. Parry DH, O’Farrell PH. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr Biol CB.* 2001;11(9):671–83.
99. Sullivan M, Morgan DO. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):894–903.

100. Wong JV, Dong P, Nevins JR, Mathey-Prevot B, You L. Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry. *Cell Cycle Georget Tex.* 2011;10(18):3086–94.
101. Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2002;59(8):1317–26.
102. Chen H-M, Yen-Ping Kuo M, Lin K-H, Lin C-Y, Chiang C-P. Expression of cyclin A is related to progression of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol.* 2003;39(5):476–82.
103. Wang A, Yoshimi N, Suzui M, Yamauchi A, Tarao M, Mori H. Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(2):122–6.
104. Saarilahti K, Kajanti M, Kouri M, Aaltonen L-M, Franssila K, Joensuu H. Cyclin A and Ki-67 expression as predictors for locoregional recurrence and outcome in laryngeal cancer patients treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57(4):986–95.
105. Tran TA, Ross JS, Carlson JA, Mihm MC. Mitotic cyclins and cyclin-dependent kinases in melanocytic lesions. *Hum Pathol.* 1998;29(10):1085–90.
106. Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Kobayashi K, Yokozawa T, et al. Expression of G2-M modulators in thyroid neoplasms: correlation of cyclin A, B1 and cdc2 with differentiation. *Pathol Res Pract.* 2002;198(6):397–402.
107. Cooper WA, Kohonen-Corish MRJ, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS. Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. *Histopathology.* 2009;55(1):28–36.
108. Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H, Shuin T, Yamamoto A, Terao N, et al. Cyclin A overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter including dysplasia: immunohistochemical findings in relation to prognosis. *Clin Cancer Res.* 1997;3(8):1399–404.
109. Davidson B, Risberg B, Berner A, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB, et al. Expression of cell cycle proteins in ovarian carcinoma cells in serous effusions: biological and prognostic implications. *Gynecol Oncol.* 2001;83(2):249–56.
110. Żuryń A, Litwiniec A, Gagat M, Drzewucka J, Gackowska L, Grzanka A. The influence of arsenic trioxide on the cell cycle, apoptosis and expression of cyclin D1 in the Jurkat cell line. *Acta Histochem.* 2014;116(8):1350–8.
111. Witzel I-I, Koh LF, Perkins ND. Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(Pt 1):217–22.

112. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene*. 2006;25(11):1620–8.
113. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1996;69(2):92–9.
114. Hall M, Peters G. Genetic Alterations of Cyclins, Cyclin-Dependent Kinases, and Cdk Inhibitors in Human Cancer. In: Klein GFVW and G, editor. *Advances in Cancer Research* 1996. p. 67–108.
115. Yamamoto M, Tamakawa S, Yoshie M, Yaginuma Y, Ogawa K. Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2006;45(12):901–13.
116. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, Sluis P van, Noesel CJM van, Versteeg R, et al. Cyclin D1 and CDK4 Activity Contribute to the Undifferentiated Phenotype in Neuroblastoma. *Cancer Res*. 2008;68(8):2599–609.
117. Sánchez-Mora N, Presmanes MC, Monroy V, Moreno N, Lara-Martínez JM, Aladro MH, et al. Micropapillary lung adenocarcinoma: a distinctive histologic subtype with prognostic significance. Case series. *Hum Pathol*. 2008;39(3):324–30.
118. Klein EA, Assoian RK. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci*. 2008;121(23):3853–7.
119. Guo H, Tian T, Nan K, Wang W. p57: A multifunctional protein in cancer (Review). *Int J Oncol*. 2010;36(6):1321–9.
120. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev Cell*. 2008 Feb 12;14(2):159–69.
121. Vals M-A, Yakoreva M, Kahre T, Mee P, Muru K, Joost K, et al. The Frequency of Methylation Abnormalities Among Estonian Patients Selected by Clinical Diagnostic Scoring Systems for Silver-Russell Syndrome and Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Genet Test Mol Biomark*. 2015 Oct 27.
122. Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacrétaz F, Bosman FT, Chaubert P. Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood*. 1999;94(5):1773–81.
123. Knösel T, Altendorf-Hofmann A, Lindner L, Issels R, Hermeking H, Schuebbe G, et al. Loss of p16(INK4a) is associated with reduced patient survival in soft tissue tumours, and indicates a senescence barrier. *J Clin Pathol*. 2014;67(7):592–8.
124. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13(12):1501–12.

125. Crocker J, Murray PG. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. John Wiley & Sons; 2003. 414 p.
126. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*. 1995;55(20):4525–30.
127. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*. 2007;130(2):223–33.
128. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol*. 2000;35(3):317–29.
129. Yu D-H, Waterland RA, Zhang P, Schady D, Chen M-H, Guan Y, et al. Targeted p16Ink4a epimutation causes tumorigenesis and reduces survival in mice. *J Clin Invest*. 2014 ;124(9):3708–12.
130. Tam KW, Zhang W, Soh J, Stastny V, Chen M, Sun H, et al. CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2013;8(11):1378–88.
131. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*. 1999;107(5):489–506.
132. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
133. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999;6(11):1028–42.
134. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22(53):8543–67.
135. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2006;14(1):32–43.
136. Mitrović Z. Utjecaj genskih polimorfizama FcγRIIIa i FcγRIIa receptora te izražaja survivina i kaspaze-3 na prognozu bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom liječenih kombinacijom rituksimaba i kemoterapije po shemi CHOP. Sveučilište u Zagrebu; 2009.
137. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004;64(20):7183–90.

138. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456–62.
139. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature*. 1998;396(6707):119–119.
140. Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol*. 2002;22(6):1754–66.
141. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(3):239–52.
142. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*. 2003;22(53):8568–80.
143. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol*. 2001;2(7):REVIEWS3009.
144. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 1998;396(6711):580–4.
145. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3(8):917–21.
146. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003;22(53):8581–9.
147. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1457–62.
148. Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J*. 1999;344(Pt 2):305–11.
149. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- κ B. *Trends Cell Biol*. 1998;8(3):107–11.
150. Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene*. 2007;26(19):2678–84.
151. Sommer KW, Rodgarkia-Dara CJ, Schreiner C, Holzmann K, Krupitza G, Cerni C. Oncogenic c-H-ras deregulates survivin expression: An improvement for survival. *FEBS Lett*. 2007;581(25):4921–6.

152. You L, He B, Xu Z, Uematsu K, Mazieres J, Mikami I, et al. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*. 2004;23(36):6170–4.
153. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*. 2003;101(4):1535–42.
154. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3247–57.
155. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 2002;21(17):2613–22.
156. Zhou M, Gu L, Li F, Zhu Y, Woods WG, Findley HW. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(1):124–31.
157. Noton EA, Colnaghi R, Tate S, Starck C, Carvalho A, Ferrigno PK, et al. Molecular Analysis of Survivin Isoforms EVIDENCE THAT ALTERNATIVELY SPLICED VARIANTS DO NOT PLAY A ROLE IN MITOSIS. *J Biol Chem*. 2006;281(2):1286–95.
158. O'Connor DS, Wall NR, Porter ACG, Altieri DC. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell*. 2002;2(1):43–54.
159. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res*. 2002 ;62(9):2462–7.
160. Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(6):609–15.
161. Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, Stukenberg PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 2002;13(9):3064–77.
162. Wheatley SP, Kandels-Lewis SE, Adams RR, Ainsztein AM, Earnshaw WC. INCENP binds directly to tubulin and requires dynamic microtubules to target to the cleavage furrow. *Exp Cell Res*. 2001;262(2):122–7.

163. Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, et al. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol.* 2004;166(2):179–91.
164. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2008;14(16):5000–5.
165. Ghanem MA, Van der Kwast TH, Den Hollander JC, Sudaryo MK, Van den Heuvel MM, Noordzij MA, et al. The prognostic significance of apoptosis-associated proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma. *Br J Cancer.* 2001;85(10):1557–63.
166. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1117–27.
167. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol.* 1998;152(1):43–9.
168. Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ. Survivin Expression Predicts Poorer Prognosis in Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1682–8.
169. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
170. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, et al. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 2001;61(24):8664–7.
171. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood.* 2001;98(7):2091–100.
172. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepato Baltim Md.* 2000;31(5):1080–5.
173. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(6):529–34.
174. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol.* 2001;32(1):119–25.

175. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):46–54.
176. Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999;17(7):2100–4.
177. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2001;23(3):251–8.
178. Kawasaki H, Altieri DC, Lu C-D, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of Apoptosis by Survivin Predicts Shorter Survival Rates in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 1998 ;58(22):5071–4.
179. Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, et al. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002;20(4):1063–8.
180. Kappler M, Bache M, Bartel F, Kotsch M, Panian M, Würfl P, et al. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53. *Cancer Gene Ther*. 2004;11(3):186–93.
181. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*. 2000;19(5):617–23.
182. Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett*. 2001;169(2):155–64.
183. Engels K, Knauer S, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C, et al. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J Pathol*. 2007;211(5):532–40.
184. Marioni G, Bertolin A, Giacomelli L, Marchese-Ragona R, Savastano M, Calgaro N, et al. Expression of the apoptosis inhibitor protein Survivin in primary laryngeal carcinoma and cervical lymph node metastasis. *Anticancer Res*. 2006;26(5B):3813–7.

185. Osaka E, Suzuki T, Osaka S, Yoshida Y, Sugita H, Asami S, et al. Survivin as a prognostic factor for osteosarcoma patients. *Acta Histochem Cytochem.* 2006;39(3):95–100.
186. Als AB, Dyrskjøt L, von der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, et al. Emmptrin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 1):4407–14.
187. Hinnis AR, Lockett JCA, Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2007;96(4):639–45.
188. Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M, et al. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am J Hematol.* 2006;81(11):824–31.
189. Watanuki-Miyauchi R, Kojima Y, Tsurumi H, Hara T, Goto N, Kasahara S, et al. Expression of survivin and of antigen detected by a novel monoclonal antibody, T332, is associated with outcome of diffuse large B-cell lymphoma and its subtypes. *Pathol Int.* 2005;55(6):324–30.
190. Caldas H, Holloway MP, Hall BM, Qualman SJ, Altura RA. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo. *J Med Genet.* 2006;43(2):119–28.
191. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, et al. Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Transl Med.* 2014;12:27.
192. Wilky BA, Goldberg JM. Immunotherapy in Sarcoma: A New Frontier. *Discov Med.* 2014;17(94):201–6.
193. Hipp NI, Christner L, Wirth T, Mueller-Klieser W, Walenta S, Schröck E, et al. MYCN and survivin cooperatively contribute to malignant transformation of fibroblasts. *Carcinogenesis.* 2014;35(2):479–88.
194. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60(4):585–95.
195. Pallari H-M, Lindqvist J, Torvaldson E, Ferraris SE, He T, Sahlgren C, et al. Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Mol Biol Cell.* 2011;22(9):1539–49.

196. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, et al. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2004;61(19-20):2510–22.
197. Yang XH, Wu QL, Yu XB, Xu CX, Ma BF, Zhang XM, et al. Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *J Clin Pathol*. 2008;61(4):467–73.
198. Krupkova O, Loja T, Zambo I, Veselska R. Nestin expression in human tumors and tumor cell lines. *Neoplasma*. 2010;57(4):291–8.
199. Zambo I, Hermanova M, Adamkova Krakorova D, Mudry P, Zitterbart K, Kyr M, et al. Nestin expression in high-grade osteosarcomas and its clinical significance. *Oncol Rep*. 2012;27(5):1592–8.
200. Kim K-J, Lee K-H, Kim H-S, Moon K-S, Jung T-Y, Jung S, et al. The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. 2011;31(5):494–502.
201. Chinnaiyan P, Wang M, Rojiani AM, Tofilon PJ, Chakravarti A, Ang KK, et al. The prognostic value of nestin expression in newly diagnosed glioblastoma: report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Radiat Oncol Lond Engl*. 2008;3:32.
202. Lenz J, Karasek P, Jarkovsky J, Muckova K, Dite P, Kala Z, et al. Clinicopathological correlations of nestin expression in surgically resectable pancreatic cancer including an analysis of perineural invasion. *J Gastrointest Liver Dis JGLD*. 2011;20(4):389–96.
203. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9821–6.
204. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(13):E65–65.
205. Casanova M, Meazza C, Favini F, Fiore M, Morosi C, Ferrari A. Rhabdomyosarcoma of the extremities: a focus on tumors arising in the hand and foot. *Pediatr Hematol Oncol*. 2009;26(5):321–31.
206. Ferrari A, Dileo P, Casanova M, Bertulli R, Meazza C, Gandola L, et al. Rhabdomyosarcoma in adults. A retrospective analysis of 171 patients treated at a single institution. *Cancer*. 2003;98(3):571–80.
207. Stock N, Chibon F, Binh MBN, Terrier P, Michels JJ, Valo I, et al. Adult-type rhabdomyosarcoma: analysis of 57 cases with clinicopathologic description,

- identification of 3 morphologic patterns and prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(12):1850–9.
208. Little DJ, Ballo MT, Zagars GK, Pisters PWT, Patel SR, El-Naggar AK, et al. Adult rhabdomyosarcoma: outcome following multimodality treatment. *Cancer*. 2002;95(2):377–88.
 209. Wang C. Childhood rhabdomyosarcoma: recent advances and prospective views. *J Dent Res*. 2012;91(4):341–50.
 210. Newton WA, Gehan EA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJ, Hamoudi AB, et al. Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification--an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer*. 1995;76(6):1073–85.
 211. Furlong MA, Mentzel T, Fanburg-Smith JC. Pleomorphic Rhabdomyosarcoma in Adults: A Clinicopathologic Study of 38 Cases with Emphasis on Morphologic Variants and Recent Skeletal Muscle-Specific Markers. *Mod Pathol*. 2001;14(6):595–603.
 212. Ferrari A, Dileo P, Casanova M, Bertulli R, Meazza C, Gandola L, et al. Rhabdomyosarcoma in adults. *Cancer*. 2003;98(3):571–80.
 213. Badr MA, Al-Tonbary YA, Mansour AK, Hassan TH, Beshir MR, Darwish A, et al. Epidemiological Characteristics and Survival Studies of Rhabdomyosarcoma in East Egypt: A Five-Year Multicenter Study. *ISRN Oncol*. 2012;2012:674523.
 214. Hosoi H, Teramukai S, Matsumoto Y, Tsuchiya K, Iehara T, Hara J, et al. A review of 331 rhabdomyosarcoma cases in patients treated between 1991 and 2002 in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2007;12(2):137–45.
 215. Mu K, Li L, Yang Q, Yun H, Kharaziha P, Ye D-W, et al. A standardized method for quantifying proliferation by Ki-67 and cyclin A immunohistochemistry in breast cancer. *Ann Diagn Pathol*. 2015;19(4):243–8.
 216. Huuhtanen RL, Blomqvist CP, Böhling TO, Wiklund TA, Tukiainen EJ, Virolainen M, et al. Expression of cyclin A in soft tissue sarcomas correlates with tumor aggressiveness. *Cancer Res*. 1999;59(12):2885–90.
 217. Kosacka M, Piesiak P, Porebska I, Korzeniewska A, Dyla T, Jankowska R. Cyclin A and Cyclin E expression in resected non-small cell lung cancer stage I-IIIa. *Vivo Athens Greece*. 2009;23(4):519–25.
 218. Dobashi Y, Jiang S-X, Shoji M, Morinaga S, Kameya T. Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas. *J Pathol*. 2003;199(2):208–20.

219. Boström P, Söderström M, Palokangas T, Vahlberg T, Collan Y, Carpen O, et al. Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. *BMC Res Notes*. 2009;2:140.
220. Engellau J. Prognostic factors in soft tissue sarcoma. Tissue microarray for immunostaining, the importance of whole-tumor sections and time-dependence. *Acta Orthop Scand Suppl*. 2004 Dec;75(314):2 p preceding table of contents – 52, backcover.
221. Poikonen P, Sjöström J, Amini R-M, Villman K, Ahlgren J, Blomqvist C. Cyclin A as a marker for prognosis and chemotherapy response in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(5):515–9.
222. Wolowiec D, Berger F, Ffrench P, Bryon PA, Ffrench M. CDK1 and cyclin A expression is linked to cell proliferation and associated with prognosis in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 1999;35(1-2):147–57.
223. Noguchi T, Dobashi Y, Minehara H, Itoman M, Kameya T. Involvement of cyclins in cell proliferation and their clinical implications in soft tissue smooth muscle tumors. *Am J Pathol*. 2000;156(6):2135–47.
224. Ahlin C, Aaltonen K, Amini R-M, Nevanlinna H, Fjällskog M-L, Blomqvist C. Ki67 and cyclin A as prognostic factors in early breast cancer. What are the optimal cut-off values? *Histopathology*. 2007;51(4):491–8.
225. Pasz-Walczak G, Kordek R, Faflik M. P21 (WAF1) expression in colorectal cancer: correlation with P53 and cyclin D1 expression, clinicopathological parameters and prognosis. *Pathol Res Pract*. 2001;197(10):683–9.
226. Lin H, Huang J-F, Qiu J-R, Zhang H-L, Tang X-J, Li H, et al. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 2013;94(1):73–8.
227. Khan H, Gupta S, Husain N, Misra S, Singh N, Negi MPS. Prognostics of Cyclin-D1 expression with chemoradiation response in patients of locally advanced oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(2):258–64.
228. Krsková L, Kalinová M, Brízová H, Mrhalová M, Sumerauer D, Kodet R. Molecular and immunohistochemical analyses of BCL2, KI-67, and cyclin D1 expression in synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;193(1):1–8.
229. Gupta V, Garg M, Chaudhry M, Singh S, Sen R, Gill M, et al. Role of cyclin D1 immunoreactivity and AgNOR staining in the evaluation of benign and malignant lesions of the prostate. *Prostate Int*. 2014;2(2):90–6.

230. Zhang LQ, Jiang F, Xu L, Wang J, Bai JL, Yin R, et al. The role of cyclin D1 expression and patient's survival in non-small-cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Clin Lung Cancer*. 2012;13(3):188–95.
231. Fagone P, Nicoletti F, Salvatorelli L, Musumeci G, Magro G. Cyclin D1 and Ewing's sarcoma/PNET: A microarray analysis. *Acta Histochem*. 2015 Sep 9.
232. Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PHB, Triche TJ. Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res*. 2004;64(17):6026–34.
233. Zhao W, Tian B, Wu C, Peng Y, Wang H, Gu W-L, et al. DOG1, cyclin D1, CK7, CD117 and vimentin are useful immunohistochemical markers in distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from clear cell renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Pathol Res Pract*. 2015;211(4):303–7.
234. Al-Maghrabi J, Mufti S, Gomaa W, Buhmeida A, Al-Qahtani M, Al-Ahwal M. Immunoexpression of cyclin D1 in colorectal carcinomas is not correlated with survival outcome. *J Microsc Ultrastruct*. 2015;3(2):62–7.
235. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004;145(12):5439–47.
236. Tobin NP, Lundgren KL, Conway C, Anagnostaki L, Costello S, Landberg G. Automated image analysis of cyclin D1 protein expression in invasive lobular breast carcinoma provides independent prognostic information. *Hum Pathol*. 2012;43(11):2053–61.
237. Guo R, Overman M, Chatterjee D, Rashid A, Shroff S, Wang H, et al. Aberrant expression of p53, p21, cyclin D1, and Bcl2 and their clinicopathological correlation in ampullary adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2014;45(5):1015–23.
238. Fan G-K, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol*. 2006;42(2):147–53.
239. Guo H, Nan K, Hu T, Meng J, Hui W, Zhang X, et al. Prognostic significance of co-expression of nm23 and p57 protein in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. 2010;40(11):1107–16.
240. Biao Xue R, Xiguang C, Hua L, Hui M, Shuanying Y, Wei Z, et al. Decreased expression of decorin and p57(KIP2) correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Int J Biol Markers*. 2011;26(1):9–21.
241. Atasoy P, Yilmaz E, Bozdogan O, Ayva S, Batislam E. Expression profile and prognostic importance in prostate lesions of the reverse transcriptase component of

- human telomerase (hTERT) and of cyclin-dependent kinase inhibitor p57 (p57kip2a). *Int Urol Nephrol*. 2009;41(1):55–60.
242. Kavanagh E, Joseph B. The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(1):50–6.
 243. Li J-Q, Wu F, Usuki H, Kubo A, Masaki T, Fujita J, et al. Loss of p57KIP2 is associated with colorectal carcinogenesis. *Int J Oncol*. 2003;23(6):1537–43.
 244. Larson PS, Schlechter BL, King C-L, Yang Q, Glass CN, Mack C, et al. CDKN1C/p57kip2 is a candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:68.
 245. Bueso-Ramos C, Xu Y, McDonnell TJ, Brisbay S, Pierce S, Kantarjian H, et al. Protein expression of a triad of frequently methylated genes, p73, p57Kip2, and p15, has prognostic value in adult acute lymphocytic leukemia independently of its methylation status. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(17):3932–9.
 246. Lee SM, Lee EJ, Ko Y-H, Lee SH, Maeng L, Kim K-M. Prognostic significance of O6-methylguanine DNA methyltransferase and p57 methylation in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2009;117(2):87–94.
 247. Yoo J, Park SY, Kang SJ, Shim SI, Kim BK. Altered expression of G1 regulatory proteins in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(5):567–73.
 248. Linardic CM, Naini S, Herndon JE, Kesserwan C, Qualman SJ, Counter CM. The PAX3-FKHR Fusion Gene of Rhabdomyosarcoma Cooperates with Loss of p16INK4A to Promote Bypass of Cellular Senescence. *Cancer Res*. 2007;67(14):6691–9.
 249. Obana K, Yang H-W, Piao H-Y, Taki T, Hashizume K, Hanada R, et al. Aberrations of p16INK4A, p14ARF and p15INK4B genes in pediatric solid tumors. *Int J Oncol*. 2003;23(4):1151–7.
 250. Maelandsmo GM, Berner JM, Flørenes VA, Forus A, Hovig E, Fodstad O, et al. Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas--relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Br J Cancer*. 1995;72(2):393–8.
 251. Li J, Poi MJ, Tsai M-D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry (Mosc)*. 2011;50(25):5566–82.
 252. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle Georget Tex*. 2011;10(15):2497–503.

253. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer J Int Cancer*. 2005;114(4):509–12.
254. Halasová E, Adamkov M, Kavcová E, Matáková T, Musák L, Vybohová D, et al. Expression of anti-apoptotic protein survivin and tumor suppressor p53 protein in patients with pulmonary carcinoma. *Eur J Med Res*. 2009;14 Suppl 4:97–100.
255. Taubert H, Heidenreich C, Holzhausen H-J, Schulz A, Bache M, Kappler M, et al. Expression of survivin detected by immunohistochemistry in the cytoplasm and in the nucleus is associated with prognosis of leiomyosarcoma and synovial sarcoma patients. *BMC Cancer*. 2010;10:65.
256. Serrano-López J, Serrano J, Figueroa V, Torres-Gomez A, Tabares S, Casaño J, et al. Cytoplasmic localization of wild-type survivin is associated with constitutive activation of the PI3K/Akt signaling pathway and represents a favorable prognostic factor in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2013;98(12):1877–85.
257. Khoury T, Arshad A, Bogner P, Ramnath N, Zhang S, Chandrasekhar R, et al. Apoptosis-related (survivin, Bcl-2), tumor suppressor gene (p53), proliferation (Ki-67), and non-receptor tyrosine kinase (Src) markers expression and correlation with clinicopathologic variables in 60 thymic neoplasms. *Chest*. 2009;136(1):220–8.
258. Wang G-C, Hsieh P-S, Hsu H-H, Sun G-H, Nieh S, Yu C-P, et al. Expression of cortactin and survivin in renal cell carcinoma associated with tumor aggressiveness. *World J Urol*. 2009;27(4):557–63.
259. Mathieu R, Klatte T, Margulis V, Karam JA, Rouprêt M, Seitz C, et al. Survivin is not an independent prognostic factor for patients with upper tract urothelial carcinoma: A multi-institutional study. *Urol Oncol*. 2015;33(11):495.e15-22.
260. Liang Q, Wang B, Li G. DcR3 and survivin are highly expressed in colorectal carcinoma and closely correlated to its clinicopathologic parameters. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009;10(9):675–82.
261. Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marcé S, Villamor N, et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol*. 2004;164(2):501–10.
262. Adamkov M, Halasova E, Kajo K, Machalekova K, Vybohova D, Varga I, et al. Survivin: a promising biomarker in breast carcinoma. *Neoplasma*. 2010;57(6):572–7.
263. Nakano J, Huang C, Liu D, Masuya D, Yokomise H, Ueno M, et al. The clinical significance of splice variants and subcellular localisation of survivin in non-small cell lung cancers. *Br J Cancer*. 2008;98(6):1109–17.

264. Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruyt F a. E, Rodriguez JA, Giaccone G. Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2004;15(11):1654–60.
265. Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marcé S, Villamor N, et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol*. 2004;164(2):501–10.
266. Kappler M, Kotzsch M, Bartel F, Füssel S, Lautenschläger C, Schmidt U, et al. Elevated expression level of survivin protein in soft-tissue sarcomas is a strong independent predictor of survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003;9(3):1098–104.
267. Simon-Keller K, Paschen A, Hombach AA, Ströbel P, Coindre J-M, Eichmüller SB, et al. Survivin blockade sensitizes rhabdomyosarcoma cells for lysis by fetal acetylcholine receptor-redirectioned T cells. *Am J Pathol*. 2013;182(6):2121–31.
268. Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2003;29(4):379–82.
269. Song KY, Jung CK, Park WS, Park CH. Expression of the antiapoptosis gene Survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2009;39(5):290–6.
270. Miller MA, Karacay B, Breslow NE, Li S, O’Dorisio MS, Grundy PE, et al. Prognostic value of quantifying apoptosis factor expression in favorable histology wilms tumors. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005;27(1):11–4.
271. He C, Liu Z, Ji J, Zhu H. Prognostic value of survivin in patients with non-Hodgkin’s lymphoma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(4):5847–54.
272. Würfl P, Kappler M, Meye A, Bartel F, Köhler T, Lautenschläger C, et al. Co-expression of survivin and TERT and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Lancet Lond Engl*. 2002;359(9310):943–5.
273. Khan S, Ferguson Bennit H, Asuncion Valenzuela MM, Turay D, Diaz Osterman CJ, Moyron RB, et al. Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a clinical perspective. *Biol Targets Ther*. 2015;9:57–67.
274. Spaulding B, Pan D, Ghadersohi A, Nielsen G, Jensen S, Gellert F, et al. Characterization of the 12C4 survivin monoclonal antibody and insight into the expression of survivin in human adult tissues. *Histopathology*. 2006;49(6):622–33.

275. Veselska R, Skoda J, Neradil J. Detection of cancer stem cell markers in sarcomas. *Klin Onkol Cas České Slov Onkol Spolecnosti*. 2012;25 Suppl 2:2S16–20.
276. Strojnik T, Røsland GV, Sakariassen PO, Kavalar R, Lah T. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg Neurol*. 2007;68(2):133–43; discussion 143–4.
277. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: Effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol WJG*. 2011;17(4):409–18.
278. Kim K-J, Lee K-H, Kim H-S, Moon K-S, Jung T-Y, Jung S, et al. The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. 2011;31(5):494–502.
279. Furlong MA, Fanburg-Smith JC. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in children: four cases in the pediatric age group. *Ann Diagn Pathol*. 2001;5(4):199–206.
280. Kobayashi M, Sjöberg G, Söderhäll S, Lendahl U, Sandstedt B, Sejersen T. Pediatric rhabdomyosarcomas express the intermediate filament nestin. *Pediatr Res*. 1998;43(3):386–92.
281. Shimada S, Tsuzuki T, Kuroda M, Nagasaka T, Hara K, Takahashi E, et al. Nestin expression as a new marker in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Pathol Int*. 2007;57(2):60–7.
282. Sadikovic B, Graham C, Ho M, Zielenska M, Somers GR. Immunohistochemical Expression and Cluster Analysis of Mesenchymal and Neural Stem Cell–Associated Proteins in Pediatric Soft Tissue Sarcomas. *Pediatr Dev Pathol*. 2011;14(4):259–72.
283. Sana J, Zambo I, Skoda J, Neradil J, Chlapek P, Hermanova M, et al. CD133 expression and identification of CD133/nestin positive cells in rhabdomyosarcomas and rhabdomyosarcoma cell lines. *Anal Cell Pathol Amst*. 2011;34(6):303–18.
284. Piras F, Perra MT, Murtas D, Minerba L, Floris C, Maxia C, et al. The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma. *Oncol Rep*. 2010;23(1):17–24.
285. Wu B, Sun C, Feng F, Ge M, Xia L. Do relevant markers of cancer stem cells CD133 and Nestin indicate a poor prognosis in glioma patients? A systematic review and meta-analysis. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2015;34:44.
286. Wu H, Qi X, Yan G, Zhang Q, Xu C, Bian X. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2014;9(6):e100168.

287. Zhou Q, Chen A, Song H, Tao J, Yang H, Zuo M. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3080–8.

B I O G R A F I J A

Dr Sofija Glumac rođena je 04.08.1971. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 1990/1991. godine, a diplomirala 1997. godine, sa prosečnom ocenom 8.64.

Stručni ispit položila je 25.02.1999. godine.

Od 01.02.2002. godine zaposlena je na Institutu za patologiju Medicinskog fakultetu u Beogradu, gde je 2014. godine reizabrana u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Patologija.

Magistarsku tezu pod nazivom: "Ispitivanje apoptoze TUNEL metodom u uzorcima endomiokardnih biopsija bolesnika sa idiopatskom dilatacionom kardiomiopatijom i miokarditisom" odbranila je 07.07.2010. godine.

Specijalistički ispit iz Patologije položila je 20.04.2011. godine.

Užu specijalizaciju iz Kliničke patologije upisala je 19.01.2015. godine.

Objavila je više autorskih i koautorskih radova na domaćim i inostranim kongresima (12 in extenso radova od kojih je 6 u Current Contentu).

Bila je više puta mentor u studentskim radovima koji su prezentovani na domaćim i stranim kongresima.

Istraživač je na projektu broj 41207, pod nazivom "Hemijske i molekulske osnove malignih i kardiovaskularnih oboljenja- kliničke implikacije".

Član je Sekcije za patologiju Srpskog Lekarskog Društva, Udruženja patologa i citologa Srbije i Evropskog Udruženja Patologa.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a **Sofija Glumac**

broj upisa _____

Izjavljujem

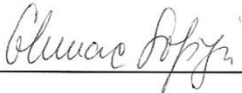
da je doktorska disertacija pod naslovom

**„ZNAČAJ POREMEĆAJA GENA REGULATORA ĆELIJSKOG CIKLUSA I
EKSPRESIJE NJIHOVIH PROTEINA U RABDOMIOSARKOMU „**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2015. god.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : **Sofija Glumac**

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „ZNAČAJ POREMEĆAJA GENA REGULATORA ĆELIJSKOG
CIKLUSA I EKSPRESIJE NJIHOVIH PROTEINA U RABDOMIOSARKOMU „

Mentor: **Prof. dr Jelena Sopta**

Potpisani: **Sofija Glumac**

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2015. god.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„ZNAČAJ POREMEĆAJA GENA REGULATORA ĆELIJSKOG CIKLUSA I EKSPRESIJE NJIHOVIH PROTEINA U RABDOMIOSARKOMU „

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2015. god



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.