

**MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU**

Nenad B. Lujić

**ZNAČAJ EKSPRESIJE FAKTORA
PROLIFERACIJE
I PROTEINA REGULACIJE ĆELIJSKOG
CIKLUSA U
GIGANTOCELULARNOM TUMORU KOSTI**

Doktorska disertacija

Beograd 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Nenad B. Lujic

**THE THE SIGNIFICANCE OF EXPRESSION
PROLIFERATION
FACTORS AND CELL CYCLE REGULATION
PROTEINS
IN GIANT CELL TUMOR OF BONE**

Doctoral Dissertation

Beograd 2016.

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

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Goran Tulić,**
vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Zoran Baščarević,**
vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Dragoljub Bacetić,**
profesor u penziji Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: ___ / ___ / ____

Želim prvo da se zahvalim svima koji su učestvovali i pomogli mi u izradi ove doktorske disertacije. Tako se, valjda, niko ne zaboravi.

Verovatno smo uvek ponosni i osećamo se značajnim i važnim, kao i ja danas, kada učinimo sve ono što smo planirali, a posebno kada je to nešto ovako značajno. Ali nikada ne treba zaboraviti na čijim ramenima stojimo. To su pre svega moji učitelji, prof. dr Jelena Sopta, prim. dr Branko Sbutega, prof. dr Williem Enneking, prof. dr Mirjana Atancković, prof. dr Slobodan Slavković. Hvala i svim onim kolegama koji su uvek bili spremni da pomognu i posavetuju, razumevajući strahove, želje, strepnje, radosti, vizije i iluzije hirurškog života; to mogu samo braća po alatima, sa kojima zajedno gradimo, nadam se, nešto bolje. Da bi u toj gradnji i na naša ramena neko stao, jer samo tako je vredno živeti.

Zahvaljujem se mojim roditeljima, koji bi danas, siguran sam, bili presrećni i ponosni.

I na kraju, zahvaljujem se mojoj Suzani, mojoj ljubavi, mom prijatelju i partneru za ceo život.

ZNAČAJ EKSPRESIJE FAKTORA PROLIFERACIJE I PROTEINA REGULACIJE ĆELIJSKOG CIKLUSA U GIGANTOCELULARNOM TUMORU KOSTI

SAŽETAK

Uvod: Gigantocelularni tumor kosti (GCTB) je primarni koštani tumor koga karakteriše prisustvo dve ćelijske populacije: džinovske ćelije tipa osteoklasta i monojedarne stromalne ćelije koje predstavljaju pravu neoplastičnu tumorsku komponentu. Biološko ponašanje GCTB je nepredvidivo. Terapija izbora za gigantocelularni tumor kosti je hirurška. Međutim, pojava recidiva nakon hirurške intervencije je opisana kod značajnog broja pacijenata i kreće se od 10 do 25%. Postoji veliki broj studija koje se bave analizom biološkog ponašanja GCTB, pre svega sa ciljem predviđanja nastanka recidiva. One su veoma značajne jer ukazuju da GCTB sa agresivnijim biološkim ponašanjem zahteva i agresivniji terapijski pristup. Naše istraživanje se odnosi na određivanje različitih kliničko-radiološko-patohistoloških parametara koji bi mogli uticati na predikciju biološkog ponašanja GCTB, odnosno predviđanje pojave recidiva. Izdvajanjem i jasnim definisanjem karakteristika tumora koje bi mogle ukazivati na povećan rizik za ponovnu pojavu GCTB, nakon hirurške terapije, moglo bi eventualno opravdati i ekstenzivnost/agresivnost terapijskog pristupa.

Ciljevi: Gigantocelularni tumor kosti je benigni tumor, koji i danas ima nepredvidljivo ponašanje, morfološko i kliničko. U cilju preciznijeg utvrđivanja ponašanja tumora i utvrđivanja novih prognostičkih faktora, postavili smo sledeće ciljeve:

1. Utvrđivanje korelacije ekspresije Ki-67, p53 i Ciklin D1 u tkivu gigantocelularnog tumora kosti sa biološkim ponašanjem ovog tumora (pojavom rest-recidiva ili pojavom plućnih metastaza).
2. Utvrđivanje korelacije ekspresije Ki-67, p53 i Ciklin D1 u tkivu gigantocelularnog tumora kosti sa kliničko-patološkim prognostičkim parametrima (klinička GTM, Enneking-ova klasifikacija).

Metodologija: Ova teza je izvedena kao studija preseka, u koju je uključeno 164 pacijenata kojima je u periodu od 1964-2008. god. na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu dijagnostikovao gigantocelularni tumor kosti, a koji su operisani na Institutu za Ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“. Kriterijumi za uključenje u studiju bili su: patohistološki verifikovan

gigantocelularni tumor kosti. Kriterijumi za isključenje iz studije bili su: nekompletnost podataka preuzetih iz Istorije Bolesti IOHB "Banjica", period praćenja kraći od 3 godine.

Rezultati: U cilju određivanja potencijalnih prediktivnih parametara za nastanak recidiva analizirani su kliničko-radiološko-patohistološke karakteristike tumora. Univarijantnom logističkom regresijom (ULR) je od 16 analiziranih varijabli, koje predstavljaju potencijalne prediktorne faktore za nastanak recidiva GCTB, izdvojeno 4 visoko-statistički značajna parametra: 1) lokalizacija lezije, 2) broj hirurških intervencija, 3) nuklearna ekspresija p53 u monojedarnim ćelijama, 4) nuklearna ekspresija Cyclina D1 u džinovskim, multijedarnim ćelijama. Utvrđeno je češće recidiviranje GCTB u humerusu (HR=3,641, $p<0,001$) i radijusu (HR=4,798, $p=0,027$), nego u femuru. Zapaženo je da sa povećanjem broja hirurških reintervencija raste i verovatnoća za nastanak recidiva. Nakon treće intervencije rizik za ponovno pojavu tumora je 11 puta veći, u odnosu na primarnu biopsiju (HR=11,026, $p<0,001$). Od imunohistohemijskih parametara koji se mogu koristiti na biopsijskom uzorku, prilikom inicijalne dijagnostike pozitivnost monojedarnih ćelija na p53 je gotovo 7 puta bila češća kod tumora koji su dali recidive (HR=6,677, $p<0,001$). Tumori koji su imali Cyclin D1 pozitivna jedra u džinovskim ćelijama su 2 puta češće recidivirali od lezija koje nisu pokazivale ovu pozitivnost (HR=2,193, $p=0,005$). Univarijantna regresija je ove varijable izdvojila kao nezavisne prognostičke parametre. Takođe su statističkim alatima (projekcija ULR na veći uzorak) u potencijalno značajne prediktore uključena i sledeća dva kriterijuma: 1) jasna destrukcija korteksa sa prisustvom ekstrakomartmentalne lezije i 2) histološki kriterijumi za malignost. U našem uzorku je 2 puta češća pojava recidiva kod destrukcije korteksa (HR=2,346, $p=0,075$), dok maligni izgled tumora 3 puta češće ukazivao na pojavu recidiva (HR=3,418, $p<0,043$). Sve izdvojene varijable su uključene u multivarijantnu logističku regresiju (MLR), čime je utvrđeno da je ekspresija p53 u monojedarnim ćelijama najznačajniji prediktorni faktor (HR=6,181 $p<0,001$), čija pozitivnost ukazuje na 6 puta veću verovatnoću za pojavu recidiva u GCTB. Ostali parametri nisu multivarijantnom regresijom potvrđeni kao prediktori nastanka recidiva. Međutim, uočeno je da je ekspresija Cyclina D1 u džinovskim ćelijama, koje sadrže manje od 15 jedara, takođe statistički značajna (HR=8,398, $p=0,038$) za predikciju recidiviranja i ukazuje na 8 puta češći nastanak recidiv kod pozitivnih tumora.

Zaključci: Analiza ekspresije faktora proliferacije, kao i regulatora ćelijskog ciklusa, ipak ima značajnu ulogu u proceni i predviđanju ponašanja GCTB. Najznačajnija uloga se ogleda u imunohistohemijskoj nuklearnoj pozitivnosti stromalnih ćelije na p53, i on je najznačajniji

parametar u predikciji recidiva. Drugo po značajnosti je nuklearna pozitivnost Cyclina D1, i to u ćelijama sa manje od 15 jedara i takođe se može reći da predstavlja predikcioni faktor. I poslednja ali ne manje važna je ekspresija β -katenina u citoplazmi monojedarnih, kao i u jedrima džinovskih ćelija, koja visoko korelira sa nastankom patološke fracture kod GCTB. Pozitivnost β -katenina u ćelijama GCTB ukazuje i na aktivaciju Wnt puta, a to predstavlja doprinoseći faktor za lokalno destruktivno ponašanje ovog tumora. Kada ove parametre povežemo sa kliničkim pokazateljima agresivnog ponašanja GCTB zaključujemo, da se postavkom ovih parametara može, ipak sa većom sigurnošću postaviti preciznija indikacija, za agresivniji terapijski – hirurški pristup u terapiji GCTB.

Ključne reči: Gigantocelularni tumor kosti, recidiv, Ki 67, Cyclin D1, p53,
 β -Catenin, Wnt put.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Ortopedska hirurgija, patologija.

THE SIGNIFICANCE OF EXPRESSION PROLIFERATION FACTORS AND CELL CYCLE REGULATION PROTEINS IN GIANT CELL TUMOR OF BONE

SUMMARY

Introduction: Giant cell tumor of bone (GCTB) is a primary bone tumor, characterized by the presence of two cell populations: osteoclast-like giant cells and mononuclear stromal cells, which are, in fact, the real neoplastic tumor component. Biological behavior of the GCTB is unpredictable. Apart from the locally aggressive growth followed by the destruction of bone tissue and propagation in the surrounding soft tissue, as well as frequent incidence of fractures and relapses, the occurrences of pulmonary metastases are also reported. The therapy of choice for giant cell tumor of bone is surgical. However, the recurrence after surgical intervention is found in significant number of patients, i.e. at a rate of 10 to 25%. A large number of studies deal with analyzing the biological behavior of GCTB, primarily in order to predict the recurrence. Those studies are of great importance, since they imply that GCTB with a more aggressive biological behavior also requires a more aggressive therapeutic approach. Our research refers to determining various clinical, radiological and pathohistological parameters which may have an influence on predicting the biological behavior of GCTB, i.e. on predicting the incidence of relapses. Detecting and clearly defining the tumor characteristics which could indicate an increased risk of GCTB recurrence after surgical therapy might account for the extensiveness/aggressiveness of therapeutic approach.

Objective: Giant Cell Tumor of Bone is a benign tumor, which still has an unpredictable behavior, morphology and clinical. In order to precisely determine the behavior of the tumor and the determining of new prognostic factors, we set the following objectives:

1. Establishing correlations expression Ki-67, p53 and Cyclin D1 in the tissues of giant cell tumor of bone with the biological behavior of this tumor (the appearance of rest-relapse or emergence of pulmonary metastases).
2. Establishing correlations expression of Ki-67, p53 and Cyclin D1 in the tissues of giant cell tumor of bone with clinicopathological prognostic parameters (clinical GTM, Enneking's classification).

Methodology: This thesis was carried out as a cross-sectional study, which included 164 patients in the period from 1964 to 2008.god. at the Institute of Pathology, School of Medicine in Belgrade diagnosed with Giant Cell Tumor of Bone, which were operated at the Institute for Orthopedic Surgery "Banjica". Criteria for inclusion in the study were: histologically verified Giant Cell Tumor of Bone. Criteria for exclusion from the study were: the completeness of the data taken from the History of Diseases IOHB „Banjica”, a shorter follow-up period of 3 years.

Results: In order to determine possible predictive parameters for recurrence, the clinical, radiological and pathohistological characteristics of tumors were analyzed. Out of 16 analyzed variables, which presented possible predictive factors for the incidence of relapse of GCTB, univariate logistic regression (ULR) was used to extract 4 highly statistically significant parameters: 1) lesion localization, 2) number of surgical interventions, 3) nuclear p53 expression in mononuclear cells, 4) nuclear Cyclin D1 expression in giant multinuclear cells. A more frequent recurrence of GCTB was detected in humerus (HR=3,641, $p<0,001$) and radius (HR=4,798, $p=0,027$) than in femur. It was observed that, with the increase of surgical reinterventions, the probability of relapse also increased. After the third intervention, the risk of tumor recurrence was 11 times greater in comparison to the primary biopsy (HR=11,026, $p<0,001$). Out of immunohistochemical parameters which could be used on biopsy samples, upon initial diagnostics, the positivity of mononuclear cells on p53 was almost 7 times more frequent in recurrent tumors (HR=6,677, $p<0,001$). Tumors displaying Cyclin D1 positive nuclei in giant cells were 2 times more recurrent than lesions lacking in this positivity (HR=2,193, $p=0,005$). Univariate regression detected these variables as independent prognostic parameters. Additionally, statistical tools (ULR projection on a larger sample) were used to include the following two criteria into potentially significant predictors: 1) clear destruction of cortex with the presence of extracompartmental lesion and 2) histological criteria for malignancy. Our sample revealed recurrence which was 2 times more frequent when cortex was destructed (HR=2,346, $p=0,075$), whereas malignant tumor appearance indicated 3 times more frequent incidence of relapse (HR=3,418, $p<0,043$). All detected variables were included in the multivariate logistic regression (MLR), revealing that p53 expression in mononuclear cells was the most significant predictive factor (HR=6,181 $p<0,001$), the positivity of which indicated 6 times higher probability for recurrence in GCTB. There were no other parameters confirmed as recurrence predictors using the multivariate regression technique. However, it was identified that the expression of Cyclin D1 in giant cells, containing

less than 15 nuclei, was also statistically significant (HR=8,398, p=0,038) for predicting the recurrence, and that it demonstrated 8 times more frequent recurrence in positive tumors.

Conclusions: Analysis of the expression of the factors of proliferation and cell cycle regulators has a significant role in assessing and predicting the behavior GCTB. The most important role is reflected in the immunohistochemical nuclear positivity in stromal cells on p53, and he is the most important parameter in predicting recurrence. The second significance of nuclear cyclin D1 positivity, in cells with less than 15 sails and can also be said to represent a predictive factor. And last, but not least, is the expression of β -catenin in the cytoplasm mononuclear, as well as giant cell nuclei, which is highly correlated with the development of pathologic fracture at GCTB. β -catenin positivity in the cells indicates the activation of Wnt putway, and this represents a contributing factor for the local destructive behavior of this tumor. When these parameters, connected with clinical indicators of aggressive behavior GCTB, we can conclude that the setting of these parameters can, however, a more reliable set of indications, for aggressive surgical approach.

Key words: Giant Cell Tumor of Bone, recurrence, Ki 67, Cyclin D1, p53,
 β -Catenin, Wnt pathway.

Scientific area: Medicine.

Specific scientific Area: Orthopedic Surgery, Pathology.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Klinička klasifikacija tumora koštanog porekla.....	4
1.2. Epidemiologija.....	14
1.3. Regulacija ćelijskog ciklusa i patogeneza.....	17
1.4. Klinička slika	28
1.5. Dijagnostika	30
1.5.1. Klinički pregled.....	31
1.5.2. Radiološko ispitivanje.....	31
1.5.3. Scintigrafija.....	31
1.5.4. Angiografija	32
1.5.5. Kompjuterizovana tomografija	32
1.5.6. Nuklearna magnetna rezonanca	32
1.5.7. Biopsija	33
1.5.8. Osnove makroskopske analize	34
1.5.9. Osnove mikroskopske analize.....	35
1.5.10. Varijante entiteta	36
1.5.11. Diferencijalna dijagnoza	37
1.6. Hirurški kriterijumi	38
1.6.1. Hirurške granice.....	39
1.6.2. Hirurške tehnike resekcije i stepenovanje tumora	40
1.6.2.a Agresivna kiretaža.....	45
1.6.2.b Blok resekcija.....	46
1.6.2.c Lečenje recidiva	46
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	48
3. METODOLOGIJA	50
3.1. Vreme i mesto istraživanja.....	51
3.2. Ispitanici – jedinice posmatranja.....	51
3.3. Klinička metodologija.....	51
3.3.1. Inciziona biopsija	52
3.3.2. Mikroskopska analiza	52
3.4. Statistička metodologija.....	58

4. REZULTATI.....	59
4.1. Osnovne karakteristike.....	60
4.2. Analiza imunohistohemijske ekspresije P53.....	67
4.3. Vrsta operacije u odnosu na p53 (prva, druga, treća)	68
4.4. Patološka fraktura analiza za p53.....	72
4.5. Analiza imunohistohemijske ekspresije Ciklina D1	73
4.6. Vrsta operacije u odnosu na Ciklin D1 (prva, druga, treća).....	74
4.7. Patološka fraktura analiza za Ciklin D1.....	78
4.8. Analiza imunohistohemijske ekspresije Ki67.....	78
4.9. Patološka fraktura analiza za Ki67.....	84
4.10. Analiza imunohistohemijske ekspresije β -katenina	84
4.11. Patološka fraktura analiza za β -katenina.....	89
4.12. Uporedna analiza imunohistohemijske ekspresije p53, Ciklina D1, Ki67, β -katenina i pojave recidiva.....	92
4.13. Broj markera u odnosu na recidivantnost	96
5. DISKUSIJA	98
6. ZAKLJUČCI.....	107
7. LITERATURA	109

1. UVOD

Lečenje tumora muskuloskeletnog sistema zahteva posebna znanja koja se odnose na: kliničku sliku, metode kliničke procene, posebne laboratorijske analize, određene patohistološke tehnike široko poznavanje ortopedsko rekonstruktivne hirurgije uz poznavanje radio, hemio i fizikalne terapije.

Obzirom na činjenicu da su navedena polja iz različitih oblasti medicinske nauke, sasvim je sigurno da pojedinac ne može pokriti sve aspekte navedenog problema te da metodološki pristup i rešenje može realizovati samo tim stručnjaka.

Poslednje decenije prate “kadrovske” promene u timu stručnjaka kako kvantitativno tako i kvalitativno uz konstataciju da lider tima uvek ostaje ortopedski hirur, ali uz neophodnost proširenja svog aspekta interesovanja pa i delovanja.

U istorijskoj fazi lečenja tumora koštanog sistema, posle radiološke i histološke verifikacije, pristupalo se ablativnoj hirurgiji benignih odnosno amputacionoj malignih lezija bez analize histohemijskih, odnosno bioloških karakteristika tumora.

Međutim, poslednje dve decenije označene su raskidom sa navedenom tradicijom pri čemu poseban značaj leži u razvitku novih tehnologija u sferi dijagnostike, hirurgije i rekonstruktivne tehnike. Da bi racionalno i adekvatno izabrao najbolji modalitet lečenja, lezija mora biti procenjena ne samo u odnosu na histološku varijantu, nego i u odnosu na biološko ponašanje, preciznu anatomsko-topografsku lokalizaciju itd.

Sve dijagnostičke procedure uključujući radiografiju, scintigrafiju, kompijuterizovanu tomografiju i Nuklearnu Magnetnu Rezonanc (CT i NMR), kao i angiografiju, moraju biti učinjene u prebiopsijskoj fazi kako bi interpretacija histološkog uzorka bila što adekvatnija, a u sklopu navedenog i realno planirana definitivna hirurška procedura.

Navedeni metodološki pristup ima direktne implikacije na organizaciju ortopedsko-onkološke službe.

Obzirom na činjenicu da se, na primer, u SAD prosečno godišnje dijagnostikuje oko 8000 novih slučajeva neoplazmi porekla skeletnog sistema i da ovaj broj zbrinjava oko 14000 ortopedskih hirurga, očigledno je da godišnje hirur ne može sresti više od dva do tri slučaja što je nedovoljno za sticanje znanja i iskustva, te se ovom patologijom mogu baviti isključivo referentni centri i pojedinci.

U našim uslovima, formiranje, referentnog centra je promenilo tradicionalni koncept planiranja i lečenja tumora muskuloskeletnog sistema.

Tokom protekle 34 godine, odeljenje za lečenje tumora muskuloskeletnog sistema doživelo je razvoj dostojan poštovanja. Pre svega zahvaljujući entuzijazmu svih članova tima koji je obuhvatio: ortopedске hirurge, opšte hirurge, patologe, radiologe, hemoterapeute, fizijatre, medicinske sestre. Svi oni su svako na svoj način, doprineli stvaranju referentnog centra. Evidencija broja pacijenata pokazuje značajno povećanje broja, tokom vremena, a time je stvorena respektabilna baza podataka.

Neophodno je naglasiti da ova oblast ortopedске hirurgije pokazuje visoki stepen nepredvidljivosti, zahvaljujući samoj prirodi sarkoma i lezija koje liče na njih. Tako da je upravo ovakva organizacija tima i njegov rad jedini način da se dođe do značajnih rezultata. Ali takva organizacija je dovela i do proširenja interesovanja pa i integracije ideja, što je inicijalno i bio cilj.

Ali sve ovo nije dovoljno...

Naravno, dobri rezultati i iskustvo samo obavezuju, primoravajući sve članove tima da preispituju svoj doprinos i rezultate, u cilju daljeg razvoja i napretka.

1.1. Klinička klasifikacija tumora koštanog porekla

Tumor džinovskih ćelija – GCT je intramedularna koštana lezija sa širokom lepezom prezentacija, koju čine stromalne i džinovske ćelije.

Sa histološke i imunološke tačke gledišta osteoklastom je tumor *fibrohistiocitnog* porekla. Ovo je svakako možda jedina lezija gde su džinovske ćelije nastale fuzijom ćelija stromalnog porekla.

Obzirom na fibrohistiocitno poreklo histohemijsko prebojavanje i elektronsku mikroskopiju, stromalne ćelije su morfološki slične osteoklastomima, tako da se u aktuelnoj nomenklaturi koriste nazivi *osteoclastom* i *gigantocelularni tumor*.

Gigantocelularni tumor (GCT) prvi put pominje Bloodgood 1921. godine, a definiciju prvi daju Jaffe, Lichtensein i Portis, 1940. godine [1-7].

Od tog vremena tumor je klasifikovan kao benigna, ali i kao maligna lezija. Zbog svoje osnovne karakteristike, džinovskih ćelija, ali ne samo zbog toga već i zbog lokalne agresivnosti u gradusu 3, pojave plućnih metastaza, i pojave maligniteta, mnogi autori su mu posvetili svoje vreme, a on je i danas samo “Veliki iluzionista”. I danas, posle toliko godina, postavlja se pitanje; da li su autori od 1940. godine (Jaffe i Lichtenstein) do devedesetih (Ennekong, Campanacci, Capana, i mnogi drugi) bili u pravu kada su postavili teoriju o GCT kao benignom, agresivnom i malignom tumoru. “Veliki iluzionista” je njih same primorao, da sebi i drugima danas postave pitanje o stvarnom postojanju maligne varijante GCT [3-9].

Klinička klasifikacija tumora koštanog porekla “Staging System” nastala je na Univerzitetu u Floridi uz prethodnu retrogradnu analizu podataka različitih neoplazmi počev od 1960. do 1976. godine. Sistem je proveravan od strane Udruženja za Muskuloskeletne Tumore (Musculoskeletal Tumor Society) od 1976. do 1978. godine kada je prihvaćen u smislu interinstitucionalnog protokola i publikovan je 1980. godine. Prihvaćen je 1985. godine od strane Americke Komisije za Zglobove (American Joint Commission – AJC), a 1990. godine ga je usvojila Međunarodna Unija za borbu protiv malignoma – International Union Against Cancer – UICC [5,7,9].

Klasifikacija je bazirana na biološkom ponašanju neoplazmi porekla vezivnog tkiva, i primenljiva je na lezije porekla iz kosti kao i mekih tkiva. Ova klasifikacija se ne koristi za metastatske karcinome i lezije porekla kostne srži (limfom, mijelom, leukemija itd.) koje imaju vlastite parametre kliničke procene i klasifikacije.

Osnovni kriterijumi koji čine ovaj sistem su:

Stepen – gradus (**G**),

Lokalizacija (**T**)

Metastaze (**M**).

STEPEN – GRADUS (G)

Predviđena su tri stepena: G-0 (benigno), G-1 (malignitet niskog stepena) i G-2 (neoplazma visokog stepena maligniteta). Stepentumora se određuje kombinacijom kliničkih, radioloških i histoloških kriterijuma. [6,8,9,10].

G-0

KLINIČKE KARAKTERISTIKE

Lezija je najčešće asimptomatska i otkriva se često sasvim slučajno. Retko može biti aktivna, sa minimalnim stepenom agresivnosti.

RADIOGRAFIJA

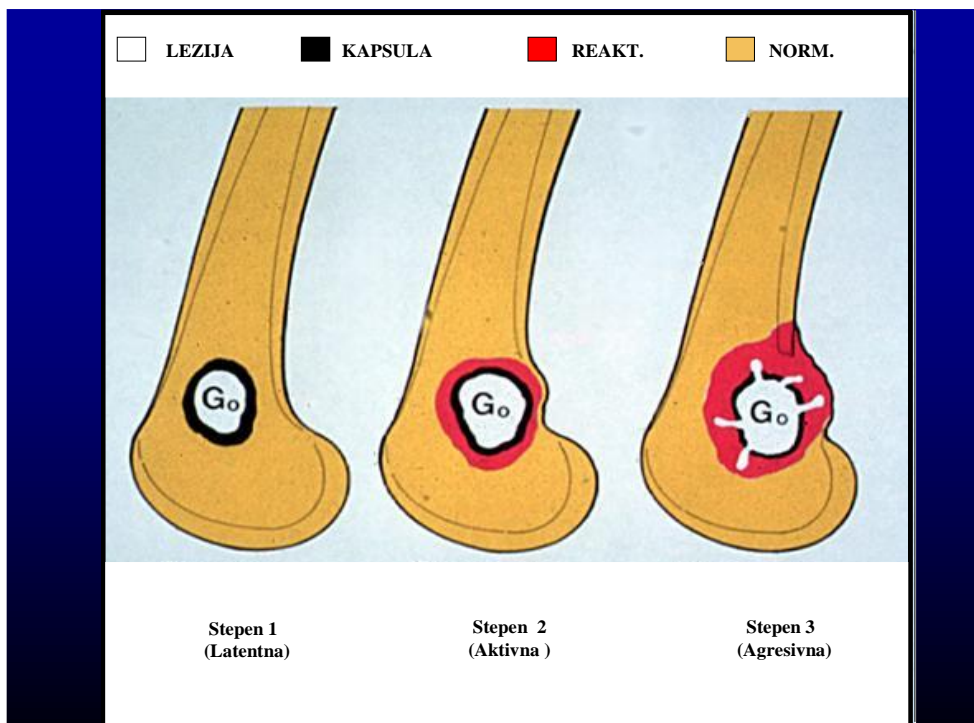
Na standardnoj radiografiji lezija se prezentuje kao zona narušene koštane građe oko koje se može uočiti zona reaktivne kosti.

HISTOLOŠKA ANALIZA

Histološka analiza potvrđuje da je lezija dobro diferencirana sa zrelim matriksom, zanemarljivom nekrozom i bez ćelijske atipije.

BIOLOŠKO PONAŠANJE

Po definiciji lezija je benigne prirode i označava se arapskom nomenklaturom. Stepent 1. odgovara latentnom, stepent 2. aktivnom, a stepent 3. agresivnom obliku.



Slika 1. Kliničko gradiranje benignih tumora kosti.

G-1

KLINIČKE KARAKTERISTIKE

Neoplazma, malih dimenzija sa minimalnom simptomatologijom. Veoma se retko sreće patološki prelom.

RADIOGRAFIJA

Lezija se prezentuje slikom narušene koštane građe, korteks je tanak, ne retko sa prekidom kontinuiteta i invazijom u okolna tkiva, posebno u regionu neurovaskularnog snopa.

HISTOLOŠKA ANALIZA

Lezija je dobro diferencirana sa nezrelim matriksom. Ponekad se sreću polja nekroze i umerena ćelijska atipija sa mitozama. Po Broderovoj četvoro-stepenoj klasifikaciji, ovakav nalaz odgovara stepenima G-1 ili G-2, a po tro-stepenoj Enzinger klasifikaciji G-1 i G-2 [8].

BIOLOŠKO PONAŠANJE

Lezije klasifikovane kao G1 su niskog stepena maligniteta sa malim potencijalom ka ranim metastazama. Ovi tumori poseduju pseudokapsulu i mikrosatelite izvan reaktivne zone.

G-2

KLINIČKE KARAKTERISTIKE

U ovu grupu su svrstani tumori sa brzim rastom, velikog obima, akutnom simptomatologijom i čestim patološkim prelomima.

RADIOGRAFIJA

Tumorska granica kapsule i reaktivne zone je probijena, a periostalna reakcija, ukoliko se javlja, odgovara Codmanovom trouglu. U većini slučajeva tumor potiskuje neurovaskularne elemente.

HISTOLOŠKA ANALIZA

Tumor je slabo diferenciran sa malo ili bez nezrelog matriksa, česta su polja nekroze i krvavljenja, izražena je ćelijska atipija sa brojnim mitozama. Po Broderovoj četvero-stepenoj klasifikaciji korespondira se G-3 ili G-4, a po tro-stepenoj Enzinger klasifikaciji G-2 i G-3.

BIOLOŠKO PONAŠANJE

Odgovaraju tumorima visokog stepena maligniteta sa visokom incidencijom ranog metastaziranja. Označeni su rimskim brojem II. U odnosu na satelitske promene u blizini reaktivne zone postoji značajan rizik od "Skip" metastaza izvan reaktivne zone, ali u loži ishodišta primarnog tumora.

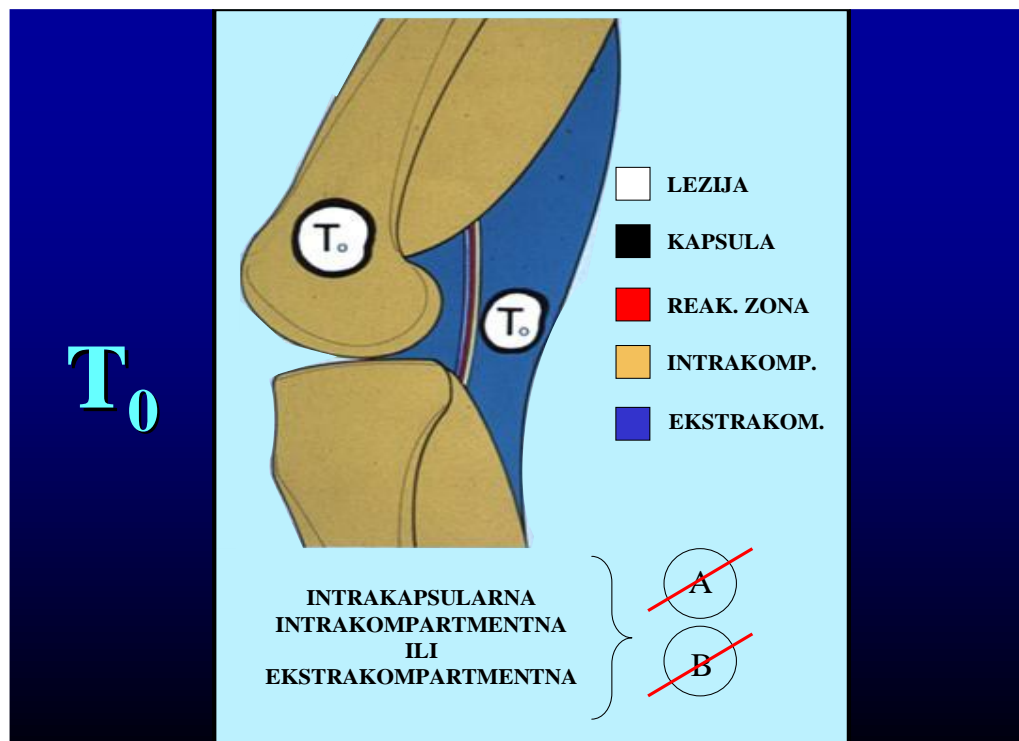
LOKALIZACIJA (T)

Topografska lokalizacija tumora se svrstava u tri kategorije: T-0 (intrakapsularna), T-1 (intrakompartmentna) i T-2 (ekstrakompartmentna). Kompartimenti ili anatomske lože predstavljaju prirodne anatomske barijere u kojima je ishodište neoplazme. Kada je u pitanju lokomotorni sistem to može biti kortikalna kost, zglobna hrskavica, zglobna kapsula, mišićni klivaži, nervni omotači itd.

Ekstrakompartmentna lokalizacija (T2), je regija ograničena tkivom koje nije u stanju da ograniči propagaciju tumora. Radi se pre svega o tkivu oko magistralnih neurovaskularnih snopova, paraartikularnom tkivu, predelu prepone, poplitealne fose, aksile, kubitalne fose itd. Anatomska topografska lokalizacija tumora se određuje kombinacijom radiografskog nalaza, dopunskih dijagnostičkih metoda, makro i mikroskopskim nalazima. [8-16].

T-0

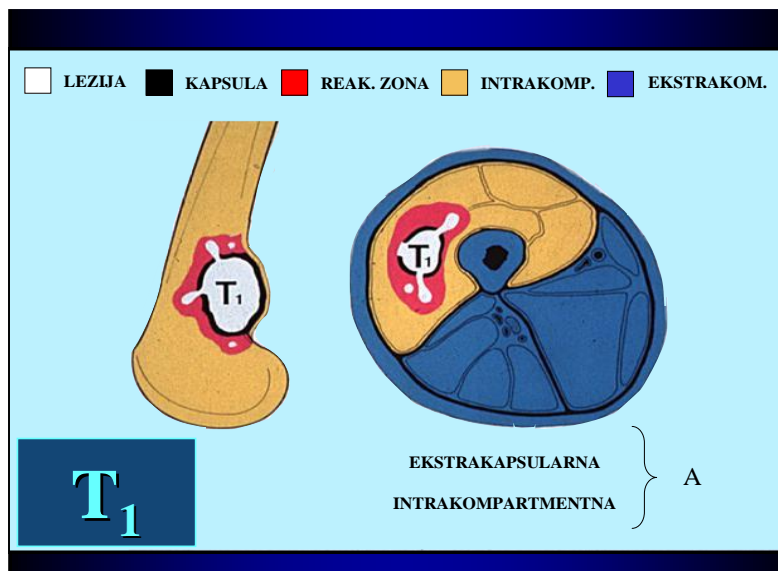
T-0 predstavlja u celini inkapsuliranu leziju. Kapsulu tumora čini zrelo vezivno tkivo, bez obzira da li je lokalizovana u, ili izvan kompartmenta.



Slika 2. Prikaz kategorije **T₀**
(intrakapsularna lezija u odnosu na kompartment)

T-1

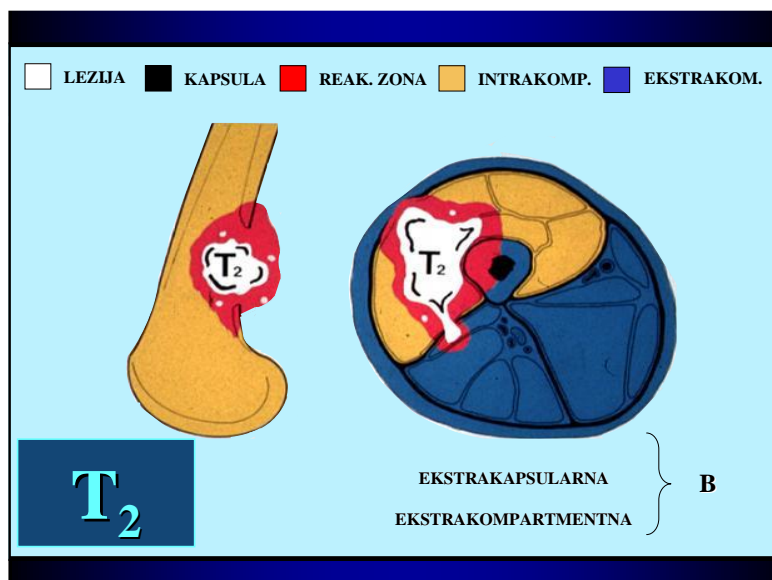
T-1 predstavlja leziju koja je ekstrakapsulirana, ali se nalazi u kompartmentu iz koga potiče. Radiografski, tumor potvrđuje ekstrakapsularnost sa okolnom reaktivnom reakcijom kosti.



Slika 3. Prikaz kategorije **T1**
(ekstrakapsularna lezija u kompartmanu)

T-2

Lezija T-2 je značajna zbog činjenice da je u isto vreme ekstrakapsularna i ekstrakompartmentna (po samoj lokalizaciji ili invazijom kroz barijeru kompartmenta nastanka). Često zahvata susedni neurovaskularni snop i označava se slovom B.



Slika 4. Prikaz kategorije **T2**
(ekstrakapsularna lezija uz ekstrakompartmalnu prezentaciju)

METASTAZE (M)

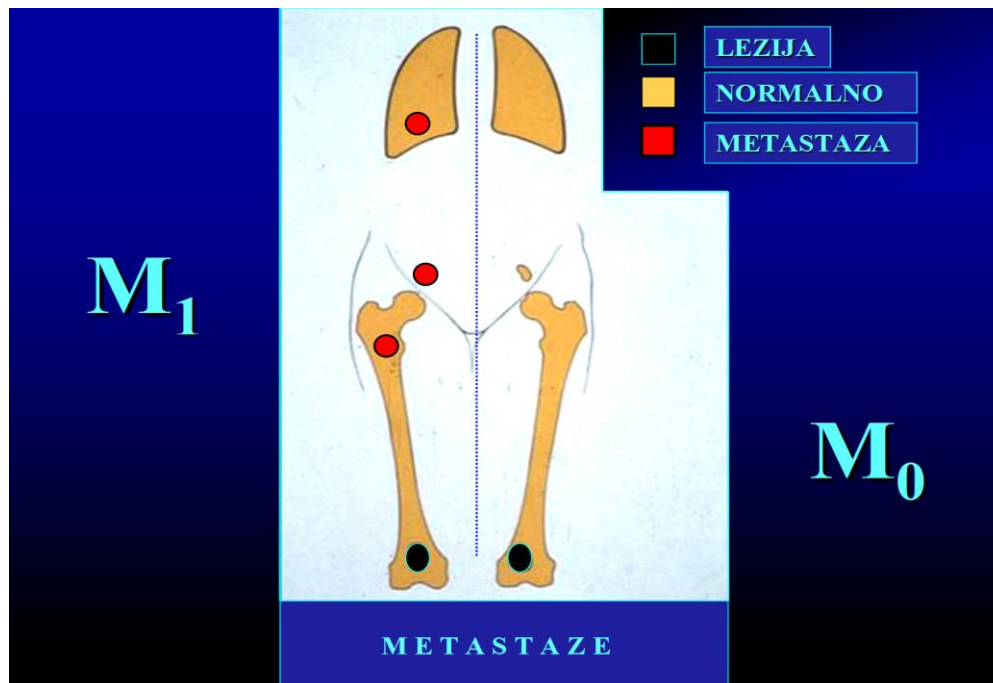
Metastaze su obeležene kao dve kategorije: M-0 (nema meta promena) i M-1 (“skip”, regionalne ili udaljene sistemske metastaze).

M-0 Ne postoje dokazi o postojanju metastatske bolesti.

M-1

Evidentno je postojanje “skip”, regionalnih ili udaljenih sekundarnih depozita. “Skip” promene se definišu kao sekundarna bolest udaljena od primarne lezije međuzonom koju sačinjava normalno nereaktivno tkivo. Ove promene se upravo po navedenom razlikuju od satelitskih lezija koje su u neposrednoj blizini reaktivne zone. Većina se sreće u kompartmentu primarnog tumora, mada se ne retko viđaju u delu trans-artikularno u proksimalnom segmentu susedne kosti. [1,8,15,16,17,18,19,20].

Regionalne metastaze su pre svega lokalizovane u regionalnim limfnim čvorovima. Ovakav način metastaziranja nije karakterističan za GCTB. Udaljeni oblik sekundarne bolesti se može sresti bilo gde, mada su pluća predilekciono mesto.



Slika 5. Prikaz kategorije M (regionalne, „skip“ i udaljene metastaze)

KLINIČKE KARAKTERISTIKE

Ove lezije su u najvećem broju slučajeva, posebno u ranoj fazi, asimptomatske. Nastanak regionalnih metastaza, u zavisnosti od lokalizacije tumora, može biti praćen uvećanjem limfnih čvorova.

RADIOGRAFIJA

“Skip” metastaze su uglavnom veoma male, manje od 2 mm. Tako da se ne mogu vizuelno prikazati radiografski. Najpouzdanija metoda otkrivanja je svakako longitudinalna MR koja je u ovom slučaju najosetljivija i najpouzdanija metoda detekcije.

CT sken je najosetljivija i najpouzdanija metoda u detekciji okultnih plućnih metastaza. Ali u poslednje vreme i Pozitronska tomografija (PET sken), dobija na važnosti.

HISTOLOŠKA ANALIZA

Metastatske lezije su često daleko slabije diferencirane, uz postojanje naglašene atipije, u odnosu na primarni tumor.

BIOLOŠKO PONAŠANJE

Prognoza u odnosu na ishod metastaza zavisi od više faktora rizika [5]. Faktori rizika se mogu podeliti u tri grupe:

1. Postojanje više od jedne metastatske lezije
2. Lezija koja je u svom najvećem promeru veća od 2 mm
3. Vremenski interval manji od 18 meseci od uspostavljene lokalne kontrole bolesti do pojave metastaze. [5-8, 17-23,].

KLINIČKO STEPENOVANJE TUMORA

Tabela 1. Kliničko stepenovanje benignih tumora kosti.

B E N I G N I	
Stepen 1	Latentni G-0, T-0, M-0
Stepen 2	Aktivni G-0, T-0 ili 1, M-0
Stepen 3	Agresivni G-0, T-1 ili 2, M-0 ili 1

Tabela 2. Kliničko stepenovanje malignih tumora kosti.

M A L I G N I	
Stepen I (niski)	a. G-1, T-1, M-0. b. G-1, T-2, M-0.
Stepen II (visoki)	a. G-2, T-1, M-0. b. G-2, T-2, M-0.
Stepen III (metastatski)	a. G-1 ili 2, T-1 ili 2, M-1 sa 0 ili 1 faktorom rizika b. G-1 ili 2, T-1 ili 2, M-1 sa 2 ili 3 faktora rizika

1.2. EPIDEMIOLOGIJA

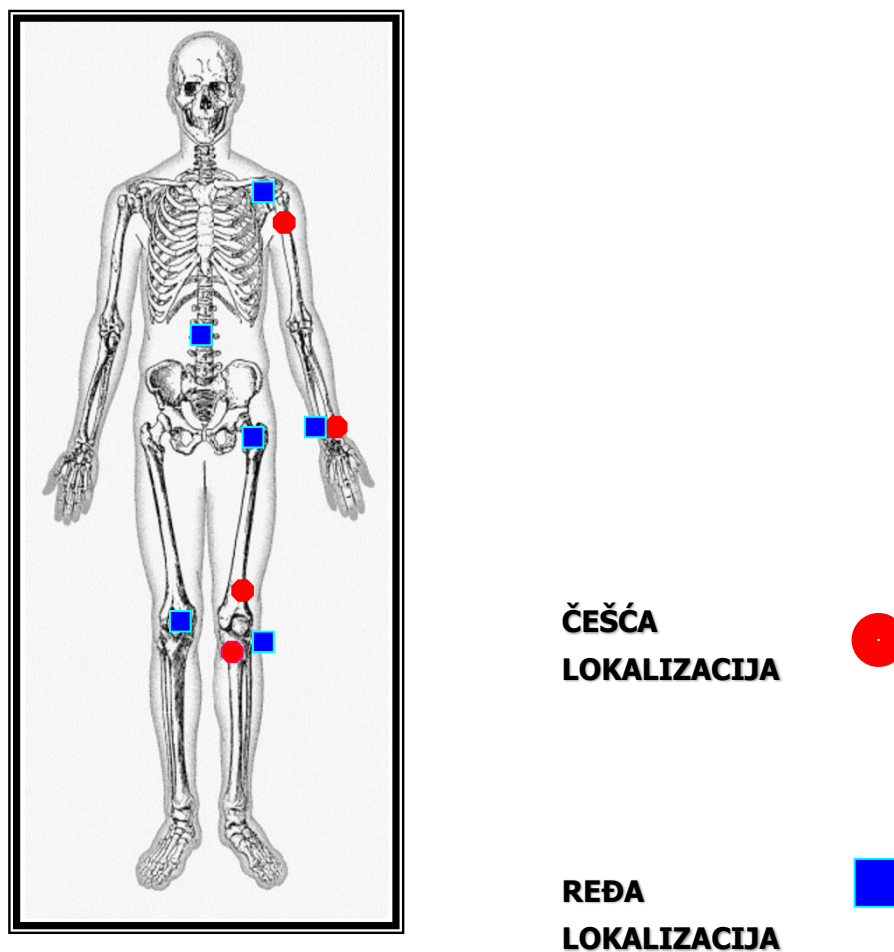
Starost: Gigantocelularni Tumor Kostu (GCTB) se javlja u 2/3 slučajeva između 20-40 godina starosti (u oko 2% slučajeva se javlja u dečijem uzrastu). [8,9,17,21,23].

Pol: U najvećem broju slučajeva zastupljenost muškog i ženskog pola je podjednaka M=Ž [17,21].

Lokalizacija: U principu, svaka kost može biti zahvaćena GCT, ali su predilekciona mesta epifize dugih kostiju, posebno distalni femur i proksimalna tibija. Tumor najčešće zahvata metafizno-epifiznu regiju i ekcentrično je lokalizovan. Retko u odraslih, lezija može biti lokalizovana samo u metafizi kosti sa centralnom pozicijom.

Kada je u pitanju kičmeni stub, tumor je najčešće lokalizovan u predelu tela pršljena. U ređe lokalizacije spadaju kosti šaka i stopala.

Interesantno je istaći da GCT distalnog radiusa, gotovo isključivo nastaje kod osoba ženskog pola (10:1. [8,9,17,21,23]



Slika 6. Distribucija lokalizacija GCT

Pojava GCTB u mlađih od 15 godina je izuzetno retka, ali se javlja i to obično udružena sa neosificirajućim fibromom.

Lokalizacija GCT na pateli je veliki raritet, a prvi objavljuje studiju, Ferguson 1977. god., u kojoj je prikazano 5 slučajeva ove lokalizacije. Od tada ova raritetna lokalizacija nailazi na interesovanje ali i dalje broj ovakvih slučajeva velika retkost, Escribano 2012, Casadei 2012, Yoshida 2012, Malhotra 2009. i sada možemo da navedemo i patelu kao retku tačku na mapi lokalizacija.

Ovakav prikaz epidemioloških podataka GCT je nastao na bazi velikih serija: Mayo Clinice sa 425 slučajaja sakupljenih preko 70 godina (Dahlin et al., 1986.). Huvos prezentira 256 slučajeva 1991. godine, a Capana 876 slučajeva do 1989. godine.

Rezultati svih studija se uglavnom slažu kada su u pitanju epidemiološki podaci. Međutim, učestalost ovih tumora u odnosu na sve tumore muskuloskeletnog sistema je različita i kreće se od 5 – 10%. Kada je u pitanju distribucija po polu, postoje razlike u studijama.

U odnosu na patohistološki gradus svi benigni tumori su podeljeni na tri stepena, a njihova zastupljenost u slučaju GCT je:

Stepen 1 – **10%**

Stepen 2 – **70%**

Stepen 3 – **20%**

Multi centrični GCT, predstavljaju poseban entitet, koji je redak, ali interesantan toliko da je veliki broj autora obradio ove slučajeve [8,10,15,24,25].

Plućne metastaze se javljaju u manje od 1% slučajeva GCT (bez obzira na stepen), ali posebnost ovih metastaza je uticala na postavku nove teze. Naime, GCT histološkog stepena 1. može, mada retko, dati metastaze u plućima. U vezi sa ovom činjenicom zaključujemo, da kada su u pitanju GCT, postojanje metastaza ne podrazumeva i obavezno postojanje primarnog malignog tumora.[24].

Poseban, veoma redak vid javljanja je i u mekim tkivima, pankreasu, bubrežima. Ovi entiteti se analiziraju u novijim redovima, a tek predstoje ozbiljnija istraživanja na ovom polju.

1.3. Regulacija ćelijskog ciklusa i patogeneza

Patogeneza i histogenska priroda ćelijske populacije GCT nije potpuno razjašnjena [26-33].

U osnovi može se reći da u ćelijskoj populaciji GCTB srećemo tri vrste ćelija:

1. **MONONUKLEARNE** (stromalne) vretenaste ćelije slične fibroblastima, koje u kulturi aktivno proliferisu,
2. **POLIGONALNE MONONUKLEARNE** ćelije, sa izraženim monocitnomakrofagnom diferencijacijom,
3. **MULTINUKLEARNE** ćelije, veoma slične osteoklastima, koje nastaju iz sincicijuma fuzijom mononuklearnih ćelija prekursora i makrofagnog su porekla, a imaju sposobnost za profileraciju i osteoplastnu diferencijaciju. [1,5,8,21].

Obzirom na sličnost između poligonalnih stromalnih i džinovskih ćelija (morfološka i imunohistohemijska) i pretpostavku da džinovske ćelije nastaju fuzijom stromalnih, smatramo da je naziv **gigantocelularni tumor** adekvatniji u odnosu na *osteoklastom*.

Da bi odredili što preciznije karakter razvoja tumorskih ćelija GCTB-a, neophodno je sagledati najznačajnije karakteristike, puta onkogeneze, regulacije ćeliskog ciklusa i faktora proliferacije. [26,32-36].

Poznato je da svaka ćelija, ima svoj životni ciklus, koga čine proliferacija, diferencijacija i ćelijska smrt i ove tri faze određuju samu ćeliju. Sve tri faze, nastaju pod uticajem signala iz ćelijske okoline. Poremećaj regulacije bilo kog od ova tri ćelijska procesa dovodi ili do funkcionalne insuficijencije ili tumorogeneze.

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

S faza je period sinteze DNK tokom koje ćelija replicira svoj genetski materijal i od diploidne somatske ćelije (2n) na početku, postaje tetraploidna (4n) na kraju S faze. Trajanje S faze je različito, od nekoliko minuta u ranim embrionalnim ćelijama, do nekoliko sati u većini somatskih ćelija.

G2 faza je period između S i M faze, kada ćelije imaju repliciranu DNK i spremne su za deobu. Ova faza se automatski odvija u svim ćelijama koje uđu u S fazu.

M faza ili mitozu je period nuklearne i citoplazmatske podele ćelija tokom koje se duplirani hromozomi podjednako dele između dve ćerke ćelije, tako da se od ćelija sa 4n na početku M faze, na kraju dobijaju dve ćelije, svaka sa 2n sadržajem DNK.

G1 faza je faza između M i S faze. G1 faza je period ćelijskog rasta tokom koje se obezbeđuje povećanje ćelijske mase neophodno za sledeću fazu ćelijskog ciklusa. Trajanje ove faze je različito, ono zavisi od ćelijskog tipa i prisustva faktora sredine (faktora rasta i osnovnih nutritivnih faktora). Ukoliko uslovi za proliferaciju nisu odgovarajući, ćelija ostaje u produženoj G1 fazi, dok nasuprot tome u slučaju neophodne brze ćelijske proliferacije, G1 faza vrlo kratko traje tako da nema ćelijskog rasta, već ćelija odmah počinje da vrši sintezu DNK i ulazi u S fazu novog ćelijskog ciklusa.

Iz G1 faze ćelijskog ciklusa, u prisustvu osnovnih nutritivnih faktora, ćelija ima mogućnost da ponovo počne da se deli ili diferencira. Da bi ćelija počela da se deli, tj. da bi ušla u S fazu (tj. započela sintezu DNK) neophodni su faktori rasta. U odsustvu faktora rasta ćelija prelazi u G0 fazu.

Kontrolni mehanizmi deluju na dve osnovne tačke ćelijskog ciklusa:

A) prelaz iz G1 u S fazu (započinjanje sinteze DNK)

B) prelaz iz G2 u M fazu (indukcija mitoze).

Prilikom započinjanja sinteze DNK (pri prelazu ćelija iz G1 u S fazu), ćelija ima mogućnost da miruje (tj. uđe u G0 fazu) ili da nastavi sa deobom (tj. uđe u S fazu ćelijskog ciklusa). Prelaz iz G1 u G0 fazu je reverzibilan proces. Prelaskom u G0 fazu, pod uticajem faktora diferencijacije, ćeliji je omogućeno da se diferencira. Vraćanje iz G0 u G1 fazu, pod uticajem faktora rasta ili onkogena, predstavlja vraćanje ćelije u njeno proliferativno stanje.

(A) Prelaz iz G1 u S fazu

U regulaciji prelaska iz G1 u S fazu značajan je Rb protein (retinoblastoma protein). Rb protein je fosfoprotein jedra. On je tumor supresor protein, jer mutantne forme ovog proteina dovode do gubitka kontrole ćelijske proliferacije. Rb protein se stvara tokom celog ćelijskog ciklusa.

(B) Prelaz iz G2 u M fazu

Regulator prelaska iz G2 u M fazu je MPF (maturation promoting factor). MPF je kompleks sačinjen od protein kinaze p34 i ciklina B. Nivo protein kinaze p34 ostaje konstantan tokom celog ćelijskog ciklusa, dok se nivo ciklina B menja tokom ćelijskog ciklusa. U G1 fazi Ciklina B nema, tokom S i G2 faze se povećava, tokom M faze se degradira postepeno.

Sam nastanak tumora je proliferativni poremećaj, i predstavlja bolest ćelijskog ciklusa. Smatra se da su u tumorskim ćelijama mehanizmi koji normalno sprečavaju ćelijsku deobu poremećeni, dok oni koji stimulišu deobu postaju aktivniji. Geni koji su odgovorni za ove promene nazvani su tumor supresori i onkogeni. Veruje se da gubitak funkcije pRb-a stimuliše abnormalnu proliferaciju kao rezultat deregulacije E2F transkripcionih faktora koju prati povećana ekspresija specifičnih gena S faze. I pozitivni (ciklini i CDKs) i negativni (CKI) regulatori ćelijskog ciklusa koji funkcionišu preko pRb-a takođe mogu biti izmenjeni tokom neoplastičnih bolesti. [26,33,36-43]

Deo ćelijskog ciklusa, koji pokriva grupu puteva transdukcije, a koji bi mogao imati značajnu ulogu u fuzionisanju mezenhimalnih ćelija je Wnt signalni put. Wnt signalni put je otkriven 1982. god. istraživanjima na onkogenom retrovirusu, Roel Nusse i Harold Varmus (Stanford University). Određuju ga proteini koji pomoću ćelijskih receptora različitim mehanizmima određuju transkripciju gena, citoskeleton, pa i promet kalcijuma u ćeliji. Prva dva pripadaju kanonskom Wnt signalnom putu. Aktivacija kanonskog Wnt puta indukuje osteoblastnu diferencijaciju i osteoklastnu genuzu tokom procesa resorpcije. Za verifikaciju aktivacije Wnt puta neophodna je primena imunohistohemijskih tehnika molekularne patologije. [39,41,44-49]

Imunohistohemiska metoda (IHC) kombinuje histološku, imunološku i biohemijske tehnike za identifikaciju specifičnih tkivnih komponenti, a po značenju specifičnih antigen/antitelo reakcija, a na osnovu jasno vidljivih obeležja. IHC se koristi pre svega za detekciju: proteina, karbohidrata, tipa ćeliske sekrecije, membranskih antigena, strukturalnih antigena unutar citoplazme, lokalizovanje antigena u nukleusu. Primarna i sekundarna antitela (At) su osnova imunohistohemijskih i imunocitohemijskih tehnika

Postoji veliki broj komercijalnih sekundarnih antitela koja mogu biti korišćena za mapiranje brojnih puteva onkogeneze u različitim mezenhimalnim neoplazmama. U literaturi je poznata upotreba Ciklina D1, β -katenina i p53, kao osnovnih regulatora ćelijskog ciklusa koji bi mogli reprezentativno da verifikuju aktivaciju Wnt puta u tumorogenezi GCTB.

Ciklin D1 je protein uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa tako što kontroliše prelaz iz G1 u S fazu. Predominantno se uočava u nukleusima džinovskih ćelije, mada je opisana i njegova ekspresija u mononuklearnim ćelijama. Do sada objavljene studije, koje se bave ovim fenomenom pokazuju pojačanu ekspresiju CiklinD1 u GCTB. Pojačanu ekspresiju u pojedinim slučajevima ipak ne prati i genska pojačana aktivnost, i ta činjenica sugerise presudnu ulogu Ciklina D1 u

poremećaju prelaska ćelije u stabilnu S fazu, što dovodi do nestabilnosti i praktično, agresivnog ponašanja ćelije. Drugo objašnjenje prikazuje da pojačanu ekspresiju Ciklin D1, ne prati i ekspresija Ki67 (taj trenutak je odgovoran za zaključavanje gigantske ćelije u prelazu iz G u S fazu i nemogućnost da uđe u M fazu). Sa druge strane, konstatovan je i nizak nivo Ciklin D1 genske ekspresije, što se u ovim studijama objašnjava dilucijom ćelijama koje nisu ušle u ovu alteraciju. [66-69]

Kao jedan od najznačajniji puteva onkogeneze navodi supresija aktivnosti antionkogeni (tumor supresorskih gena –TSG). Među većim brojem TSG koji su uključeni u proces onkogeneze supresija p53 se izdvaja kao “raskrsnica” mnogih puteva koji vode u transformaciju ćelije. P53 se nalazi na hromozomu 17(lokus 17p13.3), (McBride i sar., 1986), koji je kod čoveka kodiran na TP53 genu, a njegovi produkti su proteini koji kontrolišu ćelijski ciklus, reparaciju DNK i apoptozu, kao i reparacije oštećene DNK (Kato i sar., 2003). U normalnim, fiziološkim, uslovima p53 je labilan i ima kratak životni vek. Međutim, u slučaju stresa, dolazi do stabilizacije proteina i formiranja tetramera, koji su funkcionalno kompetentni. Značajnu ulogu u stabilizaciji p53 imaju različite kinaze, koje fosforilišu serinske i treoninske ostatke u okviru amino kraja proteina. Na ovaj način p53 je zaštićen od ubikvitinacije od strane MDM2. p53 povećava ekspresiju gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa (p21, Gadd45, 14-3-3s), reparacije oštećene DNK (p53R2) i apoptoze (Bax, Apaf-1, PUMA, NoxA) (Bai i Zhu, 2006). Najpoznatiji primer regulacije ekspresije je aktivacija gena p21. Proteinski produkt ovog gena ima ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G1 fazi, kao odgovor na oštećenje DNK. Neki autori su prozvali p53 “univerzalni čuvar genoma”, dok inaktivacija ovog antionkogeni učestvuje u patogenezi više od 50% humanih neoplazmi. Jedarna ekspresija p53 u mononuklearnim ćelijama GCT je primećena kod novih tumora koji su razvili lokalne recidive ili metastaze. [27-33, 70]

β -katenin je proto-onkogeni. Mutacije ovog gena se često sreću u različitim malignomima: kod primarno hepatocelularnog karcinoma, kolorektalnog karcinoma, ovarialnog karcinoma, karcinoma dojke, karcinoma pluća i glioblastoma. U osnovi β -katenin utiče na kontrolu koju sprovodi Ciklin D1. Sva ova zapažanja mogu ali i ne moraju da implicira mutaciju β -katenina, a njegovo učešće u Wnt signalnom putu je i dalje ne razjašnjeno. [36,39,66,71-75]

Pored aktivacije Wnt puta onkogeneze, koja je visoko verovatna, svakako da veliki značaj u biološkom ponašanju GCTB ima i proliferacija ćelija u kojima je ovaj put aktiviran. Osnovni

proliferativni marker u molekularnoj imunohistohemijskoj tehnici je Ki67 i njegova primena je rutinska, kako u dijagnostičkoj, tako i u eksperimentalnoj patologiji. [39,66,69]

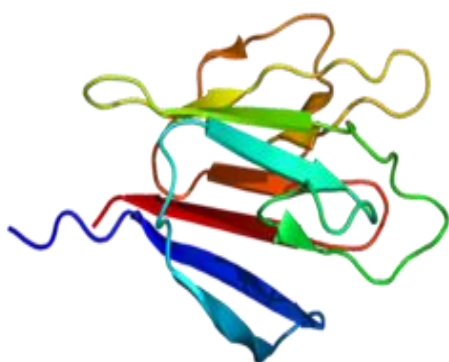
Antigen KI-67, takođe poznat kao Ki-67 ili MKI67 je protein koji je kod čoveka kodiran MKI67 gena (antigen identifikovan monoklonskim antitelom Ki-67). Ki-67 protein je prvobitno definisan iz prototipa monoklonskih antitela Ki-67, koji je generisan iz ćelija Hodžkin limfoma, miševa, ćelijske linije L428.

Naziv potiče od grada Kil, Nemačka. Pored toga što je u vezi sa ribozomalnom RNK transkripcijom. Inaktivacija antigena Ki-67 dovodi do inhibicije sinteze ribozomalne RNK. Ki-67 je antigen koji se odnosi na nehistski nuklearni protein, a koji se eksprimuje u G1, G2, M, i S fazi ćelijskog ciklusa. Generalno, smatra se da postoji visok stepen korelacije ekspresije (jedarne imunopozitivnosti) Ki-67 i mitotske aktivnosti tumorskih ćelija. Zbog toga je određivanje proliferativnog indeksa (broj Ki-67 pozitivnih ćelija prema ukupnom broju ćelija na određenom mikroskopskom uveličanju) prihvaćeno kao odličan marker brzine tumorskog rasta. Takođe postoje jasni klinički pokazatelji i eksperimentalni modeli koji potvrđuju da su tumorska progresija i stepen agresivnosti tumora udruženi sa većim proliferativnim indeksom. Određivanje proliferativnog indeksa u GCT kosti, odnosno ekspresija Ki-67 u mononuklearnoj tumorskoj ćelijskoj populaciji jasan je marker lokalne agresivnosti lezije, kao i prognostički faktor za pojavu recidiva ili plućnih metastaza. [55,60,61,67,76-83]

Savremeni literaturni podaci ukazuju da je određivanjem proliferativnog faktora Ki-67, ekspresije produkata antionkogeno p53 i regulatora ćelijskog ciklusa Ciklina D1 moguće preciznije predvideti biološko ponašanje GCTB, a time i sigurnije pristupiti terapijskom protokolu. [60,61,63,64,68,84]

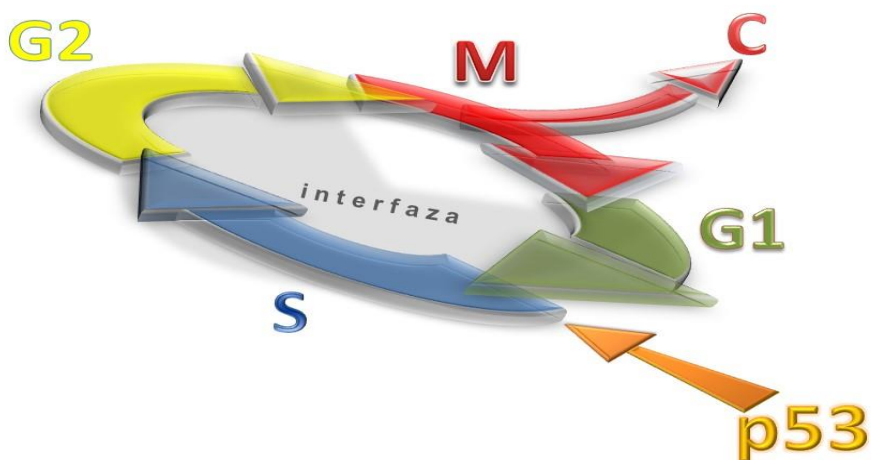
Antigen KI-67, takođe poznat kao Ki-67 ili MKI67 je protein koji je kod čoveka kodiran MKI67 gena (antigen identifikovan monoklonskim antitelom Ki-67). Ki-67 protein je prvobitno definisan iz prototipa monoklonskih antitela Ki-67, koji je generisan iz ćelija Hočkin limfoma, miševa, ćelijske linije L428. Naziv potiče od grada (Kil, Nemačka). Pored toga što je u vezi sa ribozomalnom RNK transkripcijom. Inaktivacija antigena Ki-67 dovodi do inhibicije sinteze ribozomalne RNK. Ki-67 je antigen koji se odnosi na nehistski nuklearni protein, a koji se eksprimuje u G1, G2, M, i S fazi ćelijskog ciklusa. Generalno, smatra se da postoji visok stepen korelacije ekspresije (jedarne imunopozitivnosti) Ki-67 i mitotske aktivnosti tumorskih ćelija. Zbog toga je određivanje proliferativnog indeksa (broj Ki-67 pozitivnih ćelija prema ukupnom

broju ćelija na određenom mikroskopskom uveličanju) prihvaćeno kao odličan marker brzine tumorskog rasta. Takođe postoje jasni klinički pokazatelji i eksperimentalni modeli koji potvrđuju da su tumorska progresija i stepen agresivnosti tumora udruženi sa većim proliferativnim indeksom. Određivanje proliferativnog indeksa u GCT kosti, odnosno ekspresija Ki-67 u mononuklearnoj tumorskoj ćelijskoj populaciji jasan je marker lokalne agresivnosti lezije, kao i prognostički faktor za pojavu recidiva ili plućnih metastaza. [55,60,61,67,76-83,85]



Slika 7. Monoklono antitelo Ki67
(3D prikaz ProteinData Bank EU; PDB)

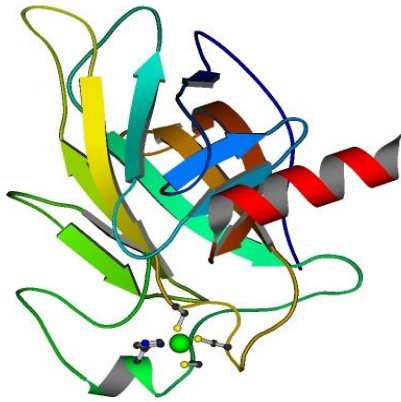
Kako priroda GCTB nije jasna, tako ni mehanizmi nastanka ove neoplazije nisu rasvetljeni. U literaturi se često kao jedan od najznačajnijih puteva onkogeneze navodi supresija aktivnosti antionkogenih gena (tumor supresornih gena –TSG). Među većim brojem TSG koji su uključeni u proces onkogeneze supresija p53 se izdvaja kao “raskrsnica” mnogih puteva koji vode u transformaciju ćelije. P53 se nalazi na hromozomu 17(lokus 17p13.3), otkriven je 1979. (McBride i sar., 1986), koji je kod čoveka kodiran na TP53 genu, a njegovi produkti su proteini koji kontrolišu ćelijski ciklus, reparaciju DNK i apoptozu, kao i reparacije oštećene DNK (Kato i sar., 2003). Neki autori su prozvali p53 “univerzalni čuvar genoma”, dok inaktivacija ovog antionkogenih gena učestvuje u patogenezi više od 50% humanih neoplazmi. Jedarna ekspresija p53 u mononuklearnim ćelijama GCT je primećena kod novih tumora koji su razvili lokalne recidive ili metastaze. [50,51,55,77,78,82]



Slika 8. Šematski prikaz ćelijskog ciklusa i mesto uticaja „univerzalnog čuvara genoma“ p53.

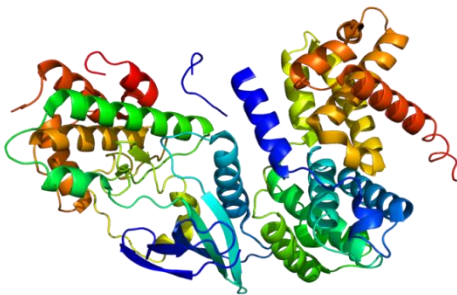
U normalnim, fiziološkim, uslovima p53 je labilan i ima kratak životni vek. Međutim, u slučaju stresa, dolazi do stabilizacije proteina i formiranja tetramera, koji su funkcionalno kompetentni. Značajnu ulogu u stabilizaciji p53 imaju različite kinaze, koje fosforilišu serinske i treoninske ostatke u okviru amino kraja proteina. Na ovaj način p53 je zaštićen od ubikvitinacije od strane MDM2. p53 povećava ekspresiju gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa (p21, Gadd45, 14-3-3s), reparacije oštećene DNK (p53R2) i apoptoze (Bax, Apaf-1, PUMA, NoxA) (Bai i Zhu, 2006). Najpoznatiji primer regulacije ekspresije je aktivacija gena p21. Proteinski produkt ovog gena ima ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G1 fazi, kao odgovor na oštećenje DNK.

Uzimajući u obzir da p53 svoju antionkogensku funkciju ostvaruje indirektno, preko niza drugih gena i njihovih produkata već izvesno vreme se proučava mogući zajednički uticaj p53 i regulatora ćelijskog ciklusa iz grupe ciklina. Većina autora podržava stav da p53 svojim produktima dovodi do aktivne represije transkripcije Ciklina D1, čime indirektno utiče na tok ćelijskog ciklusa. [11,12,20]



Slika 9. Tumorski protein 53
(p53, 3D prikaz Protein Data Bank EU; PDB)

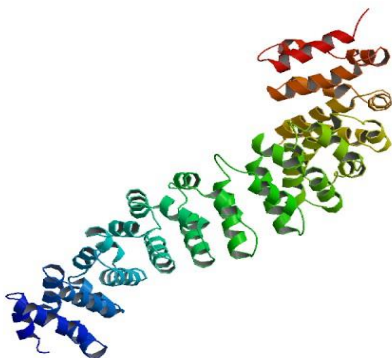
Grupa Ciklina (D, E, A, B), predstavlja ključ regulacije ćelijskog ciklusa, kroz sve faze. Ciklin D1, vrši kontrolu većeg dela G1 faze (tj. tokom pripreme za replikaciju DNA), Ciklin E, kontroliše prelazak G1 u S fazu, (tj. završetak pripreme a zatim i samo dupliciranje DNA), Ciklin B, od tog momenta preuzima kontrolu nad svim preostalim fazama do G0, međutim Ciklin A, sprovodi kontrolu uz Ciklin B tokom cele S, G2 Interfaze ali i same Mitoze.



Slika 10. Cyclin D1
(3D prikaz Protein Data Bank EU; PDB)

Ciklin D1 je protein uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa tako što kontroliše prelaz iz G1 u S fazu. Njega enkodira gen PRAD1 na lokusu 11q13, čija je pojačana ekspresija putem genske amplifikacije dokazana kod mnogih tumora. Ekspresija Ciklina D1 je opisana i u jedrima džinovskih ćelija tipa osteoklasta u GCT kosti. A uloga Ciklina D1 je indukovana β -kateninom (koji je regulator Wnt signalnog puta).

Uočeno je da je pojava Ciklina D1 kod ovog tumora pokazatelj agresivnog biološkog ponašanja, kao i da ima prognostičku ulogu za nastanak recidiva i eventualnu pojavu plućnih metastaza. [39,41,58,60,68].



Slika 11. Katenin beta
(3D prikaz Protein Data Bank EU; PDB)

I učešće β -katenina je značajno. Katenin (kadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (HUGO-odobreni zvanični simbol, CTNNB1; HGNC ID, HGNC: 2514), koji se naziva beta-katenin (ili β -katenin), je regulacioni protein sa dve funkcije, reguliše koordinaciju ćelija ćelijske adhezije i gena. Kod ljudi, CTNNB1 protein se kodiran CTNNB1 genom. β -katenin je prvobitno otkriven u ranim 1990 kao komponenta ćelija sisara adhezionog kompleksa: protein odgovoran za citoplazmatsko ankerisanje kadherina. Tako β -katenin postao jedan od prvih primera da protein obavlja više od jedne radikalno drugačije ćelijske funkcije. [28,39,88-94]

Regulacija nivoa β -katenina u ćeliji preko Wg/Wnt (Wingless) signalnog puta je primarno efektivna tokom embrionalnog razvoja. Glavni događaji tokom ove signalizacije podrazumevaju vezivanje sekretornih glikoproteina Wg/Wnt porodice i njihovih transmembranskih receptora (porodica Frizzled; FRZ), što dovodi do fosforilizacije i aktivacije Dsh (Dishevelled; proteina. Aktivirani Dsh inhibira aktivnost GSK-3 β i na taj način stabilizuje i povećava nivo rastvorenog β -katenina. Zatim sledi njegova nuklearna translokacija i aktivacija Wg/Wnt osetljivih gena preko dvokomponentnog transkripcionog faktora koji sadrži β -katenin i LEF/TCF protein.

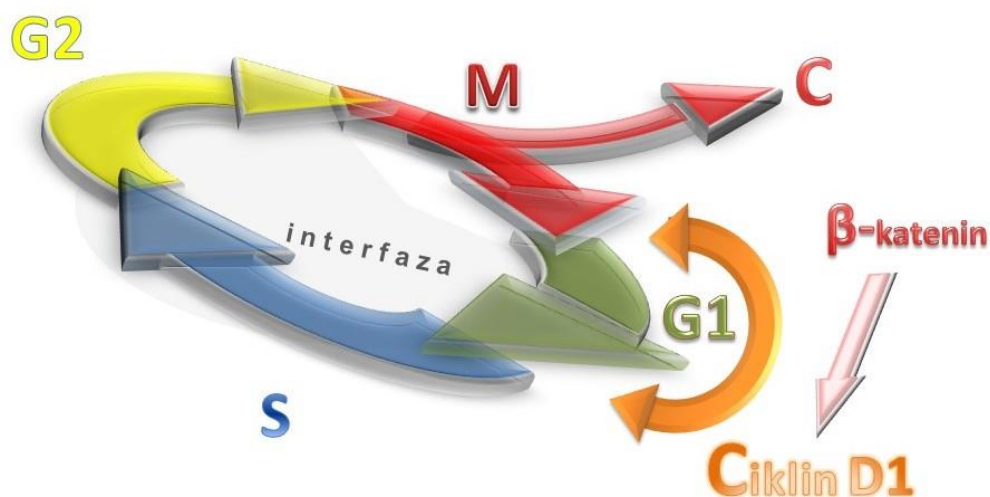
Aktivacija β -katenina kao onkogeno može doći kroz tri mehanizma:

1. Inaktivacijom APC supresora tumora - Pokazano je da su defekti u APC genu odgovorni za razvoj familijarnih i sporadičnih oblika kancera debelog creva. Od najveće važnosti za

tumorogenezu predstavlja defekt u centralnom regionu proteina koji stupa u interakciju sa β -kateninom.

2. Mutacijom u β kateninu - Za sudbinu β -katenina u ćeliji odgovoran je N-terminalni kraj, koji sadrži amino kiseline serin i treonin a na kojima se vrši fosforilizacija β -katenina. Specifične mutacije u CTNNB1 genu mogu da imitiraju efekte inaktivacije APC-a kod ćelija sisara. Efekti obe vrste mutacija (APC i CTNNB1) su isti - sprečavanje fosforilacije i degradacije β -katenina, što posledično dovodi do povećanja β -katenina u ćeliji.

3. Aktivacijom β -katenina pomoću Wnt signalizacije – Wg/Wnt put je uključen u kontrolu ekspresije gena ćelijskog proliferacije i ćelijske adhezije i deluje u kombinaciji sa drugim signalnim putevima (slika 10). U razvoju bubrega, Wnt-4 sekretorni glikoprotein je neophodan za prelaz od metanefričkog blastema do epitelnih ćelija i signalizacija se verovatno odvija preko β -katenina. Nuklearna lokalizacija β -katenin proteina u humanim karcinomima bi mogla stoga biti dobar indikator ne samo za mutacije CTNNB1 gena već indikator aktivacije Wg/Wnt signalnog puta. U skladu sa tim, povećana ekspresija β -katenina i nuklearna translokacija su opisane u naslednim i ne naslednim karcinomima kolona, jajnika, uterusa, melanomima i meduloblastomu. Ove studije su nas podstakle da analiziramo ekspresiju β -katenina u WnT-u pomoću imunohistohemijske metode i da uporedimo te rezultate sa mutacionim statusom CTNNB1 gena. [94-102]



Slika 12. Šematski prikaz ćelijskog ciklusa i mesto uticaja β -katenina i indukcija Ciklina D1.

1.4. KLINIČKA SLIKA

Uprkos činjenici da se radi o benignoj leziji, klinički tok GCT je nepredvidiv. Ne retko lezije stepena 1. mogu ostati mirne odnosno latentne godinama ili čak decenijama.

Većina lezija, oko 70%, su stepen 2., znači aktivne, ali je značajno da oko 20% tumora pokazuje agresivnost stepena 3.

Multicentrične lezije su retke u procentu manjem od 1%.

Glavni simptom GCT je bol sa vidljivom tumorskom masom, posebno kada su u pitanju manje kosti kao distalni radijus ili proksimalna fibula. Kod tumora lokalizovanih u predelu femura ili proksimalne tibije tegobe su vezane za koleno, a artroskopija je uglavnom negativna. Ne retko prva manifestacija tumora je patološki prelom, prema podacima iz literature u oko 10% slučajeva. [1-4]

Klinički tok nelečenog GCT je veoma varijabilan. U većini slučajeva tumor raste sporo, ali konstantno i udvostručuje se u dijametru u roku od 2-6 meseci. Sa druge strane, ako je lezija u uznapređovalom stadijumu, može da se udvostruči za nekoliko nedelja. [5-9]

Plućne metastaze nastaju izuzetno retko (1-2%) bez obzira na ponašanje primarne lezije. Interesantna je činjenica, da je sklonost ka nastanku metastaza ista, kod tumora 2 i 3. stepena i njihov nastanak ne znači da je primarna lezija primila oblike maligne transformacije. Takođe treba pomenuti da je pojava plućnih metastaza moguća i kod tumora 1. stepena, ali izuzetno retko. Histološki aspekt sekundarne bolesti odgovara primarnoj leziji, a i klinički tok je neuporedivo manje fatalan u odnosu na druge maligne tumore koji su dali plućne metastaze [10]

U “stagingu” treba voditi računa da histološki stepen nije odlučujući u odnosu na kliničke karakteristike koje tumor pokazuje na snimcima radiografije, scintigrafije, CT, NMR itd. Praksa je pokazala da čak nema uvek jasne korelacije između biološkog ponašanja tumora i njegovog histološkog stepena.

Dakle, histološki stepen I može biti klinički 3. [59,63,64]

1.5. DIJAGNOSTIKA

1.5.1. Klinički pregled

Kliničkim pregledom, na osnovu informacija dobijenih od pacijenta kroz anamnezu i detaljnog objektivnog pregleda, treba potvrditi ili odbaciti **sumnju**, da se radi o tumoru. I praktično je već u tom trenutku specijalista aktivira “STAGING SYSTEM” (Sistem Kliničke Klasifikacije). To je praktično, skup pažljivo odabranih dijagnostičkih metoda. I kako se ispitivanja realizuju, tako se postavlja i diferencijalna dijagnoza, koju ne retko sačinjavaju samo dva entiteta [18,19,23,56,57]

Sve ovo je proizvod dugogodišnjeg preciznog analiziranja podataka dobijenih primenom odabranih dijagnostičkih metoda.

1.5.2. Radiološko ispitivanje

Osnovno radiološko obeležje GCT je *juksta-artikularna* lokalizacija.

Latentne lezije su radiolucetne, a formirani defekti jasno ograničeni u predelu epifize, bez deformacije korteksa. Tumor je najčešće lokalizovan u blizini subhondralne ploče i ne uvećava se, ili vremenom dolazi do spore progresije lezije.

Aktivne lezije stepena 2. su takođe radiolucetne, ograničene tankom zonom reaktivne kosti, u proseku 2-5 mm probija zonu subhondralne ploče. Daljom evolucijom tumora dolazi do deformiteta korteksa, ali i dalje ostaje granični okvir reaktivne kosti.

Agresivna lezija stepena 3. je radiolucetna sa malom ili nikakvom zonom reaktivnog koštanog tkiva. U nekim tumorima se sreće klasična destrukcija kosti sa prodorom tumora u okolna meka tkiva. Sve navedeno je ne retko praćeno destrukcijom subhondralne ploče i prodorom tumora u zglobni prostor.

Patološki prelomi su česti u GCT i posebno u slučaju lezije tipa 2. Prelom lečen konzervativno, imobilizacijom zarasta sa formiranjem kalusa koji prevenira dalju ekstraosalnu propagaciju. (Slika 13.) [15,54,63]

1.5.3. Scintigrafija

Akumulacija radiofarmaka je u korelaciji sa stepenom lezije. Ona je umerena u prvom, intenzivna u drugom i sa propagacijom u okolna tkiva u trećem stepenu. (Slika 13)



Slika 13. *Desno* – radiografija osteolitičke lezije proksimalne tibije
Levo – scintigrafija skeleta (Tc 99) iste lezije: sa fokalnim nakupljanjem radiofarmaka

1.5.4. Angiografija

Angiografska metoda jasno definiše hipervaskularnost lezije posebno kada se radi o venskoj fazi.

1.5.5. Kompjuterizovana tomografija

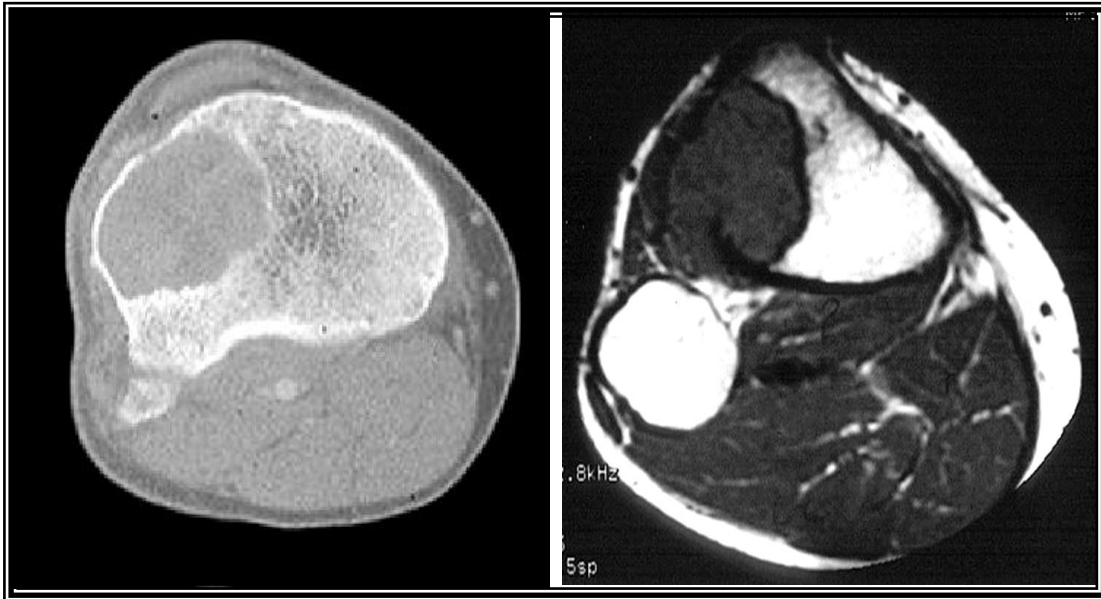
Metoda kompjuterizovane tomografije je najbolja tehnika za procenu stepena destrukcije kortikalne kosti. Sa aplikacijom kontrasta dolazi do izražaja denzitet lezije, odnos sa neurovaskularnim strukturama, a što utiče na planiranje definitivne terapijske procedure.

Intraartikularna propagacija GCT nije česta, ali se dešava, što kompjuterizovana tomografija češće dokazuje ovakvu situaciju nego u slučaju drugih neoplazmi. (Slika 14.)

1.5.6. Nuklearna magnetna rezonanca

Signal u T-1 je niskog stepena, dok je u slučaju T-2 visokog stepena. Obe varijante prezentiraju razgraničenje intraosealne lezije u odnosu na susednu reaktivnu zonu. (Slika 14)

U većini primera Nuklearna Magnetna Rezonanca (NMR) rešava mnoge probleme vezane za odnos tumora prema zglobu, i okolnim strukturama. Ovi podaci su od neprocenjivog značaja za precizno određivanje vrste i tipa hirurške intervencije. [36,54]



Slika 14. *Desno* – CT GCTB proksimalne tibije
Levo – NMR proksimalne tibije, iste lezije

1.5.7. Biopsija

Operativna dijagnostika predstavlja krunu dijagnostičke procedure. Pravila bioptiranja postavljena su razvojem onkološke ortopedije. Osim “klasične” *Incizione biopsije*, moguće je primeniti i *Punkcionu*, koja je u patohistološkoj analizi nepouzdana iako ima svoje prednosti, najviše u okviru racionalizovanja biopsijska trase.

Inciozna biopsija zahteva uslove operacione sale, uz adekvatnu anesteziju. Biopičku trasu treba planirati prema mogućoj sledećoj intervenciji, koja može biti i završna, uklopiti je u buduću kožnu inciziju tako da nam omogućava uključenje hirurške biopsijska trase u resecirani segment, bez obzira na dobijeni rezultat učinjenje hirurške procedure, zato što je cilj, uvek što šira resekcija, uz što kraću kožnu inciziju, ali dovoljno komotnu za rad [37]

Dalji pristup kroz slojeve tkiva bazira se na 3D projekciji levka, svaka sledeća incizija je kraća, sva do kosti ili tumorskog tkiva koje je probilo kompartman. Uzorak tkiva mora biti reprezentativan, što znači odabrati deo viabilnog tumorskog tkiva, i ako je moguće koštani prelaz ka ne zahvaćenom segmentu. Naravno, posebnu pažnju je neophodno obratiti na hemostazu. Ako je potrebno aplikovati i dren, ali tako da se uklopi u “*Biopsijsku trasu*”.

Dobijeni uzorak tkiva potrebno je adekvatno uskladiti i što pre proslediti do nadležnog patologa koji je i deo tima. Adekvatno uskladišten materijal podrazumeva smaštanje u veću posudu, širokog otvora, sa deset puta većom količinom 10% rastvora formaldehida koji se smatra

za gotovo idealan fiksativ. Sve do sada navedeno obezbeđuje adekvatno planiranje definitivne hirurške procedure, a odstupanje može uzrokovati ne premostive prepreke u obezbeđivanju potpune lokalne kontrole bolesti.

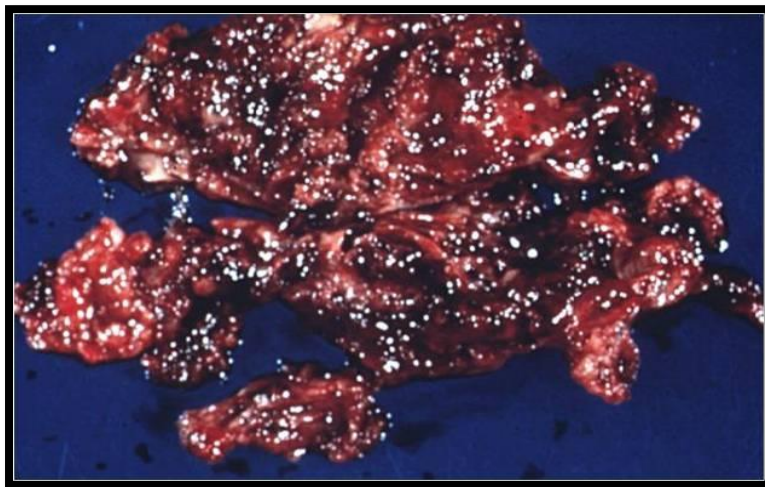
1.5.8. Osnove makroskopske analize

Pri hirurškoj eksploraciji najpre se nailazi na meko tkivo koje je nepromenjeno i tupim preparisanjem se lako odvaja od okolnog koštanog supstrata, zatim se pristupa “normalnoj kosti” ili okolnoj reaktivnoj zoni. Po otvaranju kortikalnog “prozora” sreće se dobro vaskularizovano, kidljivo tkivo sundefaste konzistencije. (Slika 15.) Opisano tkivo se lako uklanja skalpelom ili kiretom, crveno-braon je boje sa mestimičnim poljima žute nijanse.

Kada je ceo uzorak na raspolaganju izgled može biti sasvim različit. U nekim slučajevima tkivo je u celini meko, vaskularno rastresito i crveno-braon boje.

Ove lezije po pravilu na magnetnoj rezonanci poseduju svetao signal zbog visokog sadržaja tečnosti. U drugim okolnostima lezija je primarno čvršće konzistencije sa predominacijom sirasto žutog sadržaja sa minimalnom vaskularnom komponentom. U tumoru su prisutne i zone nekroze i krvavljenja.

Makroskopski proboj subhondralne ploče se sreće na mestima pripoja intraartikularnih ligamenata, najčešće ukrštenih veza kolena.



Slika15. Makroskopski uzorak GCBT

1.5.9. Osnove mikroskopske analize

Osnovnu histološku sliku sačinjavaju multinuklearne džinovske i mononuklearne ćelije sa poljima krvavljenja i nekroze. Džinovske ćelije nastaju fuzijom stromalnih i tkivo je tako mrežasto ukomponovano da je teško reći gde stromalne ćelije prestaju, a džinovske počinju.

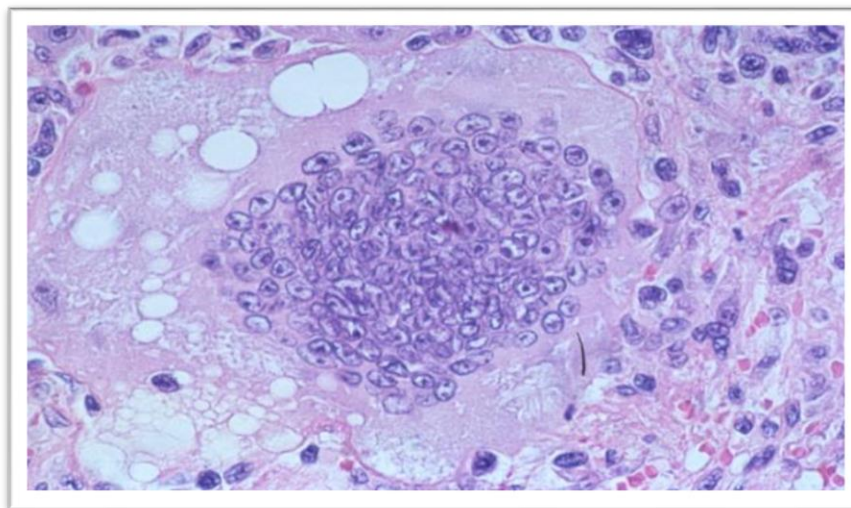
U drugim slučajevima se sreće čvršće, žuto prebojeno tkivo, sa ne malim poljima nekroze i raznolikom distribucijom džinovskih ćelija, zrelim fibroznim tkivom, hemosiderinom i mestimično prisutnim histiocitima, koji su fagocitovali kapljice masti – ksantomne ćelije. [34,69]

U delovima gde osnovna lezija probija osteokartilaginoznu ploču sasvim jasno se konstatuje da tumorske ćelije direktno resorbuju viabilnu zglobnu hrskavicu.

Histogenetski priroda ćelijske populacije GCT je još uvek nerazjašnjena. Do sada su vršena ispitivanja, ultrasonografski, imunohistoheмиjski, testirani su hormonski receptori (PTH, calcitonin), direktno iz tumora i *in vitro*. [53]

U osnovi može se reći da u ćelijskoj populaciji GCT srećemo tri vrste ćelija:

1. MONONUKLEARNE (stromalne) vretenaste ćelije slične fibroblastima, koje u kulturi aktivno proliferišu,
2. POLIGONALNE I OKRUGLE MONONUKLEARNE ćelije, sa izraženim monocitno-makrofagnim karakteristikama,
3. MULTINUKLEARNE ćelije veoma slične osteoklastima, koje nastaju fuzijom mononuklearnih poligonalnih ćelija prekursora.



Slika 16. Multinuklearna ćelija GCT

1.5.10. Varijante entiteta

GCT se na osnovu kliničkih karakteristika, morfoloskih specifičnosti i biološkog ponašanja, može podeliti na:

- a.) konvencionalni GCT
- b.) multicentrični GCT
- c.) konvencionalni GCT sa plućnim metastazama
- d.) maligni gigantocelularni tumori [24,26,50,46]

a.) **Konvencionalni GCT** je opisan u poglavljima

b.) **Multicentrični oblik GCT** je veoma retka varijanta tumora. Dve ili više lezija nastaju sinhrono u metafiznim delovima kostiju i mogu biti latentne, aktivne ili agresivne. Rizik od lokalnog recidiva ili nastanak plućnih metastaza nije veći u odnosu na solitarne konvencionalne GCT. [67]

c.) **Konvencionalni GCT sa plućnim metastazama;** Prema podacima iz literature 2-3% bolesnika (na osnovu velikih studija < 1%) sa konvencionalnim GCT razvijaju plućne metastaze. To su boleli sa histološki benignim oblicima tumora drugog ili trećeg stepena kliničke klasifikacije.

Prema sadašnjim saznanjima sasvim je jasno da ne postoji pouzdana metodologija koja bi precizno predvidela koji tip GCT ima veći ili manji rizik u odnosu na pojavu sekundarne bolesti.

Prognoza bolesti GCT sa plućnim metastazama je neuporedivo bolja nego kod klasičnog sarkoma, sa plućnim metastazama.

Prosečno 80% pacijenata se leči ekscizijom plućnih depozita sa ili bez hemoterapije.

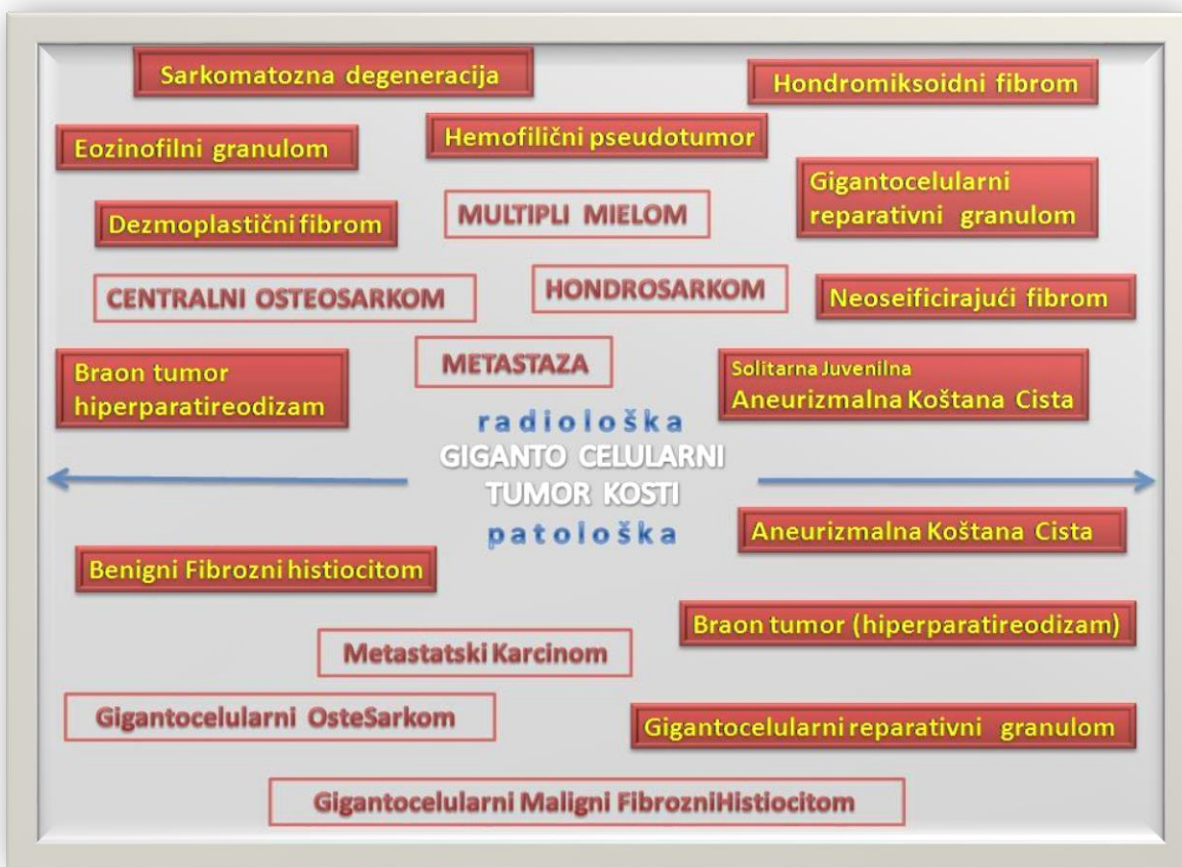
d.) **Maligni GCBT:** ovo je entitet koji odgovara klasičnom sarkomu koji sačinjava stroma malignih vretenastih i poligonalnih ćelija sa razbacanim iregularnim poljima multinuklearnih džinovskih ćelija.

Radi se o leziji visokog stepena maligniteta pre svega u predelu metafize i dijafize dugih kostiju i tretira se kao stepen II (po klasifikaciji malignih tumora muskuloskeletnog sistema, "Staging System") gde je sa terapijske tačke gledišta potrebno realizovati široku ili radikalnu hiruršku proceduru.

Postoje dva tipa sarkoma džinovskih ćelija: primarni i sekundarni. Primarni sarkom džinovskih ćelija se karakteriše istovremenim prisustvom konvencionalnog GCT i sarkoma u juxta poziciji. Ova maligna komponenta je verovatno izraz dediferencijacije osnovnog tumora.

Činjenica da je maligna komponenta tumora samo mestimično prisutna ukazuje na potrebu pažljive patohistološke analize velikog broja isečaka. Sekundarni sarkom džinovskih ćelija je posledica zračenja GCT, po literaturi usled zračenja od 30G, u oko 20% slučajeva primenjene radio terapije. Lečenje ovakvog sarkoma mora biti agresivno, a prognoza je neizvesna.

1.5.11. Diferencijalna dijagnoza



Grafikon 1. Diferencijalna dijagnoza GCTB. [22,23,37,45,61]

1.6. HIRURŠKI KRITERIJUMI

1.6.1. Hirurške granice

U cilju procene efikasnosti sprovedene hirurške procedure, uz očuvanje lokalne kontrole neoplazme, intervencija se klasifikuje u odnosu na zonu intaktnog tkiva. Hirurške granice se definišu u odnosu na topografske ravni prostora kroz koje je realizovana disekcija, a u odnosu na relativne barijere kojima se koristimo a to su: fascije, tetive, ligamenti, hrskavica.

Morfologija samog tumora ima veliki uticaj na hiruršku tehniku.

Postoje četiri tipa hirurških granica:

- a) intrakapsularna (intralezionalna)
- b) marginalna
- c) široka
- d) radikalna

a) **Intrakapsularna (intralezionalna)**

Intrakapsularna procedura podrazumeva ablaciju neoplazme kroz kapsulu u delovima.

Ova intervencija u operativnom polju ostavlja neizbežno makroskopske i mikroskopske delove osnovne neoplazme. Primeri za navedeno su inciziona biopsija, kiretaža ili neadekvatna destrukcija kapsule u toku ekscizije ili amputacije.

b) **Marginalna**

Marginalna granica se postiže disekcijom tumora ekstrakapsularno kroz ravan reaktivne zone tipa en bloc. Kao posledica navedenog ostaje deo reaktivnog tkiva, sa realnom mogućnošću ekstrakapsularne propagacije agresivnih benignih lezija, mikrosatelita nisko i visoko malignih tumora kao i “skip” metastaze maligniteta visokog stepena. Primeri za ovaj tip se sreću pre svega kod ekscizionih biopsija, enukleacija “in toto” ili resekcija odnosno amputacija kroz reaktivnu zonu.

c) **Široka**

Široka granica se postiže disekcijom tumora zajedno sa kapsulom, reaktivnom zonom u ravni koja zahvata zdrave strukture u zahvaćenoj loži, odnosno kompartmentu.

Posle učinjene procedure na mestu ablacije ne preostaje neoplastično tkivo, dakle tkivo koje se odnosi na moguće “skip” metastaze posebno kod tumora visokog stepena maligniteta.

d) **Radikalna**

Radikalna granica se postiže “en block” uklanjanjem lezije, kapsule, reaktivne zone i zdravog tkiva u celini celog kompartmenta u kome je ishodište primarnog tumora.

Ono što preostaje je neoplastično tkivo, nereaktivno, zdravo ekstrakompartmetno tkivo bez potencijala za rezidualni tumor. [3-6]

1.6.2. Hirurške tehnike resekcije i stepenovanje tumora

Hirurške procedure se definišu granicama koje su postignute a ne načinom kako su realizovane. Kada je granica široka ona se postiže loko-regionalnom resekcijom ili amputacijom. Ekstrakompartmetna en bloc ekscizija je radikalna, dok hemipelevektomija koja prolazi u ravni reaktivne zone tumora predstavlja hirurgiju marginalnog tipa.

Disekcija koja je u 95% široka a u pet posto marginalna, je sa onkološke tačke gledišta marginalna intervencija. Granice se svakako mogu proceniti u pojedinim slučajevima makroskopski, mada suspektna mesta moraju biti proverena mikroskopski. Kada su u pitanju koštane lezije od posebnog je značaja preoperativna oralna administracija Tetraciklina od 250 mg, tri dana pre planirane operacije sa ciljem da se postigne kasnijom patohistološkom analizom distinkcija između reaktivne i ne-reaktivne kosti. Obeležavanje slobodnih površina mekog tkiva uzorka sa India mastilom sasvim izvesno doprinosi identifikaciji postignute granice.

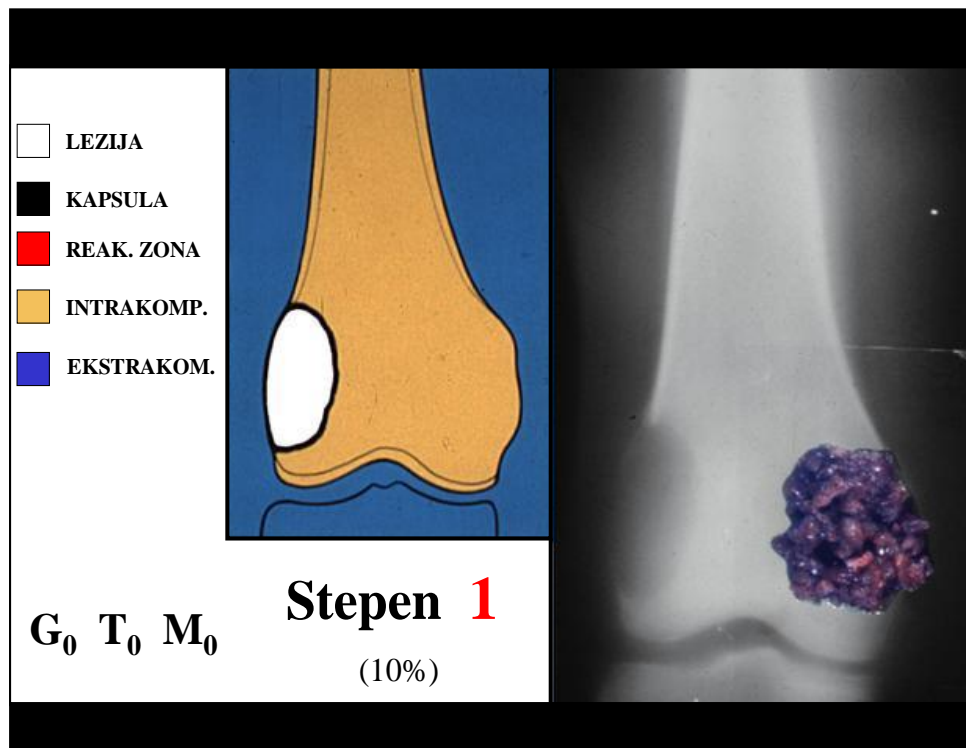
Pomenuta pravila izvođenja hirurških tehnika se odnose pre svega na malignome, zato njihovo tretiranje i podrazumeva visoki stepan odgovornosti a nepoštovanje vodi u neispravljlive graške. Grupa benignih tumora koštanog sistema koji se leče operativno a kojoj pripada i GCT podnose po pravilu intralezionu i marginalnu proceduru u većem broju slučajeva, dok je “en block” resekcija rezervisana za agresivne lezije. Međutim neophodno je voditi računa da histološki stepen 1. može biti klinički 3; što pre svega oslikava biološku aktivnost GCT i tako formiran staging koristiti pri donošenju odluke o vrsti operativnog zahvata.

Kroz istoriju, operativno lečenje GCT se razvijalo po tipu pokušaja i greška. [3,4,10,13,61]

Kao osnovna tehnika, kiretaža tumorskog ležišta u samoj kosti sa širokom trepanacijom istanjenog zida kosti je dozvoljena u slučajevima operativnog rešavanja benignih tumora, ali i u slučajevima tretiranja agresivnih lezija kao što je i GCT ali samo uz upotrebu pomoćnih metoda koje bi mogli da podvedemo pod “hemijsku kiretažu”. U ovu grupu pomoćnih tehnika spadaju: primena MMA, tecnog azota, fenol-glicerolskog rastvora i termokauterizacije. [144]

Stepen 1 (latentni)

U ovom obliku incidenca lokalnog recidiva je zanemarljiva posle kiretaže. Kriohirurgija ili osteoplastika sa koštanim cementom nije indikovana a spontana regresija lezije je zabeležena u dosadašnjoj literaturi više puta, ali samo kod slučajeva dijagnostikovanog GCT u mlađih od 15 god. Kada je obično udružen sa neoseificirajućim fibromom.



Slika 17. Osnovne karakteristike benignih koštanih tumora stepena 1

Stepen 2 (aktivni)

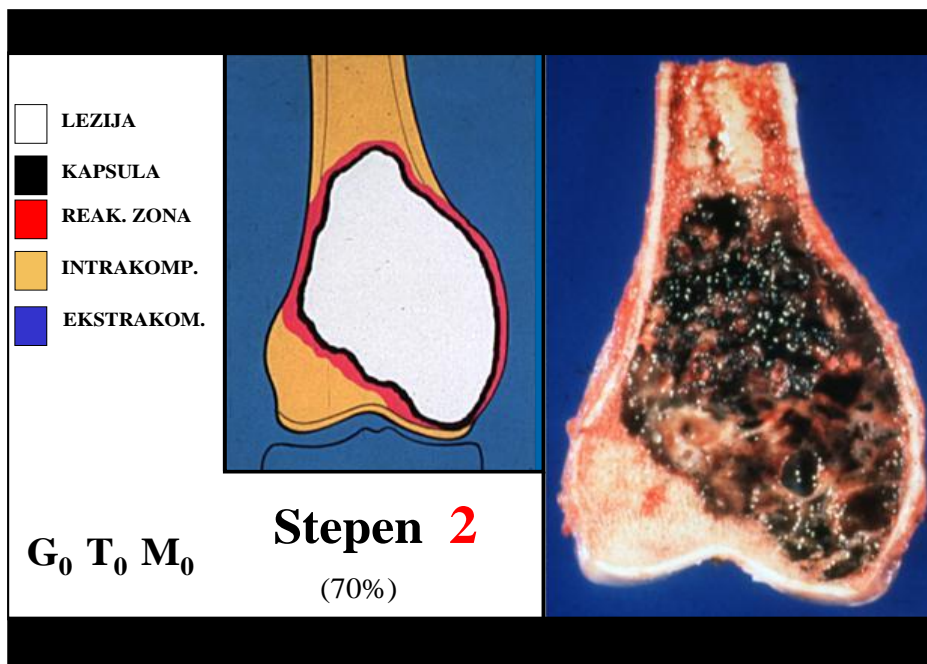
Lokalni recidiv posle kiretaže po dosadašnjim saznanjima iznosi oko 20% posebno kada se šupljina ispunjava koštanim kalemovima u odnosu na koštani cement. Ako je šupljina "stabilna" sa malim rizikom od patološkog preloma pre je indikovana osteoplastika sa koštanim kalemovima dok je koštani cement pre indikovano kada je lokalizacija lezije blizu subhondralnoj ploči, odnosno kada pretili veći rizik od patološkog preloma.

Upravo većina recidiva u stadijumu dva se javlja posle ne adekvatne kiretaže u delu subhondralne hrskavice kada postoji opravdana strepnja od proboja tumora u zglobnu šupljinu. Sasvim sa jasno pokazalo da pod takvim okolnostima upotreba koštanog cementa ima prednost jer izaziva nekrozu preostalih tumorskih ćelija, toplotom tokom polimerizacije.

Na osnovu dosadašnje prakse zaključeno je da je rizik od degenerativne artroze upotrebom Metilmetakrilata (MMA) pojačan. U slučaju gde je odnos zdrave spongiozne kosti u odnosu na sub hondralnu ploču 1 cm rizik je zanemarljivo mali i dokazuje opravdanost ove procedure, dok u primerima manjim od 5 mm rizik je već veoma visok i iznosi oko 35%. [64,66,81,82]

Upravo zbog navedenog, smatra se da je indikovano aplikovati auto kalem (kortikospongiozni), najmanje 1 cm debljine, koji predstavlja podlogu na subhondralnoj ploči pre aplikacije koštanog cementa. [63,65]

Još uvek postoje neslaganja u vezi zamene cementa koštanim kalemovima. Dosadašnja višegodišnja iskustva pokazuju da ima indikacija za zamenu cementa koštanim transplantatom ali najmanje dve godine posle primarne hiruške procedure, a da u međuvremenu nije bilo lokalnog recidiva.



Slika 18. Osnovne karakteristike benignih koštanih tumora stepena 2

Stepen 3 (agresivni)

Lokalni recidiv posle ekstenzivne kiretaže iznosi 70%, sa aplikacijom kriohirurgije ili koštanim cementom oko 25%, a adjuvantna terapija Fenolom (Sol. Phenoly-glicerolata 20%) snižava procenat recidiva na cak 7% i preporučuje se u tretiranju svih stepena lezije.

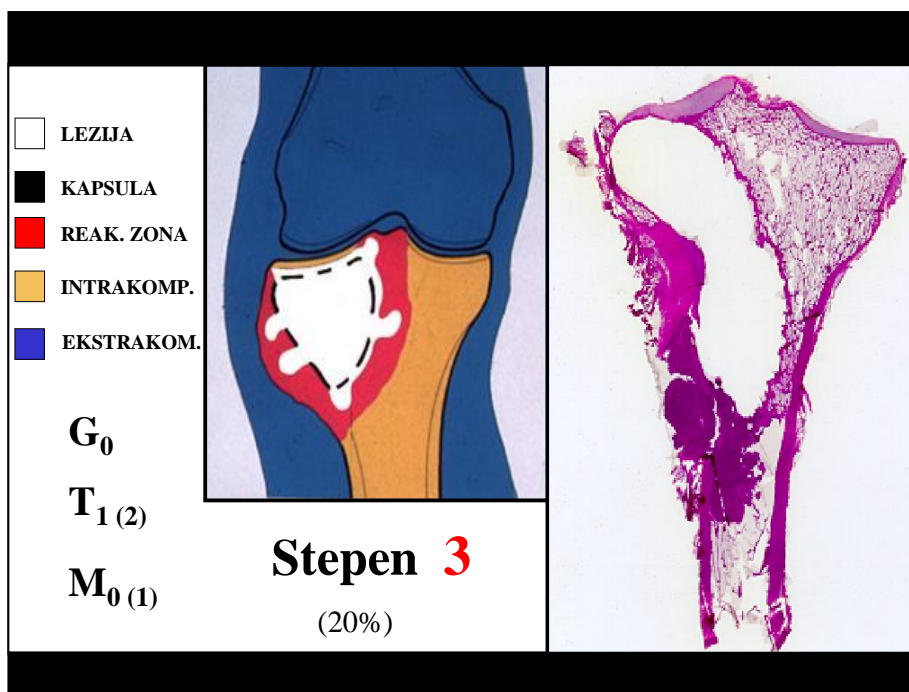
Agresivne lezije ekspanzivnog rasta sa zahvatanjem mekih tkiva su sasvim jasno nepodobne za procedure tipa kiretaže ili marginalne ekscizije. Sasvim je izvesno da je potrebno realizovati sa onkološke tačke gledišta široke procedure sa rekonstruktivnim alternativama tipa artrodeze uz upotrebu alograft kalema, tumor endoproteze i u pojedinačnim slučajevima patelarni autokalem kada su u pitanju lezije proksimalne tibije. Recidivantne lezije se klinički procenjuju i leče po kriterijumima primarne bolesti.

Lezije koje su praćene *patološkim prelomom* predstavljaju poseban problem. Mnoge od njih su primarno intra-artikularne zbog predilekcije tumora za metafizno-epifiznu lokalizaciju. Uprkos svemu klinički procenjene lezije tipa jedan ili dva treba lečiti lokalnim izborom procedura dok lezije tipa tri zahtevaju široku resekciju.

Ova vrsta preloma se po danas usvojenim načelima leči bolje metodom spoljne fiksacije upravo zbog rizika od lokalne kontaminacije. [6,75]

GCT često dobro reaguje na umerene doze zračne terapije od 40 do 45 CentGraya. Radiološki se sreće osifikacija na mestu radiolucenčnih defekata, a rizik u ovom obliku terapije od lokalnog recidiva je 15-20%. [56,59]

Postoji značajan rizik od indukovanoog sarkoma posle iradijacije mada procenti nisu indikativni u odnosu na vreme praćenja i pojavljuju se u oko 5% obolelih.

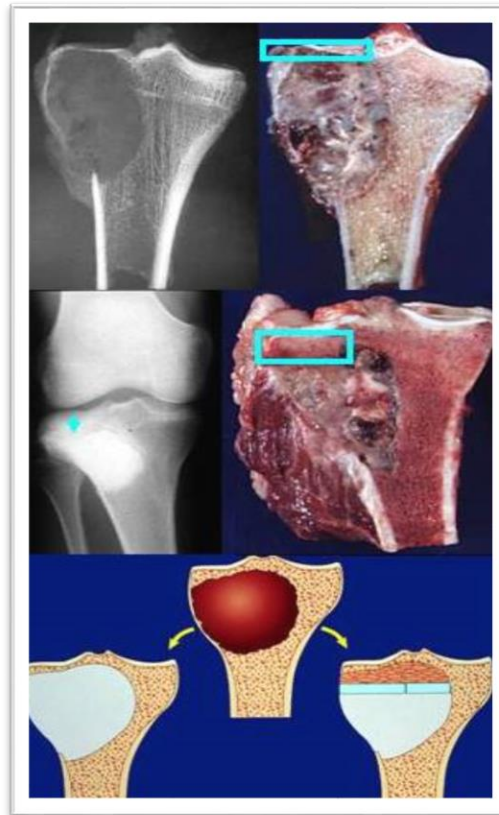


Slika 19. Osnovne karakteristike benignih koštanih tumora stepena 3

Upravo iz navedenih razloga hirurgija jeste metoda izbora, a alternativna radioterapija ima svoje indikacije u odnosu na specifične topografske regije kao što je kičmeni stub gdje navedene procedure nije moguće adekvatno onkološki realizovati. Daleko je adekvatnije primeniti neku od adjuvantnih procedura.

Posebna pažnja se obraća na pojavu sekundarne artroze na bliskoj artikulaciji, kao posledice delovanja Metilmetakrilata (MMA) na artikularnu površinu. Potvrdu za ovakvu tvrdnju dao je naučno istraživački centar Rizzoli iz Bolonje. [60] Učinjena je eksperimentalna studija na psima i konstatovana pojava sekundarnih artrozičnih promena na bliskoj artikulaciji, što je potvrđeno i kliničkim studijama. Kao posledica takvog istraživanja uvodi se nova tehnika "Kombinovana osteoplastika". Ova tehnika se primenjuje u slučajevima kada je destrukcija subhondralne kosti (bilo tumorom ili kiretažom) ostavila manje od 1 cm zdrave spongiozne kosti. U tom slučaju se na subhondralnu površinu transplantira spongiozno-kortikalni graft (ako je moguće auto-graft sa kriste), uz adekvatnu fiksaciju, a ostatak kavana se popuni sa MMA. Usvojena tehnika ima i svojih mana, ali pokušava da objedini najpozitivnije strane do sada primenjivanih tehnika kako u tretiranju same neoplazme tako i kao olakšavajući činilac kod

praćenja bolesnika tokom post operativnog perioda sa težnjom da se ponovna pojava tumora dijagnostikuje u pravom trenutku i pravilno tretira. [52,57,59,64]



Slika 20. Kriterijumi i prikaz izvdjenja "kombinovane osteoplastike"

1.6.2.a Agresivna kiretaža

I konačno treba pokloniti dužnu pažnju hirurškoj tehnici koja se često pominje ali se obično tehnički ne izvede pravilno, a to je kiretaža, ili kako je Campanacci M. naziva „Agresivna kiretaza“. [45]

Ova, na prvi pogled, bezazlena hirurška tehnika, zahteva poštovanje određenih pravila:

1. zid šupljine tumora se otvara široko, u nastavku prethodno formirane bioptičke trase, koja uključuje tkivo od kože do pomenutog zida tumora,
2. kada je kiretažom moguće prikazati u većoj meri zdravu kost (kiretirati i reaktivnu zonu) sa izuzetkom manjih polja teško pristupačnih, tada se primenjuje neki od dostupnih adjuvantnih metoda (fenol, tecni azot, termokauterizacija).

3. kada rezidualna kost na mestu tumora, perkusijom proizvodi zvuk akrilatnog cementa, predlaže se aplikacija metilmetakrilata, ali ako lokalizacija zahteva može se upotrebiti i koštani graft, naravno uz povećani rizik od pojave rest/recidiva,
4. ako je potencijalni rizik od pojave lokalnog resta visok ili su tumorom ugroženi vitalni elementi (neurovaskularne strukture) predlaže se primarna en-bloc resekcija.

1.6.2.b Blok resekcija

Blok resekcija tumorom zahvaćenog segmenta je indicovana:

1. kada tumor široko destruiše kost
2. u slučaju patološke frakture
3. u slučajevima zahvaćenog segmenta koji je trajno afunkcionalan (proksimalna fibula, distalna ulna ...)

U većini slučajeva resekcija se primenjuje kod tumora kliničkog gradusa 2. i 3.

Radioterapija se i danas pominje u savremenoj literaturi, ali samo u okviru postoperativnog tretmana GCT, teško dostupnih regija: kičmeni stub, sakrum i karlica, ali samo u situaciji kompletne makroskopske eliminacije tumora, zbog moguće pojave sekundarnog osteosarkoma. U slučaju mikroskopskih ostataka tumora (marginalna resekcija), taj rizik je minimalan. [8,9]

1.6.2.c Lečenje recidiva

Bez obzira na stepen primarne lezije recidiv GCT je neophodno tretirati pažljivo, i dijagnostikovati na vreme i sa visokim stepenom sigurnosti.

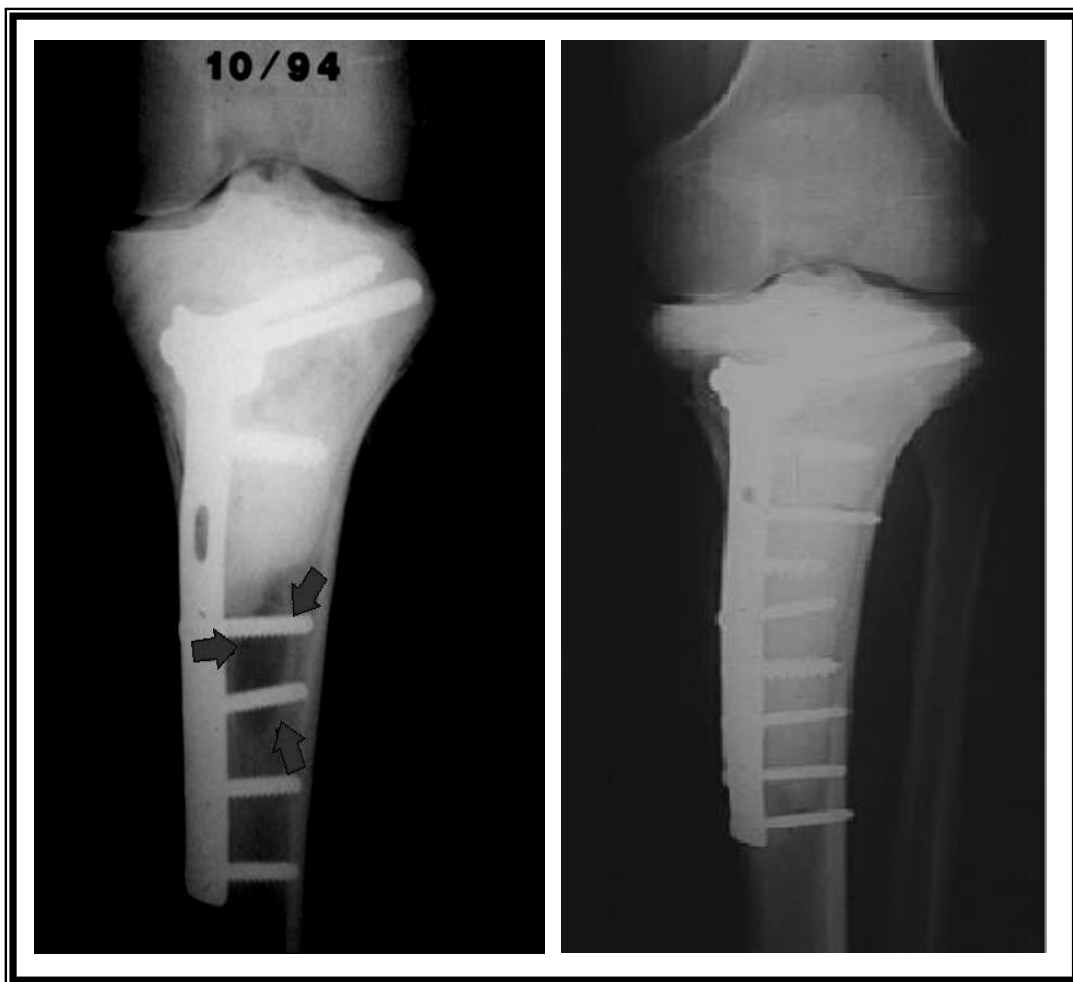
Dijagnostikovanje recidiva (RTG, CT, NMR) je u mnogome olakšano primenom MMA, ali ako se ne koristi cement nego graft najsigurnija metoda je NMR (iako postoji mogućnost lažnog rezultata).

Ako se ponovna pojava tumora dijagnostikuje u periodu dve godine od operacije u pitanju je ostatak tumora “rest”, a ako se dijagnostikuje posle tog perioda pojava se tumači kao “recidiv”. [52,57]

Dijagnostikovani recidiv ili rest tumor se tretira izolovano i ukoliko je to moguće istom tehnikom kojom je učinjena primarna operacija.

Ako se rest/recidiv ipak ne dijagnostikuje na vreme, bolest napreduje tako da sužava mogućnosti adekvatne onkološke lokalne kontrole bolesti i mogućnost rekonstruktivne hirurgije,

pa je neophodno primeniti adekvatnu tehniku resekcije i naravno rekonstrukcije, od osteoplastike, masivnim graftovima, do implantacije endoproteze. [59,64]



Slika 21. Recidiv GCT (desno) i postoperativni snimak posle reintervencije (levo)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrđivanje korelacije ekspresije Ki-67, p53 i Ciklin D1 u tkivu gigantocelularnog tumora kosti sa biološkim ponašanjem ovog tumora (pojavom rest-recidiva ili pojavom plućnih metastaza).
2. Utvrđivanje korelacije ekspresije Ki-67, p53 i Ciklin D1 u tkivu gigantocelularnog tumora kosti sa kliničko-patološkim prognostičkim parametrima (klinička GTM, Enneking-ova klasifikacija).

3. METODOLOGIJA

3.1. Vreme i mesto istraživanja

Studija preseka u koju je uključeno 164 pacijenata kojima je u periodu od 1964-2008. god. na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu dijagnostikovani gigantocelularni tumor kosti, a koji su operisani na Institutu za Ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“.

3.2. Ispitanici – jedinice posmatranja

Ispitanici, odnosno jedinice posmatranja u ovoj studiji predstavljaju pacijenti kojima je u periodu od 1964. godine do 2008. godine dijagnostifikovan *gigantocelularni* tumor kosti, a koji su operisani na Institutu za Ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“, sa minimalnim kliničkim praćenjem, a u cilju određivanja biološkog ponašanja tumora, od 3 godine.

Kriterijumi za uključnje u studiju bili su: patohistološki verifikovan gigantocelularni tumor kosti, na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Kriterijumi za isključenje iz studije bili su: nekompletnost podataka preuzetih iz Istorije Bolesti IOHB "Banjica", period praćenja kraći od 3 godine.

U navedenom periodu na Medicinskom fakultetu i Institutu "Banjica" ukupno je registrovano 217 pacijenta kojima je dijagnostikovani i lečen gigantocelularni tumor kosti i koji ispunjavaju kriterijume za uključnje u studiju, ali od tog broja 53 pacijenta su imale nekompletne podatke pa je ukupan broj pacijenata sveden na 164.

3.3. Klinička metodologija

Po dolasku na Institut, pacijentima je uzeta detaljna anamneza sa akcentom na početak i tok bolesti. Nakon fizikalnog pregleda urađene su osnovne laboratorijske analize (biohemija, krvna slika) i urađena radiografija kosti. Nakon identifikovanja lokacije potencijalnog patološkog procesa urađena je biopsija. Biopsija ili operativna dijagnostika predstavlja krunu dijagnostičke procedure. Pravila biopsiranja postavljena su razvojem onkološke ortopedije. Osim "klasične" incizione biopsije, moguće je primeniti i punkcionu, koja je u patohistološkoj analizi nepouzdana iako ima svoje prednosti, najviše u okviru racionalizovanja biopsijske trase.

3.3.1. Incizionna biopsija

Incizionna biopsija rađena je u operacionoj sali, uz adekvatnu anesteziju. Biopićka trasa je planirana prema mogućoj sledećoj intervenciji, koja mođe biti i završna, uklopljena u buduću kožnu inciziju tako da nam omogućava ukljućenje hirurške biopsijske trase u resecirani segment, bez obzira na dobijeni rezultat učinjenje hirurške procedure, zato što je cilj, uvek što šira resekcija, uz što kraću kožnu inciziju, ali dovoljno komotnu za rad. [35]

Dalji pristup kroz slojeve tkiva bazira se na 3D projekciji levka, svaka sledeća incizija je kraća, sva do kosti ili tumorskog tkiva koje je probilo kompartman. Uzorak tkiva mora biti reprezentativan, što znaći odabrati deo viabilnog tumorskog tkiva, i ako je moguće koštani prelaz ka ne zahvaćenom segmentu. Naravno, posebnu pažnju je neophodno obratiti na hemostazu. Ako je potrebno aplikovati i dren, ali tako da se uklopi u "Biopićku trasu". Dobijeni uzorak tkiva je adekvatno uskladišten i što pre prosleđen do nadležnog patologa koji je i deo tima. Adekvatno uskladišten materijal podrazumeva smaštanje u veću posudu, širokog otvora, sa deset puta većom kolićinom formalina koji se smatra za gotovo idealan fiksativ.

Sve do sada navedeno obezbeđuje adekvatno planiranje definitivne hirurške procedure, a odstupanje mođe uzrokovati ne premostive prepreke u obezbeđivanju potpune lokalne kontrole bolesti.

Histopatološkal dijagnoza je postavljena u skladu sa Klasifikacijom tumora mekih tkiva i kostiju SZO iz 2013 godine kao i određivanje histoloških tipova. [14]

3.3.2. Mikroskopska analiza

Na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu je na nakon patohistološke dijagnostike na reprezentativnim parafinskim kalupima učinjena imunohistohemijski analizirana ekspresija sledećih markera: Ki-67 proliferativni faktor, p53 tumor supresorski protein i Ciklin D1 regulatorni protein ćelijskog ciklusa i athezionog molekula β -catenina.

Imunohistohemijska tehnika, podrazumeva primenu streptavidin-biotin metode korišćenjem L-SAB + kita, uz primenu diaminobenzidina kao hromogena i Majerovog hematoksilina za kontrastiranje. Za pozitivnu spoljašnju kontrolu korišćena su sledeća tkiva: Ki-67 u Burkit limfomu, p53 u karcinomu dojke i Ciklin D1 u tkivu tonzile, β -catenina tkivo dezmoida za nuklearno bojenje i tkivo rabdomiosarkoma za citoplazmatsko bojenje.

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 preseci su preneti 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 (biotinilizovano 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. odлити 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. prelitati svežim puferom.

FAZA IV (supstrat hromogen):

1. odлити 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:

Ki67 (DAKO, klon MIB1,), 1:50,

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

p53 (, clone DO7, Denmark), 1:100

β -catenina (Abcam, USA), 1:100

Ekspresija svih navedenih markera je jedarna i određivana je semikvantitativno optičkom mikroskopijom na mikroskopu, Olympus BX50F4, uvećanjem 200. Na svakom uzorku su analizirana izabrana polja sa najvećom imunopozitivnošću. Dobijeni rezultati su semikvantitativno klasifikovani u 4 kategorije koje su određene arbitražno, na osnovu literaturnih podataka.

I negativno (0): 0-5% pozitivnih tumorskih ćelija

II laka pozitivnost (1+): 6-20% pozitivnih tumorskih ćelija

III umerena pozitivnost (2+): 21-50% pozitivnih tumorskih ćelija

IV jaka pozitivnost (3 +): više od 50% pozitivnih tumorskih ćelija

Indeks obeležavanja je rađen na digitalnim fotografijama snimljenim Olympus DP70 kamerom, 12 MPixela uz pomoć mrežice, metodom manuelnog brojanja- određivanje broja pozitivnih ćelija, prema ukupnom broju ćelija, ne manjem od 500.

Nakon sprovedene optimalne terapije klinički je praćen tok bolesti (minimalni period praćenja 3 godine) u smislu nastanka recidiva i pojave „metastaza “. Na osnovu ovih parametara svi tumori su klasifikovani kao:

1. tumori bez nastanka recidiva
2. tumori sa pojavom recidiva
3. tumori sa pojavom „metastaza “

Svi pacijenti koji su imali metastaze imali su i klinički verifikovan recidiv.

Sve varijable su svrstane u sledeća kategorije.

Sociodemografske varijable u ovoj studiji su:

- starost
- pol

Varijable koje se odnose na tok bolesti i dijagnostiku su:

- trajanje tegoba u mesecima
- bol i otok
- lokalizacija tumora
- lokalizacija na dugim kostima
- PH nalaz

Varijable koje se odnose na tok lečenja:

- prva, druga i treća operacija
- broj intervencija

Varijable koje se odnose na nalaz patohistologije (imunohistohemiju)

- beta katenin u džinovskim ćelijama
- beta katetin u stromalnim ćelijama
- p53
- Ki67
- ciklin D1 u džinovskim ćelijama

Varijable koje se odnose na recidiv:

- prisustvo recidiva
- vreme do recidiva
- PH nalaz recidiva

Varijable koje se odnose na komplikacije:

- komplikacije
- infekcija
- pseudoartritis

- resorpcija grafta
- ankiloza
- ograničenje pokretljivosti
- destabilizacija
- metastaze u plućima
- paraliza nerva
- patološka fraktura

3.4. Statistička metodologija

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su:

- Apsolutni i relativni brojevi
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije)

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

Testovi za ispitivanje značajnosti razlike koji su korišćeni u ovoj studiji su:

- Parametarski: t test
- Neparametarski: Hi-kvadrat test, Hi-kvadrat test za trend, Mann-Whitney U test

Zbog malog broja jedinica posmatranja u određenim analizama korišćena je Monte Karlo simulacija radi dobijanja tačnije vrednosti.

Za ispitivanje povezanosti između dve ordinalne varijable korišćena je Spirmanova korelaciona analiza. Analiza preživljavanja obuhvatila je Kaplan-Majerovu krivu sa Log-rank testom. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Nivo značajnosti od 0,05 uzet je kao granični za odbacivanje nulte hipoteze. Svi podaci su obrađeni u SPSS 20,0 (IBM korporacija) softverskom paketu.

4. REZULTATI

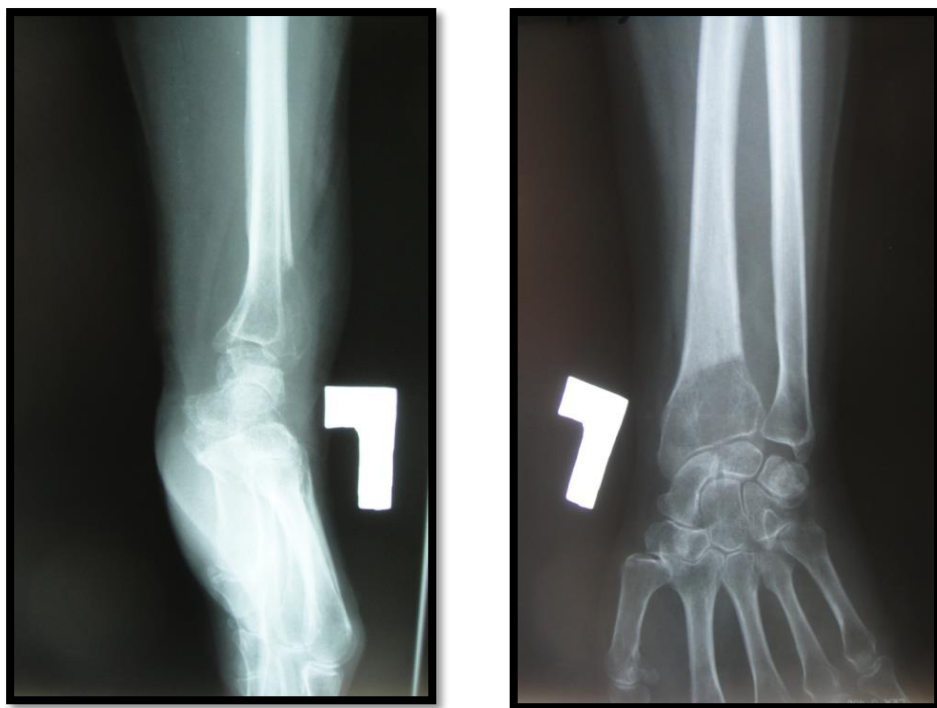
4.1. Osnovne karakteristike

U studiju je uključeno ukupno 164 pacijenta sa gigantocelularnim tumorom kosti (GCTB). Deskriptivna statistika ispitivanog uzorka (osnovne karakteristike pacijenata sa kliničkom slikom) prikazana je u tabeli 3.

Tabela 3. Osnovne karakteristike pacijenata sa kliničkom slikom.

		N	%
Pol	muški	76	46.3%
	ženski	88	53.7%
Starost (godine)		30.8±13.2; 28 (5-64)	
Trajanje tegoba (meseći)		6.2±6.3; 4 (1-38)	
Bol	ne	20	12.4%
	da	141	87.6%
Otok	ne	28	17.4%
	da	133	82.6%
Lokalizacija	femur	70	42.7%
	tibija	34	20.7%
	humerus	12	7.3%
	skapula	2	1.2%
	radius	17	10.4%
	ulna	9	5.5%
	karlica	3	1.8%
	kičma	6	3.7%
	stopalo	2	1.2%
	šaka	3	1.8%
	fibula	6	3.7%
Lokalizacija na dugim kostima	proksimalno	58	39.2%
	distalno	90	60.8%

Iz tabele se vidi da se radi o populaciji sa sličnom distribucijom po polu, prosečne starosti oko 30 godina. Većina pacijenata u kliničkoj slici ima bol i otok, sa najčešćom lokalizacijom na femuru, a zatim tibiji i po kriterijumu prox./dist., distalno je lociran na femuru a proksimalno na tibiji. (Slika 22.)



Slika 22. RTG: GCTB distalnog radiusa

Distribucija pacijenata u odnosu na operacije (broj i vrsta hiruruške intervencije) prikazana je u tabeli 4.

Tabela 4. Broj i vrsta hiruruške intervencije

	Prva operacija		Druga operacija		Treća operacija	
	N	%	N	%	N	%
biopsija	71	43.8%	4	3.4%	1	2.6%
kiretaža	71	43.8%	46	39.0%	1	2.6%
resekcija	17	10.5%	36	30.5%	17	44.7%
amputacija	2	1.2%	21	17.8%	14	36.8%
zračenje	0	0.0%	6	5.1%	0	0.0%
odbijanje lečenja	0	0.0%	3	2.5%	1	2.6%
revizija	0	0.0%	2	1.7%	4	10.5%
neoperativno	1	0.6%	0	0.0%	0	0.0%

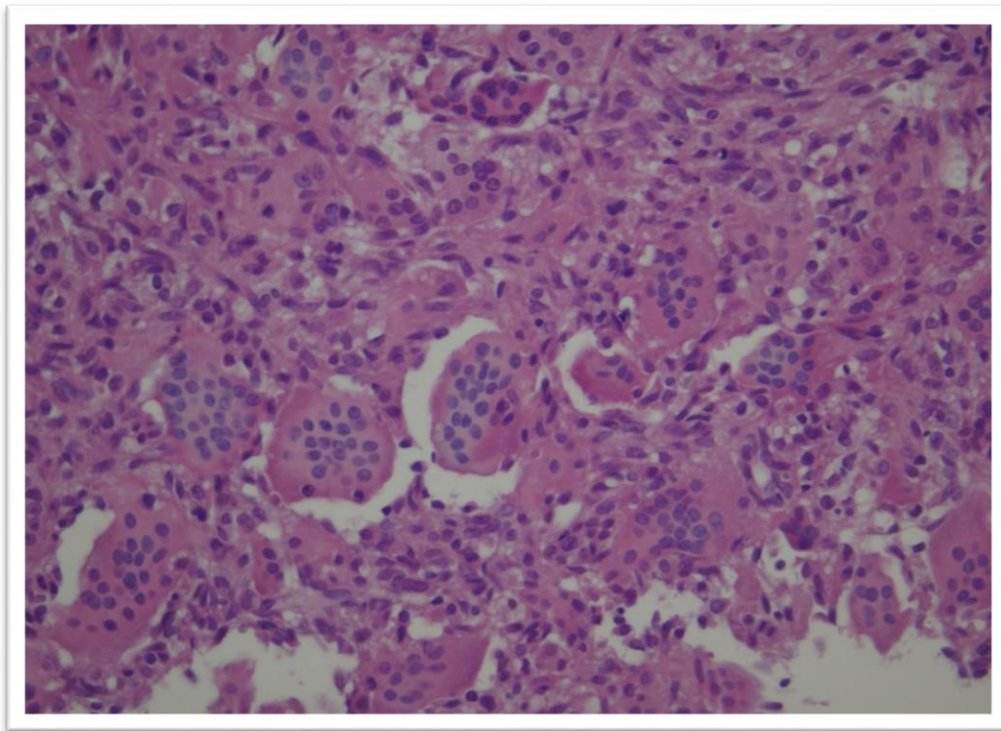
Biopsija, kao izolovana procedura i kiretaža su dominantni zahvati u prvoj operaciji, dok su kiretaža i resekcija u drugoj operaciji, a resekcija i amputacija u trećoj operaciji.

Na osnovu PH nalaza i gradusa tumora, prikazana je distribucija pacijenata (Tabela 5).

Tabela 5. PH nalaz u odnosu na gradus tumora

	PH I		PH II		PH III	
	N	%	N	%	N	%
gradus I	64	39.3%	25	23.1%	4	12.1%
gradus II	83	50.9%	60	55.6%	15	45.5%
gradus III	15	9.2%	16	14.8%	8	24.2%
maligno	1	0.6%	7	6.5%	6	18.2%

Na prvom PH nalazu dominira gradus II, pa gradus I, na drugom PH nalazu takođe je najčešći gradus II, kao I na trećem PH nalazu. (Slika 23.)

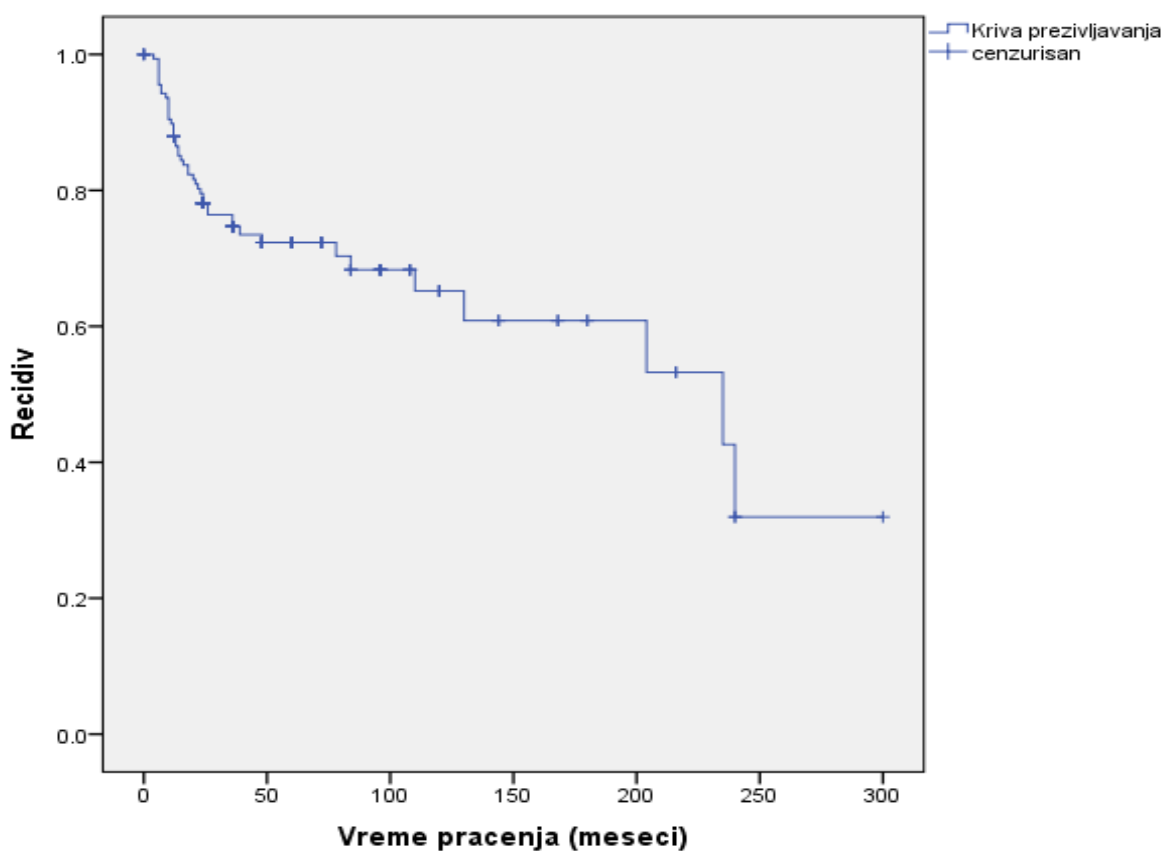


Slika 23. Tipičan patohistološki izgled gigantocelularnog tumora kosti, koji ukazuje na dvokomponentnost u histološkoj građi. (HE, 200x)

Od ukupnog broja pacijenata, jednu intervenciju imalo je 48 pacijenata (28,4%), dve intervencije imalo je 78 pacijenata (48,1%) dok je tri intervencije imalo 38 pacijenata (23,5%). Za dva pacijenta (1,2%) nema podatak o broju intervencija.

Recidiv se javio kod 46 pacijenata (28%), dok kod 118 pacijenata (72%) nije bilo pojave recidiva tokom praćenja.

Vreme praćenja iznosilo je maksimalno 300 meseci. Medijana preživljavanja (pojava recidiva) iznosi 235 meseci (95% interval poverenja 99,7-370,2 meseci). Kriva preživljavanja je grafički prikazana (Grafikon 2.).



Grafikon 2. Prikaz pojave recidiva praćenje u odnosu na vreme

Tokom praćenja pacijentima je beležena pojava komplikacija, kao i vrsta same komplikacije (uključujući i komplikaciju osnovne bolesti). Distribucija pacijenata u odnosu na komplikacije prikazana je u tabeli 6.

Tabela 6. Komplikacije operacije i osnovne bolesti

		N	%
Komplikacije	ne	103	62.8%
	da	61	37.2%
Infekcija	ne	135	82.3%
	da	29	17.7%
Pseudoartroza grafta	ne	163	99.4%
	da	1	0.6%
Resorpcija grafta	ne	163	99.4%
	da	1	0.6%
Ankiloza	ne	161	98.2%
	da	3	1.8%
Ograničenje pokreta	ne	138	84.1%
	da	26	15.9%
Destabilizacija	ne	161	98.2%
	da	3	1.8%
Pareza nerva	ne	152	92.7%
	da	12	7.3%
Metastaze na plućima	ne	161	98.2%
	da	3	1.8%
Patološka fraktura	ne	143	87.2%
	da	21	12.8%

Tabele pokazuje da je trećina pacijenata imala neku komplikaciju operacije, najčešće su to bile infekcije i ograničenje pokreta.

Na osnovu PH nalaza utvrđeno je da je kod 155 pacijenata (94.5%) tumor bio benigni, 7 pacijenata (4,3%) imalo je maligni tumor, dok je multicentrični bio kod 2 pacijenta (1,2%).

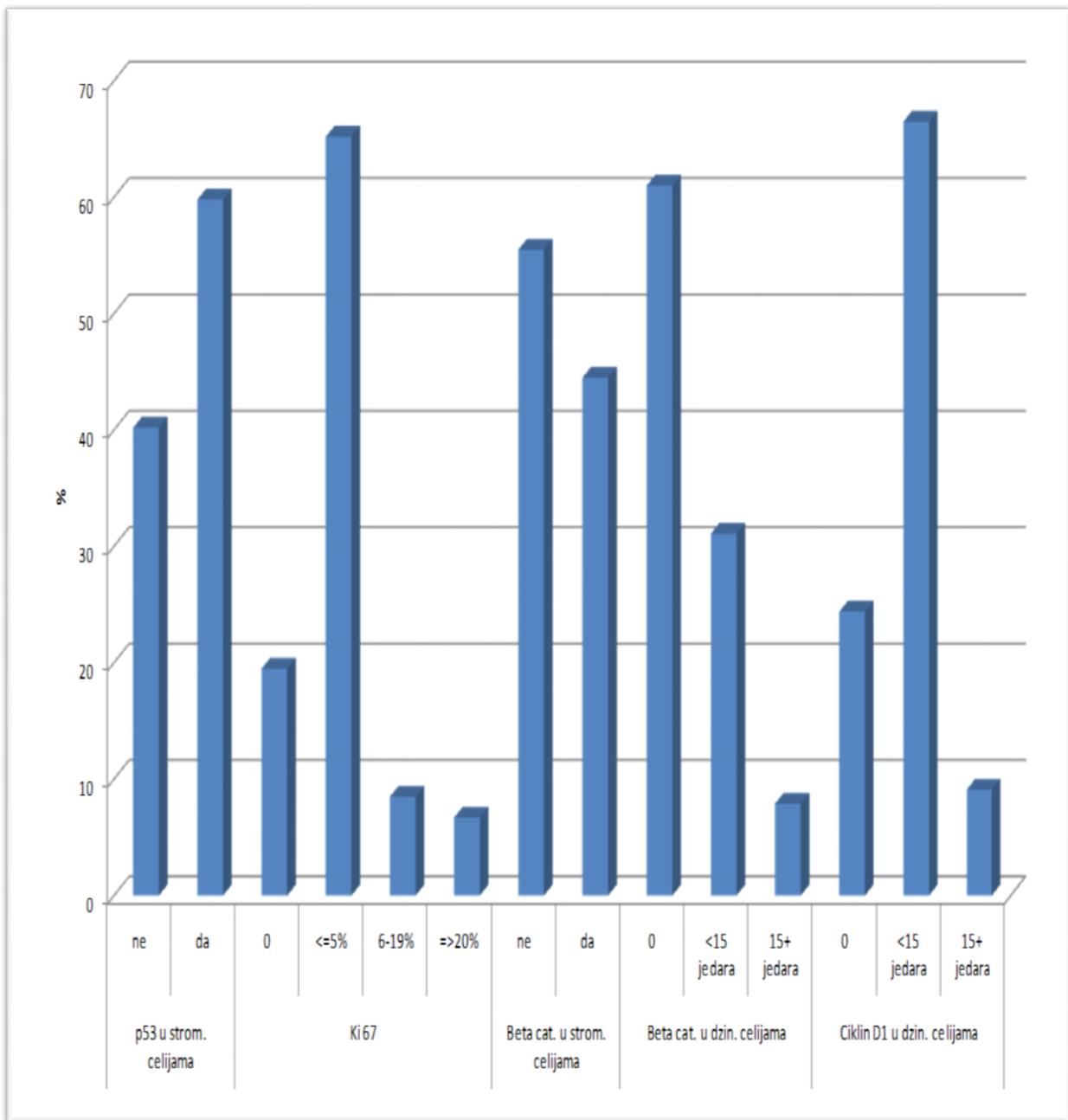
Distribucija pacijenata u odnosu na faktore proliferacije i proteina regulacije prikazana je u tabeli 7.

Tabela 7. Faktori proliferacije i proteina regulacije ćelijskog ciklusa.

		N	%
p53 u stromalnim ćelijama	ne	66	40.2%
	da	98	59.8%
Ki 67	0	32	19.5%
	<=5%	107	65.2%
	6-19%	14	8.5%
β-catenin u stromalnim ćelijama	=>20%	11	6.7%
	ne	91	55.5%
β-catenin u džinovskim ćelijama	da	73	44.5%
	0	100	61.0%
	<15 jedara	51	31.1%
Ciklin D1 u džinovskim ćelijama	15+ jedara	13	7.9%
	0	40	24.4%
	<15 jedara	109	66.5%
	15+ jedara	15	9.1%

Kada su u pitanju faktori proliferacije i protein regulacije, evidentno je da je samo on β-katenin u stromalnim ćelijama dihotomnog karaktera. Ali, ako uporedimo negativne nalaze ostala tri parametra iz tabele (0 procenata, jedara), evidentno je da je β-katenin u džinovskim ćelijama najčešći negativan nalaz, a zatim i β-katenin u stromalnim ćelijama. Ciklin D1 i Ki 67 imaju dominantnu prvu pozitivnu kategoriju pozitivnih nalaza (<=5%, <15 jedara).

U daljim analizama, prikazane su karakteristike ispitivanog uzorka u odnosu na kategorije faktora proliferacije i proteine regulacije ćelijskog ciklusa.



Grafikon 3. Pozitivnost faktora proliferacije i protein regulacije u odnosu na stromalne i džinovske ćelije

4.2. Analiza imunohistohemijske ekspresije P53

Distribucija osnovnih karakteristika pacijenata u odnosu na P53 prikazana je u tabeli 8.

Tabela 8. P53 u odnosu na osnovne karakteristike pacijenata

		p53 u stromalnim ćelijama				Rezultat testiranja
		ne		da		
		N	%	N	%	
Pol	muški	30	45.5%	46	46.9%	X ² =0.035 p=0.852
	ženski	36	54.5%	52	53.1%	
Starost		31.2±13.3		30.5±13.2		t=-0.311 p=0.756
Trajanje tegoba		3.3±5.7; 5 (1-36)		6.1±6.6; 4 (1-38)		Z=-0.199 p=0.842
Bol	ne	10	15.6%	10	10.3%	X ² =1.002 p=0.572
	da	54	84.4%	87	89.7%	
Otok	ne	7	10.9%	21	21.6%	X ² =3.080 p=0.079
	da	57	89.1%	76	78.4%	
Lokalizacija	femur	29	43.9%	41	41.8%	X ² =16.738 p=0.061 (0.055-0.67)
	tibija	20	30.3%	14	14.3%	
	humerus	4	6.1%	8	8.2%	
	skapula	0	0.0%	2	2.0%	
	radius	3	4.5%	14	14.3%	
	ulna	4	6.1%	5	5.1%	
	karlica	1	1.5%	2	2.0%	
	kičma	1	1.5%	5	5.1%	
	stopalo	0	0.0%	2	2.0%	
	šaka	0	0.0%	3	3.1%	
Lokalizacija na dugim kostima	fibula	4	6.1%	2	2.0%	X ² =1.774 p=0.183
	proksimalno	29	45.3%	29	34.5%	
	distalno	35	54.7%	55	65.5%	

Tabela ukazuje da nema statistički značajnih razlika između pacijenata sa i bez ekspresije p53 u stromalnim ćelijama. Jedino je otok nešto učestaliji kod onih koji nemaju ekspresiju a evidentna je razlika i kod lokalizacije, koja je na granici konvencionalnog nivoa značajnosti (za ovu analizu korišćena je Monte Carlo simulacija zbog velikog broja kategorija a malog broja pacijenata).

4.3. Vrsta operacije u odnosu na p53 (prva, druga, treća)

Pacijenti su u odnosu na pozitivnost p53 u stromalnim ćelijama podeljeni u dve grupe i distribucije pacijenata u odnosu na PH nalaz za sve tri operacije pojedinačno prikazana je u tabeli 9.

Tabela 9. Pozitivnost p53 u odnosu na PH nalaz za svaku operaciju posebno

		p53 u stromalnim ćelijama				Rezultati testiranja
		ne		da		
		N	%	N	%	
PH I	gradus I	28	42.4%	36	37.1%	X ² =0.230 p=0.709
	gradus II	32	48.5%	51	52.6%	
	gradus III	5	7.6%	10	10.3%	
	maligno	1	1.5%	0	0.0%	
PH II	gradus I	8	21.6%	17	23.9%	X ² =0.033 p=0.902
	gradus II	22	59.5%	38	53.5%	
	gradus III	5	13.5%	11	15.5%	
	maligno	2	5.4%	5	7.0%	
PH III	gradus I	1	11.1%	3	12.5%	X ² =0.023 p=1.000
	gradus II	5	55.6%	10	41.7%	
	gradus III	1	11.1%	7	29.2%	
	maligno	2	22.2%	4	16.7%	

Tabela ukazuje da nema značajnih razlika, odnosno, distribucije PH nalaza kod onih koji imaju pozitivan p53 u stromalnim ćelijama se ne razlikuju bitno od onih koji nemaju.

Za razliku od PH nalaza, ukupan broj intervencija se značajno razlikovao između pacijenata sa pozitivnim p53 u odnosu na negativne (Tabela 10.).

Tabela 10. Ukupan broj intervencija u odnosu na pozitivnost p53 u stromalnim ćelijama

			Broj intervencija			Ukupno
			1	2	3	
p53 u stromalnim ćelijama	ne	n	26	28	11	65
		%	40.0%	43.1%	16.9%	100.0%
	da	n	20	50	27	97
		%	20.6%	51.5%	27.8%	100.0%
Ukupno		n	46	78	38	162
		%	28.4%	48.1%	23.5%	100.0%

Ova tabela prikazuje da je učestalost pacijenta sa pozitivnim p53 značajno veća kod većeg ukupnog broja intervencija, odnosno postoji trend rasta broja intervencija, dok kod onih koji nemaju pozitivan p53 postoji trend pada ukupnog broja intervencija ($X^2=6,878$; $p=0,009$).

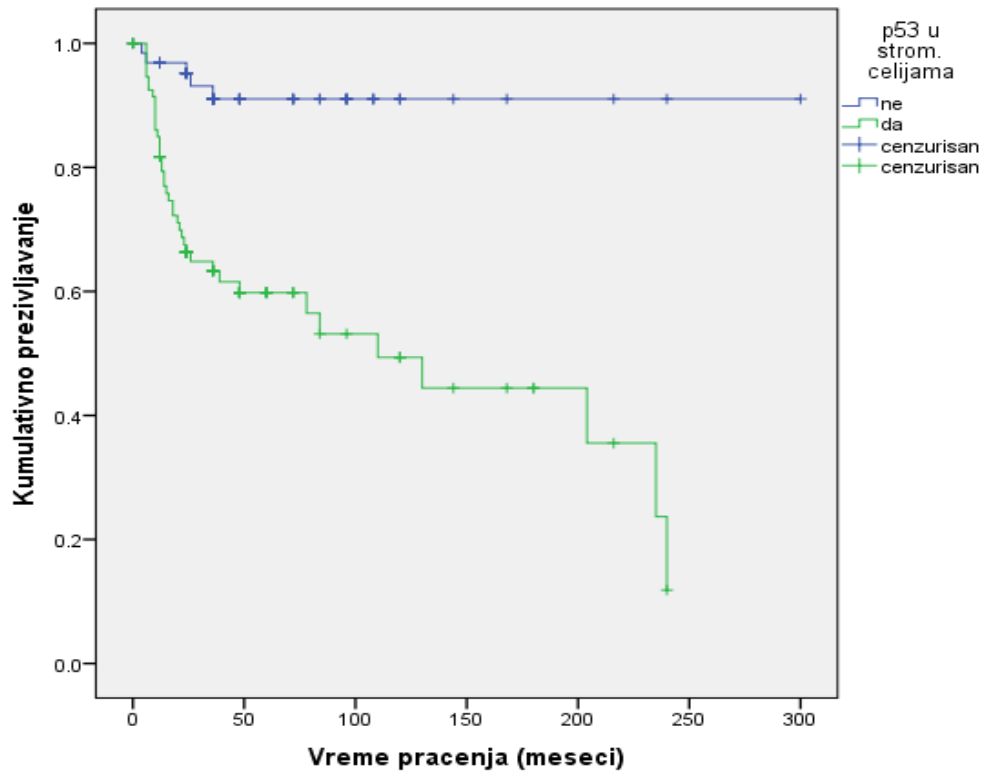
U daljoj analizi ispitivano je pojava recidiva u odnosu na pozitivnost p53 u stromalnim ćelijama. Distribucija pacijenata u odnosu na praćenje i recidiv prikazana je u tabeli 11.

Tabela 11. Recidiv u odnosu na eksponiranost p53

p53 u stromalnim ćelijama	Ukupno N	N recidiva	cenzurisano	
			N	%
ne	65	5	60	92.3%
da	96	41	55	57.3%
Ukupno	161	46	115	71.4%

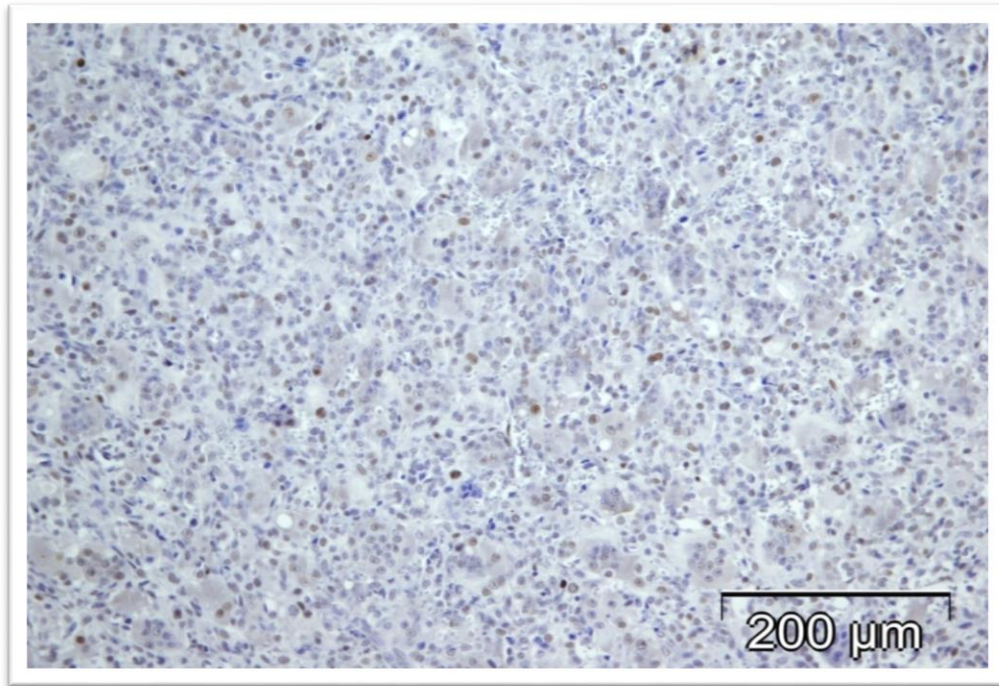
Prosečno preživljavanje (prosečno vreme u mesecima bez pojave recidiva) kod onih koji nisu imali pozitivan p53 iznosilo je 274,9, dok medijanu nije bilo moguće računati jer je više od 50% bez recidiva, dok je u grupi pacijenata sa pozitivnim p53 prosečno preživljavanje 125,5 meseci sa medijanom 110,0 meseci. Analizirajući ove podatke Log Rank testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove dve grupe pacijenata (Log Rank $X^2=21,602$; $p<0,001$). (Slika 24. i 25.)

Kriva preživljavanja je i grafički prikazana (Grafikon 4.).

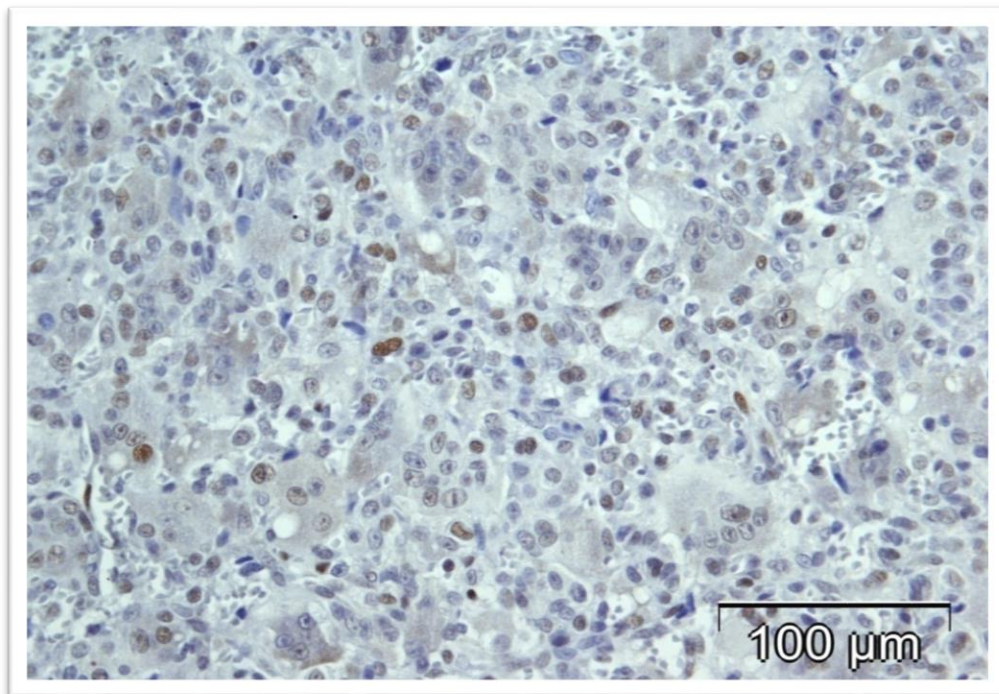


Grafikon 4. Recidiv u odnosu na eksponiranost p53

Iz grafikona se jasno vidi razlika u recidivantnosti između onih koji nemaju i koji imaju pozitivan p53 na stromalnim ćelijama.



Slika 24. Ekspresija p53 u stromalnim ćelijama (p53, 100x)



Slika 25. Nuklearna pozitivnost p53 u stromalnom ćelijama (p53, 200x)

4.4. Patološka fraktura analiza za p53

Pacijentima je analizirana učestalost patoloških fraktura u odnosu na pozitivnost p53 u stromalnim ćelijama i distribucija pacijenata je prikazana u tabeli 12.

Tabela 12. Patološka fraktura u odnosu na p53 u stromalnim ćelijama

		Patološka fraktura		Ukupno	
		ne	da		
p53 u stromalnim ćelijama	ne	N	61	5	66
		%	92.4%	7.6%	100.0%
	da	N	82	16	98
		%	83.7%	16.3%	100.0%
Ukupno		N	143	21	164
		%	87.2%	12.8%	100.0%

Tabela ukazuje da je dva puta veći procenat patoloških fraktura kod pacijenata sa pozitivnim p53 na stromalnim ćelijama, ali statističkom analizom nismo dobili značajnost ove razlike ($X^2=2,705$; $p=0,100$).

4.5. Analiza imunohistohemijske ekspresije Ciklina D1

Distribucija osnovnih karakteristika pacijenata u odnosu na Ciklin D1 prikazana je u tabeli 13.

Tabela 13. Ciklin D1 u odnosu na osnovne kliničke karakteristike pacijenata

		Ciklin D1 u džinovskim ćelijama						Rezultati testiranja
		0		<15 jedara		15+ jedara		
		N	%	N	%	N	%	
Pol	muški	18	45.0%	51	46.8%	7	46.7%	$\chi^2=0.027$ p=0.894
	ženski	22	55.0%	58	53.2%	8	53.3%	
Starost		30.4±14.9		31.3±12.9		28.4±9.9		Rho=0.008 p=0.917
Trajanje tegoba		4.4±3.8; 4 (1-24)		7.0±7.1; 5 (1-38)		4.9±3.3; 4 (1-13)		Rho=0.120 p=0.130
Bol	ne	1	2.6%	16	15.0%	3	20.0%	$\chi^2=4.495$ p=0.059
	da	38	97.4%	91	85.0%	12	80.0%	
Otok	ne	8	20.5%	18	16.8%	2	13.3%	$\chi^2=0.457$ p=0.577
	da	31	79.5%	89	83.2%	13	86.7%	
Lokalizacija	femur	16	40.0%	49	45.0%	5	33.3%	$\chi^2=0.008$ p=0.940
	tibija	11	27.5%	21	19.3%	2	13.3%	
	humerus	1	2.5%	9	8.3%	2	13.3%	
	skapula	1	2.5%	1	0.9%	0	0.0%	
	radius	2	5.0%	13	11.9%	2	13.3%	
	ulna	2	5.0%	5	4.6%	2	13.3%	
	karlica	2	5.0%	1	0.9%	0	0.0%	
	kičma	1	2.5%	5	4.6%	0	0.0%	
	stopalo	0	0.0%	1	0.9%	1	6.7%	
	šaka	1	2.5%	2	1.8%	0	0.0%	
	fibula	3	7.5%	2	1.8%	1	6.7%	
Lokalizacija na dugim kostima	proksimal.	14	40.0%	38	38.4%	6	42.9%	$\chi^2=0.005$ p=1.000
	distalno	21	60.0%	61	61.6%	8	57.1%	

Iz tabele se vidi da nema značajnih razlika, osim kada je u pitanju prisustvo bola, gde je signifikantnost blizu granice konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05 (iznosi 0,059) pa ovu razliku možemo smatrati značajnom ukoliko bi nivo greške povećali za 1%.

4.6. Vrsta operacije u odnosu na Ciklin D1 (prva, druga, treća)

Pacijenti su u odnosu na eksponiranost Ciklina D1 u džinovskim ćelijama podeljeni u tri grupe i distribucija pacijenata u odnosu na PH nalaz za sve tri operacije pojedinačno prikazana je u tabeli 14.

Tabela 14. Pozitivnost Ciklina D1 u odnosu na PH nalaz za svaku operaciju posebno

		Ciklin D1 u džinovskim ćelijama						Rezultati testiranja
		0		<15 jedara		15+ jedara		
		N	%	N	%	N	%	
PH I	gradus I	15	38.5%	42	38.5%	7	46.7%	Rho=-0.010 p=0.900
	gradus II	21	53.8%	56	51.4%	6	40.0%	
	gradus III	2	5.1%	11	10.1%	2	13.3%	
	maligno	1	2.6%	0	0.0%	0	0.0%	
PH II	gradus I	7	25.0%	15	20.3%	3	50.0%	Rho=0.032 p=0.740
	gradus II	18	64.3%	39	52.7%	3	50.0%	
	gradus III	2	7.1%	14	18.9%	0	0.0%	
	maligno	1	3.6%	6	8.1%	0	0.0%	
PH III	gradus I	3	37.5%	1	4.2%	0	0.0%	Rho=0.389 p=0.025
	gradus II	4	50.0%	10	41.7%	1	100.0%	
	gradus III	1	12.5%	7	29.2%	0	0.0%	
	maligno	0	0.0%	6	25.0%	0	0.0%	

Ova tabela pokazuje da postoji statistički značajna povezanost gradusa u trećoj operaciji i pozitivnosti Ciklina D1 u džinovskim ćelijama. Korelacija je solidna, pozitivnog je smera (što je veći gradus, veća je i eksponiranost i obrnuto) i statistički je značajna.

Distribucija pacijenata u odnosu na ukupan broj intervencija prema kategorijama Ciklina D1 prikazana je u tabeli 15.

Tabela 15. Ukupan broj intervencija u odnosu na Ciklin D1 u džinovskim ćelijama

			Broj intervencija			Ukupno
			1	2	3	
Ciklin D1 u džinovskim ćelijama	0	n	10	21	8	39
		%	25.6%	53.8%	20.5%	100.0%
	<15 jedara	n	28	53	27	108
		%	25.9%	49.1%	25.0%	100.0%
	15+ jedara	n	8	4	3	15
		%	53.3%	26.7%	20.0%	100.0%
Ukupno	n	46	78	38	162	
	%	28.4%	48.1%	23.5%	100.0%	

Nema statistički značajne korelacije između ispitivanih grupa i broja intervencija ($Rho=0,059; 0,453$), mada je evidentno da je distribucija pacijenata nešto drugačija kada je u pitanju grupa sa 15+ jedara u odnosu na druge dve.

U daljoj analizi ispitivano je preživljavanje (pojava recidiva) u odnosu na pozitivnost Ciklina D1 u džinovskim ćelijama. Distribucija pacijenata u odnosu na praćenje i recidiv prikazana je u tabeli 16.

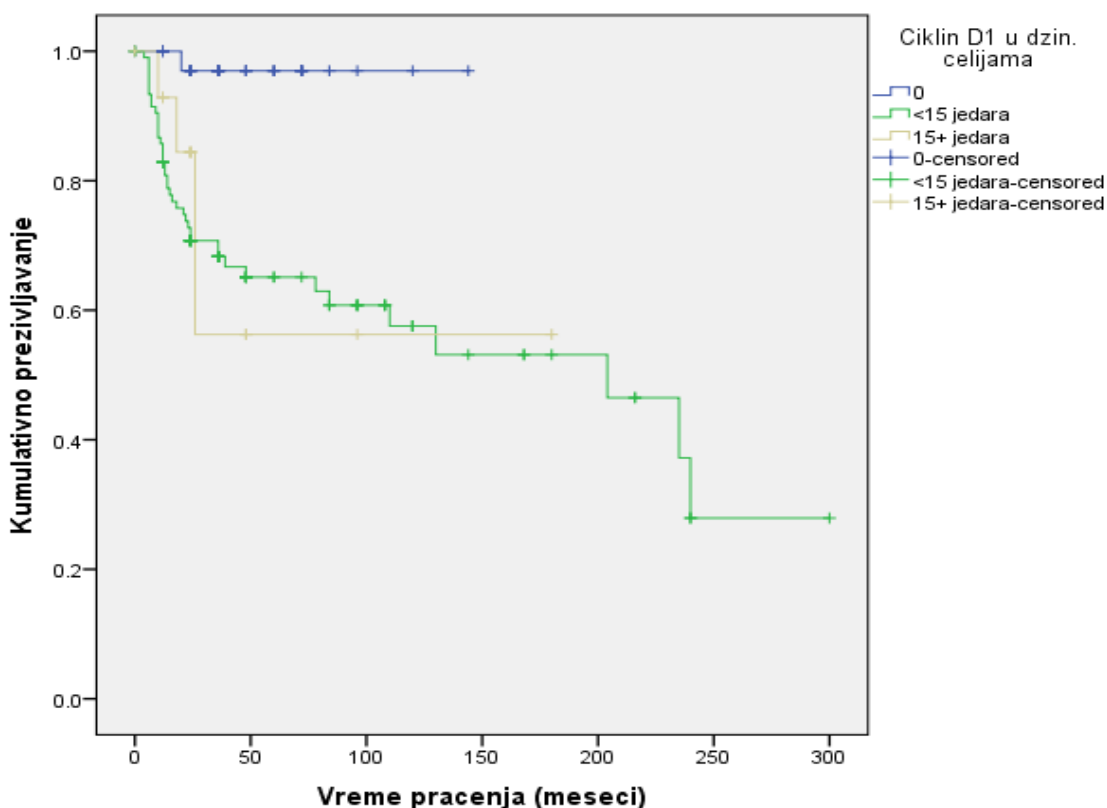
Tabela 16. Recidiv u odnosu na pozitivnost ciklina D1 u džinovskim ćelijama

Ciklin D1 u džinovskim ćelijama	Ukupno N	N recidiva	cenzurisano	
			N	%
0	39	1	38	97.4%
<15 jedara	107	41	66	61.7%
15+ jedara	15	4	11	73.3%
Overall	161	46	115	71.4%

Prosečno preživljavanje (prosečno vreme u mesecima bez pojave recidiva) kod onih koji nisu imali pozitivan Ciklin D1 iznosilo je 140,2, dok medijanu nije bilo moguće računati jer je više od 50% bez recidiva, dok je u grupi pacijenata sa pozitivnim Ciklinom D1 do 15 jedara prosečno preživljavanje 160,1 meseci sa medijanom 204,0 meseca, prosečno preživljavanje onih koji su imali 15 i više jedara iznosi 110,84, a medijana nije mogla da se izračuna. Analizirajući ove podatke Log Rank testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove tri grupe pacijenata ($X^2=12,234$; $p=0,002$). (Slika 26. i 27.)

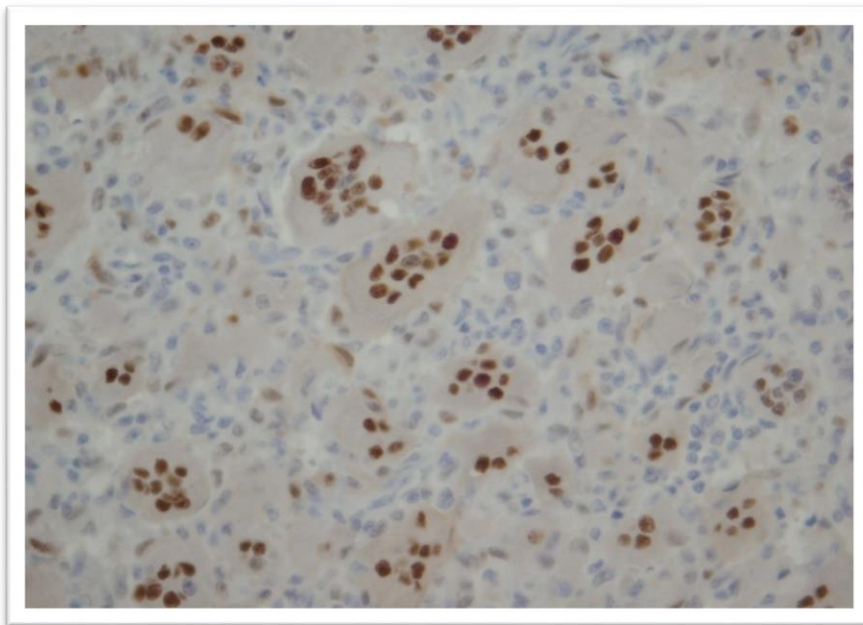
Naknadnim poređenjem utvrđeno je da je razlika značajna između 0 i <15 ($X^2=12,157$; $p<0,001$), 0 i 15+ ($X^2=9,626$; $p=0,002$) dok razlika između <15 i 15+ nije statistički značajna ($X^2=0,111$; $p=0,739$).

Kriva preživljavanja je i grafički prikazana (Grafikon 5.).

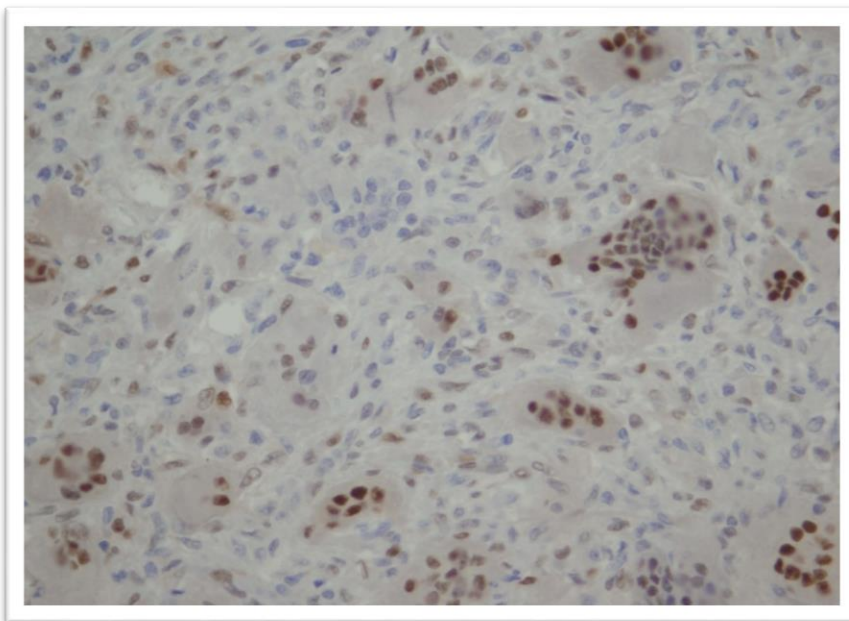


Grafikon 5. Recidivantnost u odnosu na Ciklin D1

Ovaj grafički prikaz pokazuje, sličnost između pacijenata sa Ciklin D1 do 15 jedara i 15 i više jedara, ali je takođe evidentna razlika u recidivantnosti ove dve grupe u odnosu na pacijente koji nisu imali pozitivnost Ciklina D1 u džinovskim ćelijama.



Slika 26. Ekspresija Ciklina D1 u džinovskim ćelijama (Cikli



Slika 27. Nuklearna pozitivnost Ciklina D1 je različita u džinovskim ćelijama koje imaju do 15 i više od 15 jedara (Ciklin D1, 400x)

4.7. Patološka fraktura analiza za Ciklin D1

Analogno P53 analizirana je i distribucija pacijenata po pozitivnosti Ciklina D1 u odnosu na patološku frakturu (Tabela 17.).

Tabela 17. Ciklin D1 u odnosu na patološku frakturu

			Patološka fraktura		Ukupno
			ne	da	
	0	N	37	3	40
		%	92.5%	7.5%	100.0%
Ciklin D1 u džinovskim ćelijama	<15	N	91	18	109
	jedara	%	83.5%	16.5%	100.0%
	15+	N	15	0	15
	jedara	%	100.0%	0.0%	100.0%
Ukupno		N	143	21	164
		%	87.2%	12.8%	100.0%

U tabeli se jasno vidi da je najveća učestalost patoloških fraktura kod pacijenata sa manje od 15 jedara, a najmanja u kategoriji 15 i više jedara. Ipak, razlika nije statistički značajna ($X^2=0,007$; $p=0,933$).

4.8. Analiza imunohistohemijske ekspresije Ki67

Ki 67 kao proliferativni faktor, analiziran je u odnosu na iste osnovne parametre kao i P53 i Ciklin D1.

Distribucija pacijenata u odnosu na eksponiranost Ki67 prema osnovnim karakteristikama pacijenata prikazana je u tabeli 18.

Tabela 18. Ki 67 u odnosu na osnovne karakteristike pacijenata

		Ki 67								Rezultati testiranja
		0		<=5%		6-19%		=>20%		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Pol	muški	14	43.8%	52	48.6%	4	28.6%	6	54.5%	X ² =0.001 p=1,000
	ženski	18	56.2%	55	51.4%	10	71.4%	5	45.5%	
Starost		28.5±12.7		32.7±13.2		23.5±9.1		27.8±14.5		Rho=- 0,048 p=0,549
Trajanje tegoba		5.4±6.2; 4 (1-36)		5.9±5.7; 4 (1-38)		11.5±9.0; 9.5 (1-26)		4.4±4.1; 4 (1- 15)		Rho=0,071 p=0,368
Bol	ne	3	9.7%	14	13.3%	3	21.4%	0	0.0%	X ² =0.040 p=0.870
	da	28	90.3%	91	86.7%	11	78.6%	11	100.0%	
Otok	ne	7	22.6%	14	13.3%	3	21.4%	4	36.4%	X ² =0.763 p=0.396
	da	24	77.4%	91	86.7%	11	78.6%	7	63.6%	
Lokalizacija	femur	13	40.6%	46	43.0%	8	57.1%	3	27.3%	X ² =0.380 p=0.552
	tibija	3	9.4%	27	25.2%	1	7.1%	3	27.3%	
	humerus	2	6.2%	8	7.5%	1	7.1%	1	9.1%	
	skapula	1	3.1%	0	0.0%	1	7.1%	0	0.0%	
	radius	3	9.4%	12	11.2%	1	7.1%	1	9.1%	
	ulna	2	6.2%	7	6.5%	0	0.0%	0	0.0%	
	karlica	2	6.2%	1	0.9%	0	0.0%	0	0.0%	
	kičma	1	3.1%	3	2.8%	0	0.0%	2	18.2%	
	stopalo	1	3.1%	0	0.0%	0	0.0%	1	9.1%	
	šaka	1	3.1%	0	0.0%	2	14.3%	0	0.0%	
Lokalizacija na dugim kostima	proksimalno	11	42.3%	38	36.9%	4	36.4%	5	62.5%	X ² =0.411 p=0.544
	distalno	15	57.7%	65	63.1%	7	63.6%	3	37.5%	

Tabela prikazuje da nema značajnih razlika između Ki67 kategorija u odnosu na osnovne karakteristike pacijenata.

U daljoj analizi ispitivana je povezanost PH nalaza na svakoj operaciji posebno u odnosu na kategorije Ki67 (pozitivnost).

Tabela 19. Ki 67 u odnosu na PH nalaz vezan za svaku operaciju posebno

		Ki 67								Rezultati testiranja
		0		<=5%		6-19%		=>20%		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
PH I	gradus I	13	41.9%	40	37.4%	6	42.9%	5	45.5%	Rho=0,026 p=0,739
	gradus II	15	48.4%	59	55.1%	5	35.7%	4	36.4%	
	gradus III	3	9.7%	8	7.5%	3	21.4%	1	9.1%	
	maligno	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	1	9.1%	
PH II	gradus I	8	40.0%	13	16.9%	3	50.0%	1	20.0%	Rho=0,131 p=0,177
	gradus II	8	40.0%	50	64.9%	1	16.7%	1	20.0%	
	gradus III	3	15.0%	9	11.7%	2	33.3%	2	40.0%	
	maligno	1	5.0%	5	6.5%	0	0.0%	1	20.0%	
PH III	gradus I	1	20.0%	2	8.3%	1	33.3%	0	0.0%	Rho=0,162 p=0,369
	gradus II	2	40.0%	13	54.2%	0	0.0%	0	0.0%	
	gradus III	2	40.0%	4	16.7%	2	66.7%	0	0.0%	
	maligno	0	0.0%	5	20.8%	0	0.0%	1	100.0%	

Tabela prikazuje da nema statistički značajnih korelacija između nivoa eksponiranosti Ki 67 i gradusa po svakoj intervenciji posebno.

U odnosu na broj intervencija, distribucija pacijenata prema pozitivnosti Ki67 je prikazana u tabeli 20.

Tabela 20. Ki 67 u odnosu na ukupan broj intervencija

		Broj intervencija			Ukupno
		1	2	3	
0	N	8	18	5	31
	%	25.8%	58.1%	16.1%	100.0%
<=5%	N	27	51	28	106
	%	25.5%	48.1%	26.4%	100.0%
Ki 67 6-19%	N	6	5	3	14
	%	42.9%	35.7%	21.4%	100.0%
=>20%	N	5	4	2	11
	%	45.5%	36.4%	18.2%	100.0%
Ukupno	N	46	78	38	162
	%	28.4%	48.1%	23.5%	100.0%

Tabela 20. pokazuje da ne postoji trend povećanja broja intervencija u odnosu na Ki 67 kategorije. Nema statistički značajne korelacija između grupa po broju intervencija ($Rho=-0,050$; $p=0,528$).

Preživljavanje, odnosno recidivantnost je ispitivana pomoću Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja i Log Rank testa. U tabeli 21. prikazana je distribucija pacijenata u odnosu na recidivantnost prema Ki 67 kategorijama.

Tabela 21. Ki 67 u odnosu na recidivantnost

Ki 67	Ukupno N	N recidiva	cenzurisano	
			N	%
0	30	3	27	90.0%
<=5%	106	34	72	67.9%
6-19%	14	6	8	57.1%
=>20%	11	3	8	72.7%
Ukupno	161	46	115	71.4%

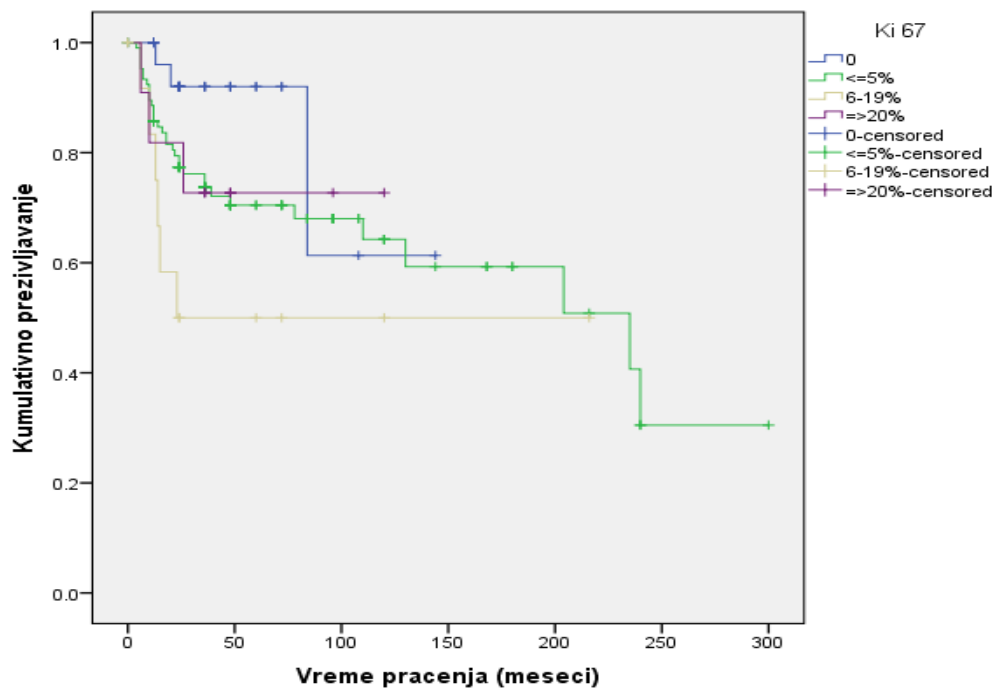
Prosečno preživljavanje i medijana preživljavanja prikazani su u tabeli 22.

Tabela 22. Aritmetička sredina i medijana recidivantnost po Ki 67 ekspoziciji

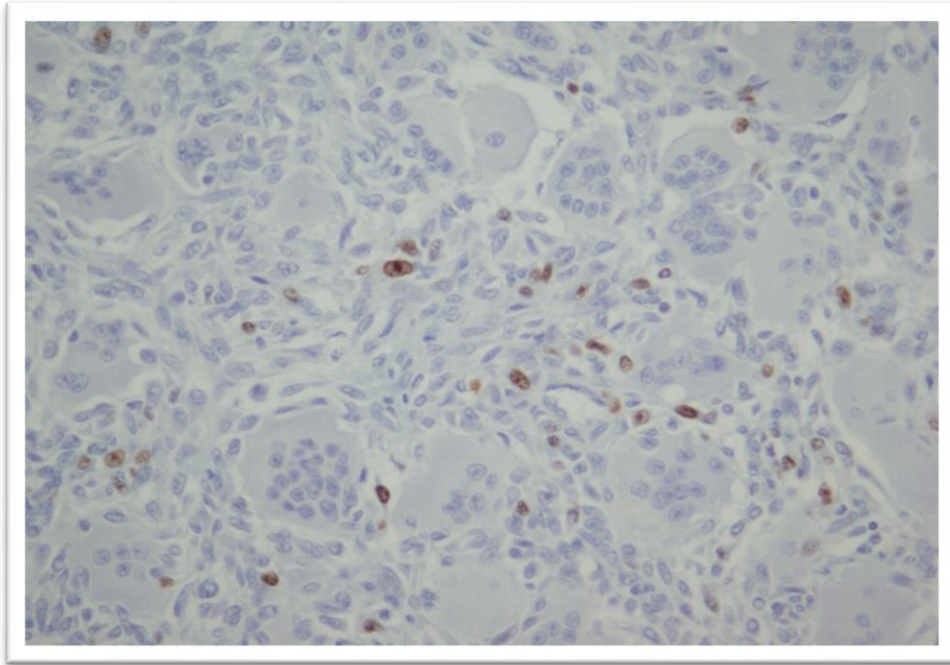
Ki 67	Prosek	Median
0	115.400	.
<=5%	175.005	235.000
6-19%	114.750	23.000
=>20%	91.091	.
Ukupno	179.164	235.000

Analizirajući sve četiri grupe zajedno utvrđeno je da razlika između grupa nije statistički značajna (Log Rank $X^2=6,039$; $p=0,110$). Međutim zbog malog broja pacijenata u određenim kategorijama urađena su naknadna poređenja i kada se uradi testiranje svake grupe sa svakom, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između grupe 0 i grupe 6-19% ($X^2=6,792$; $p=0,009$). (Slika 28. i 29.)

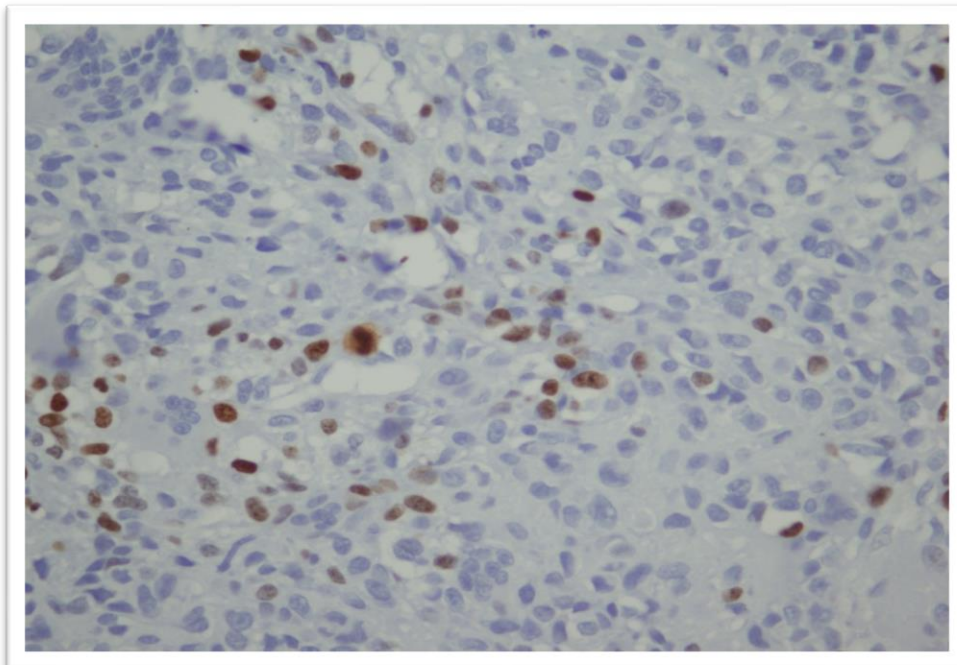
Recidivantnost je i grafički prikazana (Grafikon 5).



Grafikon 6. Recidivantnost u odnosu na Ki-67



Slika 28. Nuklearna pozitivnost Ki67 u stromalnim ćelijama je manja kod tumora koji nisu recidivirali (Ki67, 400x)



Slika 29. Nuklearna pozitivnost Ki67 u stromalnim ćelijama se povećava kod tumora nakon nastanka recidiva (Ki67, 400x).

4.9. Patološka fraktura analiza za Ki67

Distribucija pacijenata u odnosu na patološku frakturu prema Ki 67 kategorijama, prikazana je u tabeli 23.

Tabela 23. Ki 67 kategorije u odnosu na patološku frakturu

		Patološka fraktura		Total
		ne	da	
0	N	28	4	32
	%	87.5%	12.5%	100.0%
<=5%	N	93	14	107
	%	86.9%	13.1%	100.0%
Ki 67 6-19%	N	12	2	14
	%	85.7%	14.3%	100.0%
=>20%	N	10	1	11
	%	90.9%	9.1%	100.0%
Total	N	143	21	164
	%	87.2%	12.8%	100.0%

Iz tabele se vidi da su distribucije pacijenata sa patološkom frakturom vrlo slične, gotovo identične u svakoj od kategorije Ki 67 ($X^2=0,026$; $p=0,872$).

4.10. Analiza imunohistohemijske ekspresije β -katenina

Analogno prethodnim parametrima, urađena je i analiza β -katenina u stromalnim i džinovskim ćelijama.

Distribucija pacijenata u odnosu na osnovne karakteristike prema pozitivnosti β -katenina, prikazana je u tabelama 24. i 25.

Tabela 24. Osnovne karakteristike pacijenata u odnosu na β -katenin u stromalnim ćelijama

		β -katenin u stromalnim ćelijama				Rezultati testiranja
		ne		da		
		N	%	N	%	
Pol	muški	45	49.5%	31	42.5%	$X^2=0.795$ $p=0.373$
	ženski	46	50.5%	42	57.5%	
Starost		29.4 \pm 11.5		32.6 \pm 14.8		t=1.537 p=0.127
Trajanje bolesti		6.4 \pm 6.1; 4 (1-38)		5.9 \pm 6.5; 4 (1-38)		Z=-1.103 p=0.270
Bol	ne	11	12.2%	9	12.7%	$X^2=0.008$ p=0.931
	da	79	87.8%	62	87.3%	
Otok	ne	15	16.7%	13	18.3%	$X^2=0.075$ p=0.785
	da	75	83.3%	58	81.7%	
Lokalizacija	femur	36	39.6%	34	46.6%	$X^2=11.375$ p=0.333
	tibija	24	26.4%	10	13.7%	
	humerus	5	5.5%	7	9.6%	
	skapula	2	2.2%	0	0.0%	
	radius	8	8.8%	9	12.3%	
	ulna	3	3.3%	6	8.2%	
	karlica	2	2.2%	1	1.4%	
	kičma	3	3.3%	3	4.1%	
	stopalo	1	1.1%	1	1.4%	
	šaka	3	3.3%	0	0.0%	
	fibula	4	4.4%	2	2.7%	
Lokalizacija na dugim kostima	proksimalno	37	46.2%	21	30.9%	$X^2=3.643$ p=0.056
	distalno	43	53.8%	47	69.1%	

Ova tabela nam ukazuje da nema značajnih razlika osim kada je u pitanju lokalizacija na dugim kostima gde je distalno značajno češće pozitivan nego proksimalno (p vrednost je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05 pa ovu analizu možemo smatrati značajnom).

Tabela 25. Osnovne karakteristike pacijenata u odnosu na β -katenin u džinovskim ćelijama

		β -katenin u džinovskim ćelijama						Rezultat testiranja
		0		<15 jedara		15+ jedara		
		N	%	N	%	N	%	
Pol	muški	50	50.0%	20	39.2%	6	46.2%	$X^2=0.811$ $p=0.368$
	ženski	50	50.0%	31	60.8%	7	53.8%	
Starost		31.1±13.0		30.0±13.9		31.5±12.1		Rho=-0.016 $p=0.840$
Trajanje bolesti		6.0±5.6; 4 (1-38)		6.6±7.6; 4 (1-38)		5.8±4.7; 4 (1-16)		Rho=-0.014 $p=0.862$
Bol	ne	11	11.2%	7	14.0%	2	15.4%	$X^2=0.336$ $p=0.562$
	da	87	88.8%	43	86.0%	11	84.6%	
Otok	ne	17	17.3%	8	16.0%	3	23.1%	$X^2=0.064$ $p=0.871$
	da	81	82.7%	42	84.0%	10	76.9%	
Lokalizacija	femur	45	45.0%	17	33.3%	8	61.5%	$X^2=0.078$ $p=0.796$
	tibija	20	20.0%	14	27.5%	0	0.0%	
	humerus	6	6.0%	3	5.9%	3	23.1%	
	skapula	2	2.0%	0	0.0%	0	0.0%	
	radius	14	14.0%	2	3.9%	1	7.7%	
	ulna	3	3.0%	5	9.8%	1	7.7%	
	karlica	2	2.0%	1	2.0%	0	0.0%	
	kičma	3	3.0%	3	5.9%	0	0.0%	
	stopalo	1	1.0%	1	2.0%	0	0.0%	
	šaka	1	1.0%	2	3.9%	0	0.0%	
Lokalizacija na dugim kostima	fibula	3	3.0%	3	5.9%	0	0.0%	$X^2=0.136$ $p=0.798$
	proksimalno	34	37.4%	22	50.0%	2	15.4%	
	distalno	57	62.6%	22	50.0%	11	84.6%	

Za razliku od prethodne tabele, ovde nema statistički značajih razlika između β -katenin kategorija i osnovnih karakteristika pacijenata.

Analizirano je preživljavanje (recidivantnost) ova dva faktora proliferacije i distribucija pacijenata u odnosu na njihove kategorije, prikazana je u tabelama 26. i 27.

Tabela 26. Recidivantnost u odnosu na β -katenin u stromalnim ćelijama

β -katenin u stromalnim ćelijama	Ukupno N	N recidiva	cenzurisano	
			N	%
ne	89	23	66	74.2%
da	72	23	49	68.1%
Ukupno	161	46	115	71.4%

Tabela 27. Recidivantnost u odnosu na β -katenin u džinovskim ćelijama

β -katenin u džinovskim ćelijama	Ukupno N	N recidiva	cenzurisano	
			N	%
0	98	27	71	72.4%
<15 jedara	50	13	37	74.0%
15+ jedara	13	6	7	53.8%
Ukupno	161	46	115	71.4%

Iz tabela se vidi da je kada je u pitanju β -katenin u stromalnim ćelijama, broj recidiva sličan u ove dve kategorije sa nešto većom učestalošću kod onih koji imaju pozitivan Beta katenin u stromalnim ćelijama, dok je broj recidiva nešto veći što je veći broj jedara. (Slika 30. i 31.)

Aritmetička sredina i medijana preživljavanja (recidivantnosti) između ove dve kategorije je prikazana u tabeli 28 i tabeli 29.

Tabela 28. Aritmetička sredina i recidivantnost za β -katenin u stromalnim ćelijama.

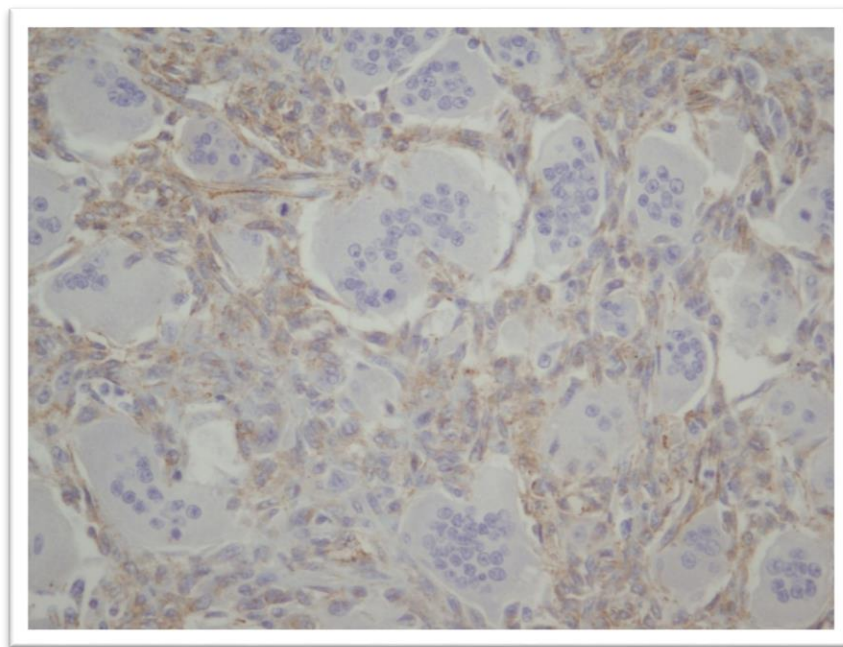
β -katenin u stromalnim ćelijama	Prosek	Median
ne	169.644	240.000
da	170.658	235.000
Ukupno	179.164	235.000

Tabela 29. Aritmetička sredina i medijana preživljavanja za β - katenin u džinovskim ćelijama

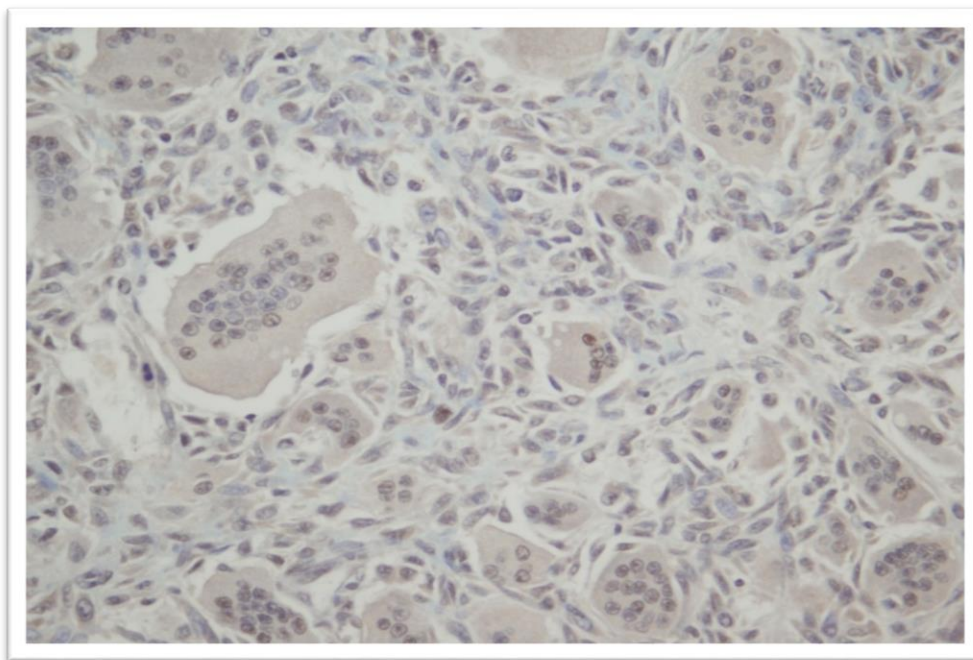
β -catenin u džinovskim ćelijama	Prosek	Median
0	184.525	235.000
<15 jedara	150.703	.
15+ jedara	142.754	240.000
Ukupno	179.164	235.000

U prvom slučaju, prosečna vrednost i medijana su slične u obe kategorije, dok je u drugom slučaju medijana ista u obe kategorije (kategorija <15 ćelija ne može da se izračuna medijana), a prosečna vrednost je najveća u kategoriji 0.

Log rank testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u preživljavanju kada je u pitanju Beta katenin u stromalnim ćelijama ($X^2=0,645$; $p=0,422$), kao ni u džinovskim ćelijama ($X^2=0,871$; $p=0,647$).



Slika 30. Citoplazmatska pozitivnost β -katenina u stromalnim ćelijama je perinuklearna sitnogradulirana (β -katenin, 400x)



Slika 31. Nuklearna pozitivnost β -katenina u stromalnim i multinuklearnim ćelijama je sličnog intenziteta (β -katenin, 400x)

4.11. Patološka fraktura analiza za β -katenina

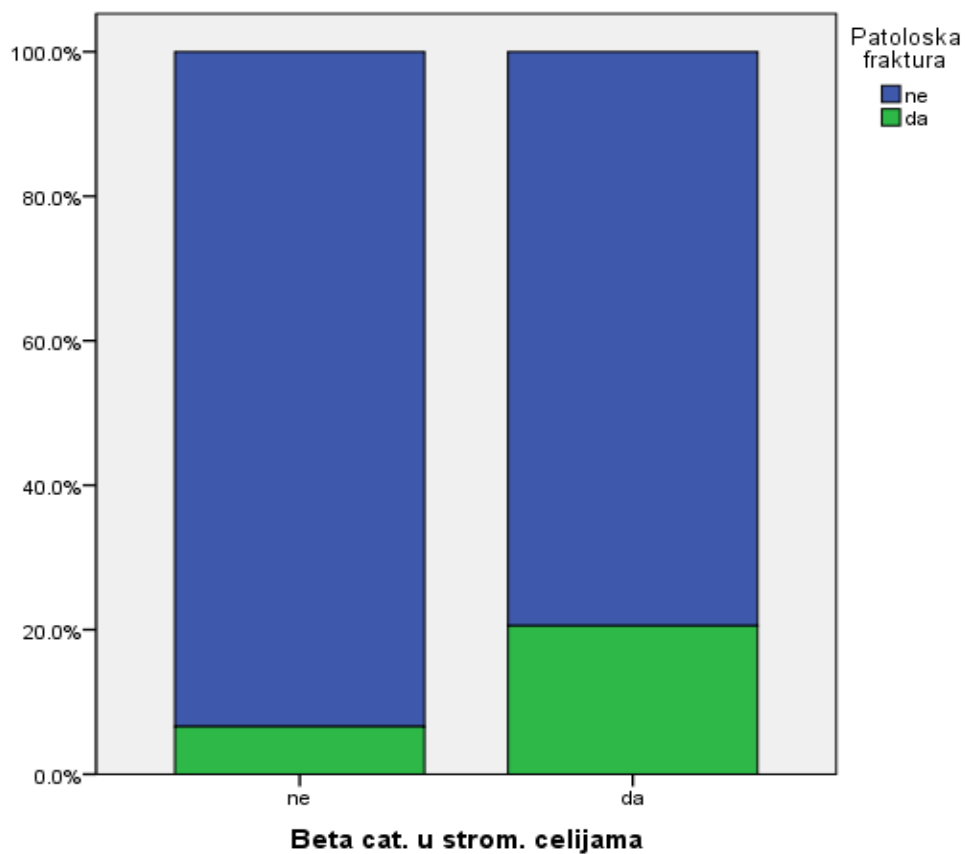
Distribucija pacijenata u odnosu na patološke fracture kod β -katenina u stromalnim ćelijama, prikazana je u tabeli 30.

Tabela 30. β -katenin u stromalnim ćelijama u odnosu na patološku frakturu

			Patološka fraktura		Ukupno
			ne	da	
β -katenin u stromalnim ćelijama	ne	N	85	6	91
		%	93.4%	6.6%	100.0%
	da	N	58	15	73
		%	79.5%	20.5%	100.0%
Ukupno		N	143	21	164
		%	87.2%	12.8%	100.0%

Iz ove tabele se vidi da pacijenti koji imaju eksprimiran β -katenin u stromalnim ćelijama imaju tri puta češće patološku frakturu od onih koji nemaju eksponiran beta katenin u stromalim ćelijama ($X^2=7,065$; $p=0,008$).

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 6)



Grafikon 7. β - katenin u stromalnim ćelijama u odnosu na patološke fracture

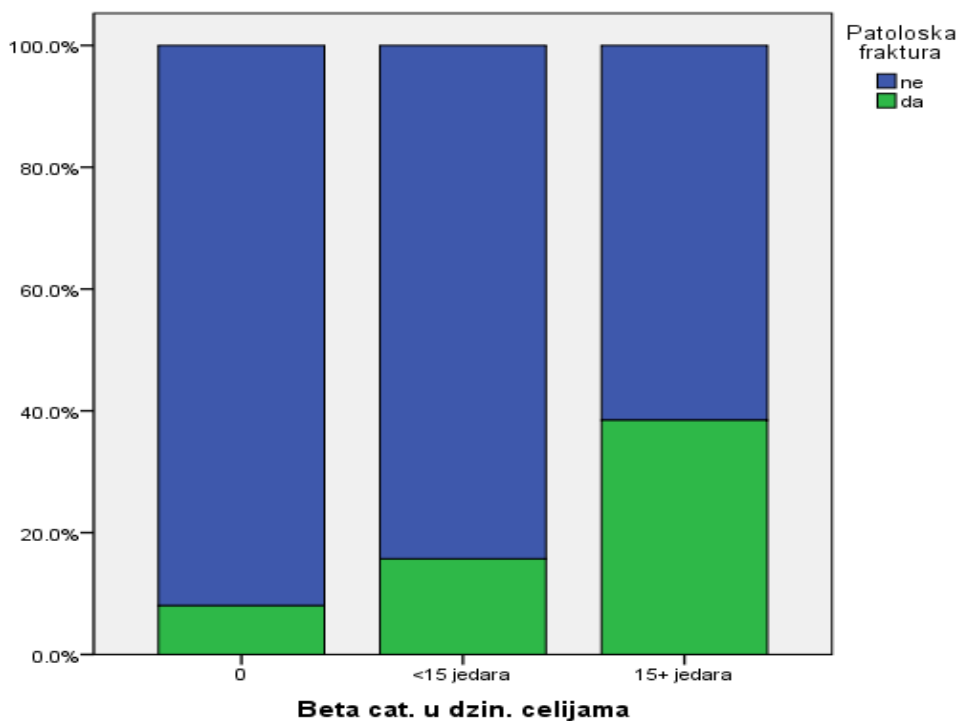
Analogno stromalnim, analizirana je i učestalost patoloških fraktura u odnosu na β -katenin u džinovskim ćelijama (Tabela 31.).

Tabela 31. β -katenin u dŹinovskim ćelijama u odnosu na patološke frakture

		Patološka fraktura		Ukupno	
		ne	da		
β -katenin u dŹinovskim ćelijama	0	n	92	8	100
		%	92.0%	8.0%	100.0%
	<15 jedara	n	43	8	51
		%	84.3%	15.7%	100.0%
	15+ jedara	n	8	5	13
		%	61.5%	38.5%	100.0%
Ukupno	n	143	21	164	
	%	87.2%	12.8%	100.0%	

I ovde postoji jasno uoćljiv trend povećanja učestalosti patoloških fraktura sa povećanjem broja jedara β -katenina u dŹinovskim ćelijama ($X^2=8,824$; $p=0,003$).

Rezultati su i grafićki prikazani (Grafikon 8.).



Grafikon 8. β -katenin u dŹinovskim ćelijama u odnosu na patološku frakturu

4.12. Uporedna analiza imunohistohemijske ekspresije p53, Ciklina D1, Ki67, β -katenina i pojave recidiva

Analiza pojave recidiva (analiza preživljavanja) urađena je univarijantnom Cox regresionom analizom za svaki prediktor posebno, a onda su rađeni multivarijantni modeli. Univarijantna analiza recidivantnosti tumora, prikazana je u tabelama 32. i 33.

Tabela 32. Recidivantnost tumora u odnosu na kliničke karakteristike

Univarijantna analiza	p vrednost	HR (95% Interval poverenja)
Pol ženski	0.314	0.742 (0.415-1.326)
Starost	0.611	1.005 (0.985-1.027)
Trajanje tegoba	0.395	1.017 (0.978-1.058)
Bol	0.793	1.117 (0.489-2.552)
Otok	0.075	2.346 (0.918-5.991)
Lokalizacija		
Femur	0.003	1
Tib. + fib. + stopalo	0.780	1.124 (0.495-2.553)
Humerus	0.027	3.641 (1.158-11.445)
Skap. + ulna + šaka	0.384	0.577 (0.167-1.991)
Radius	0.001	4.798 (1.977-11.646)
Kičma+karlica	0.378	0.517 (0.120-2.237)
Proks. Lokalizacija (duga kost)	0.540	0.763 (0.321-1.813)
Dist. lokalizacija (duga kost) *	0.122	1.739 (0.863-3.507)
Operacija		
Biopsija		1
Biopsija+procedura	0.219	1.520 (779-2.965)
GRADUS	0.494	1.150 (0.770-1.717)
Gradus kategorije		
Gradus I	0.058	1
Gradus II	0.029	2.125 (1.079-4.186)
Gradus III+maligno	0.771	0.885 (0.298-2.455)
Broj intervencija	<0.001	2.941 (1.872-4.620)
Broj intervencija CAT		
1	<0.001	1
2	0.017	4.352 (1.296-14.606)
3	<0.001	11.026 (3.296-36.910)
Komplikacije	0.957	0.984 (0.540-1.792)
Tumor		
Benigni		1
Maligni	0.043	3.418 (1.039-11.246)
Patološka fraktura	0.387	1.402 (0.652-3.015)

*Analiza urađena samo za duge kosti

Iz tabele 32. se uočava da su statistički značajni prediktori lokalizacija, gradus tumora, broj intervencija i tip tumora, dok je otkaz blizu konvencionalnog nivoa značajnosti od 0.05 pa i njega uzimamo u obzir kao prediktor za multivarijantnu analizu.

Tabela 33. Recidivantnost u odnosu na markere

Univarijantna analiza	p vrednost	HR (95% Interval poverenja)
P53	<0.001	6.677 (2.635-16.919)
Ki67	0.113	1.344 (0.932-1.937)
Ki67 po kategorijama		
0	0.143	1
<=5	0.098	2.723 (0.831-8.927)
6-19	0.021	5.153 (1.284-20.680)
20+	0.258	2.522 (0.508-12.511)
β -catenin u stromalnim ćelijama	0.425	1.266 (0.709-2.259)
β -catenin u dženovskim ćelijama	0.396	1.196 (0.791-1.807)
β -catenin u dženovskim ćelijama po kategorijama		
0	0.653	1
<15 jedara	0.776	1.102 (0.565-2.150)
15+	0.358	1.517 (0.624-3.687)
CiklinD1	0.005	2.193 (1.273-3.780)
CiklinD1 po kategorijama		
0	0.030	1
<15	0.008	14.458 (1.982-105.447)
15+	0.026	12.144 (1.356-108.742)

U tabeli 33. se može videti da su p53, Ki67 i Cilin D1 statistički značajni prediktori recidivantnosti.

Na osnovu univarijantne analize urađena je multivarijantna analiza prvo za svaki marker posebno, a zatim sa tri gore navedena markera zajedno.

U tabeli 34. prikazani su multivarijantni modeli za svaki pojedinačni marker, ali kada se uradi prilagođavanje za otok, lokalizaciju i tip tumora.

Tabela 34. Multivarijantni modeli za svaki marker posebno

Multivarijantni modeli za svaki marker posebno *	p vrednost	HR (95% Interval poverenja)
P53	<0.001	6.846 (2.667-17.570)
Ki67	0.088	1.408 (0.950-2.087)
Ki67 po kategorijama		
0	0.161	1
<=5	0.151	2.406 (0.727-7.968)
6-19	0.026	4.960 (1.215-20.239)
20+	0.244	2.638 (0.516-13.488)
β-catenin u stromalnim ćelijama	0.506	1.228 (0.671-2.247)
β-catenin u džinovskim ćelijama	0.446	1.176 (0.775-1.782)
β-catenin u džinovskim ćelijama po kategorijama		
0	0.719	1
<15 jedara	0.487	1.280 (0.639-2.563)
15+	0.581	1.302 (0.510-3.322)
CiklinD1	0.023	1.933 (1.095-3.414)
CiklinD1 po kategorijama		
0	0.040	1
<15	0.013	12.667 (1.723-93.133)
15+	0.047	9.468 (1.035-86.619)

*Prilagođeno za otok, lokalizaciju i tip tumora

Na osnovu multivarijantnih modela se može zaključiti da su ključni prediktori za recidivantnost p53, Ki67 i Ciklin D1, kao što je to i u univarijantnoj analizi prikazano, odnosno otok, lokalizacija i tip tumora neće modifikovati uticaj ovih markera na recidivantnost tumora.

U narednoj tabeli (tabela 35.) prikazan je multivarijantni model gde su svi ovi markeri, ali ovog puta samo statistički značajni u prethodnoj analizi, analiziraju zajedno uz prilagođavanje za otok, lokalizaciju i tip tumora.

Tabela 35. p53, Ki67 i CiklinD1 multivarijantni model.

Multivarijantni model svi zajedno *	p vrednost	HR (95% Interval poverenja)
P53	<0.001	6.163 (2.346-16.192)
Ki67		
0	0.265	1
<=5	0.322	1.843 (0.549-6.182)
6-19	0.089	3.471 (0.828-14.544)
>=20	0.138	3.649 (0.660-20.175)
Ciklin D1		
0	0.118	1
<15	0.039	8.379 (1.113-63.051)
15+	0.079	7.385 (0.792-68.838)

*Prilagođeno za otok, lokalizaciju i tip tumora

Na osnovu rezultata multivarijantne analize vidi se da sva tri markera imaju uticaj na recidivantnost, ali je evidentno da su p53 i Ciklin D1 statistički značajni, dok je situacija dok Ki67 nešto drugačija, odnosno jedino je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti kategorija 6-19 pa je ne smemo prevideti izostaviti ovaj marker u daljoj analizi.

Ako bi istu analizu uradili, ali da se ne raščlanjuje po kategorijama, već samo da se vidi da li za svaku kategoriju više postoji veća šansa za recidivantnošću dobijamo rezultate prikazane u tabeli 36.

Tabela 36. P53, Ki67 i Ciklin D1 multivarijantni model

Multivarijantni model svi zajedno *	p vrednost	HR (95% Interval poverenja)
P53	<0.001	6.163 (2.346-16.192)
Ki67	0.024	1.669 (1.071-2.601)
Ciklin D1	0.077	1.758 (0.940-3.287)

*Prilagođeno za otok, lokalizaciju i tip tumora

Iz tabele se vidi da je p53 najuticajniji, ali to je zato što su Ki67 i Ciklin D1 u četiri, odnosno tri kategorije, odnosno gradacije. Iz tog razloga urađen je i model u kome su Ki67 i CiklinD1 transformisani u kategorijalne varijable sa pozitivnim i negativnim statusom.

Tabela 37. p53, Ki67 i CiklinD1 multivarijantni model

Multivarijantni model svi zajedno *	p vrednost	HR (95% Interval poverenja)
P53	<0.001	5.893 (2.296-15.123)
Ki67	0.213	2.138 (0.647-7.062)
Ciklin D1	0.043	8.038 (1.073-60.235)

*Prilagođeno za otok, lokalizaciju i tip tumora

Sada se vidi da je uticaj p53 i Ciklina D1 bitniji, kada se uzme u obzir pozitivnost markera, bez obzira na gradaciju.

U sledećoj analizi ispitujemo da li postoji uticaj udruženog efekta markera na recidivantnost. Paralelno posmatramo recidivantnost uopšte i recidivantnost u prve tri godine. Jedan pacijent imao je recidiv u 39 mesecu, ali ćemo ga zbog potreba ove analize smatrati kao da je i on imao recidiv u prvih 36 meseci. Distribucija pacijenata u odnosu na pozitivan broj markera (bez obzira na gradaciju) prikazan je u tabeli 36.

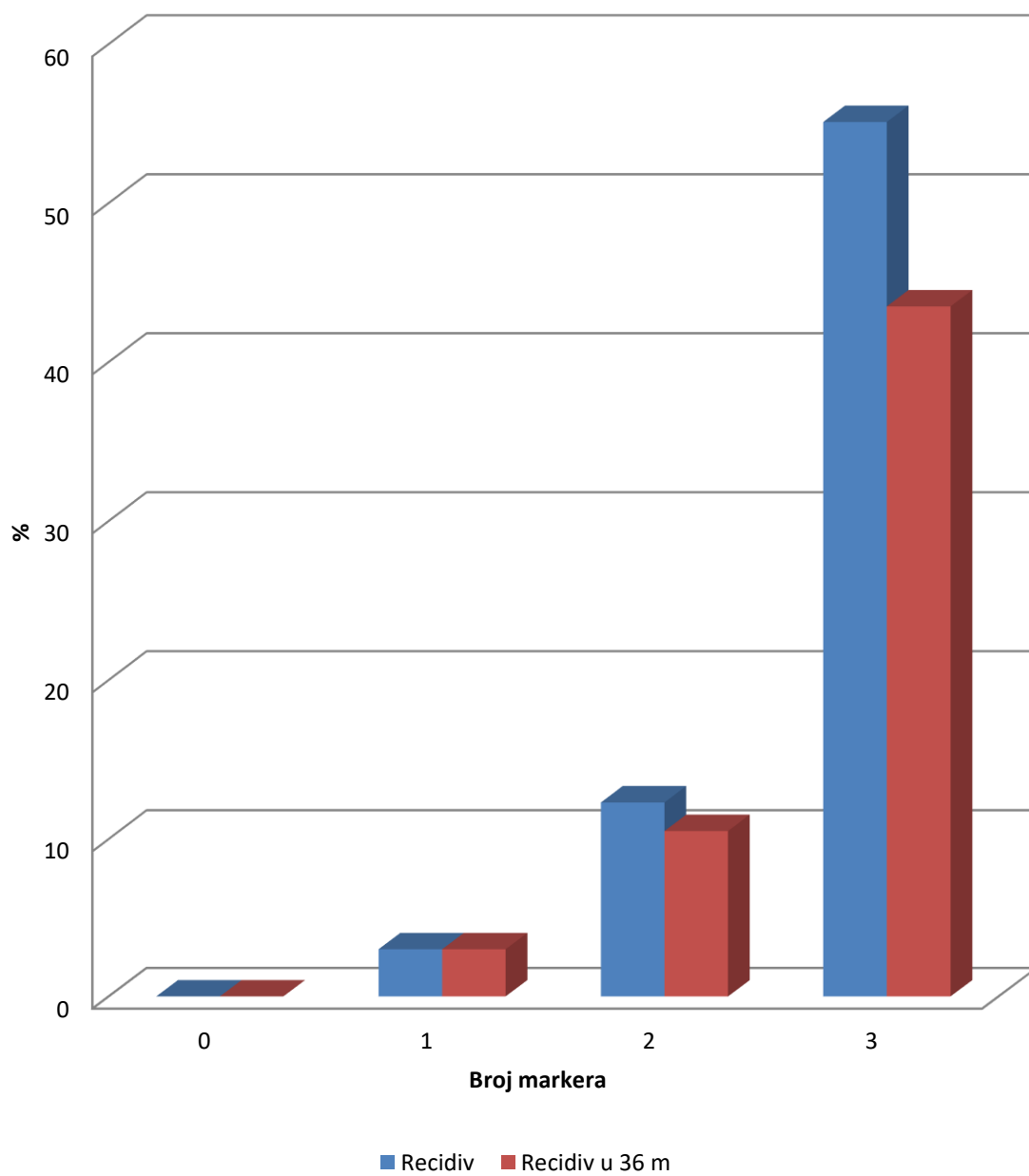
4.13. Broj markera u odnosu na recidivantnost

Tabela 38. Broj markera u odnosu na recidivantnost

Broj markera	Recidiv	Recidiv u 36 m
0 (n=5)	0 (0%)	0 (0%)
1 (n=33)	1 (3%)	1 (3%)
2 (n=57)	7 (12.3%)	6 (10.5%)
3 (n=69)	38 (55.1%)	30 (43.5%)
Ukupno	46 (28%)	37 (22.6%)
p vrednost	<0.001	<0.001

Tabela 38. ove studije je ključna u našem istraživanju i pokazuje da je u oba slučaja visoko statistički značajna razlika između pacijenata sa i bez recidiva po kumulativnom broj markera. Naime, svi pacijenti koji nemaju nijedan pozitivan marker nemaju recidiv, dok samo jedan pacijent koji ima pozitivan jedan marker (pacijent koji ima pozitivan p53) ima recidiv. Jasno je da procenat recidiva raste kada su u pitanju dva ili tri markera pozitivna. Recidivantnost, kada su u pitanju sva tri markera zajedno je veoma visoka.

Distribucija pacijenata sa recidivima u odnosu na broj markera je i grafički prikazana (grafikon 9.).



Grafikon 9. Broj markera u odnosu na recidivantnost

5. DISKUSIJA

Gigantocelularni tumor predstavlja neoplaziju koja je etiološki, patogenetski i terapijski veliki izazov za lekare i istraživače različitih specijalnosti.

U do sada objavljenim studijama, najveći broj analiziranih rezultata lečenja učinjen je sredinom osamdesetih godina, kada su objedinjeni rezultati lečenja, u okviru ISOLS-a (Asocijacije limb salvage hirurgije). Studija je obuhvatila 570 pacijenata lečenih na teritoriji SAD i Evrope. [1,8,17,53,59]

Sam protokol lečenja, koncipiran je početkom sedamdesetih i značajno je unapređen tokom proteklih decenija. Novije tehnike i kliničke procene, dijagnostika, hirurgija, rekonstrukcija kao i dopunske mere lečenja korišćenjem novih znanja iz oblasti hemoterapije, radioterapije, i imunoterapije su promenile tradicionalni istorijski pristup, kako u teoriji tako i u praksi. Da bi se odredilo najracionalniji metod lečenja, lezija mora biti precizno procenjena ne samo na osnovu histološkog tipa, već i stepena agresivnosti, topografske lokalizacije i prisustva odnosno odsustva metastaza. Tako da je aktuelni protokol lečenja baziran, pre svega, na timskom radu specijalista razilicnih grana medicine, pa samim tim i ovi rezultati predstavljaju produkt permanentne i dugogodišnje saradnje kolega uključenih u rad Sarkoma konzilijuma.

Upoređujući dobijene rezultate brojnih studijai Studije o kliničkom i morfološkom ponašanju GCTB izvedena 2002-2003. godine, na Institutu "Banjica", konstatovano je slaganje sa pređašnjim iskustvima lekara, koje ukazuje na benignu prirodu GCTB, kao i potrebu za produženjem perioda intezivnih kontrola u postoperativnom period (sa dve na tri godine). [22,62,64] Međutim, ponašanje GCTB i dalje je nepredvidljivo i multifaktorijalno. [65,74,77,103-107]

Pojava lokalnog recidiviranja u ortopedskoj onkologiji utiče na mogućnost i ishod daljeg lečenja pacijenata. Kako je GCTB nepredvidivog lokalnog ponašanja, veliki je praktičan i klinički značaj eventualnog predviđanja nastanka recidiva, još tokom inicijalne dijagnostike, u primarnoj biopsiji. Standardni terapijski pristup podrazumeva hirurško lečenje čija ekstenzivnost mnogo zavisi od verovetnoće ponovne lokalne pojave tumora, odnosno lokalnog recidiva.

Poznato je da su najznačajniji parametri za agresivno ponašanje i nastanak recidiva GCTB lokalizacija i destrukcija korteksa sa propagacijom u meka tkiva, odnosno ekstrakompartmentalna prezentacija lezije. [103,108-111] Takođe je utvrđeno da sa reinetrventnim hirurško terapijskim pristupkom varovatnoća za nastanak recidiva raste.

[109-113]

Kao i kod drugih neoplazija, i kod GCTB se postavlja pitanje tumorogeneze i aktivacije pojedinih puteva tokom nastanka neoplazije. Među mogućim činiocima koji bi mogli uticati na ponašanje GCTB su i regulatori ćelijskog ciklusa, koji kontrološu proliferaciju tumorskih ćelija. [50,58,114-125]

Obzirom da je sam ćelijski ciklus odgovoran za sudbinu tumorska ćelije, faktori proliferacije kao i regulacije ćelijskog ciklusa mogu da predstavljaju bitnu odrednicu u budućoj sudbini tumorske lezije. S toga je ova studija nastavak prethodno kliničko-morfološkog ispitivanja GCTB, sprovedenog na IOHB "Banjica", koncipirana kao studija preseka u cilju ispitivanja značaja imunohistohemijske ekspresije markera regulatora ćelijskog ciklusa kod GCTB.

Ova studija preseka u koju je ukupno bilo uključeno 217 pacijenata i koji su prikupljeni u periodu od 1994-2008. godine na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu i Institutu za Ortopedsko-hiruruške bolesti „Banjica“. Svi pacijenti su operisani na Institutu za Ortopedsko-hiruruške bolesti i minimalno su bili praćeni 3 godine. Svim pacijentima je potvrđen gigantocelularni tumor kosti patohistološkim analizama na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od ukupnog broja pacijenata, 53 pacijenta su imala nekompletne podatke, pa su iz tog razloga isključeni iz izorka, čime je definitivni uzorak ograničen na 164 pacijenta.

U ispitivanom uzorku najmlađi pacijent je imao pet godina, a najstariji 64 godine, dok se najveći broj pacijenata u našoj studiji nalazi u trećoj deceniji života. Ovaj tumor se inače najčešće sreće u populaciji od pedeset i više godina, ali nije retkost pojave ovog tumora kod mladih osoba, naročito u trećoj deceniji života, a izuzetno i kod osoba u prepubertetskom periodu. [57,63,111,112] Upoređujući literaturne podatke drugih istraživača utvrđeno je da je prosečna starost naših pacijenata slična u određenoj meri kao i kod drugih israživanja koje su se bavile sličnom problematikom. [17,23,111,113]

Fond izgubljenog vremena se kretao od mesec dana do 38 meseci sa medijanom četiri meseca. Naime, "fond izgubljenog vremena" je period od pojave prvih simptoma pa do postavljanja definitivne dijagnoze i početka lečenja. Problem kliničke prezentacije i patohistološke dijagnostike ičini da fond izgubljenog vremena bude u proseku 6 meseci. Smanjenje fonda izgubljenog vremena do pojave recidiva nije statistički značajno, što pokazuje nepredvidljivo biološko ponašanje neoplazme.

I drugi istraživači ukazuju na postojanje ovog perioda i njegovo trajanje koje se kreće od jedan do 38 meseci. [103,108,113]

Iz literature je poznato da se GCBT najčešće manifestuje kao bol, otok i veoma retko patološka fraktura. [109,110] U našem uzorku, i bol i otok su gotovo podjednako zastupljeni u viskom procentu, dok je patološka fraktura daleko ređa, što je i očekivano. Patološka fraktura je u našem uzorku bila zastupljena kod 21 pacijenta, odnosno u 12,8% ukupnog broja, što je u korelaciji sa ostalim istraživačima. Patološka fraktura je relativno učestala komplikacija kod 9–30% pacijenata, na osnovu podataka iz literature. [22,23,113]

Uzroci nastanka patološke frakture su multifaktorijalni i jos uvek nedovoljno poznati. Mogući potencijani parametri koji dovode do pojave patološke frakture su i aktivacija Wnt puta kancerogeneze koja je opisana u GCTB. Pojedini geni koji su uključeni u put Wnt utiču na destruktivnost GCTB i promovišu rast ćelija. Poznato je da β -katenin ima značajnu ulogu u Wnt signalnom putu i u nastanku mnogih primarnih mezenhimalnih tumora kosti i mekih tkiva.

Naše istraživanje je potvrdilo da je ekspresija β -katenina u citoplazmi monojedarnih, kao i u jedrima džinovskih ćelija udružena sa visokim rizikom za nastanak frakture kod GCTB. Tumori čije su stromalne, monojedarne ćelije pokazivale citoplazmatsku pozitivnost na β -katenin, su se tri puta češće klinički i radiološki manifestovali pojavom patološke frakture. Jedarna ekspresija β -katenina u džinovskim, multijedarnim "osteoclast like" ćelijama je visoko statistički korelirala sa pojavom frakture.

Pozitivnost na β -katenin u ćelijama GCTB ukazuje na aktivaciju Wnt puta u GCTB, kao i na mogući značaj ovog signalnog puta kako za patogenezu, tako i za lokalno agresivno ponašanje ovog primarnog koštanog tumora. [39,66,81,88,126-128]

Kako su Chen i saradnici potvrdili da je JUN gen, koji je deo Wnt puta aktiviran u GCTB, a koji je zaduzen za promociju rasta stromalnih ćelija, kao i povećanu destruktivnost ovog tumora, to bi moglo objasniti udruženost sa patoloskom frakturom. Poznato je, takođe, da gen JUN igra veoma značajna ulogu u kanonskom Wnt signalnom putu, pre svega interreagujući sa β -katenina-TCFs transkriptornim kompleksom. S toga ekspresija β -katenina ukazuje na povećanu transkripciju u GCTB, kao i moguću hiperaktivaciju JUN gena. [125]

Ovaj gen, koji je usko povezan sa β -kateninom, je takođe povezan sa pozitivnom regulacijom matriks metaloproteinaza koje imaju veliki značaj za diskohherentnost tumorskih ćelija, a time i lokalno agresivno biolosko ponašanje. U GCTB su visoko pozitivne sledeće

matriks metaloproteinaze: MMP-2, MMP-13 i MMP-9. Uloga MMP-13 je optimizacija koštane resorpcije od strane džinovskih ćelija tipa osteoklasta, a njena visoka ekspresivnost u GCTB bi mogla biti odgovorna za nastanak osteolize i patološke frakture. JUN, pa i β -kateninom, bi mogli imati uticaja i na pojedine fiziološke procese u ekstracelularnom matriksu, promovišući rast i potencirajući destruktivnost u GCTB.

Značaj razumevanja nastanka patološke frakture u GCTB se ogleda u činjenici da njeno prisustvo određuje terapijski pristup, pre svega tip i ekstenzivnost hirurške intervencije. Ova studija je pokazala da ekspresija β -katenina visoko korelira sa nastankom patološke frakture kod GCTB. Kako je β -katenin usko povezan sa aktivacijom Wnt signalnog puta u patogenezi GCTB, moglo bi se postulirati da je aktivacija Wnt puta jedan od doprinosećih faktora za lokalno destruktivno ponašanje ovog tumora, pa i za pojavu patološke frakture. [89,133-136]

Lokalizacija GCBT je raznolika i najčešće zahvata duge kosti, najčešće predeo kolena. Ipak, pored dugih kostiju, viđaju se i tumori lokalizovani na pljosnatim kostima, kao što je scapula pa čak i patella, ali i na kratkim, kao što su kosti stopala i šake. U našoj studiji najveći procenat pacijenata ima lokalizaciju tumora na dugim kostima, odnosno femuru, što se poklapa sa literurnim podacima, dok mali broj pacijenata ima tumor lokalizovan na kratkim kostima i pljosnatim kostima, ali u zanemarljivo manjem procentu u odnosu na duge kosti. Iz navedenog vidimo da se radi o uzorku sa tipičnom lokalizacijom ovog tumora, odnosno sa pacijentima kojima je većinom tumor dijagnostikovao na predilekcionom. Kada posmatramo lokalizaciju na dugim kostima, u literaturi je najčešće navedeno da je predilekciono mesto na dugim kostima distalni femur i proksimalna tibija [59,64,108,111], što se takođe poklapa sa našim rezultatima. Inače, u našoj studiji je distalna lokalizacija u dugim cevastim kostima 2 puta češće prisutna u odnosu na proksimalnu. Analizirano ishodište tumora na drugim kostima pokazuje značajnu distribuciju na distalnim okrajcima, a pre svega na femuru, proksimalna lokalizacija je najzastupljenija na tibiji. Iz literature je poznato da su distalni femur i distalni radijus tipična mesta za GCTB, ali nismo naišli na reference koje su posebno analizirale učestalost pojave GCTB u odnosu na pojedine segmente dugih cevastih kostiju. [136-140]

U našem istraživanju u kliničkoj slici je prevashodno dominirala pojava otoka, dok je bol bio manje zastupljen. Što se tiče hirurške intervencije, najdominantnija je biopsija kao izolovani hirurška zahvat, i kao prva intervencija, što pre svega potvrđuje poštovanje usvojenog protokola ‘‘Staging system’’. [4,6,52,63,140-144]

Ekspresija p53, KI67, Ciklina D1 i β -katenina u odnosu na opšte klinička parametre nije pokazala značajnu razliku između pacijenata sa i bez ekspresije navedenih antitela. Jedino je otok nešto učestaliji kod onih koji nemaju ekspresiju p53, a evidentna je razlika i kod lokalizacije, koja je na granici konvencionalnog nivoa značajnosti. Ovakvi rezultati su u skladu sa objavljenim studijama. Praktični dokaz je studija koja se bavi veoma retkim podtipom a to je Maligni GCTB, gde su istraživači konstatovali čak do 40% povećanje p53 u ispitivanom uzorku. Istina je da je taj uzorak mali (dva pacijenta). [49,92-94]

Kauzman pak u svom istraživanju postavlja mogućnost da je prekomerna ekspresija Ciklina D1 u džinovskim ćelijama GCTB u pljosnatim i malim kostima uslovljena lokalizacijom. Naši rezultati negovore o takvoj uslovljenosti tj. mi nismo došli do takvih zaključaka. A Rousseau u svojoj studiji na multicentričnoj formi GCTB (istina na malom broji ispitanika) ukazuje na činjenicu da Ciklin D1, čak i u takvoj pojavi ne menja svoju ekspresivnost. [48-50,70-75]

Pacijenti naše studije su bili podvrgnuti jednom do tri hirurška zahvata, u najvećem broju slučajeva je prva intervencija podrazumevala biopsiju ali u najranijem periodu analize je podrazumevala, pre svega definitivnu intervenciju, što se pokazalo kao pogrešno. U ostalim studijama, pa i našoj, tokom vremena je pokazana neophodnost izvođenja biopsije kao prve intervencije zbog potencijalnih izmena u PH dijagnozi [52,133,134,141]

Od ukupnog broja pacijenata, jednu intervenciju imalo je 48 pacijenata (28,4%), dve intervencije imalo je 78 pacijenata (48,1%) dok je tri intervencije imalo 38 pacijenata (23,5%). Za dva pacijenta (1,2%) nema podatak o broju intervencija.

Vreme praćenja iznosilo je maksimalno 300 meseci. Porast pužine perioda bez znakova bolesti je visoko statistički značajan, što je pokazatelj ukupnog dijagnostičko terapijskog uspeha. Medijana preživljavanja (pojava recidiva) iznosi 235 meseci (95% interval poverenja 99,7-370,2 meseci). U odnosu na lokalizaciju distribucija odgovara postojećim referentnim podacima iz literature, osim u slučaju GCT na pateli [32,73], jer ova pojava u studiji nije konstatovana. [60,135-139]

Recidiv se javio kod 46 pacijenata (28%), dok kod 118 pacijenata (72%) nije bilo pojave recidiva tokom praćenja. Studija je bazirana na komparaciji kliničkoradiološko-patohistoloških parametara kod pacijenata bez I sa pojavom recidiva u cilju predikcije ponašanja tumora. Analizirani su i pacijenti sa pojavom plućnih metastaza. [125,126,132,135]

Naši rezultati koreliraju sa konstatovanim rezultatima drugih istraživača, iako je naš nivo recidiva nešto veći, za oko 3% do 5%. Uzrok tome leži u činjenici da su analizom obuhvaćeni i pacienti koji su lečeni, pre svega u periodu, pre 1981.g (tj. dvadeset godina pre) i u tom periodu nije postojao niti je primenjivan „STAGING SYSTEM“, i u tom periodu je najveći broj recidiva. A u periodu od osamdesetih godina pa do danas, pojava recidiva je sve ređa, i drastično pada u periodu od tri godine kada je korišćen phenol-glicerolski rastvor.

Navedeni rezultati su ispunili naša očekivanja, i saglasni su sa studijama koje su sprovedene u drugim centrima ortopedске onkologije, a pre svega studijom sa Mayo Clinic iz Rochestera, Minnessota, USA. [144]

Pojava lokalnog recidiviranja u ortopedskoj onkologiji utiče na mogućnost i ishod daljeg lečenja pacijenata. Kako je GCTB nepredvidivog lokalnog ponašanja, veliki je praktičan i klinički značaj eventualnog predviđanja nastanka recidiva, još tokom inicijalne dijagnostike, u primarnoj biopsiji. Standardni terapijski pristup podrazumeva hirurško lečenje čija ekstenzivnost mnogo zavisi od verovatnoće ponovne lokalne pojave tumora.

Poznato je da su najznačajniji parametri za agresivno ponašanje i nastanak recidiva GCTB lokalizacija i destrukcija korteksa sa propagacijom u meka tkiva, odnosno ekstrakompartmentalna prezentacija lezije. Takođe je utvrđeno da sa reintrventnim hirurškim terapijskim pristupom varovatnoća za nastanak recidiva raste.

Rezultati koje smo izneli u našoj studiji su potpuno u skladu sa navedenim literaturnim podacima. Oni potvrđuju da je lokalizacija tumora na dugim cevastim kostima gornjih ekstremitata (humerus, a naročito radius) češće udružena sa pojavom recidiva. Interesantno je da, u našem uzorku, karlica i kičmeni stub nisu bili „mesto rizika“ za nastanak recidiva, što se može objasniti relativno malim brojem pacijenata kojima je tumor dijagnostikovao na ovoj lokalizaciji (23 od 164 analizirana slučaja). Radiološka prezentacija lezije sa inicijalnom destrukcijom korteksa i propagacijom u meka tkiva je i u ovoj studiji izdvojena kao značajan prediktorni parametar. Tumori sa ovakvim radiološkim karakteristikama su 2,3 puta češće recidivirali u odnosu na druge lezije.

Naši podaci su potvrdili opšte poznate činjenice da svaka ponovljena hirurgija povećava rizik od lokalnog recidiviranja, odnosno da je veoma teško uspostaviti lokalnu kontrolu bolesti nakon višestrukih hirurških intervencija. Analizom je utvrđeno da se rizik od recidiviranja 11 puta uvećava nakon treće hirurške terapijske procedure.

Međutim, svi, do sada analizirani, kliničko-radiološki parametri nisu dovoljno precizno ukazivali na biološko ponašanje GCTB, te je stalno prisutna potreba da se definišu i pronađu dodatni, novi kriterijumi.

Dugo se smatralo da je patohistološka, mikroskopska prezentacija tumora, sa određivanjem histološkog gradusa pouzdan prediktivni parametar. Ipak, danas je prihvaćen stav da histološki gradus GCTB ne korelira sa pojavom recidiva. S toga se i dalje traga za potencijalnim patohistološkim prediktorima biološkog ponašanja.

Podatak da prosečno vreme u mesecima bez pojave recidiva kod onih koji nisu imali ekspresiran p53 iznosilo je 274,9, dok je u grupi pacijenata sa pozitivnim p53 prosečno vreme u mesecima bez pojave recidiva 125,5 meseci sa medijanom 110,0 meseci. Ovaj podatak nam pokazuje saglasnost sa drugim studijama vezanim za procene značajnosti markera p53, jer odsustvo ovog markera evidentno pokazuje smanjeni rizik za nastanak recidiva. Ali jaka ekspresija p53 je dokazana posle čak petnaest godina praćenja pacijenta koji je lečen kiretažom i koštanim graftovanjem, i na pojavu recidiva je bioptiran, pri čemu je dokazan GCTB, međutim, veoma visoku pozitivnost p53 je ukazivala i sekundarni malignitet. [79,80,145]

I ova studija bi mogla potvrditi da su ekspresija p53 i Ciklina D1 u ćelijama GCTB značajni i nezavisni imunohistohemijski kriterijumi za predikciju nastanka recidiva. U našem uzorku je nuklearna pozitivnost p53 u stromalnim, monojedarnim ćelijama visoko statistički značajno ukazivala na 6,7 puta veću verovatnoću za ponovnu lokalnu pojavu tumora. Istovremeno je utvrđeno da je prisustvo pozitivnosti Ciklina D1 u jedrima multinuklearnih džinovskih ćelija takođe nezavisan parametar, koji ukazuje na 2 puta veći rizik za pojavu recidiva. Slične rezultate koji se odnose na značaj pozitivnosti p53 i Ciklina D1 u tumorogenezi i biološkom ponašanju GCTB su opisali brojni autori. [35, 39, 41]

Interesantno je da u našem uzorku nije utvrđena korelacija proliferativnog indeksa Ki67 i β -catenina sa nastanakom recidiva GCTB. Ipak, moramo pomenuti da je statističom projekcijom na veći uzorak pokazano da bi „2+ pozitivnost “Ki67 (+ u 6-19% tumorskih ćelija) mogla biti tretirana kao potencijalni prognostički kriterijum za ponovno javljanje lezije. Ovakavi nalazi su samo delimično u korelaciji sa literaturnim podacima, jer postoje autori koji napominju moguću ulogu β -catenina za nastanak recidiva GCTB, mada njihova serija obuhvata znatno manji broj ispitanika. [43,50,75,94] Agresivnije ponašanje u tumorima sa većim proliferativnim indeksom je

čest podatak iz literature, te je moguće da će se i GCTB ponašati po tom modelu, mada naša studija to nije u potpunosti potvrdila.

Kriterijumi, koji su kao značajni izdvojeni univarijantnom logističkom regresijom, uključeni su u multivarijantnu statističku analizu (MLG). Dobijeni rezultat ukazuje da je pozitivnost na p53 najznačajniji prediktorni faktor za pojavu recidiva. Tumori koji pokazuju nuklearnu ekspresiju p53 u monojedarnim ćelijama 6 puta češće recidiviraju. Navedeni rezultat možda jeste pomalo neočekivan, ali je ipak u skladu sa mnogim objavljenim studijama, koje ukazuju na moguću prognostičku ulogu p53 u GCTB. [83,92].

Uz p53 pozitivnost MLG je u našem uzorku izdvojila i nuklearnu pozitivnost Ciklina D1 u džinovskim ćelijama sa manje od 15 jedara kao drugi po značajnosti parametar predikcije pojave recidiva. Matsubayashi i saradnici su takođe analizirali varijacije u ciklinskoj pozitivnosti u odnosu na broj jedara u džinovskim ćelijama i došli do sličnog zaključka kao i mi. Odnosno utvrđeno je da je ekspresija Ciklina D1 u ćelijama sa manje jedara u korelaciji sa biološkim ponašanjem lezije.

Ova studija, čija su osnovna ograničenja retrospektivnost i korišćenje starih bioptičkih uzoraka (kalupa iz arhive), što bi eventualno moglo da kompromituje imunohistohemijske analize, je pokušaj da se izdvoje potencijalni kriterijumi za predikciju nastanka recidiva gigantocelularnog tumora kosti. U njoj se, uz opšte poznate parametre: lokalizacija lezije, broj hirurških intervencija, jasna destrukcija korteksa sa prisustvom ekstrakomartmentalne lezije i histološki kriterijumi za malignost, kao nezavisni prediktori, diferenciraju: ekspresija p53 u monojedarnim tumorskim ćelijama i ekspresija Ciklina D1 u džinovskim, multijedarnim ćelijama.

Navedene rezultate je neophodno testirati na još većem uzorku pacijenata, a njihova eventualna potvrda bi mogla olakšati dileme u terapijskom pristupu gigantocelularnog tumora kosti.

6. ZAKLJUČCI

1. Imunohistochemijska nuklearna pozitivnost stromalnih ćelije na p53 je najznačajniji prediktorni faktor za pojavu recidiva. Činjenica da p53 svoju antionkogensku funkciju ostvaruje indirektno, kroz niz drugih gena i njihovih produkata, može da ukaže na njegovu značajnost, ali u ovoj studiji se direktno pruža dokaz o značajnosti p53.
2. Nuklearna pozitivnost Cyclina D1 u džinovskim ćelijama sa manje od 15 jedara izdvojila se kao drugi po značajnosti parametara predikcije pojave recidiva. Direktno ukazuje na pojačanu aktivnost, posebno u završnoj fazi pripreme dupliciranja DNK. Tako da džinovske ćelije do 15 jedara, ukazuju na ekspanzivno stanje samog tumora.
3. Ekspresija β -katenina u citoplazmi monojedarnih, kao i u jedrima džinovskih ćelije visoko korelira sa nastankom patološke fracture kod GCTB. Ta specifična aktivnost tumora, ne samo kao fizički ubrzan rast, nego i pojačana destrukcija na ćelijskom nivou. Ovo ima kao rezultat povišeni stepen koštane destrukcije.
4. Pozitivnost na β -katenin u ćelijama GCTB ukazuje na aktivaciju Wnt puta u GCTB, te bi se moglo postulirati da je aktivacija Wnt puta jedan od doprinosećih faktora za lokalno destruktivno ponašanje ovog tumora, pa i za pojavu patološke frakture.
5. Najznačajniji kliničko-radiološki parametar za agresivno ponašanje i nastanak recidiva GCTB su lokalizacija i destrukcija korteksa sa propagacijom u mekatkiva, odnosno ekstrakompartmentalna prezentacija lezije.
6. Reinertventnim hirurškim terapijskim pristupom varovatnoća za nastanak recidiva raste. Ova tvrdnja je poznata, ali je do sada dokazivana indirektno, ali kroz ovu studiju se jasno vidi ovaj zaključak.

7. LITERATURA

REFERENCE

1. Fletcher DM, Unni KK, Martens F. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone Pathology & Genetics. In: Kleihues P, Sobin LH, editors. Lyon: IACP Press. 2002; p. 12-18, p. 227-232, p. 309-313.
2. Jaffe HL. Tumors and Tumors Conditions of the Bones and Joints. In: Jaffe HL, editor. London: Lea & Febiger. 1972; p. 312-9.
3. Enneking WF, Berrey HB, Scarborough TM, Vander Griend AR. Clinical Musculoskeletal Pathology. In: Berrey HB, Scarborough TM, editors. Florida: UF Press Gainesville.1997; p.21-9.
4. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. Clin Orthop Relat Res. 1980; 153:106-120.
5. Mirra MJ, Picci P, Gold RH. Bone Tumors. In: Mirra MJ, editor. London: Lea & Febiger; 1989; p.941-1020.
6. Enneking WF. Staging of Musculoskeletal Tumors in Musculoskeletal Surgery. In: Enneking WF, editor. New York: Churchill-Livingstone. 1983; p.1468-76.
7. Balke M, Neumann A, Szuhai K, Angelopoulos K, August C, Gosheger G et al. A short-term in vivo model for giant cell tumor of bone. BMC Cancer. 2011; 11: 241-5.
8. Huevos A. Bone tumors. Diagnosis, treatment and prognosis. W.B. Saunders company.1991; 792:118-560.
9. Dahlin DC, Unni KK. Bone Tumors: General Aspects and Data on 3,987 Cases. 2nd ed. Charles C. Thomas: Springfield. 1986; 146:749–56.
10. Atanacković M. Patologija. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu. 2003;938:78-243.
11. Peabody TD, Gibbs CP, Jr, Simon MA. Evaluation and staging of musculoskeletal neoplasms. J Bone Joint Surg Am. 1998; 80:1204-1218.
12. Higginson J, Muir CS, Munoz N. Bone. In: Human cancer: epidemiology and Environmental causes. University Press: Cambridge. 1992; pp. 353-357.
13. Coley BL, Irving ME. Neoplasms of bone and related conditions: etiology, pathogenesis, Diagnosis and treatment. Annals of Surgery. 1962; 155.3: 471-479.
14. Inwards CY, Unni KK. Classification and grading of bone sarcomas. Hematol Oncol Clin North Am.1995; 9: 545-569.

15. Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Lechner G, Immenkamp M, Kogelnik HD, Salzer M. Knochentumoren. Georg ThiemeVerlag: Stuttgart, New York. 1984; S 1.1-1.375.
16. Green FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed Springer: New York. 2002; 157-164. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer*. 1995; 75: 203-210.
17. Greenspan A, Remagen W. Differential Diagnosis of Tumors and Tumor-like Lesions of Bones and Joints. *The new England Journal of Medicine*. 1998; 338:1393-4.
18. Aboulafia AJ, Levin AM, Blum J. Preferral Evaluation of Patients with suspected bone and soft tissue tumors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2002; 397: 83-88.
19. Anderson MW, Temple HT, Dussault RG, Kaplan PA. Compartmental anatomy: relevance to staging and biopsy of musculoskeletal tumors. *AJR Am J Roentgenol*. 1999; 173:1663-1671.
20. Abdul-Karim FW, Bauer TW, Kilpatrick SE, Raymond KA, Siegal GP. Recommendations for the Reporting of Bone Tumors. *Perspectives in Pathology. Human pathology*. 2004; 35, No10.
21. Biscaglia R, Bacchini P, Bertoni F. Giant cell tumor of the bones of the hand and foot. *Cancer*. 2000; 88: 2022-2032.
22. Masui F, Ushigome S, Fuji K. Giant cell tumor of bone: a clinicopathologic study of Prognostic factors. *Pathol Int*. 1998; 48: 723-729.
23. Marui T, Yamamoto T, Yoshihara H, Kurosaka M, Mizuno K, Akamatsu T. De novo malignant transformation of giant cell tumor of bone. *Skeletal Radiol*. 2001; 30:104-108.
24. Morris JM, Lane JI, Witte RJ, Thompson DM. Giant Cell Reparative Granuloma of the Nasal Cavity. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004; 25: 1263-1265.
25. Zheng MH, Robbins P, Xu J, Huang L, Wood DJ, Papadimitrou JM. The histogenesis of giant cell tumor of bone: a model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. *Histol Histopathol*. 2001; 16:297-307.
26. Yalcinkaya U, Ugras N, Kabul S, Ocakoglu G, Bilgen MS. Prognostic value of p53 protein expression in giant cell tumor of bone. *Pol J Pathol*. 2015; 66(4):389-96.

27. Seethala RR, Goldblum JR, Hicks DG, Lehman M, Khurana JS, Pasha TL et al. Immunohistochemical evaluation of microphthalmia-associated transcription factor expression in giant cell lesions. *Modern Pathology*. 2004; 17: 1491–6.
28. Horvai AE, Kramer MJ, Garcia JJ, O'Donnell RJ. Distribution and prognostic significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in giant-cell tumor of bone. *Mod Pathol*. 2008; 21: 423–30.
29. Dickson BC, Li SQ, Wunder JS, Ferguson P, Eslami B, Werier JA et al. Giant cell tumor of bone express p63. *Mod Pathol*. 2008; 21: 369–75.
30. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:130–4.
31. Cheng-Han L, Espinosa I, Jensen KC, Subramanian S, Zhu SX, Varma S. et al. Gene expression and profiling identifies p63 as a diagnostic marker for giant cell tumor of the bone. *Mod Pathol*. 2008; 21: 531–9.
32. Faisham WI, Aminudin MS, Zulmi W, Salzihan D, Mutum SS. Ki-67 immunohistochemistry index in stage III giant cell tumor of the bone. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010; 29:25-29.
33. Scotlandi K, Serra M, Manara C, Maurici D, Benini S, Nini G et al. Clinical relevance of Ki-67 expressions in bone tumors. *Cancer*. 1995; 75:806-14.
34. Kauzman A, Qiu SL, Bradley G, Bell, RS, Wunder JS, Kan del R. Cyclin Alterations in Giant Cell Tumor of Bone. *Mod Pathol*. 2003; 16:210–218.
35. Osaka S, Sugita H, Osaka E, Yoshida Y, Ryu J, Hemmi A et al. Clinical and immunohistochemical characteristics of benign giant cell tumor of bone with pulmonary metastases: case series. *J Orthop Surg*. 2004; 12: 55–62.
36. Aragão MS, Piva MR, Nonaka CFW, Freitas R.deA, De Souza LB, Pinto LP. Central Giant Cell Granuloma of the jaws and Giant Cell Tumor of long bones—an immunohistochemical Comparative Study. *J Appl Oral Sci*. 2007; 15:310-6.
37. Khooei A, Gharedaghi M, Ataei R. Prediction of Clinical Course and Biologic Behavior of the Bone Giant Cell Tumor Using Bax and bcl-2 Markers. *Iran J Pathol*. 2010; 5:53-9.
38. Matsubayashi S, Nakashima M, Kumagai K, Egashira M, Naruke Y, Kondo H et al. Immunohistochemical analyses of β -catenin and Cyclin D1 expression in giant cell tumor

- of bone (GCTB): A possible role of Wnt pathway in GCTB tumorigenesis. *Pathol Res Pract.* 2009; 205: 626-33.
39. Ramos RY, Haupt HM, Kanetsky PA, Donthineni RR, Arenas EC, Lackman RD et al. Giant Cell Tumors Inquiry into Immunohistochemical Expression of CD117 (c-Kit), Microphthalmia Transcription Factor, Tartrate-Resistant Acid Phosphatase and HAM-56. *Arch. Pathol. Lab.Med.* 2005; 129:360–5.
 40. Kandel R, Li SQ, Bell R, Wunder Ferguson P, Kauzman A. et al. Cyclin D1 and p21 is elevated in the giant cells of giant cell tumors. *J Orthop Res.* 2006; 24:428-37.
 41. Gamberi G, Serra M, Ragazzini P, Magagnoli G, Pazzaglia L, Ponticelli F. et al. Identification of markers of possible Prognostic value in 57 giant cell tumors of bone. *Oncology Rep.* 2003; 10:351-6.
 42. Skubitz KM. Giant cell tumor of bone: current treatment options. *Curr Treat Options Oncol.* 2014 Sep;15(3):507-18.
 45. Campanacci M, Baldini N, Boriani S, Sudanese A. Giant Cell Tumor of Bone. *J Bone and Joint Surg.* 1987; Vol. 69 - A:105-114.
 46. Heng Du, Huan Xu, Guowei Che. Malignant giant cell tumor of the rib with lung metastasis in a man. *J Thorac Dis.* 2014; 6(9):1307–1310.
 47. Benjamin T. Spike, Geoffrey M. Wahl. P53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes Cancer.* 2011; 2(4): 404–419.
 48. Rousseau MA, Handra-Luca A, Lazennec JY, Catonné Y, Saillant G. Metachronous multicentric giant-cell tumor of the bone in the lower limb. Case report and Ki-67 immunohistochemistry study. *Virchows Arch.* 2004; 445(1):79-82.
 49. De Souza PE, Paim JF, Carvalhais JN, Gomez RS. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28(2):54-8.
 50. Antal I, Sápi Z, Szendrői M. The prognostic significance of DNA cytophotometry and proliferation index (Ki-67) in giant cell tumors of bone. *Int Orthop.* 1999; 23(6):315-9.
 51. Caming CA, Scarborough TM, Enneking WF. Multicentric Giant Cell Tumor of Bone. *Clinical Orthop And Related Research.* 1997; 322: pp. 245-252.
 52. Gosheger JG. Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134(9):969-78.

53. Errani C, Ruggieri P, Asenzio MA, et al. Giant cell tumor of the extremity: a review of 349 cases from a single institution. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36:1–7.
54. Yasko AW. Giant cell tumor of bone. *Curr Oncol Rep.* 2002; 4:520–526.
55. Domovitev SV, Healey JH. Primary malignant giant-cell tumor of bone has high survival rate. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17:694–701.
56. Mendenhall WM, Zlotecki RA, Scarborough MT, Gibbs CP, Mendenhall NP. Giant cell tumor of bone. *Am J Clin Oncol.* 2006; 29:96–99.
57. Raskin KA, Schwab JH, Mankin HJ, Springfield DS, Hornicek FJ. Giant cell tumor of bone. *J Am Acad Orthop Surg.* 2013; 21:118–126.
58. Wulling M, Engels C, Jesse N, Werner M, Delling G, Kaiser E. The nature of giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001; 127:467–474.
59. Balke M, Schremper L, Gebert C, et al. Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134:969–978.
60. Alberghini M, Kliskey K, Krenacs T, et al. Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone. *Virchows Arch.* 2010; 456(1):97-103.
61. Klenke FM, Wenger DE, Inwards CY, Rose PS, Sim FH. Giant cell tumor of bone: risk factors for recurrence. *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 469:591–599.
62. Blackley HR, Wunder JS, Davis AM, White LM, Kandel R, Bell RS. Treatment of giant-cell tumors of long bones with curettage and bone-grafting. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81:811–820.
63. Turcotte RE, Wunder JS, Isler MH et al. Giant cell tumor of long bone: a Canadian Sarcoma Group study. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 397:248–258.
64. Niu X, Zhang Q, Hao L, et al. Giant cell tumor of the extremity: retrospective analysis of 621 Chinese patients from one institution. *J Bone Joint Surg Am.* 2012; 94:461–467.
65. Becker WT, Dohle J, Bernd L, et al. Local recurrence of giant cell tumor of bone after intralesional treatment with and without adjuvant therapy. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90:1060–1067.
66. Jiang HL, Jiang LM, Han WD. Wnt/ β -catenin signaling pathway in lung cancer stem cells is a potential target for the development of novel anticancer drugs. *J BUON.* 2015; 20(4):1094-100.

67. Rousseau MA, Luca AH, Lazennec JV. Metachronous multicentric giant cell tumor of the bone in the lower limb. Case report and Ki 67 immuno-histochemistry study. *VirchowsArch*. 2004;445:79-82.
68. Kandel R, Li SQ, Bell R et al. Cyclin D1 and p21 is elevated in the giant cells of giant cell tumors. *J Orthop Res*. 2006; 24(3):428-37.
69. Matsubayashi S, Nakashima M, Kumagai K, et al. Immunohistochemical analyses of beta-catenin and cyclin D1 expression in giant cell tumor of bone (GCTB): a possible role of Wnt pathway in GCTB tumorigenesis. *Pathol Res Pract*. 2009; 205(9):626-33.
70. Okubo T, Saito T, Mitomi H, et al. P53 mutations may be involved in malignant transformation of giant cell tumor of bone through interaction with GPX1. *Virchows Arch*. 2013; 463(1):67-77.
71. Chakarun CJ, Forrester DM, Gottsegen CJ, Patel DB, White EA, Matcuk GR Jr. Giant cell tumor of bone: review, mimics, and new developments in treatment. *Radiographics*. 2013; 33:197–211.
72. Wang H, Wan N, Hu Y. Giant cell tumour of bone: a new evaluating system is necessary. *Int Orthop*. 2012 Dec; 36(12):2521-7.
73. Cowan RW, Singh G. Giant cell tumor of bone: a basic science perspective. *Bone*. 2013;52:238–246.
74. Scully SP, Mott MP, Temple HT, O’Keefe RJ, O’Donnell RJ, Mankin HJ. Late recurrence of giant-cell tumor of bone. A report of four cases. *J Bone Joint Surg Am*. 1994; 76:1231 – 1233.
75. De Souza PE, Paim JF, Carvalhais JN, Gomez RS. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28(2):54-58.
76. Prosser GH, Baloch KG, Tillman RM, Carter SR, Grimer RJ. Does curettage without adjuvant therapy provide low recurrence rates in giant-cell tumors of bone. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 435:211 –218.
77. Wang HC, Chien SH, Lin GT. Management of grade III giant cell tumors of bones. *J Surg Oncol*. 2005; 92:46–51.

78. Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, Sasaki MS, Yamamuro T. P53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. *BrJCancer*. 1993;68(6):1134-1139.
79. Levine AJ, Perry ME, Chang A et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *BrJCancer*. 1994; 69(3):409-416.
80. Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, et al. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res*. 1992; 52(22):6194-6199.
81. Van der Heijden I, Dijkstra S, Campanacci D, et al. Giant Cell Tumor With Pathologic Fracture: Should We Curette or Resect?. *Clin Orthop Relat Res*. 2013; 471(3): 820–829.
82. Dongqi L, Jinlei Z, Yi L, et al. Surgery methods and soft tissue extension are the potential risk factors of local recurrence in giant cell tumor of bone. *World Journal of Surgical Oncology*. 2016; 14:114-21.
83. 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 Apr; 69(2):92–9.
84. Matthew RS, Wakenda KT, Allison GS, Steven R et al. Targeting the Giant Cell Tumor Stromal Cell: Functional Characterization and a Novel Therapeutic Strategy. *Plos one*, Open acces <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069101>.
85. Shuxin C, Chunquan L, Bingli W, et al. Identification of differentially expressed genes and their subpathways in recurrent versus primary bone giant cell tumors. *International Journal of Oncology*. 2014; 45: 1133-1142.
86. Barham W, Frump A, Sherrill T, et al. Targeting the Wnt pathway in synovial sarcoma models. *Cancer Discov*. 2013; 3(11):1286-301.
87. Ng TL, Gown AM, Barry TS et al. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol*. 2005 Jan; 18(1):68-74.
88. Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, et al. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the β -catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2002; 102:338–342.
89. Cheng DD, Hu T, Zhang HZ, Huang J, Yang QC. Factors Affecting the Recurrence of Giant Cell Tumor of Bone After Surgery: A Clinicopathological Study of 80 Cases from a Single Center. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36(5):1961-70.

90. Gong L, Liu W, Sun X, Sajdik C, Tian X, Niu X, Huang X. Histological and clinical characteristics of malignant giant cell tumor of bone. *VirchowsArch*. 2012; 460(3):327-34.
91. Radaelli E, Rustighi A, Scanziani E. Giant cell tumor of bonelike lesion in a Trp53 mutant mouse. *Toxicol Pathol*. 2012; 40(4):675-81.
92. Ohara M, Matsuura K, Akimoto E, Noma M, Doi M, Nishizaka T, Kagawa N, Itamoto T. Prognostic value of Ki67 and p53 in patients with estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer: Validation of the cut-off value of the Ki67 labeling index as a predictive factor. *Mod Clin Oncol*. 2016; 4(4):648-654.
93. Heublein S, Page SK, Mayr D, Ditsch N, Jeschke U. P53 determines prognostic significance of the carbohydrate stem cell marker TF1 (CD176) in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Jun; 142(6):1163-70.
94. 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 Jul; 136(1):220–8.
95. 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 Dec; 7:14 Suppl 4:97–100.
96. 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 May; 45(5):1015–23.
97. 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.
98. Lin H, Huang J-F, Qiu J-R, Zhang H-L, Tang X-J, Li H, et al. Significantly upregulated TACS TD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol. Pathol*. 2013; Feb;94(1):73–8.
99. 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 Jun; 10(2):258–64.

100. 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 Aug; 193(1):1–8.
101. 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.
102. 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 May; 13(3):188–95.
103. Scully SP, Mott MP, Temple HT, O'Keefe RJ, O'Donnell RJ, Mankin HJ. Late recurrence of Giant-cell tumor of bone. A report of four cases. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76:1231–1233.
104. Muheremu A, Huang Z, Niu X. Treatment for giant cell tumor of the spine metastasizing to the lung: A report of two cases and a literature review. *Oncol Lett.* 2015 Mar; 9(3):1321–1326.
105. Rock M. Curettage of giant cell tumors of bone: Factors influencing local recurrence and metastasis. *Chir Organi Mov.* 1990; 75 (I suppl.): 204–205.
106. Cheng JC, Johnston JO. Giant cell tumor of bone - Prognosis and treatment of pulmonary metastases. *Clin Orthop.* 1997; 338, 205–214.
107. Viswanathan S, Jambhekar N A. Metastatic Giant Cell Tumor of Bone Are There Associated Factors and Best Treatment Modalitie. *Clin Orthop Relat Res.* 2010; 468:827–833.
108. López-Pousa A, Broto JM, Garrido T, Vázquez J. Giant cell tumor of bone: new treatments in development. *Clin Transl Oncol.* 2015; 24.
109. Van der Heijden L, Dijkstra PD, Van de Sande MA, Kroep JR, Nout RA, Van Rijswijk CS, Bovée JV, Hogendoorn PC, Gelderblom H. The clinical approach toward giant cell tumor of bone. *Oncologist.* 2014; 19(5):550–61.
110. Wang CS, Lou JH, Liao JS, Ding XY, Du LJ, Lu Y, Yan L, Chen KM. Recurrence in giant cell tumor of bone: imaging features and risk factors. *Radiol Med.* 2013; 118(3):456–64.
111. Goldenberg RR, Campbell CJ, Bonfiglio M. Giant cell tumor of bone, an analysis of 218 cases. *J Bone and Joint Surg.* 1970; 52B: 775.

112. Stratil PG, Stacy GS. Multifocal metachronous giant cell tumor in a 15-year-old boy. *Pediatr Radiol*. 2005 Apr; 35(4):444-8.
113. Balke M, Ahrens H, Streitbuerger A, Koehler G, Winkelmann W, Gosheger G, Harges J. Treatment options for recurrent giant cell tumors of bone. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; 135(1):149-58.
114. 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.
115. 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 Sep; 64(17):6026-34.
116. 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 Apr; 211(4):303-7.
117. 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 Jun; 3(2):62-7.
118. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004 Dec; 145(12):5439-47.
119. 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 Nov; 43(11):2053-61.
120. 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 May; 45(5):1015-23.
121. 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 Jun; 156(6):2135-47.
122. 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*. 2003Feb; 199(2):208-20.

123. 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.
124. Klein EA, Assoian RK. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J. Cell Sci*. 2008 Dec; 121(23):3853–7.
125. Chen S, Li C, Wu B, Zhang C, Liu C, Lin X, Wu X, Sun L, Liu C, Chen B, Zhong Z, Xu L, Li E. Identification of differentially expressed genes and their subpathways in recurrent versus primary bone giant cell tumors. *Int J Oncol*. 2014 Sep; 45(3):1133-42.
126. 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 Dec; 45(12):901–13.
127. Witzel I-I, Koh LF, Perkins ND. Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochem Soc Trans*. 2010 Feb; 38(Pt 1):217–22.
128. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene*. 2006; 25(11):1620–8.
129. 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 Oct; 116(8):1350–8.
130. 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 Nov; 83(2):249–56.
131. 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 Feb; 122(2):122–6.
132. Cassier P, Pissaloux D, Alberti L, Ray-Coquard I, Blay JY. Targeted treatment of rare connective tissue tumors and sarcomas. *Bull Cancer*. 2010; 97(6):693-700.
133. Zhu Z, Zhang C, Zhao S, Dong Y, Zeng B. Partial wrist arthrodesis versus arthroplasty for distal radius giant cell tumors. *Int Orthop*. 2013 Nov; 37(11):2217-23.
134. Van der Heijden L, Piner SR, van de Sande MA. Pigmented villonodular synovitis: a crowdsourcing study of two hundred and seventy-two patients. *Int Orthop*. 2016; May 12. [Epub ahead of print]

135. Escribano Rueda LC, Sánchez Gutiérrez SJ, Gómez-Rice A, de Lucas Aguilar R, Gómez García A. Patellar giant cell tumor: presentation of a case and a review of the literature. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2012 Nov-Dec; 56(6):486-90.
136. Casadei R, Kreshak J, Rinaldi R, Rimondi E, Bianchi G, Alberghini M, Ruggieri P, Vanel D. Eur Imaging tumors of the patella. *J Radiol*. 2012 Aug; 27. [Epub ahead of print]
137. Yoshida Y, Kojima T, Taniguchi M, Osaka S, Tokuhashi Y. Giant-cell tumor of the patella. *Acta Med. Okayama*. 2012; 66(1):73-6.
138. Malhotra R, Sharma L, Kumar V. Giant cell tumor of the patella and its management using a patella, patellar tendon, and tibial tubercle allograft. *AR. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010 Feb; 18(2):167-9.
139. Blanc-Lonjon J, Fabre S, Schmidt-Peynet C, Defasque A, Jorgensen C, Cyteval C. Multifocal giant cell tumor of bone: a case report. *J Radiol*. 2010 Jan; 91(1 Pt 1):72-4.
140. Tang YW, Yang SW, Hsu CJ. Surgical treatment of multifocal giant cell tumor of carpal bones with preservation of wrist function: case report. *J Hand Surg Am*. 2009 Feb; 34(2):262-5.
141. Stratil PG, Stacy GS. Multifocal metachronous giant cell tumor in a 15-year-old boy. *Pediatr Radiol*. 2005 Apr; 35(4):444-8.
142. Dumford K, Moore TE, Walker CW, Jaksha. Multifocal, metachronous, giant cell tumor of the lower limb. *J Skeletal Radiol*. 2003 Mar; 32(3):147-50.
143. Greenspan A, Gernot J, Wolfgang R. *Diagnosis in Orthopaedic Oncology*. Lippincott-Williams & Wilkins. 2007 II; ch7: 389-401.
144. Rock M. Curettage of giant cell tumors of bone. Factors influencing local recurrence and metastasis. *Chir Organi*. 1990; Mov.75(I suppl.): 204-205.
145. Li J, Zhu Y, Wei Y. Fibrosarcoma development 15 years after curettage and bonegrafting of giant cell tumor of bone. *Orthopedics*. 2014; 37(5).

SPISAK SKRAĆENICA

GCT – gigantocelularni tumor

G – gradus

T – lokalizacija

M – metastaze

GCTB – gigantocelularni tumor kosti

IHC – imunohistohemijska metoda

At – antitelo

Rb protein – retinoblastoma protein

MPF – *maturation promoting factor*

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

CT – kompjuterizovana tomografija

MLR – multivarijantna logistička regresija

MMA – medicinski cement

BIOGRAFIJA

Dr Nenad Lujčić je rođen u Beogradu 04.09.1963.god. Osnovnu školu kao srednju završio je u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao 1983. god sa prosečnom ocenom 8,5. Magistarsku tezu pod nazivom „Indikaciona područija u lečenju osteoklastoma“, odbranio 2003.god. Specijalistički ispit položio 1996. god. Položio subspecijalistički ispit nakon stručnog usavršavanja 1998.god. na Shanz Hospital, Gainesville, FL, USA, u klasi Prof dr W. Ennekinga. Koautor knjige „Tumori i njima slične lezije lokomotornog sistema“. 2012.god. proveo u inst. „Rizzoli“ Bologna Italy, šest meseci i položio ispit upravljanja tkivnom bankom.

Autor je zaposlen na Insittutu za ortopedsko hirurške bolesti „Banjica“u Beogradu i trenutno radi na mestu načelnika Sektora za opšte medicinske poslove. I polje interesovanja mu je Ortopedsko Hirurška Onkologija.

Dr Nenad Lujčić je član Srpskog lekarskog društva i Srpske asocijacije ortopeda i traumatologa, Međunarodni je član Američke asocijacije ortopedskih hirurga (AAOS). Trenutno je član je Republičke stručne komisije za transplantacije ćelija i tkiva i predsednik Upravnog odbora Instituta za reumatologiju Republike Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a NENAD B. LUJIĆ

broj upisa _____

Izjavljujem

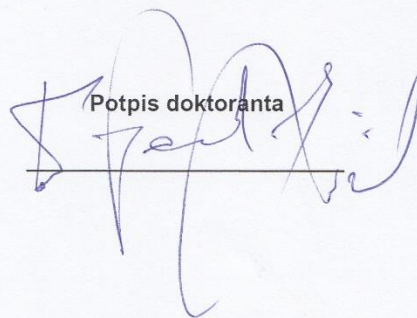
da je doktorska disertacija pod naslovom :

„ZNAČAJ EKSPRESIJE FAKTORA PROLIFERACIJE I PROTEINA REGULACIJE ĆELIJSKOG CIKLUSA U GIGANTOCELULARNOM TUMORU KOSTI“

- 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.

U Beogradu, _____

Potpis doktoranta



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: NENAD B. LUJIĆ

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada:

**„ZNAČAJ EKSPRESIJE FAKTORA PROLIFERACIJE I PROTEINA REGULACIJE
ĆELIJSKOG CIKLUSA U GIGANTOCELULARNOM TUMORU KOSTI“**

Mentor: **Prof. Dr JELENA SOPTA**


Potpisani: _____


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.

U Beogradu, _____

Potpis doktoranta


Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

**„ZNAČAJ EKSPRESIJE FAKTORA PROLIFERACIJE I PROTEINA REGULACIJE
ČELIJSKOG CIKLUSA U GIGANTOCELULARNOM TUMORU KOSTI“**

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 poledini lista).

U Beogradu, _____

Potpis doktoranta
