

# Čimbenici rizika za razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože nakon transplantacije bubrega

---

**Borlinić, Tajana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:689367>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tajana Borlinić**

**Čimbenici rizika za razvoj zloćudnih  
nemelanomskih tumora kože nakon  
transplantacije bubrega**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tajana Borlinić**

**Čimbenici rizika za razvoj zloćudnih  
nemelanomskih tumora kože nakon  
transplantacije bubrega**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Kliničkom zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Zrinka Bukvić Mokos, dr. med.

Suvoditeljica rada: prof.dr. sc. Nikolina Bašić–Jukić, dr. med.

Hvala svima bez kojih izrada ove disertacije ne bi bila moguća:

- mojoj mentorici prof. dr. sc. Zrinki Bukvić Mokos na neizmjernej stručnoj i moralnoj pomoći, strpljenju, stalnom poticaju i ohrabrenju pri ostvarenju mojih želja i vizija
- mojoj menotrici prof. dr. sc. Nikolini Bašić-Jukić na ideji, stručnoj pomoći i nepresušnoj volji tijekom izrade ove disertacije
- prof.dr.sc. Marijani Ćorić sa Zavoda za patologiju KBC Zagreb i njenom timu na uloženom trudu, vremenu, strpljenju i savjetima pri prikupljanju uzoraka i imunohistokemijskoj analizi
- patolozima: Klinike za dermatovenerologiju KBC Zagreb te Općih i Županijskih bolnica Čakovec, Požega, Pula, Šibenik, Vinkovci i Varaždin na nesebičnom ustupanju uzoraka za imunohistokemijsku analizu
- posebno hvala gospodinu Ivanu Krešimiru Lukiću na bezgraničnoj prijateljskoj pomoći i savjetima tijekom statističke obrade podataka
- mom učitelju, prof.dr.sc. Srećku Gajoviću jer me naučio uvijek istraživati dalje
- mojim roditeljima koji su me poticali uvijek postići više

Rad posvećujem Eni, Maji, Ledi i Marinku.

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA

POPIS SLIKA

POPIS TABLICA

1. UVOD.....	1
1.1. TEMELJNE ODREDNICE.....	1
1.2. BAZOCELULARNI KARCINOM.....	1
1.2.1. Definicija .....	1
1.2.2. Epidemiologija.....	1
1.2.3. Patofiziologija.....	2
1.2.3.1. Čimbenici rizika .....	2
1.2.3.2. Genetski čimbenici .....	3
1.2.3.3. Fotokarcinogeneza.....	3
1.2.3.4. Imunosupresija .....	4
1.2.4. Klinička slika .....	4
1.2.5. Histološka obilježja .....	6
1.2.6. Diferencijalna dijagnoza .....	7
1.2.7. Dijagnostika .....	8
1.2.8. Liječenje.....	8
1.3. PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE.....	11
1.3.1. Definicija .....	11
1.3.2. Epidemiologija.....	11
1.3.3. Patofiziologija.....	12
1.3.3.1. Čimbenici rizika .....	12
1.3.3.2. Genetski čimbenici .....	13
1.3.3.3. Imunosupresija .....	14
1.3.4. Klinička slika .....	14
1.3.5. Histološka obilježja .....	15
1.3.6. Diferencijalna dijagnoza.....	16
1.3.7. Dijagnostika .....	16
1.3.8. Liječenje.....	17

1.4. KRONIČNA BUBREŽNA BOLEST .....	19
1.5. BUBREŽNO NADOMJESNO LIJEČENJE .....	22
1.5.1. Hemodijaliza (HD) .....	22
1.5.2. Peritonejska dijaliza .....	23
1.5.3. Transplantacija bubrega .....	23
1.5.3.1. Imunosupresivna terapija .....	26
1.5.3.2. Indukcija .....	26
1.5.3.3. Inicijalna imunosupresija u fazi održavanja .....	27
1.5.3.4. Dugotrajna terapija održavanja.....	27
1.6. IMUNOSUPRESIVNI LIJEKOVI I TUMORI .....	28
1.7. WNT SIGNALNI PUTOVI.....	30
1.7.1. Organizacija gena i funkcija proteina .....	30
1.7.2. Pregled Wnt/PCP signalnog puta.....	31
1.7.3. Pregled Wnt/Ca <sup>2+</sup> signalnog puta.....	33
1.7.4. Pregled Wnt/ $\beta$ – katenin signalnog puta .....	34
1.7.5. Wnt signalni putovi i tumori .....	38
1.7.6. Wnt4 .....	39
2. HIPOTEZA .....	43
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	44
Opći cilj.....	44
Specifični ciljevi .....	44
4. MATERIJALI I METODE .....	45
4.1. ISPITANICI .....	45
4.1.1. ETIČKI ASPEKTI .....	46
4.2. PLAN EPIDEMIOLOŠKOG ISTRAŽIVANJA I METODE .....	46
4.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA .....	47
4.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	48
5. REZULTATI .....	50
5.1. OPĆI PODATCI ISPITANIKA .....	50
5.2. UČESTALOST ZLOĆUDNIH NEMELANOMSKIH TUMORA KOŽE U BOLESNIKA S TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	51

5.3. IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA I ZLOĆUDNI NEMELANOMSKI TUMORI KOŽE .....	63
5.3.1. Imunosupresivna terapija .....	63
5.3.2. Odnos imunosupresivne terapije i pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora kože .....	66
5.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA IZRAŽENOSTI Wnt4 .....	72
5.4.1. Izraženost Wnt4 u zdravoj koži .....	72
5.4.2. Izraženost Wnt4 u zloćudnim nemelanomskim tumorima kože .....	73
5.4.2.1. Rezultati analize imunohistokemijske izraženosti Wnt u bazocelularnom karcinomu kože .....	74
5.4.2.2. Rezultati analize imunohistokemijske izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu kože.....	77
6. RASPRAVA .....	81
6.1. OPĆI PODATCI ISPITANIKA .....	81
6.2. UČESTALOST ZLOĆUDNIH NEMELANOMSKIH TUMORA KOŽE U BOLESNIKA S TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	83
6.3. IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA I ZLOĆUDNI NEMELANOMSKI TUMORI KOŽE .....	88
6.3.1. Imunosupresivna terapija .....	88
6.3.2. Odnos imunosupresivne terapije i pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora kože .....	91
6.4. ANALIZA IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJANJA Wnt4 PROTUTIJELOM ....	95
6.4.1. Izraženost Wnt4 u zdravoj koži .....	95
6.4.2. Izraženost Wnt4 u zloćudnim nemelanomskim tumorima kože.....	96
6.4.2.1. Analiza imunohistokemijske izraženosti Wnt4 u bazocelularnom karcinomu kože.....	96
6.4.2.2. Analiza imunohistokemijske izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu kože.....	98
7. ZAKLJUČCI .....	100
8. SAŽETAK.....	101
9. SUMMARY.....	103
10. LITERATURA .....	105
11. ŽIVOTOPIS .....	124

## POPIS KRATICA

ALG	antilimfocitni globulin
APC	engl. adenomatous polyposis coli
ATG	antitimocitni globulin
AZA	azatioprin
BCC	bazocelularni karcinom (engl. basal cell carcinoma)
BCL9	engl. B-cell lymphoma 9 protein
BMP	skupina čimbenika rasta (engl. bone morphogenetic proteins)
BTB	bolesnici s transplantiranim bubregom
CAMKII	kalcij – kalmodulin ovisna kinaza II
CBP	modifikator histamina (engl. CREB-cAMP response element – binding protein)
CC – TT	parovi nukleotidnih baza citozin – citozin, timin – timin
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
Ci	čimbenik prepisivanja <i>cubitus interruptus</i>
CK1alfa	kazein kinaza 1
CNI	kalcineurinski inhibitor
CTNNB1	gen koji prepisuje beta – katenin
CYC	ciklosporin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleid acid)
DSH	djelovateljske molekule (engl. Dishevelled)
EGFR	receptor za epidermalni čimbenik rasta (od engl. epidermal growth factor receptor)
FoxN1	čimbenik prepisivanja (engl. forkhead box N1)
Fzd	receptor Frizzled
GFR	glomerularna filtracija (engl. glomerular filtration rate)



Gli	glioblastoma proteini
GSK3beta	glikogen sintetaza kinaza 3beta
HD	hemodijaliza
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. human immunodeficiency virus)
HLA	sustav tkivnih antigena (engl. human leukocyte antigen)
HPV	ljudski papiloma virus (engl. human papiloma virus)
IL2 – RA	antagonist interleukin 2 receptora
JNK	signalni G protein (engl. C-Jun amino – terminal kinase)
K	raščišćavanje (engl. clearance)
KBB	kronična bolest bubrega
KDIGO	engl. Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KZB	kronično zatajenje bubrega
LEF/TCF	jezgrin čimbenik prepisivanja LEF/TCF (engl. lymphoid enhancer – binding factor/ T cell specific)
LRP	engl. lipoprotein receptor – related protein
MAPK	mitogen-aktivirana protein kinaza (engl. mitogen activated protein kinase)
MED	minimalna eritemska doza
MFM	mikofenolat – mofetil
MMP7	matriks metaloproteaza 7
mTOR	ljudski enzim kinaza koji sudjeluje u regulaciji staničnih procesa (engl. mechanistic target of rapamycin, ranije mammalian target of rapamycin)
Musk	tirozin kinaza skeletnog mišića (od engl. muscle skeletal tyrosin kinase)
NER	ekscizijski popravak nukleotida (engl. nucleotide excision repair)

NFAT	jezgrin čimbenik aktiviranih stanica (engl. Nuclear factor of activated cells)
NKF – KDOQI	National Kidney Foundation – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
NMSC	nemelanomski kožni tumor (engl. non-melanoma skin cancer)
NOTCH1	engl. <i>Notch homolog 1</i>
PCP	planarni polarni stanični put (engl. planar cell polarity)
PDT	fotodinamska terapija (engl. photodynamic therapy)
PKC	protein kinaza C
PLC	fosfolipaza C
PTCH1	<i>Patched 1</i> gen
Ptch – 1	transmembranski protein <i>Patched – 1</i>
Ptk	protein tirozin kinaza (engl. protein tyrosin kinase)
RAS	porodica gena u ljudi i životinja uključena u prijenos signala između stanica
Rho/Rac	signalni G proteini
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleid acid)
Ror	receptor nalik tirozin kinazi (engl. tyrosin kinase – like orphan receptor)
Ryk	receptor tirozin kinaze (engl. receptor tyrosin kinase)
SCC	planocelularni karcinom (engl. squamous cell carcinoma)
SHH	engl. <i>sonic hedgehog</i> protein
Smo	engl. Smoothened
STAT3	pretvornik signala i activator transkripcije 3 (engl. Signal transducer and activator of transcription 3)
TAC	takrolimus
TLE	engl. transducin – like enhancer of split

TP53	tumor supresorski gen p53
TF	čimbenik prepisivanja (engl. transcription factor)
UV	ultraljubičaste zrake
UVA	ultraljubičaste A zrake
UVB	ultraljubičaste B zrake
Wnt	engl. wingless type mouse mammary tumor virus integration site
6 – TG	6 – tiogvanin

## POPIS SLIKA:

Slika 1. Bazocelularni karcinom kože. ....	6
Slika 2. Planocelularni karcinom kože. ....	15
Slika 3. Prikaz wnt/PCP signalnog puta. ....	32
Slika 4. Pregled Wnt/Ca <sup>2+</sup> signalnog puta. ....	34
Slika 5. Wnt beta kateninski put: „deaktivirano“ stanje .....	35
Slika 6. Wnt/ beta kateninski put: „aktivirano“ stanje. ....	37
Slika 7. Učestalost zloćudnih nemelanomskih tumora kože. ....	51
Slika 8. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora raspoređena po spolu. .	53
Slika 9. Vrijeme od transplantacije do pojave tumora ovisno o spolu bolesnika. .....	54
Slika 10. Starost bolesnika kod razvoja zloćudnih nemelanomskih tumora kože. .....	56
Slika 11. Vrijeme liječenja hemodijalizom prije transplantacije.....	57
Slika 12. Starost bolesnika pri transplantaciji bubrega prije i nakon 2010. godine.....	58
Slika 13. Vrijeme od transplantacije do oboljevanja od tumora kod bolesnika transplantiranih prije i nakon 2010. godine.....	59
Slika 14. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože bolesnika s transplantiranim bubregom ovisno o prebivalištu. ....	61
Slika 15. Vrijeme do razvoja tumora ovisno o prebivalištu bolesnika. ....	62
Slika 16. Raspodjela imunosupresivne terapije.....	65
Slika 17. Udio bolesnika koji su oboljeli od zloćudnih nemelanomskih tumora kože tijekom imunosupresije pojedinim kalcineurinskim inhibitorom. ....	69
Slika 18. Udio bolesnika koji su oboljeli od zloćudnih nemelanomskih tumora kože tijekom imunosupresije pojedinim antiproliferativnim lijekom. ....	70
Slika 19. Unutarstanični raspored Wnt4 u keratinocitima zdravog epidermisa. ....	72
Slika 20. Raspored Wnt4 pozitiviteta u stanicama bazocelularnog karcinoma kože.....	73
Slika 21. Raspored Wnt4 pozitiviteta u stanicama planocelularnog karcinoma kože.....	74
Slika 22. Izraženost Wnt4 u bazocelularnom karcinomu.....	76
Slika 23. Izraženost Wnt4 u planocelularnom karcinomu. ....	79

## POPIS TABLICA

<b>Tablica 1. Odnos glomerularne filtracije i albuminurije u kroničnoj bolesti bubrega. ....</b>	<b>21</b>
<b>Tablica 2. Bolesnici s transplantiranim bubregom prema spolu i prebivalištu. ....</b>	<b>50</b>
<b>Tablica 3. Raspodjela imunosupresivne terapije kalcineurinskim inhibitorima u bolesnika s transplantiranim bubregom.....</b>	<b>64</b>
<b>Tablica 4. Raspodjela imunosupresivne terapije ostalih imunosupresivnih lijekova u bolesnika s transplantiranim bubregom. ....</b>	<b>64</b>
<b>Tablica 5. Pojavnost NMSC kod bolesnika na trojnoj i dvojnoj imunosupresivnoj terapiji. ....</b>	<b>66</b>
<b>Tablica 6. Broj i udio zloćudnih nemelanomskih tumora kože bolesnika s transplantiranim bubregom koji primaju terapiju takrolimus. ....</b>	<b>67</b>
<b>Tablica 7. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože u bolesnika koji kao jedan od imunosupresiva primaju kalcineurinski inhibitor ciklosporin A. ....</b>	<b>68</b>
<b>Tablica 8. Cox regresijska analiza prediktora nastanka tumora.....</b>	<b>71</b>
<b>Tablica 9. Imunohistokemijska analiza izraženosti Wnt4 u bazocelularnom karcinomu. ....</b>	<b>75</b>
<b>Tablica 10. Usporedba izraženosti Wnt4 u bazocelularnom karcinomu kože i zdravoj koži. ....</b>	<b>76</b>
<b>Tablica 11. Imunohistokemijska analiza izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu. ....</b>	<b>78</b>
<b>Tablica 12. Analiza izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu i zdravoj koži.....</b>	<b>79</b>

## **1. UVOD**

### **1.1. TEMELJNE ODREDNICE**

Transplantacija bubrega najbolja je metoda liječenja kroničnoga bubrežnoga zatajenja. Kako organizam ne bi odbacio presađeni organ, u transplantiranih bolesnika potrebna je doživotna imunosupresivna terapija.

Bolesnici koji dugotrajno uzimaju imunosupresivnu terapiju pokazuju veću sklonost razvoju tumora kože. Povećani broj tumora kože predstavlja i veliki javnozdravstveni problem te se stoga nameće sve veća potreba za ranim otkrivanjem tumora i njihovim liječenjem. Veliki se naponi ulažu u proučavanje patofiziologije ovih tumora, kako bi se invazivni tipovi tumora što prije prepoznali, a samim tim i bolje liječili.

Zloćudnim nemelanomskim tumorima kože (NMSC) smatramo bazocelularni i planocelularni karcinom kože, adneksalne tumore, limfome kože, karcinom Merkelovih stanica i druge rijetke tumore. No, kada govorimo o nemelanomskim tumorima kože, de facto mislimo na bazocelularni i planocelularni karcinom kože.

### **1.2. BAZOCELULARNI KARCINOM**

#### **1.2.1. Definicija**

Bazocelularni karcinom (BCC) je spororastući zloćudni epidermalni tumor niskog malignoga potencijala.

#### **1.2.2. Epidemiologija**

Bilježenje pojavnosti tumora kože, pa tako i bazocelularnog karcinoma kože razlikuje se ovisno o zakonodavnim odrednicama pojedine države. Bazocelularni karcinom smatra se tumorom sporoga rasta i niskoga malignog potencijala te ga se obično ne

mora prijavljivati Nacionalnim registrima za tumore. U posljednjih 15 godina pojačava se tendencija bilježenja pojavnosti BCC, čime se doznaje kako je broj kirurški liječenih BCC porastao za 70% (1), s općim povećanjem od 7% godišnje (2). Epidemiološki podatci zemalja koje bilježe pojavnost BCC navode kako je bazocelularni karcinom u europskim državama zastupljen gotovo jednako kao svi ostali tumori zajedno (1,3). Pojavnost standardizirana po godinama ukazuje na pojavnost od 77–158 karcinoma na 100 000 osoba godišnje (4). U Sjedinjenim Američkim Državama pojavnost bazocelularnog karcinoma je također visoka, s tendencijom rasta (5). U Republici Hrvatskoj zabilježena je incidencija od 33,6 za muškarce i 24,5 za žene na 100 000 osoba godišnje (6). Trogodišnji kumulativni rizik za razvoj sljedećeg bazocelularnog karcinoma u oboljelih je 44%, što je 10 puta više nego u osoba koje nisu imale tumor (7).

Pojavnost BCC veća je u muškaraca nego u žena, a muškarci imaju i veći rizik nastanka multiplih bazocelularnih karcinoma (8,9). Pokazano je i linearno povećanje incidencije BCC u žena mlađih od 40 godina ukoliko su bile izložene umjetnim izvorima UV svjetla za postizanje tamnijeg tena, osobito prije 25. godine života (10,11).

Sve veći broj osoba starije životne dobi u populaciji pridonosi povećanoj pojavnosti BCC. Čak 80% svih BCC nastaje u osoba starijih od 60 godina, no bilježi se povećanje pojavnosti i u osoba mlađe životne dobi (9).

### **1.2.3. Patofiziologija**

#### **1.2.3.1. Čimbenici rizika**

Čimbenici rizika za nastanak bazocelularnog karcinoma kože su genetska predispozicija, tip kože I i II po Fitzpatrick-u, višestruke opekline od sunca u mladosti, starija životna dob, muški spol, imunosupresija i izloženost karcinogenima (npr. arsen), a najveći rizik za nastanak BCC je izloženost ultraljubičastim (UV) zrakama.

### 1.2.3.2. Genetski čimbenici

Gorlin Goltz sindrom, autosomno dominantna bolest, koju uz ostale značajke karakteriziraju multipli bazocelularni karcinomi, pokazao je karakterističnu mutaciju u genu PTCH1, tj. mutacije u tzv. *Hedgehog* signalnom putu.

*Sonic Hedgehog* signalni put regulira embrionalni razvoj tako da kontrolira proliferaciju stanica i apoptozu. Identifikacijom Hedgehog receptora Ptch–1 dobila se poveznica između toga signalnoga puta i pojavnosti karcinoma.

PTCH1 kodira transmembranski protein *Patched–1* (Ptch–1) koji je receptor za protein *sonic hedgehog* (SHH). Vežanje SHH na Ptch-1 aktivira i stabilizira receptor Smoothened (Smo). Aktivirani Smo pokreće signalnu kaskadu zbivanja kodirajući transmembranske proteine te pokreće unutarstanične signale za regulaciju protein-kinaza koje aktiviraju čimbenike prepisivanja *cubitus interruptus* (Ci) proteine i *glioblastoma* proteine (Gli). Aktivacija Gli proteina pokreće složene postupke unutarstaničnih gena (12). Ptch–1 se ponaša kao tumor–supresorski gen, potiskuje Smo te izostaje prepisivanje gena i proliferacija stanica. Gubitak funkcije Ptch-1 dovodi do smanjene supresije, tj. aktivacije Smo (13). Aktivirani Smo pokreće kaskadu staničnih zbivanja koje uzrokuju prepisivanje gena unutar jezgre stanice čime oštećena stanica ne može ući u apoptozu (12). Francuski autori pokazali su mutaciju gena PTCH1 u 70% osoba s obiteljskim bazocelularnim karcinomima (14). Kod sporadičnih BCC gubitak funkcije PTCH1 može se naći kod 54–67% tumora, a gubitak funkcije Smo u 10–20% tumora (15, 16).

Ostali geni čija je ekspresija povećana pod utjecajem PTCH1 gena u raznim tkivima jesu članovi Wnt/Wg i BMP/TGFb obitelji gena (17).

Novija istraživanja karcinogeneze pokazuju i povišenu količinu beta-ksenina u bazocelularnom karcinomu i njihovu moguću ulogu u lokalnoj invazivnosti bazocelularnih karcinoma (18, 19).

### 1.2.3.3. Fotokarcinogeneza

Točan mehanizam fotokarcinogeneze nije do kraja istražen, no osnovni element je oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNA) uzrokovano UV zrakama. Na



životinjskim modelima pokazano je kako UVB uzrokuje veća oštećenja DNA od UVA zraka. Temeljna oštećenja potaknuta UVB zrakama jesu stvaranje ciklopirimidinskih dimera i pirimidinskih fotoprodukata (20). Oštećenja UVA zrakama pripisuju se oksidativnom oštećenju, no novija istraživanja pokazuju kako UVA zrake također uzrokuju nastanak ciklopirimidinskih dimera (21). Osim toga, popravak oštećenih stanica smanjen je pod utjecajem UVA zraka.

Mutageni fotoprodukti nastali oštećenjem UV zrakama uzrokuju specifične mutacije osjetljivih gena. Mutacije osobito pogađaju p53, *patched-1* i Smo gene u nemelanomskim kožnim tumorima. Mutacije u genima za *Hedgehog* signalni put, osobito PTCH1, smatraju se najvažnijim za nastanak BCC (22).

#### 1.2.3.4. Imunosupresija

Bolesnici s transplantiranim organima pokazuju puno veći rizik za pojavnost karcinoma. Taj je rizik za razvoj bazocelularnog karcinoma do 10 puta veći nego kod bolesnika koji nisu imunosuprimirani (23).

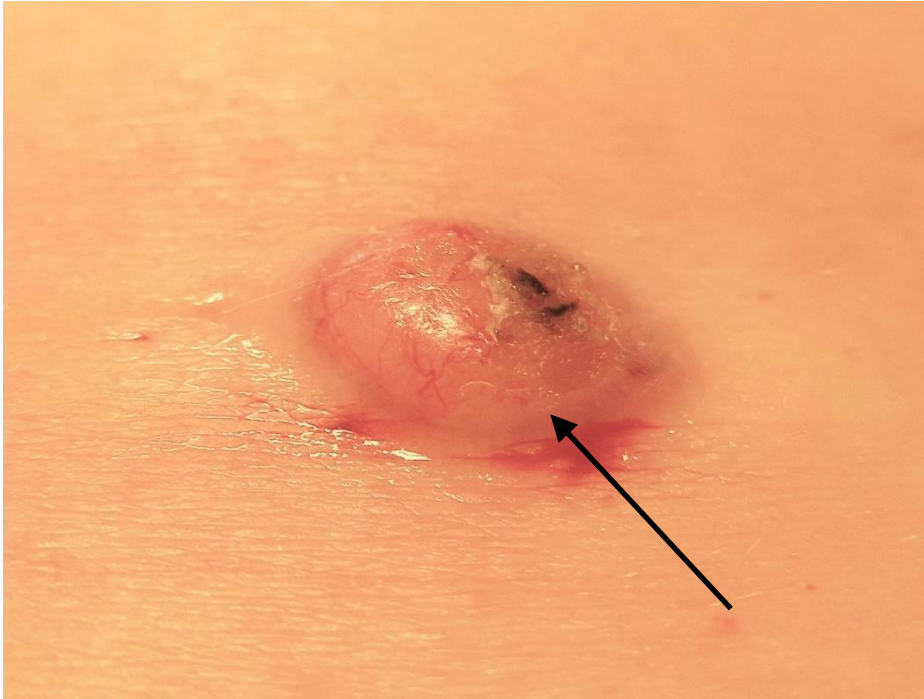
Bolesnici koji su inficirani virusom humane imunodeficijencije (HIV+) također imaju povišenu pojavnost kožnih tumora. Pojavnost nemelanomskih tumora kože kod HIV+ osoba je 1426 na 100 000 osoba godišnje, a kod HIV- bolesnika 766 na 100 000 osoba godišnje, što je prilagođeni omjer od 2:1. Prilagođeni omjer za BCC također iznosi 2:1 (24). Bolesnici koji dobivaju antiretrovirusnu terapiju za HIV infekciju imaju manji rizik za nastanak NMSC od osoba koje nisu liječene antiretrovirusnom terapijom (25).

#### 1.2.4. Klinička slika

Bazocelularni karcinom klinički se može prezentirati kao: nodularni, površinski, morfeiformni, ulcerirani i uznapredovali ili metastatski BCC.

1. **Nodularni** bazocelularni karcinom najčešća je varijanta bazocelularnog karcinoma. Očituje se kao solitarna papula ili nodul, sedefastog odsjaja, prožeta teleangiektazijama (Slika 1). Ukoliko je pigmentiran, klinički može nalikovati malignom melanomu.

2. **Površinski** bazocelularni karcinomi najčešće se nalaze na trupu i rjeđe na udovima. Klinički se očituju kao eritematozno žarište nepravilnog oblika, blago uzdignutih rubova, s ljuskama ili krustama na površini. U središnjem dijelu promjena može biti atrofična i prožeta teleangiektazijama. Iako pokazuju sklonost uglavnom površinskom širenju, površinski bazocelularni karcinomi mogu razviti i vertikalni rast s ulceracijama i zahvaćanjem dubljih struktura.
3. **Morfeiformni** (sklerodermiformni) bazocelularni karcinom rjeđi je oblik BCC. Prezentira se kao indurirana promjena blago ispod ili iznad razine kože, boje okolne kože ili boje slonovače. Može sličiti lokaliziranom obliku sklerodermijskog plaka. Površina je obično glatka i sjajna, a rijetko ulcerira.
4. **Ulcerirani** bazocelularni karcinom počinje kao sedefasta makula ili papula koja ulcerira kako se tumor povećava. Rub promjene obično je induriran, a središnji dio tumora nalazi se ispod površine kože. Takvi tumori podložni su destrukciji okolnog tkiva, osobito na licu.
5. **Pigmentirani** bazocelularni karcinom klinički se može prikazati kao nodularni, mikronodularni ili površinski bazocelularni karcinom, no histološki je određen gnijezdima bazaloidnih stanica, obiljem melanina i makrofaga i umjerenim upalnim infiltratom. Melanociti su smješteni između gnijezda tumora, a melanofazi u stromi (26).
6. **Mikronodularni** bazocelularni karcinom jest histološka podvarijanta koja se klinički prezentira kao makula, papula ili plak koju je teško klinički razlikovati od nodularnog bazocelularnog karcinoma. Taj je oblik karcinoma izrazito invazivan, sa subkliničkim metastazama i visokom stopom recidiva (27).
7. **Bazoskvamozni** karcinom jest tumor koji posjeduje histološke karakteristike i bazocelularnog i planocelularnog karcinoma. Biološke karakteristike tumora više sličje planocelularnom nego bazocelularnom karcinomu, s češćim recidivima i metastazama. Smatra se da oko 5% ovih tumora metastazira (27).



**Slika 1. Bazocelularni karcinom kože.**

Prikazan je nodularni tip bazocelularnog karcinom kože u transplantiranog bolesnika; klinički se prikazuje kao nodularna promjena sedefastog odsjaja s krustom na površini, prožeta teleangiektazijama, lumbosakralno.

### **1.2.5. Histološka obilježja**

Nodularni BCC histološki je obilježen velikim solidnim lobulima atipičnih bazaloidnih stanica s perifernim palisadiranjem. Bazaloidne stanice nalaze se u papilarnom ili u retikularnom dermisu, a od okolne su strome odvojene prostorima poput proreza. Nema mitozu niti nekrozu.

Površinski BCC opisuje se kao površinsko nakupljanje atipičnih bazaloidnih stanica unutar epidermisa ili postranično uz adneksalne strukture. Mitoze i nekroza se obično ne nalaze.

Morfeiformni BCC karakteriziran je brojnim tračcima sastavljenim od nekoliko stanica koje se prikazuju kao tanje ili deblje niti u fibroznoj stromi te invadiraju duboke slojeve dermisa. Obično su prisutne pojedinačne nekrotične stanice te mitotska aktivnost.

Značajke ulcerirajućeg ili infiltrativnog BCC su slabije ograničeni tumori koji pokazuju znakove invazije subkutanog tkiva u obliku tračaka i stupaca atipičnih bazaloidnih stanica. Česte su mitoze, a mogu se naći i pojedinačne nekrotične stanice.

Mikronodularni tip BCC je invazivni tip BCC koji se prikazuje kao tumor sastavljen od brojnih gnjezdastih nakupina atipičnih bazaloidnih stanica koje zalaze duboko u dermis, a mogu pokazivati i znakove perineuralne invazije.

Bazoskvamozni BCC histološki se sastoji od šiljatih jezičaca infiltrirajućih bazaloidnih stanica s perifernim palisadiranjem (28).

### 1.2.6. Diferencijalna dijagnoza

Bazocelularni karcinom potrebno je razlikovati od drugih malignih i benignih tumora kože. Fibromatozni nevusi mogu sličiti bazocelularnom karcinomu, no kod nevusa nema povećanja lezije, krvarenja ili ulceriranja s tipičnim uzdignutim rubovima. *Chondrodermatitis nodularis* uške često je bolan na palpaciju tako da se lako može razlikovati od inače bezbolnog BCC. Sebacealna hiperplazija često se nalazi kao multiple lezije s centralnim ulegnućem, a nalazi se na seborejičkim područjima kože. *Molusca contagiosa* posjeduju karakteristično središnje udubljenje i „čep“ s virusnim inkluzijama. Keratoakantom tipično posjeduje centralni keratinizirajući „čep“, razvoj lezije je puno brži nego kod bazocelularnog karcinoma te je moguća i spontana involucija. Planocelularni karcinom, za razliku od bazocelularnog, često nastaje iz premaligne lezije na prethodno oštećenoj koži, a baza promjene je eritematozna. Bowenova bolest, psorijaza ili ekcem također mogu sličiti površinskom bazocelularnom karcinomu. Pomnom inspekcijom te detaljnom anamnezom, klinički se vrlo lako mogu isključiti psorijaza ili ekcem, no bazocelularni karcinom i Bowenovu bolest često je moguće razlikovati jedino patohistološki. Posebna pažnja potrebna je kod razlikovanja pigmentiranog bazocelularnog karcinoma i malignog melanoma. Rub BCC je uzdignut, teleangiektatičan i multinodularan, no ukoliko postoji dvojba, promjenu je najbolje ukloniti u cijelosti i histološki analizirati (29).

### 1.2.7. Dijagnostika

Bazocelularni karcinom dijagnosticira se na temelju anamneze i kliničke slike, a dijagnoza se potvrđuje histološki. Korištenje neinvazivnih optičkih metoda, kao što je dermatoskopija, ukoliko ju provode educirane osobe, također uvelike može pomoći dijagnozi (30).

Dermatoskopske karakteristike bazocelularnog karcinoma su sjajno-bijele do crvene zone u svim lezijama, erozije u 78,6% lezija, kratke fine teleangiektazije (66,6%) i plavo-sivi globuli (14,3%). Dodatne strukture koje se mogu vidjeti dermatoskopom jesu područja slična listu, razgranate teleangiektazije te velika plavo–siva jajolika gnijezda (31, 32).

Biopsija i patohistološka analiza potrebne su za potvrdu dijagnoze, a manje je tumore najbolje ukloniti u cjelosti te histološki analizirati.

### 1.2.8. Liječenje

Odabir metode liječenja BCC ovisi o kliničkoj slici, komorbiditetima bolesnika i procjeni kliničara. Pojedine države izdale su vlastite smjernice za terapiju nemelanomskih kožnih tumora, ovisno o vrsti i raširenosti tumora (33).

1. **Kirurško uklanjanje (ekscizija u cijelosti)** jest zlatni standard u terapiji bazocelularnih karcinoma. Bazocelularne karcinome potrebno je otkloniti s 4mm zdravoga ruba ukoliko to lokalizacija tumora dopušta. Na mjestima gdje bi bile potrebne masivne rekonstrukcije, karcinom se može ukloniti i s manjim rubom. Ukoliko dođe do recidiva tumora, šira ekscizija s rekonstrukcijom ili Mohs mikrografska kirurška metoda je bolja opcija (33). Kirurško uklanjanje, uz patohistološku analizu, vrlo je dobar pokazatelj uspješnosti zahvata te biološkog ponašanja tumora i sklonosti recidivima.
2. **Radioterapija** jest tretiranje tumora mekim rentgenskim zrakama. Pogodna je u bolesnika s recidivirajućim karcinomima, kod multinodularnih BCC gdje je teško predvidjeti zdravi rub tkiva, kod specifičnih lokalizacija tumora (npr. nos, vjeđe) i u bolesnika koji iz bilo kojeg razloga nisu pogodni za kirurško liječenje. U usporedbi sa kirurškim liječenjem, kontrola rubova i uklanjanje tumora u potpunosti ne može se sa sigurnošću utvrditi. Nakon radioterapije

povećana je vjerojatnost nuspojava u smislu poslijeiradijacijskog dermatitisa, alopecije i tumora izazvanih zračenjem, tako da je zračenje metoda koju je bolje primijeniti u osoba nakon 60 godina starosti (34).

3. **Fotodinamska terapija (PDT)** jest iradijacija crvenim svjetlom, valne duljine od 630nm, tumora koji je prethodno fotosenzibiliziran metilaminolevulinskom ili aminolevulinskom kiselinom. Iradijacija fotosenzibiliziranog tumora vidljivim svjetlom dovodi do citotoksičnog učinka na tumorske stanice te do uništenja manjih tumora. PDT se pokazala učinkovitijom kod površinskih nego kod nodularnih BCC, ali i vrlo dobrom kod nodularnih tumora veličine do 2cm. Uspješnost fotodinamske terapije kod površinskih BCC iznosi 92%, a kod nodularnih 71-75% (35). Radi postizanja bolje uspješnosti i smanjenja recidiva, fotodinamska terapija može se kombinirati s drugim terapijama kao što su kriokirurgija ili primjena 5- fluorouracila, 5% imiquimoda ili diklofenaka (36).
4. **Kriokirurgija** je učinkovita u liječenju manjih, dobro definiranih i površinskih bazocelularnih karcinoma. Metoda je jednostavna i brza te je izrazito pogodna u bolesnika koji se ne mogu kirurški liječiti ili kad postoji veliki broj manjih tumora (26). Osim hipopigmentiranih makula nakon zahvata, ne navode se ozbiljnije nuspojave, no bolesnike je potrebno pratiti zbog visoke stope recidiva (34).
5. **Kiretaža i elektrokauterizacija** jest metoda koja se koristi kod dobro definiranih tumora. Standardnom kiretom po Volkmanu učini se kiretaža tumorskog tkiva, a baza tumora se koagulira elektrokauterom. Kod tumora je važno da se kauterizacija izvrši u dubinu od 1mm, te da se nakon inicijalne kauterizacije ponovi još barem dvaputa. Metoda minimalno oštećuje tkivo dermisa pa koža zacijeljuje minimalnim ožiljkom. Kod većih promjena ili jačeg zagrijavanja postoji mogućnost cijeljenja hipopigmentacijom ili hipertrofičnim ožiljkom. Metoda je u nekim europskim zemljama izrazito popularna, a u Hrvatskoj se uglavnom ne provodi. Kod visokorizičnih tumora zabilježeni su recidivi i do 27% (37).
6. **5% imiquimod** stimulira Toll – like receptore 7 i 8 na dendritičkim stanicama i monocitima. Stimulacija receptora povećava proizvodnju citokina i kemokina koji stimuliraju Th1 prirodenu imunost i stanicama posredovanu stečenu imunost koje su ključne u prepoznavanju i uništenju tumorskih

stanica (38). Imiquimod se koristi u liječenju površinskih i manjih nodularnih bazocelularnih karcinoma. Kod površinskih bazocelularnih karcinoma zabilježena je stopa izlječenja 76–88% (39).

7. **5 – fluorouracil** oštećuje sintezu DNA i RNA inhibirajući enzim timidilat sintetazu: nedostatak enzima sprječava inkorporaciju purinskih i pirimidinskih baza u DNA tijekom S-faze staničnog ciklusa. Koristi se kod manjih nodularnih i površinskih bazocelularnih karcinoma (40).
8. **Inhibitori *Sonic Hedgehog* signalnog puta** koriste se u bolesnika u kojih se ne mogu primijeniti kirurške metode niti zračenje, ili imaju uznapredovale, multiple ili metastatske tumore. Kod bazocelularnih karcinoma zbog mutacije PTCH1 ili Smo dolazi do stalne aktivacije te time i kaskade zbivanja koji potiču proliferaciju stanica. Vismodegib je inhibitor Smo koji se primjenjuje peroralno dvaput dnevno. Stopa kliničkog odgovora u bolesnika s lokalno uznapredovalim BCC bila je 43%, a u bolesnika s metastatskim BCC 30%. U oko 30% bolesnika javljaju se nuspojave lijeka, uključujući mišićne spazme, alopeciju, poremećaj okusa, gubitak težine i mučnine (41).

Izlječenje i stope recidiva ovise o dobrom izboru terapije. Petogodišnja stopa recidiva bazocelularnog karcinoma liječenog Mohs mikrografskom kirurgijom je 1%, standardnog kirurškog liječenja 10,1%, radioterapije 8,7%, a kriokirurgije 7,5% (42). Nakon kiretaže uz elektrokauterizaciju stopa recidiva iznosi prosječno 7,7%, ali i do 27% kod liječenja primarno agresivnoga BCC (37).

## **1.3. PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE**

### **1.3.1. Definicija**

Planocelularni karcinom kože (SCC) maligni je tumor epidermalnih keratinocita, sa sklonošću lokalnom, regionalnom i udaljenom širenju.

### **1.3.2. Epidemiologija**

Planocelularni karcinom kože drugi je po učestalosti kožni tumor te je među tumorima kože zastupljen oko 20%. Podatci pojedinih registara razlikuju se zbog neujednačenoga zakonodavnog postupka kod prijavljivanja tumora, no globalno je zapaženo povećanja incidencije ovog tumora. Najveća incidencija SCC zabilježena je u Australiji, standardizirano po godinama 387 na 100 000 osoba godišnje, a kumulativni rizik za razvoj bar jednog nemelanomskog tumora kože u osobe starosti 70 godina je 70% za muškarce i 58% za žene (43).

Incidencija SCC standardizirana po godinama u posljednjih 10 godina u Belgiji također je u porastu, 14,9–24,7/100 000 osoba godišnje u muškaraca i 6,8-13,5/100 000 osoba godišnje u žena (44). Škotska bilježi incidenciju od 34,7/100 000 osoba godišnje. Trogodišnji kumulativni rizik za nastanak slijedećeg planocelularnog karcinoma je 18%, što je povećanje od 10 puta u usporedbi s pojavnosti prvog tumora (7,45). Slovačka bilježi incidenciju od 6,7/100 000 osoba godišnje za muškarce te 3,8/100 000 osoba godišnje za žene (46). Incidencija u istočnoj Hrvatskoj, standardizirana po godinama je 16,8/100 000 osoba godišnje za muškarce i 9,0/100 000 osoba godišnje za žene (47), što je više od prosjeka za Republiku Hrvatsku. Gledajući opće podatke iz Hrvatskog registra za rak, incidencija standardizirana po godinama je 8,9/100 000 osoba godišnje za muškarce i 5,2/100 000 osoba godišnje za žene (48).

U usporedbi s bazocelularnim karcinomom, planocelularni karcinom je zbog većeg rizika za nastanak metastaza povezan i s većim rizikom za smrtni ishod zbog bolesti (49).

Podatci ukazuju na veću pojavnost planocelularnog karcinoma u muškaraca, što može biti posljedica većeg izlaganja UV zrakama (50).



Pojavnost planocelularnog karcinoma povećava se s godinama, osobito kod osoba starijih od 60 godina (43), a prema podacima istočnog dijela Hrvatske, većina osoba s SCC starija je od 70 godina (47). Standardizirana po godinama, pojava SCC u osoba mlađih od 64 godine je 4,04/100 000 osoba godišnje, a u osoba starijih od 85 godina 26,9/100 000 osoba godišnje (50).

### **1.3.3. Patofiziologija**

#### **1.3.3.1. Čimbenici rizika**

Povećana pojava nemelanomskih tumora kože, pa tako i planocelularnog karcinoma uzrokovana je kombinacijom nekoliko čimbenika uključujući pojačanu izloženost UV zrakama, odnosno dulji boravak na otvorenom, promjene u stilu odjevanja, produženje životnog vijeka populacije, oštećenje ozonskog omotača i genetske čimbenike (51). Osobe svjetlije puti, zbog manje prirodne zaštite od sunca imaju veći rizik nastanka karcinoma.

Ne smiju se zanemariti ni ostali čimbenici rizika, a to su kronične upale, kronične rane, kronične dermatoze (*lichen planus*), dermatoze koje zarastaju ožiljcima (bulozna epidermoliza) i ožiljci nakon opekline (52). Kronična dugogodišnja izloženost UV zrakama nosi veći rizik za nastanak planocelularnog karcinoma od intenzivnih povremenih izloženosti u djetinjstvu (51). Utjecaj kemijskih karcinogena iz okoliša na pojava SCC ovisi o kumulativnoj izloženosti tijekom godina, što se osobito vidi u bolesnika koji su višekratno liječeni PUVA terapijom. Ne smijemo zaboraviti ni na HPV, koji je pronađen u velikom broju SCC. Iako točan molekularni mehanizam kojim HPV sudjeluje u karcinogenezi nije do kraja razjašnjen, istraživanja ukazuju kako HPV inhibira apoptozu i pospješuje klonalnu proliferaciju stanica oštećenih UV zrakama, uzrokujući progresiju prekursorskih lezija u SCC (29).

Bolesnici inficirani HIV virusom također imaju povećani rizik za nastanak SCC. Usklađeni odnos rizika za SCC između HIV+ i HIV- osoba iznosi 2,6. HIV+ osobe imaju dvostruko veću pojava SCC od HIV-, s većim postotkom pojavnosti u osoba koje imaju uznapredovali stadij bolesti, što upućuje na imunosupresiju kao važan rizičan čimbenik u nastanku SCC (24).

U bolesnika koji su na jatrogenoj imunosupresiji nakon transplantacije organa, pojavnost SCC također je povećana (53).

### **1.3.3.2. Genetski čimbenici**

Definirana su dva biološka zbivanja koja dovode do fotooštećenja kože: mutacije u genima potrebnim za kontrolu stanične diobe, diferencijacije i invazije te imunosupresija. Ukoliko se oštećenje DNA nastalo UV zrakama ne popravi prije diobe stanice, novonastale stanice imaju nepravilan raspored nukleotida u DNA. Mutacije u određenim genima pridonose karcinogenezi. Fotooštećene dendritičke stanice u koži i neodgovarajući odgovor mastocita dovode do aktivacije T i B regulatornih stanica koje suprimiraju staničnu imunost. Ta aktivacija onemogućava imunološkom sustavu prepoznati i uništiti mutirane stanice te i na taj način pridonosi nastanku kožnih tumora (54).

Smatra se kako je SCC bolest „nepravilno reguliranih signalnih putova“ (55). Na životinjskim modelima, staničnim linijama te u parafin uklopljenim planocelularnim karcinomima čovjeka prikazano je nekoliko signalnih putova koji bi, svojim aktivacijom ili mutacijom pojedinoga gena, mogli sudjelovati u nastanku SCC: HRAS, mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK), STAT3, NOTCH 1, wnt/beta kateninski put (56, 57, 58, 59, 60). Receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR, engl. epidermal growth factor receptor) i mTOR putovi su nepravilno aktivirani u SCC (55).

Dva tumor-supresorska gena pokazala su se važnima u nastanku SCC: tumor supresor gen p53 (TP53) i p16. Tumor supresorski geni pomažu popravak DNA oštećene UV zrakama, te pokreću apoptozu stanice ukoliko popravak oštećenja nije moguć. Studija Brach DE i suradnika provedena na invazivnim SCC švedskih i engleskih bolesnika pokazala je mutacije u genu p53 u čak 58% (61). Oštećenje stanica kože UV zrakama prepoznaje se po mutacijama dipirimidinskih baza budući mutacije TP53 na tumorima drugih organa ne pokazuju takve mutacije, ukazujući time kako je dipirimidinski fotoprodukt koji sadrži citozin onkogeni fotoprodukt (61,62). Zamjena dvostrukih baza CC–TT i visoka frekvencija zamjene citozina timinom mutacije su specifične za oštećenje UV zrakama (63).

UV zrake također uzrokuju karakteristične mutacije tumor supresorskog gena p16, što je osobito izraženo kod agresivnijih tumora (64). U bolesnika inficiranih humanim

papiloma virusom (HPV), UV zrakama uzrokovana promjena gena rezultira funkcionalno neodgovarajućim proteinom p16 te posljedično i lokalno agresivnijim SCC (65). Studije ukazuju na veću pojavnost p53 i p16 u ranim stadijima SCC te upućuju na njihovu važnost u razvoju prekursorskih lezija u invazivni karcinom (66, 67).

### **1.3.3.3. Imunosupresija**

Jatrogeno imunosuprimirani bolesnici koji nakon transplantacije organa uzimaju ciklosporin ili azatioprin imaju povećan rizik za nastanak SCC. Rizik ovisi o dobi bolesnika kod transplantacije, duljini i intenzitetu imunosupresije te prijašnjem solarnom oštećenju (68,69). Istraživanja ukazuju kako je rizik za razvoj SCC nakon transplantacije organa 65x veći nego u netransplantiranih bolesnika (23).

Bolesnici oštećenog imunološkog sustava zbog hematološke zloćudne bolesti ili HIV infekcije također imaju povišen rizik za nastanak SCC, razvoj multiplih tumora te invazivnije oblike tumora (70, 71).

### **1.3.4. Klinička slika**

Planocelularni karcinom kože je tumor koji se karakteristično nalazi na fotoekspoziranim dijelovima kože, tako da su najčešće lokalizacije na glavi, vratu, preternalnoj regiji i ekstenzornim stranama udova. Nastaje na aktinički oštećenoj koži. Najčešće nastaje iz prekanceroze, odnosno iz aktiničke keratoze.

Aktinička keratoza klinički se prikazuje kao eritematozna papula ili plak prekriven ljuskama i krustama (72). Iako se smatraju premalignim lezijama, sa sklonošću prelasku u SCC, aktiničke keratoze su lezije niskog malignog potencijala. Stopa prelaska aktiničke keratoze u SCC unutar nekoliko godina od njenog nastanka je 5 – 10% (73).

Prvi znak maligne alteracije je induracija.

Planocelularni karcinom kože *in situ* (Bowenova bolest) prezentira se kao eritematozna promjena u razini kože, s ljuskama i krustama na površini, koju karakterizira niska invazivnost.

Invazivni planocelularni karcinom prezentira se kao eritematozna promjena iznad površine kože koja može biti ravne površine, verukozna, nodularna ili ulcerirana. Površina karcinoma može biti erodirana, ali i prekrivena ljuskama ili krustama. Rijetko mogu biti prisutni bol ili parestazije, no treba imati na umu kako bilo koji od tih simptoma može značiti perineuralnu invaziju i širenje tumora. Na polusluznicama (usta ili genitalna regija) promjena može početi kao fisura, erozija ili ulceracija koja ne zarasta te povremeno krvari (27, 74)(Slika 2).



**Slika 2. Planocelularni karcinom kože.**

Prikazan je planocelularni karcinom transplantiranog bolesnika smješten preaurikularno: eritematozni infiltrat prekriven ljuskama i krustama, koji je djelomično egzulceriran.

### **1.3.5. Histološka obilježja**

Histološka obilježja SCC *in situ* su umnoženi atipični keratinociti koji se nalaze u epidermisu, grupirani u gnijezda i tračke. Stanice su uvećanih jezgara i staklastih, eozinofilnih citoplazmi. Mogu se naći i diskeratotični keratinociti, keratinske perlice, intracelularni mostovi te mitoze (28). O invazivnom SCC govorimo kada navedena

obilježja oštete bazalnu membranu i prelaze u dermis, što govori o strukturalnoj, a ne citološkoj razlici između prekursorskih lezija i invazivnog karcinoma (74).

Razlikujemo nekoliko histoloških varijanti SCC: bowenoidni, dezmodoplastički, mucinozni, pigmentirani, akantolitički te pseudoglandularni. Smatra se da posljednja dva oblika imaju lošiju prognozu. Prema uputama Američkog zajedničkog odbora o karcinomima (*American joint committee of cancer*) stupnjevanje SCC uzima u obzir veličinu tumora (promjer veći ili manji od 2cm), dubinu invazije (>2mm), anatomske regije te proširenost u regionalne limfne čvorove (27).

Prema studijama, rizični čimbenici za razvoj metastaza invazivnog SCC su promjer veći od 2cm; dubina tumora veća od 2mm; lokalizacija tumora na uški, usni ili polusluznicama; pojava unutar ožiljnog tkiva; histološki slabije diferencirani ili nediferencirani tumori; akantoliza; razvoj unutar Bowenove bolesti te imunosupresija (75).

### **1.3.6. Diferencijalna dijagnoza**

Planocelularni karcinom treba razlikovati od njegovog prekursora, aktiničke keratoze. Diferencijacija je jednostavna ukoliko je planocelularni karcinom razvijen u punoj kliničkoj slici s induracijom. Ukoliko postoji dvojba, promjenu je prije terapije potrebno biopsirati i pregledati histološki.

SCC je potrebno razlikovati i od ulceriranog i morfeiformnog oblika bazocelularnog karcinoma.

### **1.3.7. Dijagnostika**

Dijagnoza SCC postavlja se na temelju kliničke slike te anamneze u kojoj se ističe podatak o dugogodišnjem izlaganju čimbenicima rizika, a potvrđuje se biopsijom i histološkim nalazom.

Dermatoskopija je neinvazivna metoda koja može kliničaru pomoći u donošenju odluke o daljnjem dijagnostičkom i terapijskom postupku. Dermatoskopski se nalaze dvije vrste vaskularnoga uzorka: male točkaste krvne žile te glomerularne krvne žile. Oba uzorka često se nalaze unutar pojedine lezije, a raspoređene su u male, gusto zbijene grozdaste nakupine te se zajedno s hiperkeratozom označavaju kao glavne značajke

Bowenove bolesti, tj. planocelularnog karcinoma *in situ*. Kod pigmentirane Bowenove bolesti dodatno nalazimo smeđe pigmentirane globule nepravilno raspoređene u mrljastim nakupinama ili kao smeđe – sivu jednoliku pigmentaciju.

Invazivni oblik SCC prezentira se većim polimorfizmom. Na bjelkastoj pozadini nalaze se orožnjača ili ulceracije, a krvne žile mogu biti iregularno linearno raspoređene, zavijene u obliku ukosnice, grupiranog glomerularnog ili točkastog uzorka (76).

U dijagnostici se mogu koristiti još neke neinvazivne metode kao što su refleksna konfokalna mikroskopija, ultrazvuk, optička koherentna tomografija i multifotonska tomografija. Unatoč svojoj neinvazivnosti, te metode još nisu izrazito zaživjele u svakodnevnoj kliničkoj praksi (76).

### 1.3.8. Liječenje

Liječenje SCC usmjereno je u prvom redu na potpuno uklanjanje primarne promjene i na sprječavanje recidiva te lokalnih i udaljenih metastaza. To je osobito važno kod planocelularnih karcinoma na glavi i vratu jer je kod njih sklonost širenju bolesti najveća. Osobito je važno uputiti bolesnike u važnost samopregleda i ukazivanja na eventualne recidive promjena te na redovite kontrole. Do sada nisu provedene veće randomizirane kliničke studije o najboljoj opciji za liječenje SCC. No, kolika je važnost pravilnog liječenja i praćenja bolesti govori i podatak o smjernicama za liječenje koje su objavile pojedine zemlje (33, 77-81).

1. **Kirurško liječenje** uz histološku kontrolu rubova ekscidiranog tkiva metoda je izbora u liječenju SCC. SCC niskoga rizika dovoljno je ukloniti s 4 – 5mm zdravim rubom, dok je kod tumora visokoga rizika potrebno ukloniti 10mm zdravoga ruba kože. Kod velikih tumora kod kojih postoji velika vjerojatnost lokalnoga ili udaljenoga širenja savjetuje se koristiti Mohs mikrografsku kiruršku metodu.

Budući je SCC sklon širenju limfnim putovima, svakako se savjetuje kontrola regionalnih limfnih čvorova ultrazvukom. Ukoliko tumori infiltriraju podležee strukture, savjetuju se i dodatni testovi širenja bolesti, kao što su pregled kompjuterskom tomografijom ili magnetskom rezonancom.

2. **Radioterapija** mekim rentgenskim zrakama je metoda izbora kod tumora koji zbog svoje anatomske lokalizacije nisu pogodni za kirurško liječenje ili ukoliko kirurško liječenje nije dovelo do uklanjanja tumora u cijelosti.
3. **Fotodinamska terapija**. Odobrena je za liječenje SCC u više europskih zemalja pa ipak je ova metoda liječenja SCC – a još uvijek predmet rasprave stručnih krugova zbog velikog postotka recidiva bolesti te sklonosti SCC metastaziranju. Prama manjim kliničkim studijama metoda se pokazala učinkovitom u 8%-82% bolesnika (82, 83).
4. **Kriokirurgija, kiretaža, elektrodisekcija i primjena 5-fluorouracila** terapijske su metode koje su rezervirane za liječenje prekursorskih lezija kao što su aktiničke keratoze i nisu preporučljive za liječenje SCC (84).
5. **5% imiquimod**. Pospješuje apoptozu tumorskih stanica inducirajući prepisivanje proupalnih gena, no obzirom na nedovoljnu količnu kliničkih studija koje bi bile osnova za terapijsku preporuku, ova se metoda savjetuje u liječenju prekursorskih lezija i SCC niskog malignog potencijala (74).
6. **Antagonisti signalnih putova**. Tumorske stanice ovisne su o neprekidnoj aktivaciji specifičnih signalnih putova. Otkriće brojnih mutacija signalnih putova omogućilo je razvoj monoklonskih protutijela koja mogu blokirati pojedine signalne putove. Cetuximab je monoklonsko protutijelo koje inhibira aktivnost EGFR te se sve više nameće kao potencijalna terapija uznapredovalih SCC, kao monoterapija ili u kombinaciji s kemoterapijom (78, 85, 86). U najvećoj studiji procjene učinkovitosti cetuximaba u liječenju inoperabilnog SCC, u 2/36 bolesnika došlo je do potpune regresije bolesti, a u 8/36 do parcijalne remisije. Liječenje je provedeno tijekom 6 tjedana tijekom kojih je u 69% bolesnika postignut zadovoljavajući terapijski učinak. Daljnje praćenje ukazalo je na prosječno vremensko razdoblje bez progresije bolesti od 4,1 mjesec (87). Terapija cetuximabom se uglavnom dobro podnosi, a najčešća nuspojava je akneiformni egzantem. Iako je visoka izraženost EGFR bila jedan od kriterija za uključivanje u studiju, razina izraženosti nije bila povezana s učinkovitosti, što ukazuje na potrebu daljnjih istraživanja ovoga i drugih signalnih putova.  
Novija istraživanja uključuju ispitivanja mutacija TP53, RAS i *Notch* porodice gena. U SCC kože TP53 je često mutiran, a RAS je često aktiviran, no frekvencija tih mutacija je relativno niska (88, 89). *Notch* geni djeluju

bifunkcionalno pri čemu se tumori mogu razviti mutacijom koja pojačava funkciju ili mutacijom koja uzrokuje gubitak funkcije naglašavajući ovisnost tumora o signalnim putovima. Smatra se da inhibicija *Notch* signalnog puta potiče stvaranje epitelijalnih tumora (90).

Uspješnost liječenja uvelike ovisi o izboru terapije. Ukoliko se radi o malim lezijama niskoga rizika, kriokirurgijom, elektrodisekcijom i kiretažom može se postići dobar odgovor i mala stopa recidiva (0,8% za kriokirurgiju, 1,7 za elektrodisekciju). Procjena recidiva nakon Mohs mikrografske kirurške metode liječenja je 3%, no nije značajnije veća u usporedbi s klasičnom kirurškom ekscizijom (5,4% recidiva) ili radioterapijom. Unatoč dobrom početnom terapijskom odgovoru na PDT, recidiv bolesti je procijenjen na 26,4% što je značajnije veća stopa recidiva nego kod drugih oblika liječenja (91).

#### **1.4. KRONIČNA BUBREŽNA BOLEST**

Za kroničnu bubrežnu bolest (KBB) može se reći da poprima epidemijske razmjere. Epidemiološki podatci govore o incidenciji od 5%–13% (92).

Kronična bubrežna bolest je progresivno i ireverzibilno oštećenje bubrežne funkcije u kojoj ne postoji sposobnost bubrega da održi ravnotežu između tjelesnih tekućina i elektrolita te iz organizma izluči štetne tvari. Krajnja posljedica KBB je uremija (93).

Prema smjernicama radne grupe za poboljšanje ishoda transplantacije bubrega, KDIGO grupe (engl. Kidney Disease: Improving Global Outcomes), kronična bubrežna bolest definirana je padom glomerularne filtracije (GRF) na <60ml/min po 1,73m<sup>2</sup> u periodu ≥3 mjeseca te albuminurijom >30mg/g. Obje vrijednosti podijeljene su dodatno u stupnjeve težine, tako da je GFR podijeljena u 5 stadija, a albuminurija u 3 (94). GFR do 60 ml/min te albuminurija do 30 smatraju se normalnim do optimalnim, GFR 45 – 59 smatra se blagim do umjerenim oštećenjem (stadij G3a), GFR 30 – 44 označava umjereno do teško oštećenje rada bubrega (stadij G3b), a GFR 15 – 29 znak je teškog bubrežnog oštećenja (stadij G4). Zatajenjem bubrega smatra se GFR ispod 15ml/minuti. Albuminurija je podijeljena u tri stadija, stadij A1 označava optimalnu i normalnu razinu albuminurije sa <10 i 10 – 29mg/g, stadij A2 označava stanje visoke



albuminurije (30 – 299mg/g) dok se albuminurija od 300 – 1999 i >2000mg/g smatra vrlo visokom i nefrotičnom albuminurijom (Tablica 1) (94).

Kronična bubrežna bolest povezana je s povećanim rizikom od nastanka kardiovaskularnih bolesti, progresije do kroničnog zatajivanja bubrega (KZB) te smanjenog očekivanog trajanja života. KBB i KZB na kraju rezultiraju multiplim disbalansom u organizmu uključujući hiperkalemiju, metaboličku acidozu i hiperfosfatemiju. Sva ta zbivanja mogu dovesti do opadanja mišićne snage, poremećaja mineralizacije kostiju, kalcifikacije krvnih žila te na kraju do smrti (95).

Odgovarajućega lijeka za zaustavljanje bubrežne bolesti i njene progresije prema zatajivanju još nema. Zbog toga je iznimno važno usmjeriti pažnju pravodobnom prepoznavanju bubrežne bolesti, redovitim kontrolama bubrežnih bolesnika, specifičnoj terapiji, usporavanju progresije bolesti te liječiti komplikacije i komorbiditete (96).

stupanj oštećenja GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )			stupnjevi albuminurije (mg/g)					
			A1		A2	A3		
			optimalna		visoka	vrlo visoka i nefrotska		
			<10	10-29	30-29	300-1999	≥2000	
G1	visoki optimalan	i	>105					
			90-104					
G2	blago snižen		75-89					
			60-74					
G3a	blago umjereno	–	45-59					
G3b	umjereno teško	–	30-44					
G4	teško		15-29					
G5	zatajenje bubrega		<15					

**Tablica 1. Odnos glomerularne filtracije i albuminurije u kroničnoj bolesti bubrega.**

Glomerularna filtracija ispod 60 ml/min i albuminurija iznad 30 mg/g u trajanju duljem od 3 mjeseca smatraju se znacima oštećenja bubrega. Što su vrijednosti GFR manje, a albuminurija veća, oštećenje bubrežne funkcije je veće i progredira prema zatajenju bubrega. Osjenčana polja označuju relativni rizik zatajenja bubrega, najsvjetlija polja označuju manji rizik, tamnije osjenčana polja označuju veći rizik za zatajenje bubrega. (prema KDIGO smjernicama)

GFR: glomerularna filtracija (engl. glomerular filtration rate), G1-5: stupnjevi oštećenja glomerularne filtracije, A1-3: stupnjevi albuminurije.

## 1.5. BUBREŽNO NADOMJESNO LIJEČENJE

U slučaju kroničnog zatajenja bubrega, potrebno je započeti bubrežno nadomjesno liječenje. Bubrežno nadomjesno liječenje može se provoditi hemodijalizom, peritonejskom dijalizom ili transplantacijom bubrega.

*National Kidney Foundation – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF – KDOQI) grupa je 2006.g. predložila smjernice u kojima se predlaže optimalno vrijeme započinjanja bubrežne nadomjesne terapije. Tendencija je da se s nadomještanjem počinje što kasnije. Studije na manjem broju bolesnika ukazuju kako ranije započinjanje liječenja (kod GFR 10-14 ml/min) nije dovelo do smanjenja mortaliteta u odnosu na kasnije započinjanje (kod GFR 5-7ml/min) (97). Kako bi se postigao što bolji terapijski učinak i smanjila smrtnost, uz istodobno smanjenje bolničkih i ostalih troškova u tijeku su studije koje bi mogle preporučiti optimalno vrijeme započinjanja bubrežnog nadomjesnog liječenja (98).

### 1.5.1. Hemodijaliza (HD)

Svrha hemodijalize je uklanjanje suvišnih produkata iz organizma, stabiliziranje unutarnje biokemijske neravnoteže i uklanjanje toksina koji uzrokuju trajna oštećenja (93). Hemodijaliza je najčešći oblik nadomještanja bubrežne funkcije. Za izvođenje hemodijalize potreban je posebni uređaj za hemodijalizu koji djeluje na principu polupropusne membrane. Onečišćena bolesnikova krv ulazi u aparat s jedne strane, a tekućina za dijalizu s druge strane. Kroz polupropusnu membranu dolazi do izmjene suvišnih tvari iz krvotoka i njihovog uklanjanja.

Pokazatelji uspješne dijalize je tzv. KT/V omjer, u kojem je K raščišćavanje (engl. clearance) ureje, T vrijeme trajanja HD i V distribucija ureje. Više studija pokazalo je kako omjer KT/V 1,2 ukazuje na učinkovitu HD, ali taj se omjer postiže u relativno malo ustanova, najviše zbog vrste uređaja i filtera za HD, neodgovarajuće prehrane bolesnika, nedovoljne edukacije bolesnika te komorbiditeta bolesnika (93).

Provodi se ambulantno, u bolnicama ili specijaliziranim ustanovama, do tri puta tjedno, a pojedini postupak traje 3-4 sata. Naravno, kvaliteta života bolesnika koji nadomještaju bubrežnu funkciju hemodijalizom smanjena je zbog potrebe povezanosti s ustanovom u kojoj se provodi hemodijaliza.

### **1.5.2. Peritonejska dijaliza**

Peritonejska dijaliza vrsta je nadomjesne bubrežne terapije koja koristi vlastiti peritoneum kao polupropusnu membranu za izlučivanje štetnih produkata metabolizma. Laparoskopskom metodom postavljaju se posebne cjevčice unutar trbušne šupljine, a bolesnik tekućinu za dijalizu može sam ubrizgati u kućnim uvjetima, što je, uz manje troškove, izrazita prednost ove metode. Izbor metode ovisi o edukaciji bolesnika, njegovoj motivaciji, želji, udaljenosti od Centra za hemodijalizu te sklonosti liječnika i medicinskog osoblja (99).

### **1.5.3. Transplantacija bubrega**

Transplantacija bubrega najbolja je metoda nadomještanja bubrežne funkcije u bolesnika u kojih je došlo do krajnjega stadija bubrežnoga zatajenja. Osim što produljuje život bolesnika, transplantacija bubrega značajno poboljšava njegovu kvalitetu. Povećano oboljevanje uzrokovano bolesnikovim prehrambenim i okolišnim čimbenicima sve više produljuje listu čekanja na nadomještanje organa. Poboljšanje zdravstvene skrbi dovelo je do produženja životnog vijeka, no povećalo broj bolesnika sa završnim stadijem KBZ. Laboratorijski pokazatelj kroničnog bubrežnog zatajenja je smanjenje GFR ispod 15ml/min na 1,73m<sup>2</sup>.

Za uspješnu transplantaciju potrebna je suradnja više timova, a najveći napredak postignut je postavljanjem koordinatora transplantacijskih timova koji su neprekidno dostupni. Republika Hrvatska (RH) je 26. svibnja 2007. postala punopravnom članicom europske organizacije Eurotransplant, međunarodne organizacije za razmjenu organa. Na taj način omogućen je napredak transplantacijske medicine te bolja dostupnost i preraspodjela organa potencijalnih darovatelja. Pojačanom skrbi o primateljima organa, pojačanom skrbi o potencijalnim darovateljima te dostupnošću i organiziranošću transplantacijskih timova, 2011. godine Republika Hrvatska bila je vodeća zemlja u svijetu po broju transplantiranih bubrega i jetre po broju stanovnika. Današnje zakonske odrednice u RH podrazumijevaju dva načina darivanja organa: pretpostavljeni pristanak i informirani pristanak. Kod darivanja organa od živog darovatelja svakako je potreban informirani pristanak. Kod darivanja organa preminule osobe na snazi je pretpostavljeni pristanak koji podrazumijeva da su svi građani RH

potencijalni darivatelji organa ukoliko se tijekom života nisu izričito izrazili i potpisom potvrdili kako ne žele biti darivatelji organa nakon smrti.

Ovakva organizacija uvelike je smanjila liste čekanja na transplantaciju, no ponuda organa još uvijek je manja od broja bolesnika koji trebaju transplantaciju. Zbog toga je na razini pojedine države ili organizacije (npr. Eurotransplant) uspostavljen način i transparentna pravila kojima se raspodjeljuju organi. Svi potencijalni primatelji organa stavljaju se na zajedničku listu koja se stalno obnavlja. Vrijeme čekanja na transplantaciju računa se od dana prve dijalize. Za svakog se bolesnika upisuju osnovni podatci i svi podatci potrebni za transplantaciju: krvna grupa, imunološka tipizacija tkiva i podatci o ostalim bolestima.

Kod raspodjele organa prva potrebna podudarnost je ona krvne grupe, a zatim HLA (od engl. Human Leucocyte Antigen) imunološka podudarnost. Bolesnici s dužim vremenom čekanja na transplantaciju i boljom imunološkom podudarnosti imaju prednost pri primanju organa. Ukoliko se radi o međunarodnim organizacijama za primanje i raspodjelu organa, prati se i ravnoteža raspodjele među pojedinim državama članicama.

Kompjutorski sustav analizira sve unesene podatke darovatelja i potencijalnih primatelja na listi te na osnovi sustava bodovanja sastavlja listu potencijalnih primatelja. Nakon sastavljanja liste, međunarodni koordinator kontaktira lokalnog koordinatora koji kontaktira nefrologa iz transplantacijskog tima. Nefrolog provjerava stanje potencijalnoga primatelja te u dogovoru s bolesnikom, urologom i imunologom javlja odluku lokalnom koordinatoru. Najvažnije je što ranije donijeti odluku o prihvaćanju ili neprihvaćanju, kako bi organ preminule osobe što kraće bio u stanju hladne ishemije, a time i pogodniji za potencijalnog primatelja (100). Hladna ishemija je stanje u kojem je bubreg izvađen iz darovatelja i putuje prema primatelju. Kako ne bi došlo do edema i smrti bubrežnih stanica, bubreg se prevodi u stanje hipotermije i kroz njega se neprekidno filtrira posebna perfuzijska otopina. Time se dodatno utječe na usporenje metabolizma stanica i na očuvanje stanica bubrega od propadanja. S obzirom da nijedna otopina za perfuziju nije savršeno podobna za očuvanje bubrežnih stanica duže vrijeme, vrijeme hladne ishemije pokušava se skratiti na najkraće moguće (101).

Jedan od najvažnijih čimbenika transplantacije je imunološka, HLA podudarnost darovatelja i primatelja. Geni HLA sustava nalaze se na tri genske regije na 6. kromosomu, koji kodiraju tri razreda molekula. Razred I uključuje HLA – A, HLA – B i

HLA – C, razred II uključuje HLA – DR, HLA – DQ i HLA – DP dok razred III uključuje tzv. ne – HLA gene MICA, MICB, gene za C2 i C4 komponente komplementa i citokin TNF. HLA geni kodiraju molekule (antigene) HLA sustava razreda I i II koji sudjeluju u predočavanju stranih antigena T–staničnim receptorima koji zatim potiču proizvodnju protutijela protiv stranih antigena. Strani antigeni su uglavnom bakterije i virusi, ali u tu skupinu ulaze i antigeni darovatelja kojih nema u organizmu primatelja.

Pri transplantaciji bubrega uspoređuje se nepodudarnost HLA – A, HLA – B i HLA – DQ. Nepodudarnost se označava engleskom riječi „mismatch“ (neslaganje). Nepodudaran je antigen koji se nalazi kod darovatelja, a ne nalazi se kod primatelja jer se na njega kod primatelja počinju stvarati protutijela protiv doniranog organa. Ukupan broj nepodudarnosti može biti 0 – 6, po dva neslaganja sa svakog lokusa. Veća nepodudarnost dovodi do smanjenog preživljenja doniranog organa, osobito u prvoj godini nakon transplantacije. Veća nepodudarnost zahtijeva i pojačanu dozu imunosupresije kako bi se sačuvao donirani organ, što u konačnici pojačava nuspojave povezane s imunosupresijom, uključujući i tumore kože. Suprotno, bolja podudarnost zahtijeva slabiji režim imunosupresivne terapije.

Nakon HLA podudarnosti, određuju se HLA protutijela u serumu primatelja. Primatelji se mogu senzibilizirati nakon transfuzija krvi, žene tijekom trudnoće (nepodudarnim antigenima koje je dijete naslijedilo od oca) te zbog nepodudarnosti davatelja u prijašnjim transplantacijama. HLA protutijela primatelja periodično se provjeravaju, uobičajeno svaka 3 mjeseca. Prije same transplantacije provjerava se i test križne reakcije kako bi se uvidjelo postoje li u krvi primatelja specifična protutijela protiv darovatelja (102).

Osim transplantacije bubrega od umrlog darovatelja, bubreg može darovati i živa osoba. Obično su to rođaci (majka, otac, brat ili sestra, daljnji rođaci) ili nesrodne osobe (supružnici). Svakako je potrebno poticati darovanje živih darovatelja budući je petogodišnje preživljenje takvog prestka bolje od preživljenja kadaveričnog presatka. Ukoliko je darovatelj osoba srodna primatelju, očekuje se bolja HLA podudarnost darovatelja i primatelja bubrega. Oba zahvata izvode se u jednom transplantacijskom centru čime je vrijeme hladne ishemije skraćeno na najkraće moguće. Zahvat se može učiniti u vrijeme najpogodnije za darovatelja i primatelja, a vrijeme dijalize može se skratiti na najkraće moguće, čak bi se moglo postići inicijalno liječenje KBZ transplantacijom čemu se danas teži (103). Dobra HLA podudarnost srodnih osoba omogućuje nižu dozu imunosupresije čime se i nuspojave imunosupresije svode na

najnižu moguću razinu. Ukoliko srodna osoba koja želi biti darovatelj ima veliku HLA nepodudarnost s primateljem, može se učiniti uparivanje darovatelja i primatelja. Kod uparivanja, uparuju se dva ili više parova darovatelj – primatelj te se darovatelji međusobno zamjenjuju radi bolje HLA podudarnosti.

Smrtnost bolesnika s transplantiranim bubregom dvostruko je manja od smrtnosti bolesnika na liječenju hemodijalizom (104). Kako imunološki sustav ne bi odbacio transplantirani organ, potrebna je trajna imunosupresivna terapija.

#### **1.5.3.1. Imunosupresivna terapija**

KDIGO grupa preporučila je smjernice imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega. Imunosupresivna terapija dijeli se na indukcijsku, inicijalnu i terapiju održavanja, pri čemu se vodi računa o individualizaciji imunosupresivnog protokola ovisno o obilježjima primatelja i darivatelja organa (105).

#### **1.5.3.2. Indukcija**

Najbolji rezultati postižu se ukoliko se imunosupresija započne prije ili u vrijeme same transplantacije. Biološki lijek trebao bi biti dio početne imunosupresivne terapije i to antagonist interleukin 2 receptora (IL2 – RA). Antagonisti IL2 – RA, basiliximab i daclizumab, vežu se na CD25 antigen na površini aktiviranih T – limfocita i inhibiraju aktivaciju limfocita, presudan trenutak u imunološkoj reakciji odbacivanja presatka.

U bolesnika s visokim imunološkim rizikom, bolji izbor su limfocit – trošeci antigeni (engl. lymphocyte depleting antigen). Svrha indukcijske terapije limfocit – trošecim antigenima je potrošnja ili modulacija T – staničnoga odgovora u vrijeme prezentacije antigena u ranoj fazi nakon transplantacije, poboljšanje učinka imunosupresije i smanjenje stope akutnoga odbacivanja.

Limfocit – trošeci antigeni su antitimocitni globulin (ATG), antilimfocitni globulin (ALG) i antimonomurab – CD3.

### **1.5.3.3. Inicijalna imunosupresija u fazi održavanja**

Savjetuje se kombinacija kalcineurinskog inhibitora (CNI) i antiproliferacijskog lijeka, s ili bez kortikosteroida. Za primarni CNI savjetuje se takrolimus. Takrolimus ili ciklosporinA trebali bi u terapiju biti uvedeni u vrijeme transplantacije, a ne nakon uspostavljanja funkcije presatka.

Mikofenolat mofetil (MFM) savjetuje se kao prva opcija u izboru antiproliferacijskog lijeka. Kod bolesnika niskog imunološkog rizika bilo bi dobro prekinuti kortikosteroidnu terapiju u prvom tjednu nakon transplantacije. Predlaže se da se liječenje mTOR inhibitorima (engl. „mammalian target of rapamycin inhibitors“) ne počinje dok se ne stabilizira funkcija presatka, a kirurške rane ne zacijele. Azatioprin, kao prvi i vrlo dobar antiproliferacijski lijek pokušava se napustiti kao lijek prvog izbora zbog brojnih nuspojava dugotrajnoga uzimanja.

Terapija održavanja je dugoročno liječenje potrebno za sprječavanje akutnoga odbacivanja i pogoršanja funkcije presatka. Lijekovi se koriste u kombinaciji kako bi se postigla odgovarajuća imunosupresija, a minimizirala toksičnost koju nosi terapija višim dozama samo jednog lijeka. U prva tri mjeseca nakon transplantacije, kada je vjerojatnost odbacivanja presatka najveća, doze lijekova su visoke. Nakon toga se smanjuju na najnižu razinu koja sprječava odbacivanje, a smanjuje toksičnost lijekova. Kortikosteroidi su oduvijek bili glavna potpora terapiji održavanja. No zbog brojnih nuspojava koje su posljedica dugotrajnog uzimanja kortikosteroida, pokušavaju se pronaći imunosupresivne kombinacije koje ne uključuju kortikosteroide. Noviji protokoli predlažu kortikosteroide tek kratko vrijeme nakon transplantacije ili čak potpuni izostanak istih u terapiji održavanja.

### **1.5.3.4. Dugotrajna terapija održavanja**

Savjetuje se 2–4 mjeseca nakon transplantacije sniziti dozu imunosupresivnih lijekova na najnižu moguću razinu, ali samo ukoliko u tom vremenu nije bilo znakova akutnog odbacivanja presatka. Terapiju CNI bolje je nastaviti. Ukoliko terapija kortikosteroidima nije bila prekinuta u prvom tjednu nakon transplantacije, bolje ju je zadržati nego isključiti.



## 1.6. IMUNOSUPRESIVNI LIJEKOVI I TUMORI

Bolesnici s transplantiranim bubregom (BTB) imaju povećanu sklonost razvoju karcinoma (53). Zloćudni nemelanomski tumori kože najčešći su karcinomi u bolesnika izloženih imunosupresivnoj terapiji (68, 69). Neke kliničke studije ukazuju na veću pojavnost planocelularnih u odnosu na bazocelularne karcinome u bolesnika s transplantiranim bubregom (69,106,107,108,109), dok je u nekim istraživanjima zabilježena veća pojavnost bazocelularnih karcinoma u odnosu na planocelularne (110-112). Planocelularni karcinom u bolesnika s transplantiranim bubregom pokazuje najveću pojavnost na fotoeksponiranim dijelovima tijela (113), ukazujući time na oštećenje keratinocita UV zrakama kao osnovnoga čimbenika u patogenezi karcinoma. Dodatno, pojavnost planocelularnih karcinoma veća je u onih bolesnika s transplantiranim bubregom koji su profesionalno ili neprofesionalno više bili izloženi djelovanju UV zraka (109,114).

Smatra se da je glavni uzrok povećane sklonosti razvoju tumora dugogodišnja imunosupresija, no mehanizam karcinogeneze u bolesnika s transplantiranim bubregom nije do kraja istražen. Još uvijek je nepoznanica jesu li tumori posljedica imunosuprimirano – ovisnih ili imunosuprimirano – neovisnih zbivanja (115, 116), no pojavnost kožnih tumora u skladu je sa stupnjem imunosupresije na način da redukcija doze imunosupresivnih lijekova smanjuje pojavnost tumora (117).

Osnova UV oštećenja, bilo posljedica UVA ili UVB zraka, jest formiranje dipirimidinskih baza unutar tumor supresorskih gena p53, *Patched 1* i *Smo* (21). Oštećenja DNA popravljaju se ekscizijskim popravkom nukleotida (engl. nucleotide excision repair, NER) unutar same stanice (UV – izazvan popravak DNA). Ukoliko ne dođe do popravka oštećenja, mutirani produkti se nakupljaju predisponirajući osobe karcinogenezi (118). Istraživanja su ukazala kako se frekvencija mutacija p53 u karcinomima kože ne mijenja u uvjetima imunosupresije (119). Budući da je poznato kako su UV uzrokovane mutacije p53 bitan čimbenik u ranom nastanku tumora kože, osobito SCC, ovaj nalaz ukazuje na moguće postojanje dodatnih čimbenika koji utječu na karcinogenezu kod bolesnika s transplantiranim bubregom (22,120).

Dosadašnja istraživanja učinka imunosupresije na razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože u laboratorijskim uvjetima pokazala su slijedeće:

- Liječenje azatioprinom povezano je s pojačanom osjetljivošću kože na UVA zrake (121). Metaboliziranje azatioprina rezultira ugradnjom 6–tiogvanina (6–

TG) u DNA bolesnika i time povećava osjetljivost bolesnika na UVA (122). 6-TG DNA je fotosenzibilizator i izvor slobodnih kisikovih radikala, koji uzrokuju velika oštećenja DNA i proteina (123). Minimalna eritemska doza u bolesnika liječenih azatioprinom bila je dva puta niža od MED bolesnika liječenih mikofenolat mofetilom. Zamjena azatioprina mikofenolat mofetilom selektivno smanjuje fotosenzitivnost na UVA i umanjuje UVA – uzrokovano oštećenje DNA (124).

- Stanice tretirane ciklosporinomA imaju smanjenu mogućnost ekscizijskog popravka oštećenja nukleotida (NER) i blokirano uklanjanje mutagenih fotoprodukata (125).

CiklosporinA smanjuje apoptozu oštećenih stanica, dok rapamicin inhibira epidermalnu regeneraciju i povećava apoptozu stanica oštećenih UV zrakama. No, studije ukazuju i na usporavanje početne faze nastanka primarnog tumora tijekom terapije ciklosporinomA, a rapamicin koči rast tumora što može ukazivati na dodatne čimbenike, osim imunosupresivne terapije, u nastanku tumora. Smanjenje proliferacije izazvano rapamicinom moglo bi biti razlog usporenog cijeljenja rana nakon transplantacije (119).

U usporedbi s kontrolnom skupinom ciklosporinA povećava veličinu tumora i širenje, dok sirolimus te ciklosporinA u kombinaciji sa sirolimusom, smanjuju veličinu i brojnost tumora. Rezultati upućuju na povećanje i progresiju tumora tijekom liječenja ciklosporinomA, dok dodavanje sirolimusa u terapiju uzrokuje suprotan učinak (126).

- Životinje kronično izložene UV zrakama liječene samo sirolimusom ili kombinacijom sirolimusa, ciklosporinaA i takrolimusa razvile su veće tumore nego miševi tretirani placebom, ali su tumori bili manji nego kod životinja tretiranih samo ciklosporinomA ili takrolimusom. Dodavanje mikofenolat mofetila liječenju ciklosporinomA značajno je smanjilo veličinu tumora. Takav učinak nije zabilježen kod dodavanja MFM liječenju takrolimusom. Dodavanje MFM ciklosporinu smanjilo je upalni infiltrat i gustoću krvnih žila tumora. Sirolimus nije imao učinka na upalni infiltrat, ali je značajno smanjio vaskularizaciju tumora (127), što ukazuje na ulogu imunosupresiva na smanjenje upale i angiogeneze.
- U novijem istraživanju Ming M. i suradnika takrolimus i mikofenolat mofetil smanjili su mogućnost popravka UVB – uzrokovanog DNA oštećenja i apoptoze

u ljudskim keratinocitima, a takrolimus je dodatno zaustavio UVB – uzrokovane signalne molekule ukazujući da mehanizam nastanka tumora nije bio ovisan o imunosupresivima (116).

Usporedbom mikofenolat mofetila i rapamicina pokazalo se da nijedan od navedenih lijekova nije imao utjecaj na početak razvoja tumora, ali rapamicin značajno povećava latenciju većih tumora, reducira njihov broj i reducira UV – izazvane mutacije p53, što upućuje na svojstvo rapamicina da smanji morbiditet i mortalitet kod bolesnika s transplantiranim bubregom (120).

Sve navedene studije govore u prilog mTOR inhibitora kao potencijalnih lijekova koji bi, uz osnovno imunosupresivno djelovanje, mogli reducirati posttransplantacijski razvoj tumora (128).

## **1.7. WNT SIGNALNI PUTOVI**

### **1.7.1. Organizacija gena i funkcija proteina**

Wnt geni spadaju u skupinu gena koji šifriraju proteinske čimbenike rasta, a pronađeni su u brojnih eukariotskih organizama. U ljudi je do sada identificirano 19 Wnt gena, smještenih na kromosomima 2 i 12. Većina Wnt gena ima po 4 egzona, a prvi egzon ima početni metionin. Wnt obitelj proteina čini 19 lipidnih i glikoziliranih proteina. Wnt proteini pronađeni su u signalnim sekretornim putovima što ukazuje na njihovo svojstvo sekretornih proteina. Jednom izlučeni, Wnt proteini vežu se na glikozaminoglikane izvanstaničnog matriksa i, kao takvi, vežu se na staničnu površinu. Prijem i prevođenje Wnt signala uključuje vezenje Wnt proteina na dva različita stanična receptora, članove obitelji gena Frizzled (Fzd) i članove obitelji receptora vezanih na LDL receptor (LRP) (129). Unatoč brojnim istraživanjima i napretku u razjašnjenju funkcije i aktivacije Fzd i Wnt –a, brojni dijelovi signalnih putova još uvijek su nejasni, što je vjerojatno posljedica složenih veza između 19 Wnt liganada te 10 Fzd receptora, čineći signalne puteve izrazito kompliciranim sustavom za proučavanje (129).

Prema dosadašnjim istraživanjima Wnt proteini moduliraju barem 3 signalna puta uključujući beta–katenin ovisni (kanonski) put i beta katenin neovisne (nekanonske)

signalne puteve. Iako se, zbog jednostavnosti, signalni putovi opisuju posebno, kao kanonski i nekanonski, oni se u tkivima preklapaju radi koordinacije kompleksnih staničnih zbivanja. Različite Wnt molekule te različiti Fzd receptori aktiviraju svaki od tih putova. Wnt beta kateninski put najtemeljitiše se istražuje u ljudi. Kanonski Wnt–beta kateninski put modulira prepisivanje ciljnih gena tijekom embrionalnog razvitka uzduž dorzo–ventralne i anteroposteriorne osi te održava homeostazu u stanicama odrasloga organizma. (130, 131, 132).

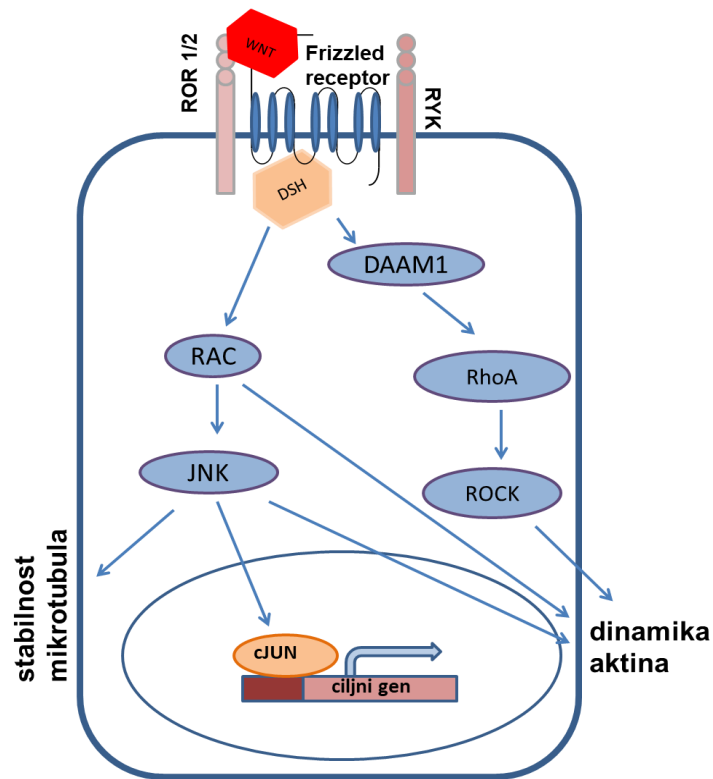
### **1.7.2. Pregled Wnt/PCP signalnog puta**

Kratak pregled Wnt/PCP puta (planarni polarni stanični put, od engl. planar cell polarity) prikazan je na slici. (Slika 3). Istraživanja ukazuju na evolucijsku očuvanost toga puta, a pogled na taj put najbolje je prikazan kod vinske mušice te zebraste ribice koji su ujedno i modeli za njegovo proučavanje (133). Osnovnom ulogom Wnt/ PCP puta smatra se regulacija orijentacije i strukturiranja citoskeleta te migracije stanica unutar pojedinog tkiva ili organa (133). Smatra se da Wnt/PCP signalni put sudjeluje u morfogogenetskim procesima regulirajući dinamiku aktomiozina, no još nije poznat specifični način toga djelovanja. Taj signalni put odgovoran je za polarizaciju uzduž više tjelesnih osi, te upravlja morfogogenetskim staničnim ponašanjem tijekom gastrulacije i neurulacije (132).

Najbolje opisane signalne molekule koje djeluju na PCP signalni put su Wnt5 i Wnt11. Ti ligandi vežu se na Fzd receptor na staničnoj membrani uz pomoć koreceptora Ror1/2 (od engl. tyrosin kinase – like orphan receptor 1/2), Ptk7 (od engl. protein tyrosin kinase 7), Ryk (od eng. receptor tyrosin kinase) i Musk (od engl. muscle skeletal tyrosin kinase). Fzd receptori, zajedno s nekoliko efektorima, uključujući Van Gogh/Prickle i Dishevelled, često su asimetrično raspoređeni unutar stanice regulirajući polarnost. Tijekom aktivnosti PCP signala, signalni G proteini (Rho i Rac) i JNK (engl. c-Jun amino-terminal kinase) aktiviraju se te kontroliraju aktino – miozinske citoskeletne promjene i na taj način utječu na produljenje i migraciju stanica kod beskralješnjaka i kralješnjaka (134, 135)

Procesi u kojima sudjeluju PCP signali u kralješnjaka neprestano se otkrivaju, a uključuju razvitak kože, orijentaciju dlaka, polarizaciju osjetnih stanica unutrašnjega uha, polarizaciju stanica jajovoda i respiratornog trakta, polarizaciju cilija u mnogim

tkivima, migraciju stanica, interkalaciju mezanimalnih stanica tijekom gastrulacije i neurulacije te produljenje hrskavica dugih kostiju (136).



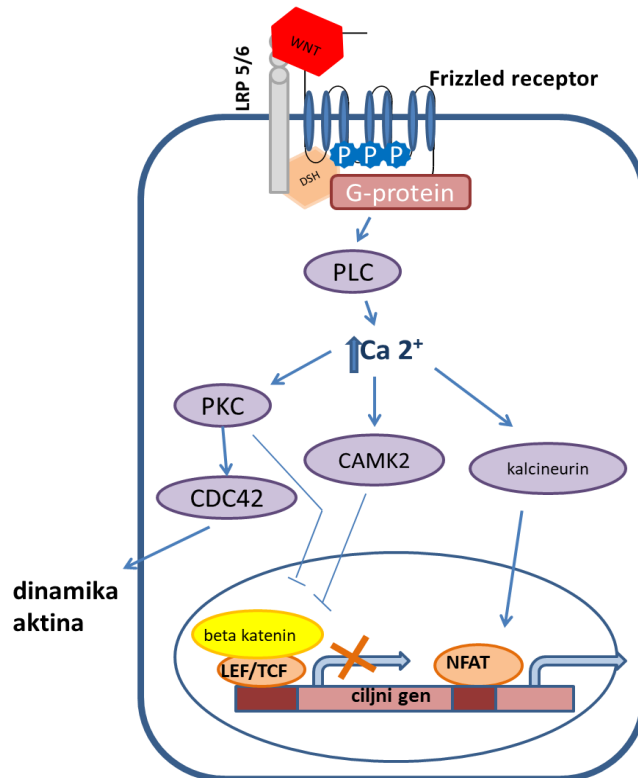
**Slika 3. Prikaz wnt/PCP signalnog puta.**

Wnt ligandi Wnt5 i Wnt11 uz pomoć koreceptora ROR1/2, Ptk7, Ryk i Musk vežu se na Frizzled receptor na staničnoj membrani. Uz pomoć efektor VanGogh/Prickle i Dishevelled aktiviraju se signalni proteini Rho, Rac i cJun. Signalni proteini kontroliraju aktino-miozinske promjene citoskeleta stanice te na taj način kontroliraju produljenje i migraciju stanica.

PCP: planar cell polarity, DSH: Dishevelled, DAAM1: Dishevelled associated activator of morphogenesis 1), JNK: cJun aminoterminal kinase

### 1.7.3. Pregled Wnt/Ca<sup>2+</sup> signalnog puta

Biološka funkcija Wnt/Ca<sup>2+</sup> puta nije do kraja istražena te su u tijeku brojna istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u njegovu ulogu. Dosadašnja istraživanja ukazuju na sposobnost Wnt/Ca<sup>2+</sup> puta u povećanju unutarstanične koncentracije Ca<sup>2+</sup> molekula te sniženju unutarstanične koncentracije cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP)(137,138). Wnt proteini koji vjerojatno mogu utjecati na aktivaciju Fzd-2 su Wnt4, Wnt5A i Wnt11. Aktivacija Fzd-2 receptora dovodi do otpuštanja kompleksa beta/gama podjedinice G-proteina (vjerojatno Go i Gt), što dovodi do aktivacije fosfolipaze C i drugih efektora koji stimuliraju pokretljivost unutarstaničnih iona kalcija. Aktivnost unutarstaničnog kalcija aktivira kalcij-osjetljive enzime (protein kinaza C- PKC, kalcij-kalmodulin ovisna kinaza II (CAMKII) i kalcineurin). PKC aktivira GTPazu CDC42 te preko nje sudjeluje u odvajanju tkiva i kretanju stanica tijekom gastrulacije. Povišena unutarstanična koncentracija Ca<sup>2+</sup> također naizmjenično aktivira kalcineurin i CAMK2. Kalcineurin aktivira čimbenik prepisivanja gena NFAT i na taj način sudjeluje u promoviranju stanične sudbine duž ventralne embrionalne osi i u razvoju srca. CAMK2 zaustavlja beta-katenin/TFC i negativno regulira formiranje dorzalne osi tijekom embrionalnog razvoja (139). Wnt/Ca<sup>2+</sup> signalni put ima važnu ulogu tijekom dorzo-ventralnog strukturiranja embrija, regulira migraciju stanica, razvoj srca, a pretpostavlja se i da ima određenu ulogu u supresiji tumora (137, 138). Pojednostavljen prikaz mogućega djelovanja Wnt/Ca<sup>2+</sup> puta prikazana je na slici (Slika 4).



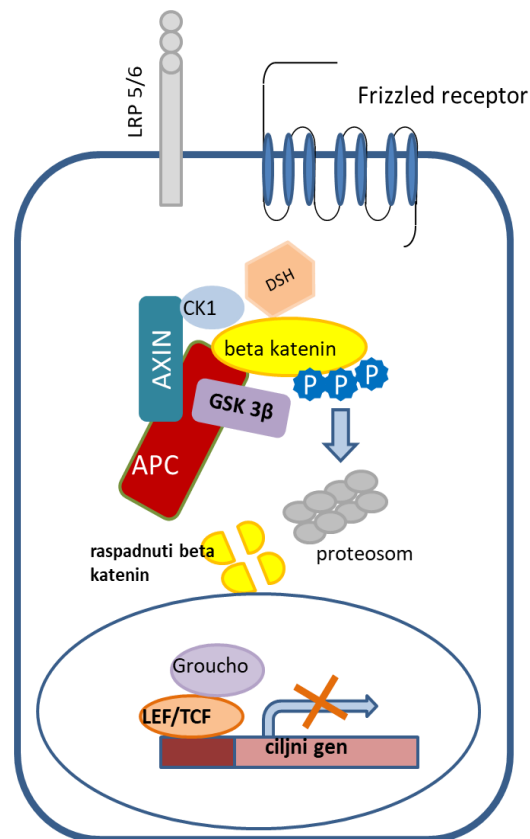
**Slika 4. Pregled Wnt/Ca<sup>2+</sup> signalnog puta.**

Nakon aktivacije fosfolipaze C (PLC) i drugih efektoru vezanjem Wnt4, Wnt5 i Wnt11 na Frizzled 2 receptor dolazi do oslobađanja Ca<sup>2+</sup> iona iz endoplazmatskog retikuluma. Povišenje unutarstanične koncentracije kalcijevih iona aktivira kalcij-osjetljive enzime: PKC (protein-kinaza C), CAMKII (kalcij-kalmodulin kinaza 2) i calcineurin. PKC preko GTP-aze CDC42 utječe na dinamiku aktina i kretanje stanica tijekom gastrulacije. CAMK2 zaustavlja djelovanje beta katenina na prepisivanje ciljnih proteina u stanici, kako bi calcineurin mogao aktivirati čimbenik prepisivanja gena (NFAT) i usmjeriti staničnu sudbinu u formiranje ventralne embrionalne osi.

#### 1.7.4. Pregled Wnt/β – katenin signalnog puta

Glavni čimbenik u Wnt signalnoj kaskadi je slobodni citoplazmatski beta-katenin. Ukoliko nema Wnt signala (Wnt deaktivirano stanje) količina beta-katenina u citoplazmi je niska jer je podložan stalnoj razgradnji. Kompleks koji razgrađuje beta-katenin sastoji se od dva proteina koji se aktiviraju *axin*-a i APC (engl. *adenomatous polyposis coli*). Axin i APC vežu na sebe kazein-kinazu-1alfa (CK1alfa) i glikogen-sintetaza-kinazu-3beta (GSK3beta) koji dodatno pospješuju fosforilaciju beta-katenina. Fosforilacija destabilizira beta-katenin te on biva razgrađen unutar

citoplazme. Bez premještanja beta–katenina u citoplazmu jezgrin čimbenik prepisivanja LEF/TCF (engl. *lymphoid enhancer–binding factor/T cell specific*) veže se s proteinom *Groucho* i sprječava prepisivanje ciljnih gena (Slika 5).



**Slika 5. Wnt beta kateninski put: „deaktivirano“ stanje**

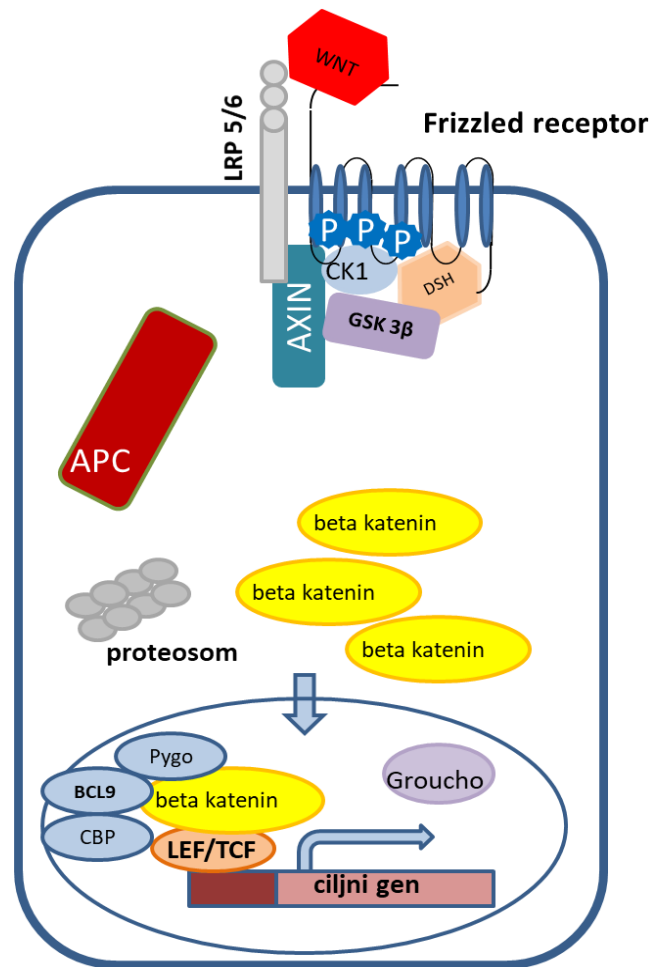
Slobodni beta katenin u citoplazmi veže se na APC i axin, što uzrokuje vezanje GSK3β i CK1. Cijeli kompleks uzrokuje fosforilaciju beta katenina koji zatim biva razgrađen u citoplazmi unutar proteosoma. Kako u citoplazmi nema dovoljno beta-katenina koji bi bio premješten u jezgru, jezgrin čimbenik prepisivanja LEF/TCF veže na sebe protein *Groucho* i prepisivanje gena se zaustavlja. Prilagođeno prema: Yu J, Virshup D. M. Updating the Wnt pathways. *Biosci Rep.* 2014; 34(5), 593-607

APC: *adenomatous polyposis coli*, GSK3β: glikogen-sintetaza-kinaza-3beta, CK1: kazein-kinaza-1alfa, LEF/TCF: *lymphoid enhancer–binding factor/T cell specific*.



Nakon vezanja wnt liganda, receptor Frizzled (Fzd) i njegov koreceptor LRP (engl. lipoprotein receptor-related protein) povežu se i tvore velike multiproteinske komplekse. Dolazi do fosforilacije *axina* uz pomoć CK1 i GSK3 $\beta$  koja omogućuje njegovo vezanje za unutarstanično vezno mjesto na LRP koreceptoru. Fosforilirani axin na, do sada nedovoljno razjašnjeni način, aktivira protein *Dishevelled* (DSH). DSH je modulatorski protein sa sposobnošću interakcije s raznim dijelovima Wnt signalnih putova. Interakcija s multiproteinskim *axin* kompleksom na staničnoj membrani omogućava DSH stabilizaciju beta-katenina u citoplazmi (139). Stabilizirani beta-katenin nakuplja se u citoplazmi te se transportira u staničnu jezgru. Jezgrin beta-katenin premješta *Groucho*, regrutira se u kromatin pomoću čimbenika prepisivanja TF (engl. transcription factor) te stvara komplekse s proteinima BCL9 (engl. B-cell lymphoma 9 protein), *Pygopus*, modifikatorom histamina CBP (engl. CREB (cAMP response-element-binding)-binding protein) i aktivatorima tkivno specifičnih transkriptora. Takav jezgrin beta-katenin prevodi LEF/TCF iz funkcije represora u funkciju aktivatora prepisivanja gena (od kojih su značajniji protoonkogeni AXIN2, cyclin D1 (CCND1), FZD7 and c-Myc (MYC) i matriks metaloproteaza 7 (MMP7)) na vrlo specifičan i pojedinim stanicama svojstven način (140; 141).

TCF djeluju kao blokatori prepisivanja gena suzbijajući Wnt ciljeve u nedostatku signala tako da jačaju TLE (engl. transducin-like enhancer of split) i *Groucho* koji dodatno regrutiraju koaktivatore kao što su histonska acetiltransferaza CREB vežući protein (CBP) i p300 (142)(Slika 6).



**Slika 6. Wnt/ beta kateninski put: „aktivirano“ stanje.**

Vežanje Wnt liganda za Frizzled receptor i njegov koreceptor LRP 5/6 dovodi do privlačenja i vežanja glavnoga inhibitora, *axina* za vezno mjesto na LRP receptoru uz fosforilaciju potpomognutom GSK3 $\beta$  i CK1. Vežanje *axina* uklanja njegov negativni utjecaj na Wnt signalni put i omogućuje aktivaciju fosfoproteina DSH. Aktivacija DSH stabilizira beta-katenin koji se nakuplja u citoplazmi i a zatim se transportira u staničnu jezgru. U jezgri beta-katenin veže na sebe aktivatore tkivno specifičnih transkriptora te prevodi LEF/TCF u funkciju prepisivača ciljnih gena. Prilagođeno prema: Yu J, Virshup D. M. Updating the Wnt pathways. Biosci Rep. 2014; 34(5), 593-607

LRP: lipoprotein receptor–related protein, DSH: *dishevelled*, APC: adenomatous polyposis coli, GSK3 $\beta$ : glikogen-sintetaza-kinaza-3beta, CK1: kazein-kinazu-1alfa, LEF/TCF: *lymphoid enhancer–binding factor/* T cell specific.

### 1.7.5. Wnt signalni putovi i tumori

Suradujući s drugim signalnim putovima, Wnt signalni put kontrolira staničnu proliferaciju, morfologiju i embrionalni razvoj. Regulacijom somatskih matičnih stanica tijekom života održava ravnotežu u tkivima, uključujući kožu, krv, crijeva i mozak. Pogrešna regulacija Wnt signalnog puta dovodi do neoplastične proliferacije u tim tkivima. Budući Wnt/PCP signalni put kontrolira polarnost i migraciju stanica, nepravilna aktivacija toga puta u ljudskim tumorima dovodi do razvoja malignijih fenotipova, invazije i metastaza (143).

Prvi poznati primjer je razvoj karcinoma u obiteljskoj polipozi kolona, nasljednoj bolesti u kojoj bolesnici nasljeđuju mutiranu kopiju APC gena, a drugi APC alel biva izgubljen tijekom života. Ti bolesnici razviju brojne adenomatozne polipe kolona u mlađoj životnoj dobi, koji kasnije mogu prijeći u karcinome (144).

Daljnja istraživanja ukazala su kako mutacije proteina APC, GSK3 beta i *axin*, glavnih proteina u regulaciji beta–kateninskog Wnt puta, sudjeluju u nastanku tumora, kao što su karcinom kolona i melanom. Mutacije koje uzrokuju gubitak funkcije APC gena, ili aktiviraju funkciju CTNNB1 gena (gen koji prepisuje beta–katenin) rezultiraju povišenim razinama beta–katenina i kompleksa beta–katenin/TCF kompleksa u staničnoj jezgri. Popratna nepravilna aktivacija ciljnih gena smatra se kritičnim zbivanjem u ranoj karcinogenezi (145).

Planocelularni karcinomi ljudi također pokazuju izraženost najveće razine beta–katenina u jezgri stanice. Značajno je i da je ablacija beta–katenina rezultirala potpunom regresijom tumora (19). Malanchi I. i suradnici ukazali su 2008.g. na postojanje tumorskih matičnih stanica koje pokazuju obilježja slična matičnim stanicama „bulge“ regije u stanicama folikula dlake. Istraživanje je također ukazalo kako je beta–katenin najčešće smješten unutar stanične jezgre (60). Wnt/beta–katenin signal ključan je u normalnoj koži kao regulator stanične diferencijacije i sudbine folikula dlake, no ima i kritičnu ulogu za održanje tumorskih matičnih stanica u epidermalnim tumorima (19,146).

Osim nasljedne polipoze i posljedično nasljednih karcinoma kolona, embrionalne mutacije Wnt signalnih molekula mogu uzrokovati bolesti kostiju, eksudativnu vitreoretinopatiju te sindrom intelektualne invalidnosti. Mutacije APC gena ili CTNNB1 gena koje aktiviraju Wnt/beta–katenin signalni put pokazane su u kolorektalnom karcinomu, karcinomu prostate i endometrija. Pojačana aktivnost ROR1 u B–staničnim

limfomima i solidnim tumorima te pojačana aktivnost ROR2 u melanomu aktiviraju Rho–ROCK i Rac–JNA signale te potiču rast tumora, razvoj metastaza i rezistenciju na terapiju (142, 147).

Nepravilan Wnt signal te aktivacija signalnoga puta pokazani su u različitim tipovima tumora. U razvoju i progresiji kolorektalnoga karcinoma i karcinoma prostate, također je značajna uloga i Wnt5a (148-150).

Wnt signalni proteini predloženi su i za potencijalne biomarkere karcinoma, uključujući karcinom prostate, pluća i kolorektalni karcinom (149, 151, 152).

Istraživanja su ukazala na ulogu Wnt signalnih putova razvoju i diferencijaciji stanica kože pa se može očekivati razvoj zloćudnih tumora kože uzrokovan nepravilnom aktivacijom tih putova. Analize genskih polja u uzorcima planocelularnih karcinoma kože ukazala su na povišene vrijednosti mRNA Wnt liganada i njihovih receptora. Imunohistokemijske analize planocelularnih karcinoma kože ukazuju na povišene vrijednosti beta–katenina u staničnim jezgrama tumora i u metastazama SCC kože u regionalnim limfnim čvorovima, a inhibicija beta–katenina u stanicama ljudskog modela SCC kože reducira volumen tumora i produžuje vrijeme bez metastaza (153). Proučavajući Wnt1 u planocelularnim karcinomima kože Halifu Y. i suradnici pronašli su visoku izraženost Wnt1 u uzorcima SCC kože i slabiju izraženost biljega u tumora slabije histološke diferencijacije, ukazujući na važnu ulogu Wnt1 u razvoju kožnog SCC, te se isti predlaže za potencijalni tumorski marker (154).

#### **1.7.6. Wnt4**

Istraživanja Wnt4 započela su još 1998.g. istraživanjima Saitoh A. i suradnika na mišjem modelu keratinocita. U istraživanju su pokazali kako normalni mišji keratinociti i melanocitna linija mišjih stanica koje se razmnožavaju *in vitro* sadrže Wnt4 mRNA, dok ju dermalni fibroblasti i dendritičke stanice ne sadrže, ukazujući na Wnt4 signalom potencirana zbivanja unutar epitela kože. Količina Wnt4 mRNA bila je povišena u kulturi keratinocita kako se stanice približavaju, a mitogeni faktori rasta značajno su snizili aktivaciju. Podatci već tada ukazuju kako je gubitak pojavnosti Wnt4 povezan sa slabije diferenciranim, malignim fenotipom. Unatoč tome, kod Wnt4 negativne (Wnt4-) kože mišjeg modela nije bilo abnormalnosti epidermisa prilikom rođenja, no uočene su fibroplazija dermisa i povišena razina kolagena tipa 1. Rezultati ukazuju na izraženost

Wnt4 proteina u epidermisu odraslih miševa te na moguću ulogu u epidermo–dermalnim interakcijama (155).

Mutacije gena *sonic hedgehog* signalnog (SHH) puta, osobito PTCH1 i Smo, središnja su zbivanja u razvoju bazocelularnog karcinoma. Bonifas JM i suradnici pokazali su kako bazocelularni karcinomi imaju povišene vrijednosti Wnt2B i Wnt5a, snižene vrijednosti Wnt4 i nepromijenjene vrijednosti Wnt7B u usporedbi sa zdravim tkivom te ukazuju na autonomne i indirektne učinke mutacija u SHH signalnim genima i indiciraju kako stanice BCC imaju fenotip koji barem djelomično slični epidermalnim matičnim stanicama (17).

Već tada se istraživalo kojim signalnim Wnt putom dolazi do učinaka pojedinih liganada, pa tako i Wnt4. Istraživanja embrionalnog razvitka bubrega ukazala su kako je Wnt4 signal nužan za prelazak mezenhimalnog tkiva u ranom razvitku bubrega u epitelno tkivo iz kojeg kasnije nastaju tubuli bubrega. Istraživanja Lyons JP. i suradnika ukazala su kako Wnt4 ligand utječe na aktivaciju kanonskoga i nekanonskoga Wnt signalnog puta te da oba pridonose tubulogenezi u razvitku bubrega (156).

Uloga Wnt4 do sada je najviše proučavana na ženskom reproduktivnom sustavu. Proučavanjima na mišjim modelima dolazi se do spoznaja o značajnoj ulozi Wnt4 u razvoju ženskog spolnog sustava te u funkciji jajnika. Nedostatak Wnt4 dovodi do poremećaja u razvoju unutarnjih spolnih organa u miševa i do redukcije oocita. Miševi s nedostatkom Wnt4 imali su pojačanu apoptozu oocita što ukazuje na moguću ulogu Wnt4 u izboru oocita i sazrijevanju folikula i u ljudskim ovarijima (157). Wnt4 je ključni signal koji indiferentnu gonadu sisavaca usmjerava prema razvoju ovarija. Prunskaiter R. i suradnici na mišjem modelu pokazali su kako kod Wnt4 *knock out* miša s nedostatkom Wnt4 dolazi do prijevremenog zakazivanja ovarija zbog nedostataka u staničnoj polarnosti unutar folikula, ukazujući time na važnost Wnt4 signala u sazrijevanju ovarijskih folikula (158).

Wang G. i suradnici proučavali su ekspresiju Wnt4 i Wnt5A u normalnom tkivu decidue te u decidui žena s preeklampsijom. Iako je signal bio prisutan u obje skupine, razina mRNA oba biljega u žena s preeklampsijom bila je znatno niža nego u nekomplikiranim trudnoćama, ukazujući na relevantnost Wnt4 i Wnt5a u normalnom decidualnom razvoju, invaziji trofoblasta i implantaciji te je njihov nedostatak vjerojatno uključen u zbivanja koja dovode do preeklampsije (159).

Daljnja istraživanja ukazuju kako delecija Wnt4 smanjuje regeneracijski kapacitet epitela dojke ukazujući na funkcionalnu značajnost izraženosti Wnt4. Kanonski Wnt4

signal u mioepitelu zahtjeva progesteronski receptor i Wnt4. Progesteron i Wnt4 kontroliraju funkciju matičnih stanica preko luminalno–mioepitelne interakcije s Wnt4, no nezavisno o progesteronskim receptorima (160).

Izraženost Wnt4 povećana je u neoplastičnom u usporedbi s normalnim tkivom ljudske dojke. Imunohistokemija otkriva Wnt4 u bioptiranom tkivu ljudske dojke pokazujući jaču izraženost u tumorskom tkivu nego u normalnom epitelu dojke čime se upućuje na Wnt4 kao autokrini gen reguliran ljudskim hormonom rasta uključen u razvoj i rast tumorogenih fenotipova. Autokrini ljudski hormon rasta regulira pojavnost Wnt4, što ukazuje na Wnt4 kao potencijalni cilj u liječenju karcinoma dojke (161).

Istraživanja u ljudi ukazuju na redukciju epitelnih stanica osjetljivih na progesteronske receptore i smanjenje aktivacije Wnt signalnoga puta kao jedan od mehanizama u zaštiti rane trudnoće. Muenst S. i suradnici istraživali su izraženost Wnt4 u tkivu dojki žena koje nisu rodile, žena koje su rodile u ranoj životnoj dobi (do 30 godina života) i žena koje su rodile sa više od 30 godina života, s posebnim osvrtom na kasnije oboljevanje od karcinoma dojke. Izraženost Wnt4 bila je značajno niža u žena koje su rodile, neovisno o dobi i kasnijem razvoju karcinoma dojke. Također, u nerotkinja koje su u kasnijoj dobi oboljele od karcinoma dojki, izraženost Wnt4 bila je značajno veća nego u žena koje su rodile i nisu oboljele od karcinoma dojki, ukazujući kako blokada Wnt signalnog puta predstavlja potencijalni cilj za prevenciju karcinoma dojki u ljudi (162).

Sikora MJ. i suradnici proučavaju stanice invazivnoga lobularnoga karcinoma dojke koji ne odgovara na uobičajenu endokrinu terapiju i kao potencijalni novi signalni put navode Wnt signalni put preko Wnt4 liganda, kritične signalne molekule u razvoju žlijezdanog tkiva dojke regulirane progesteronskim receptorom. U istraživanju su pokazali kako je Wnt4 neophodan za endokrini odgovor u stanicama invazivnog lobularnoga karcinoma dojke, budući da se inhibicijom Wnt4 blokira estrogenom uzrokovano umnažanje tumorskih stanica. Time su ukazali na novi signalni put u stanicama invazivnog lobularnoga karcinoma, s kritičnom ulogom u rastu potaknutom estrogenom i estrogenoj rezistenciji na lijekove. Smatraju kako bi Wnt4 mogao predstavljati novu ciljnu molekulu kojom bi se modulirao endokrini odgovor, osobito u bolesnica s invazivnim lobularnim karcinomom dojke (163).

Za Wnt4 se zna da regulira proliferaciju pituitarnih stanica miša tijekom embrionalnoga razvitka, a istraživanja ukazuju kako tijekom embrionalnog razvitka Wnt4 regulira umnažanje i preživljenje specifičnih pituitarnih stanica koje stvaraju

hormone (164). Miyakoshi T. i suradnici su pokazali pojačanu izraženost Wnt4 u adenomima koji secerniraju hormon rasta, prolaktin-secernirajućim adenomima i adenomima koji secerniraju TSH (tiroidstimulirajući-hormon). Također su ukazali na aktivaciju beta-katenin neovisnoga puta koji aktivira Wnt4 u ovim tumorima (165). Istraživanja Li W. i suradnika potvrdila su istraživanja Miyakoshi T. i suradnika o pojačanoj izraženosti Wnt4 u pituitarnim tumorima, no jačina signala je bila u inverznom odnosu sa stupnjem invazije tumora. Jačina Wnt4 signala smanjena je u višim stupnjevima invazivnosti tumora. Zbog toga smatraju kako njegova pretjerana aktivacija može smanjiti invazivnost pituitarnih tumora (166).

Chen Y. i suradnici ispitivali su pojavnost Wnt4 u stanicama timusa. Razvoj epitelnih stanica timusa pod kontrolom je Wnt signalnoga puta na način da izraženost Wnt4 i koštanih morfogenetskih proteina (BMP, engl. bone morphogenic proteins) dovodi do aktivacije čimbenika prepisivanja FoxN1 (*forkhead box N1*). Kočenje Wnt signalnoga puta dovodi do degradacije timusa. Prijašnje studije istih autora ukazale su na aktivaciju Wnt signalnog puta i nepravilnu izraženost FoxN1 u razvoju timoma, rijetkog tumora koji nastaje iz epitelnih stanica timusa. Daljnje analize na životinjskom modelu ukazale su kako smanjena aktivacija Wnt4 i smanjena izraženost FoxN1 dovode do inhibicije rasta timoma, što bi se moglo upotrijebiti u terapijskom djelovanju na timom (167).

Proučavajući molekularne mehanizme planocelularnog karcinoma penisa, rijetkog karcinoma s izrazitom sklonošću ranom invazivnom rastu, Arya M. i suradnici ispitivali su pojavnost Wnt4 liganda i protoonkogene Wnt signalnog puta CD1, cMYC i MMP7. Istraživanjem su uvidjeli značajno jaču pojavnost Wnt4 i protoonkogene u karcinomima u usporedbi sa zdravim tkivom. Također, istraživanje je ukazalo na smanjenu pojavnost Wnt4 u tumorima gradusa 2 u odnosu na tumore gradusa 1. Rezultati ukazuju na pojačanu aktivnost Wnt4 signala u karcinogenezi SCC, no smanjenu aktivnost tijekom rasta i širenja karcinoma (168).

## 2. HIPOTEZA

Dulje trajanje imunosupresije, starija dob pri transplantaciji i dulje vrijeme provedene dijalize rizični su čimbenici za razvoj karcinoma kože nakon transplantacije bubrega. Wnt4 je imunohistokemijski biljeg čija izraženost može ukazati na invazivnije tipove zloćudnih nemelanomskih tumora kože.



### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

**Opći cilj** ovoga istraživanja jest identificirati skupinu bolesnika s transplantiranim bubregom pod povećanim rizikom za razvoj zloćudnih tumora kože.

**Specifični ciljevi** ovoga istraživanja su:

1. utvrditi učestalost i vrstu zloćudnih tumora kože u bolesnika nakon transplantacije bubrega u bolesnika registriranih u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju od 1973. do 2014. god.
2. prikupiti i obraditi podatke o dobi bolesnika pri transplantaciji, geografskoj regiji u kojoj žive, trajanju nadomještanja bubrežne funkcije dijalizom, vrsti, intenzitetu i trajanju imunosupresije
3. ispitati izraženost imunohistokemijskog biljega Wnt4 kod nemelanomskih tumora kože imunokompetentnih bolesnika i bolesnika s transplantiranim bubregom te usporediti tu izraženost s izraženošću biljega kod zdrave kože.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. ISPITANICI

U retrospektivno istraživanje uključeni su bolesnici iz baze podataka Kliničkoga bolničkoga centra Zagreb.

Iz baze podataka Zavoda za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju identificirani su bolesnici kojima je u razdoblju od 1974.g. do 2014. godine kronično bubrežno zatajenje liječeno transplantacijom bubrega. U bazi podataka pronađena su 1232 bolesnika, ekstrahirani su potrebni podatci te su korišteni za statističku obradu. Istraživanje je provedeno u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Kliničkom zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Za imunohistokemijsku analizu biljega Wnt4 koristili su se u parafin uklopljeni preparati bazocelularnih i planocelularnih karcinoma kože iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb i Klinike za dermatovenerologiju KBC-a Zagreb.

Ukupno je imunohistokemijski obojano i pregledano:

- 28 bazocelularnih karcinoma i 28 planocelularnih karcinoma bolesnika s transplantiranim bubregom (imunosuprimirani bolesnici) za proučavanje izraženosti biljega Wnt4 u zloćudnim nemelanomskim tumorima kože – ispitivana skupina bolesnika
- 77 bazocelularnih i 76 planocelularnih karcinoma bolesnika koji nemaju transplantirani bubreg (imunokompetentni bolesnici) i nisu bili izloženi imunosupresivnoj terapiji, uzetih slučajnim odabirom – kontrolna skupina bolesnika
- 150 uzoraka zdrave kože imunokompetentnih bolesnika za proučavanje izraženosti biljega Wnt4 u zdravoj koži.

Zdravom kožom smatra se histološki uredna koža koja je od ruba planocelularnoga i/ili bazocelularnoga karcinoma kože odvojena minimalno 4mm.

Zabilježeni su podatci o starosti bolesnika iz kontrolne skupine u vrijeme oboljevanja od tumora, a navedeni podatci su se kasnije koristili za usporedbu s transplantiranim bolesnicima.

#### **4.1.1. ETIČKI ASPEKTI**

Identitet bolesnika čiji su podatci korišteni u istraživanju dio su arhive KBC-a Zagreb. Tijekom upisa i obrade podataka identitet pojedinoga bolesnika je zaštićen postupkom pseudoanonimiziranja, u kojem se identifikatori zamjenjuju pseudonimom. Tijekom upisa i obrade podataka svaki ispitanik zaveden je pod rednim brojem tako da istraživači koji rade s podacima ne znaju identitet ispitanika. Prema Zakonu o zaštiti osobnih podataka, podatci će se u obliku koji omogućava identifikaciju čuvati samo tijekom razdoblja potrebnog u svrhe zbog kojih se prikupljaju ili dalje obrađuju.

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom o etičkim principima pri istraživanju na ljudima i odobrilo ga Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb te Etičko povjerenstvo Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### **4.2. PLAN EPIDEMIOLOŠKOG ISTRAŽIVANJA I METODE**

Iz baze podataka izdvojili smo podatke o bolesnicima koji su nakon transplantacije bubrega razvili nemelanomske tumore kože te utvrdili pojavnost planocelularnih i bazocelularnih karcinoma.

Ekstrahirali smo podatke o dobi bolesnika pri transplantaciji te dobi bolesnika pri nastanku tumora kako bismo usporedili dob oboljevanja od tumora u bolesnika s transplantiranim bubregom u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika te izračunali vrijeme trajanja imunosupresije u bolesnika s transplantiranim bubregom te ih usporedili s podacima iz literature.

Geografsko podrijetlo ispitanika dijeli bolesnike na one koji žive u kontinentalnom području Republike Hrvatske i one koji žive u primorskom području Republike Hrvatske. Prema podacima Hrvatskog hidrometeorološkog zavoda kontinentalni dio RH godišnje primi 3161–4680 MJ/m<sup>2</sup> sunčeve energije, dok primorski dio obasja 4681–5760 MJ/m<sup>2</sup> sunčeve energije što potvrđuje kako je izloženost bolesnika UV zračenju

u primorskom području dulja i intenzivnija. Granicu između kontinentalnog i primorskog područja RH povukli smo na južnoj granici Karlovačke županije. Na taj smo način došli do podatka koliko život u regiji s većom izloženošću UV zrakama utječe na pojavnost tumora.

Izdvojili smo podatke o vremenu trajanja nadomještanja bubrežne funkcije dijalizom, te pokušali dobiti uvid utječe li određeno vrijeme trajanja dijalize na razvoj nemelanomskih tumora kože.

Prikupljanjem i obradom podataka dobili smo uvid u posttransplantacijski imunosupresivni terapijski režim, tj. podatke o vrsti i intenzitetu imunosupresivne terapije, dijeleći pritom terapiju na dvojnju terapiju i trojnu terapiju. Transplantirani bolesnici terapijski su izloženi brojnim lijekovima, no za ovo istraživanje u obradu su uzeti samo imunosupresivni lijekovi. Trojnom imunosupresivnom terapijom smatra se istovremeno uzimanje tri imunosupresivna lijeka u fazi dugotrajnog održavanja, a dvojnju terapijom smatra se istovremeno uzimanje dva imunosupresivna lijeka. U Republici Hrvatskoj odobreni imunosupresivni lijekovi su inhibitori kalcineurina (ciklosporin i takrolimus), antiproliferacijski lijekovi (mikofenolna kiselina i azatioprin) te mTOR inhibitori (sirolimus i everolimus).

### **4.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA**

Dijagnoza nemelanomskih tumora kože postavljena je temeljem anamneze, kliničke slike te pregledom hemalaun–eozinom bojanih histoloških preparata.

U istraživanju smo imunohistokemijskom analizom ispitali postoji li izraženost Wnt4 u bazocelularnom i planocelularnom karcinomu kože, opisali mjesta izraženosti Wnt4 unutar stanice te označili pojavnost Wnt4 unutar tumora kako bismo ju kasnije mogli uspoređivati sa zloćudnim nemelanomskim tumorima kože u bolesnika s transplantiranim bubregom.

Također, imunohistokemijski je pokazana pojavnost biljega Wnt4 u cijelosti ekscidiranih i u parafin uklopljenih planocelularnih i bazocelularnih karcinoma kože bolesnika s transplantiranim bubregom.

Imunohistokemijsko bojanje i analiza izraženosti Wnt4 izvršena je u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb.

Za imunohistokemijsko bojanje koristilo se u formalinu fiksirano tkivo uklopljeno u parafinske blokove koje je potom izrezano na uzorke debljine 4 $\mu$ m. Uzorci su deparafinizirani i rehidrirani smanjujućim koncentracijama alkohola. Svi uzorci bojani su standardnim imunohistokemijskim postupkom, komercijalno dostupnim protutijelom na Wnt4 (Abcam, UK). Za demaskiranje antigena korištena je mikrovalna pećnica (95°C, 15 minuta, Target retrieval otopina pH 9,0). Za vizualizaciju izraženosti biljega korištena je standardna avidin-biotin imunohistokemijska metoda (LSAB, Dako, Glostrup, Denmark) koristeći automatski stroj za bojanje (TechMate, Dako) koji koristi kapilarnu aktivnost. Napravljene su pozitivna i negativna kontrolna bojanja.

Pozitivnom reakcijom smatra se obojenost stanične membrane, citoplazme ili jezgre stanice. Izraženost Wnt4 izrazili smo semikvantitativno, odnosno udio pozitivnih stanica u ispitivanom uzorku, kako tumorskih tako i zdravih keratinocita epidermisa i opisali na slijedeći način:

1. Wnt negativno (-): < 10% pozitivnih stanica
2. Wnt slabo pozitivno (+): 10 – 49% pozitivnih stanica
3. Wnt4 umjereno pozitivno (++) : 50 – 74% pozitivnih stanica
4. Wnt4 izrazito pozitivno (+++) : više od 75% pozitivnih stanica

Analizirali smo 8 vidnih polja mikroskopa, pri povećanju x 400, s najmanje 500 stanica svakog uzorka.

#### **4.4. STATISTIČKA ANALIZA**

S obzirom na vrstu varijabli i tip distribucije podataka, identificirane varijable od interesa opisane su udjelom, medijanom ili aritmetičkom sredinom, a rasap podataka standardnom devijacijom, odnosno interkvartilnim rasponom.

Statističku značajnost varijabli izračunali smo Studentovim t–testom ili  $X^2$  testom uz razinu značajnosti  $P < 0,05$ . Za pojedine varijable od interesa izračunali smo i omjer šansi za pojavnost uz interval pouzdanosti od 95%.

Normalnost distribucije analizirala se odgovarajućim testovima.

Vrijeme do pojave karcinoma nakon transplantacije analizirano je koristeći analizu preživljenja. Prikazane su Kaplan-Meireove krivulje za pojavnost karcinoma ovisno o dobi, zemljopisnom podrijetlu i drugim podacima od interesa. Krivulje su uspoređene log rank testom.

Za analizu utjecaja identificiranih varijabli na vrijeme pojavnosti karcinoma koristili smo Cox-ovu regresijsku analizu. Razina značajnosti je  $P < 0,05$ .

Za usporedbu razlike izraženosti Wnt4 između skupina (uzoraka kože) koristili smo neparametrijske testove: razlike između tri ispitivane skupine utvrdile su se Kruskal – Wallis-ovim testom, a razlike između dvije skupine i Wilcoxon-ovim testom s razinom značajnosti  $p < 0,05$ .

Za obradu podataka koristili smo programe: Microsoft® Excel® 2016, Microsoft corporation, Redmond (WA), USA i programski jezik R: R Core team 2017. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL R: The R Project for Statistical Computing.

## 5. REZULTATI

### 5.1. OPĆI PODATCI ISPITANIKA

Kako bismo dobili uvid u epidemiološke podatke o bolesnicima s transplantiranim bubregom, režime njihove imunosupresivne terapije i pojavnost tumora, pretražili smo bazu podataka Zavoda za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju KBC-a Zagreb.

Osnovna obilježja bolesnika s transplantiranim bubregom navedena su u priloženoj tablici (Tablica 2). U Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju KBC-a Zagreb ukupno se liječi 1232 bolesnika s transplantiranim bubregom (BTB). Većina bolesnika s transplantiranim bubregom su muškarci (59,74% ispitanika), a 40,26% su žene. Tri četvrtine bolesnika s transplantiranim bubregom živi u kontinentalnom području Republike Hrvatske, dok ostala četvrtina živi u primorskom području RH. Podatci su sukladni podacima o gustoći naseljenosti stanovništva.

<b>Spol</b>	<b>Broj bolesnika</b>	
Žene	496	(40,26%)
Muškarci	736	(59,74 %)
Ukupno	1232	(100,00%)

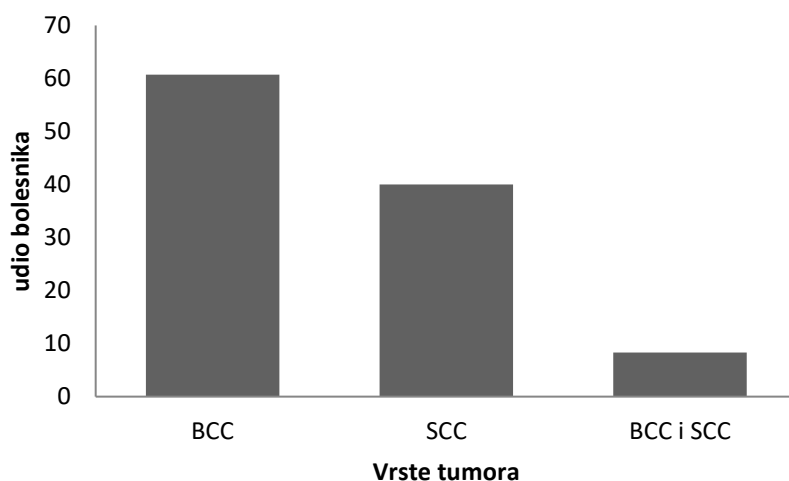
  

<b>Prebivalište</b>		
Kontinentalna RH	932	(75,65%)
Primorska RH	300	(24,35%)
Ukupno	1232	(100,00%)

**Tablica 2. Bolesnici s transplantiranim bubregom prema spolu i prebivalištu.**

## 5.2. UČESTALOST ZLOČUDNIH NEMELANOMSKIH TUMORA KOŽE U BOLESNIKA S TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM

Do zaključivanja istraživanja, 84 (6,81%) bolesnika razvilo je barem jedan tumor kože. Ovih 84 bolesnika s transplantiranim bubregom razvilo je ukupno 125 tumora. Po jedan zloćudni nemelanomski tumor kože razvilo je 65 bolesnika, 8 bolesnika razvilo je dva tumora, 7 bolesnika razvilo je tri tumora, 2 bolesnika razvila su 4 tumora, jedan bolesnik imao je 6 tumora dok je jedan bolesnik razvio čak 9 tumora kože. Bazocelularni karcinom kože nastao je u 51 bolesnika, u 26 bolesnika nastao je planocelularni karcinom kože, dok je oba tumora razvilo 7 bolesnika. Omjer pojavnosti BCC i SCC u našoj studiji je 1,76:1. (Slika 7).



**Slika 7. Učestalost zloćudnih nemelanomskih tumora kože.**

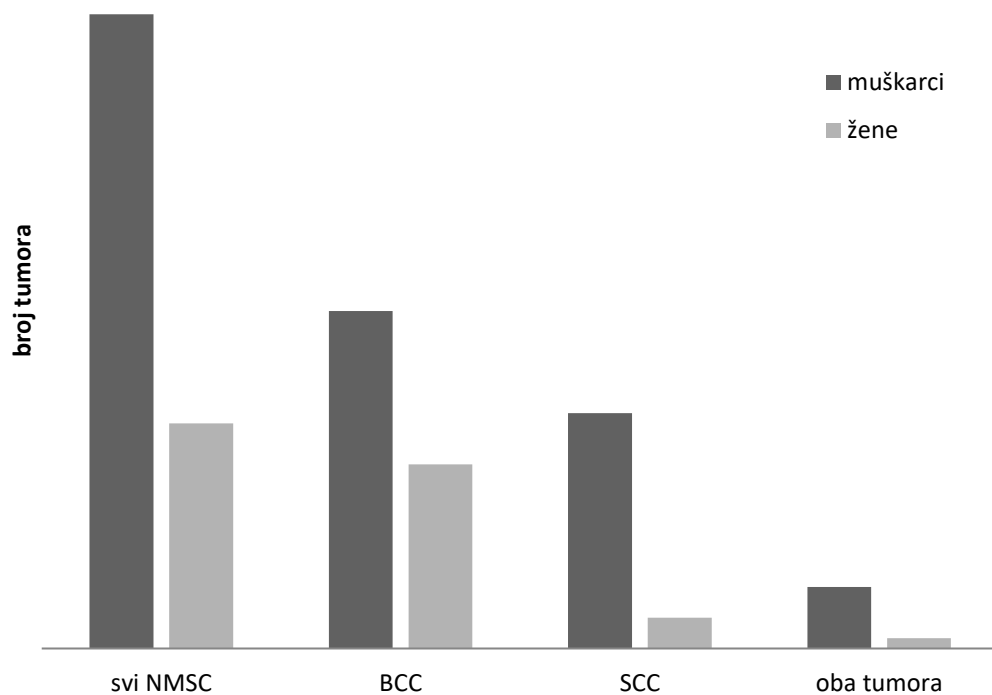
Prikazan je udio bolesnika s transplantiranim bubregom koji su razvili bazocelularni karcinom, udio bolesnika koji su razvili planocelularni karcinom i broj bolesnika koji je razvio obje vrste NMSC.

BCC: bazocelularni karcinom, SCC: planocelularni karcinom.



Željeli smo ispitati oboljevaju li muškarci s transplantiranim bubregom od zloćudnih nemelanomskih tumora više nego žene s transplantiranim bubregom.

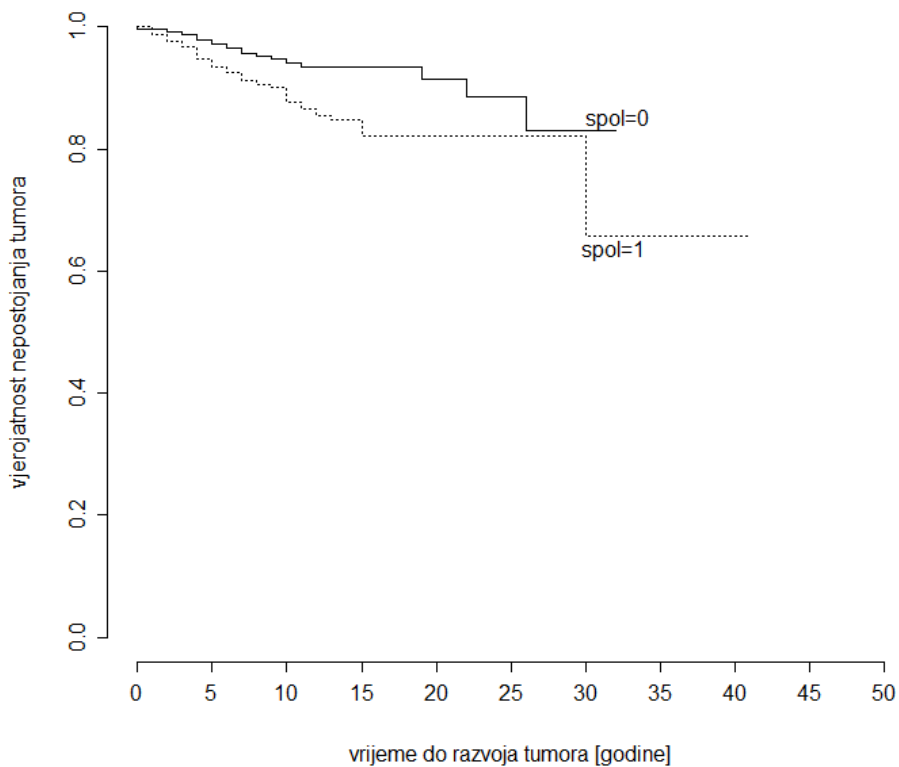
U ispitivanoj skupini, ukupno 73,8% muškaraca i 26,2% žena razvilo je zloćudni nemelanomski tumor kože. Bazocelularni karcinom kože razvila su 33 muškarca i 18 žena, dok su planocelularni karcinom razvila 23 muškarca i 3 žene. Oba tumora razvilo je 6 muškaraca i 1 žena. Omjer pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora muškaraca i žena je 2,6:1. Muškarci češće oboljevaju od zloćudnih nemelanomskih tumora nego žene ( $X^2$ ,  $p= 0,007$ ) i imaju 50% veću šansu oboljevanja od zloćudnih nemelanomskih tumora kože (Relativni rizik (OR, engl. odds ratio) 1,98 (1,20 – 3,27),  $P= 0,007$ ) (Slika 8). Nadalje, vrijeme od transplantacije do razvoja prvog NMSC značajno je kraće u muškaraca nego u žena. ( $P= 0,002$ ) (Slika 9). Medijan vremena od transplantacije do razvoja prvog NMSC u muškaraca s transplantiranim bubregom je 5 (interkvartilni raspon 7,5), a u žena 6 godina (interkvartilni raspon 7).



**Slika 8. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora raspoređena po spolu.**

Prikazana je ukupna pojava zloćudnih nemelanomskih tumora u ispitivanoj skupini i pojava pojedinih karcinoma za muškarce i žene. Prikazan je i broj bolesnika koji su oboljeli od oba tumora.

NMSC: zloćudni nemelanomski tumori kože, SCC: planocelularni karcinom, BCC: bazocelularni karcinom



**Slika 9. Vrijeme od transplantacije do pojave tumora ovisno o spolu bolesnika.**

Prikazano je vrijeme od transplantacije do razvoja zloćudnih nemelanomskih tumora kože u žena i muškaraca s transplantiranim bubregom. Muškarci s transplantiranim bubregom ranije su razvili tumore od žena s transplantiranim bubregom.

0: žene s transplantiranim bubregom, 1: muškarci s transplantiranim bubregom.  $X^2(\text{logrank})$  9,5 P= 0,002.

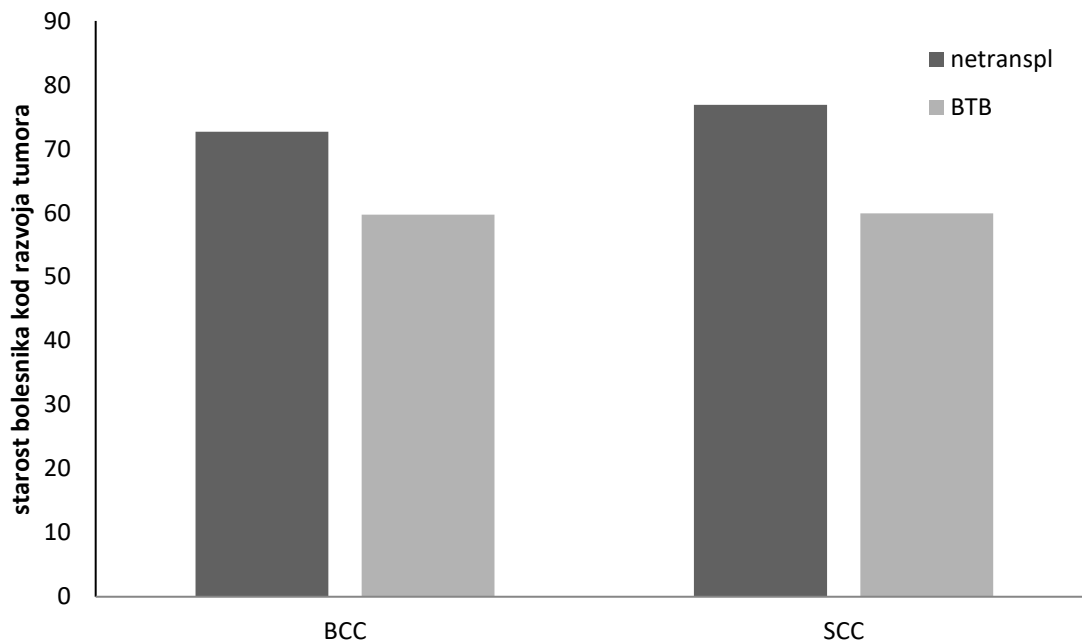
Nadalje, željeli smo ispitati oboljevaju li muškarci s transplantiranim bubregom od zloćudnih nemelanomskih tumora u ranijoj životnoj dobi nego žene. Prosječna starost bolesnika s transplantiranim bubregom kod razvoja tumora bila je  $60,2 \pm 8,1$  godina; za muškarce  $60 \pm 8,3$  i za žene  $60,6 \pm 7,9$  godina. Muškarci i žene s transplantiranim bubregom u podjednakoj životnoj dobi oboljevaju od zloćudnih nemelanomskih tumora kože.

Zanimala nas je starost svih bolesnika pri transplantaciji bubrega. Prosječna dob naših bolesnika pri transplantaciji bila je  $46,6 \pm 14,3$  godine. Prosječna dob žena pri transplantaciji bila je  $46,0 \pm 14,2$  godine, a muškaraca  $46,9 \pm 14,4$  godine.

Za uvid u djelovanje imunosupresije na pojavu zloćudnih nemelanomskih tumora kože, izračunali smo i starost pojedinih skupina bolesnika pri transplantaciji. Bolesnici s transplantiranim bubregom koji su razvili nemelanomski tumor kože pri transplantaciji su bili u dobi od  $53,6 \pm 10$  godina, a starost bolesnika koji do kraja istraživanja nisu razvili tumor, u vrijeme transplantacije bila je  $46,0 \pm 14,5$  godina. Razlika u starosti pri transplantaciji između bolesnika koji su razvili NMSC i bolesnika koji nisu razvili tumor je 7,6 s intervalom pouzdanosti 4,4 – 10,7. Starija dob pri transplantaciji povećava vjerojatnost razvoja NMSC (Studentov t – test  $p < 0,0001$ )

Kako bismo ispitati oboljevaju li bolesnici s transplantiranim bubregom od zloćudnih nemelanomskih tumora ranije nego bolesnici kontrolne skupine izračunali smo prosječnu dob bolesnika kod razvoja BCC i prosječnu dob kod razvoja SCC. Te smo podatke usporedili sa starosti oboljevanja bolesnika kontrolne skupine koji nemaju transplantiran bubreg. Prosječna starost kod razvoja BCC u bolesnika s transplantiranim bubregom bila je  $59,7 \pm 8,3$  godina, SCC  $59,9 \pm 8,1$  godina, a kod bolesnika koji su razvili oba tumora prvi tumor se javio u prosjeku u dobi od 64,1 godine. Bolesnici koji nemaju transplantirani bubreg prosječno obole od BCC sa  $72,7 \pm 11,4$  godina života, a od SCC sa  $76,9 \pm 9,7$  godina (Slika 10). Razlika u starosti kod oboljevanja od bazocelularnog karcinoma u ove dvije skupine je 12,9 godina s intervalom pouzdanosti 9,3 – 16,6. Bolesnici s transplantiranim bubregom u statistički značajno ranijoj životnoj dobi oboljevaju od BCC nego bolesnici koji nemaju transplantirani bubreg (Studentov t – test  $p < 0,0001$ ). Razlika u starosti bolesnika kod oboljevanja od SCC između netransplantiranih i transplantiranih bolesnika je 16,9 s

intervalom pouzdanosti 12,8–21,2. Bolesnici s transplantiranim bubregom u statistički značajno mlađoj životnoj dobi oboljevaju od planocelularnog karcinoma nego netransplantirani bolesnici (Studentov t–test  $p < 0,0001$ ).

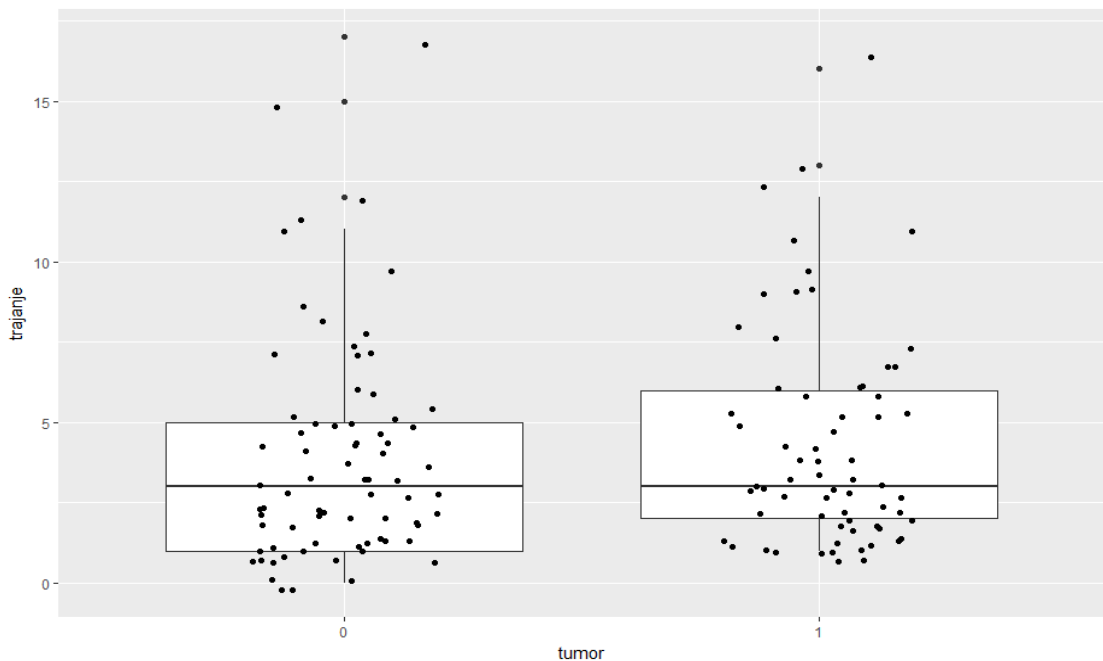


**Slika 10. Starost bolesnika kod razvoja zloćudnih nemelanomskih tumora kože.**

Prikazana je starost bolesnika koji nemaju transplantiran bubreg i bolesnika s transplantiranim bubregom (BTB) kod razvoja bazocelularnog karcinoma kože te starost netransplantiranih i BTB kod oboljevanja od planocelularnog karcinoma kože. BTB u značajno ranijoj dobi oboljevaju od oba zloćudna nemelanomska tumora kože (Studentov t – test  $p < 0,0001$ ).

BCC: bazocelularni karcinom, SCC: planocelularni karcinom, netranspl: bolesnici oboljeli od zloćudnog nemelanomskog tumora kože koji nemaju transplantiran bubreg, BTB: bolesnici s transplantiranim bubregom.

Budući je najčešće liječenje kronične bubrežne bolesti hemodijaliza, kod svih naših bolesnika je, prije transplantacije, kronična bubrežna bolest liječena hemodijalizom i to tijekom različito dugog razdoblja. Medijan trajanja hemodijalize u bolesnika koji nisu razvili NMSC i u bolesnika koji su razvili NMSC prije transplantacije bio je 3 godine (interkvartilni raspon 4). Vrijeme provedeno na dijalizi prije transplantacije kod naših bolesnika nije utjecalo na razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože, Wilcoxonov test  $p=0,272$  (Slika 11).



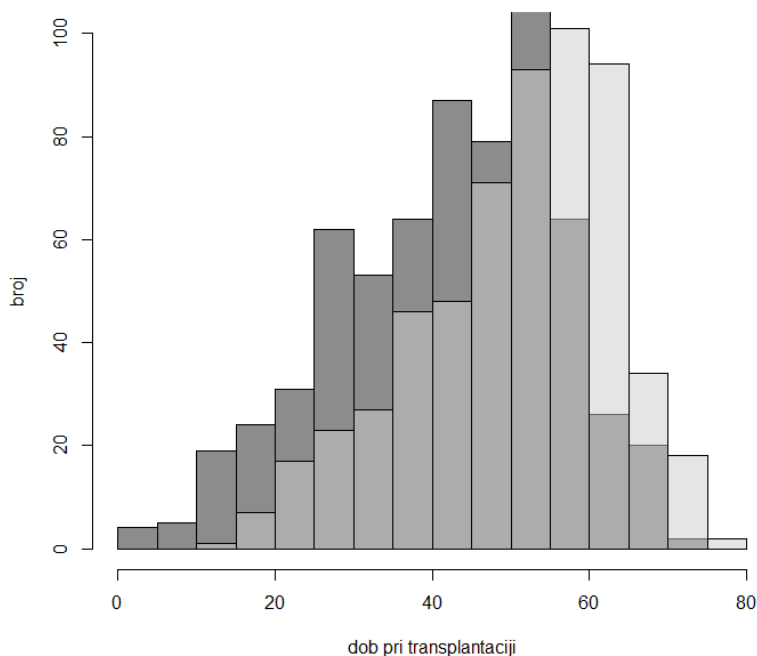
**Slika 11. Vrijeme liječenja hemodijalizom prije transplantacije.**

Dijagrami s pravokutnikom prikazuju vrijeme hemodijalize prije transplantacije u BTB koji su razvili tumor kože i BTB koji nisu razvili tumor kože. Vrijeme provedeno u liječenju hemodijalizom kod naših bolesnika nije značajno utjecalo na razvoj NMSC nakon transplantacije. Wilcoxonov test  $p=0,272$ .

Trajanje (hemodijalize): u godinama. Pojavnost tumora: 0: bolesnici koji nisu oboljeli od NMSC, 1: bolesnici koji su oboljeli od NMSC.

Medijan vremena od transplantacije do razvoja nemelanomskog tumora kože je 5 (3–9,75) godina.

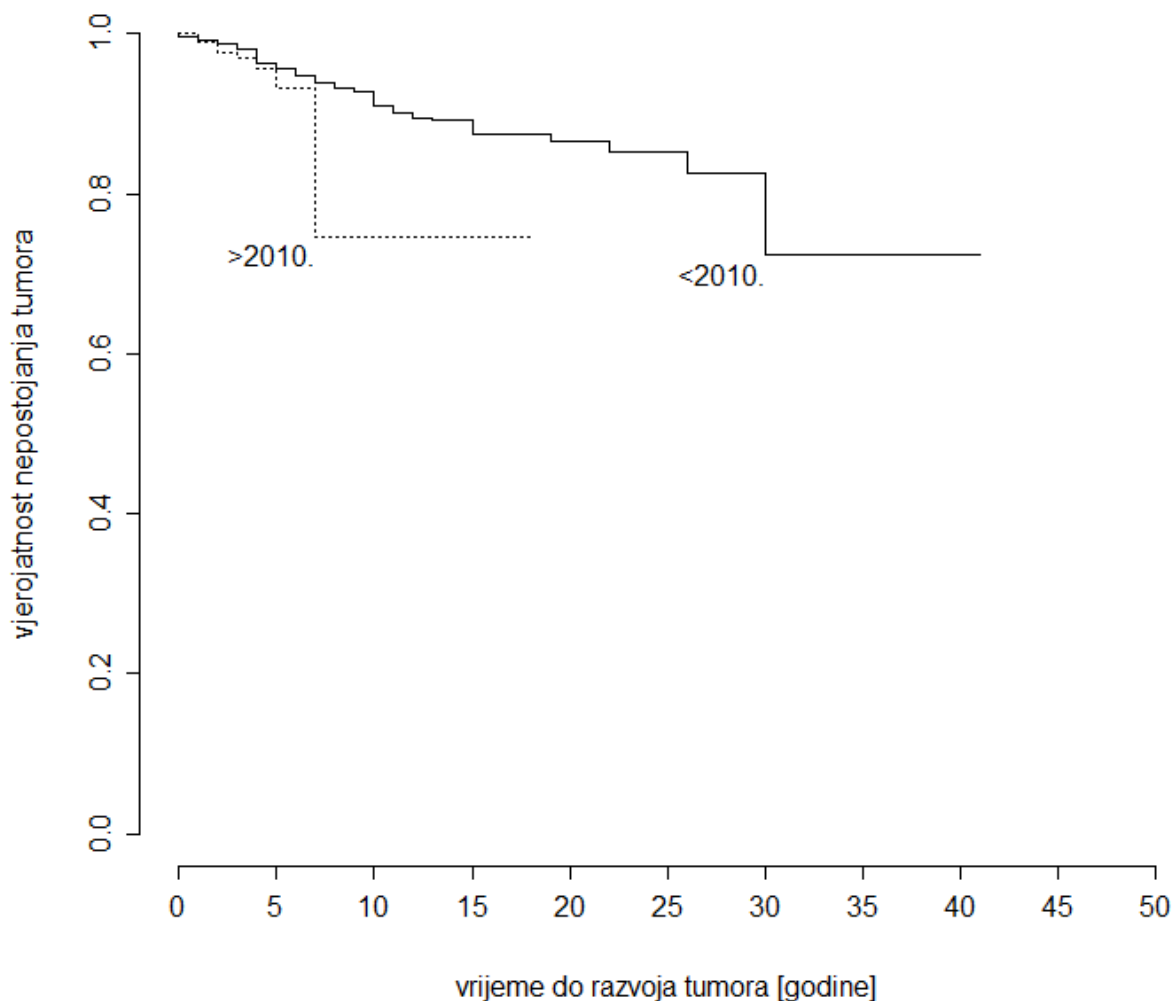
Kako bismo pobliže utvrdili vrijeme do nastanka tumora, bolesnike smo podijelili na one koji su transplantirani prije 2010. godine i one koji su transplantirani 2010. godine i kasnije. Medijan starosti bolesnika pri transplantaciji transplantiranih prije 2010.g. je 44 (32–53) godine, dok je medijan starosti bolesnika pri transplantaciji nakon 2010.g. 53 (43–61) godine. Bolesnici transplantirani nakon 2010. pri transplantaciji su značajno stariji nego bolesnici transplantirani prije te godine (Studentov t–test,  $P < 0,0001$ ) (Slika 12). Vrijeme do razvoja tumora ovisno o starosti prilikom transplantacije prikazano je grafički (Slika 13).



**Slika 12. Starost bolesnika pri transplantaciji bubrega prije i nakon 2010. godine.**

Prikazan je raspon starosti bolesnika pri transplantaciji bubrega. Bolesnici transplantirani nakon 2010. godine značajno su stariji nego bolesnici transplantirani prije te godine. Studentov t – test,  $P < 0,0001$ . Starost najvećeg broja bolesnika u vrijeme transplantacije u obje skupine je između 40 i 60 godina života, no nakon 2010. godine transplantira se i sve više bolesnika starijih od 50 godina.

tamno osjenčana polja: bolesnici transplantirani prije 2010. godine, svijetlo osjenčana polja: bolesnici transplantirani nakon 2010.godine, srednje tamno osjenčana polja: preklapanje osjenčanih polja



**Slika 13. Vrijeme od transplantacije do oboljevanja od tumora kod bolesnika transplantiranih prije i nakon 2010. godine.**

Prikazano je vrijeme od transplantacije do oboljevanja od zloćudnih nemelanomskih tumora u bolesnika koji su transplantirani prije 2010. godine i u bolesnika koji su transplantirani 2010.g. i kasnije. Na slici se vidi da je vrijeme od transplantacije do pojave prvog tumora kraće kod bolesnika transplantiranih nakon 2010. godine, no taj rezultat još uvijek nije statistički značajan.  $X^2$  (logrank) = 2,4,  $P=0,12$ .

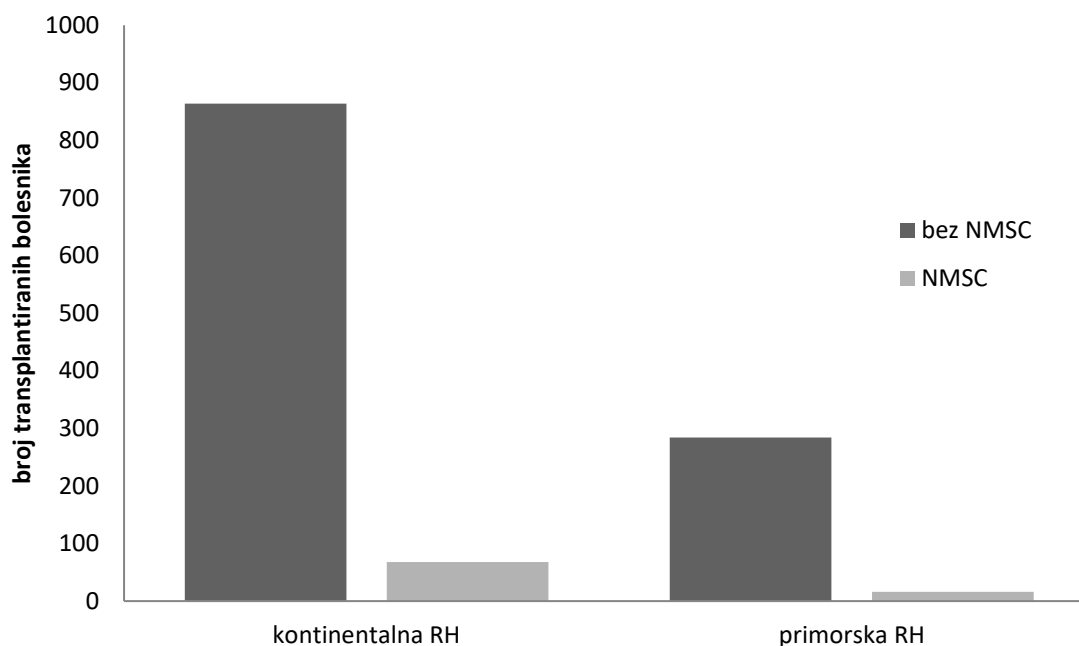
<2010= bolesnici transplantirani prije 2010.godine, >2010= bolesnici transplantirani 2010. godine i kasnije.



Jedan od čimbenika rizika za razvoj zloćudnog nemelanomskog tumora u bolesnika s transplantiranim bubregom je izloženost UV zrakama. Za procjenu utjecaja izloženosti UV zrakama tijekom života i pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože, BTB smo podijelili ovisno o prebivalištu.

Prebivalište u kontinentalnom području Republike Hrvatske (RH) ima 932 bolesnika, a 300 bolesnika prebiva u primorskom dijelu RH (Tablica 2). Od toga, 68 (7,3%) bolesnika koji žive u kontinentalnom dijelu RH razvilo je zloćudni nemelanomski tumor kože, dok je 16 (5,3%) bolesnika primorske Hrvatske razvilo tumor kože.

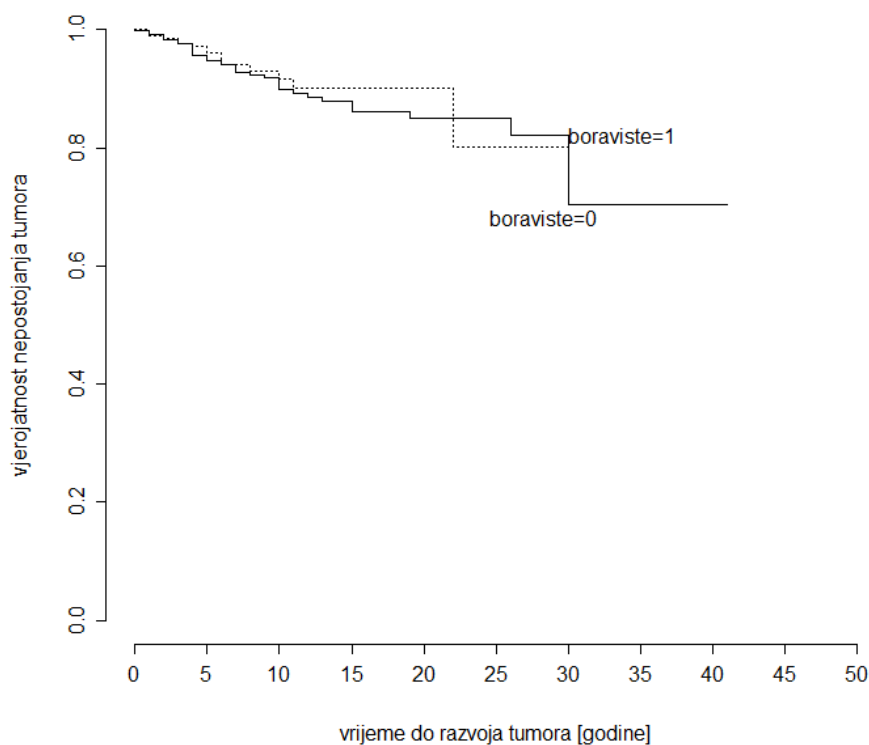
Pojavnost tumora u bolesnika koji žive u primorskom dijelu RH ne razlikuje se statistički značajno od pojavnosti tumora kod bolesnika koji žive u kontinentalnom dijelu RH ( $\chi^2$ ,  $P=0,241$ ). Relativni rizik bolesnika s transplantiranim bubregom koji žive u kontinentalnom dijelu RH za razvoj NMSC je 1,397, s intervalom pouzdanosti 0,797–2,448. Bolesnici s transplantiranim bubregom primorskog dijela RH imaju podjednaku šansu razvoja zloćudnog nemelanomskog tumora kože kao i bolesnici kontinentalnog dijela RH, a vrijeme od transplantacije do pojave prvog zloćudnog nemelanomskog tumora kože kod ovih bolesnika ne ukazuje na značajnu razliku ( $P=0,564$ ) (Slika 14, Slika 15).



**Slika 14. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože bolesnika s transplantiranim bubregom ovisno o prebivalištu.**

Prikazan je broj BTB s prebivalištem u kontinentalnoj Hrvatskoj sa ili bez NMSC te broj BTB koji žive u primorskoj Hrvatskoj sa ili bez NMSC. Statistička značajnost izračunata  $\chi^2$  testom  $P = 0,241$ ;  $OR = 1,397$  (0,797-2,448). Razlika u broju oboljelih i neoboljelih bolesnika s transplantiranim bubregom ne ovisi o mjestu prebivališta.

kontinentalna RH: bolesnici koji žive u kontinentalnom dijelu RH; primorska RH: bolesnici koji žive u primorskom dijelu RH; bez NMSC: bolesnici koji nisu oboljeli od zloćudnog nemelanomskog tumora kože; NMSC: bolesnici oboljeli od zloćudnog nemelanomskog tumora kože.



**Slika 15. Vrijeme do razvoja tumora ovisno o prebivalištu bolesnika.**

Prikazano je vrijeme od transplantacije do razvoja NMSC u BTB koji žive u kontinentalnom dijelu RH i u BTB koji žive u primorskom dijelu RH. Nema statistički značajne razlike u vremenu od transplantacije do razvoja prvog NMSC u ove dvije skupine bolesnika.  $X^2$  (logrank) 0,3 P=0,564.

boravište 0: bolesnici koji žive u kontinentalnom području RH, boravište 1: bolesnici koji žive u primorskom području RH.

## **5.3. IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA I ZLOĆUDNI NEMELANOMSKI TUMORI KOŽE**

### **5.3.1. Imunosupresivna terapija**

Tijekom proučavanja bolesnika s transplantiranim bubregom zanimala nas je raspodjela imunosupresivne terapije koju koriste naši bolesnici.

Trojnu imunosupresivnu terapiju dobivalo je 1130 BTB, dok su 102 BTB bila na dvojnjoj imunosupresivnoj terapiji. Bolesnici s transplantiranim bubregom tradicionalno su imunosuprimirani jednim od dva kalcineurinska inhibitora, ciklosporinomA ili takrolimusom. Osim kalcineurinskog inhibitora, bolesnici s transplantiranim bubregom imaju još jedan ili dva imunosupresivna lijeka. Najčešće su to antiproliferativni lijekovi, azatioprin ili mikofenolat mofetil. Navedeni lijekovi primaju se sami ili u kombinaciji s kortikosteroidom prednisonom. Umjesto kalcineurinskog inhibitora ili antiproliferativnog lijeka, bolesnici mogu primati i kombinaciju s mTOR inhibitorom.

Imunosupresivnu terapiju takrolimusom primalo je 802 bolesnika, terapiju ciklosporinomA 399 bolesnika, mikofenolat mofetilom 1047 bolesnika, a azatioprinom 95 bolesnika. mTOR inhibitore primala su 144 bolesnika.

Za proučavanje jačine imunosupresivne terapije na pojavnost tumora izdvojili smo broj bolesnika koji su liječeni trojnom i dvojnjom terapijom uključujući pojedini kalcineurinski inhibitor (Tablica 3). Na trojnoj terapiji takrolimusom je 89,9% bolesnika, a na dvojnjoj terapiji takrolimusom je 10,1% bolesnika. Udio BTB primarno imunosuprimiranih ciklosporinomA koji imaju trojnu imunosupresivnu terapiju iznosi 97,7%, a samo 2,3% bolesnika imunosuprimirano je dvojnjom terapijom uključujući ciklosporinA.

Opći pregled imunosupresivne terapije prikazan je u tablicama i na slici (Tablica 3 i Tablica 4, Slika 16).

<b>kalcineurinski inhibitor</b>	<b>trojna terapija</b>	<b>dvojna terapija</b>	<b>ukupno</b>
<b>takrolimus</b>	721 (89,9%)	81 (10,1%)	802
<b>ciklosporinA</b>	390 (97,7%)	9 (2,3%)	399
<b>ukupno</b>	<b>1114</b>	<b>87</b>	<b>1201</b>

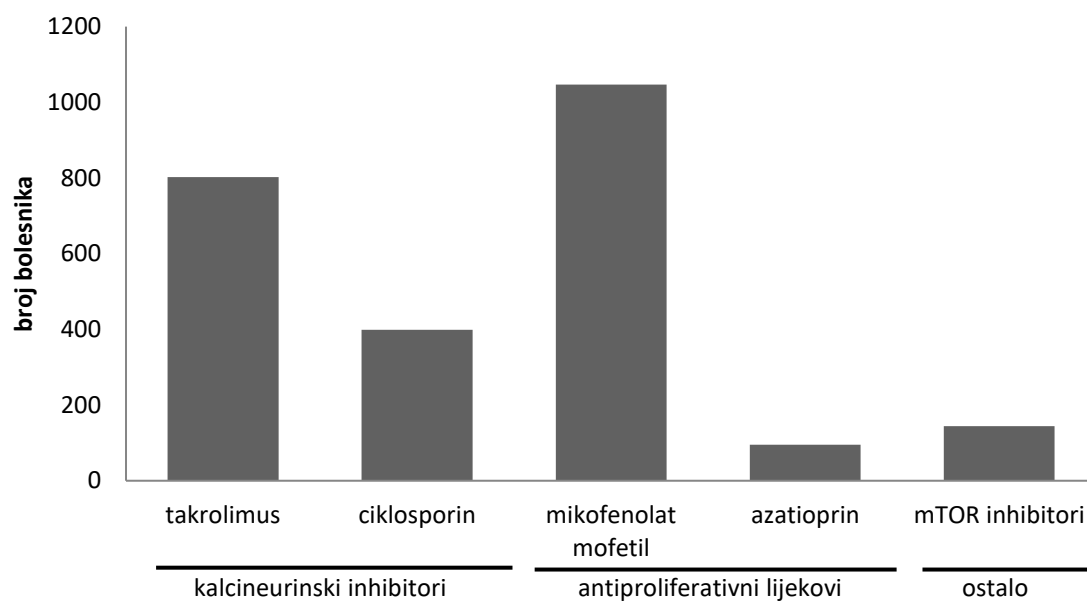
**Tablica 3. Raspodjela imunosupresivne terapije kalcineurinskim inhibitorima u bolesnika s transplantiranim bubregom.**

Prikazan je broj bolesnika koji dobivaju svaki pojedini kalcineurinski inhibitor. Od ukupnoga broja bolesnika na terapiji ciklosporinomA prikazan je udio onih koji dobivaju dvojnju i onih koji dobivaju trojnu terapiju te udio bolesnika na dvojnjoj i trojnoj terapiji takrolimusom (od ukupnog broja bolesnika na terapiji takrolimusom).

<b>imunosupresivni lijek</b>	<b>trojna ili dvojna terapija</b>
<b>azatioprin</b>	95 (8,3%)
<b>mikofenolat mofetil</b>	1047 (91,7%)
<b>mTOR inhibitori</b>	144 (11,7%)

**Tablica 4. Raspodjela imunosupresivne terapije ostalih imunosupresivnih lijekova u bolesnika s transplantiranim bubregom.**

Prikazan je broj i udio bolesnika koji primaju pojedini antiproliferativni lijek te broj i udio bolesnika koji primaju mTOR inhibitore.



### Slika 16. Raspodjela imunosupresivne terapije.

Bolesnici s transplantiranim bubregom uobičajeno u imunosupresiji dobivaju jedan kalcineurinski inhibitor i jedan antiproliferativni lijek, same ili u kombinaciji s kortikosteroidom prednisonom. Umjesto kalcineurinskog inhibitora ili antiproliferativnog lijeka, bolesnici mogu dobivati i kombinaciju s mTOR inhibitorom.

Prikazani su imunosupresivni lijekovi i broj bolesnika koji dobivaju pojedini lijek.

### 5.3.2. Odnos imunosupresivne terapije i pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora kože

Jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je proučiti ovisnost pojavnosti tumora o intenzitetu i tipu imunosupresije.

Od 1130 bolesnika na trojnoj imunosupresivnoj terapiji zloćudni nemelanomski tumor kože razvilo je 6,64%, dok je 8,82% bolesnika na dvojnoj terapiji razvilo tumor kože (Tablica 5).

Razlika u pojavnosti tumora kože u bolesnika na trojnoj i bolesnika na dvojnoj imunosupresivnoj terapiji nije bila statistički značajna ( $\chi^2$ ,  $P=0,556$ ) što upućuje na zaključak kako jači intenzitet terapije kod naših bolesnika nije uzrokovao veću pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože.

Relativni rizik (OR) razvoja zloćudnih nemelanomskih tumora kože bolesnika na trojnoj i dvojnoj imunosupresivnoj terapiji je 0,806, s intervalom pouzdanosti 0,392–1,656.

	trojna terapija	dvojna terapija
<b>NMSC</b>	75 (6,64%)	9 (8,82%)
<b>bez NMSC</b>	1055 (93,36%)	93 (91,18%)
<b>ukupno</b>	1130	102

**Tablica 5. Pojavnost NMSC kod bolesnika na trojnoj i dvojnoj imunosupresivnoj terapiji.**

Prikazan je ukupan broj i udio zloćudnih nemelanomskih tumora u BTB na trojnoj i dvojnoj imunosupresivnoj terapiji, neovisno o kombinaciji lijekova koje bolesnici dobivaju.

Trojna terapija: istovremeno uzimanje tri različita imunosupresivna lijeka; dvojna terapija: istovremeno uzimanje dva različita imunosupresivna lijeka; NMSC: zloćudni nemelanomski tumor kože. OR = 0,806 (0,392-1,656); razina značajnosti:  $\chi^2$  P = 0,556.

Zatim smo usporedili svaki pojedini kalcineurinski inhibitor (takrolimus i ciklosporinA), kako bismo ispitali ima li razlike u pojavnosti tumora ukoliko bolesnici dobivaju dvojni ili trojnu terapiju uključujući ciklosporinA te ima li razlike u pojavnosti tumora između bolesnika na dvojnoj i bolesnika na trojnoj terapiji uključujući takrolimus.

Na trojnoj imunosupresivnoj terapiji uključujući takrolimus 3,1% bolesnika razvilo je zloćudne nemelanomske tumore kože. Tri bolesnika na dvojnoj imunosupresivnoj terapiji takrolimusom razvila su zloćudan nemelanomski tumor kože (3,7 %). Primjetili smo da bolesnici na dvojnoj i trojnoj imunosupresiji takrolimusom podjednako razvijaju tumore kože  $\chi^2$ , P=0,748. (Tablica 6).

	<b>trojna terapija takrolimusom</b>	<b>dvojna terapija takrolimusom</b>
<b>NMSC</b>	22 (3,1%)	3 (3,7 %)
<b>bez NMSC</b>	699 (96,9%)	78 (96,3 %)
<b>ukupno</b>	721	81

**Tablica 6. Broj i udio zloćudnih nemelanomskih tumora kože bolesnika s transplantiranim bubregom koji primaju terapiju takrolimus.**

Prikazana je pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože u bolesnika koji uz takrolimus imaju još dva imunosupresivna lijeka (trojna terapija) te bolesnika koji uz takrolimus imaju još jedan imunosupresivni lijek (dvojna terapija). Bolesnici na terapiji takrolimusom podjednako razvijaju zloćudne nemelanomske tumore kože, neovisno o jačini imunosupresije. Statistička značajnost izračunata  $\chi^2$  testom: P=0,748

NMSC: zloćudni nemelanomski tumori kože.



Od bolesnika na trojnoj imunosupresivnoj terapiji ciklosporinomA njih 13,59% je razvilo zloćudni nemelanomski tumor kože, dok je iste tumore razvilo 44,44% bolesnika na dvojnoj imunosupresiji ciklosporinomA.

Bolesnici na dvojnoj i trojnoj imunosupresivnoj terapiji ciklosporinomA podjednako razvijaju zloćudne nemelanomske tumore kože ( $\chi^2$ , P=0,080). (Tablica 7).

	trojna terapija ciklosporinom A	dvojna terapija ciklosporinom A
<b>NMSC</b>	53 (13,59 %)	4 (44,44 %)
<b>bez NMSC</b>	337 (86,41 %)	5(55,56 %)
<b>ukupno</b>	390	9

**Tablica 7. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože u bolesnika koji kao jedan od imunosupresiva primaju kalcineurinski inhibitor ciklosporin A.**

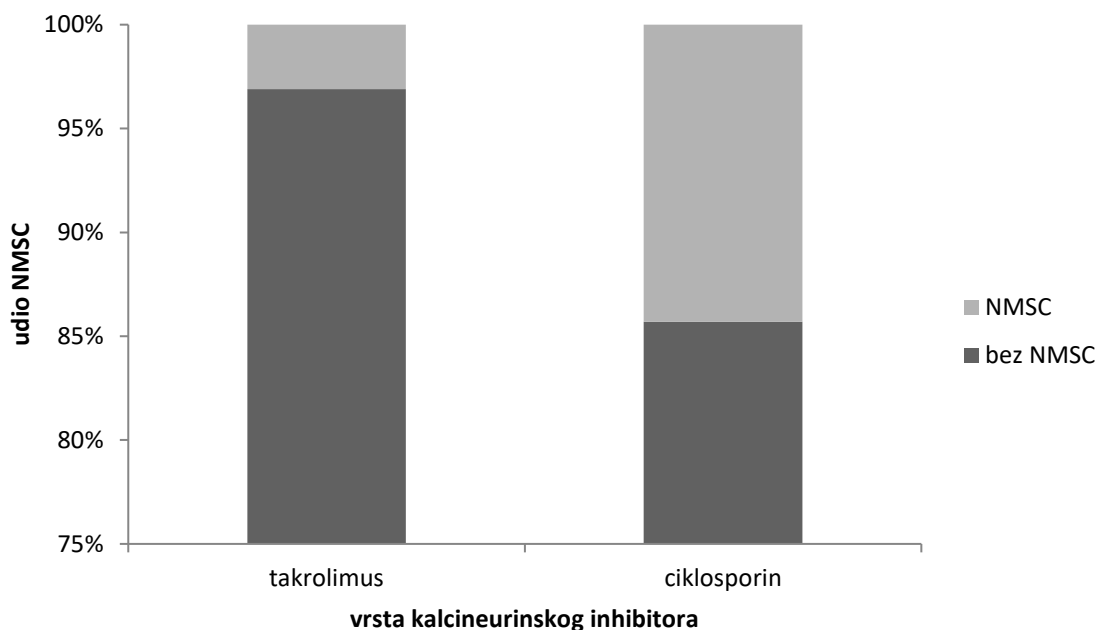
Prikazana je pojava tumora kod bolesnika s transplantiranim bubregom koji u kombinaciji imunosupresivne terapije imaju ciklosporin A. Izračunat je omjer pojavnosti tumora u odnosu na jačinu imunosupresije (trojna terapija i jača imunosupresija ili dvojna terapija koja ukazuje na slabiju imunosupresiju). Bolesnici s transplantiranim bubregom podjednako razvijaju zloćudne nemelanomske tumore kože, neovisno o jačini imunosupresije ciklosporinomA. Razina značajnosti:  $\chi^2$  P=0,080.

NMSC: zloćudni nemelanomski tumori kože.

Nadalje, željeli smo ispitati oboljevaju li bolesnici imunosuprimirani takrolimusom češće od zloćudnih nemelanomskih tumora kože u usporedbi s bolesnicima koji su liječeni ciklosporinom, neovisno o tome radi li se o dvojnjoj ili trojnoj terapiji.

Imunosupresivnu terapiju takrolimusom ima 802 bolesnika, od čega je 25 razvilo zloćudni nemelanomski tumor kože, a terapiju ciklosporinomA ima 399 bolesnika, od čega je 57 bolesnika razvilo tumor (Slika 17).

Statistička analiza ukazuje na značajnu razliku u pojavnosti tumora BTB liječenih ciklosporinomA i takrolimusom ( $\chi^2$ ,  $P < 0,001$ ). Relativni rizik bolesnika na terapiji takrolimusom i ciklosporinomA za razvoj tumora kože je 0,19 s intervalom pouzdanosti 0,12–0,31, odnosno, bolesnici imunosuprimirani ciklosporinomA imaju 80% veći rizik razvoja zloćudnih nemelanomskih tumora kože nego bolesnici imunosuprimirani takrolimusom.

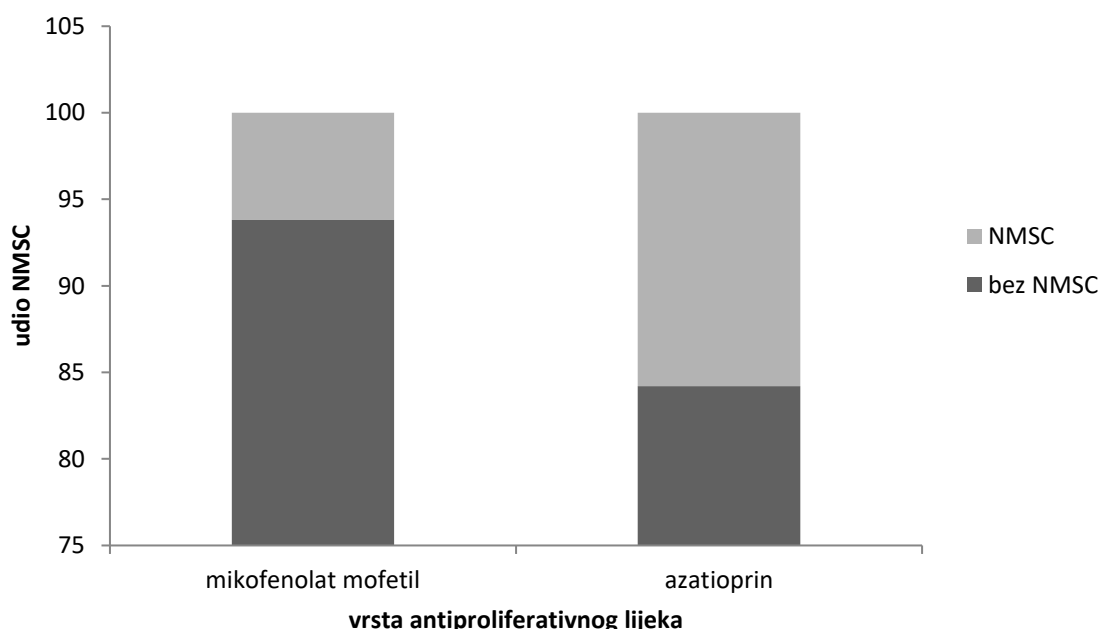


**Slika 17. Udio bolesnika koji su oboljeli od zloćudnih nemelanomskih tumora kože tijekom imunosupresije pojedinim kalcineurinskim inhibitorom.**

Tijekom terapije takrolimusom 3,1% bolesnika oboljelo je od zloćudnih nemelanomskih tumora kože, dok su isti tumor dobila 14,3% bolesnika imunosuprimirana ciklosporinomA. Razina značajnosti razlike u oboljevanju izračunata  $\chi^2$  testom,  $P < 0,001$ , dok je relativni rizik za nastanak zloćudnih nemelanomskih tumora kože  $OR = 0,19$  (0,12-0,31). Bolesnici suprimirani ciklosporinomA imaju 80% veći rizik oboljeti od zloćudnih nemelanomskih tumora kože od bolesnika imunosuprimiranih takrolimusom. NMSC: zloćudni nemelanomski tumori kože

Također smo ispitali navode iz literature koji govore kako bolesnici imunosuprimirani azatioprinom češće razvijaju zloćudne nemelanomske tumore kože od bolesnika na terapiji mikofenolat mofetilom.

Mikofenolat mofetil kao imunosupresivna terapija uveden je u 1047 bolesnika, od čega je 62 razvilo NMSC, a terapija azatioprinom u 95 bolesnika, od čega je 15 razvilo NMSC. Analiza ukazuje na značajnu razliku u pojavnosti tumora ove dvije skupine (Slika 18). Bolesnici imunosuprimirani mikofenolat mofetilom imaju značajnije manju pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože ( $\chi^2$ ,  $P=0,001$ ). Relativni rizik bolesnika liječenih mikofenolat mofetilom za razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože je 0,34, s intervalom pouzdanosti 0,18–0,62. Bolesnici imunosuprimirani azatioprinom imaju 60% veću šansu za razvoj NMSC nego bolesnici imunosuprimirani mikofenolat mofetilom.



**Slika 18. Udio bolesnika koji su oboljeli od zloćudnih nemelanomskih tumora kože tijekom imunosupresije pojedinim antiproliferativnim lijekom.**

Prikazan je udio NMSC u bolesnika koji su na terapiji mikofenolat mofetilom i udio NMSC u bolesnika koji su imunosuprimirani azatioprinom. U ispitivanom uzorku 5,9% bolesnika liječenih mikofenolat mofetilom i 15,8% bolesnika liječenih azatioprinom oboljelo je od NSMC. Pronađena je statistički značajna razlika u pojavnosti NMSC kože u ove dvije skupine bolesnika,  $X^2$   $P=0,001$ , OR = 0,34 (0,18–0,62).

NMSC: bolesnici oboljeli od zloćudnog nemelanomskog tumora kože; bez NMSC: bolesnici koji nisu oboljeli od zloćudnog nemelanomskog tumora kože.

Za Cox-ovu regresijsku analizu koristili smo do sada istražene čimbenike rizika.

	Exp (coef)	p
muški spol	2,1033	0,0028*
prebivalište u primorskom dijelu RH	0,7346	0,2708
dob kod transplantacije	1,0889	1.9e-14*
terapija takrolimusom	0,7552	0,4188
terapija mikofenolat mofetilom	0,7061	0,1983

**Tablica 8. Cox regresijska analiza prediktora nastanka tumora.**

Regresijskom analizom utjecaja identificiranih varijabli na vrijeme pojavnosti tumora pokazali smo kako su muški spol i dob kod transplantacije statistički značajan čimbenik u nastanku zloćudnih nemelanomskih tumora kože. Statistički značajni rezultati, muški spol i dob kod transplantacije označeni su zvjezdicom.

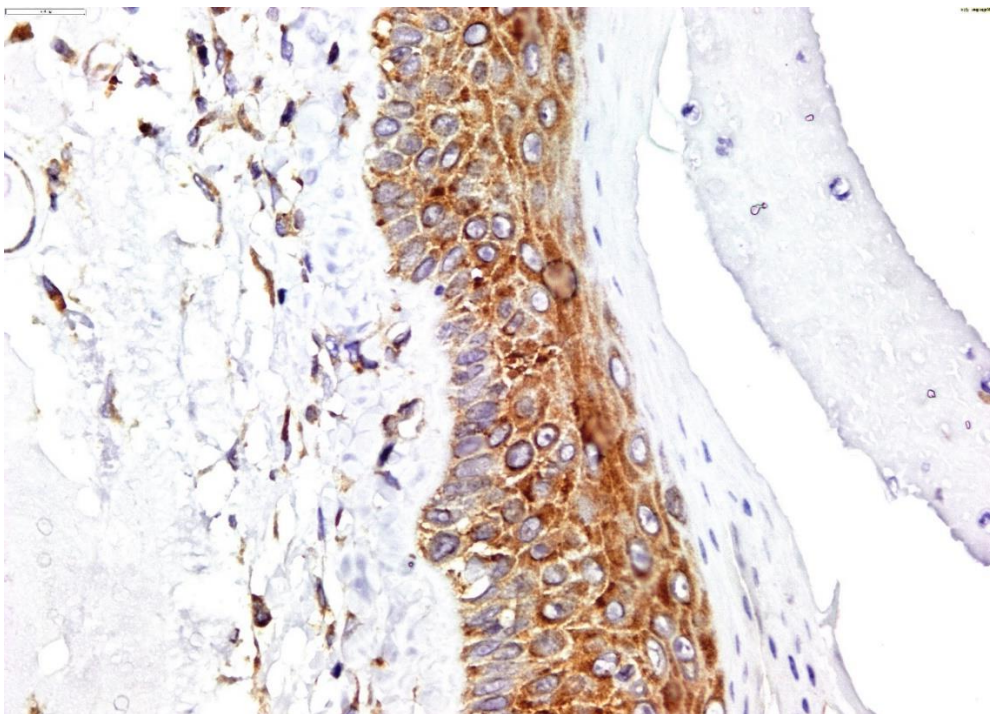
Smatra se da nova grupa imunosupresiva, mTOR inhibitori, značajno smanjuje pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože i produljuje vrijeme do pojave prvog tumora. Na terapiji mTOR inhibitorima bilo je 144 bolesnika, od čega je 6 (4,2%) razvilo zloćudne nemelanomske tumore kože. mTOR inhibitor everolimus kao inicijalni terapijski izbor nakon transplantacije imalo je 38 bolesnika, a sirolimus 13 bolesnika. Ostali su bolesnici prebačeni na terapiju mTOR inhibitorom nakon različito dugog vremena imunosupresije drugim lijekovima, i to 67 bolesnika na everolimus i 26 bolesnika na sirolimus. U studiji nismo posebno istraživali koji su razlozi prelaska bolesnika na terapiju mTOR inhibitorom, no promjena početne imunosupresije prema mTOR inhibitorima najčešće je zbog razvoja maligne bolesti. BTB koji su bili na terapiji mTOR inhibitorima iste su dobivali u raznim terapijskim kombinacijama, tako da zbog malog broja bolesnika koji dobivaju pojedinu terapijsku kombinaciju, a i zbog relativno kratkog razdoblja tijekom kojeg su dobivali mTOR inhibitore, a oboljeli su od NMSC, nismo učinili analizu usporedbe mTOR inhibitora, ostalih imunosupresiva i rizik razvoja NMSC.

## 5.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA IZRAŽENOSTI Wnt4

Jedan od ciljeva našeg istraživanja bilo je proučiti i ispitati izraženost biljega Wnt4, budući se u novije vrijeme aktivacija Wnt4 povezuje s ranom karcinogenezom brojnih tumora.

### 5.4.1. Izraženost Wnt4 u zdravoj koži

Početno smo opisali izraženost Wnt4 u zdravoj peritumorskoj koži. Pregledali smo ukupno 150 imunohistokemijski obojanih preparata. Imunohistokemijskim bojanjem uočili smo pozitivitet staničnih citoplazmi normalnih keratinocita u svim slojevima epidermisa, pozitivitet staničnih citoplazmi keratinocita folikula dlake te pozitivitet polimorfonukleara i mononukleara. Zdrava koža netransplantiranih bolesnika i BTB pokazuje jaku izraženost Wnt4 pozitiviteta u gotovo svim preparatima (98,7%)(Slika 19).

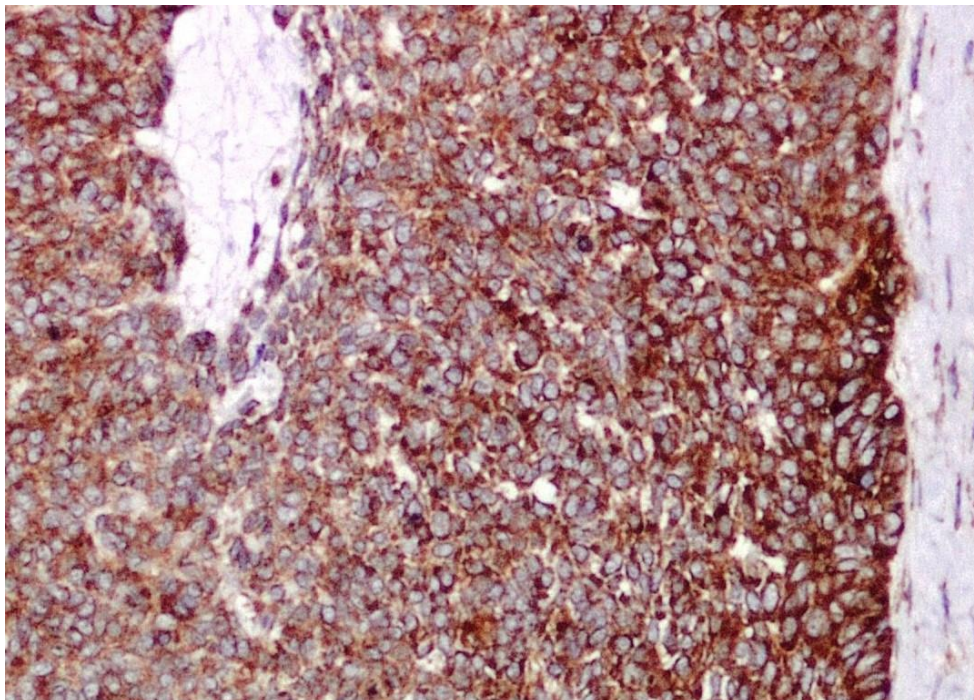


**Slika 19. Unutarstanični raspored Wnt4 u keratinocitima zdravog epidermisa.**

U zdravoj koži Wnt4 pozitivitet vidi se u citoplazmama keratinocita svih slojeva epidermisa kao smeđe obojana zrnca.

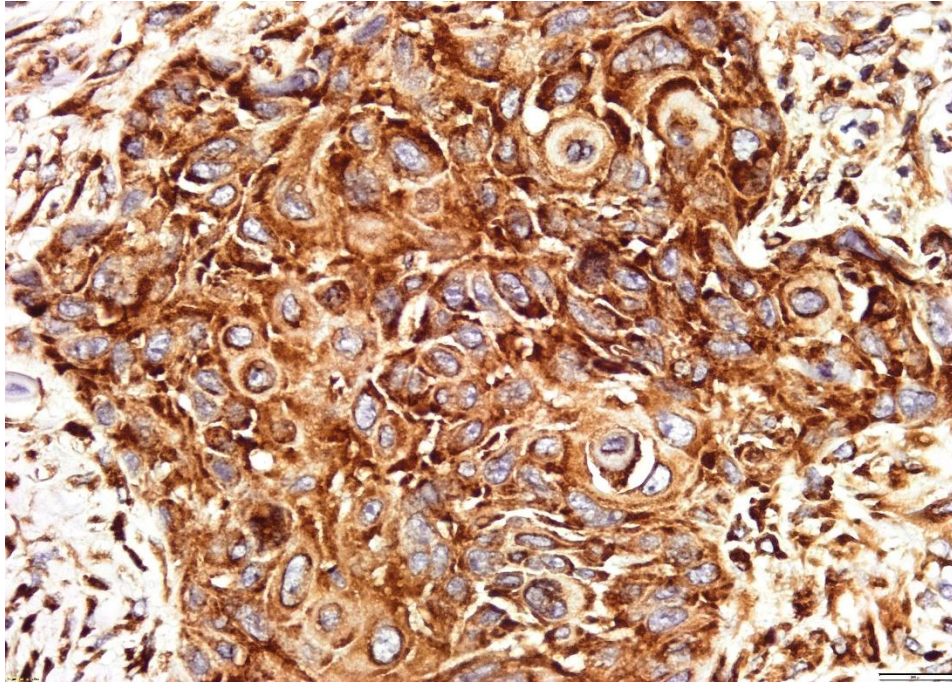
#### 5.4.2. Izraženost Wnt4 u zloćudnim nemelanomskim tumorima kože

U tumorskim stanicama imunohistokemijskim bojanjem s Wnt4 protutijelom također smo uočili citoplazmatski pozitivitet (Slika 20-Slika 21).



**Slika 20. Raspored Wnt4 pozitiviteta u stanicama bazocelularnog karcinoma kože.**

Imunohistokemijskim bojanjem uočava se Wnt4 pozitivitet unutar citoplazme tumorskih stanica. Povećanje 40x



**Slika 21. Raspored Wnt4 pozitiviteta u stanicama planocelularnog karcinoma kože.**

U planocelularnom karcinomu kože uočen je citoplazmatski pozitivitet Wnt4 bojanja. Povećanje 40x.

Nakon opisa izraženosti Wnt4 u zdravoj koži i zloćudnim nemelanomskim tumorima ispitali smo pojavnost pozitiviteta Wnt4 u pojedinim skupinama bolesnika.

#### **5.4.2.1. Rezultati analize imunohistokemijske izraženosti Wnt u bazocelularnom karcinomu kože**

U uzorcima bazocelularnog karcinoma kože u BTB, imunohistokemijskom analizom izraženosti Wnt4 negativna reakcija zabilježena je u 2 (7,1%) uzorka, a pozitivna reakcija zabilježena je u 26 uzoraka (92,9%). Među uzorcima s pozitivnom reakcijom, slabo pozitivna reakcija bila je izražena u 3 uzorka (10,7%), umjereno pozitivna reakcija u 6 (21,5%), a izrazito pozitivna reakcija u 17 (60,7%) uzoraka. Analizom uzoraka BCC kontrolne skupine bolesnika negativna reakcija zabilježena je u jednom uzorku (1,3%), dok je u ostalih 76 uzoraka zabilježena pozitivna reakcija i to slabo pozitivna u 27 (35,1%) uzoraka, umjereno pozitivna u 23 (29,8%) i izrazito

pozitivna u 26 (33,8%) uzoraka. Istovremeno, u zdravoj koži zabilježeno je 74 (98,6%) izrazito pozitivnih Wnt4 uzoraka i jedan (1,4%) slabo pozitivan Wnt4 uzorak. Nije bilo negativnih uzoraka zdrave kože (Tablica 9).

Skupina	Izraženost Wnt4									
	Negativna		Slabo		Umjereno		Izrazito		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
BCC - BTB	2	7,1	3	10,7	6	21,5	17	60,7	28	100
BCC – kontrolna	1	1,3	27	35,1	23	29,8	26	33,8	77	100
Zdrava koža	0	0	1	1,4	0	0	74	98,6	75	100
<b>Ukupno</b>	<b>3</b>		<b>31</b>		<b>29</b>		<b>117</b>		<b>180</b>	

**Tablica 9. Imunohistokemijska analiza izraženosti Wnt4 u bazocelularnom karcinomu.**

Prikazan je broj Wnt4 pozitivnih uzoraka bazocelularnog karcinoma u BTB, bolesnika kontrolne skupine i u uzorcima zdrave kože.

BCC–BTB: bazocelularni karcinom u bolesnika s transplantiranim bubregom, BCC–kontrolna: bazocelularni karcinom u imunokompetentnih bolesnika koji nemaju transplantiran bubreg, zdrava koža: zdrava peritumorska koža.



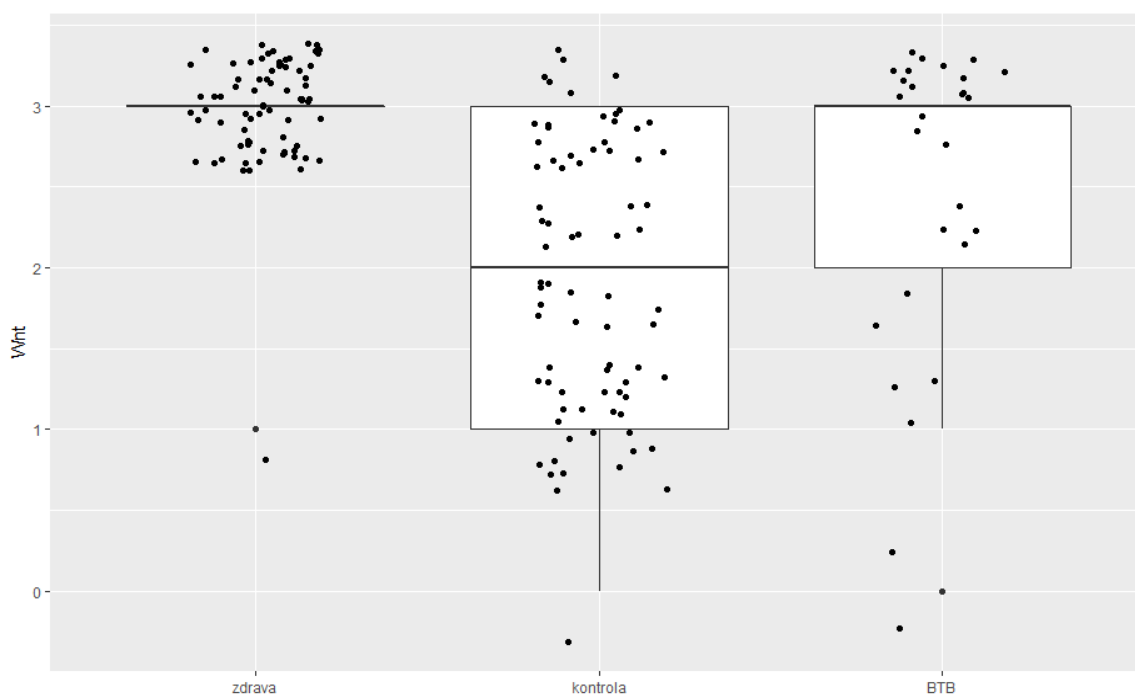
Obilježje	Izraženost Wnt4		
	BTB	Kontrolna skupina	Zdrava koža
Medijan	3*	2*	3*
Interkvartilni raspon	1	2	0

\*  $p < 0,001$  u usporedbi sa ostale dvije skupine bolesnika

**Tablica 10. Usporedba izraženosti Wnt4 u bazocelularnom karcinomu kože i zdravoj koži.**

Prikazana je usporedba izraženosti Wnt4 u bazocelularnom karcinomu BTB, u bazocelularnom karcinomu bolesnika kontrolne skupine koji nisu transplantirani i u uzorcima zdrave kože (Kruskal – Wallis test  $p < 0,0001$ ).

BTB: bolesnici s transplantiranim bubregom



**Slika 22. Izraženost Wnt4 u bazocelularnom karcinomu.**

Prikazana je izraženost Wnt4 u zdravoj koži, u uzorcima BCC kontrolne skupine te u BCC bolesnika s transplantiranim bubregom.

U bazocelularnom karcinomu kože najmanji stupanj imunohistokemijske izraženosti Wnt4 bio je negativan (-), a najviši stupanj izraženosti je izrazito pozitivna reakcija (+++), dok kod uzoraka zdrave kože imamo samo pozitivne rezultate, najmanji stupanj izraženosti je slabo pozitivna reakcija (+), a najveći izrazito pozitivna (+++) (Tablica 9, Slika 22). Medijan stupnja izraženosti Wnt4 u BTB je 3 (interkvartilni raspon 1), u BCC kontrolne skupine medijan izraženosti je 2 (interkvartilni raspon 2), a u zdravoj koži 3 (interkvartilni raspon 0). Kruskal – Wallisovim testom uvidjeli smo kako postoji statistički značajna razlika između ovih skupina bolesnika ( $p < 0,0001$ ) (Tablica 10). Koristeći Wilcoxonov test za uparene uzorke identificirali smo parove Wnt4 imunoreaktivnih stanica (BTB–kontrolna skupina, BTB-zdrava koža, kontrolna skupina–zdrava koža) u kojima smo uvidjeli postojanje statistički značajnih razlika u Wnt4 pozitivitetu ( $p < 0,0001$  u sva tri para). Dakle, statističkom analizom utvrdili smo kako je imunohistokemijska izraženost Wnt4 značajno viša u zdravoj koži nego u tumorima kože, no utvrđena je i značajno veća izraženost Wnt4 u BTB u odnosu na bolesnike kontrolne skupine.

#### **5.4.2.2. Rezultati analize imunohistokemijske izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu kože**

U uzorcima planocelularnog karcinoma kože, imunohistokemijskom analizom izraženosti Wnt4 u BTB negativna reakcija zabilježena je u 1 (3,6%) uzorku, dok je pozitivna reakcija zabilježena je u 27 uzoraka (96,4%). Među uzorcima s pozitivnom reakcijom, slabo pozitivna reakcija bila je izražena u 2 uzorka (7,1%), umjereno pozitivna reakcija u 14 (50,0%) i izrazito pozitivna reakcija u 11 (39,3%) uzoraka. Analizom uzoraka SCC kontrolne skupine bolesnika negativna reakcija zabilježena je u 3 uzorka (3,9%), dok je u ostalih 73 uzoraka zabilježena pozitivna reakcija i to: slabo pozitivna u 23 (30,3%) uzoraka, umjereno pozitivna u 26 (34,2%) i izrazito pozitivna u 24 (31,6%) uzorka. U uzorcima zdrave kože zabilježeno je 74 (98,6%) izrazito pozitivnih Wnt4 uzoraka i jedan (1,4%) negativan Wnt4 uzorak (Tablica 11).

Skupina	Izraženost Wnt4									
	Negativna		Slabo		Umjereno		Jako		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
SCC - BTB	1	3,6	2	7,1	14	50,0	11	39,3	28	<b>100</b>
SCC – kontrolna	3	3,9	23	30,3	26	34,2	24	31,6	76	<b>100</b>
Zdrava koža	1	1,4	0	0	0	0	74	98,6	75	<b>100</b>
<b>Ukupno</b>	<b>5</b>		<b>25</b>		<b>40</b>		<b>109</b>		<b>179</b>	

**Tablica 11. Imunohistokemijska analiza izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu.**

Prikazana je izraženost Wnt4 u SCC bolesnika s transplantiranim bubregom, u SCC uzoraka kontrolne skupine i u zdravoj koži. Kruskal – Wallis test  $p < 0,0001$ .

SCC–BTB: planocelularni karcinom u bolesnika s transplantiranim bubregom, SCC–kontrolna: planocelularni karcinom u bolesnika koji nemaju transplantiran bubreg, zdrava koža: zdrava peritumorska koža.

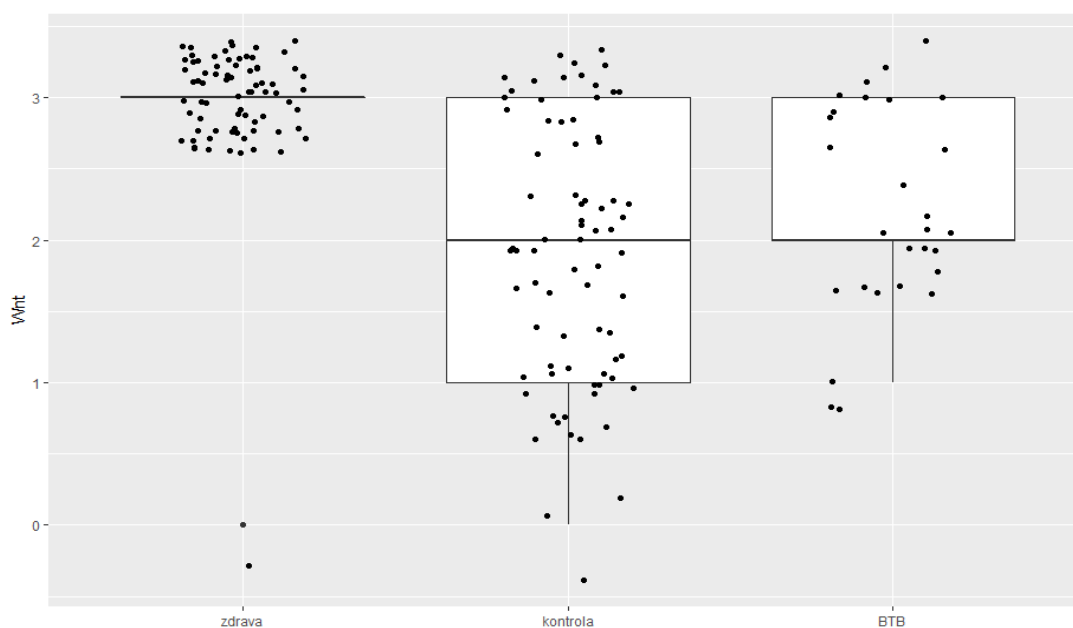
Obilježje	Izraženost Wnt4		
	BTB	Kontrolna skupina	Zdrava koža
<b>Medijan</b>	2 <sup>o</sup>	2*	3
<b>Interkvartilni raspon</b>	1	2	0

\* p<0,001 u usporedbi sa zdravom kožom; ° p=0,052 u usporedbi s kontrolnom skupinom

**Tablica 12. Analiza izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu i zdravoj koži.**

Prikazani su medijan, interkvartilni raspon i p vrijednosti usporebe izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu BTB, u PCC bolesnika kontrolne skupine te izraženosti Wnt4 u zdravoj koži. Izraženost u zdravoj koži viša je od izraženosti u planocelularnom karcinomu obje ispitivane skupine. Nema statistički značajne razlike u izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu BTB i imunokompetentnih bolesnika kontrolne skupine.

BTB: bolesnici s transplantiranim bubregom, kontrolna skupina: planocelularni karcinom u bolesnika koji nemaju transplantiran bubreg, zdrava koža: peritumorska koža



**Slika 23. Izraženost Wnt4 u planocelularnom karcinomu.**

Prikazana je izraženost Wnt4 pozitiviteta u zdravoj koži, u uzorcima SCC kože imunokompetentnih bolesnika kontrolne skupine i u SCC bolesnika s transplantiranim bubregom. Kruskal Wallisov test ukazuje na značajnu razliku u Wnt4 pozitivitetu između ovih skupina bolesnika (p<0,0001).

BTB: bolesnici s transplantiranim bubregom, kontrola: planocelularni karcinom u bolesnika koji nemaju transplantiran bubreg, zdrava: zdrava peritumorska koža

U planocelularnom karcinomu kože najmanji stupanj imunohistokemijske izraženosti Wnt4 bio je negativan (-), a najviši stupanj izraženosti je izrazito pozitivna reakcija (+++), kako je zabilježeno i u uzorcima zdrave kože gdje smo zabilježili jedan negativan rezultat (-), dok su svi ostali rezultati bili izrazito pozitivni (+++) (Tablica 11, Slika 23). Medijan stupnja izraženosti Wnt4 u SCC BTB je 2 (interkvartilni raspon 1), u SCC kontrolne skupine medijan izraženosti je 2 (interkvartilni raspon 2), a u zdravoj koži 3 (interkvartilni raspon 0). Kruskal – Wallisovim testom uvidjeli smo kako postoji statistički značajna razlika između ovih skupina bolesnika ( $p < 0,0001$ ). Wilcoxonovim testom za uparene uzorke identificirali smo parove Wnt4 imunoreaktivnih stanica (BTB – kontrolna skupina, BTB - zdrava koža, kontrolna skupina – zdrava koža) u kojima smo uvidjeli postojanje statistički značajnih razlika u Wnt4 pozitivitetu ( $p < 0,001$ ). Utvrdili smo kako je imunohistokemijska izraženost Wnt4 značajno viša u zdravoj koži nego u planocelularnom karcinomu kože obje skupine bolesnika. Između BTB i bolesnika kontrolne skupine nije utvrđena statistički značajna razlika izraženosti Wnt4 ( $p = 0,052$ ) (Tablica 12).

## 6. RASPRAVA

### 6.1. OPĆI PODATCI ISPITANIKA

Iz baze podataka ekstrahirali smo podatke o 1232 bolesnika s transplantiranim bubregom koji se liječe u KBC-u Zagreb. U istraživanje su uključeni svi bolesnici kojima je do kraja 2014. godine transplantiran bubreg u KBC-u Zagreb i redovito se kontroliraju u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju. Uključili smo i bolesnike kojima bubreg nije transplantiran u KBC-u Zagreb, ali se redovito kontroliraju u KBC-u Zagreb. U istraživanje nisu uključeni bolesnici kojima je transplantiran bubreg u KBC-u Zagreb, a kontroliraju se u drugim centrima (Osijek, Rijeka), niti bolesnici kojima je bubreg transplantiran u drugim transplantacijskim centrima u Republici Hrvatskoj gdje se i kontroliraju.

U istraživanje nisu uključeni bolesnici s transplantiranim bubregom mlađi od 18 godina koji se još uvijek kontroliraju u Klinici za pedijatriju KBC-a Zagreb. S navršenih 18 godina života bolesnici s transplantiranim bubregom počinju se kontrolirati u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju.

Ograničenje studije je nemogućnost istraživanja cjelovite hrvatske populacije zbog postojanja centara za liječenje i praćenje bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem u Rijeci i Osijeku koji također uspješno liječe kronično bubrežno zatajenje transplantacijom bubrega.

U imunohistokemijsko istraživanje pojavnosti Wnt4 uključeno je 153 u formalinu fiksiranih tkiva uklopljenih u parafinske blokove bolesnika koji nemaju transplantiran bubreg, a koji su oboljeli od zloćudnog nemelanomskog tumora kože. Analizirano je 77 bazocelularnih i 76 planocelularnih u parafin uklopljenih karcinoma bolesnika oba spola koji nemaju transplantiran bubreg niti su na neki drugi način imunosuprimirani te koji nisu bolovali od genodermatoza s povećanom osjetljivošću na ultraljubičasto zračenje (Xeroderma pigmentosum, Bloom-ov sindrom, Cheddiak – Higashi sindrom, Rothmund – Thomson sindrom i Cockayne – ov sindrom). Zabilježeni su i podatci o starosti tih bolesnika u vrijeme oboljevanja od tumora kako bismo dobili uvid u prosječnu starost tih bolesnika (kontrolna skupina bolesnika) prilikom oboljevanja i taj podatak kasnije koristili za usporedbu s transplantiranim bolesnicima.

Razlozi kroničnoga bubrežnoga zatajenja su brojni, a uključuju glomerulonefritis, policističnu bolest bubrega, mezangioproliferativni glomerulonefritis, Wegenerovu granulomatozu, pijelonefritis, IgA nefropatiju, arterijsku hipertenziju, analgetičku nefropatiju, nefropatiju kao posljedicu vezikouretralnog refluksa, nefroangiosklerozu, posljedice dijabetesa, kongenitalne anomalije. Brojni bolesnici nemaju dokazan uzrok bubrežnoga zatajenja što može biti problem nakon transplantacije zbog mogućnosti povrata osnovne bolesti u presađeni organ (100).

Od ukupnog broja ispitanika, 496 (40,26%) bolesnika su žene dok je 736 (59,74%) muškaraca s transplantiranim bubregom.

U kontinentalnom dijelu Republike Hrvatske (RH) živi 75,65% bolesnika s transplantiranim bubregom, a 24,35% ispitanika živi u primorskom dijelu RH. U istraživanju smo definirali kontinentalnu RH i primorsku RH na način: Zagrebačka, Krapinsko-zagorska, Sisačko-moslavačka, Karlovačka, Varaždinska, Koprivničko-križevačka, Bjelovarsko-bilogorska, Virovitičko-podravska, Požeško-slavonska, Brodsko-posavska, Osječko-baranjska, Vukovarsko-srijemska i Međimurska županija te Grad Zagreb dijelovi su kontinentalne RH, a Primorsko-goranska, Ličko-senjska, Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska, Istarska i Dubrovačko-neretvanska županija dio su primorske RH.

Distribucija bolesnika s transplantiranim bubregom odgovara demografskoj raspodjeli stanovništva. Prema podacima Statističkog ljetopisa iz 2012 godine, gustoća naseljenosti stanovnika kontinentalnog dijela RH je 179 stanovnika/km<sup>2</sup>, a gustoća naseljenosti primorskog dijela je 59 stanovnika/km<sup>2</sup> (169). Bolesnici s transplantiranim bubregom koji su liječeni i kontroliraju se u KBC-u Zagreb žive u sjevernom, središnjem, dijelom istočnom, gorskom i južnom dijelu RH. Obzirom na postojanje transplantacijskih centara u Rijeci i Osijeku, u KBC-u Zagreb ne kontroliraju se bolesnici zapadnog i istočnog dijela RH.

## 6.2. UČESTALOST ZLOĆUDNIH NEMELANOMSKIH TUMORA KOŽE U BOLESNIKA S TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM

Literaturni podatci govore o pojačanoj pojavnosti nemelanomskih tumora kože kod bolesnika s transplantiranim bubregom. Ovim istraživanjem željeli smo uvidjeti je li to slučaj i kod naših bolesnika i utječu li na naše bolesnike istovrsni rizični čimbenici.

Bazocelularni karcinom smatra se najčešćim tumorom kože u općoj populaciji (1). Planocelularni se karcinom zbog svoje invazivnosti i sklonosti udaljenom širenju smatra zloćudnijim tumorom, no pojavnost mu je manja od bazocelularnog karcinoma. Da bismo provjerili omjer pojavnosti kod naših bolesnika, zabilježili smo sve zloćudne nemelanomske tumore bolesnika s transplantiranim bubregom.

Do završetka istraživanja, 84 bolesnika razvilo je barem jedan zloćudan nemelanomski tumor kože, što je pojavnost od 6,81%. 65 bolesnika razvilo je po jedan zloćudni nemelanomski tumor kože, ostali bolesnici razvili su nekoliko tumora, svih 84 bolesnika ukupno je razvilo 125 zloćudnih nemelanomskih tumora kože. Zavos G. i suradnici u Grčkoj zabilježili su pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože od 2,2%, Sulowicz J. i suradnici u Poljskoj 5,1%, Ramsay HM. u Ujedinjenom Kraljevstvu Velike Britanije i Sjeverne Irske 15,4%. Fuente MJ. i suradnici u mediteranskom dijelu Španjolske zapazili su pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože od 25,3%, dok su pojavnost od 28,1% i 33,3% zabilježili Carrol RP. u Australiji i Rodrigues – Acosta ED. u Meksiku (68,111,114,170-171). U usporedbi s navedenim, pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože u RH usporediva je s pojavnosti zabilježenim u drugim europskim zemljama, no značajno manja u usporedbi sa zemljama čiji je broj sunčanih dana u godini puno veći (Meksiko, Australija, španjolski dio Mediterana).

Kako je prikazano na slici (Slika 7), bazocelularni karcinom kože razvilo je 60,7%, planocelularni karcinom razvilo je 30,9% bolesnika, dok je 8,3% bolesnika razvilo oba zloćudna nemelanomska tumora kože. Neke kliničke studije ukazuju na veću pojavnost planocelularnih u odnosu na bazocelularne karcinome kod bolesnika s transplantiranim bubregom (69, 106, 107, 108, 109), dok su neka istraživanja pokazala veću pojavnost bazocelularnih karcinoma u odnosu na planocelularne (110 -112). Ukupno gledajući, učestalost SCC u bolesnika s transplantiranim bubregom veća je u studijama koje uključuju mediteranski dio Europe, Brazil i Australiju, dok je u



Sjevernijim dijelovima Europe u BTB veća učestalost BCC u odnosu na SCC, što je slučaj i u našoj ispitivanoj populaciji. Do sada nije bilo podataka o pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora kože kod bolesnika s transplantiranim bubregom u RH te smo ovom studijom pokazali kako je u naših bolesnika bazocelularni karcinom i dalje češći zloćudni nemelanomski tumor kože nego planocelularni karcinom. Omjer pojavnosti bazocelularnog i planocelularnog karcinoma je 1,76:1; bolesnici s transplantiranim bubregom gotovo dvostruko češće oboljevaju od bazocelularnog karcinoma.

Neka su istraživanja ukazala na muški spol kao čimbenik rizika za razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože u bolesnika s transplantiranim bubregom (103, 106). Naše istraživanje, u kojem je 26,2% žena i 73,8% muškaraca razvilo zloćudne nemelanomske tumore kože, ukazuje na omjer pojavnosti između žena i muškaraca 1:2,6. U našoj populaciji, muškarci s transplantiranim bubregom skoro tri puta češće oboljevaju od zloćudnih nemelanomskih tumora kože od žena s transplantiranim bubregom, odnosno imaju 50% veću šansu oboljevanja od žena. Osim češćeg oboljevanja, vrijeme od transplantacije do razvoja prvog NMSC značajno je kraće u muškaraca nego u žena s transplantiranim bubregom. Razloge za povećanu i raniju pojavnost u muškaraca možemo objasniti samom patogenezom nastanka tumora, u kojoj veliku ulogu ima oštećenje kože UV zrakama te manjoj sklonosti muškaraca korištenju sredstava za zaštitu od sunca. Te spoznaje potvrđuju i istraživanja Görig T., Cardoso P. te Pinault L. i suradnika koji su svojim studijama o samozaštiti kože od sunca došli do rezultata u kojima muškarci značajno manje koriste sredstva za zaštitu od sunca, zaštitne kreme i odjeću (173-175). Stoga smatramo kako je potrebno daljnje napore ulagati u edukaciju, osobito transplantiranih bolesnika, o potrebi i dobrobiti zaštite od sunca kako bi se dugoročno smanjilo oboljevanje tih bolesnika od zloćudnih nemelanomskih tumora kože.

Prosječna starost naših bolesnika s transplantiranim bubregom kod razvoja NMSC bila je  $60,2 \pm 8,1$  godina, te se ne razlikuje bitno po spolu, kod žena je  $60,6 \pm 7,9$ , a kod muškaraca  $60 \pm 8,3$ . Time smo pokazali kako nema značajne razlike u starosti muškaraca i žena pri oboljevanju od zloćudnih nemelanomskih tumora kože, odnosno, muškarci i žene s transplantiranim bubregom u podjednako dobi oboljevaju od tumora kože.

Prosječna starost svih bolesnika prilikom transplantacije bubrega je  $46,6 \pm 14,3$  godine ( $46,0 \pm 14,2$  za žene i  $46,9 \pm 14,4$  za muškarce). Starost bolesnika s transplantiranim bubregom pri transplantaciji, koji su razvili nemelanomski tumor kože bila je  $53,6 \pm 10$  godina, a starost bolesnika koji nisu razvili tumor pri transplantaciji bila je  $46,0 \pm 14,5$  godina. Uočili smo da su bolesnici koji su razvili tumore nakon transplantacije, u vrijeme transplantacije u prosjeku 8 godina ( $7,6$  s CI  $4,4-10,7$ ) stariji od bolesnika koji nisu razvili tumore. Osobito, starost bolesnika koji su razvili tumore je  $53,6 \pm 10$  godina što potvrđuje dosadašnja istraživanja u kojima je starija dob kod transplantacije ( $>50$  godina života) jedan od rizičnih čimbenika za razvoj tumora kože (108,176).

Kako bismo uvidjeli oboljevaju li transplantirani bolesnici u ranijoj životnoj dobi od netransplantiranih, u svih bolesnika uključenih u istraživanje zabilježili smo starost prilikom oboljevanja od NMSC. Očekivanu starost bolesnika koji nemaju transplantiran bubreg (kontrolna skupina) kod pojave tumora dobili smo pregledom podataka bolesnika čije smo tumore (u cijelosti ekscidirane) koristili za imunohistokemijsku analizu.

Prosječna starost bolesnika s transplantiranim bubregom kod pojave bazocelularnog karcinoma je  $59,7 \pm 8,3$  godine, kod pojave planocelularnog karcinoma je  $59,9 \pm 8,1$  godina, dok kod bolesnika koji razviju oba tumora pojavnost prvog tumora nastaje nešto kasnije, u prosječnoj dobi od  $64,1 \pm 6,6$  godina. Starost bolesnika kontrolne skupine pri oboljevanju od zloćudnih nemelanomskih tumora kože je u dobi od  $72,3 \pm 11,4$  godine za bazocelularni i  $76,9 \pm 9,7$  godina za planocelularni karcinom. Koristeći Studentov t-test, dobili smo razinu značajnosti u razlici ove dvije skupine bolesnika  $P < 0,0001$ , i zaključili kako bolesnici s transplantiranim bubregom u značajnije mlađoj životnoj dobi oboljevaju od zloćudnih nemelanomskih tumora kože, kako bazocelularnih, tako i planocelularnih.

Jednim od uzroka pojavnosti NMSC u ranijoj životnoj dobi u BTB smatra se imunosupresivna terapija.

Ranije studije pokazuju kako se pojavnost tumora povećava s duljinom trajanja imunosupresivne terapije na način da dulje trajanje imunosupresije uzrokuje veću sveukupnu pojavnost i pojavnost više karcinoma kod istog bolesnika (111,177). Medijan vremena od transplantacije do razvoja prvoga karcinoma kod naših bolesnika je 5 ( $3-9,75$ ) godina. Sulowicz J. i suradnici, Rodriguez – Acosta ED. i suradnici i

Ferreira FR. i suradnici opisali su pojavu prvog zloćudnog nemelanomskog tumora kože u svojih bolesnika oko 6 godina nakon transplantacije, a u najnovijem istraživanju Zilinska Z. i suradnici opazili su pojavu prvih karcinoma prosječno 3,75 godina nakon transplantacije (106,114,170,178). Prateći vrijeme do razvoja zloćudnog nemelanomskog tumora kože naših bolesnika uvidjeli smo da je vrijeme do pojave bolesti kraće u bolesnika koji su transplantirani nakon 2010, iako još nema statistički značajne razlike.

To je kratko vrijeme praćenja (4 godine u odnosu na 5-40 godina transplantacije prije 2010) te su potrebna daljnja promatranja naših bolesnika kako bismo mogli doći do detaljnijih podataka. Razlog ranijem razvoju tumora nakon transplantacije mogla bi biti povećana starost bolesnika pri transplantaciji koja se značajno povećala nakon 2010, povećanjem broja transplantacija. Značajno više je bolesnika s transplantiranim bubregom koji su pri transplantaciji stariji od 50 godina.

Obzirom na primjećeno, kako se vrijeme do pojave prvog tumora skraćuje, kod bolesnika bi svakako bilo potrebno obaviti pregled dermatologa prije transplantacije, te bolesnike dermatološki kontrolirati jednom godišnje nakon transplantacije bubrega kako bi se pojava zloćudnih nemelanomskih tumora što ranije uočila i pravovremeno liječila. Praćenje i liječenje NMSC u bolesnika s transplantiranim bubregom zahtjeva multidisciplinarni pristup. Kao dermatolozi uvijek moramo biti svjesni važnosti pravovremenog uočavanja suptilnih kožnih kliničkih znakova potencijalno životno ugrožavajućih tumora te biti svjesni potrebe za prevencijom i pravovremenim liječenjem. Stoga su internacionalna i europska mreža za brigu o koži transplantiranih bolesnika (International transplat-skin cancer collaborative – ITSSC i European skin care in organ transplant skin patients network – SCOP) 2004. godine razvili zajedničke strategije za prevenciju i reevaluaciju NMSC u BTB. Prema njihovim preporukama bolesnike bi trebalo klinički pregledati prije transplantacije i procijeniti čimbenike rizika za nastanak NMSC uključujući: anamnezu, tip kože po Fitzpatrick-u, kumulativnu izloženost UV zrakama, dob bolesnika, intenzitet i trajanje imunosupresije, postojanje HIV infekcije ili CD4 limfocitopenije. Preporuča se stalna edukacija bolesnika, kako prije tako i nakon transplantacije o samoprevenciji, osnovnim kliničkim znacima tumora kože i redovitim samopregledima, kako bi se NMSC pravovremeno prepoznali i liječili. Smatraju kako je bolesnike potrebno pratiti u pravilnim vremenskim intervalima, ovisno o čimbenicima rizika svakog pojedinca: svakih 12-24 mjeseci ukoliko je rizični čimbenik

jedino imunosupresija, jednom do dva puta godišnje ukoliko postoji anamneza o premalignim ili malignim bolestima te u intervalima od 1-6 mjeseci ovisno o stupnju maligne bolesti (179).

Medijan trajanja hemodijalize prije transplantacije bolesnika koji su razvili tumor kože i bolesnika koji nisu razvili tumor kože bio je 3 godine (interkvartilni raspon 4), što je u korelaciji s dosadašnjim istraživanjima (106, 111, 176). U našem istraživanju vrijeme provedeno na hemodijalizi prije transplantacije nije utjecalo na kasniji razvoj NMSC. Nakon uključivanja Republike Hrvatske u Eurotransplant značajno se skratilo vrijeme čekanja naših bolesnika na transplantaciju i ono danas iznosi manje od dvije godine, te će daljnje praćenje bolesnika ukazati na utjecaj smanjenja duljine vremena liječenja hemodijalizom na pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože. Kao što je nastojanje u svijetu (103), i dio naših bolesnika transplantiran je preemtivno, što znači da nisu ni liječeni hemodijalizom već je transplantacija inicijalno liječenje kroničnog bubrežnog zatajenja čime bolesnicima pružamo najbolje moguće liječenje.

Brojne studije ispitivale su utjecaj povećane izloženosti UV zraka i imunosupresivne terapije na pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože u transplantiranih bolesnika. Španjolski znanstvenici već 2003. godine opisuju profesionalnu izloženost suncu kao jedan od značajnih čimbenika u prijevremenom razvoju zloćudnih nemelanomskih tumora kože kod bolesnika s transplantiranim bubregom (111), a povećana pojavnost zabilježena je i u drugim novijim studijama (114). U ovom retrospektivnom istraživanju nismo mogli ispitati sve transplantirane bolesnike o njihovim zanimanjima i navikama te smo općenitu izloženost suncu i oštećenje UV zrakama pokušali rasporediti dijeleći bolesnike prema mjestu njihova prebivališta. Smatrali smo kako su bolesnici koji žive u primorskom dijelu RH tijekom života više bili izloženi suncu, kako profesionalno tako i u slobodno vrijeme, jer je prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda Republike Hrvatske primorski dio RH godišnje izložen jačoj solarnoj energiji od kontinentalnog ( $4681\text{--}5760\text{ MJ/m}^2$ :  $3136\text{--}4680\text{ MJ/m}^2$ ) (180). Zbog toga smo očekivali veću pojavnost i raniji razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože u tih bolesnika.

Granicu između kontinentalne i primorske Hrvatske povukli smo na južnoj granici Karlovačke županije, na način da smo sve županije sjevernije i istočnije od Karlovačke uključili u kontinentalnu Hrvatsku, a sve južnije županije u primorsku Hrvatsku. U

istraživanju nismo pronašli statistički značajnu razliku u pojavnosti NMSC između te dvije skupine bolesnika ( $P=0,241$ ), 7,3% bolesnika kontinentalne RH i 5,3% bolesnika primorskog dijela RH razvilo je zloćudni nemelanomski tumor kože. Istovremeno, nismo pronašli ni značajnu razliku u vremenu do pojave prvog NMSC između bolesnika kontinentalnog i primorskog dijela RH ( $P=0,564$ ).

Pretpostavljamo kako su razlozi za takvu statistiku demografska kretanja u RH tijekom posljednjih nekoliko desetljeća: bolesnici koji su u djetinjstvu živjeli u primorskom dijelu RH migriraju prema centralnom dijelu države, prenoseći sa sobom i oštećenja kože nastala tijekom djetinjstva, a s druge strane, brojno stanovništvo kontinentalnog dijela RH radi u poljoprivrednim i građevinskim zanimanjima, koja uzrokuju dugotrajan boravak na suncu te tako i oštećenja kože koja dodatno predisponiraju nastanak karcinoma kože. Tijekom ljetnih mjeseci, kada je energija UV zraka najveća, brojni stanovnici kontinentalnog dijela RH odlaze na sezonske poslove u turizmu u primorski dio RH te se na taj način njihova izloženost povećava. Za bolju diferencijaciju potrebno je daljnje istraživanje profesionalnoga i rekreativnoga boravka na suncu svakog pojedinoga transplantiranog bolesnika imajući u vidu demografska kretanja stanovništva.

### **6.3. IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA I ZLOĆUDNI NEMELANOMSKI TUMORI KOŽE**

#### **6.3.1. Imunosupresivna terapija**

U istraživanje smo uključili podatke o imunosupresivnoj terapiji bolesnika nakon transplantacije bubrega. Lijekovi koje bolesnici dobivaju radi sprječavanja odbacivanja transplantanta mogu se podijeliti u skupine: inhibitori kalcineurina (takrolimus i ciklosporin), imunosupresivne antiproliferativne lijekove (mikofenolna kiselina, azatioprin), mTOR inhibitore (sirolimus i everolimus) i sustavne kortikosteroide.

Ispitivani bolesnici dobivaju trojnu ili dvojni imunosupresivnu terapiju, ovisno o broju imunosupresivnih lijekova: dva od gore navedenih lijekova sa ili bez sustavnog kortikosteroida. Kombinacija imunosupresivne terapije zabilježena je ovisno o režimu koji bolesnici trenutačno dobivaju. Kod bolesnika kod kojih je terapija promijenjena nakon razvoja zloćudnoga nemelanomskoga tumora kože, zabilježena je terapija prije

razvoja tumora, obzirom se tumor odnosi na terapiju prije promjene. Kalcineurinski inhibitori i antiproliferativni lijekovi zabilježeni su točno u kombinaciji u kojoj ih bolesnici dobivaju. U ispitivanoj skupini 31 transplantirani bolesnik dobiva kortikosteroid metilprednisolon, a svi ostali bolesnici su na terapiji prednisolonom. Ti su bolesnici uključeni u jednu skupinu jer ne postoji značajna razlika između imunosupresivnog učinka metilprednisolona i djelovanja prednisolona. mTOR inhibitori koje bolesnici dobivaju su sirolimus (41 bolesnik) te everolimus (103 bolesnika). Obzirom na slično terapijsko djelovanje, mTOR inhibitori također su grupirani u jednu skupinu.

Ostali lijekovi koje bolesnici uzimaju (antihipertenzivi, antilipemici, antidijabetici i sl), a nisu imunosupresivnog djelovanja, nisu ispitivani u ovom istraživanju.

Trojnu imunosupresivnu terapiju primalo je 1130 bolesnika s transplantiranim bubregom, a samo su 102 bolesnika bila na dvojnjoj terapiji. Odabir imunosupresivne terapije ovisi o stavovima struke i svakog pojedinog transplantacijskog centra, ali i o specifičnim obilježjima svakog pojedinog bolesnika. Prvenstveno se radi o imunološkom riziku za akutno odbacivanje, ali i o pridruženim bolestima. U KBC-u Zagreb bolesnici koji se dugotrajno liječe transplantacijom bubrega postupno prekidaju terapiju kortikosteroidima. Dugo je vremena stav struke bio potreba terapije sustavnim kortikosteroidom radi sprječavanja odbacivanja presađenog bubrega. Poboljšanjem očuvanja organa prije transplantacije i uvođenjem novijih i boljih imunosupresivnih lijekova, smatra se da se imunosupresija može smanjiti na najnižu moguću razinu. Obzirom na brojne nuspojave dugotrajne sustavne terapije kortikosteroidima, smjernice KDIGO grupe iz 2011. godine predlažu da se terapija kortikosteroidom prekine tjedan dana nakon transplantacije, no ukoliko se to nije učinilo, terapiju je bolje zadržati. Treba naglasiti da jača zabrinutost oko ukidanja kortikosteroida obzirom na rizik pojave donor specifičnih protutijela i razvoja humoralnog odbacivanja.

Imunosupresivnu terapiju takrolimusom ima 66,1% bolesnika, dok je na terapiji ciklosporinomA samo jedna trećina naših bolesnika (32,4%). Istraživanja Han W. i suradnika ukazala su kako ciklosporinA inhibira popravak baza oštećenih UVB zrakama te se na taj način olakšava karcinogeneza u koži (115, 125). Prema KDIGO smjernicama takrolimus bi trebao biti lijek prvog izbora. Posljednjih godina imunosupresivna terapija usmjerena je prema imunosupresiji takrolimusom kao

kalcineurinskim inhibitorom prvog izbora. Od 2009. godine u KBC-u Zagreb kalcineurinski inhibitor prvog izbora je upravo takrolimus.

Što se tiče antiproliferativnih lijekova, samo 8,3% naših bolesnika imunosuprimirano je azatioprinom, dok je ostalih 91,7% bolesnika imunosuprimirano mikofenolat mofetilom kao antiproliferativnim lijekom prvog izbora. Istraživanja Perret CM. i suradnika ukazalo je kako azatioprin pojačava osjetljivost kože na UVA zrake, te značajno reducira MED za UVA, sa značajno povećanim UVA–izazvanim oštećenjima DNA u stanicama kože (6–TG) (121). Hofbauer GF. i suradnici ukazali su na smanjenje fotosenzitivnosti ukoliko se liječenje azatioprinom zamijeni liječenjem mikofenolat mofetilom (107). Većina naših bolesnika liječi se mikofenolat mofetilom.

Do završetka istraživanja 144 bolesnika je na terapiji mTOR inhibitorima (everolimus i sirolimus). mTOR inhibitore bolesnici dobivaju u raznim kombinacijama: everolimus (ili sirolimus) s takrolimusom, everolimus (ili sirolimus) s ciklosporinom i prednisonom, everolimus (ili sirolimus) s prednisonom i mikofenolat mofetilom, everolimus (ili sirolimus) s azatioprinom i prednisonom. Istraživanja mTOR inhibitora sve više ukazuju na njihovu sposobnost smanjenja progresije tumora kože i smanjenja broja UV zrakama izazvanih mutacija (120, 126). Većina bolesnika koji uzimaju mTOR inhibitore na tu je terapiju prebačena tek nakon pojave zloćudnog tumora. Kod 67 bolesnika everolimus je druga linija terapije, što je slučaj sa 26 bolesnika koji dobivaju sirolimus. Razloge većeg broja bolesnika koji dobivaju everolimus je u nedostatku oblika lijeka od 0,5mg sirolimusa zbog čega se nije mogla postići ciljna koncentracija lijeka u krvi bolesnika pa su prevedeni sa sirolimusa na everolimus. U istraživanju nismo proučavali koji su bili razlozi promjene terapije s inicijalne imunosupresije prema mTOR inhibitorima. Za 38 bolesnika everolimus je prvi terapijski izbor. Bolesnici koji dobivaju mTOR inhibitore kao prvi izbor terapije transplantirani su uglavnom 2012. godine ili kasnije što je u skladu sa spoznajama kako mTOR inhibitori ne uzrokuju problem cijeljenja rana zbog čega su prethodno bili izbjegavani u *de novo* protokolima. Čekaju se rezultati TRANSFORM studije koji će ukazati na neinferiornost protokola baziranih na everolimusu u kombinaciji s niskim dozama inhibitora kalcineurina u odnosu prema mikofenolat mofetilu.

Za kasnije proučavanje utjecaja jačine imunosupresije na pojavnost tumora, istražili smo broj bolesnika na dvojnjoj i trojnoj terapiji pojedinim kalcineurinskim inhibitorom. Među bolesnicima koji su imunosuprimirani takrolimusom 89,9% uz takrolimus ima još dva imunosupresivna lijeka, a 10,1% uz takrolimus imaju još samo jedan imunosupresivni lijek (prednison, mikofenolat mofetil, azatioprin), za sada nema bolesnika koji dobivaju dvojnju terapiju takrolimusom i mTOR inhibitorom.

Samo je 2,3% bolesnika imunosuprimirano ciklosporinomA u kombinaciji s još samo jednim lijekom i to prednisonom, dok svi ostali bolesnici koji dobivaju ciklosporinA, njih 97,7% uz ciklosporin imaju još dva imunosupresivna lijeka.

### **6.3.2. Odnos imunosupresivne terapije i pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora kože**

Dugotrajna imunosupresivna terapija transplantiranim bolesnicima uzrokuje brojne nuspojave, od kojih su najznačajnije one sistemske upotrebe kortikosteroida (npr. steroidni dijabetes, Cushing sindrom, osteoporoza) i pojačan razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože kod bolesnika koji uzimaju azatioprin i ciklosporinA. Zbog toga brojni autori provode kliničke studije pokušavajući što više smanjiti količinu imunosupresiva, a zadržati funkcionalni presadak. Abou Ayache R. i suradnici u svojim studijama unatrag desetak godina ukazali su na monoterapiju ciklosporinomA kao dobrom imunosupresijom za redukciju karcinoma uz zadržanu funkciju presađenog bubrega (177), a smjernice prema dvojnjoj imunosupresivnoj terapiji predložene su i od KDIGO grupe 2011. godine. Stoga je jedan od zadataka našeg istraživanja bio proučiti pojavnost tumora ovisno o intenzitetu imunosupresije.

Smatra se kako trojna terapija, tj. terapija s istovremeno tri imunosupresivna lijeka pojačava intenzitet terapije u odnosu na dvojnju terapiju, a time dovodi do pojačane sklonosti nastanku zloćudnih nemelanomskih tumora kože. Osobito je to naglašeno kod kalcineurinskih inhibitora, pa smo proučili pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora na dvojnjoj i trojnoj terapiji, posebno za ciklosporinA i takrolimus.

U našoj studiji nismo primijetili statistički značajnu razliku u pojavnosti tumora bolesnika na trojnoj terapiji u odnosu na dvojnju terapiju, 6,64% bolesnika na trojoj



terapiji i 8,82% bolesnika na dvojnjoj imunosupresivnoj terapiji oboljelo je od zloćudnih nemelanomskih tumora kože ( $P=0,556$ ), dok je omjer rizika za razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože na trojnoj i dvojnjoj terapiji 0,806 s intervalom pouzdanosti 0,392-1,656. Za naše bolesnike to je dobar pokazatelj, budući ih je 91,7% na trojnoj terapiji.

Obzirom na brojne nuspojave terapije ciklosporinomA, od kojih je posebno značajna ona o zaustavljanju popravka UV zrakama izazvanih mutacija DNA keratinocita, provode se studije o pokušaju zamjene ciklosporina drugim lijekom. Studija Karasove M. i suradnika ukazala je na značajno povišeni rizik nastanka zloćudnih nemelanomskih tumora kože u bolesnika koji su dobivali terapiju ciklosporinomA u odnosu na takrolimus, mikofenolat mofetil, steroide i njihovu kombinaciju (181). Campistol JM. i suradnici primijetili su u svojoj studiji da zamjena ciklosporinaA mTOR inhibitorom dovodi do smanjenja pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora kože, dok Wulff BC. i suradnici navode da čak i samo dodavanje sirolimusa terapiji ciklosporinom dovodi do usporavanja rasta i progresije tumora (126,182). Trećina naših bolesnika s transplantiranim bubregom prima ciklosporinA pa nas je zanimalo utječe li ona na razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože u kombinaciji s jednim ili dva dodatna imunosupresiva. Unatoč malom broju bolesnika na dvojnjoj terapiji, nismo našli statistički značajnu razliku u pojavnosti nemelanomskim zloćudnih tumora bolesnika na trojnoj terapiji ciklosporinomA i bolesnika na dvojnjoj terapiji ciklosporinomA ( $P=0,080$ ); oni u podjednakom omjeru oboljevaju od NMSC (13,59% na trojnoj terapiji i 44,44% na dvojnjoj terapiji).

Tijekom studije zanimalo nas je koliko je povezana terapija takrolimusom, kalcineurinskim inhibitorom prvog izbora, s pojavom NMSC te postoji li razlika između trojne i dvojne terapije. Tek 3,1% bolesnika na trojnoj terapiji razvilo je NMSC. Na dvojnjoj terapiji takrolimusom četiri bolesnika oboljela su od NMSC (3,7%). Istraživanje je pokazalo da nema statistički značajne razlike u pojavnosti zloćudnih nemelanomskih tumora kože kod bolesnika na dvojnjoj u odnosu na bolesnike na trojnoj terapiji takrolimusom. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože uz takrolimus biti će jasna tek kroz desetak godina obzirom na relativno kratku izloženost bolesnika lijeku. Možemo očekivati i veću ili raniju pojavnost tumora kod ovih bolesnika obzirom na snažniji imunosupresivni učinak takrolimusa.

Obzirom na navedeno i na pojavnost NMSC na terapiji takrolimusom od 3,2% te 14,3% bolesnika sa NMSC na terapiji ciklosporinomA, vidjeli smo da postoji statistički značajna razlika u pojavnosti NMSC između bolesnika liječenih ovim kalcineurinskim inhibitorima ( $P < 0,001$ ). Relativni rizik bolesnika na terapiji takrolimusom i ciklosporinomA za razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože je 0,19 s intervalom pouzdanosti 0,12–0,31. Prema našem istraživanju, bolesnici imunosuprimirani ciklosporinomA imaju 80% veću šansu razvoja tumora kože od bolesnika imunosuprimiranih takrolimusom, prvenstveno zbog duljine izloženosti imunosupresijskoj terapiji.

Proučavajući tip imunosupresije i pojavnost tumora, sljedeće smo usporedili pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože pri uzimanju dva antiproliferativna lijeka, azatioprina i mikofenolat mofetila. Prema smjernicama, mikofenolat mofetil je lijek prvog izbora, a smatra se da djeluje tumoroprotektivno, što potvrđuju i naši podaci: 91,7% bolesnika u terapiji ima mikofenolat mofetil, a tek 8,3% bolesnika je na terapiji azatioprinom. Unatoč malom broju bolesnika imunosuprimiranih azatioprinom, utvrdili smo kako su bolesnici koji su primali terapiju azatioprinom statistički značajno češće oboljeli od zloćudnih nemelanomskih tumora kože nego bolesnici koji primaju terapiju mikofenolat mofetilom.

Zloćudni nemelanomski tumor kože razvilo je 5,9% bolesnika koji se liječe mikofenolat mofetilom te 15,8% bolesnika na terapiji azatioprinom. Svakako je to i pitanje duljine izloženosti azatioprinu u odnosu na mikofenolat mofetil, budući su bolesnici s transplantiranim bubregom desetljećima izloženi imunosupresiji azatioprinom. No, dobivene vrijednosti su očekivane, jer su već 2008. godine istraživanja Perret CM. i suradnika ukazala su na postojanje pojačane UVA osjetljivosti bolesnika koji dobivaju terapiju azatioprinom, a prema studiji Coghill AE. i suradnika bolesnici na terapiji azatioprinom imaju dvostruko veću mogućnost razvoja zloćudnih nemelanomskih tumora kože (121,183). Također, Hofbauer GF. i suradnici pokazali su kako je MED za UVA zrake tijekom terapije azatioprinom dvostruko manja od MED bolesnika koji uzimaju mikofenolat mofetil kao antiproliferativni lijek što zatim dovodi do pojačane UV inducirane karcinogeneze kod tih bolesnika. (124).

Za utjecaj do sada ispitivanih varijabli na razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kože učinili smo i Cox-ovu regresijsku analizu. U analiziranju smo koristili slijedeće prediktore: muški spol u odnosu na ženski spol ispitanika, prebivalište u primorskom dijelu RH u odnosu na kontinentalni dio RH, dob pri transplantaciji, te dva imunosupresivna lijeka, takrolimus i mikofenolat mofetil. Razlog uključivanja tih lijekova u izračun je njihovo korištenje kao lijekova prvog izbora u imunosupresivnoj terapiji. Regresijskom analizom potvrdili smo kako je muški spol rizičan čimbenik za razvoj zloćudnih nemelanomskih tumora kod bolesnika s transplantiranim bubregom. Analiza također ukazuje da je pojavnost tumora kože kod bolesnika s transplantiranim bubregom veća ukoliko su bolesnici pri transplantaciji stariji.

Novija istraživanja ukazuju da mTOR inhibitori, osobito sirolimus, sprječavaju nastanak tumora na više načina koji još nisu do kraja istraženi, no koji se intenzivno proučavaju. Istraživanja Voskamp P. i suradnika na modelu stanica ljudske kože ukazuje na indukciju apoptoze tumorskih stanica djelovanjem sirolimusa (119); dok istraživanja Wulff BC. i suradnika na animalnom modelu ukazuju na smanjenje veličine i progresije kožnih tumora nakon terapije sirolimusom, čak i u kombinaciji s ciklosporinomA (126). Prospektivna studija Campostol JM. i suradnika ukazala je na produljenje vremenskog razdoblja od transplantacije do razvoja prvog kožnoga tumora u bolesnika koji su dobivali imunosupresivnu terapiju sirolimusom (182). U našem istraživanju 144 bolesnika je na terapiji mTOR inhibitorima, većinom zbog zloćudnih tumora dobivenih prije ili nakon transplantacije, od kojih je 4,2% bolesnika razvilo zloćudni nemelanomski tumor kože ukazujući kako ih imunosupresija mTOR inhibitorom nije zaštitila od razvoja zloćudnog nemelanomskog tumora kože. Budući 144 bolesnika dobivaju mTOR inhibitore, a uključeni su u terapiju različitim imunosupresivima, nije moguće izračunati statističku značajnost pojavnosti tumora kod bolesnika koji primaju tu terapiju.

Nakon oboljevanja od zloćudnih nemelanomskih tumora kože, 36 naših bolesnika prešlo je s inicijalne imunosupresivne terapije održavanja na mTOR inhibitor. Tijekom daljnjeg praćenja, 7 bolesnika je zbog nuspojava, uglavnom proteinurije, prekinulo uzimanje mTOR inhibitora i vraćeno je na prijašnji protokol liječenja. Ranije studije pokazale su kako se recidiv zloćudnih nemelanomskih tumora kože nakon liječenja prvog zloćudnog nemelanomskog tumora kože bilježi u 41% bolesnika (68) te kako bolesnici s transplantiranim bubregom nakon prvog zloćudnog nemelanomskog

tumora kože imaju 49 puta viši rizik razvoja sljedećega zloćudnoga nemelanomskoga tumora (183). U našem istraživanju vrijeme do pojave prvog NMSC je oko 5 godina, stoga je potrebno daljnje praćenje tih bolesnika kako bi se vidjelo koliko uključivanje mTOR inhibitora utječe na pojavnost novih zloćudnih nemelanomskih tumora kože.

#### **6.4. ANALIZA IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJANJA Wnt4 PROTUTIJELOM**

Za kliničare koji prate imunosuprimirane bolesnike od iznimne je važnosti pokušati prepoznati bolesnike s rizikom od razvoja invazivnijih tipova tumora, odnosno tumora koji će biti skloniji recidivima i metastazama. Većina zloćudnih nemelanomskih tumora kože dobro reagira na inicijalnu terapiju kirurškom ekscizijom, no bolesnici koji razviju metastaze često imaju lošu prognozu bolesti. Do sada nije identificiran imunohistokemijski biljeg kojim bi već nakon prve ekscizije tumora mogli predvidjeti biološko ponašanje u smislu recidiva ili metastaza, iako su učinjena brojna istraživanja. Ovim istraživanjem pokušali smo pridonijeti tom istraživanju proučivši izraženost i pojavnost imunohistokemijskog markera Wnt4, jednoga od signalnih proteina u Wnt signalnom putu, za koji je ukazano da je pojačano izražen u brojnim tumorima (162, 163, 166, 168).

Pojavnost Wnt4 do sada je istraživana samo u pojedinačnim slučajevima zloćudnih tumora kože te smo tome htjeli pridonijeti ovim istraživanjem. Ispitali smo pojavnost Wnt4 u zloćudnim nemelanomskim tumorima u bolesnika s transplantiranim bubregom, u ispitanika iz kontrolne skupine koji nisu bili izloženi imunosupresivnoj terapiji i u zdravoj koži te usporediti stupanj izraženosti Wnt4 u navedenim skupinama.

##### **6.4.1. Izraženost Wnt4 u zdravoj koži**

Početo smo istražili ekspresiju Wnt4 u zdravoj koži ispitanika, pregledavši 150 uzoraka peritumorske kože. Kako je prikazano na slici 19 (stranica 72), Wnt4 pozitivitet zdrave kože naših ispitanika vidi se u obliku smeđe obojenih zrnaca unutar stanične citoplazme u svim slojevima epidermisa. Dosadašnja imunohistokemijska bojanja drugih autora također ukazuju na ekspresiju Wnt4 kao smeđe granule na staničnoj

membrani i u citoplazmi stanice, što je očekivani nalaz obzirom na patogenezu u kojoj se Wnt4 veže na receptor na staničnoj membrani i pokreće unutarцитoplazmatska zbivanja (162,167,185). Pozitivno Wnt4 bojanje zapazili smo i u keratinocitima folikula dlake zdrave kože što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima u kojima se navodi pojačana aktivnost Wnt signalnog puta u bazalnom sloju epidermisa, u folikulu dlake (osobito tijekom anagene faze životnog ciklusa dlake) te u tzv. „bulge“ regiji koja je važan izvor matičnih stanica kože i nalazi se uz epidermalne keratinocite folikula dlake (19).

#### **6.4.2. Izraženost Wnt4 u zloćudnim nemelanomskim tumorima kože**

Pozitivnom ekspresijom Wnt4 u stanicama tumora kože smatrali smo obojanost stanične citoplazme tumorskih stanica u obliku smeđe obojanih zrnaca, kao što je opisano i u dosadašnjim istraživanjima Muenst S. i suradnika te Miyakoshi T. i suradnika (162,165).

Ispitujući jačinu izraženosti Wnt4 naišli smo na razlike. Određeni tumori pokazuju jaku izraženost Wnt4, što je sukladno dosadašnjim istraživanjima Halifu Y. i suradnika koji su ukazali na pojačanu izraženost Wnt1 u planocelularnom karcinomu kože te Arya M. i suradnika koji su našli pojačanu izraženost Wnt4 u planocelularnom karcinomu penisa ukazujući time na ulogu Wnt4 u inicijaciji karcinogeneze ovih karcinoma (154,168).

Neki su tumori u potpunosti bili negativni na Wnt4 bojanje, što ukazuje na neaktivnost Wnt signalnoga puta. Prema dosadašnjim istraživanjima Li W. na timomu i Arya M. na planocelularnom karcinomu penisa, smanjena ekspresija Wnt4 pronađena je u slabije diferenciranim tumorima, pretpostavljajući agresivnije ponašanje tih tumora (166,168).

##### **6.4.2.1. Analiza imunohistokemijske izraženosti Wnt4 u bazocelularnom karcinomu kože**

Dosadašnja istraživanja o aktivnosti Wnt4 signalnog puta u BCC temelje se na malim uzorcima s tim da se Wnt4 ispitivao samo u 1 istraživanju. Istraživanja Pourreyron C. i suradnika iz 2012.g. govore o pojačanoj izraženosti liganada Wnt signalnog puta, Wnt5a u bazocelularnom i planocelularnom karcinomu, osobito na aktivnim rubovima tumora zaključujući kako Wnt5a igra važnu ulogu u napredovanju i progresiji tumora

(186). Istraživanje DO Carmo NG. i suradnika govori o sniženoj aktivnosti liganada Wnt3 i Wnt16 u bazocelularnom karcinomu u odnosu na zdravu kožu (187).

Naši rezultati u skladu su s istraživanjem Bonifas JM. i suradnika koje ukazuje na snižene vrijednosti Wnt4 u bazocelularnim karcinomima kože u odnosu na zdravu kožu (17), za razliku od pojačane izraženosti Wnt4 u drugim tumorima kao što su tumori dojke ili pituitarni tumori u istraživanjima Muenst S. i suradnika te Miyakoshi T. i suradnika (162,165).

U našem istraživanju dokazana je izraženost Wnt4 u 26 (92,9%) od 28 uzoraka BCC bolesnika s transplantiranim bubregom, u 76 (98,7%) od 77 uzoraka BCC kontrolne skupine te u 75 (100,0%) od 75 uzoraka zdrave kože.

U BTB, slabo pozitivna reakcija bila je izražena u 3 uzorka (10,7%), umjereno pozitivna reakcija u 6 (21,5%) i izrazito pozitivna reakcija u 17 (60,7%) uzoraka; u bolesnika kontrolne skupine slabo pozitivna reakcija zabilježena je u 27 (35,1%) uzoraka, umjereno pozitivna u 23 (29,8%) i izrazito pozitivna u 26 (33,8%) uzoraka. Istovremeno, u zdravoj koži zabilježeno je 74 (98,6%) izrazito pozitivnih Wnt4 uzoraka i jedan (1,4%) slabo pozitivan Wnt4 uzorak dok negativnih uzoraka nije bilo.

Statistička obrada ukazuje na značajne razlike između ove tri skupine ispitivanih uzoraka. Imunohistokemijska izraženost Wnt4 značajno je niža u BCC kože u odnosu na izraženost Wnt4 u zdravoj koži, što smo i očekivali obzirom na nalaze dosadašnjih istraživanja u kojima se ukazuje kako je supresija izraženosti Wnt4 signala jedan od načina na koji dolazi do diseregulacije SHH gena, a time i pojave BCC. Naši rezultati ukazuju na moguću ulogu Wnt4 u inicijalnoj karcinogenezi ovih tumora.

Međutim, daljnjom analizom utvrdili smo značajno veću izraženost Wnt4 u BCC BTB u odnosu na BCC bolesnika kontrolne skupine. S obzirom da je imunosupresivna terapija u BTB temeljni uzrok povećane biološke agresivnosti NMSC, dobiveni rezultat može ukazivati kako Wnt4 signalni put nema značajnu ulogu u progresiji BCC. Porast izraženosti Wnt4 signalnog puta u BCC BTB u odnosu na BCC bolesnika kontrolne skupine mogao bi se objasniti mogućom aktivacijom različitih Wnt signalnih puteva Wnt4 ligandom u fazi progresije tumora ili koaktivacijom drugih Wnt liganada, što valja razjasniti daljnjim istraživanjima.

#### **6.4.2.2. Analiza imunohistokemijske izraženosti Wnt4 u planocelularnom karcinomu kože**

Rezultati istraživanja Arya M. i suradnika te Halifu Y. i suradnika na planocelularnim karcinomima ukazala su na pojačanu aktivnost Wnt u ranoj karcinogenezi tumora, te slabiju izraženost Wnt4 u slabije diferenciranim, a time i agresivnijim tumorima.

Imunohistokemijske analize istraživanja Sherwood V. i suradnika ukazala su na povišene vrijednosti beta-katenina u metastazama SCC (153), što se može pokazati i klinički značajnim, obzirom su dva bolesnika s transplantiranim bubregom iz našeg istraživanja razvila proširenu bolest, s metastazama planocelularnog karcinoma u parotidne žlijezde te umrla od proširene zloćudne bolesti.

U našem istraživanju uzoraka SCC, imunohistokemijskom analizom izraženosti Wnt4 u BTB pozitivna reakcija zabilježena je u 27 (96,4%) od 28 uzoraka u SCC kontrolne skupine bolesnika pozitivna reakcija zabilježena je u 73 (96,1%) od 76 uzoraka dok je u zdravoj koži zabilježeno 74 (96,1%) od 75 pozitivnih uzoraka. U BTB slabo pozitivna reakcija bila je izražena u 2 uzorka (7,1%), umjereno pozitivna reakcija u 14 (50,0%) i izrazito pozitivna reakcija u 11 (39,3%) uzoraka; u bolesnika kontrole skupine slabo pozitivna bila je izražena u 23 (30,3%) uzorka, umjereno pozitivna u 26 (34,2%) i izrazito pozitivna u 24 (31,6%) uzorka dok je u uzorcima zdrave kože zabilježeno 74 izrazito pozitivnih uzoraka i jedan negativan uzorak.

Analiza dobivenih podataka ukazuje kako je izraženost Wnt4 u SCC kontrolne skupine te u SCC BTB niža od izraženosti u zdravoj koži, dok nema statistički značajne razlike u izraženosti Wnt4 u SCC BTB i u SCC bolesnika kontrolne skupine. Dobiveni rezultati mogu ukazivati kako je Wnt4 važan čimbenik u inicijalnoj karcinogenezi SCC. Međutim, imunosupresivna terapija u BTB, inače povezana s povećanom biološkom agresivnošću SCC, u našem istraživanju nije se mogla povezati s daljnjom razlikom u izraženosti Wnt4 u odnosu na SCC bolesnika kontrolne skupine. Navedeni rezultati stoga ukazuju kako Wnt4 signalni put nema značajnu ulogu u progresiji SCC.

Ukupno gledajući, našim smo istraživanjem ukazali na moguću ulogu Wnt4 u inicijalnoj karcinogenezi BCC i SCC, no ne i na moguću povezanost imunosupresivne terapije i izraženosti Wnt4 signalnog puta.

Potrebna su daljnja istraživanja koja bi pridonijela razjašnjavanju utjecaja imunosupresivne terapije na različite kaskade Wnt signalnog puta te postoji li razlika u izraženosti Wnt4 u NMSC između bolesnika na različitoj imunosupresivnoj terapiji.

Nadalje, dosadašnja istraživanja, iako provedena na malom broju uzoraka, ukazuju kako beta-kateninski signal dovodi do proliferacije stanica NMSC, što može biti pokrenuto putem nekoliko različitih signalnih putova (153). Jedan od signalnih putova koji se aktivira djelovanjem beta-kateninskog signala jest Wnt signalni put; međutim, još uvijek nije razjašnjena uloga pojedinih komponenti Wnt signalnog puta u karcinogenezi NMSC te na njihovo biološko ponašanje. Našim istraživanjem pokušali smo pridonijeti razumijevanju značenja Wnt4 signala u patogenezi BCC i SCC kože.



## 7. ZAKLJUČCI

1. Pojavnost zloćudnih nemelanomskih tumora kože bolesnika s transplantiranim bubregom od 6,81% odgovara pojavnosti u drugim europskim zemljama.
2. U bolesnika s transplantiranim bubregom, bazocelularni karcinom kože češći je od planocelularnog karcinoma kože. Omjer pojavnosti bazocelularnog i planocelularnog karcinoma je 1,76: 1.
3. Muškarci s transplantiranim bubregom tri puta češće oboljevaju od zloćudnog nemelanomskog tumora kože nego žene s transplantiranim bubregom.
4. Bolesnici s transplantiranim bubregom (BTB) u značajnije mlađoj životnoj dobi oboljevaju od zloćudnih nemelanomskih tumora kože nego bolesnici koji nisu izloženi imunosupresivnoj terapiji.
5. Značajno je više bolesnika s transplantiranim bubregom koji su pri transplantaciji stariji od 50 godina. Kako se vrijeme od transplantacije do pojave prvog NMSC skraćuje, obavezno je u ovih bolesnika učiniti dermatološki pregled prije transplantacije te redovito, sukladno smjernicama, nakon transplantacije bubrega kako bi se pojava NMSC što ranije uočila i pravovremeno liječila.
6. Nema razlike u učestalosti NMSC u između bolesnika s BTB koji žive u kontinentalnom dijelu RH i onih BTB koji imaju prebivalište u primorskom dijelu RH.
7. Vrijeme provedeno na hemodijalizi prije transplantacije nije imalo utjecaja na pojavnost NMSC.
8. Intenzitet imunosupresivne terapije nije utjecao na pojavnost tumora, dok je vrsta imunosupresivnog lijeka povezana s pojavom NMSC. Bolesnici imunosuprimirani ciklosporinom ili azatioprinom značajno češće oboljevaju od NMSC nego bolesnici imunosuprimirani takrolimusom ili mikofenolat mofetilom.
9. Wnt4 protein izražen je u citoplazmi zdravih keratinocita i u citoplazmi tumorskih stanica zloćudnih nemelanomskih tumora kože.
10. Izraženost Wnt4 signala veća je u zdravoj koži nego bazocelularnim i placnocelularnim karcinomima kože što ukazuje kako supresija Wnt4 signalnog puta sudjeluje u inicijalnoj karcinogenezi ovih tumora.

## 8. SAŽETAK

Bolesnici liječeni imunosupresivnom terapijom pokazuju povećanu sklonost razvoju tumora, od kojih su najčešći zloćudni nemelanomski tumori kože (NMSC).

Istražili smo pojavnost NMSC u populaciji bolesnika s transplantiranim bubregom (BTB). Zabilježili smo rizične čimbenike za razvoj NMSC uključujući: spol bolesnika, dob pri transplantaciji, geografsku regiju u kojoj žive, trajanje nadomještanja bubrežne funkcije dijalizom te vrstu, intenzitet i trajanje imunosupresivne terapije. Izraženost imunohistokemijskog biljega Wnt4 ispitali smo u NMSC BTB i u NMSC bolesnika kontrolne skupine koji nisu pod imunosupresivnom terapijom (77 bazocelularnih i 76 planocelularnih u potpunosti uklonjenih tumora). Razina statističke značajnosti određena je na  $P < 0,05$ .

Pojavnost NMSC u BTB bila je 6,81% s omjerom pojavnosti bazocelularnog i planocelularnog karcinoma 1,76:1. Muškarci s transplantiranim bubregom češće obolijevaju od zloćudnih nemelanomskih tumora od žena s transplantiranim bubregom, i imaju 50% veću vjerojatnost obolijevanja ( $P = 0,007$ , OR 1,98 (1,20–3,27)). Nismo uočili značajnu razliku u starosti muškaraca i žena s transplantiranim bubregom pri razvoju tumora, no razdoblje od transplantacije do pojave prvog tumora kraće je u muškaraca ( $P = 0,002$ ). Ukupno, BTB u značajno mlađoj životnoj dobi razvijaju NMSC u usporedbi s bolesnicima kontrolne skupine ( $P < 0,0001$ ). Medijan trajanja dijalize prije transplantacije bio je 3 godine (2–6 godina), a medijan razvoja prvog zloćudnog nemelanomskog tumora u BTB je 5 godina. Medijan starosti bolesnika pri transplantaciji transplantiranih prije 2010.g. je 44 godine (32–53), dok je medijan starosti bolesnika pri transplantaciji transplantiranih nakon te godine 53 godine (43–61), što predstavlja značajnu statističku razliku ( $P < 0,0001$ ), dok se istovremeno u bolesnika starijih pri transplantaciji smanjuje vrijeme do pojave prvog karcinoma. NMSC su utvrđeni u 7,3% BTB koji žive u kontinentalnom dijelu Republike Hrvatske (RH) te u 5,3% BTB koji žive u primorskom dijelu RH, što nije statistički značajno ( $P = 0,241$ , OR 1,397 (0,797–2,448)). Vrijeme od transplantacije do pojave NMSC podjednako je za bolesnike koji žive u kontinentalnom i bolesnike koji žive u primorskom dijelu Republike Hrvatske ( $P = 0,564$ ). Tumori su se razvili u 6,64% bolesnika na trojnoj imunosupresivnoj terapiji, dok je 8,42% bolesnika na dvojnoj imunosupresivnoj terapiji razvilo zloćudni nemelanomski tumor kože ( $P = 0,556$ ). Značajna je razlika u vrsti imunosupresivne terapije, 3,1 % bolesnika

imunosuprimiranih takrolimusom razvilo je zloćudni nemelanomski tumor kože, što je značajno manje u odnosu na 14,3% bolesnika koji su imunosuprimirani ciklosporinom A ( $P < 0,0001$ ). Nadalje, 5,9% bolesnika imunosuprimiranih mikofenolat mofetilom i 15,8% bolesnika imunosuprimiranih azatioprinom razvilo je NMSC ( $P = 0,001$ ).

Imunohistokemijskim bojanjem na Wnt4 protutijelo pronašli smo pozitivitet unutar stanične citoplazme zdrave kože i tumorskih stanica. Izraženost Wnt4 manja je u bazocelularnim i planocelularnim karcinomima kože u odnosu na zdravu kožu ( $p < 0,0001$ ) ukazujući na utjecaj Wnt signala u inicijalnoj karcinogenezi NMSC. Razlika u izraženosti Wnt4 pozitiviteta u BTB u odnosu na kontrolnu skupinu ukazuje na moguću aktivaciju različitih Wnt signalnih putova ili koaktivacijom drugih Wnt liganada u progresiji NMSC no ne i na ulogu imunosupresije u izraženosti Wnt4 signala.

Naši rezultati pokazuju kako su bolesnici s transplantiranim bubregom visoko rizična skupina za razvoj zloćudnih NMSC. Svaki bolesnik bi prije transplantacije trebao obaviti dermatološki pregled te bi isti bilo uputno ponavljati nakon transplantacije bubrega sukladno smjernicama i rizičnim čimbenicima svakog pojedinog bolesnika.

## 9. SUMMARY

### **Title: Risk factors for development of non-melanoma skin cancer after renal transplantation**

Tajana Borlinić, MD, 2019

Patients on immunosuppressive therapy are more prone to cancer development, with nonmelanoma skin cancers (NMSCs) being the most frequent ones.

The aim of the study was to examine the incidence of NMSCs the group of renal transplant recipients (RTR).

Risk factors for NMSC development were recorded, such as patients' sex, age at transplantation, geographic background, duration of dialysis, type, intensity and duration of immunosuppression. In order to examine the role of Wnt4, the expression pattern was investigated in NMSCs of RTR and in a control group, a nontransplant group which is not under immunosuppressive therapy (77 paraffin embedded basal cell carcinomas (BCC) and 76 paraffin embedded squamous cell carcinomas (SCC)). Statistical significance was appointed to  $p < 0,05$ .

The incidence of NMSC among RTRs was 6,81%., with basal cell carcinoma being the most prevalent one (BCC:SCC ratio 1,76:1). Males were more affected than females ( $P=0,007$ ), with shorter mean interval between the time of transplantation and first cancer development ( $P=0,0001$ ). Mean dialysis time before transplantation was 3 years (2–6 years), and mean time to first NMSC development was 5 years respectively. There was difference between age at transplantation; mean age at transplantation for patients transplanted before the year 2010 was 44 (32–53) and mean age at transplantation after 2010 was 53 (43–61) ( $P < 0,0001$ ). Time to first NMSC development is decreasing in later group. NMSC was observed in 5,3% of RTR who live along the Adriatic coast and in 7,3% of RTR who live in the continental part of Croatia; the difference is not statistically significant ( $P = 0,241$ ), nor is the time to first NMSC development between those two groups of patients ( $P=0,564$ ). Patients receiving more intense therapy (which includes 3 immunosuppressive agents) did not develop more NMSC then patients receiving only 2 immunosuppressive agents (6,64% compared to 8,42 %) ( $P=0,556$ ). There was significant difference in the incidence of

NMSC between the groups of patients treated with different immunosuppressive agents; 3,1% of patients receiving tacrolimus developed NMSC which is significantly lower than 14,3% of NMSC among patients receiving cyclosporinA ( $P < 0,0001$ ). In addition, 5,9% of patients receiving mycophenolat mofetil and 15,8% of patients receiving azathioprine developed NMSC ( $P = 0,001$ ).

Immunohistochemical staining to Wnt4 antibody revealed cytoplasmic staining in NMSC cells and in the healthy tissue. Wnt4 staining was weaker in BCC and SCC when compared to the healthy skin ( $p < 0,0001$ ), pointing to influence of Wnt signaling in initial NMSC carcinogenesis. The difference between Wnt4 staining in RTR compared to control group indicates possible activation of different Wnt signaling pathways in carcinogenesis or coactivation of another Wnt ligands in the NMSC progression. However, the role of immunosuppression in Wnt4 expression and activation was not completely made clear.

Our results indicate RTRs as a high-risk group for NMSC development. Therefore, patients should undergo a dermatological skin examination prior to transplantation as well as regular dermatological follow up after transplantation considering the guidelines and risk factors for each individual patient.

## 10. LITERATURA

1. Levell NJ, Igali L, Wright KA, Greenberg DC. Basal cell carcinoma epidemiology in the UK: the elephant in the room. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38(4):367-369. doi: 10.1111/ced.12016
2. Kaldor J, Shugg D, Young B, Dwyer T, Wang YG. Non – melanoma skin cancer: ten years of cancer-registry-based surveillance. *Int J Cancer*. 1993;53(6):886-91.
3. Holm AS, Nissen CV, Wulf HC. Basal cell carcinoma is as common as the sum of all other cancers: implications for treatment capacity. *Acta Derm Venereol*. 2016 May;96(4):505-509. doi: 10.2340/00015555-2282.
4. de Vries E, Micallef R, Brewster DH, Gibbs JH, Flohil SC, Saksela O. Population-based estimates of the occurrence of multiple vs first primary basal cell carcinomas in 4 European regions. *Arch Dermatol*. 2012;148(3):347-54. doi: 10.1001/archdermatol.2011.2244.
5. Wu X, Elkin EE, Marghoob AA. Burden of basal cell carcinoma in USA. *Future Oncol*. 2015;11(22):2967-2974. doi: 10.2217/fon.15.180.
6. Celić D, Lipozencić J, Jurakić Tončić R, Ledić-Drvar D, Marasović D, Puizina-Ivić N i sur. The incidence of basal cell carcinoma in Croatia: an epidemiological study. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2009;17(2):108-112.
7. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol*. 2000;136(12):1524-30.
8. Katalinic A, Kunze U, Schäfer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol*. 2003;149(6):1200-6.
9. Qureshi AA, Wei-Passanese EX, Li T, Han J. Host risk factors for the development of multiple non-melanoma skin cancers. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(5):565-70. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04483.x.
10. Flohil SC, Seubring I, van Rossum MM, Coebergh JW, De Vries E, Nijsten T. Trends in basal cell carcinoma incidence rates: a 37-year Dutch observational study. *J Invest Dermatol*. 2013;133:913–8. doi: 10.1038/jid.2012.431.

11. Wehner MR, Shive ML, Chren MM, Han J, Qureshi AA, Linos E. Indoor tanning and non-melanoma skin cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012;345:e5909.
12. Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, i sur. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci*. 2014;21(1):28-31. doi: 10.5214/ans.0972.7531.210109.
13. Toftgård R. Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(12):1720-31. doi: 10.1007/PL00000654.
14. Soufir N, Gerard B, Portela M, Brice A, Liboutet M, Saiag P, i sur. PTCH mutations and deletions in patients with typical nevoid basal cell carcinoma syndrome and in patients with a suspected genetic predisposition to basal cell carcinoma: a French study. *Br J Cancer*. 2006;95(4):548-53. doi: 10.1038/sj.bjc.6603303.
15. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, i sur. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005;152(1):43-51. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06353.x.
16. Huang YS, Bu DF, Li XY, Ma ZH, Yang Y, Lin ZM, i sur. Unique features of PTCH1 mutation spectrum in Chinese sporadic basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(2):235-41. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04453.x.
17. Bonifas JM. Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol*. 2001;116:739-742. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01315.x.
18. El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, Poulson R, Fallowfield M. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2003;148(5):964-70.
19. Li J, Ji L, Chen J, Zhang W, Ye Z. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway in skin carcinogenesis and therapy. *Biomed Res Int*. 2015;2015:964842. doi: 10.1155/2015/964842.
20. Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res*. 2005;571(1-2):19-31. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.057
21. Beani JC. Ultraviolet A-induced DNA damage: role in skin cancer. *Bull Acad Natl Med*. 2014;198(2):273-95.

22. Rass K, Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2008;624:162-78. doi: 10.1007/978-0-387-77574-6\_13.
23. Yu SH, Bordeaux JS, Baron ED. The immune system and skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;810:182-91.
24. Silverberg MJ, Leyden W, Warton EM, Quesenberry CP Jr, Engels EA, Asgari MM. HIV infection status, immunodeficiency, and the incidence of non-melanoma skin cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(5):350-60. doi: 10.1093/jnci/djs529.
25. Zhao H, Shu G, Wang S. The risk of non-melanoma skin cancer in HIV-infected patients: new data and meta-analysis. *Int J STD AIDS.* 2016;27(7):568-75. doi: 10.1177/0956462415586316.
26. Dourmishev LA, Rusinova D, Botev I. Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma. *Indian Dermatol Online J.* 2013;4(1):12-7. doi: 10.4103/2229-5178.105456.
27. Soyer PH, Darrell S, Rigel DS, Wurm EMT. Actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. U: Bologna AL, Jorizzo JL, Schaffer JC ur. *Dermatology* 3. izd: Elsevier Ltd; 2012. Str. 1773-1795.
28. França K, Alqubaisy Y, Hassanein A, Nouri K, Lotti T. Histopathologic pitfalls of Mohs micrographic surgery and a review of tumor histology. *Wien Med Wochenschr.* 2018;168(9-10):218-227. doi:10.1007/s10354-016-0528-0.
29. Madan V, Lear JT. Basal cell carcinoma. U: Griffiths CEM, Barker J, Bleiker T, Chalmers R, Creamer D, ur. *Rook's textbook of dermatology* 9.izd. Chichester UK etc.: Blackwell publishing Ltd; 2016.
30. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2017 Jan;7(Suppl 1):5-19. doi: 10.1007/s13555-016-0165-y.
31. Scalvenzi M, Lembo S, Francia MG, Balato A. Dermoscopic patterns of superficial basal cell carcinoma. *Int J Dermatol.* 2008 Oct;47(10):1015-8. doi: 10.1111/j.1365-4632.2008.03731.x.
32. Puig S, Cecilia N, Malvehy J. Dermoscopic criteria and basal cell carcinoma. *G Ital Dermatol Venereol.* 2012 Apr;147(2):135-40.



33. Newlands C, Currie R, Memon A, Whitaker S, Woolford T. Non-melanoma skin cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol*. 2016 May;130(Suppl 2):S125-132. doi: 10.1017/S0022215116000554.
34. Marzuka AG, Book SE. Basal Cell Carcinoma: Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Features, Diagnosis, Histopathology, and Management. *Yale J Biol Med*. 2015 Jun; 88(2): 167–179.
35. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti A, Gollnick SO, Hahn SM, et al. Photodynamic therapy of cancer – an update. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(4): 250–281. doi:10.3322/caac.20114.NIH-PA.
36. Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, Zamarrón A, González S, Juarranz A, Gilaberte Y. Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(10): 25912-25933. doi:10.3390/ijms161025912.
37. Blixt E, Nelsen D, Stratman E. Recurrence rates of aggressive histologic types of basal cell carcinoma after treatment with electrodesiccation and curettage alone. *Dermatol Surg*. 2013 May;39(5):719-25. doi: 10.1111/dsu.12122.
38. Dummer R, Urosevic M, Kempf W, Hoek K, Hafner J, Burg G. Imiquimod in basal cell carcinoma: how does it work?. *Br J Dermatol*. 2003 Nov;149 Suppl 66:57-8.
39. Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, Williams HC. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jan 24;(1):CD003412.
40. Sloan KB, Sherertz EF, McTiernan RG. The effect of 5-fluorouracil on inhibition of epidermal DNA synthesis in vivo: a comparison of the effect of formulations and a prodrug of 5-FU. *Arch Dermatol Res*. 1990;282(7):484-6.
41. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2012 Jun 7;366(23):2171-9. doi: 10.1056/NEJMoa1113713.
42. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol*. 1989 Mar;15(3):315-28.
43. Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*. 2006 Jan 2;184(1):6-10.

44. Callens J, Van Eycken L, Henau K, Garmyn M. Epidemiology of basal and squamous cell carcinoma in Belgium: the need for a uniform and compulsory registration. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Nov;30(11):1912-1918. doi: 10.1111/jdv.13703.
45. Brewster DH, Bhatti LA, Inglis JH, Nairn ER, Doherty VR. Recent trends in incidence of nonmelanoma skin cancers in the East of Scotland, 1992-2003. *Br J Dermatol*. 2007 Jun;156(6):1295-300. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07892.x
46. Plesko I, Severi G, Obsitníková A, Boyle P. Trends in the incidence of non-melanoma skin cancer in Slovakia, 1978-1995. *Neoplasma*. 2000;47(3):137-42.
47. Kraljik N, Rosso M, Ageel A, Sepić T, Gmajnić R. The incidence of skin squamous cell carcinoma in Osijek-Baranja County-an epidemiological study. *Coll Antropol*. 2011 Sep;35 Suppl 2:77-80.
48. Celić D, Lipozencić J, Tončić RJ, Pasić A, Rados J, Puizina-Ivić N. Descriptive epidemiology of cutaneous squamous cell carcinoma in Croatia. *Coll Antropol*. 2012 Mar;36(1):133-7.
49. Rees JR, Zens MS, Celaya MO, Riddle BL, Karagas MR, Peacock JL. Survival after squamous cell and basal cell carcinoma of the skin: A retrospective cohort analysis. *Int J Cancer*. 2015 Aug 15;137(4):878-884. doi: 10.1002/ijc.29436.
50. Hussain SK, Sundquist J, Hemminki K. Incidence trends of squamous cell and rare skin cancers in the Swedish national cancer registry point to calendar year and age-dependent increases. *J Invest Dermatol*. 2010 May;130(5):1323-8. doi: 10.1038/jid.2009.426.
51. Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer-the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol*. 2008;624:89-103. doi: 10.1007/978-0-387-77574-6\_8.
52. Garcia-Zuazaga J, Olbricht SM. Cutaneous squamous cell carcinoma. *Adv Dermatol*. 2008;24:33-57.
53. Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ. Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation*. 2004;77(4):574-9.
54. Wei J, Kok LF, Byrne SN, Halliday GM. Photodamage: all signs lead to actinic keratosis and early squamous cell carcinoma. *Curr Probl Dermatol*. 2015;46:14-9. doi: 10.1159/000366531.

55. Einspahr JG, Calvert V, Alberts DS, Curiel-Lewandrowski C, Warneke J, Krouse R, i sur. Functional protein pathway activation mapping of the progression of normal skin to squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2012;5:403–13. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0427.
56. Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P, Sucker A, Kamsukom N, Jones R, i sur. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. *J Clin Oncol*. 2012 Jan 20;30(3):316-21. doi: 10.1200/JCO.2011.36.7680.
57. Kim DJ, Chan KS, Sano S, Digiovanni J. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2007 Aug;46(8):725-31. doi: 10.1002/mc.20342.
58. Wu J, Lu WY, Cui LL. Clinical significance of STAT3 and MAPK phosphorylation, and the protein expression of cyclin D1 in skin squamous cell carcinoma tissues. *Mol Med Rep*. 2015 Dec;12(6):8129-34. doi: 10.3892/mmr.2015.4460.
59. South AP, Purdie KJ, Watt SA, Haldenby S, den Breems N, Dimon M, i sur. NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *J Invest Dermatol*. 2014 Oct;134(10):2630-2638. doi: 10.1038/jid.2014.154. doi: 10.1038/jid.2014.154.
60. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, i sur. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 2008;452:650–3.
61. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, i sur. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10124-8.
62. Brash DE. UV signature mutations. *Photochem Photobiol*. 2015 Jan-Feb;91(1):15-26. doi: 10.1111/php.12377.
63. Hutchinson F. Induction of tandem-base change mutations. *Mutat Res*. 1994 Aug 1;309(1):11-5.
64. Soufir N, Molès JP, Vilmer C, Moch C, Verola O, Rivet J, i sur. P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. *Oncogene*. 1999 Sep 23;18(39):5477-81. doi: 10.1038/sj.onc.1202915.
65. Mattos MSG, Oliveira WR, Sotto MN. Comparative study of p16 protein expression in squamous cell carcinomas from patients with epidermodysplasia

- verruciformis and patients without the disease. *Arch Dermatol Res.* 2017 Apr 24. doi: 10.1007/s00403-017-1742-3.
66. Marinescu A, Stepan AE, Mărgăritescu C, Marinescu AM, Zăvoi RE, Simionescu CE, i sur. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(2 Suppl):691-696.
  67. Salopek KM, Jukić S, Babić D. Correlation of the HPV detection, protein expression and DNA content in cutaneous pre-invasive and invasive carcinoma among Croatian patients. *Exp Mol Pathol.* 2017 Feb;102(1):123-127. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.01.010.
  68. Zavos G, Karidis NP, Tsouroufflis G, Bokos J, Diles K, Sotirchos G, i sur. Nonmelanoma skin cancer after renal transplantation: a single-center experience in 1736 transplantations. *Int J Dermatol.* 2011;50(12):1496-50. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.04939.x.
  69. Berg D, Otley CC. Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47(1):1-17.
  70. Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Impact of the HIV infection on skin cancers. *Rev Med Liege.* 2009 Jan;64(1):37-40.
  71. Wilkins K, Turner R, Dolev JC, LeBoit PE, Berger TG, Maurer TA. Cutaneous malignancy and human immunodeficiency virus disease. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Feb;54(2):189-206. doi: 10.1016/j.jaad.2004.11.060.
  72. Yanofsky VR, Mercer SE, Phelps RG. Histopathological variants of cutaneous squamous cell carcinoma: a review. *J Skin Cancer.* 2011;2011:210813. doi: 10.1155/2011/210813.
  73. Rossi M, Mori M, Lotti T. Actinic keratosis. *Int J Dermatol.* 2007;46(9):895-904.
  74. Gupta G, Madan V, Lear JT. Squamous cell carcinoma and its precursors. U: Griffiths CEM, Barker J, Bleiker T, Chalmers R, Creamer D, ur. *Rook's textbook of dermatology 9.izd.* Chichester UK etc.: Blackwell publishing Ltd; 2016.
  75. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Röcken M, Breuninger H. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2008 Aug;9(8):713-20. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70178-5.
  76. Warszawik-Hendzel O, Olszewska M, Maj M, Rakowska A, Czuwara J, Rudnicka L. Non-invasive diagnostic techniques in the diagnosis of squamous

- cell carcinoma. *J Dermatol Case Rep.* 2015 Dec 31;9(4):89-97. doi: 10.3315/jdcr.2015.1221.
77. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, del Marmol V, Pehamberger H, i sur. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer.* 2015 Sep;51(14):1989-2007. doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.110.
  78. Palyca P, Koshenkov VP, Mehnert JM. Developments in the treatment of locally advanced and metastatic squamous cell carcinoma of the skin: a rising unmet need. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014:397-404. doi: 10.14694/EdBook\_AM.2014.34.e397.
  79. Firnhaber JM. Diagnosis and treatment of basal cell and squamous cell carcinoma. *Am Fam Physician.* 2012 Jul 15;86(2):161-8.
  80. Hofbauer G, Anliker M, Boehncke WH, Brand C, Braun R, Gaide O, i sur. Swiss clinical practice guidelines on field cancerization of the skin. *Swiss Med Wkly.* 2014 Dec 24;144:w14026. doi: 10.4414/smw.2014.14026. eCollection 2014.
  81. Zwald F, Leitenberger J, Zeitouni N, Soon S, Brewer J, Arron S, i sur. Recommendations for solid organ transplantation for transplant candidates with a pretransplant diagnosis of cutaneous squamous cell carcinoma, Merkel cell carcinoma and melanoma: a consensus opinion from the International Transplant Skin Cancer Collaborative (ITSCC). *Am J Transplant.* 2016 Feb;16(2):407-13. doi: 10.1111/ajt.13593.
  82. Cabete J; Rafael M, Cravo M; Moura C; Sachse F, Pecegueiro M. Long-term recurrence of nonmelanoma skin cancer after topical methylaminolevulinate photodynamic therapy in a dermatology department. *An Bras Dermatol* 2015; 90: 846–850. doi: 10.1590/abd1806-4841.20154080.
  83. Cohen DK, Lee PK. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancers. *Cancers (Basel).* 2016 Oct 4;8(10):90. doi:10.3390/cancers8100090.
  84. Morton C, Horn M, Leman J, Tack B, Bedane C, Tjioe M, Ibbotson, i sur. Comparison of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy with cryotherapy or fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma in situ—Results of a multicenter randomized trial. *Arch. Dermatol.* 2006; 142:729–735. doi:10.1001/archderm.142.6.729.

85. Gaffney DC, Soyer HP, Simpson F. The epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma: An emerging drug target. *Australas J Dermatol*. 2014 Feb;55(1):24-34. doi: 10.1111/ajd.12025.
86. Soura E, Chasapi V, Stratigos AJ. Pharmacologic treatment options for advanced epithelial skin cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(10):1479-93. doi: 10.1517/14656566.2015.1052743.
87. Maubec E, Petrow P, Scheer-Senyarich I, Duvillulard P, Lacroix L, Certain JG, i sur. Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin. *J Clin Oncol*. 2011; 29:3419–3426. doi: 10.1200/JCO.2010.34.1735.
88. Uribe P, Gonzalez S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract*. 2011 Jun 15;207(6):337-42. doi: 10.1016/j.prp.2011.03.002.
89. Harwood CA, Proby CM, Inman GJ, Leigh IM. The promise of genomics and the development of targeted therapies for cutaneous squamous cell carcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2016 Jan;96(1):3-16. doi: 10.2340/00015555-2181.
90. Wang NJ, Sanborn Z, Arnett KL, Bayston LJ, Liao W, Proby CM, i sur. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 25;108(43):17761-6. doi: 10.1073/pnas.1114669108.
91. Lansbury L, Bath-Hextall F, Perkins W, Stanton W, Leonardi-Bee J. Interventions for non-metastatic squamous cell carcinoma of the skin: systematic review and pooled analysis of observational studies. *BMJ*. 2013 Nov 4;347:f6153. doi: 10.1136/bmj.f6153.
92. De Nicola L, Minutolo R. Worldwide growing epidemic of CKD: fact or fiction?. *Kidney Int*. 2016 Sep;90(3):482-4. doi: 10.1016/j.kint.2016.05.001.
93. Barzegar H, Moosazadeh M, Jafari H, Esmaeili R. Evaluation of dialysis adequacy in hemodialysis patients: A systematic review. *Urol J*. 2016 Aug 25;13(4):2744-9.
94. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, i sur. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int*. 2011 Jul;80(1):17-28. doi: 10.1038/ki.2010.483.

95. Dhondup T, Qian Q. Electrolyte and acid-base disorders in chronic kidney disease and end-stage kidney failure. *Blood Purif.* 2017;43(1-3):179-188. doi: 10.1159/000452725.
96. Kes P. What do we know about chronic kidney disease at the beginning of the 21st century? *Acta Med Croat.* 2014 Apr;68(2):75-7.
97. Slinin Y, Greer N, Ishani A, MacDonald R, Olson C, Rutks I, i sur. Timing of dialysis initiation, duration and frequency of hemodialysis sessions, and membrane flux: a systematic review for a KDOQI clinical practice guideline. *Am J Kidney Dis.* 2015 Nov;66(5):823-36. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.11.031.
98. Chau EM, Manns BJ, Garg AX, Sood MM, Kim SJ, Naimark D, i sur. Canadian Kidney Knowledge Translation and Generation Network (CANN-NET). Knowledge translation interventions to improve the timing of dialysis initiation: protocol for a cluster randomized trial. *Can J Kidney Health Dis.* 2016 Sep 14;3:1-11. doi: 10.1177/2054358116665257.
99. Sinnakirouchenan R, Holley JL. Peritoneal dialysis versus hemodialysis: risks, benefits, and access issues. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011 Nov;18(6):428-32. doi: 10.1053/j.ackd.2011.09.001.
100. Bašić–Jukić N. Primatelj bubrega U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. ur. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. Str. 103-115.
101. Kaštelan Ž, Hudolin T: Kirurški principi nefrektomije kod umrlog darovatelja bubrega. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. ur. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. Str. 116-131.
102. Žunec R: Imunobiologija transplantacije, U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. ur. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. Str. 21-34.
103. Goto N, Okada M, Yamamoto T, Tsujita M, Hiramitsu T, Narumi S, i sur. Association of dialysis duration with outcomes after transplantation in a Japanese cohort. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016 Mar 7;11(3):497-504. doi: 10.2215/CJN.08670815.
104. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, i sur. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999; 341:1725–1730.
105. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G, Vanholder R for (ERBP) Work Group on kidney transplantation. Endorsement of the Kidney Disease Improving

- Global Outcomes(KDIGO) guidelines on kidney transplantation: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26: 2099–2106. doi: 10.1093/ndt/gfr169.
106. Ferreira FR, Ogawa MM, Nascimento LF, Tomimori J. Epidemiological profile of nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients: experience of a referral center. *Ann Bras Dermatol*. 2014;89(5):745-50.
  107. Hofbauer GF, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S. Organ transplantation and skin cancer: basic problems and new perspectives. *Exp Dermatol*. 2010;19(6):473-82. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01086.x.
  108. Forchetti G, Suppa M, Del Marmol V. Overview on non-melanoma skin cancers in solid organ transplant recipients. *G Ital Dermatol Venereol*. 2014;149(4):383-7.
  109. Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C. Comparative epidemiologic study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33(2 Pt 1):222-9.
  110. Bernat García J, Morales Suárez-Varela M, Vilata JJ, Marquina A, Pallardó L, Crespo J. Risk factors for non-melanoma skin cancer in kidney transplant patients in a Spanish population in the Mediterranean region. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(4):422-427.
  111. Fuente MJ, Sabat M, Roca J, Lauzurica R, Fernández-Figueras MT, Ferrándiz CA. Prospective study of the incidence of skin cancer and its risk factors in a Spanish Mediterranean population of kidney transplant recipients. *Br J Dermatol*. 2003;149(6):1221-6.
  112. Thurot-Guillou C, Templier I, Janbon B, Pinel N, Beani JC, Leccia MT. Dermatologic follow-up and evaluation of skin tumours in renal transplant patients. *Ann Dermatol Venereol*. 2007;134(1):39-44.
  113. O'Reilly Zwald F, Brown M. Skin cancer in solid organ transplant recipients: Advances in therapy and management. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(2):253-61. doi: 10.1016/j.jaad.2010.11.063.
  114. Rodríguez-Acosta ED, Calva-Mercado JJ, Alberú-Gómez J, Vilatoba-Chapa M, Domínguez-Cherit J. Patients with solid organ transplantation and skin cancer: determination of risk factors with emphasis in photoexposure and immunosuppressive regimen. Experience in a third level hospital. *Gac Med Mex*. 2015;151(1):20-6.



115. Han W, Soltani K, Ming M, He YY. Deregulation of XPC and CypA by cyclosporin A: an immunosuppression-independent mechanism of skin carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Sep;5(9):1155-62. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0185-T.
116. Ming M, Zhao B, Qiang L, He YY. Effect of immunosuppressants tacrolimus and mycophenolate mofetil on the keratinocyte UVB response. *Photochem Photobiol*. 2015 Jan-Feb;91(1):242-7. doi: 10.1111/php.12318.
117. Otley CC, Maragh SL. Reduction of immunosuppression for transplant-associated skin cancer: rationale and evidence of efficacy. *Dermatol Surg*. 2005;31:163–168.
118. Shah P, He YY. Molecular regulation of UV-induced DNA repair. *Photochem Photobiol*. 2015 Mar-Apr;91(2):254-64. doi: 10.1111/php.12406.
119. Voskamp P, Bodmann CA, Koehl GE, Rebel HG, Van Olderen MG, Gaumann A, i sur. Dietary immunosuppressants do not enhance UV-induced skin carcinogenesis, and reveal discordance between p53-mutant early clones and carcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013 Feb;6(2):129-38. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0361.
120. de Gruijl FR. p53 mutations as a marker of skin cancer risk: comparison of UVA and UVB effects. *Exp Dermatol*. 2002;11(Suppl 1):37-9.
121. Perrett CM, Walker SL, O'Donovan P, Warwick J, Harwood CA, Karran P, i sur. Azathioprine treatment photosensitizes human skin to ultraviolet A radiation. *Br J Dermatol*. 2008;159(1):198-204. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08610.x.
122. Attard NR, Karran P. UVA photosensitization of thiopurines and skin cancer in organ transplant recipients. *Photochem Photobiol Sci*. 2012 Jan;11(1):62-8. doi: 10.1039/c1pp05194f.
123. Brem R, Karran P. Multiple forms of DNA damage caused by UVA photoactivation of DNA 6-thioguanine. *Photochem Photobiol*. 2012 Jan-Feb;88(1):5-13. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01043.x.
124. Hofbauer GF, Attard NR, Harwood CA, McGregor JM, Dziunycz P, Iotzova-Weiss G, i sur. Reversal of UVA skin photosensitivity and DNA damage in kidney transplant recipients by replacing azathioprine. *Am J Transplant*. 2012 Jan;12(1):218-225. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03751.x.
125. Thoms KM, Kuschal C, Oetjen E, Mori T, Kobayashi N, Laspe P, i sur. Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair mediated by calcineurin:

- implications for tumorogenesis under immunosuppression. *Exp Dermatol*. 2011 Mar;20(3):232-6. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01213.x.
126. Wulff BC, Kusewitt DF, VanBuskirk AM, Thomas-Ahner JM, Duncan FJ, Oberyshyn TM. Sirolimus reduces the incidence and progression of UVB-induced skin cancer in SKH mice even with co-administration of cyclosporine A. *J Invest Dermatol*. 2008 Oct;128(10):2467-73. doi: 10.1038/jid.2008.121.
  127. Duncan FJ, Wulff BC, Tober KL, Ferketich AK, Martin J, Thomas-Ahner JM, et al. Clinically relevant immunosuppressants influence UVB-induced tumor size through effects on inflammation and angiogenesis. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2693-703. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02004.x.
  128. Geissler EK. Skin cancer in solid organ transplant recipients: are mTOR inhibitors a game changer? *Transplant Res*. 2015;4:1-6. doi: 10.1186/s13737-014-0022-4.
  129. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*. 2002;3(1): reviews3001.1-3001.15.
  130. Corda G, Sala A. Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. *Oncogenesis*. 2017 Jul 24;6(7):e364. doi: 10.1038/oncsis.2017.69.
  131. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008 Jul;40(7):577-94.
  132. Sokol SY. Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Jun;42:78-85. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.05.002.
  133. Jussila M, Ciruna B. Zebrafish models of non-canonical Wnt/planar cell polarity signalling: fishing for valuable insight into vertebrate polarized cell behavior. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2017 May;6(3). doi: 10.1002/wdev.267.
  134. Hikasa H, Sokol SY. Wnt Signaling in Vertebrate Axis Specification. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013Jan;5(1):a007955. doi: 10.1101/cshperspect.a007955.
  135. Brunt L, Scholpp S. The function of endocytosis in Wnt signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2018; 75(5): 785–795. doi: 10.1007/s00018-017-2654-2.
  136. Yang Y, Mlodzik M. Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt). *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31:623-46. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125315.

137. Wang HY. WNT-frizzled signaling via cyclic GMP. *Front Biosci.* 2004 May 1;9:1043-7.
138. Kühl M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci.* 2004 Jan 1;9:967-74.
139. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008 Apr-Jun; 4(2): 68–75.
140. Yu J, Virshup DM. Updating the Wnt pathways. *Biosci Rep.* 2014;34(5), 593-607. doi: 10.1042/BSR20140119.
141. Virshup DM. Moving upstream in the war on WNTs. *J Clin Invest.* 2015 Mar 2;125(3):975-7. doi: 10.1172/JCI80819.
142. Ramakrishnan AB, Cadigan KM. Wnt target genes and where to find them. *F1000Res.* 2017;6:746. doi: 10.12688/f1000research.11034.1. eCollection 2017.
143. Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep.* 2005 Dec;14(6):1583-8.
144. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 1991;66:589–600.
145. Brantjes H, Barker N, van Es J, Clevers H. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol Chem.* 2002 Feb;383(2):255-61.
146. Wend P, Holland JD, Ziebold U, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Oct;21(8):855-63. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.09.004.
147. Katoh M, Katoh M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *Int J Mol Med.* 2017 Sep;40(3):587-606. doi: 10.3892/ijmm.2017.3071.
148. Chiurillo MA. Role of the Wnt/b-catenin pathway in gastric cancer: An indepth literature review. *World J Exp Med.* 2015 May 20; 5(2): 84-102. doi: 10.5493/wjem.v5.i2.84.
149. Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene.* 2010 Apr 8;29(14):2036-4638. doi: 10.1038/onc.2009.496.

150. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookmann–Amisshah N, Freeman A, Nariculam J, i sur. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene*. 2007;26(45): 6560-6565. doi: 10.1038/sj.onc.1210472.
151. Jin J, Zhan P, Kato M, Kobayashi SS, Phan K, Qian H, i sur. Prognostic significance of  $\beta$ -catenin expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res*. 2017 Feb;6(1):97-108. doi: 10.21037/tlcr.2017.02.07.
152. Ting WC, Chen LM, Pao JB, Yang YP, You B, Chang TY, i sur. Common genetic variants in Wnt signaling pathway genes as potential prognostic biomarkers for colorectal cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013 [pristupljeno 04.05.2016.];8(2).e56196. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3566082/>.
153. Sherwood V, Leigh IM. WNT signaling in cutaneous squamous cell carcinoma: a future treatment strategy? *J Invest Dermatol*. 2016 Sep;136(9):1760-1767. doi: 10.1016/j.jid.2016.05.108.
154. Halifu Y, Liang JQ, Zeng XW, Ding Y, Zhang XY, Jin TB, i sur. Wnt1 and SFRP1 as potential prognostic factors and therapeutic targets in cutaneous squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res* [Internet]. 2016 Jun 20 [pristupljeno 20.03.2017.];15(2). doi: 10.4238/gmr.15028187. Dostupno na: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-2/pdf/gmr8187.pdf>.
155. Saitoh A, Hansen LA, Vogel JC, Udey MC. Characterization of Wnt gene expression in murine skin: possible involvement of epidermis-derived Wnt-4 in cutaneous epithelial-mesenchymal interactions. *Exp Cell Res*. 1998 Aug 25;243(1):150-60.
156. Lyons JP, Mueller UW, Ji H, Everett C, Fang X, Hsieh JC, i sur. Wnt-4 activates the canonical beta – catenin – mediated Wnt pathway and binds Frizzled – 6 CRD: functional implications of Wnt/beta – catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2004 Aug 15;298(2):369-387.
157. Jääskeläinen M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Naillat F, Parviainen H, Anttonen M, Heikinheimo M, i sur. WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Apr 12;317(1-2):106-11. doi: 10.1016/j.mce.2009.11.013.

158. Prunskaitė-Hyyryläinen R, Shan J, Railo A, Heinonen KM, Miinalainen I, Yan W, i sur. Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimüllerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle. *FASEB J.* 2014 Apr;28(4):1568-81. doi: 10.1096/fj.13-233247.
159. Wang G, Zhang Z, Chen C, Zhang Y, Zhang C. Dysfunction of WNT4/WNT5A in deciduas: possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia. *J Hypertens.* 2016 Apr;34(4):719-27. doi: 10.1097/HJH.0000000000000851.
160. Rajaram RD, Buric D, Caikovski M, Ayyanan A, Rougemont J, Shan J, i sur. Progesterone and Wnt4 control mammary stem cells via myoepithelial crosstalk. *EMBO J.* 2015 Mar 4;34(5):641-52. doi: 10.15252/emboj.201490434.
161. Vouyovitch CM, Perry JK, Liu DX, Bezin L, Vilain E, Diaz JJ, i sur. WNT4 mediates the autocrine effects of growth hormone in mammary carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer.* 2016 Jul;23(7):571-85. doi: 10.1530/ERC-15-0528.
162. Muenst S, Mechera R, Däster S, Piscuoglio S, Ng CKY, Meier-Abt F, Weber WP, Soysal SD. Pregnancy at early age is associated with a reduction of progesterone-responsive cells and epithelial Wnt signaling in human breast tissue. *Oncotarget.* 2017 Apr;8(14):22353-22360. doi:10.18632/oncotarget.16023.
163. Sikora MJ, Jacobsen BM, Levine K, Chen J, Davidson NE, Lee AV, i sur. WNT4 mediates estrogen receptor signaling and endocrine resistance in invasive lobular carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res [Internet].* 2016 Sep 20 [pristupljeno: 12.12.2016.];18(1):92. doi: 10.1186/s13058-016-0748-7. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5028957/>.
164. Potok MA, Cha KB, Hunt A, Brinkmeier ML, Leitges M, Kispert A, i sur. WNT signaling affects gene expression in the ventral diencephalon and pituitary gland growth. *Dev Dyn.* 2008;237:1006–2. doi:10.1002/dvdy.21511.
165. Miyakoshi T, Takei M, Kajiya H, Egashira N, Takekoshi S, Teramoto A, i sur. Expression of Wnt4 in human pituitary adenomas regulates activation of the beta-catenin-independent pathway. *Endocr Pathol.* 2008 Winter;19(4):261-73. doi: 10.1007/s12022-008-9048-9.
166. Li W, Zhang Y, Zhang M, Huang G, Zhang Q. Wnt4 is overexpressed in human pituitary adenomas and is associated with tumor invasion. *J Clin Neurosci.* 2014 Jan;21(1):137-41. doi: 10.1016/j.jocn.2013.04.034.

167. Chen Y, Liu X, Liu Y, Wang Y, Wang H, Lu C, i sur. Decreased Wnt4 expression inhibits thymoma development through downregulation of FoxN1. *J Thorac Dis.* 2017 Jun;9(6):1574-1583. doi: 10.21037/jtd.2017.05.28.
168. Arya M, Thrasivoulou C, Henrique R, Milar M, Hamblin R, Davda R, i sur. Targets of wnt/ $\beta$ -catenin transcription in penile carcinoma. *PLoS One.* 2015;10(4):1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0124395.
169. Markešić R, Kusanović J, Crkvenčić B. Upravno-teritorijani ustroj. U: *Ostroški Lj. ur. Statistički ljetopis Republike Hrvatske.* Zagreb: Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske; 2012. Str. 53-70.
170. Sułowicz J, Wojas-Pelc A, Ignacak E, Betkowska-Prokop A, Kuzniewski M, Sułowicz W. Risk factors of non melanoma skin cancers in kidney transplant patients. *Przegl Lek.* 2014;71(1):19-25.
171. Ramsay HM, Fryer AA, Reece S, Smith AG, Harden PN. Clinical risk factors associated with nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis.* 2000 Jul;36(1):167-76.
172. Carroll RP, Ramsay HM, Fryer AA, Hawley CM, Nicol DL, Harden PN. Incidence and prediction of nonmelanoma skin cancer post-renal transplantation: a prospective study in Queensland, Australia. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(3):676-83.
173. Görig T, Diehl K, Greinert R, Breitbart EW, Schneider S. Prevalence of sun-protective behaviour and intentional sun tanning in German adolescents and adults: results of a nationwide telephone survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;32:225-235. doi: 10.1111/jdv.14376.
174. Cardoso F, Mesquita GV, Campelo V, Martins MDCCE, Almeida CAPL, Rabelo RS, i sur. Prevalence of photoprotection and its associated factors in risk group for skin cancer in Teresina, Piauí. *An Bras Dermatol.* 2017 Mar-Apr;92(2):206-210. doi: 10.1590/abd1806-4841.20174831.
175. Pinault L, Fioletov V. Sun exposure, sun protection and sunburn among Canadian adults. *Health Rep.* 2017 May 17;28(5):12-19.
176. Karczewski M, Stronka M, Karczewski J, Wiktorowicz K. Skin cancer following kidney transplantation: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2011 Dec;43(10):3760-1. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.08.080.
177. Abou Ayache R, Thierry A, Bridoux F, Bauwens M, Belmouaz M, Desport E, i sur. Long-term maintenance of calcineurin inhibitor monotherapy reduces the

- risk for squamous cell carcinomas after kidney transplantation compared with bi- or tritherapy. *Transplant Proc.* 2007;39:2592-4.
178. Zilinska Z, Sersenova M, Chrastina M, Breza J Sr, Bena L, Baltsova T, i sur. Occurrence of malignancies after kidney transplantation in adults: Slovak multicenter experience. *Neoplasma.* 2017;64(2):311-317. doi: 10.4149/neo\_2017\_220.
179. Stasko T, Brown MD, Carucci JA, Euvrard S, Johnson TM, Sengelmann RD, i sur. Guidelines for the management of squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. *Dermatol Surg.* 2004;30(4 Pt 2):642-50.
180. Zaninović K, Gajić-Čapka M, Perčec Tadić M. ur. Climate atlas of Croatia 1961-1990, and 1971-2000. Meteorological and Hydrological Service of Croatia, Zagreb, Croatia; 2008. Str. 75-86.
181. Krásová M, Sečnicková Z, Göpfertová D, Hercogová J, Viklický O, Jůzlová K, i sur. Immunosuppressive therapy in the posttransplant period and skin cancer. *Dermatol Ther.* 2016 Nov;29(6):433-436. doi: 10.1111/dth.12379.
182. Campistol JM, Eris J, Oberbauer R, Friend P, Hutchison B, Morales JM, i sur. Sirolimus therapy after early cyclosporine withdrawal reduces the risk for skin cancer in adult renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:581-9.
183. Coghill AE, Johnson LG, Berg D, Resler AJ, Leca N, Madeleine MM. Immunosuppressive medications and squamous cell skin carcinoma: nested case-control study within the skin cancer after organ transplant (SCOT) cohort. *Am J Transplant.* 2016 Feb;16(2):565-73. doi: 10.1111/ajt.13596.
184. Tessari G, Naldi L, Boschiero L, Minetti E, Sandrini S, Nacchia F, i sur. Incidence of primary and second cancers in renal transplant recipients: a multicenter cohort study. *Am J Transplant.* 2013 Jan;13(1):214-21. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04294.x.
185. Hua JY, He YZ, Xu Y, Jiang XH, Ye W, Pan ZM. Emodin prevents intima thickness via Wnt4/Dvl-1/ $\beta$ -catenin signaling pathway mediated by miR-126 in balloon-injured carotid artery rats. *Exp Mol Med [Internet].* 2015 Jun 26 [pristupljeno: 12.12.2016.];47:e170. doi: 10.1038/emm.2015.36. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4491726/>.
186. Pourreyron C, Reilly L, Proby C, Panteleyev A, Fleming C, McLean K, i sur. Wnt5a is strongly expressed at the leading edge in non-melanoma skin cancer, forming active gradients, while canonical Wnt signalling is repressed. *PLoS One*

[Internet]. 2012 [pristupljeno 03.04.2018];7(2): e31827. doi: 10.1371/journal.pone.0031827. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384081>.

187. DO Carmo NG, Sakamoto LH, Pogue R, DO Couto Mascarenhas C, Passos SK, Felipe MS, i sur. Altered expression of PRKX, WNT3 and WNT16 in human nodular basal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2016 Sep;36(9):4545-51.



## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 08. kolovoza 1974. godine u Ogulinu. Osnovnu školu završila sam u Čakovcu, a srednju u Varaždinu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1992. godine, a diplomirala 1999. godine. Od 1995. godine do završetka studija bavila sam se znanstvenim radom u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, a 1997. godine nagrađena sam Rektorovom nagradom za najbolji studentski znanstveni rad.

Pripravnički staž obavila sam u Domu zdravlja Čakovec gdje sam radila do početka specijalizacije iz dermatovenerologije 2001. godine. Specijalistički ispit položila sam 2005. godine i od tada radim u dermatovenerološkoj ambulanti Županijske bolnice Čakovec.

Nakon završetka dodiplomskog studija i za vrijeme vrijeme specijalizacije u Klinici za dermatovenerologiju KBC Zagreb, odslušala sam i položila sve ispite na znanstvenom magistarskom studiju Medicinskog fakulteta te završila specijalistički stručni studij iz dermatovenerologije. 2014. godine upisala sam razlikovnu godinu znanstvenog doktorskog studija Medicinskog fakulteta, a 2015. godine prihvaćena mi je tema doktorske disertacije.

Na Sveučilištu u Varaždinu 2011. godine izabrana sam u nastavno zvanje asistenta, a 2018. godine reizabrana sam u nastavno zvanje predavač na Sveučilištu Sjever.

Do sada sam kao autor i koautor objavila 5 radova, od čega su dva indeksirana u Current Contents bazi podataka.

Sudjelovala sam na više stranih i domaćih kongresa i simpozija iz područja dermatovenerologije i temeljnih medicinskih znanosti, aktivno sa posterima, radovima i kongresnim sažecima te pasivno kao slušač.