

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

PETRA KOVAČEVIĆ

**EKSPRESIJSKI PROFIL MEGALINA, CUBILINA, CAVEOLINA-1, GIPC1 I
DAB2IP U RETINOBLASTOMU, UVEALNOM MELANOMU I ZDRAVOM
LJUDSKOM OKU**

DOKTORSKI RAD

SPLIT, 2026.

Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju

Laboratorij za istraživanje ranog razvoja čovjeka

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Katarini Vukojević, čija me stručnost, posvećenost i ljudskost nisu samo vodile kroz ovaj rad, već su me i oblikovale kao osobu. Njezina strast prema znanosti, podrška i vjera u mene bile su mi stalna inspiracija i motivacija da dam najbolje od sebe. Bila mi je istinski uzor i nepresušan izvor inspiracije.

Zahvaljujem i svim kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju na pomoći i podršci koja je ovaj proces učinila lakšim i ispunjenijim.

Posebnu i najdublju zahvalnost dugujem svojoj majci. Njezina bezuvjetna ljubav, snaga, strpljenje i vjera u mene bili su moj najveći oslonac kroz sve godine školovanja.

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
1.1. Anatomija oka	2
1.1.1. Pomoćni aparat oka	2
1.1.1.1. Vjeđe	2
1.1.1.2. Spojnica.....	3
1.1.1.3. Suzni aparat	3
1.1.1.4. Orbita.....	3
1.1.2. Očna jabučica	3
1.1.2.1. Vanjska očna ovojnica (lat. <i>tunica fibrosa bulbi</i>)	3
1.1.2.1.1. Bjeloočnica (lat. <i>sclera</i>)	4
1.1.2.1.2. Rožnica (lat. <i>cornea</i>).....	4
1.1.2.2. Srednja očna ovojnica (lat. <i>tunica vasculosa bulbi – Uvea</i>)	4
1.1.2.2.1. Šarenica (lat. <i>iris</i>).....	4
1.1.2.2.2. Cilijarno tijelo (lat. <i>corpus ciliare</i>)	4
1.1.2.2.3. Žilnica (lat. <i>choroidea</i>)	4
1.1.2.3. Unutarnja očna ovojnica (lat. <i>tunica interna bulbi</i>)	5
1.1.2.4. Prednji segment oka	6
1.1.2.5. Stražnji segment oka	7
1.2. Retinoblastom	8
1.2.1. Epidemiologija retinoblastoma.....	8
1.2.2. Patofiziologija retinoblastoma.....	8
1.2.3. Histopatološka struktura retinoblastoma	9
1.2.4. Klasifikacija retinoblastoma	10
1.2.5. Klinička slika retinoblastoma	11
1.2.6. Dijagnostika retinoblastoma	11
1.2.7. Diferencijalna dijagnoza retinoblastoma	11
1.2.8. Terapija retinoblastoma	12
1.3. Uvealni melanom	13
1.3.1. Epidemiologija uvealnog melanoma	14
1.3.2. Patofiziologija uvealnog melanoma	14
1.3.3. Histopatološka struktura uvealnog melanoma.....	16
1.3.4. Klasifikacija uvelanog melanoma	16
1.3.5. Klinička slika uvealnog melanoma.....	17

1.3.6.	Dijagnostika uvealnog melanoma	17
1.3.7.	Diferencijalna dijagnoza uvealnog melanoma	21
1.3.8.	Terapija uvealnog melanoma.....	22
1.3.9.	Proгноza uvealnog melanoma.....	27
1.4.	Ispitivni proteini	28
1.4.1.	LRP2 (Protein povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće 2) – megalin	29
1.4.2.	Cubilin	29
1.4.3.	Caveolin-1	29
1.4.4.	GIPC1 (GAIP-interagirajući protein, C-terminal 1).....	30
1.4.5.	DAB2IP (Protein koji interagira s Disabledhomologom 2)	30
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
2.1.	Cilj istraživanja	33
2.2.	Hipoteza	33
3.	MATERIJALI I METODE.....	34
3.1.	Uzorci tkiva i priprema	35
3.2.	Imunofluorescentno bojenje.....	36
3.3.	Prikupljanje podataka.....	41
3.4.	Analiza slike imunohistokemijskog bojanja	41
3.5.	Statistička analiza.....	44
3.6.	Transkriptomika	44
3.7.	Analiza diferencijalne genske ekspresije	46
4.	REZULTATI	49
4.1.	Histopatološke značajke retinoblastoma i podtipova koroidalnog melanoma.....	50
4.2.	Ekspresija LRP2 pokazuje žarišno očuvanje, ali ukupno kvantitativno smanjenje u svim podtipovima okularnih tumora	52
4.3.	Cubilin je izrazito povišen u miksoidnom melanomu, ali smanjen u retinoblastomu i epitelioidnom melanomu	55
4.4.	Ekspresija CAV1 varira između retinoblastoma i podtipova melanoma.....	57
4.5.	Ekspresija GIPC-1 značajno je smanjena u svim podtipovima okularnih tumora.....	59
4.6.	Ekspresija DAB2IP očuvana je u epitelioidnom melanomu, ali smanjena u retinoblastomu, miksoidnom melanomu i vretenastom melanomu	61
4.7.	Analize preživljenja	63
4.8.	Analiza diferencijalne genske ekspresije	65
4.9.	Multivarijatna Coxova regresijska analiza ekspresije gena i preživljenja u uvealnom melanomu	66

5. RASPRAVA.....	68
5.1. Pregled	69
5.2. Smanjena ekspresija LRP2/Megalina u okularnim tumorima	69
5.3. Podtip-specifični obrasci ekspresije CUBN.....	71
5.4. Kontekstualno ovisna ekspresija CAV1 kroz podtipove melanoma.....	72
5.5. Smanjena ekspresija GIPC1 i receptorni transport u okularnim tumorima	73
5.6. DAB2IP kao tumor supresor u okularnim malignitetima	75
5.7. Konceptualni pregled	76
5.8. Prognostičke povezanosti i transkriptomska validacija	77
5.9. Ograničenja studije i budući smjerovi istraživanja	79
6. ZAKLJUČCI.....	81
7. SAŽETAK	83
8. LAIČKI SAŽETAK.....	86
9. SUMMARY.....	88
10. LAY SUMMARY	91
11. LITERATURA	93
12. ŽIVOTOPIS.....	114

Popis oznaka i kratica

ONL – vanjski nuklearni sloj

OPL – vanjski pleksiformni sloj

INL – unutarnji nuklearni sloj

RCG – ganglijske stanice retine / retinalne ganglijske stanice

NFL – sloj živčanih vlakana

RPE – retinalni pigmentni epitel

RB – retinoblastom

CNS – središnji živčani sustav

MYCN – onkogen povezan s virusom mijelocitomatoze

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

miRNA – mikro-RNA

ICRB – Međunarodna klasifikacija retinoblastoma

IRSS – Međunarodni sustav stupnjevanja retinoblastoma

TNM – tumor, čvor, metastaza

MR – magnetska rezonancija

CT – kompjuterizirana tomografija

PHPV – perizistentni hiperplastični primarni vitreus

ROP – prematura retinopatija / retinopatija prematuriteta

UM – uvealni melanom

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza

NF- κ B – nuklearni faktor- κ B

TME – tumorsko mikrookruženje

AJCC – Američki zajednički odbor za tumore/rak

COMS – klinička klasifikacija kolaborativne studije uvealnog melanoma

TCGA – Atlas genoma tumora

OCT – optička koherentna tomografija

CTC – cirkulirajuće tumorske stanice

RNA – ribonukleinska kiselina

ctDNA – cirkulirajuća tumorska DNA

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta

PDT – fotodinamska terapija

TTT – transpupilarna termoterapija

TCR – T- stanični receptor
FDA – Američka agencija za hranu i lijekove
EMA – Europska agencija za lijekove
PDL-1 – programirani ligand smrti 1
ACT – adoptivne T-stanice
TIL – tumor-infiltrirajući hlimfociti
CAR – himerni antigenski receptori
GEP – genetsko profiliranje tumora
LRP2 – protein povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće 2–megalin
CUBN – kubilin
CAV – kaveolin
GIPC1 – GAIP-interagirajući protein, C-terminal 1
DAB2IP – protein koji interagira s Disabled-homologom 2
EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija
ERK – izvanstanična signalno regulirana kinaza
FFPE – formalinom fiksirano i parafinom uklopljeno (tkivo)
PBS – fosfatno puferirana fiziološka otopina
H&E – hematoksilin i eozin
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
SD – standarda devijacija
ANOVA – analiza varijance
GEPIA2 – Interaktivna analiza profiliranja ekspresije gena 2
OS – ukupno preživljenje
HR – omjer hazarda
GEPIA3 – Interaktivna analiza profiliranja ekspresije gena 3
GEO – Gene Expression Omnibus
CM – koroidalni melanom
CI – interval pouzdanosti
GDC – Zajednički genomske podaci / Zajednica genomske podatke
SHH – Sonic Hedgehog (signalni put)
PI3K-AKT – signalni put fosfoinozimid-3-kinaze i protein-kinaze B
AKT – protein-kinaza B

1. Uvod

1.1. Anatomija oka

Anatomija oka predstavlja iznimno složen i funkcionalno integriran sustav u kojem su optičke, vaskularne i neurološke komponente međusobno ovisne i čine ga jednim od najvažnijih organa ljudskog tijela (1).

Razumijevanje anatomije oka temelj je za interpretaciju patofizioloških mehanizama brojnih oftalmoloških bolesti, uključujući glaukom, ablaciju mrežnice, makularnu degeneraciju, uvealni melanom i retinoblastom, te predstavlja nužnu osnovu za znanstveno-istraživački i klinički rad (2-5).

Oko (lat. *bulbus oculi*) periferni je osjetni organ vida i sastavni dio vidnog sustava koji omogućuje pretvaranje svjetlosne energije u električne impulse, njihovu primarnu obradu te prijenos prema središnjem živčanom sustavu. Anatomija oka odlikuje se visokom razinom strukturne i funkcionalne organizacije, pri čemu je svaki anatomski sloj usko povezan s optičkim, metaboličkim i neurofiziološkim procesima koji omogućuju vid (1).

Očna jabučica smještena je u koštanoj šupljini koja se naziva orbita gdje je zaštićena koštanom strukturalom, masnim tkivom i pomoćnim aparatom oka. Prosječni anteroposteriorni promjer odraslog oka iznosi približno 24 mm, dok je masa oko 7 g (6).

Šest vanjskih očnih mišića u orbiti pričvršćeno je za oko omogućujući precizne pokrete oka i binokularnu koordinaciju. Njihova sinkronizirana funkcija omogućuje stereoskopski vid (7).

1.1.1. Pomoćni aparat oka

1.1.1.1. Vjeđe

Vjeđe (lat. *palpebrae*) prekrivaju oko s prednje strane, štiteći ga od vanjskih utjecaja, isušivanja i stranih tijela. Građene su u slojevima (lamelama), a sastoje se od gornje i donje vjeđe koje zatvaraju vjeđnu pukotinu (lat. *rima palpebrarum*) s tim da je gornja vjeđa znatno veća i pokretljivija od donje. Ako gledamo od površine prema unutra, anatomske strukture vjeđa čini koža bez potkožnog masnog tkiva, što joj daje veliku pokretljivost. Ispod kože nalazi se rahlo potkožno tkivo. Slijedi kružni mišić oka (lat. *m. orbicularis oculi*) čija je funkcija zatvaranje vjeđa, a inerviran je 7. moždanim živcem (lat. *n. facialis*). Ispod mišića nalazi se orbitalni septum, vezivna opna koja dijeli vjeđu od sadržaja orbite. Strukturu i čvrstoću vjeđama daju tarzalne ploče (lat. *tarsus*) građene od gustog vezivnog tkiva. Unutar tarzalnih ploča smještene su Meibomove žlijezde koje proizvode masnu komponentu suznoga filma. Na rubu vjeđa nalaze se trepavice (lat. *cilia*) koje imaju obrambenu ulogu štiteći oko od stranih tijela,

prašine i svijetlosti. Za podizanje gornje vjeđe odgovorni su mišići podizači (lat. *m. levator palpebrae superioris*) i Müllerov mišić. Funkcionalnu podjelu na prednji i stražji dio vjeđa čini siva linija (1).

1.1.1.2. Spojnica

Površina oka i unutarnja površina vjeđa prekrivene su prozirnou membranou koja se naziva spojnica (lat. *conjunctiva bulbi*). To je tanki sloj sluznice koji prekriva unutrašnju površinu vjeđa i prelazi na očnu jabučicu (1).

1.1.1.3. Suzni aparat

Suzni aparat oka (lat. *apparatus lacrimalis*) sustav je za proizvodnju (sekreciju) i odvodnju suza, ključan za vlaženje, zaštitu i ishranu rožnice. Sastoji se od suzne žlijezde (lat. *glandula lacrimalis*) smještene lateralno ispod vanjskog ruba obrve u orbiti te proizvodi vodenu komponentu suznog filma. Suze se treptanjem razlijevaju po oku, skupljaju u unutarnjem kutu te preko suznoga puta, kojega čine suzne točkice, suzni kanalići, suzna vrećica te nazolakrimalni kanal, otječu u donji nosni hodnik.

Suze podmazuju oko i sastoje se od tri sloja – lipidni, vodeni i mucinski sloj. Ova tri sloja zajedno, nazivaju se suzni film i njegova uloga je održavanje prozirnosti rožnice, vlaženje oka te antibakterijska zaštita (8, 9).

1.1.1.4. Orbita

Orbita je koštana šupljina omeđena čeonou, jagodičnou, nosnou kosti i gornjom čeljusti. Uloga joj je mehanička zaštita bulbusa (1).

1.1.2. Očna jabučica

Očna jabučica sastoji se od triju očnih ovojnica i unutarnjeg sadržaja. Ovojnice oka su vanjska, srednja i unutarnja (6).

1.1.2.1. Vanjska očna ovojnica (lat. *tunica fibrosa bulbi*)

Vanjska ovojnica oka građena je od vezivnog tkiva te sastoji se od prozirne rožnice i neprozirne bjeloočnice. Daje čvrstoću i oblik očnoj jabučici (1, 10).

1.1.2.1.1. Bjeloočnica (lat. *sclera*)

Bjeloočnica čini stražnjih pet šestina fibrozne ovojnice oka. Po svojoj građi je gusto kolegeno, vezivno tkivo s nepravilno raspoređenim vlaknima što joj osigurava otpornost na deformaciju. Debljina joj varira od 0.3 mm na ekvatoru do 1 mm u području stražnjeg pola. Na nju se hvataju vanjski mišići oka. Na stražnjem polu vidni živac (lat. *n. opticus*) perforira bjeloočnicu kroz rešetkastu strukturu laminu cribrozu (10).

1.1.2.1.2. Rožnica (lat. *cornea*)

Rožnica je prozirna, avaskularna struktura i čini prednju šestinu fibrozne ovojnice oka i ima ključnu ulogu u lomu zraka svjetlosti i refrakciji. Građena je od pet slojeva epitel, Bowmanova membrane, stroma, Descemetova membrane, endotel (11).

1.1.2.2. Srednja očna ovojnica (lat. *tunica vasculosa bulbi* – *Uvea*)

Srednja očna ovojnica vaskularne je građe i sastoji se od šarenice (lat. *iris*), zrakastog ili cilijarnog tijela (lat. *corpusculare*) i žilnice (lat. *choroidea*). Uloga joj je u ishrani oka i akomodaciji (1, 12).

1.1.2.2.1. Šarenica (lat. *iris*)

Šarenica je prednji obojeni dio uvee čija boja ovisi o količini i rasporedu melanina.

Sadrži dva mišića *m. sphincter pupille* (parasimpatička inervacija) i *m. dilatator pupille* (simpatička inervacija) koji šire (midrijaza) ili sužavaju (mioza) zjenicu kako bi kontrolirali količinu svjetlosti koja dopire do stražnjeg dijela oka (1).

1.1.2.2.2. Cilijarno tijelo (lat. *corpus ciliare*)

Cilijarno tijelo mišićna je struktura koja kontrolira oblik leće i omogućuje akomodaciju i proces prilagodbe oka na različite udaljenosti. Sastoji se od cilijarnog mišića (akomodacija) i cilijarnih nastavaka (lučenje očne vodice) (1, 13).

1.1.2.2.3. Žilnica (lat. *choroidea*)

Žilnica smještena između bjeloočnice i mrežnice bogato je prožeta krvnim žilama i tvori stražnji dio uvealnog trakta. Osim krvnih žila, žilnica sadrži i pigmentirane stanice (melanocita), mastocyte i mikroglijske stanice. Krvne žile žilnice potječu od dviju grana arterijeoftalmike: kratke stražnje cilijarne arterije te duge stražnje cilijarne arterije. Kratke stražnje cilijarne arterije opskrbljuju stražnji dio žilnice, dok duge cilijarne arterije opskrbljuju prednju žilnicu, cilijarno tijelo i šarenicu. Tu su tri krvožilna sloja i 85 % volumena krvi u oku. Prvi sloj je koriokapilaris sastavljen od širokih, ravnih kapilara s lumenima od 20 do 50 µm. Kapilare su raspoređene u obliku saća, građene od sloja endotelne stanice povezane tijesnim

spojevima. Drugi i treći krvožilni sloj žilnice čine srednji sloj arteriola i venula (Sattlerov sloj) te najdublji sloj koroidalnih krvnih žila (Hallerov sloj), koji se sastoji od velikih arterija dimenzija 40 do 90 μm i velikih vena dimenzija 20 do 100 μm . Troslojna koroidna vaskulatura sužava se u jedan sloj i opskrbljuje vanjske slojeve mrežnice kisikom i hranjivim tvarima. Pigmentne stanice melanociti apsorbiraju raspršenu svjetlost i sprječavaju refleksiju unutar oka. Osim vaskularne mreže i pigmentnih stanica, žilnica sadrži i vezivno tkivo, živčane niti i Bruchovu membranu koja odvaja žilnicu od pigmentnog epitela mrežnice. RPE i koriokapilaras usko su i funkcionalno povezani u transportu hranjivih tvari do RPE-a i fotoreceptora kroz fenestracije koriokapilarisa. Radi se o jedinstvenim strukturama nalik porama koje imaju dijafragmu te omogućuju pasivni transport tekućina i makromolekula što je ključno za opskrbu vanjske mrežnice hranjivim tvarima. Osim toga, to je i put za odvod otpadnih produkata fotoreceptora i RPE-a iz oka. Žilnica je bogato inervirana parasimpatičkim, simpatičkim i trigeminalnim senzornim živčanim vlaknima koja reguliraju koroidalni protok krvi (12).

1.1.2.3. Unutarnja očna ovojnica (lat. *tunica interna bulbi*)

Unutarnja očna ovojnica građena je od živčanog tkiva i sastoji se od mrežnice (retine) koja se dijeli na vidni dio i slijepi dio. Nastala iz mozga (diencephalon), neuroektodermalnog je podrijetla te je funkcionalna jedinica središnjeg živčanog sustava. Zahvaljujući fotoreceptorima omogućava pretvorbu svjetlosnog signala u živčani impuls. Neuroretina sadrži šest vrsta neuronskih stanica (dvije vrste fotoreceptora: čunjići i štapići; horizontalne, bipolarne, amakrine i ganglijske stanice) i tri vrste glijalnih stanica (Müller glija stanice, astrociti i mikroglija stanice) te naslanja se na pigmentni epitel čineći zajedno ono što nazivamo mrežnicom. Zahvaljujući unutarnjim i vanjskim krvno-retinalnim barijerama i intra-retinalnim spojevima, moguća je regulacija retinalnih izmjena s cirkulacijom i unutar same retine. Dvije vrste fotoreceptora imaju različitu funkciju. Štapići percipiraju crno-bijelo i omogućuju noćno gledanje. Čunjići percipiraju boje i pružaju središnji (detaljan) vid. Tanka je prozirna tunika, manja od 500 μm , kroz koju prosijava pigment i vaskulatura žilnice, u normalnim uvjetima ružičasto-narančastog izgleda i oblaže stražnji dio oka. Histološki je građena od deset slojeva: 1. sloj stanica pigmentnog epitela retine (RPE), 2. sloj fotoreceptora, 3. vanjska granična membrana, 4. sloj fotoreceptorskih jezgri ili vanjski nuklearni sloj (ONL), 5. vanjski pleksiformni sloj kojeg čine sinapse između fotoreceptora s bipolarnim i horizontalnim stanicama (OPL), 6. unutarnji nuklearni sloj koji je sloj jezgri horizontalnih, bipolarnih, amakrinih stanica i Müllerovih glija stanica (INL), 7. unutarnji pleksiformni sloj koji se sastoji od dendrita ganglijskih stanica i aksona bipolarnih stanica, 8. sloj ganglijskih stanica (RCG), 9.

sloj živčanih vlakana, koji čine aksoni ganglijskih stanica, okruženi glijalnim nastavcima koji tvore vidni živac (NFL), 10. unutarnja membrana limitans, sastavljena od unutarnjih izdanaka Müllerovih glija stanica i njihove bazalne membrane (ILM). Sloj stanica RPE sadrži pigmentne granule koje se prvenstveno sastoje od melanina, uz prisutnost lipofuscina kao produkta razgradnje fotoreceptorskih diskova. Mrežnica se proteže od ore serrata, sprijeda, do stražnjeg pola očne jabučice. Opskrbljuje se iz dva različita vaskularna sustava. Direktnu vaskularizaciju unutarnjih slojeva retine osigurava retinalna kapilarna mreža dok je indirektna vaskularizacija osigurana preko već opisane koroidalne mreže. Arterija centralis retine odnosno središnja retinalna arterija potječe iz unutarnje karotidne arterije. Nakon intraneuralnog toka ide duž donjeg ruba ovojnice vidnog živca i ulazi u oko kroz središte vidnog živca. Ulaskom u bulbus dijeli se na četiri završne grane: temporalnu i nazalnu te gornju i donju koje se dalje granaju na kolaterale daljnom diobom formirajući mrežu krvnih žila koje oblažu unutarnju površinu mrežnice (13).

1.1.2.4. Prednji segment oka

Prednja trećina očne jabučice naziva se prednji segment oka, a čini ga, uz već spomenutu konjunktivu, rožnicu, šarenicu i cilijarno tijelo, prednja očna sobica, zjenica, leća i stražnja očna sobica. Prednja očna sobica nalazi se iza rožnice. Zjenica je otvor u sredini šarenice koji se širi i sužava kako bi regulirao količinu svjetlosti koja ulazi u oko. Neposredno iza zjenice i šarenice nalazi se leća (lat. *lens crystallina*), prozirna bikovenksna struktura smještena ispred staklastog tijela. Ove komponente odgovorne su za lom zraka svjetlosti i regulaciju ulaza svjetlosti. Leća ne sadrži krvne žile i živce te se prehranjuje difuzijom iz očne vodice. Očnu vodicu proizvode cilijarni nastavci cilijarnog tijela kako bi se održao konstantan očni tlak. Cilijarni nastavci nalaze u stražnjoj očnoj sobici od kuda očna vodica kroz zjenicu ulazi u prednju očnu sobicu, a zatim odlazi iz oka kroz komorni kut (trabekularna mreža i Schlemmov kanal) u venski sustav. Leća je zonulama Zinni koje su pričvršćena na kapsulu, povezana je s cilijarnim mišićem koji upravlja njezinim oblikom i omogućuje joj promjenu jakosti (od oko +19 dioptrija u mirovanju do +33 dioptrija) u procesu zvanom akomodacija. Leća je okružena lećnom kapsulom koja ostaje na mjestu kada se leća ukloni tijekom operacije katarakte. Umjetna leća ugrađena pri operaciji katarakte smješta se unutar kapsule, na mjesto prirodne leće. Pomažući fokusirati svjetlost dok ulazi u oko, rožnica i leća imaju važnu ulogu u pružanju jasnog vida. Zapravo, 70 % snage fokusiranja oka dolazi od rožnice, a 30 % od leće (11, 14).

1.1.2.5. Stražnji segment oka

Stražnje dvije trećine očne jabučice čini stražnji segment oka. Anatomske strukture čine staklasto tijelo (lat. *corpus vitreum*), a želatinozna tvar ispunjava prostor između leće i mrežnice pružajući potporu i održavajući oblik oka. Svjetlost koju rožnica i leća fokusiraju u oko prolazi kroz staklasto tijelo na mrežnicu. Komponentne stražnjeg segmenta oka su i mrežnica i žilnica. Kao posebne strukture spominju se makula i vidni živac.

Makula ili žuta pjega (lat. *macula lutea retinae*) nalazi se na stražnjem dijelu mrežnice kao centralno avaskularno područje. Žuta pjega čini manje od 5 % ukupne površine retine, ali omogućuje većinu fotopičkog vida i vida u boji, kao i oštrinu vida. Na žutoj pjegi razlikujemo makularni obrub, na kojemu postoji ovalni rubni makularni refleks, i centralnu jamicu (lat. *fovea centralis*) građenu najvećim dijelom od čunjića i određenih Müllerovih glijalnih stanica koja je odgovorna za najprecizniji središnji vid. Optički disk je mjesto na mrežnici gdje optički živac izlazi iz oka i, makroskopski je u obliku diska svijetliji od ostatka mrežnice. Također, naziva se i slijepa pjega jer ne sadrži fotoreceptore. To je mjesto na kojemu nastaje optički živac, odnosno struktura sastavljena od aksona ganglijskih stanica koja prenosi električne signale iz mrežnice u vidni korteks u mozgu radi obrade i interpretacije vizualnih informacija. Papila vidnog živca mjesto je ulaska i izlaska glavnih krvnih žila retine. Središnja retinalna arterija izvorno potječe iz unutarnje karotidne arterije, slijedi intraneuralni tok, putuje duž donjeg ruba ovojnice vidnog živca i ulazi u oko kroz središte vidnog živca, gdje se dijeli na četiri završne grane: temporalnu i nazalnu te gornju i donju. Završne arterije granaju se na kolaterale, koje se dalje dijele dok se ne formira mreža krvnih žila oblažući cijelu unutarnju površinu mrežnice. Retinalne arterije i vene nalaze se u sloju optičkih vlakana. Kapilare mrežnice nastaju iz kolateralnih žila i organizirane su u površinske, srednje i duboke pleksuse. Retinalne krvne žile opskrbljuju krvlju unutarnje retinalne neurone. Avaskularni fotoreceptorski sloj oslanja se na koriokapilaris koji leži ispod retinalnog pigmentnog epitela za opskrbu kisikom difuzijom (2, 15).

Maligne novotvorine oka ubrajaju se među najzahtjevnije tumore za dijagnosticiranje i liječenje zbog svoje lokalizacije, potencijala za narušavanje vida te sklonosti metastaziranju. Retinoblastom (RB), najčešći intraokularni tumor u djece, nastaje iz retinalnih progenitorskih stanica koje nose bialelnu inaktivaciju gena RB1 i obilježen je brzom proliferacijom, slabo diferenciranom histologijom te sklonošću ekstraokularnom širenju ako se ne liječi (5). Nasuprot tomu, uvealni melanom, najčešća primarna intraokularna zloćudna novotvorina u odraslih, razvija se iz melanocita unutar žilnice, cilijarnog tijela ili šarenice te i dalje predstavlja vodeći uzrok smrti povezane s tumorima oka [1P] (3).

1.2. Retinoblastom

Kao najčešći maligni intraokularni tumor dječje dobi nastao iz nezrelih retinalnih stanica javlja se gotovo isključivo kod djece (5, 16, 17).

1.2.1. Epidemiologija retinoblastoma

Incidencija pojavljivanja retinoblastoma je 1 na 15.000 – 20.000 živorođene djece (18). Čini oko 3 % svih maligniteta u dječjoj dobi i najčešće se dijagnosticira prije treće godine života (18, 19). Nema značajne spolne ili rasne predispozicije (18). Nenasljedni tumor javlja se u 70 – 75 % slučajeva, dok je 20 – 25 % nasljedno (20, 21).

Prosječna dob kada se dijagnosticira je 12 mjeseci starosti djeteta ako se radi o bilateralnom obliku te 24 mjeseca starosti ako se radi o unilateralnom obliku tumora (19, 20). Kod 89 % bolesnika s bilateralnim retinoblastomom 0,5 – 6 % razvije trilateralni retinoblastom dok svega 11 % sa unilateralnim ima trilateralni retinoblastom (5). Najčešće se javljaju s 26 mjeseci, a u 95 % slučajeva otkrije se prije dobi od 5 godina života (18, 19). Preživljavanje je u razvijenim zemljama znatno više (95 %) nego u nerazvijenim (19, 22).

1.2.2. Patofiziologija retinoblastoma

Nastaje mutacijom RB1 tumor supresorskog gena na kromosomu 13q14. Za inicijaciju i nastanak tumora potrebne su dvije mutacije gena prema teoriji iz 1971. godine poznatoj kao *two-hit* hipoteza koju je postavio Knudson: prva mutacija (nasljedna ili sporadična), a druga somatska mutacija u retinalnoj stanici (23). Kod nasljednog retinoblastoma bolesnici imaju u svom genomu naslijeđenu mutaciju Rb1 zametne linije u jednom alelu te somatsku mutaciju u drugom alelu stanica retine (21, 24). Najčešća je nasljedna RB1 inaktivirajuća mutacija *de novo*, ali može biti i obiteljska. Bilateralnu bolest razvijaju bolesnici s nasljednim retinoblastomom te se javlja ranije, dok bolesnici s nenasljednim oblikom bolesti razvijaju isključivo jednostrani tumor (5, 21). Deaktivacijom jednog alela RB1 tumor supresorskog gena u svim stanicama zametne linije nasljednih retinoblastoma, omogućuje razvoj sekundarnih malignih neoplazmi za razliku od retinoblastoma koji nisu nasljedni i nemaju povećani rizik za sekundarne neoplazme. Sekundarne neoplazme novi su tumori koji nastaju samostalno nakon pojave primarnog retinoblastoma i najčešći je sarkom koji dominira u prva dva desetljeća, zatim karcinomi i melanomi, rijetko leukemije i limfomi te tumor centralni nervni sistem (CNS). Za razliku od sekundarnih neoplazmi, metastaze se šire iz primarnog tumora i kod retinoblastoma

najčešće se radi o masivnom proširenju u orbitu (24, 25). Retinoblastom se može pojaviti i trilateralno. Radi se o pacijentima s intraokularnim retinoblastomom kod kojih dolazi do razvoja primarnog intrakranijalnog, primitivnog, neuroektodermalnog tumora. Najčešće se nalazi u epifizi ili u supraselarnoj i paraselarnoj regiji. Ukoliko je prisutan i drugi središnji tumor u supraselarnoj ili paraselarnoj regiji, utoliko govorimo o kvadri lateralnom retinoblastomu te o multifokalnoj bolesti. Nije u potpunosti objašnjeno porijeklo intrakranijalnih tumora. Moguće je da nastaju iz ektopičnih žarišta retinalnih stanica ili iz pinealnih fotoreceptora sličnih retinalnim fotoreceptorima. Rijetko se retinoblastom dijagnosticira u dobi starijoj od 4 godine i patofiziologija takvog razvoja retinoblastoma nije u potpunosti jasna. Moguće je da se radi o malignoj transformaciji benignog retinoma/retinocitoma. U patogenezi manje podgrupe retinoblastoma sudjeluju i dodatni molekularni mehanizmi (5). Kod tumora gdje je RB1 očuvan ključni je događaj amplifikacija protoonkogenog onkogen povezan s virusom mijelocitomatoze (MYCN) koji kodira transkripcijski faktor važan za proliferaciju stanica. Takvi su tumori biološki vrlo agresivni, obično unilateralni i vrlo rano se javljaju (26, 27). Epigenetske promjene mogu dodatno pojačati efekat RB1 gubitka ili MYCN amplifikacije bez promjene same deoksiribonukleinske kiseline (DNA) sekvence. U retinoblastomu važne su hipermetilacija promotora tumor supresorskih gena odnosno njihovo „gašenje“ i smanjena ekspresija, promjene u modifikacijama histona te deregulacija mikroRNA (miRNA). Sve navedeno za posljedicu ima inaktivacija zaštitnih mehanizama stanice, povećanu proliferaciju te smanjenu diferencijaciju. Osim toga, zbog gubitka funkcije RB proteina, dovodi do poremećaja kontrole staničnog ciklusa odnosno do genomske nestabilnosti što rezultira kromosomskim aberacijama, duplikacijama i delecijama segmenata DNA te posljedično progresiji tumora. Progresiji retinoblastoma dodatno doprinosi i aberantna signalizacija apoptotskih puteva (24).

1.2.3. Histopatološka struktura retinoblastoma

Retinoblastom kao maligni, primarni intraokularni tumor dječje dobi, koji nastaje iz primitivnih neuroektodermalnih stanica mrežnice, spada u grupu tzv. „small round blue cell tumors“ s karakterističnim malim okruglim monomorfim stanicama s okruglim, ovalnim ili vretenastim hiperkromatskim jezgrama i slabo izraženom citoplazmom (28). Prisutne su i brojne mitoze. Tumor je često slabo diferenciran (29). Karakteristična histološka osobina je formiranje rozeta. Najspecifičnije za retinoblastom su Flexner–Wintersteinerove rozete kod kojih su tumorske stanice raspoređene radijalno oko centralnog lumena. Predstavljaju diferencijaciju prema fotoreceptorima (29). Homer–Wrightove rozete su manje specifične i

nemaju pravi lumen, a centralno se nalazi fibrozni materijal. Fleurettes su znak visoke diferencijacije, podsjećaju na razvijene fotoreceptore i rijede se nalaze (29, 30). Često je prisutna opsežna tumorska nekroza uslijed čega je moguće i formiranje pseudorozeta. Važan dijagnostički znak na radiološkim snimkama su i distrofične kalcifikacije (31).

1.2.4. Klasifikacija retinoblastoma

Retinoblastom može pokazivati endofitni rast (prema staklastom tijelu) i egzofitni rast (prema subretinalnom prostoru) (32). U uznapredovalim stadijima može doći do: invazije žilnice, invazije optičkog živca (važan prognostički faktor), prodiranja kroz skleru i ekstraokularnog širenja (33). Retinoblastom se klasificira prema proširenosti bolesti, prognozi i terapijskom planiranju. Postoji više klasifikacija, jedna od prvih je Reese–Ellsworth klasifikacija za intraokularni tumor prema kojoj se vrši podjela retinoblastoma prema uspjehu liječenja radioterapijom vanjskim snopom. Prema toj klasifikaciji razlikujemo pet skupina. Od prve skupine s vrlo povoljnom prognozom do pete koja predviđa vrlo nepovoljnu prognozu. Ova klasifikacija se danas rijede koristi jer uvođenjem kemoterapije više nije bila prikladna (34). Nova klasifikacija je Međunarodna klasifikacija intraokularnog retinoblastoma (ICRB), koja grupira tumore u klase od A do E ovisno o veličini, položaju te prisutnosti malih kolonija kancerogenih stanica u staklastom tijelu i prisutnosti ablacije retine. Ova klasifikacija procjenjuje vjerovatnost očuvanja bulbusa (35). Postoji i Internacionalni sistem stupnjevanja retinoblastoma (IRSS), koji uzima u obzir progresiju bolesti i potencijalu za metastaziranje. Tu je i Tumor, čvor, metastaza (TNM) klasifikacija za precizno određivanje stadija bolesti, razvijena od Američkog zajedničkog odbora za tumore. U obzir uzima genetsku predispoziciju kao rizičnu kategoriju, dodajući skupinu stadija H (36).

Prema Međunarodnoj klasifikaciji retinoblastoma glavni parametar za određivanje stupnja retinoblastoma je disperzija tumorskih čestica u susjedne strukture primarno u staklasto tijelo. Upravo je disperzija jedan od najčešćih uzroka neuspjeha liječenja jer su čestice koje disperziraju rezultat klonske proliferacije tumorskih stanica i preživljavaju u avaskularnom okruženju te su otporne na kemoterapiju. Morfološki to „kljanje“ u staklastom tijelu možemo podijeliti u tri skupine: prašina, kuglice i oblaci, s tim da je najčešće prisutna prašina. Prašina je histopatološki građena od makrofaga i nekrotičnih stanica oko jedne održive tumorske stanice, kuglice su sferične nakupine živih stanica, a oblaci sadrže uglavnom nekrotični materijal. Razlika među njima nije samo morfološka već se razlikuju i po odgovoru na liječenje (37, 38).

1.2.5. Klinička slika retinoblastoma

Najčešći i najraniji znak je leukokorija poznata pod nazivom i „refleks mačjeg oka“, a vidi se bijeli odsjaj u zjenici na fotografijama. Osim leukokorije može se manifestirati i kao strabizam što je posljedica zahvaćenosti makule i gubitka centralnog vida. Tada dijete može pokazivati nesigurnost pri kretanju te slab interes za vizulane podražaje (39). Kod uznapredovalih slučajeva javlja se bolno crveno oko uz pojavu uveitisa ili glaukoma (40). Kao kasni stadij bolesti i znak ekstraokularnog širenja tumora javlja se proptoza bulbusa (32).

Kod uznapredovale bolesti dolazi do sistemskih manifestacija i metastaziranja tumora u CNS putem vidnog živca u koštanu srž, kosti i limfne čvorove, sve praćeno simptomima kao što su glavobolja, povraćanje i neurološki ispadi (33, 41).

1.2.6. Dijagnostika retinoblastoma

Dijagnoza retinoblastoma je primarno kliničko-radiološka. Sva djeca s pozitivnom obiteljskom anamnezom retinoblastoma zahtijevaju oftalmološki pregled. Probirne preglede u djetinjstvu potrebno je napraviti kod braće i sestara oboljelih pacijenata, kao i kod potomstva, osim ako se ne izvrši genetsko testiranje koje bi isključilo mutaciju gena. Tada rizik odgovara riziku u općoj populaciji. Od anamnestičkih podataka, osim obiteljske anamneze, važna je dob pacijenta i prisutnost leukorije ili strabizma (42). Uz standardni oftalmološki pregled koji bi uključivao indirektnu oftalmoskopiju u općoj anesteziji, potrebno je napraviti i ultrazvuk oka (B-scan) koji nam može pokazati tipične kalcifikacije (31, 32). Magnetska rezonanca (MR) je metoda izbora za procjenu zahvaćenosti optičkog živca, žilnice i ekstraokularnog širenja intrakranijalne ekstenzije (42). Kompjuterizirana tomografija (CT) danas se izbjegava zbog zračenja, posebno kod nasljednog oblika radi povećanog rizika sekundarnih tumora (41). Potrebno je napraviti i genetsko testiranje za analizu mutacije RB1 gena čime ćemo identificirati nasljedni oblik, napraviti skrining članova obitelji te dobiti procjenu rizika sekundarnih maligniteta (24). Za procjenu metastaza važna je već navedena magnetska rezonanca mozga, punkcija koštane srži te lumbalna punkcija kod sumnje na širenje na CNS. Biopsija tumora obično se ne radi zbog rizika širenja tumorskih stanica (22).

1.2.7. Diferencijalna dijagnoza retinoblastoma

Retinoblastom najčešće se diferencira od drugih uzroka leukokorije (bijelog refleksa zjenice) kod djece. Svaka leukokorija smatra se retinoblastomom dok se ne dokaže suprotno. Uzrok leukokorije može biti kongenitalna katarakta odnosno zamućenje leće. Od retinoblastoma

razlikuje se po tome što nema intraokularne tumorske mase kao ni kalcifikacije na ultrazvuku. Osim kongenitalne katarakte retinoblastom treba razlikovati od Coatsove bolesti koja predstavlja idiopatsku retinalnu teleangiektaziju, češća je kod dječaka, unilateralna bez kalcifikacija. Retinoblastom treba razlikovati i od perzistentnog hiperplastičnog primarnog vitreusa (PHPV) koji predstavlja kongenitalnu razvojnu anomaliju karakteriziranu fibrovaskularnom masom iza leće, praćen mikroftalmusom, bez tumorskog rasta. Prematurna retinopatija (ROP) javlja se kod prijevremeno rođene djece kod kojih dolazi do patološke neovaskularizacije retine, također se može manifestirati leukokrijom. Infekcija oka toksokarom može se zamjeniti za retinoblastom, zatim kolobom retine ili optičkog živca kao i upalom oka. Važno je razlikovati retinoblastom od benignih uzroka leukokorije jer je retinoblastom životno ugrožavajući tumor koji zahtijeva hitno liječenje (43).

1.2.8. Terapija retinoblastoma

Liječenje retinoblastoma ovisi o stadiju bolesti, veličini i lokalizaciji tumora, vrsti tumora (unilateralan ili bilateralan), postojanju metastaza i mogućnosti očuvanja vida. Ciljevi liječenja su spasiti život djeteta i prevenirati metastatsku bolest, zatim očuvati očnu jabučicu i na kraju očuvati vid. Kod manjih lokaliziranih tumora dolazi u obzir fokalna terapija, primjerice laserska fotokoagulacija, krioterapija, transpupilarna termoterapija te brahiterapija radioaktivnim pločicama. U kombinaciji s fokalnom terapijom primjenjuje se i kemoterapija s ciljem smanjenja tumora. Međutim, koncentracija lijeka u staklastom tijelu pri sistemske primjeni kemoterapeutika nije dovoljna, pa se počelo s primjenom kemoterapeutika *in situ*, intraarterijska u arteriju oftalmiku, i intravitrealna (37, 38). Protokoli liječenja iznimno su raznoliki i ovise o lokalnim resursima, a stope uspjeha su promjenjive (44). S obzirom na radio senzitivnost retinoblastoma, radioterapija dugo je bila metoda izbora, ali pokazalo se da je rizik razvoja drugog primarnog tumora na mjestu zračenja veći od 50 %. Najčešće korišteni protokol sistemske kemoterapije je kombinacija vinkristina, karboplatina i etopozida. Moguće su poznate nuspojave kemoterapije kao što su prolazne alopecije, citopenije i vrućice, rijetko sekundarna akutna mijelogeni leukemija. Upravo zbog te činjenice postoji potreba za novim ciljanim lijekovima (45). Zbog navedenih nuspojava i činjenice da se ne postiže adekvatna koncentracija lijeka u staklastom tijelu, intrarterijska i intravitrealna primjena lijeka poboljšala je ishode liječenja kod uznapredovalog retinoblastoma. Takva primjena lijeka omogućuje i do 10 puta veću koncentraciju kemoterapeutika. I tu su moguće komplikacije kao što je ablacija retine, krvarenje u staklasto tijelo, vaskularni incidenti i u oku i u mozgu te atrofija optikusa. Od lijekova koji se primjenjuju u intraarterijskoj i intravitrealnoj kemoterapiji su topotekan i

melfalan kao samostalni lijekovi ili u kombinaciji. Za liječenje disperzije tumora u prednjoj sobici moguća je i intrakameralna primjena lijeka. Međutim, protokoli liječenja su različiti i često ovise o ekonomskim faktorima (44). U svakom slučaju prognoza je znatno bolja kada se tumor otkrije ranije i provedu suvremeni protokoli liječenja. Tada uspješnost očuvanja bulbusa može biti i 100 %, a preživljenje i do 95 %.

Kod uznapredovalih oblika koji nemaju mogućnost očuvanja vida, uklanjanje bulbusa odnosno enukleacija još je uvijek metoda liječenja (46-48). Nakon enuklacije postavlja se orbitalni implantat, ali uvijek predstavlja i fiziološki i psihosocijalni problem za dijete, obitelj i društvo. Tu veliku ulogu ima obitelj i ponekad se događa da obitelj odustaje od liječenja, ali tu treba uložiti napor i objasniti da treba spašavati život. Postoji situacija kada je potrebna i bilateralna enukleacija što je rijetko (manje od 1 %), ali tada je potrebno opsežno savjetovanje roditelja (49, 50). Ako se radi o ekstraokularnom retinoblastomu svakako treba provesti sistemsku kemoterapiju, kirurško liječenje metastaza te u nekim slučajevima transplantaciju koštane srži.

Redovito praćenje i dugoročnu kontrolu pacijenta s retinoblastomom uključuje redovite oftalmološke kontrole, magnetsku rezonancu kod nasljednih oblika, praćenje mogućih sekundarnih malignih tumora te genetsko obiteljsko savjetovanje. Prognoza će ovisiti o zahvaćenosti vidnoga živca, ekstraokularnom širenju tumora te pravovremenoj dijagnozi (51). Ukoliko je zahvaćen vidni živac utoliko se preživljenje smanjuje za 20 % (52). Klinički prediktori visokog rizika su pojava sekundarnog glaukoma koji je posljedica neovaskularizacija šarenice uz tumor koji je veći od dvije trećine volumena bulbusa i difuznu infiltraciju (53). Ako dođe do širenja tumora prema žilnici potrebna je jača adjuvantna kemoterapija.

U svakom slučaju neophodan je multidisciplinarni pristup koji će dati nabolje mogućnosti terapije i praćenja bolesti te prilagoditi terapijski protokol svakom pacijentu (54, 55).

1.3. Uvealni melanom

Uvealni melanom (UM) najčešći je primarni intraokularni maligni tumor kod odraslih, s incidencijom od gotovo 5 slučajeva na milijun osoba u Sjedinjenim Državama (56, 57). U Švedskoj kohorti pokazano je da je smrtnost od metastatskog UM-a 30 % nakon 5 godina (58). Nadalje, stope smrtnosti od UM-a zabilježene su kod pacijenata 10 do 15 godina nakon primarne dijagnoze (59-61). Kolorektalne i jetrene metastaze vodeći su uzroci smrti kod pacijenata s UM-om (58). Također, UM dolazi s psihosocijalnim teretom za oboljele pacijente te s velikim utjecajem na njihovu kvalitetu života (62, 63). Iako su u posljednjih nekoliko

godina postignuti brojni napredci u liječenju UM-a, poput razvoja tebentafuspa – regulatora imunološkog sustava – prognoza UM-a ostaje loša (64-66). Trenutna uvjerenja idu u prilog prisutnosti mikrometastatske bolesti u vrijeme dijagnoze, kao rezultat hematogenog širenja stanica raka. Smatra se da kašnjenja u dijagnozi i liječenju također značajno doprinose metastatskoj bolesti (67). Stoga, postoji hitna potreba za identificiranjem novih terapijskih ciljeva u kombinaciji s visoko osjetljivim i specifičnim dijagnostičkim alatima.

Kada govorimo o melanomu oka moramo znati da se radi u 85 % slučajeva o tumoru srednje očne ovojnice. Melanom se može javiti i na vjeđama kada ima karakteristike kožnog melanoma u 10 % slučajeva ili na spojnici kada ima karakteristike sluzničkog melanoma u 5 % slučajeva.

1.3.1. Epidemiologija uvealnog melanoma

Najčešći primarni, maligni, intraokularni tumor kod odraslih generalno je rijedak tumor. Incidencija je oko 5 – 7 slučajeva na milijun stanovnika godišnje. Češće se javlja u sjevernoj Europi i Sjedinjenim Američkim Državama, a rijede u Aziji i Africi. Ako pogledamo dobnu distribuciju najčešće se javlja između 50. i 70. godine života, vrlo je rijedak kod djece, a incidencija raste s dobi. Nešto je češći kod muškaraca, ali nema velike razlike po spolu. Rasna i fenotipska distribucija pokazuje da se češće javlja kod bijele rase i osoba svijetle puti, plavih ili zelenih očiju, dok je rijedak kod osoba tamnije puti. Učestalost prema anatomske lokaciji je u žilnici 85 – 90 %, zatim u cilijarnom tijelu 5 – 10 % te u šarenici 3 – 5 %. Visok je metastatski potencijal tako da oko 40 – 50 % pacijenata razvije metastaze. Najčešće mjesto gdje metastazira je jetra, iako može metastazirati i u pluća te kosti, a prognoza nakon pojave metastaza je loša. Petogodišnje preživljenje je oko 70 – 80 %, a desetogodišnje preživljenje oko 50 % (68).

1.3.2. Patofiziologija uvealnog melanoma

Za razliku od melanoma kože, UM nije direktno povezan s izlaganjem suncu. Dodatni uobičajeni čimbenici rizika za UM su prisutnost atipičnog kožnog nevusa.

Uvealni melanom nastaje malignom transformacijom melanocita uvealnog trakta (žilnica, cilijarno tijelo, šarenica). Za razliku od kožnog melanoma, ima specifične genetske i biološke karakteristike. Nastaje iz neuralno krestnih melanocita, najčešće u žilnici ($\approx$ 85 – 90 %) Može nastati *de novo* ili iz preegzistentnog nevusa. Nastaje mutacijama GNAQ/GNA11 gena uključenih u transkripciju alfa podjedinice hetero trimernih proteina (npr. G proteini, Gq i G11). Disregulacije u signalnim putovima posredovanim G proteinima mijenjaju

biomolekularne mreže uključene u metabolizam stanica, proliferaciju stanica i rast tumora, koje su pod regulacijom MAPK, Fosfoinozimid 3-kinaza (PI3K) i mTOR signalizacije koje dovode do aktivacije MAPK signalnog puta i nekontrolirane proliferacije melanocita. Za prognozu UM-a, genetski čimbenici su dobar prediktor. Sekundarne genetske promjene kao što je monosomijom 3 promjene kromosoma 8, važan su prognostički faktor i povezani su s visokim rizikom metastaza. Mutacija BAP1 također su prisutne u metastatskim tumorskim stanicama i naznaka su agresivnog oblika te loše prognoze. Defekti u BAP1 remete replikaciju DNA, popravak DNA, homeostazu kalcija, proliferaciju i diferencijaciju te metabolizam stanica. Dok je disomija 3 znak bolje prognoze i manjeg rizika metastaziranja (69, 70).

Mehanizam rasta UM-a može biti horizontalno (difuzno zadebljanje horoidee), vertikalno (formira nodularnu masu), a može probiti Bruchovu membranu – *mushroom* oblik. UM metastazira hematogeno najčešće u jetru (više od 90 % slučajeva) dok su limfogene metastaze rijetke jer oko nema limfne drenaže. Osim toga oko je „imunološki privilegirano“ i ta imunološka privilegija definirana je prisutnošću lokalnih i sistemskih mehanizama za ograničavanje lokalne upale. Disregulacije imunološkog sustava izravno su povezane s razvojem malignih bolesti. Za razliku od drugih solidnih tumora, gdje je poznato da akutna upala uzrokuje smrt stanica tumora, upalna kaskada kod uvealnog melanoma pogoduje tumorigenezi. Poznat je upalni fenotip uvealnog melanoma, koji je definiran kao limfocitni upalni proces, povezan s lošom prognozom. Limfocitna infiltracija obilježena je povećanjem ekspresije limfocita, makrofaga i HLA klase I i II. Nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) poznati je regulator urođenog i adaptivnog imunološkog sustava, sa značajnom ulogom u homeostazi upale. Utvrđeno je da se aktivacija NF- κ B puta pojačava proliferacijom stanica UM. Nadalje, pokazano je da je metastatski potencijal stanica UM stečen transendotelnom migracijom. Nedavno je pokazano da onkogene mutacije koje aktiviraju Gαq/11 induciraju aktivaciju faktora izmjene gvanin nukleotida, a sve navedeno omogućuje tumoru lakše izbjegavanje imunološkog odgovora (3, 71-76).

Tumorsko mikrokruženje (TME) ima složenu ulogu i uglavnom je uključeno u staničnu komunikaciju i potporu tumoru. Obuhvaća različite stanične i nestanične komponente, poput topljivih medijatora (npr. citokina, kemokina i faktora rasta), različitih stromalnih stanica (npr. endotelnih stanica, fibroblasta i imunoloških stanica) i biomolekularnih markera. Postoji međusobna interakcija između tumorskih stanica i TME-a; tumorske stanice utječu na sastav TME-a, koji zatim dodatno utječe na rast, napredovanje i metastaziranje tumorskih stanica.

1.3.3. Histopatološka struktura uvealnog melanoma

Uvealni melanom maligni je tumor koji potječe od melanocita uvealnog trakta porijeklom iz melanoblasta čije je porijeklo neuralni greben. Histološka građa ima veliki prognostički značaj. Makroskopski radi se o tamnosmeđoj do crnoj tumorskoj masi koja može biti nodularna ili difuzna, a probijanjem Bruchove membrane dobiva oblik gljive. Godine 1931., Callender je uspostavio histopatološku klasifikaciju za UM, podijelivši je u pet kategorija prema vrsti stanice: vretenasto-stanični melanom A, vretenasto-stanični melanom B, miješani, fascikularni i epitelioidni. Modificirana Callenderova klasifikacija grupirala je ove kategorije u tri, koje se sastoje od vretenasto-staničnog melanoma koji ima najbolju prognozu, a karakterizira ga mali broj mitozama, uske izdužene jezgre te minimalna atopija. Melanom miješanih stanica (mješavina vretenasto-staničnog melanoma i melanoma epitelioidnih stanica) ima bolju prognozu od epiteloidnog tipa, ali lošiju od vretenastog i melanoma epitelioidnih stanica koji ima najlošiju prognozu s okruglim ili poligonalnim stanicama čije su karakteristike obilna citoplazma s velikim izraženim jezgrama, čestim mitozama i izraženom atipijom. Vrsta stanice ima jednu od najvećih povezanosti s preživljenjem, uz genetski profil. Stanice u melanomu mogu formirati listove (eng. *sheets*), snopove (eng. *fascicles*) te gnjezda (eng. *nests*) i imaju bogatu vaskularnu mrežu. Pigmentacija u stanica je varijabilna i melanin može maskirati stanične detalje, a postoje i pigmentirani tumori, tzv. amelanotični. Postoji i genetsko histološka korelacija tako da je monosomija kromosoma 3 česta kod epitelioidnog tipa i ima lošu prognozu dok je disomija 3 češća kod vretenastog tipa i znak je bolje prognoze (68, 77, 78).

1.3.4. Klasifikacija uvealnog melanoma

Postoje brojne klasifikacijske sheme za uvealni melanom, a najčešće korišteni su TNM sustav Američkog zajedničkog odbora za rak (AJCC) i klinička klasifikacija kolaborativne studije uvealnog melanoma (COMS). COMS uvelani melanom dijeli na temelju dimenzija na mali, srednji i veliki uvealni melanom. Mali su tumori visine manje od 2.4 mm i bazalnim promjerom manjim od 15 mm, srednji tumori su visine 2.5 – 10 mm ili bazalnim promjerom manjim od 15 mm, a veliki su visine veće od 10 mm ili bazalnim promjerom većim od 15 mm (71).

Priručnik AJCC određuje stadij tumora i nadograđuje ga Američki zajednički odbor za rak svakih 6 do 8 godina predstavljajući standard za klasifikaciju proširenosti tumora prateći kliničke, patološke i genetske parametre. Uzima u obzir procjenu anatomske dimenzije, zahvaćenosti struktura i histopatoloških čimbenika. Prvo izdanje objavljeno je 1977. godine, a

u siječnju 2017. godine dopunjeno je 8. izdanje AJCC-ovog priručnika koji u kategoriju N uključuje podkategoriju definirajući ekstraskleralno širenje od onih s regionalnog širenja u orbitu koja nije u očnoj blizini.

Međutim, dodatne metode klasifikacije uključuju sustave temeljene na genetskom testiranju (tj. Klasifikacija Atlasa genoma tumora (TCGA), s histopatološkim značajkama (tj. Modificirani Callenderov klasifikacijski sustav) (79, 80) i klasifikaciju profila ekspresije gena.

AJCC TNM sustav za stadij UM-a dodatno obuhvaća prognozu (72, 81). Opseg primarnog tumora (T) određuje se na temelju najvećeg bazalnog promjera tumora, debljine, prisutnosti zahvaćenosti cilijarnog tijela i ekstra okularnog širenja. Stadij N i M odnosi se na zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i prisutnost ili odsutnost udaljenih metastaza, s naknadnom dimenzijom metastatskog tumora (72, 81). Međutim, treba napomenuti da se širenje UM-a uglavnom događa hematogenim putem, s obzirom na odsutnost limfnih čvorova unutar oka. Širenje na okolne strukture, poput konjunktive, može omogućiti limfnu diseminaciju (82).

1.3.5. Klinička slika uvealnog melanoma

Klinička slika UM-a varira ovisno o veličini i lokaciji tumora. U mnogim slučajevima, otkrivanje i dijagnoza UM-a slučajan je nalaz tijekom rutinskih očnih pregleda, s obzirom na to da je većina pacijenata asimptomatska prilikom pregleda (83, 84). Međutim, u prisutnosti vizualnih simptoma, kliničari mogu propustiti UM u do 23 % slučajeva (83). Najčešći vizualni simptomi koje prijavljuju pacijenti uključuju zamagljen vid, fotopsiju, defekte vidnog polja, mušice u očima, a rijetko bol u oku i metamorfopsiju, dok veći tumori mogu biti povezani s ablacijom mrežnice.

1.3.6. Dijagnostika uvealnog melanoma

Oftalmološkim pregledom na osnovi kliničkog izgleda i oftalmoloških značajki, razlikuje se uvealni melanom od benignih nevusa. Stražnji UM-i obično se predstavljaju kao povišena žilnična masa pri pregledu fundusa, s različitim stupnjem subretinalne tekućine i narančastog pigmenta (17). Kada tumor proдре u Bruchovu membranu, može se uočiti tipičan izgled u obliku gljive (85).

Optička koherentna tomografija (OCT) neinvazivna je metoda snimanja koja pruža visoku prostornu rezoluciju i omogućuje detaljno snimanje mrežnice stvaranjem presjeka slojeva mrežnice (86). Na OCT-u, stražnji UM može biti povezan s gubitkom fotoreceptora ili

elipsoidne zone, gubitkom ili hiperplazijom RPE, intraretinalnom ili subretinalnom tekućinom, retinoshizom, stanjivanjem mrežnice, cijepanjem vanjskog pleksiformnog sloja, odvajanjem bazilarnog sloja ili subretinalnim hiper reflektirajućim materijalom (87).

Ultrazvuk oka važna je dijagnostička metoda za dijagnosticiranje, diferencijalnu dijagnozu i praćenje progresije UM-a. Njegove dvije modalnosti, A-sken i B-sken daju korisne informacije i omogućuju mjerenje unutarnje reflektivnosti, najvećeg bazalnog promjera te apikalne visine i debljine. Na standardiziranom A-skenu, tumor pokazuje nisku do srednju unutarnju reflektivnost u „decrecendo stilu“, s unutarnjom vaskularizacijom koja se vidi kao brzo kretanje unutarnjih šiljaka. Na B-skenu, tumor je obično kupolastog oblika ili, ako je probio Bruchovu membranu, izgleda kao tumor u obliku gljive sa susjednim lokaliziranim eksudativnim odvajanjem mrežnice. Ako se vide pulzacije, to je znak dobre vaskularizacije tumora. Lezije veće od 3 mm u apikalnoj visini vjerojatno su melanomi i kod većih apikalnih i bazalnih dimenzija vjerojatnost neopalstične lezije je velika (88). Zbog svega navedenog ultrazvuk je metoda izbora za kliničare iako i fluoresceinska angiografija ima svoje mjesto u dijagnostici uvealnog melanoma pokazujući sekundarnu vaskularizaciju žilnice ili ekstenzivno propuštanje (89).

Radiološke metode kao što su CT i magnetska rezonanca imaju svoju ulogu u dijagnostici melanoma, posebno u procjeni proširenosti tumora na druge organske sustave. MR može biti koristan alat za dijagnozu i praćenje UM-a, a ključne značajke UM-a koje se mogu otkriti MR-om uključuju dokaze modularne lezije, koja može biti povezana s odvajanjem mrežnice (90).

Konvencionalne metode za UM, poput biopsija tankom iglom, predstavljaju značajne izazove. S obzirom na intraokularnu i subretinalnu lokalizaciju tumora, postoji rizik od regmatogenog odvajanja mrežnice i perzistentnog krvarenja u staklasto tijelo (91). Nadalje, izravna biopsija tumora može rezultirati ekstra okularnim širenjem (92). Kao i kod svih operacija na očnom tkivu, biopsije UM-a povezane su s endoftalmitisom, a pokazalo se da su čak povezane s pogoršanjem vidne oštine kod 13 % pacijenata (93-96). Nadalje, prognostički doprinos ovih biopsija često je ograničen, posebno ako je tumor malen ili ako je smješten s posteriorne strane (95). S obzirom na rizike i nisku učinkovitost standardnih biopsija, značajan interes bio je posvećen tekućim biopsijama. Većina fokusa u području tekućih biopsija bila je na analizi krvi i seruma. Međutim, urin, cerebrospinalna tekućina, ascites, slina, pa čak i očna vodica i staklasto tijelo također su privukli pozornost (97). Tekuće biopsije jednostavne su za provođenje i predstavljaju manji rizik od konvencionalnih metoda biopsije primarnog tumora (98). Nadalje, biopsije primarnog tumora možda neće prepoznati sekundarnu ili metastatsku

bolest ili uhvatiti heterogenu prirodu tumora (97). Tumorski markeri identificirani u tekućim biopsijama uključuju CTC-ove (eng. *circulating tumor cells*), DNA, ribonukleinsku kiselinu (RNA) i proteine (97, 98).

CTC-i identificirani su u više malignih stanja poput tumora dojke, prostate i uvealnog melanoma (UM), što je kliničarima pružilo relevantne prognostičke podatke o metastazama (99, 100). Budući da su CTC-i kod pacijenata s UM rijetki, potrebne su metode izolacije (98). Najčešći način izolacije i hvatanja CTC-a je imunomagnetskim filtracijskim obogaćivanjem. Imunomagnetsko obogaćivanje koristi prednost ekspresije tumorskih proteina, dok se obogaćivanje temeljeno na filtraciji oslanja na razlike između CTC-a i krvnih stanica (101, 102). Postoji statistički značajna razlika u bazalnom promjeru UM-a, visini tumora, preživljenju bez progresije bolesti i ukupnom preživljenju između pacijenata s više od 10 CTC-a/10 mL krvi u usporedbi s onima s nižim koncentracijama CTC-a kod pacijenata bez metastaza (103). Imunomagnetska izolacija postala je preferirana metoda izolacije CTC-a s više različitih magnetskih čestica vezanih za antitijela dostupnih na tržištu.

Iako postoje varijacije među različitim dostupnim antitijelima, sigurno je da je povećanje broja CTC-a povezano s pogoršanjem prognoze (98). Također, postoje dokazi koji upućuju na to da varijante broja kopija u primarnom tumoru i CTC-ima imaju slične kromosomske aberacije tj. somatske promjene broja kromosomskih kopija (104). Komparativna analiza somatskih promjena broja kromosomskih kopija u CTC-ima izoliranim iz periferne krvi pacijenta s metastatskim UM-om ili u mononuklearnim stanicama periferne krvi pokazala je važnost kromosomskih aberacija povezanih s tumorom. Stoga, procjena ovih kromosomskih aberacija u primarnim tumorima i CTC-ima može značajno doprinjeti prognozi bolesti. Važno je napomenuti da je razlikovanje između UM-a i nevusa bio izazovan zadatak, ali studije pokazuje da je 50 % pacijenata s UM-om imalo više od 1 CTC-a u usporedbi s pacijentima s nevusima (105). Međutim, treba napomenuti da je poluživot CTC-ova nizak, između 1 i 2,5 sata (106, 107). S poboljšanjima u izolaciji CTC-ova vjerojatno je da će genomika CTC-ova igrati ulogu u predviđanju UM-a (104, 108). Treba napomenuti da prevalencija CTC-ova kod pacijenata s UM-om u literaturi može varirati ovisno o metodologiji kojom se CTC-ovi izoliraju. Te varijacije mogu uključivati, ali nisu ograničene na, uzorkovanje iz arterijske ili venske krvi i korištenih antitijela.

Cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) je DNA koja je ili aktivno izlučena iz tumorske stanice ili oslobođena putem stanične nekroze ili apoptoze (98, 109). Patološki markeri u primarnom tumoru identificirani su u ctDNA pacijenata s tumorom prostate, kao i drugih malignih bolesti (98, 110). Slični nalazi pokazani su kod UM-a, gdje je praćenje ctDNA

predvidjelo metastasku progresiju UM-a, a korištenje sekvenciranja ctDNA sljedeće generacije pomoglo je u predviđanju odgovora na terapiju inhibitorima protein kinaze (111). Osim toga, ctDNA u UM-u korištena je za predviđanje odgovora na liječenje inhibitorima kontrolnih točaka (112), a u životinjskim modelima, ctDNA iz UM-a prethodila je kliničkom otkrivanju bolesti (113). Studije su pokazale da pacijenti s UM-om imaju ctDNA i da su više razine ctDNA u korelaciji s hepatičkim metastazama i volumenom tumora (114). Zanimljivo je da je nađeno da je ctDNA bila u korelaciji s CTC-ima i preživljenjem bez progresije bolesti (114). Treba napomenuti da izolacija ctDNA može biti izazovna jer je cirkulirajuća slobodna DNA iz fizioloških procesa obilnija (97). GNAQ i GNA11 detaljno su procijenjeni jer se mogu koristiti za razlikovanje ctDNA od cirkulirajuće slobodne DNA (97, 115). Metodologije za izolaciju ctDNA vjerojatno će poboljšati njihov klinički doprinos tekućim biopsijama.

Osim cirkulirajuće DNA, pokazalo se da cirkulirajuća mikro-RNA (miRNA) također ima klinički potencijal u praćenju liječenja UM-a. Cirkulirajuća miRNA u početku se koristila kod tumora dojke, jer je izolacija ovih CTC-a bila izazovna, a utvrđeno je da su određene miRNA pojačano regulirane (116). Klinička prednost miRNA njezin je dugi poluživot, jednostavna dostupnost, kao i visoka specifičnost i osjetljivost (97, 98). Povećana miRNA-618 u plazmi i smanjena miRNA u staklastom tijelu, identificirane su kod pacijenata s UM-om u usporedbi sa zdravim kontrolama (117). Također je napomenuto da se regulacija miRNA razlikuje kod pacijenata s metastatskom i ne metastatskom bolešću (118).

Proteomski podaci iz krvi pokazali su potencijalnu kliničku vrijednost u prognozi UM-a. Gp100 i katepsin specifični za melanom povišeni su kod pacijenata s UM-om u usporedbi sa zdravim kontrolama (105, 119). Pokazalo se da su proteini uključeni u preoblikovanje izvan staničnog matriksa, kao i migraciju i invaziju tumora, povišeni kod pacijenata s visokim rizikom za UM (105). Analiza proteina topliskog šoka 27 i osteopontina mogu razlikovati metastatski i nemetastatski UM nakon liječenja (120). Također, predložena je analiza jetrenih biomarkera za identifikaciju incidencije metastaza u jetri, iako to ima ograničenu kliničku vrijednost u ranom predviđanju metastatskog potencijala (98).

Krv nije jedina tekućina koja je procijenjena za tekuću biopsiju kod UM-a. Proučavani su i uzorci očne vodice i staklastog tijela (117, 121, 122). Ove metode imaju veći rizik i invazivnije su. Vjerojatno iz tog razloga nisu bile predmet opsežnih istraživanja. Međutim, studije su ipak pokazale da su somatske promjene broja kromosomskih kopija identificirane kod pacijenata s UM-om iz uzoraka očne vodice i pokazale su visoku podudarnost s varijacijama broja kopija unutar odgovarajućeg tumora (123). Povišene razine miRNA također su identificirane u staklovini pacijenata s UM-om (117). Pokazalo se da je Vaskularni endotelni

faktor rasta (VEGF) povišen u očnoj vodici zahvaćenih pacijenata s pozitivnim korelacijama između visine i promjera tumora (121, 122) te da je protein S-100 povišen u staklovini u očnoj vodici pacijenata s UM-om (124).

Tekuće biopsije mogu pružiti neinvazivnu, lako dostupnu i kvantificirajuću metriku za praćenje i prognoziranje pacijenata s UM-om.

U liječenju malignih bolesti, dijagnoza i prognoza oduvijek su bili primarni korak. Međutim, bio je to izazov za određene maligne bolesti, posebno u oku. Srećom, napredak u računalnim mogućnostima i novi pristupi strojnom učenju omogućili su razvoj alata za kliničko donošenje odluka temeljenih na velikim zbirkama podataka.

Kao najčešća primarna intraokularna maligna bolest oka kod odraslih s više dostupnih modaliteta snimanja, uvealni melanom bio je predmet istraživanja za primjenu strojnog učenja. Od posebnog interesa, razlikovanje benignog koroidnog nevusa i malignog koroidnog melanoma bio je klinički težak zadatak, za što je primijenjeno strojno učenje (125). Godine 2022. Zabori suradnici pratili su 123 pacijenta s malim koroidnim melanocitnim tumorima i trenirali model za predviđanje malignog rasta (126). Kliničke značajke uključivale su spol, visinu tumora, subretinalnu tekućinu, narančastu pigmentaciju i udaljenost od vidnog živca (126).

Histopatološki nalazi kod UM-a korišteni su za predviđanje preživljenja i metastatskog potencijala. Korištenjem strojnog učenja u histopatologiji pokušalo se poboljšati ta predviđanja (125).

Osim dijagnoze, strojno učenje primjenjivalo se za predviđanje petogodišnje stope preživljenja pacijenata s UM-om liječenih brahiterapijom s točnošću od 84 % [150]. Ove informacije mogu pomoći liječnicima u identificiranju novih značajki za predviđanje UM-a. Osim toga, većina neuronskih mreža oslanjala se na kliničke ili histopatološke podatke. Malo je studija procijenilo fotografiju fundusa ili radiološko snimanje (125, 127). Uključivanje kliničkog snimanja u studije strojnog učenja vjerojatno će poboljšati funkcionalnost ovih mreža kada se integriraju s histopatološkim podacima. Konačno, treba napomenuti da je provedeno vrlo malo ispitivanja dubokog učenja, koja će vjerojatno poboljšati funkcionalnost u odnosu na korištene klasične modele strojnog učenja (125, 127, 128).

1.3.7. Diferencijalna dijagnoza uvealnog melanoma

Diferencijalna dijagnoza uvealnog melanoma podrazumjeva stanja koja klinički ili na slikovnim metodama mogu ličiti na UM. To mogu biti benigne melanocitne lezije kao što je nevus žilnice, šarenice ili melanocitom vidnog živca. Osim toga, UM se može zamjeniti s

vaskularnim lezijama kao što je žilni hemangiom. Metastatski tumori mogu imitirati UM, kao i upalne lezije što su primjerice posteriorni skleritis, granulomi (sarkoidoza, tuberkuloza) i subretinalni apsces (129).

1.3.8. Terapija uvealnog melanoma

Liječenje UM-a složen je izazov u onkologiji, s ograničenim mogućnostima liječenja i mogućnošću da UM napreduje do metastaza. Međutim, u posljednjih nekoliko godina postignut je značajan napredak u predkliničkim i kliničkim istraživanjima, nudeći obećavajuće načine za poboljšanje ishoda.

Liječenje melanoma ovisi o lokaciji, proširenosti i veličini tumora, vidnoj oštini, ali i prisutnosti metastatske bolesti (130). Prije se liječenje melanoma uvee primarno provodilo enukleacijom koja nije pokazala bolje ishode od liječenja brahiterapijom (131). Brahiterapija predstavlja postavljanje diska s radioaktivnim izotopom na skleru na mjestu gdje je locirana baza tumora. Cilj te terapije je zaustavljanje rasta tumora oštećenjem DNA tumorskih stanica, ali traćenje oštećuje i zdrave stanice što za posljedicu ima neželjene nuspojave. Oprezno se nacića područje tumora s poštedom okolnog tkiva. U primjeni je najčešće rutenij-106, jod-125 ili kobalt-60, paladij-103 i iridij-192. Zračenjem dolazi do lize i apoptoze stanica tumora te vaskularnim endotelnim stanicama što dovodi do ishemije, nekroze i skvrčavanja (132). Promjene u tumoru počinju nakon dva mjesca i efekt je prisutan nekoliko godina. Kod malih tumora koristi se zračenje protonskim snopom, posebno onih smještenih u blizini makula ili optičkog živca. Za dobro ograničene tumore veličine do 3 mm koristi se stereotaktička radioterapija. Navedene metode često imaju nuspojave kao što su razvoj katarakte, gubitak vida zbog zahvaćenost makule, krvarenje u oku, suhoća oka te razvoj glaukoma koji može završiti enukleacijom. Kao prevencija radijacijske makulopatije dolazi u obzir pars plana vitrektomija i primjena silikonskog ulja te intravitrealna terapija nakon skidanja aplikatora.

Laserska terapija kao što je fotodinamska terapija (PDT) i transpupilarna termoterapija (TTT) najčešće se koriste u kombinaciji s radioterapijskim metodama. Svakako su tu i kirurške metode bilo da se radi o lokalnoj resekciji tumora ili enukleaciji kada su u pitanju veliki tumori, promjera većeg od 17 mm. Kod velikih tumora s ekstraokularnim širenjem moguća je potreba i za egzenteracijom nakon koje se poslije 6 – 8 tjedana implantira proteza (133, 134).

Kad dođe do metastatskog širenja uvealnog melanoma, nema puno terapijskih opcija i prognoza je loša (135).

Imunoterapija je obećavajući pristup liječenju UM-a koristeći imunološki sustav tijela za ciljanje stanica tumor. Uz ciljanu terapiju koristi se češće nego kemoterapija (135).

Tebentafusp je prvi specifični lijek za metastatski ili neoperabilni uvealni melanom i smatra se velikim napretkom u liječenju ove bolesti (136). Tebentafusp pripada skupini ImmTAC (Immune-mobilising monoclonal T-cell receptors Against Cancer) molekula (137). Mehanizam djelovanja bispecifičnog proteina je poseban i razlikuje se od klasične imunoterapije. Djeluje na dva načina. Sadrži T-stanični receptor koji prepoznaje protein na tumorskim stanicama melanoma te privlači T-limfocite potičući ih da ubiju tumorsku stanicu, odnosno usmjerava imunitet direktno na stanice melanoma. Strukturalno sadrži dva funkcionalna dijela. T-stanični receptor (TCR) umjetno je dizajniran i prepoznaje melanomski antigen gp100. Antigen je prikazan na površini tumorske stanice preko HLA-A*02:01, odnosno tumor pokazuje fragment proteina gp100 TCR i dio tebentafuspa ga prepoznaje. Zato lijek djeluje samo kod HLA-A*02:01 pozitivnih pacijenata. Drugi dio molekule veže receptor CD3 na T-limfocitima. To je signalni kompleks T-stanice koji aktivira imunološki odgovor (137, 138). Proces djelovanja ide u nekoliko koraka. Nakon vezivanja TCR, dio tebentafuspa prepoznaje gp100 peptid prikazan na HLA-A*02:01 na tumorskoj stanici, odnosno tumor se tako „označi“. Anti-CD3 dio veže CD3 receptor na T-limfocitu formirajući „imunološki most“. Na taj način tebentafusp fizički spaja T-stanicu i tumorsku stanicu što se naziva eng. *immunesynapse* (136, 138). Vezanjem CD3 dolazi do aktivacije T-stanica, proliferacije T-limfocita te otpuštanja citokina među kojima su najvažniji interferon- γ , TNF – α , IL-2. Aktivirana T-stanica preko perforina i granzina izaziva apoptozu tumorske stanice (138). Za razliku od klasičnih *check point* inhibitora poput Pembrolizumab ili Nivolumab Tebentafuspne ovisi o spontanoj prepoznavi tumora od strane T-stanica prisilno dovodeći T-stanice do tumora te zbog toga može djelovati i kada tumor ima slabu imunogenost i malu infiltraciju T-limfocita, a to je čest problem kod uvealnog melanoma (135, 137). Zbog nagle aktivacije velikog broja T-stanica i otpuštanja citokina, nuspojave u vidu citokinskog sindroma (osip, visoka temperatura, hipotenzija) česte su na početku terapije. Gp100, kao melanocitni diferencijalni antigen prisutan je u melanomu i normalnim melanocitima, što je razlog pojave osipa i depigmentacije (139). Možemo reći da Tebentafusp djeluje kao molekularni adapter prisiljavajući imunološki sustav da prepozna i ubija stanice melanoma. Odobrile su je 2022. godine FDA i EMA u terapiji metastatskog uvealnog melanoma za bolesnike pozitivne na HLA-A2*0201 (137, 140, 141) kojih je do 50 % u zapadnim zemljama. Upravo zbog te činjenice ostaje prostor za nove molekule. Međutim, ipak je terapija Tebentafusp dokazano produžila ukupno preživljenje kod metastatskog uvealnog melanoma. Kao nova ciljana terapija istražuje se Darovasertib koji blokira protein kinaze C, signalni put i pokazuje obećavajuće rezultate kod uvealnog melanoma, posebno u kombinaciji s drugim lijekovima, ali još je u kliničkom razvoju (142). Darovasertib je eksperimentalni lijek

koji se istražuje za liječenje uvealnog melanoma. Za sada je u trećoj fazi kliničkih studija i jedan je od najperspektivnijih novih lijekova za ovu bolest. Osim navedenih lijekova istražuju se i inhibitori kontrolnih točaka (eng. *checkpoint inhibitors*). Radi se o tipu imunoterapije koja pomaže imunološkom sustavu da prepozna i napadne tumorske stanice. Vrlo su važni u liječenju mnogih karcinoma, uključujući melanom, ali kod uvealnog melanoma djeluju slabije nego kod kožnog melanoma. Inhibitori kontrolnih točaka djeluju na specifične imunološke kontrolne točke. Programirani ligand smrti 1 (PD-L1) eksprimira se u UM stanicama i interagira s PD-1 receptorima na T stanici, što potom inaktivira funkciju T stanica, omogućujući tumorskim stanicama izbjegavanje imunološkog odgovora. Drugi protein kontrolne točke je CTLA-4. Djeluje tako da smanjuje imunološki odgovor natjecanjem s CD80 i CD86 za vezanje na stimulirajući receptor na stanicama koje prezentiraju antigen, čime inhibira aktivaciju T-stanica u početnoj fazi (143). Ipilimumab (monoklonski inhibitor anti-CTLA-4) istraživao je u različitim dozama u prospektivnim studijama i retrospektivnim analizama pokazujući dobre rezultate kod kožnog melanoma, ali skromnije kod uvealnog melanoma (144). Uz Ipilimumab tu je i pembrolizumab kao PD-1 inhibitor kod kojega je isto tako učinkovitost kod uvealnog melanoma manja nego kod kožnog melanoma što se može pripisati manjem mutacijskom opterećenju kod UM-a, što se prevodi u manji broj neoantigena koje imunološki sustav prepoznaje.

Nedavni sustavni pregled inhibitora kontrolnih točaka kod metastatskog UM-a sugerirao je da su dvostruki inhibitori kontrolnih točaka imunološkog sustava učinkovitiji od terapija s jednim sredstvom i mogli bi biti potencijal za buduće imunološke terapije (145). Daljnja istraživanja istražuju kombinaciju imunoterapije s epigenetikom, imunoterapije onkolitičkim virusima i imunoterapije s ciljanom genetskom terapijom (146). Trenutna ispitivanja koja istražuju imunoterapiju u kombinaciji s ciljanom terapijom uključuju pembrolizumab s olaparibom (tj. inhibitor PARP-a (poli(ADP-riboza) polimeraze), pembrolizumab s LNS8801 (tj. agonist estrogenskog receptora spregnutog s G proteinom (GPER), atezolizumab s IN10018 (tj. inhibitor PD-L1 s inhibitorom FAK-a (fokalna adhezijska kinaza) i pembrolizumab s APG115 (tj. inhibitor MDM2). Iako kombinirani inhibitori imunoloških kontrolnih točaka pokazuju veću učinkovitost, mogu izazvati veći broj nuspojava. Stoga će daljnja istraživanja koja uključuju kombinacije imunoterapije zahtijevati personalizirani pristup (144). Ispituju se i onkolitički virusi. To su inženjerski virusi koji specifično inficiraju i ubijaju stanice tumora. Ovi virusi mogu izravno uništiti tumorske stanice inducirajući lizu tumora putem sistemskog imunološkog odgovora. Primjer je T-VEC (tj. Talimogen laherparepvec), modificirani virus herpes simpleksa i onkolitički virus kojega je

odobila FDA za kožni melanom, a modificiran je da eksprimira GM-CSF i stoga povećava funkciju dendritičnih stanica, dovodeći potom do učinkovitijeg odgovora posredovanog T-stanicama protiv stanica tumora. Rana klinička ispitivanja s T-VEC-om istražuju njegovu upotrebu u liječenju metastatskog UM-a. Uz T-VEC, istražuju se i drugi onkolitički virusi, poput koksakivirusa i HF-10, za potencijalnu upotrebu kod kožnog melanoma i potencijalno bi se mogli primijeniti i na UM. Nedavno su uspješni citotoksični učinci onkolitičkog soja virusa ECHO-7 demonstrirani u UM (147).

Pokazalo se da onkolitički virus HSV-EGFP reflektira osjetljivost i citotoksičnost prema staničnim linijama UM 92-1, MUM2B i MP41, a dodatni rezultati sugeriraju da je onkolitički HSV-1 učinkovit u liječenju UM-a in vitro i in vivo (148). Tekuća istraživanja drugih onkolitičkih virusa uključuju kliničko ispitivanje faze I u klinici Mayo, istražujući vektore virusa vezikularnog stomatitisa (VSV) koji ekspimiraju interferon (IFN) β i protein 1 povezan s tirozinazom (TYRP1) kod prethodno liječenih pacijenata s metastatskim UM-om (149). Studija je pokazala kliničku sigurnost VSV-IFN β -TYRP1 u ciljanoj populaciji i imunogenost doze i odgovora na TYRP1 (149). Značajno područje interesa je kombinacija onkolitičkih virusa s inhibitorima kontrolnih točaka (150). Cilj je poboljšati ukupni imunološki odgovor protiv UM-a osiguravajući početnu aktivaciju imunološkog sustava putem virusne infekcije i trajnu aktivaciju blokadom kontrolnih točaka. Unatoč ograničenom broju trenutnih kliničkih ispitivanja, onkolitički virusi predstavljaju novu terapijsku strategiju za pacijente s metastatskim uvealnim melanomom.

U novije vrijeme, konjugati lijekova sličnih virusima (VDC) pokazali su veliki potencijal za selektivnu dostavu lijekova tumorskim stanicama. Klinički primjer za liječenje UM-a su VDC-i Belzupacav Sarotalokana (AU-011), sastojeći se od fotosenzibilizatora koji citotoksični učinak ima nakon aktivacije fotodinamskim laserom. Trenutno je u fazi 3 kliničkih ispitivanja. AU-011 (od Aura Biosciences) pokazao je adekvatan sigurnosni profil nakon suprahoroidalne primjene (151). Predložene su višestruke kliničke primjene AU-011 za male melanome (152).

Terapija adoptivnim T-stanicama (ACT – eng. *Adoptive Cell Therapy*) napredna je personalizirana imunoterapija u kojoj se ekstrahiraju pacijentove vlastite T-limfociti, genetski modificiraju i ponovno infuziraju u pacijenta. Koristi se kod više vrsta tumora i kod melanoma, uključujući i uvealni melanom. Posebno za UM, ova terapija koristi tumor-infiltrirajuće hlimfocite (TIL), kao i genetski modificirane T-stanice (153). TIL-ovi se ekstrahiraju iz resekiranih tumorskih tkiva. Limfociti se pripremaju za prepoznavanje antigena povezanih s tumorom, uzgajaju in vitro u prisutnosti IL-2 i ponovno uvode u pacijenta (154). Zatim su u

stanju prepoznati tumorske stanice i potom ih uništiti. Kada se TIL-ovi uklone iz svog tumorskog mikrookruženja, pokazali su uspješnu ekspanziju zajedno s UM-reaktivnim T-stanicama, što sugerira da se terapija T-stanicama može koristiti kao adjuvantni tretman kod UM-a s visokim rizikom od metastaza (155). Nedavna ispitivanja istražila su učinkovitost TIL terapije kod metastatskog UM-a. Studija faze II pokazala je da se značajna regresija tumora može izazvati u podskupini pacijenata s TIL terapijom, sugerirajući da se tumorsko mikrookruženje UM-a može manipulirati kako bi se pojačali antitumorski odgovori posredovani T stanicama (153). CAR T stanična terapija uključuje himerne antigenske receptore (CAR), koji nativno prenose signale slične onima iz aktiviranih T-staničnih receptora (156). Nakon toga se genetski modificiraju da bi uništile tumorske stanice. Novi humanizirani mišji model pokazao je da CAR T-stanice mogu uništiti stanice melanoma otporne na ACT autolognih TIL-ova, implicirajući održivu opciju terapije kada UM ne reagira na standardnu terapiju (157).

Genska terapija predstavlja vrhunski pristup usmjeren na ispravljanje genetskih defekata doprinoseći razvoju UM-a. Kod uvealnog melanoma genska terapija je još uvijek uglavnom u fazi istraživanja i kliničkih studija, ali nekoliko strategija pokazuje obećanje. Terapija suicidalnim genima podrazumijeva uvođenje gena u stanice tumora kako bi se povećala njihova osjetljivost na prolijevak. Posebno je povoljno selektivno ciljati tumorske stanice, a istovremeno izbjegavati oštećenje zdravih tkiva.

RNA interferencija (RNAi) biološki je proces u kojem molekule RNA inhibiraju ekspresiju gena, obično uzrokujući uništavanje specifičnih molekula mRNA (158). Male interferirajuće RNA (siRNA) i mikroRNA (miRNA) koriste se za ciljanje i utišavanje gena koji su ključni za rast i preživljavanje tumora. U uvelanom melanomu pokušava blokirati ključne mutirane gene poput GNAQ i GNA11. Iako još nije standardna terapija, predstavlja vrlo precizan i obećavajući pristup, posebno zbog mogućnosti lokalne primjene u oku. Lnc RNA (tj. Duge nekodirajuće RNA) međusobno djeluju s više proteina, kao i s DNA, često djelujući kao nosači ili vodiči (159). Druga miRNA s dokazanim terapijskim potencijalom u liječenju UM-a je miR-181a, za koju se pokazalo da je jedina smanjena miRNA među tri studije ekspresije miRNA (160-163). Inhibitori YAP signalnog puta ključni je protein koji pokreće rast tumora kod uvealnog melanoma. Eksperimentalni lijekovi pokušavaju blokirati YAP aktivaciju i zaustaviti proliferaciju tumorskih stanica.

Liječenje uvealnog melanoma predstavlja brojne izazove zbog visokog metastatskog potencijala primarno u jetru. Mogućnosti liječenja metastaza u jetri su kirurška resekcija metastaza, radioembolizacija (Y-90), TACE – trans arterijska embolizacija, izolirana jetrena

perkutana perfuzija. Jedinstvene značajke uvealnog melanoma ograničavaju, a budućnost liječenja leži u integraciji lokalnih mjera kontrole sa sistemskim terapijama, uključujući imunoterapiju i gensku terapiju, prilagođene na temelju genetskog i molekularnog profiliranja tumora. Rano otkrivanje i liječenje metastatske bolesti ključni su za poboljšanje ishoda pacijenata.

1.3.9. Prognoza uvealnog melanoma

Nažalost, metastatski uvealni melanom ima lošu prognozu i medijan preživljenja ~ 12 mjeseci bez modernih terapija. Prognoza zavisi od veličine tumora, lokalizacije te genetskih karakteristika tumora. Širenje može zahvatiti skleru, optički živac i prednju očnu komoru kao ekstraokularno tkivo. Ekstraokularna ekstenzija značajno pogoršava prognozu. Bitni prediktori loše prognoze su AJCC stadij III i poremećaj u kopiji kromosoma 3 (3, 75, 76, 164).

Povoljniju prognozu imaju melanomi šarenice koji se povezuju sa oštećenjem ultraljubičastim zračenjem. Razliku čine melanomi žilnice i cilijarnog tijela koji nisu povezani s ultraljubičastim zračenjem, ali se kod njih pokazuju određeni evolucijski onkogeni događaji. (165).

Genetsko profiliranje tumora (GEP) predstavlja koristan alat u određivanju prognoze tumora. Genetsko profiliranje tumora kod uvealnog melanoma je analiza DNA tumorskih stanica kako bi se procijenio rizik metastaza, prognoza i moguće terapije. Danas je to jedan od najvažnijih dijelova dijagnostike ove bolesti jer genetske promjene tumora snažno određuju rizik metastaza, brzinu napredovanja bolesti, izbor terapije i potrebu za intenzivnijim praćenjem. Za razliku od mnogih drugih tumora, genetski profil je jači prognostički faktor od veličine tumora. Najvažniji geni koji se analiziraju su BAP1 kao najvažniji prognostički faktor čija mutacija znači visoki agresivnost i rizik metastaza. Mutacija u genu GNAQ koja se javlja u 45 – 50 % slučajeva aktivira signalne puteve rasta tumora, dok je mutacija GNA11 (30 – 40 %) povezana s aktivacijom PKC i MAPK signalnih puteva. Srednji rizik metastaza i njihovo kasnije javljanje vezano je za mutaciju SF3B1 gena, dok mutacija EIF1AX gena znak je niskog rizika metastaza i bolje prognoze. Klasifikacija uvealnog melanoma prema genetskom profilu razlikuje dvije klase A i B. Unutar A klase razlikuju se dvije podklase GEP 1A (s najnižim rizikom metastaza 2 – 5% u 5 godina.), GEP 1B (sa srednjim rizikom 20 %). GEP 2 ima veliki rizik metastaza i povezana je s poznatim prognostičkim rizicima kao što su starija životna dob bolesnika, veći promjer i debljina tumora, zahvaćenost cilijarnog tijela i miješani/epitelioidni tip stanica (166). Osim toga, čini se da i upala ima ulogu u progresiji uvealnog melanoma (167). Zbog svega navedenog te i visokog rizika metastaza, važan je multidisciplinarni pristup

pacijentima s uvealnim melanomom. Tim bi trebao uključiti oftalmologa, onkologa uz redovite oftalmološke preglede koji podrazumijevaju fotografiranje fundusa te ultrazvučni pregled bulbusa. Važno je pratiti i laboratorijske parametre funkcije jetre i markera S100b svakih 3 – 6 mjeseci, koji su se pokazali kao dobri markeri u praćenju i procjeni metastatske bolesti te RTG pluća i UZV (ili CT) abdomena svakih 3 – 6 mjeseci (168). Marker S100b i LDH su se pokazali kao dobri markeri u praćenju i procjeni metastatske bolesti (169).

Podaci o ekspresiji proteina meglina, cubilina, caveolina-1, GIPC1 i DAB2IP u tkivima ljudskog oka u literaturi su ograničeni. Dosadašnja istraživanja uglavnom su provedena na eksperimentalnim životinjskim modelima, zbog čega je njihova uloga u fiziološkim i patološkim procesima ljudskog oka nedovoljno razjašnjena. Posebno je malo studija koje analiziraju njihovu ekspresiju u kontekstu tumora oka.

Sustavno ispitivanje ekspresije navedenih proteina u tkivima zdravog oka te u tumorskim tkivima, poput retinoblastoma i uvealnog melanoma, moglo bi doprinijeti boljem razumijevanju molekularnih mehanizama uključenih u razvoj i progresiju ovih malignih bolesti.

Ovo istraživanje će analizirati ekspresiju meglina, cubilina, caveolina-1, GIPC1 i DAB2IP u tkivima zdravog ljudskog oka te u tkivima retinoblastoma i uvealnog melanoma, kao i utvrditi postoje li razlike u njihovoj ekspresiji između fizioloških i patoloških stanja. Cilj istraživanja bio je razjasniti biološku ulogu meglina, cubilina, caveolina-1, GIPC1 i DAB2IP, s obzirom na to da bi u budućnosti mogli imati potencijal kao dijagnostički ili prognostički biomarkeri, ali i moguće terapijske mete u liječenju najčešćih tumora oka, retinoblastoma i uvealnog melanoma, čije liječenje i dalje predstavlja značajan izazov u suvremenoj medicini.

1.4. Ispitivni proteini

Unatoč napretku u genetici i slikovnim metodama, molekularne odrednice koje stoje u podlozi okularne tumorigeneze I podtip-specifičnog ponašanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene (170).

Poremećena endocitoza i transport hranjivih tvari doprinose inicijaciji i progresiji tumora (171). Megalin (LRP2) i Cubilin (CUBN) više ligandin su endocitni receptori ključni za epitelni transport hranjivih tvari i proteina vezanih uz prijenosnike, uključujući intrinzični factor – vitamin B12, albumin i protein koji veže vitamin D (172, 173). Kao koreceptori, LRP2, CUBN posreduju kod unosa albumina i lipoproteina u apsorptivnim epitelima (174, 175). Promijenjena ekspresija povezana je s dediferencijacijom i kliničkim ishodima u humanim karcinomima (176). Ipak, njihova raspodjela i funkcija u okularnim tumorima ostaju

nedovoljno definirane, unatoč signalnoj kontroli ovisnoj o LRP2 i ključnoj ulozi endocitne homeostaze u oku (177, 178).

1.4.1. LRP2 (Protein povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće 2) – megalin

LRP2 endocitni je receptor iz obitelji LDL receptora, identificiran kao gp330 u bubregu štakora (179). Lokalizira se apikalno u apsorptivnim epitelima kako bi internalizirao ligande (albumin, lipoproteine) te surađuje s CUBN u unosu hranjivih tvari (174, 175). U karcinomu LRP2 pokazuje kontekstualnu ovisnost: melanomi stječu ekspresiju LRP2, a njegovo utišavanje smanjuje proliferaciju, dok ga nekoliko epitelnih karcinoma epigenetski utišava, pri čemu je niska ekspresija povezana s dediferencijacijom i lošim preživljenjem (171). U okularnim tkivima (pigmentni epitel mrežnice, cilijarno tijelo) LRP2 eksprimiran je i modulira aktivnost signalnog puta SonicHedgehog na perifernom dijelu mrežnice, što ga povezuje s okularnom tumorigenezom (177, 178).

1.4.2. Cubilin

Cubilin je veliki periferni endocitni receptor koji veže intrinzični faktor vitamin B12 i povezuje se s transmembranskim receptorom LRP2 (172, 173). Suradnja Megalina i Cubilina posreduje epitelni unos proteina vezanih uz prijenosnike, uključujući albumin i protein koji veže vitamin D (173). Promijenjena ekspresija CUBN ima prognostički značaj u karcinomima; gubitak CUBN predviđa lošije ishode u karcinomu bubrežnih stanica svijetlog tipa (176). Suprotno tomu, membranska pozitivnost CUBN predviđa bolji terapijski odgovor i preživljenje pri primjeni inhibitora tirozin kinaza (176, 180). Povišena ekspresija CUBN također je povezana s nepovoljnijom prognozom u kolorektalnom karcinomu (181). Ove uloge potiču procjenu CUBN kao kontekstualno ovisne odrednice obrade hranjivih tvari i tumorskog ponašanja u okularnim malignitetima.

1.4.3. Caveolin-1

Caveolin-1 (CAV1) glavni je strukturni protein kaveola, plazmatskih membranskih invaginacija uključenih u endocitozu, mehanotransdukciju, homeostazu lipida i prijenos signala (182-184). U karcinomu CAV1 pokazuje izraženu kontekstualnu ovisnost: u nekim okolnostima potiskuje rast primarnog tumora, dok u drugima potiče invaziju i metastaziranje, ovisno o tipu stanice, stadiju i mikrookolišu (185, 186). U melanomu je CAV1 osobito povezan s poticanjem metastaza u eksperimentalnim modelima te je povezan s rizikom metastaziranja

kod bolesnika (185). S obzirom na tu dvojnost, opravdano je profilirati CAV1 u okularnim tumorima, budući da su primarne studije u uvealnom melanomu povezale ekspresiju CAV1 s PI3K signalizacijom i vaskulogenom mimikrijom te pokazale različite obrasce ekspresije u odnosu na kožni melanom (187).

1.4.4. GIPC1 (GAIP-interagirajući protein, C-terminal 1)

Osim endocitnih receptora i membranskih skela, GIPC1 djeluje kao adaptor koji povezuje transmembranske receptore s mehanizmima unutarstaničnog transporta i citoskeletnim aparatom (188, 189). Regulira recikliranje receptora i signalizaciju kroz puteve PDGFR/PI3K–AKT te neuropilin–RhoA, oblikujući proliferaciju, pokretljivost i invaziju (190). GIPC1 prekomjerno je eksprimiran i funkcionalno aktivan u modelima karcinoma dojke, jajnika i gušterače, gdje potiče rast i migraciju (191, 192). U okularnim tumorima dokazi su ograničeni: studije uvealnog melanoma impliciraju os NRP1–GIPC1 bez sustavnih analiza ekspresije, a većina okularnih istraživanja usmjerena je na razvojne uloge, a ne na malignitet (193).

1.4.5. DAB2IP (Protein koji interagira s Disabledhomologom 2)

Naposljetku, DAB2IP tumor supresorski je protein koji ograničava signalizaciju PI3K–AKT, NF- κ B i izvanstanične signalne regulirane kinaze (ERK), regulirajući apoptozu, epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) i invaziju u različitim karcinomima, uključujući karcinom prostate, kolorektalni i želučani karcinom (194-196). Epigenetsko utišavanje metilacijom promotora ili represija posredovana onkogenim mikroRNA molekulama često smanjuje ekspresiju DAB2IP, što je povezano s dediferencijacijom, terapijskom rezistencijom i lošijim ishodima (197, 198). Unatoč tim opsežnim dokazima, obrasci ekspresije, funkcionalni učinak i prognostička vrijednost ovog gena u okularnim tumorima ostaju nedovoljno karakterizirane, što opravdava sustavnu evaluaciju u retinoblastomu i uvealnom melanomu (199).

Zajedno, endocitoza posredovana Megalinom–Cubulinom, membranska signalizacija posredovana CAV1 te adaptor/tumor supresorske osi (GIPC1, DAB2IP) definiraju mehanizme koji mogu upravljati diferencijacijom, metaboličkom opskrbom i invazijom u okularnim tumorima. Međutim, njihove uloge u oku još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene. U ovom radu profiliramo LRP2, CUBN, CAV1, GIPC1 i DAB2IP u normalnim humanim okularnim tkivima, retinoblastomu i histopatološkim podtipovima uvealnog (koroidalnog) melanoma, integrirajući proteinsku ekspresiju s javno dostupnim transkriptomskim podacima i podacima o preživljenju.

Ispitujemo koreliraju li podtip-specifični porasti ili gubici ekspresije s histopatologijom i kliničkim ishodima.

2. Ciljevi istraživanja

Unatoč značajnom napretku u razumijevanju molekularnih mehanizama nastanka i progresije okularnih malignih tumora, brojni procesi uključeni u njihovu patogenezu još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Posebno je ograničeno znanje o ulozi proteina uključenih u procese endocitoze, staničnog transporta i signalne transdukcije u razvoju i progresiji retinoblastoma i uvealnog melanoma. Analiza ekspresije takvih proteina može doprinijeti boljem razumijevanju molekularnih promjena koje prate tumorigenezu oka te potencijalno identificiraju nove biomarkere ili terapijske ciljeve. Stoga je ovo istraživanje usmjereno na ispitivanje ekspresijskog profila odabranih proteina u malignim tumorima oka i njihovu usporedbu sa zdravim očnim tkivom.

2.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi obrazac ekspresije proteina LRP2, cubilin, CAV1, GIPC1 i DAB2IP u tkivima retinoblastoma i uvealnog melanoma te ga usporediti s njihovom ekspresijom u zdravom ljudskom oku. Istraživanje je usmjereno na procjenu razlika u razini i distribuciji ekspresije ovih proteina između malignih okularnih tumora i normalnog očnog tkiva, kao i na analizu mogućih razlika između pojedinih histopatoloških podtipova uvealnog melanoma. Dodatni cilj bio je procijeniti potencijalnu povezanost ekspresije navedenih proteina s biološkim značajkama tumora i kliničkim ishodima korištenjem histoloških analiza i dostupnih transkriptomskih podataka.

2.2. Hipoteza

Hipoteza ovog istraživanja jest da je ekspresija proteina uključena u procese endocitoze, staničnog transporta i signalne transdukcije, uz LRP2, cubilin, CAV1, GIPC1 i DAB2IP, značajno promijenjena u malignim tumorima oka u odnosu na zdravo očno tkivo. Pretpostavlja se da retinoblastom i uvealni melanom pokazuju specifične i međusobno različite obrasce ekspresije navedenih proteina te da bi takve promjene mogle odražavati poremećaje molekularnih mehanizama uključenih u tumorigenezu, progresiju bolesti i metastatski potencijal, što može upućivati na njihov potencijalni dijagnostički i prognostički značaj.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci tkiva i priprema

Formalinom fiksirana i parafinom uklopljena (FFPE) humana tkiva oka dobivena su iz Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split. Uzorci su uključivali histološki normalne kontrolne uzorke ($n = 10$) te patološke uzorke dijagnosticirane kao RB ($n = 10$) ili podtipove melanoma (epitelni, miksoidni, vretenasti; $n = 30$). Kontrolna tkiva potjecala su iz enukleiranih očiju uklonjenih zbog ne-neoplastičnih stanja ili iz histološki normalnih regija očiju odstranjenih zbog RB-a ili melanoma, što je potvrdio patolog. Istraživanje je provedeno uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (oznaka protokola: klasa 500-03/22-01/47; br. 2181-147/01/06/M.S.-22-02; datum odobrenja 31. ožujka 2022. godine) u skladu s Helsinškom deklaracijom i njezinim izmjenama (200).

Nakon kirurške ekscizije, uzorci tkiva su uronjeni u 4 %-tnu paraformaldehidnu otopinu pripremljenu u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS) te fiksirani najmanje 24 sata na sobnoj temperaturi. Provedena je standardna histološka obrada, uključujući postupnu dehidraciju u rastućim koncentracijama etanola, pročišćavanje u ksilenu te uklapanje u parafinski vosak. Parafinski blokovi rezani su na presjeke debljine 5 μm u transversalnoj ravnini pomoću rotacijskog mikrotoma (RM2125 RTS, Leica, Buffalo Grove, IL, SAD) te montirani na pozitivno nabijena stakalca radi osiguravanja optimalne adhezije. Prije imunohistokemijske analize, stakalca su čuvana na sobnoj temperaturi u kontroliranom suhom okruženju radi očuvanja morfologije tkiva i antigenosti. Odgovarajuća očuvanost tkiva potvrđena je bojenjem hematoksilinom i eozinom (H&E) svakog desetog reza.

Uzorci RB-a analizirani su na mutacije gena RB1, dok su uzorci melanoma ispitani na mutacije BRAFV600E, BRCA2, CDK4, CDKN2A, PTEN i TP53. Genetski probir proveden je Sangerovim sekvenciranjem za BRAFV600E i *hotspot* regije TP53 te PCR metodama s alel-specifičnim početnicama za preostale gene. Kromatogrami sekvenci analizirani su pomoću programa Chromas (inačica 2.6.6; Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australija), a mutacije s učestalošću varijantnog alela ≥ 20 % smatrane su pozitivnima. U ovom istraživanju nisu korištene FISH ni NGS metode. Nijedan od analiziranih uzoraka nije sadržavao ispitivane mutacije. Za analizu su odabrana isključivo dobro očuvana tkiva, što su potvrdila dva neovisna patologa vanjskim i mikroskopskim pregledom, dok su macerirani ili loše očuvani uzorci isključeni (3 od ukupno 50 uzoraka, stopa isključenja 6 %). Sklad među patolozima u procjeni kvalitete tkiva iznosio je 100 %. Radi dodatne potvrde integriteta tkiva, svaki blok podvrgnut je standardnom bojenju hematoksilinom i eozinom prije uključivanja u istraživanje.

3.2. Imunofluorescentno bojenje

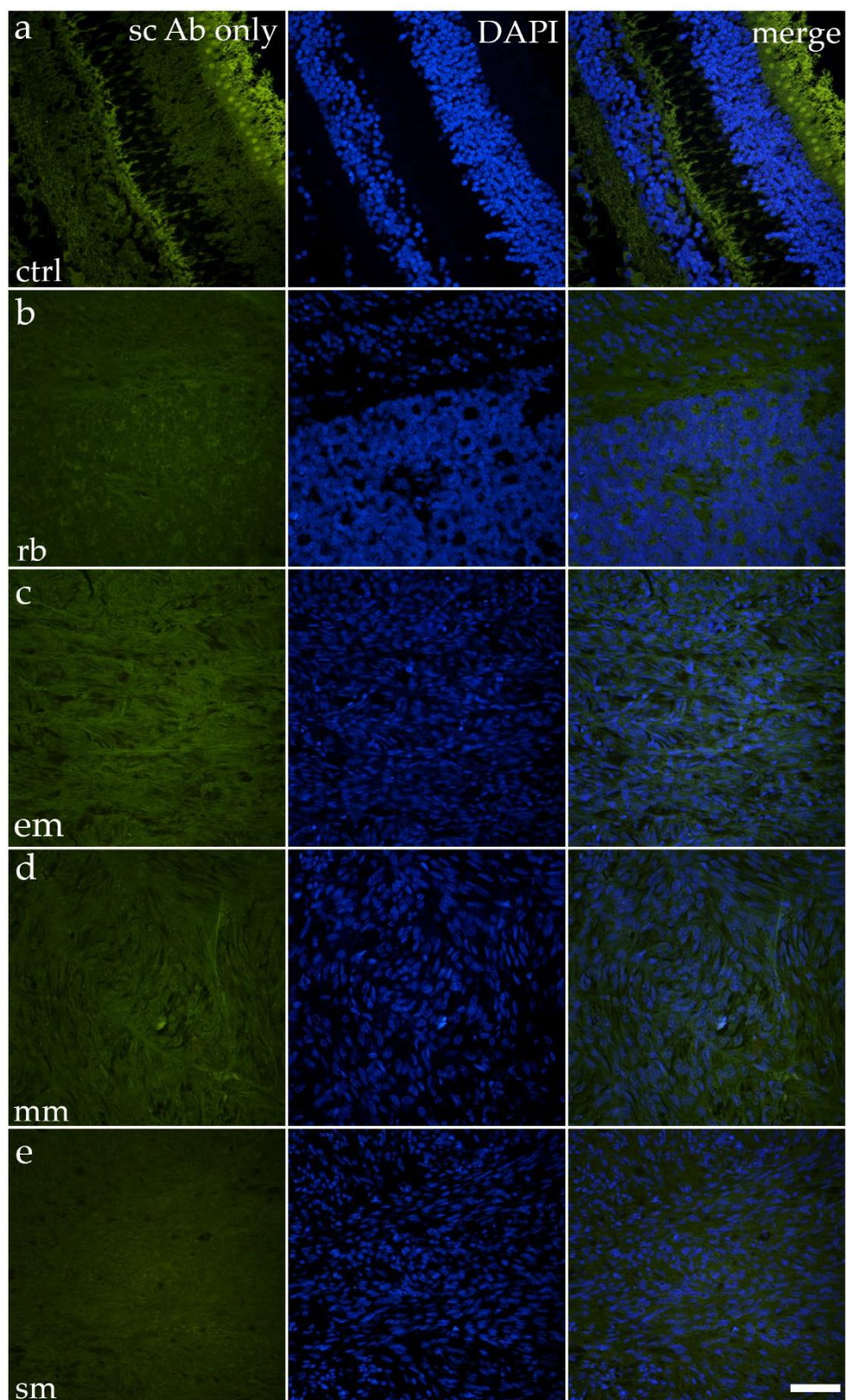
Imunofluorescentno bojenje provedeno je prema utvrđenim protokolima (201-203). Ukratko, presjeci tkiva deparafinizirani su u ksilenu (tri ispiranja po 10 minuta) i rehidrirani kroz silazne koncentracije etanola (100 %, 96 %, 70 %) prije uranjanja u destiliranu vodu (204). Toplinski inducirana retrakcija epitopa provedena je u 0,01 M citratnom puferu (pH 6,0) pri 95 °C tijekom 30 minuta u parnoj kupelji. Presjeci su najprije tretirani otopinom za blokiranje proteina (ab64226, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) tijekom 20 minuta, nakon čega su isprani u 0,1 M PBS-u radi smanjenja nespecifičnog vezanja. Zatim su primijenjena primarna protutijela (Tablica 1) i inkubirana preko noći u vlažnoj komori (StainTray sustav za bojanje preparata; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Sljedećeg dana, nakon ispiranja u PBS-u, presjeci su inkubirani 1,5 sat s odgovarajućim sekundarnim protutijelima (Tablica 1.). Jezgre su obojene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) bojom nakon dodatnog ispiranja u PBS-u. Na kraju su uzorci osušeni na zraku i montirani pokrovnim stakalcem korištenjem medija Immuno-Mount (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD).

Tablica 1. Antitijela korištena za imunofluorescenciju.

	Protutijela	Kataloški broj	Domaćin	Razrijeđenje	Izvor
Primarna	protu-Lrp2/Megalin protutijelo	ab76969	kunić	1:250	Abcam, Cambridge, UK
	Cubilin Antibody	#AF3700	ovca	1:50	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
	Caveolin-1 (D46G3) XP [®] monoklonalno	#3267S	kunić	1:300	Cell Signaling Technology (CST), Danvers, MA, USA
	Gipc1 poliklonalno	14822-1-AP	kunić	1:100	Proteintech Group, Inc., Rosemont, IL, USA
	Dab2IP poliklonalno	23582-1-AP	kunić	1:50	Proteintech Group, Inc., Rosemont, IL, USA
Sekundarna	Alexa Fluor [®] 488 AffiniPure [™] magareće protu-kunuićije IgG (H + 152 L)	711-545-	magarac	1:300	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

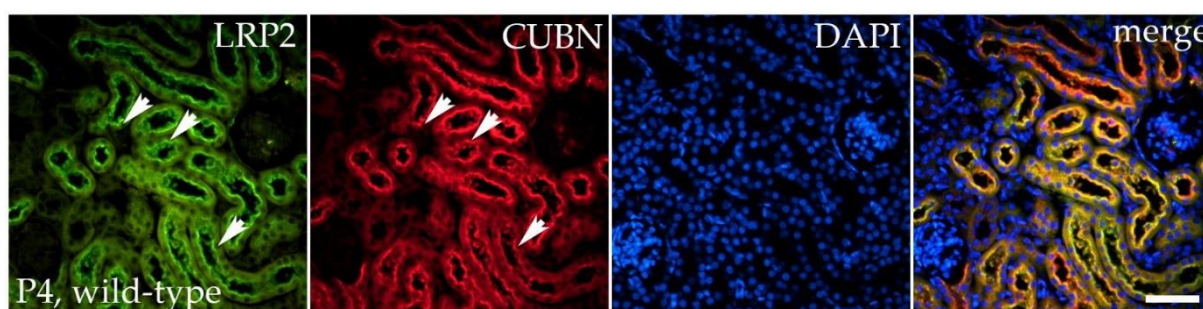
Protutijela	Kataloški broj	Domaćin	Razrijeđenje	Izvor
Alexa Fluor® 488 Affini-Pure™ magareće protu-ovčje IgG (H + L)	713-545-003	magarac	1:300	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

Radi utvrđivanja specifičnosti imunofluorescentnog bojenja i smanjenja nespecifične pozadinske fluorescencije korištene su izotipski odgovarajuće kontrole, kontrole samo sa sekundarnim protutijelom te pozitivne kontrole. U izotipski odgovarajućim kontrolama primarno protutijelo zamijenjeno je netargetnim protutijelom iste izotipske klase radi procjene mogućeg nespecifičnog vezanja. Kontrole samo sa sekundarnim protutijelom, u kojima primarno protutijelo nije primijenjeno, korištene su za otkrivanje nespecifičnih interakcija sekundarnog protutijela (Slika 1). Pozitivne kontrole uključivale su tkiva s poznatim obrascima ekspresije: korteks bubrega divljeg tipa miša u postnatalnom danu 4 (P4) za LRP2 i CUBN (Slika 2) te za CAV1, GIPC1 i DAB2IP (Slika 3). Sva protutijela validirana su na formalinom fiksiranom i parafinom uklopljenom (FFPE) humanom tkivu uz optimiziranu toplinski induciranu retrakciju epitopa kako bi se osigurala kompatibilnost i unakrsna reaktivnost.

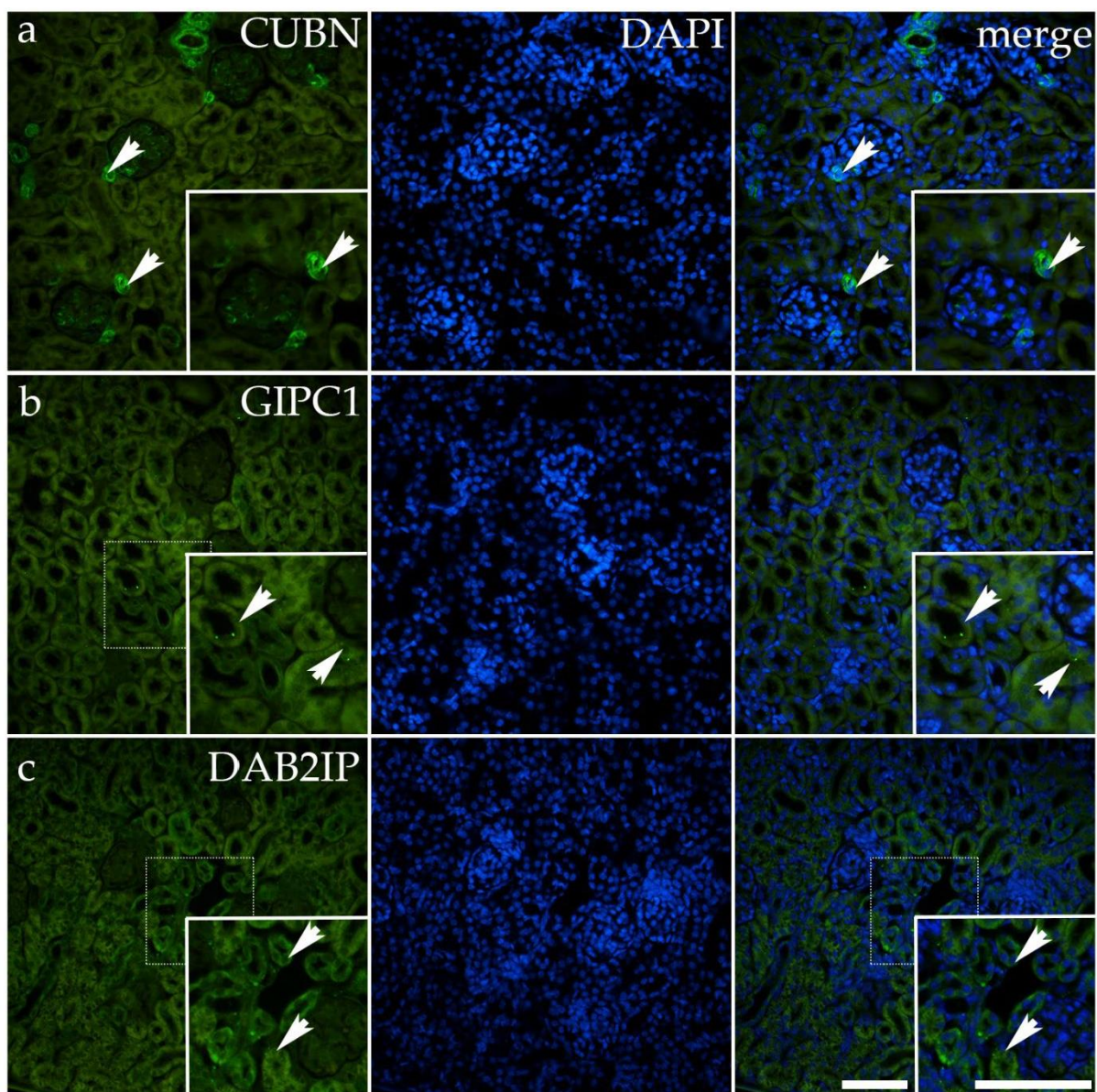


Slika 1. Imunofluorescentno bojenje negativne kontrole (samo sekundarno antitijelo). Reprezentativne slike presjeka negativne kontrole obrađenih samo sekundarnim antitijelom (izostavljena primarna antitijela) u svim vrstama tkiva. Lijevi stupac: Zeleni fluorescentni kanal (Alexa Fluor 488) koji pokazuje odsutnost specifičnog signala. Srednji stupac: DAPI nuklearna

kontrastna boja. Desni stupac: Spojeni kanali. (a) Kontrolno tkivo mrežnice (ctrl), (b) retinoblastom (rb), (c) epitelioidni melanom (em), (d) miksoidni melanom (mm) i (e) vretenasti melanom (sm). Treba napomenuti odsutnost specifičnog zelenog fluorescentnog signala u svim vrstama tkiva kada je primarno antitijelo izostavljeno, što pokazuje specifičnost antitijela i minimalno nespecifično vezanje sekundarnog antitijela. Opažena je samo slaba autofluorescencija, posebno u kontrolnom tkivu mrežnice (a), što je karakteristično za pigmentni epitel mrežnice koji sadrži lipofuscin i vanjske segmente fotoreceptora. Nizak pozadinski signal (<5% intenziteta pozitivne kontrole) potvrđuje specifičnost primarnih antitijela korištenih u ovoj studiji. Mjerilo: 50 μ m. Uvećanje: $\times 40$ (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).



Slika 2. Validacija pozitivne kontrole u tkivu mišjeg bubrega. Imunofluorescentno bojenje mišjeg bubrega divljeg tipa 4. dana nakon rođenja (P4) pokazuje očekivane obrasce ekspresije za LRP2 i CUBN. S lijeva na desno: LRP2 (zeleno, Alexa Fluor 488), CUBN (crveno, Alexa Fluor 594), DAPI nuklearna boja (plavo) i spojeni kanali. I LRP2 (vrhovi strelica) i CUBN (vrhovi strelica) pokazuju snažno, specifično bojenje apikalne membrane u epitelnim stanicama proksimalnih tubula, što je u skladu s njihovom utvrđenom ko - lokalizacijom i funkcijom kao multiligandnih endocitnih receptora u reapsorpciji bubrežnih tubula. Karakteristični uzorak četkaste granice (intenzivno apikalno bojenje s minimalnim citoplazmatskim ili bazalnim signalom) potvrđuje specifičnost antitijela i pravilnu subcelularnu lokalizaciju. Na spojenoj slici, ko ekspresija LRP2 i CUBN proizvodi žuto-narančastu fluorescenciju na apikalnoj membrani, odražavajući njihovo poznato funkcionalno partnerstvo u endocitozi posredovanoj receptorima. Mjerilo: 50 μ m. Povećanje: $\times 40$ (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).



Slika 3. Validacija pozitivne kontrole u tkivu mišjeg bubrega. Imunofluorescentno bojenje mišjeg bubrega divljeg tipa 4. dana nakon rođenja (P4) pokazuje očekivane obrasce ekspresije za (a) CUBN, (b) GIPC1 i (c) DAB2IP. Lijevi stupac: Zelena fluorescencija (Alexa Fluor 488); srednji stupac: DAPI nuklearna kontrastna boja; desni stupac: spojeni kanali. Umetci pokazuju veće povećanje uokvirenih područja. (a) CUBN pokazuje bojenje apikalne membrane (vrhovi strelica) u epitelnim stanicama proksimalnih tubula, što je u skladu s njegovom utvrđenom ulogom endocitnog receptora. Intenzitet signala je umjeren s karakterističnom lokalizacijom četkastog ruba. (b) GIPC1 pokazuje difuznu citoplazmatsku ekspresiju u epitelnim stanicama bubrežnih tubula (vrhovi strelica na umetku). Uzorak bojenja u skladu je s ulogom GIPC1 kao unutarstaničnog adapterskog proteina uključenog u transport receptora i vezikularni transport. (c) DAB2IP pokazuje citoplazmatsku ekspresiju u tubularnim epitelnim stanicama (vrhovi

strelica na umetku), s granularnim/točkastim uzorkom distribucije u skladu s njegovom funkcijom kao citoplazmatskog proteina skele. Dok ovi presjeci bubrega pokazuju niži intenzitet signala u usporedbi s očnim tkivima, specifični obrasci stanične lokalizacije potvrđuju specifičnost antitijela. Citoplazmatska distribucija GIPC1 i DAB2IP u suprotnosti je s lokalizacijom CUBN-a na apikalnoj membrani, što odražava njihove različite subcelularne funkcije. Mjerila: 50 μm (glavne ploče i umetci kao što je naznačeno) (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

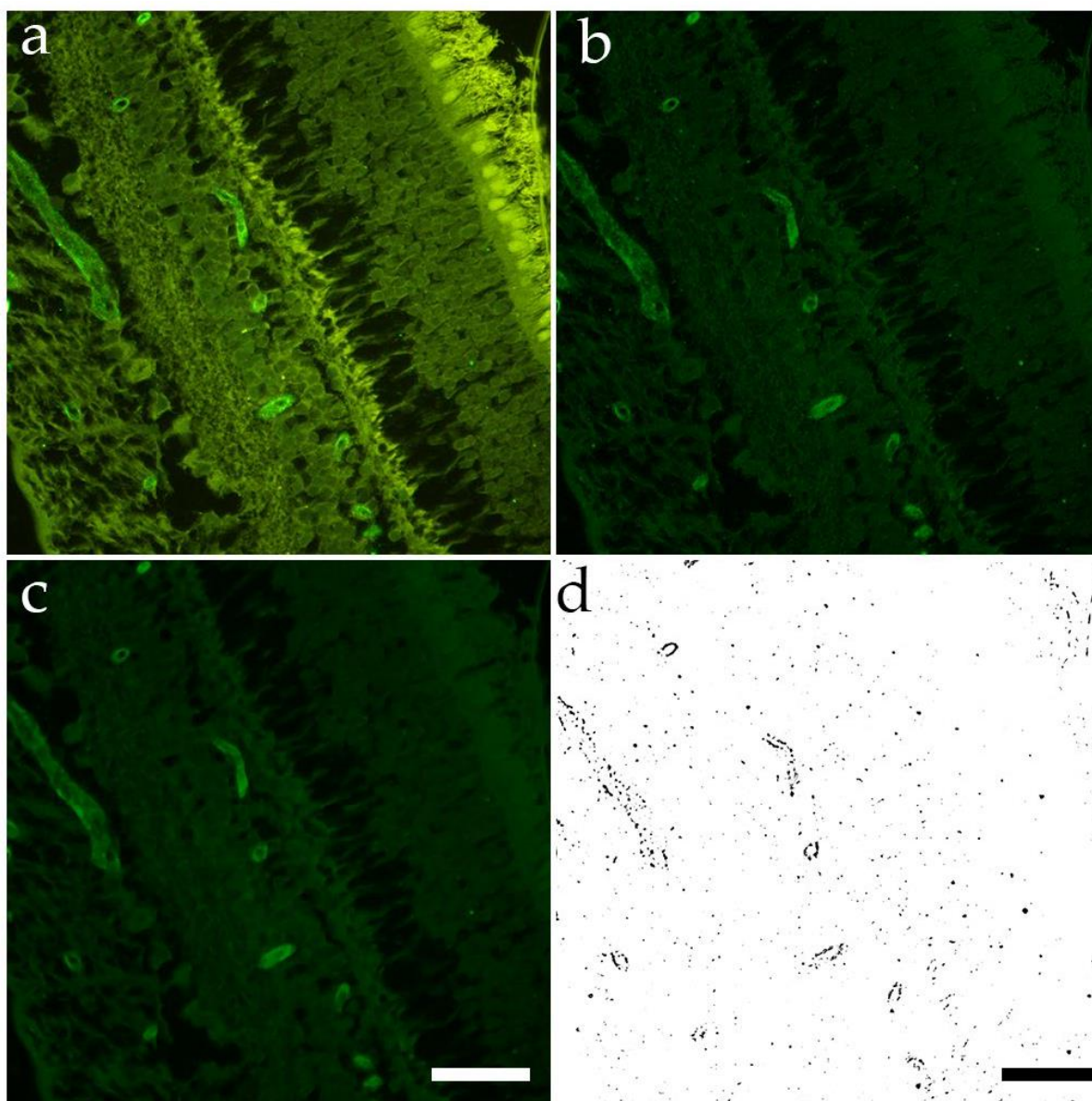
3.3. Prikupljanje podataka

Histološki preparati pregledani su svjetlosnim mikroskopom u svijetlom polju (CX43, Olympus, Tokio, Japan). Imunohistokemijski obojeni presjeci snimljeni su mikroskopom Olympus BX51 opremljenim kamerom Nikon DS-Ri2 (Nikon Corporation, Tokio, Japan) i programom NIS-Elements F (inačica 5.22.00). Sve mikrofotografije snimljene su pri povećanju $\times 40$. Kalibracija intenziteta signala standardizirana je u svim sesijama snimanja korištenjem fiksnog vremena ekspozicije, postavki pojačanja (gain) i parametara balansa bijele boje (205).

Za svaki uzorak tkiva ekspresija Megalina, Cubilina, Caveolina-1, GIPC1 i DAB2IP procijenjena je u deset reprezentativnih polja velikog povećanja (IF). Polja su odabrala tri istraživača koja nisu bila upoznata s dijagnozom uzorka, kako bi se smanjila pristranost uzorkovanja. Odabir polja vođen je digitalnim algoritmom preklapanja mreže unutar programa NIS-Elements AR (inačica 4.60; Nikon Instruments, Tokio, Japan), čime je osigurano nasumično i ravnomjerno uzorkovanje kroz tumorska i susjedna netumorska područja.

3.4. Analiza slike imunohistokemijskog bojanja

Obrada slike provedena je korištenjem programa ImageJ (inačica 1.54 g; National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD) i Adobe Photoshop (inačica 21.0.2; Adobe, San Jose, CA, SAD), u skladu s prethodno utvrđenim i validiranim protokolima (Slika 4) (206).



Slika 4. ImageJ kvantifikacijski cjevovod za analizu imunofluorescencije. Reprezentativni tijek rada obrade slike za kvantifikaciju CUBN imunofluorescencije u kontrolnom tkivu mrežnice, koji demonstrira standardizirani protokol analize ImageJ. (a) Izvorna sirova imunofluorescentna slika koja prikazuje ekspresiju CUBN-a (zeleno, Alexa Fluor 488). Snažno bojenje apikalne membrane vidljivo je u epitelu mrežnice. (b) Slika nakon oduzimanja crvenog protu-signalu kako bi se eliminiralo prelijevanje fluorescencije iz drugih kanala, izolirajući specifičnu zelenu fluorescenciju. (c) Slika s oduzimanjem pozadine nakon primjene

medijanskog filtera (radijus 7,0 piksela). Ovaj korak uklanja šum, a istovremeno čuva izvorni pozitivni signal, izolirajući specifičnu imunoreaktivnost od pozadinske fluorescencije. (d) Binarna slika nakon primjene praga korištenjem algoritma trokuta i pretvorbe u 8-bitni format. Crne čestice predstavljaju pozitivni fluorescentni signal iznad praga; bijela pozadina predstavlja negativna područja. Funkcija "Analiza čestica" u ImageJ-u kvantificira ta područja. (e) Sažetak ImageJ-a koji prikazuje rezultate kvantifikacije: Broj: 1809 (broj detektiranih diskretnih pozitivnih čestica), Ukupna površina: 26082 piksela (zbroy svih područja pozitivnog signala); Prosječna veličina: 14,418 piksela po čestici; %Površina: 1,009 (postotak ukupne površine slike koju zauzima pozitivni signal); Srednja vrijednost: 5,466 (srednja vrijednost intenziteta). Vrijednost %Površine (1,009%) predstavlja udio slike koji zauzima CUBN-pozitivni fluorescentni signal i primarna je metrika koja se koristi za statističke usporedbe među skupinama tkiva. Ovaj standardizirani, poluautomatizirani pristup osigurava objektivnu, ponovljivu kvantifikaciju u svim uzorcima. Mjerne trake: 50 μm (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

Svaka snimljena mikrofotografija obrađena je na sljedeći način: crveni kontrastni signal oduzet je od zelene fluorescencije radi smanjenja prelijevanja fluorescencije. Na duplicirane slike primijenjen je medijanski filter s radijusom od 7,0 piksela. Oduzimanjem filtriranih slika od izvornih, izoliran je pozitivni signal. Obradene slike potom su pretvorene u 8-bitni format i podvrgnute prilagodbi praga korištenjem algoritma praga *triangle*. Funkcija *Analyse Particles* korištena je za kvantifikaciju fluorescencije i utvrđivanje postotne površine fluorescencije. Ukratko, „postotak površine” predstavlja postotak slike koji zauzima pozitivni fluorescentni signal, izračunat dijeljenjem ukupnog broja piksela na slici s brojem fluorescentnih piksela koji prelaze zadani prag. Za svaku ispitivanu skupinu izračunata je srednja vrijednost rezultata. U područjima gdje je došlo do presavijanja tkiva, oštećenja ili izostanka tkiva, izračunati postotak obojenja odgovarajuće je prilagođen. Ta je korekcija uključivala mjerenje ukupnog broja piksela po slici te oduzimanje površine koja odgovara praznom prostoru pomoću alata Magic Wand u programu Adobe Photoshop (205, 207). Korigirani postotak korišten je u svim statističkim analizama.

Radi smanjenja pristranosti, ista tri histologa sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju (svaki s više od 20 godina iskustva) neovisno su analizirala obojene presjeke i postavila pragove na temelju slika negativnih kontrola, bez saznanja o identitetu slučaja ili eksperimentalnoj skupini (44). Pouzdanost među promatračima potvrđena je analizom intraklasne korelacije, pri čemu je koeficijent bio veći od 0,8, što ukazuje na visoku razinu podudarnosti (208).

3.5. Statistička analiza

Statističke analize provedene su korištenjem programa GraphPad Prism, inačica 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Normalnost podataka procijenjena je Shapiro–Wilkovim testom (209). Za usporednu analizu postotak pozitivno obojenih stanica za Megalin, Cubilin, Caveolin-1, GIPC1 i DAB2IP analiziran je među različitim skupinama (kontrola, RB, epitelni melanom, miksoidni melanom i vretenasti melanom) primjenom jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon čega je proveden Tukeyjev post hoc test radi procjene parnih razlika (209). Vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Prije prikupljanja podataka provedena je analiza snage testa korištenjem programa G*Power 3.1 radi određivanja odgovarajuće veličine skupina. Uz pretpostavku veličine učinka (f) od 0,6, $\alpha = 0,05$ i snage $(1 - \beta) = 0,8$, procijenjeni minimalni broj uzoraka po skupini iznosio je $n = 8$. Konačne veličine skupina ($n = 10$ za kontrolu i RB, $n = 30$ za podtipove melanoma zajedno) stoga su osigurale dostatnu statističku snagu za detekciju biološki značajnih razlika u izražaju proteina.

Kliničke kovarijable (dob, spol i anatomska lokalizacija) provjerene su u pogledu dostupnosti; međutim, ti podaci bili su nepotpuni u arhivskim slučajevima te stoga nisu uključeni u statistički model. Kako bi se smanjio potencijalni učinak zbunjujućih čimbenika, svi uzorci obrađeni su i analizirani pod identičnim eksperimentalnim uvjetima, a usporedbe među skupinama temeljile su se isključivo na histopatološkom podtipu.

Svi grafovi izrađeni su u programu GraphPad Prism 9.0.0, a kompozitne ploče slika konstruirane su u programu Adobe Photoshop 21.0.2. Mikrofotografije su optimizirane za prikaz primjenom korekcije pozadine i poboljšanja kontrasta uz očuvanje izvornih obilježja bojenja.

3.6. Transkriptomika

Analiza preživljenja na temelju statusa ekspresije Megalina (LRP2), Cubilina (CUBN), Caveolina-1 (CAV1), GIPC PDZ (eng. *domain containing family*, member 1 – GIPC1) i eng. *Disabled homolog 2-interacting protein* (DAB2IP) provedena je korištenjem standardnog postupka obrade javno dostupne baze Interaktivna analiza profiliranja ekspresije gena 2 (GEPIA2, <http://gepia2.cancer-pku.cn/>, pristupljeno 30. srpnja 2025. godine). Izvori podataka za analize provedene u GEPIA2 bili su skup podataka GDC TCGA Ocular Melanomas. Analiza

diferencijalne ekspresije provedena je primjenom jednosmjerne analize varijance (ANOVA) uz granične vrijednosti $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ i $p < 0,01$. Analiza ukupnog preživljenja provedena je na temelju ekspresije analiziranih gena, usporedbom najnižih i najviših 50 % za svaki gen korištenjem Log-rank testa, pri čemu je razina značajnosti postavljena na $p < 0,05$. Kaplan–Meierove krivulje ukupnog preživljenja konstruirane su u programu GEPIA2.

Bolesnici su stratificirani u dvije skupine (visoka i niska ekspresija) na temelju medijana ekspresije za svaki gen. Ukupno preživljenje (OS) uspoređeno je između skupina korištenjem Log-rank testa, pri čemu je $p < 0,05$ smatrano statistički značajnim. Analiza diferencijalne ekspresije u GEPIA2 provedena je primjenom jednosmjerne ANOVA-e, uz granične vrijednosti $|\log_2 \text{ fold change}| \geq 1$ i $p < 0,01$. Box-plot grafovi koji prikazuju razine genske ekspresije generirani su putem sučelja GEPIA2.

Omjeri hazarda (HR) i intervali pouzdanosti za univarijatnu analizu preživljenja preuzeti su iz izlaznih podataka GEPIA2. Kada GEPIA2 nije pružao eksplicitne 95 %-tne intervale pouzdanosti, oni su izračunati ručno korištenjem standardnih asimptotskih metoda: $\text{SE}(\log \text{HR}) = |\log(\text{HR})|/Z$, gdje Z odgovara kritičnoj vrijednosti izvedenoj iz prijavljene p-vrijednosti, a 95 % CI = $\exp(\log(\text{HR}) \pm 1,96 \times \text{SE}(\log \text{HR}))$. Analiza diferencijalne ekspresije unutar GEPIA2 provedena je primjenom jednosmjerne ANOVA-e uz pragove $|\log_2 \text{ fold change}| \geq 1$ i $p < 0,01$. Box-plot grafovi koji prikazuju razine genske ekspresije generirani su putem sučelja GEPIA2.

Radi smanjenja mogućih učinaka serijskih odstupanja i tehničke varijabilnosti svojstvene javnim skupovima podataka, platforme GEPIA2 i interaktivna analiza profiliranja ekspresije gena 3 (GEPIA3) primjenjuju standardizirane postupke normalizacije podataka i kontrole kvalitete izravno integrirane iz TCGA i GTEx postupaka obrade. Svi podaci o ekspresiji prethodno su obrađeni normalizacijom $\log_2 (\text{TPM} + 1)$, a korekcija serijskih odstupanja provedena je unutar harmoniziranog TCGA okvira podataka korištenjem UCSC Xena postupka obrade. Tehničke replike i duplicirani uzorci automatski se identificiraju i uklanjaju GEPIA algoritmom prije analize diferencijalne ekspresije i preživljenja, čime se osigurava da se rezultati temelje na neovisnim, kontroliranim podacima visoke kvalitete. Radi smanjenja mogućih učinaka serijskih odstupanja i tehničke varijabilnosti svojstvene javnim skupovima podataka, platforme GEPIA2 i GEPIA3 primjenjuju standardizirane postupke normalizacije podataka i kontrole kvalitete izravno integrirane iz TCGA i GTEx postupaka obrade. Svi podaci o ekspresiji prethodno su obrađeni normalizacijom $\log_2 (\text{TPM} + 1)$, a korekcija serijskih odstupanja provedena je unutar harmoniziranog TCGA okvira podataka korištenjem UCSC Xena postupka obrade. Tehničke replike i duplicirani uzorci automatski se identificiraju i

uklanjaju GEPIA algoritmom prije analize diferencijalne ekspresije i preživljenja, čime se osigurava da se rezultati temelje na neovisnim, kontroliranim podacima visoke kvalitete.

Multivarijatna Coxova regresijska analiza proporcionalnih hazarda provedena je korištenjem mrežne platforme GEPIA3 radi procjene prognostičkog utjecaja genske ekspresije na OS bolesnika s uvealnim melanomom iz TCGA-UVM kohorte. Analiza se usredotočila na razine ekspresije LRP2, CUBN, DAB2IP, GIPC1 i CAV1. Generirani su HR-a s pripadajućim 95 %-tnim intervalima pouzdanosti (CI), a Log-rank test primijenjen je radi procjene statističke značajnosti. Multivarijatno modeliranje omogućilo je procjenu djeluje li svaki gen kao neovisni prognostički čimbenik, uz prilagodbu za kliničke varijable dostupne u okviru GEPIA3, uključujući dob bolesnika, spol i stadij tumora. Forest-plot grafikon koji sažima HR i CI generiran je i preuzet iz sučelja GEPIA3.

3.7. Analiza diferencijalne genske ekspresije

Baza podataka Gene Expression Omnibus (GEO) Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (NCBI) sadržava skupove podataka iz različitih eksperimenata, omogućujući korisnicima preuzimanje profila genske ekspresije (210). U potrazi za GEO skupovima podataka s povezanim profilima genske ekspresije koristili smo ključne riječi *uveal melanoma*, *Homo sapiens* i *Expression profiling by array*, čime su dobivene 32 dostupne studije. Odabrali smo seriju GSE62075 (*Characterization of the human $\alpha 9$ integrin subunit gene: promoter analysis and transcriptional regulation*), koja uključuje podatke o genskoj ekspresiji iz 32 uzorka, obuhvaćajući primarne kulture humanih epitelnih stanica rožnice (HCEC; broj ponavljanja: 8), humane kožne epitelne stanice (HSEC; broj ponavljanja: 4), humane fibroblaste rožnice (HCFC; broj ponavljanja: 3), humane kožne fibroblaste (HSFC; broj ponavljanja: 3), humane uvealne melanocyte (UVM; broj ponavljanja: 3) te različite humane stanične linije uvealnog melanoma (T115, T142 i T143; broj ponavljanja: 2 – 3) (211). Analizirali smo dvije skupine: tri primarne kulture humanih uvealnih melanocita i tri stanične linije uvealnog melanoma s niskim brojem pasaža (T115, T142, T143). Preostale uzorke isključili smo jer nisu bili u fokusu našeg istraživanja. RNA je izolirana iz staničnih linija, a profiliranje genske ekspresije provedeno je korištenjem platforme Agilent SurePrint G3 Human GE 8×60 K microarray. Uzorci su označeni bojom Cy3, hibridizirani preko noći te skenirani uređajem Agilent SureScanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Siropi podaci obrađeni su programom Agilent Feature Extraction (inačica 11.5.1.1; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), a analiza diferencijalne genske ekspresije provedena je korištenjem

paketa LIMMA u programskom jeziku R. Za analizu sirovih podataka genske ekspresije koristili smo mrežni statistički alat GEO2R (210).

Za izračun prilagođenih p-vrijednosti korištena je metoda Benjamini i Hochberg (kontrola stope lažnog otkrića). Na podatke o ekspresiji primijenjene su funkcija *limma* precision weights (*vooma*) i kvantilna normalizacija (*limma* paket, inačica 3.28.14). Kontrola kvalitete RNA na razini uzorka provjerena je prema parametrima navedenima u izvornim GEO prijavama. Za GSE62075 svi uzorci zadovoljili su kriterije kvalitete koje su postavili autori koji su ih pohranili, uključujući broj integriteta RNA ($RIN \geq 7$), omjere apsorbancije A260/280 između 1,9 i 2,1 te uspješno prolazak Agilent spike-in hibridizacijskih kontrola. Za GSE208143 vrijednosti RIN (7,2–9,1), omjeri A260/280 (1,8–2,1) te metrički pokazatelji uspješnosti hibridizacije mikročipa (intenzitet pozadine, raspodjela signala i spike-in kontrole) potvrđeni su iz GEO metapodataka i Dodatnih QC datoteka. Svi uključeni uzorci zadovoljili su standardne Agilent mikročip QC pragove te su bili prikladni za daljnju analizu diferencijalne ekspresije.

Kako bismo identificirali gene koji su značajno diferencijalno eksprimirani u skupu podataka, primijenili smo sljedeće kriterije: $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ i $p < 0,05$. Povišeno eksprimirani geni definirani su kao oni s $\log_2FC \geq 1$, dok su sniženo eksprimirani geni određeni kao oni s $\log_2FC \leq -1$. Ovaj prag $\log_2FC (\geq 1/\leq -1)$, koji odgovara ≥ 2 -strukoj razlici u ekspresiji, unaprijed je definiran temeljem ustaljenih konvencija u analizama mikročipova i transkriptomike korištenjem paketa LIMMA, gdje takvi pragovi označavaju biološki značajne promjene uz istodobno smanjenje lažno pozitivnih rezultata (212).

Sve sirove matrice ekspresije provjerene su u pogledu kvalitete prije analize. Integritet uzoraka i učinkovitost hibridizacije provjereni su korištenjem AFE (eng. *Agilent Feature Extraction*) mjere kvalitete. Radi potvrde dosljednosti podataka i identifikacije mogućih odstupajućih vrijednosti, provedene su analiza glavnih komponenti (PCA) i hijerarhijsko klasteriranje (euklidska udaljenost, potpuno povezivanje) korištenjem programskog jezika R. Nisu identificirani odstupajući uzorci. Tehničke replike i mikročipovi niskog intenziteta (definirani kao srednji signal $< 1,5 \times$ pozadina) isključeni su prije normalizacije radi osiguravanja pouzdanosti podataka.

Podaci o profiliranju genske ekspresije preuzeti su iz GEO pristupnog broja GSE208143 (profil mRNA ekspresije u tumorima RB-a i pedijatrijskim kontrolama (213)). Studija je obuhvaćala devet enukleiranih humanih tumora RB-a i dvije pedijatrijske kontrole mrežnice, pri čemu je svaki uzorak obrađen u biološkom triplikatu (ukupno $n = 33$). Ukupna RNA izolirana je korištenjem Agilent Absolutely RNA miRNA kompleta, a kvaliteta je procijenjena pomoću uređaja Agilent TapeStation. Dvadeset pet nanograma RNA po uzorku označeno je

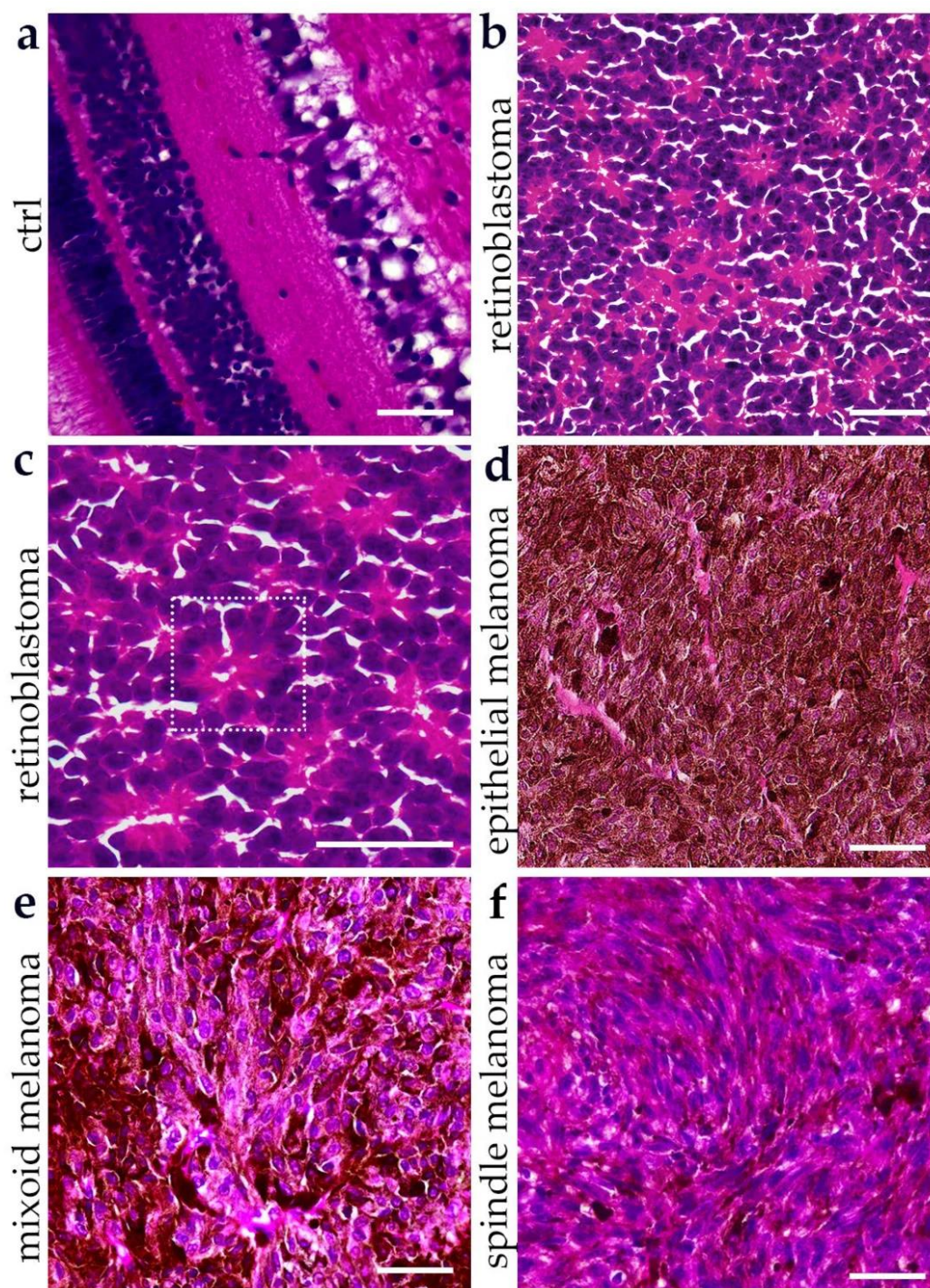
bojom Cy3 korištenjem Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit-a te hibridizirano prema jednobojnom Agilent mikročip protokolu. Sirovi podaci obrađeni su programom Agilent Feature Extraction (v11.5.1.1) i analizirani u programu GeneSpring GX v13.1. Diferencijalna ekspresija procijenjena je korištenjem neparnih T-testova uz Benjamini–Hochberg korekciju stope lažnog otkrića (FDR); transkripti s FDR-prilagođenom p-vrijednošću $\leq 0,05$ i apsolutnom promjenom izražaja ≥ 2 ($|\log_2FC| \geq 1$) smatrani su značajnima.

Za GSE208143 kontrola kvalitete po uzorku provedena je korištenjem raspodjela intenziteta sonde, MA grafova i PCA klasteriranja. Nisu identificirani niskokvalitetni ili odstupajući mikročipovi. Nakon tih provjera, potvrđeno je uključivanje svih bioloških triplikata i kontrola.

4. Rezultati

4.1. Histopatološke značajke retinoblastoma i podtipova koroidalnog melanoma

Histopatološka evaluacija presjeka obojenih hematoksilinom i eozinom (H&E) pokazala je jasne morfološke razlike između RB-a i podtipova koroidalnog melanoma (CM) (Slika 5a–f). U kontrolnoj mrežnici očuvana je očekivana višeslojna organizacija, uključujući sloj fotoreceptora i nuklearne slojeve (Slika 5a). Uzorci RB-a pokazivali su plohe gusto zbijenih malih, okruglih stanica s hiperkromatskim jezgrama, oskudnom citoplazmom i visokim omjerom jezgra/citoplazma, što je u skladu s njihovom slabo diferenciranom prirodom (Slika 5b). Tkivo RB-a pokazuje Flexner–Wintersteinerove rozete, prave rozete s centralnim lumenom koje upućuju na diferencijaciju fotoreceptora, te povremene pseudorozete tipa Homer–Wright s centralnim fibrilarnim materijalom (Slika 5c). Nasuprot tomu, CM je pokazivao karakterističnu arhitekturu specifičnu za pojedini podtip (Slika 5d–f). Epitelioidna varijanta bila je sastavljena od velikih poligonalnih tumorskih stanica s obilnom eozinofilnom citoplazmom i izraženim nukleolusima (Slika 5d). Miksoidna varijanta razlikovala se po rahloj stromalnoj pozadini s raspršenim atipičnim melanocitima uronjenima u miksoidnu matricu (Slika 6e). Melanom vretenastih stanica pokazivao je izdužene tumorske stanice raspoređene u snopaste i vrtložne uzorke (Slika 5f).

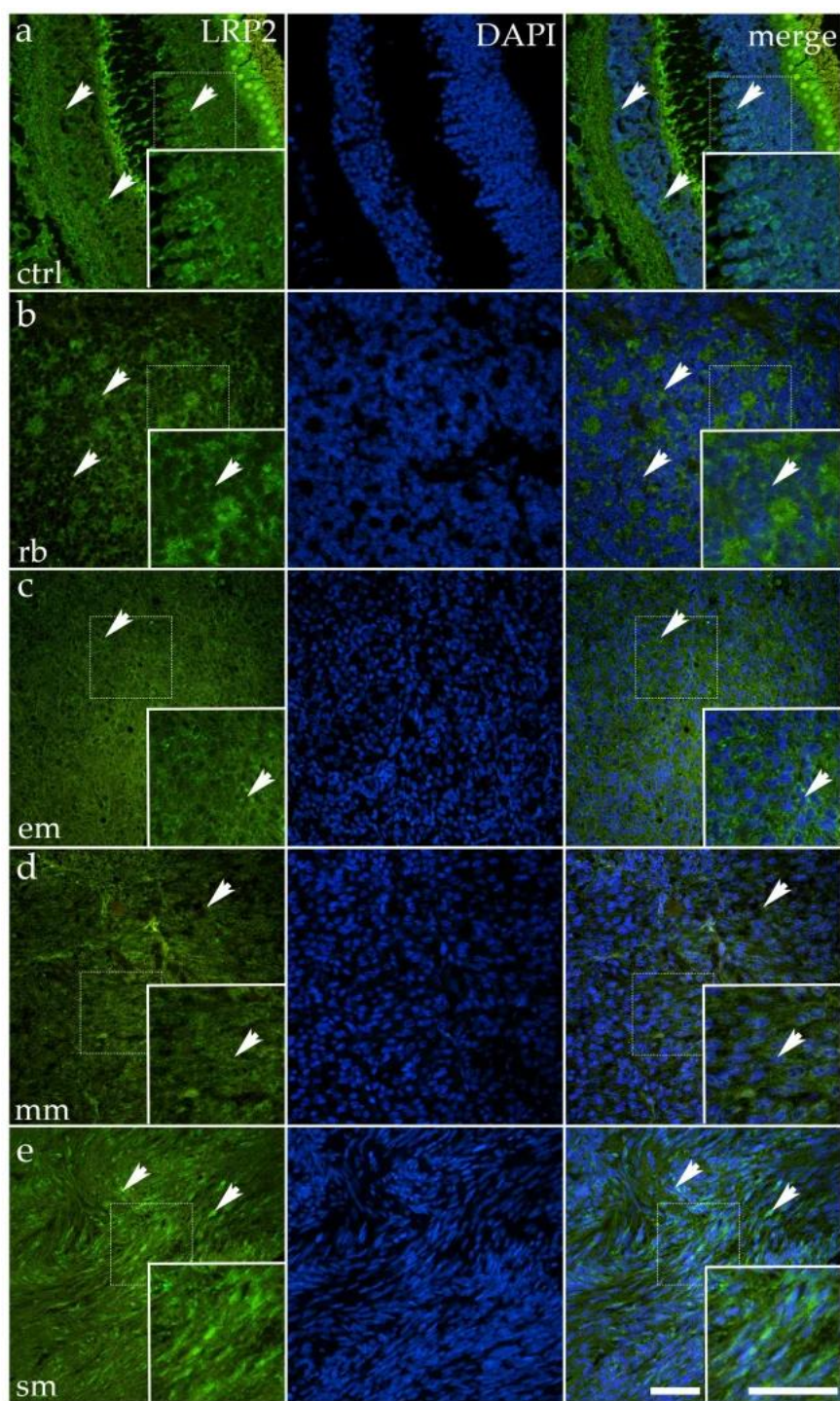


Slika 5. Reprezentativni presjeci humanih okularnih tkiva obojeni hematoksilinom i eozinom (H&E). U kontrolnom tkivu uočava se normalna laminarna organizacija mrežnice (a). Retinoblastom pokazuje plohe malih, okruglih, tamnoplavo obojenih stanica s Flexner–Wintersteinerovim rozetama i pseudorozetama tipa Homer–Wright (b, c). Panel (c) prikazuje prikaz rozeta pri većem povećanju, označenih narančastim pravokutnikom na panelu (b). Koroidalni melanom pokazuje obilježja specifična za pojedini podtip: epitelioidni (poligonalne stanice s izraženim nukleolusima) (d), vretenasti (izdužene stanice raspoređene u snopove) (e)

i mikroidni (tumorske stanice u rahloj mikroidnoj stromi) (f). Mjerilo = 50 μ m (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

4.2. Ekspresija LRP2 pokazuje žarišno očuvanje, ali ukupno kvantitativno smanjenje u svim podtipovima okularnih tumora

U kontrolnom okularnom tkivu imunoreaktivnost LRP2 bila je umjerena i primarno lokalizirana u malim apikalnim epitelnim nakupinama, stvarajući slab, ali detektabilan točkasti citoplazmatski signal. Obojenje je bilo suptilnije nego što bi se očekivalo, tvoreći slabe apikalne nakupine umjesto kontinuirane trake. Strelice na kontrolnom panelu označavaju raspršena područja pozitivnosti, gdje su male epitelne nakupine pokazivale nešto jaču fluorescenciju u odnosu na inače blijedu pozadinu (Slika 6).

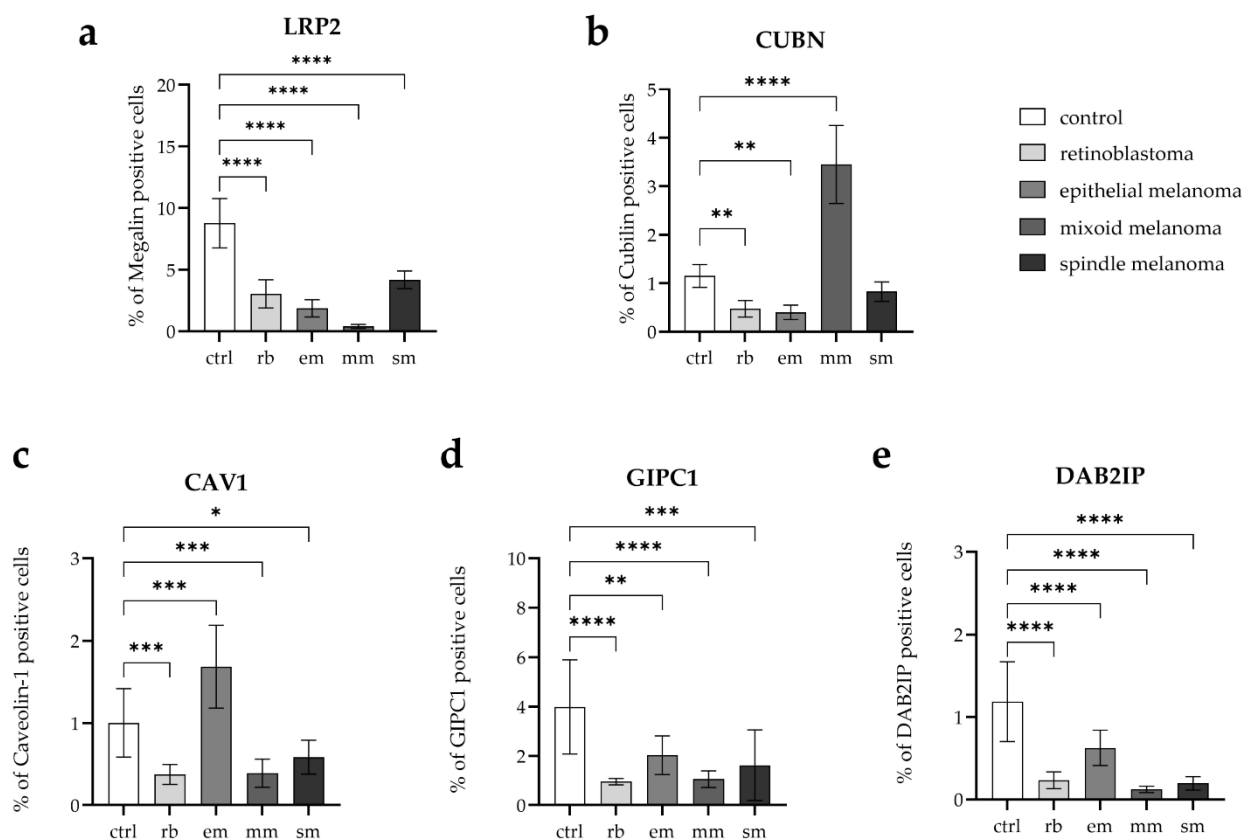


Slika 6. Imunofluorescentno bojanje LRP2, spojeno s bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), u kontrolnom tkivu i okularnim tumorima (a–e). Usporedna ekspresija LRP2 prikazana je u kontroli (ctrl; (a)), retinoblastomu (rb; (b)), epitelioidnom melanomu (em; (c)), miksoidnom melanomu (mm; (d)) i vretenastom melanomu (sm; (e)). Strelice na panelima LRP2 označavaju područja pozitivnog citoplazmatskog signala. Na spojenim (eng. *merged*) panelima strelice označavaju lokalizaciju LRP2 u odnosu na jezgreno DAPI obojenje. Povećanje: 40×; mjerilo:

50 μm (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

U svim podtipovima tumora ekspresija LRP2 bila je značajno smanjena. U RB-u, epitelioidnom melanomu, miksoidnom melanomu i vretenastom melanomu mogle su se uočiti tek rijetke ili slabo obojene stanice, obično u područjima gdje su bili očuvani ostaci epitelne organizacije. U većini područja fluorescentni signal bio je iznimno slab ili potpuno odsutan, a tkivna arhitektura bila je dominantno obilježena jezgama obojenima DAPI-jem. Strelice na tumorskim panelima ističu povremena rezidualna žarišta citoplazmatske fluorescencije, naglašavajući ukupnu oskudnost ekspresije Megalina.

Iako LRP2 pokazuje izraženo, jasno obojenje u izoliranim tumorskim područjima, njegova je globalna ekspresija značajno smanjena kada se kvantificira na razini cjelokupne površine tkiva. Ovaj obrazac potvrđen je analizom slike koja je pokazala značajno niži postotak pozitivnog obojenja u svim tumorskim skupinama u usporedbi s kontrolama ($p < 0,0001$) (Slika 7).



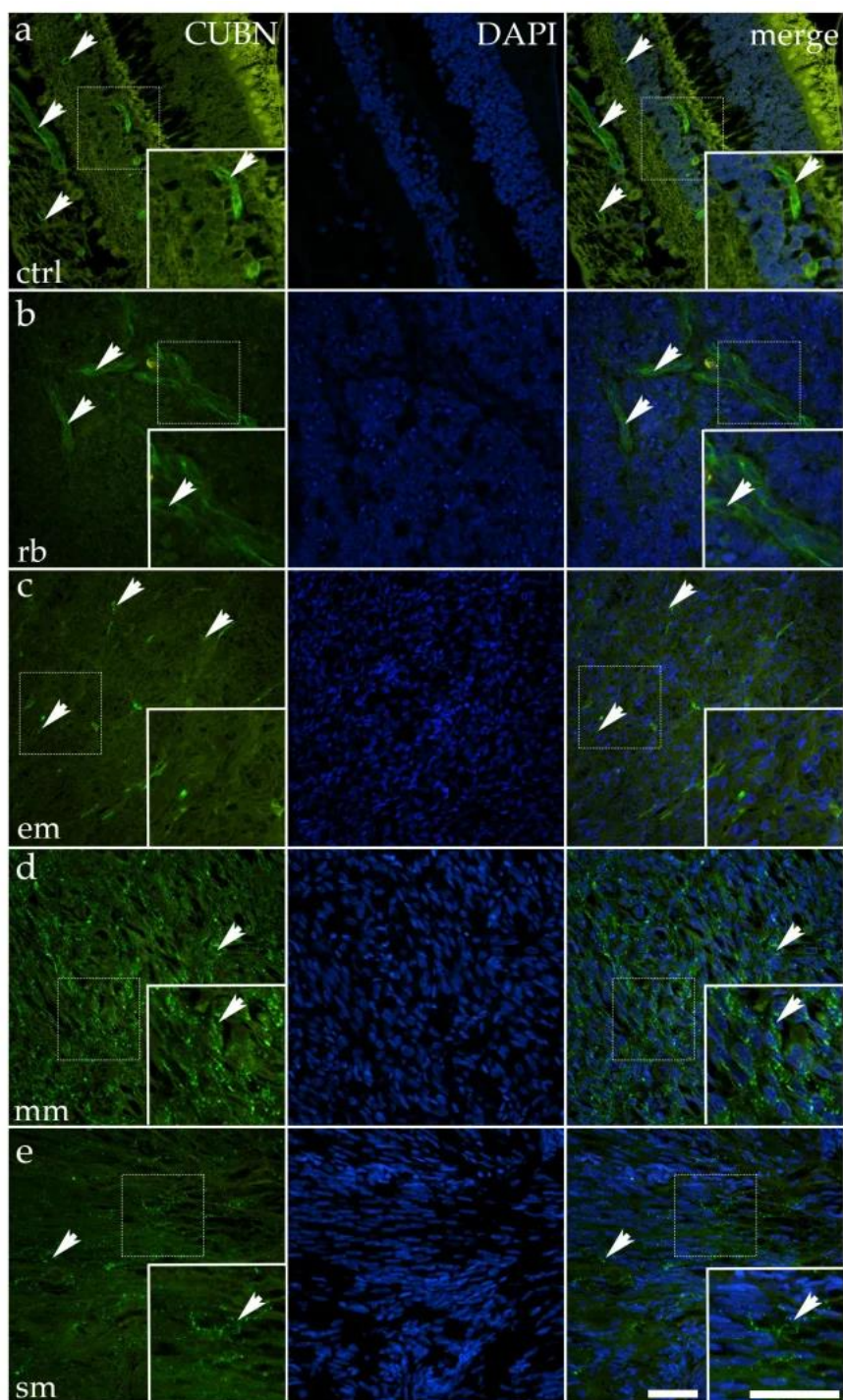
Slika 7. Kvantitativna analiza ekspresije proteina u okularnim tkivima. Postotak pozitivno obojenih stanica izmjeren je za (a) Megalin (LRP2), (b) Cubilin (CUBN), (c) Caveolin-1

(CAV1), (d) GIPC1 i (e) DAB2IP u kontrolnom tkivu (ctrl), retinoblastomu (rb), epitelioidnom melanomu (em), miksoidnom melanomu (mm) i vretenastom melanomu (sm). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Statistička analiza provedena je primjenom jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon čega je uslijedio Tukeyjev test višestrukih usporedbi. Sljedeći simboli označavaju razine statističke značajnosti: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

Ovi nalazi ukazuju na to da, iako je bazalna ekspresija LRP2 u kontrolnom okularnom tkivu relativno slaba, njezin dodatni gubitak ili gotovo potpuni izostanak u tumorskom tkivu predstavlja dosljednu molekularnu promjenu u različitim okularnim malignitetima. Takav obrazac upućuje na mogućnost da je čak i niskorazinska ekspresija Megalina povezana s očuvanjem epitelnih obilježja, dok je njezino smanjenje ili nestanak povezano s neoplastičnom transformacijom.

4.3. Cubilin je izrazito povišen u miksoidnom melanomu, ali smanjen u retinoblastomu i epitelioidnom melanomu

U normalnom okularnom tkivu CUBN bio je jasno detektabiln, sa zelenom citoplazmatskom fluorescencijom koncentriranom u blizini apikalne površine epitelnih stanica. Iako signal nije bio jednoliko intenzivan, slijedio je očuvanu epitelnu polaritetnost, stvarajući uzorkovanu raspodjelu duž organiziranog neuroepitelnog sloja. Strelice na kontrolnom panelu upućuju na uredno organizirane stanične nakupine u kojima je fluorescencija CUBN bila najizraženija. Osim u epitelnim strukturama, izolirana žarišta obojenja Cubilina uočena su i duž struktura nalik krvnim žilama, što je u skladu s niskorazinskom vaskularnom ili perivaskularnom ekspresijom (Slika 8).



Slika 8. Imunofluorescentno bojenje Cubilina (CUBN), spojeno s bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), u kontrolnom tkivu i okularnim tumorima (a–e). Usporedna ekspresija CUBN prikazana je u kontroli (ctrl; (a)), retinoblastomu (rb; (b)), epitelioidnom melanomu (em; (c)), miksoidnom melanomu (mm; (d)) i vretenastom melanomu (sm; (e)). Strelice na panelima CUBN označavaju izražen citoplazmatski/apikalni signal. Na spojenim panelima strelice prikazuju lokalizaciju CUBN u odnosu na jezgre. Povećanje: 40×; mjerilo: 50 μ m. Povremeni pozitivni signal Cubilina vidljiv je i u strukturama nalik krvnim žilama, što je u skladu s

poznatom endotelnom ekspresijom (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

U tumorskim tkivima obrazac je znatno varirao. RB je pokazao smanjenu ekspresiju CUBN, pri čemu su preostali tek slabi, žarišni fluorescentni signali u raspršenim epitelnim ostacima ili perifernim tumorskim zonama. Strelice na ovom panelu označavaju rijetka žarišta rezidualne pozitivnosti unutar inače slabo obojenog tumorskog tkiva. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno smanjenje u odnosu na kontrolu ($p = 0,0038$) (Slika 7).

Epitelioidni melanom također je pokazao smanjenu ekspresiju CUBN-a, obilježenu slabom, diskontinuiranom fluorescencijom ograničenom na male epitelne nakupine. Strelice ističu izolirana područja rezidualne pozitivnosti na podlozi izrazito smanjenog signala. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno smanjenje u usporedbi s kontrolom ($p = 0,0011$) (Slika 7).

Nasuprot tomu, miksoidni melanom pokazao je izrazito povećanje ekspresije CUBN-a. U ovom je slučaju fluorescentno obilježavanje bilo opsežnije, sa široko rasprostranjenom citoplazmatskom pozitivnošću koja je nadmašivala umjerene razine opažene u kontroli. Strelice na panelu miksoidnog melanoma ističu prostrana, snažno pozitivna tumorska polja. Ovo povećanje bilo je statistički visoko značajno ($p < 0,0001$) (Slika 7).

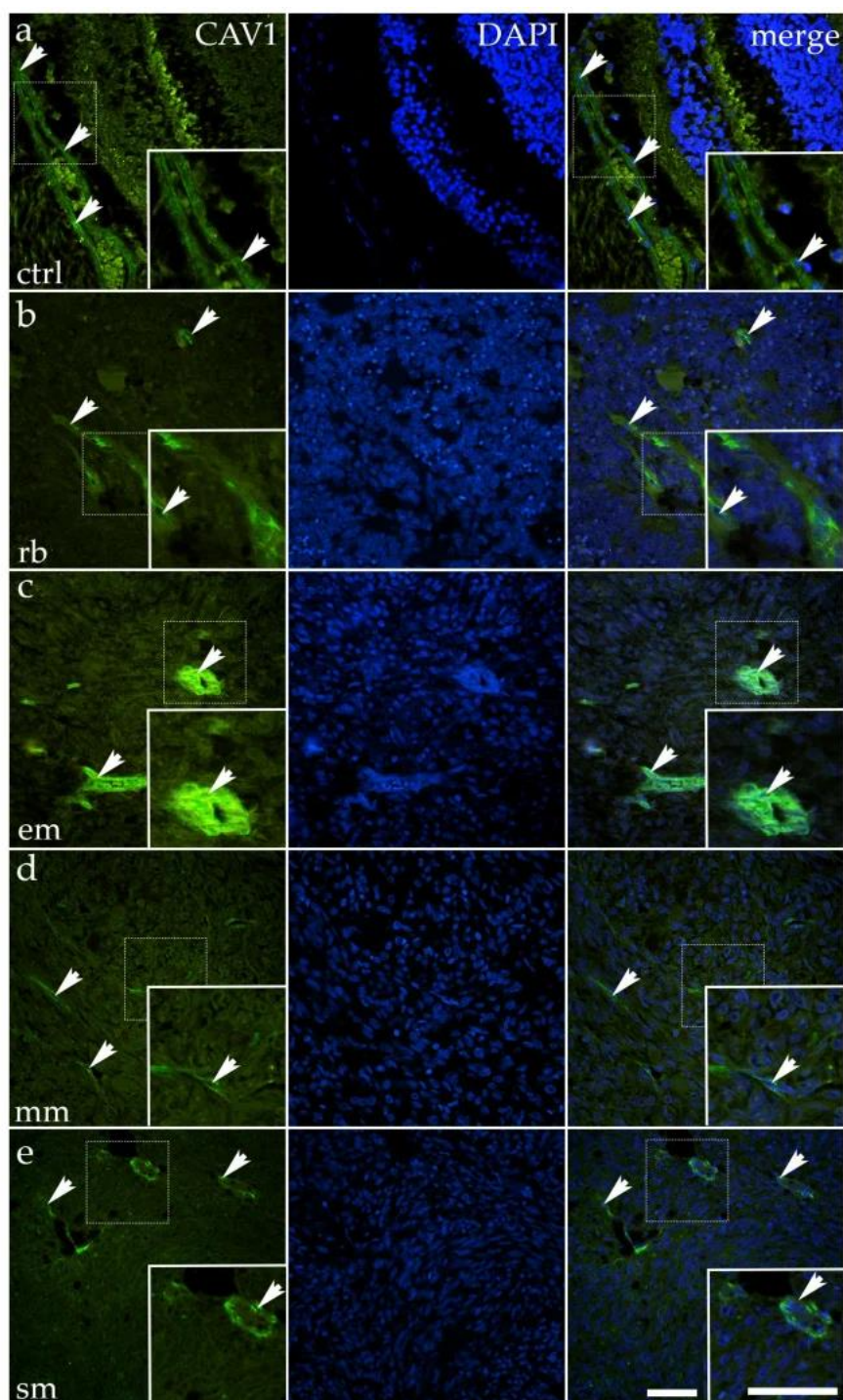
Vretenasti melanom pokazao je heterogeni obrazac, pri čemu su neka područja zadržavala fluorescenciju CUBN-a, dok su druga ostajala slabo pozitivna ili negativna. Ta varijabilnost rezultirala je ukupnom razinom ekspresije sličnoj kontrolnoj, bez značajne razlike ($p = 0,3784$) (Slika 7).

Zajedno, ovi rezultati pokazuju da je ekspresija CUBN-a smanjena u RB-u i epitelioidnom melanomu, očuvana u vretenastom melanomu, ali izrazito povećana u miksoidnom melanomu, naglašavajući podtip-specifične razlike u regulaciji CUBN-a među okularnim tumorima.

4.4. Ekspresija CAV1 varira između retinoblastoma i podtipova melanoma

U normalnom okularnom tkivu CAV1 bio je umjereno eksprimiran, pri čemu je zelena citoplazmatska fluorescencija bila najizraženija u epitelnom odjeljku. Signal je u pravilnom obrascu ocrtao epitelne stanice, iako intenzitet nije bio jednoliko snažan. Strelice na kontrolnom panelu ističu nakupine u kojima je fluorescencija bila koncentrirana duž epitelne ovojnice, odražavajući očuvanu polaritetnost. Povremeni pozitivni signali Caveolina-1 bili su

prisutni i u strukturama nalik krvnim žilama, što je očekivano s obzirom na poznatu endotelnu ekspresiju kaveolarnih proteina (Slika 9).



Slika 9. Imunofluorescentno bojanje Caveolina-1 (CAV1), spojeno s bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), u kontrolnom tkivu i okularnim tumorima (a–e). Usporedna ekspresija CAV1 prikazana je u kontroli (ctrl; (a)), retinoblastomu (rb; (b)), epitelioidnom melanomu (em; (c)), miksoidnom melanomu (mm; (d)) i vretenastom melanomu (sm; (e)). Strelice na panelima

CAV1 označavaju područja pozitivnog citoplazmatskog i membranskog signala. Na spojenim panelima strelice označavaju lokalizaciju CAV1 u odnosu na jezgreno DAPI obojenje. Povećanje: 40×; mjerilo: 50 μm. Povremeni pozitivni signal Caveolina-1 vidljiv je i u strukturama nalik krvnim žilama, što je u skladu s poznatom endotelnom ekspresijom (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

RB je pokazao izraženo smanjenje ekspresije CAV1. Uočene su tek povremene, slabo fluorescentne stanice na podlozi gusto jezgrenog tumorskog tkiva. Strelice označavaju ta rijetka rezidualna žarišta. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno nižu ekspresiju u odnosu na kontrolu ($p = 0,0006$) (Slika 7).

Miksoidni melanom također je pokazao smanjenu ekspresiju CAV1, s žarišnim, slabo pozitivnim fluorescentnim područjima nepravilno raspršenima kroz tumorsku masu. Strelice ističu te oskudne signale u kontrastu s velikim područjima bez obojenja. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno smanjenje u usporedbi s kontrolom ($p = 0,0008$) (Slika 7).

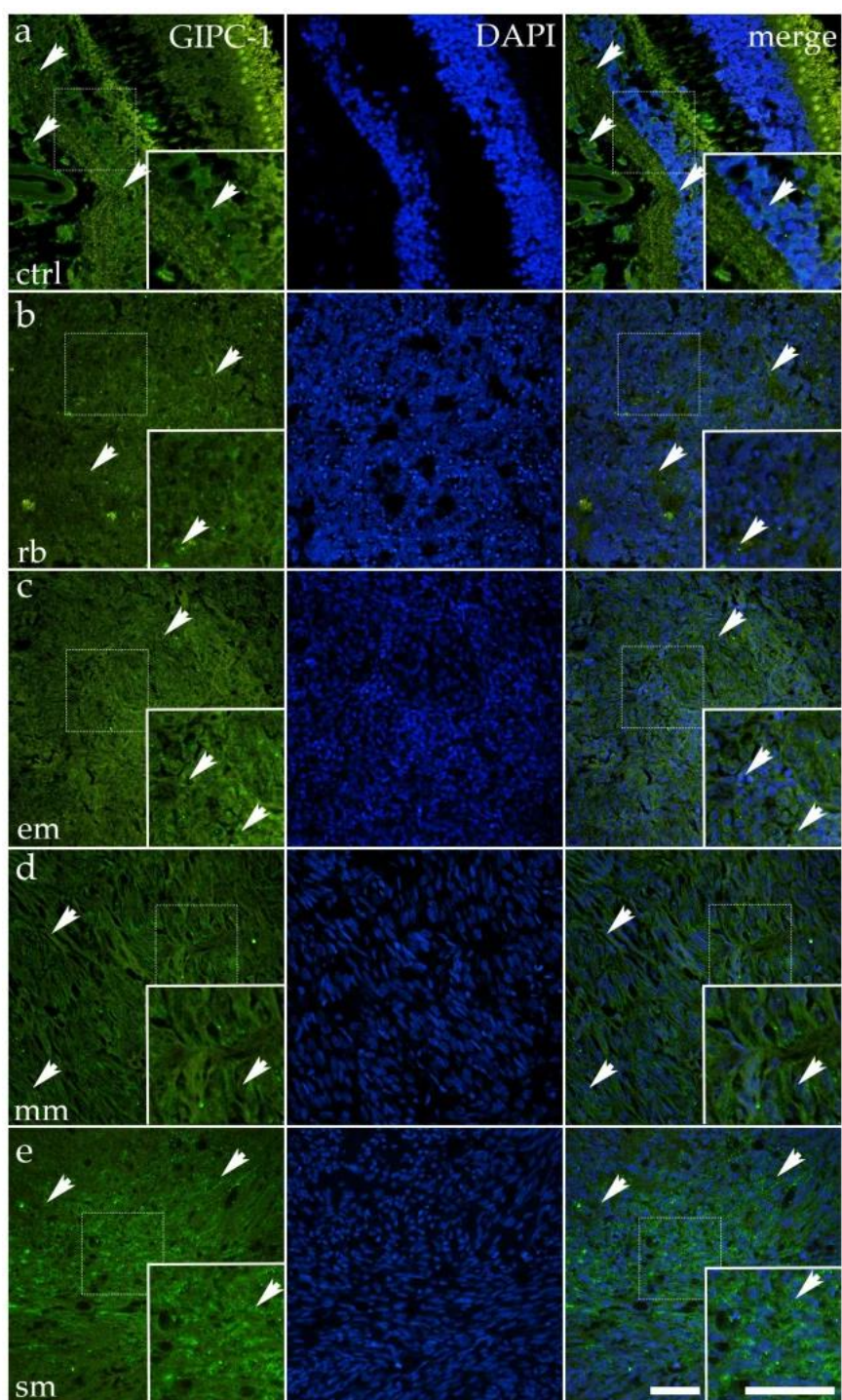
Vretenasti melanom pokazao je heterogeni obrazac, pri čemu su neke izdužene stanice zadržavale umjerenu citoplazmatsku pozitivnost, dok su velika područja bila gotovo negativna. Strelice naglašavaju očuvane trake fluorescencije unutar inače slabo obojenih polja. Kvantitativna analiza pokazala je značajno smanjenje u odnosu na kontrolu ($p = 0,0336$) (Slika 7).

Nasuprot tomu, epiteloidni melanom pokazao je očitu pojačanu ekspresiju CAV1. Fluorescentni signal bio je izraženiji i rasprostranjeniji nego u kontroli, protežući se kroz tumorske nakupine. Strelice ističu područja u kojima je citoplazmatska fluorescencija bila osobito gusta i ujednačena. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno povećanje u odnosu na kontrolu ($p = 0,002$) (Slika 7).

U cjelini, ekspresija CAV1 smanjena je u RB-u, miksoidnom melanomu i vretenastom melanomu, ali povećana u epiteloidnom melanomu, što upućuje na divergentne uloge ovog proteina među podtipovima okularnih tumora.

4.5. Ekspresija GIPC-1 značajno je smanjena u svim podtipovima okularnih tumora

U normalnom okularnom tkivu GIPC-1 bio je umjereno eksprimiran u epitelu, gdje se zelena citoplazmatska fluorescencija pojavljivala kao diskretna točkasta struktura poravnana s apikalnom citoplazmom. Strelice na kontrolnom panelu označavaju organizirane nakupine u kojima je ekspresija bila očuvana uz istodobno očuvanu epitelnu arhitekturu (Slika 10).



Slika 10. Imunofluorescentno bojanje GIPC-1, spojeno s bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), u kontrolnom tkivu i okularnim tumorima (a–e). Usporedna ekspresija GIPC-1 prikazana je u kontroli (ctrl; (a)), retinoblastomu (rb; (b)), epitelioidnom melanomu (em; (c)), miksoidnom melanomu (mm; (d)) i vretenastom melanomu (sm; (e)). Strelice na panelima GIPC-1 označavaju područja izraženijeg citoplazmatskog signala. Na spojenim panelima strelice prikazuju prostorni odnos između GIPC-1 i jezgri. Povećanje: 40×; mjerilo: 50 μ m (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

RB je pokazao izrazito smanjenu ekspresiju GIPC-1. Uočena je tek raspršena, slaba citoplazmatska fluorescencija u malim nakupinama stanica. Strelice upućuju na te slabe rezidualne signale. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno nižu ekspresiju u usporedbi s kontrolom ($p < 0,0001$) (Slika 7).

Miksoidni melanom također je pokazao smanjenu ekspresiju GIPC-1, s fragmentiranim, slabom fluorescencijom ograničenom na male žarišne površine. Strelice ističu diskontinuirana područja signala. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno smanjenje u usporedbi s kontrolom ($p < 0,0001$) (Slika 7).

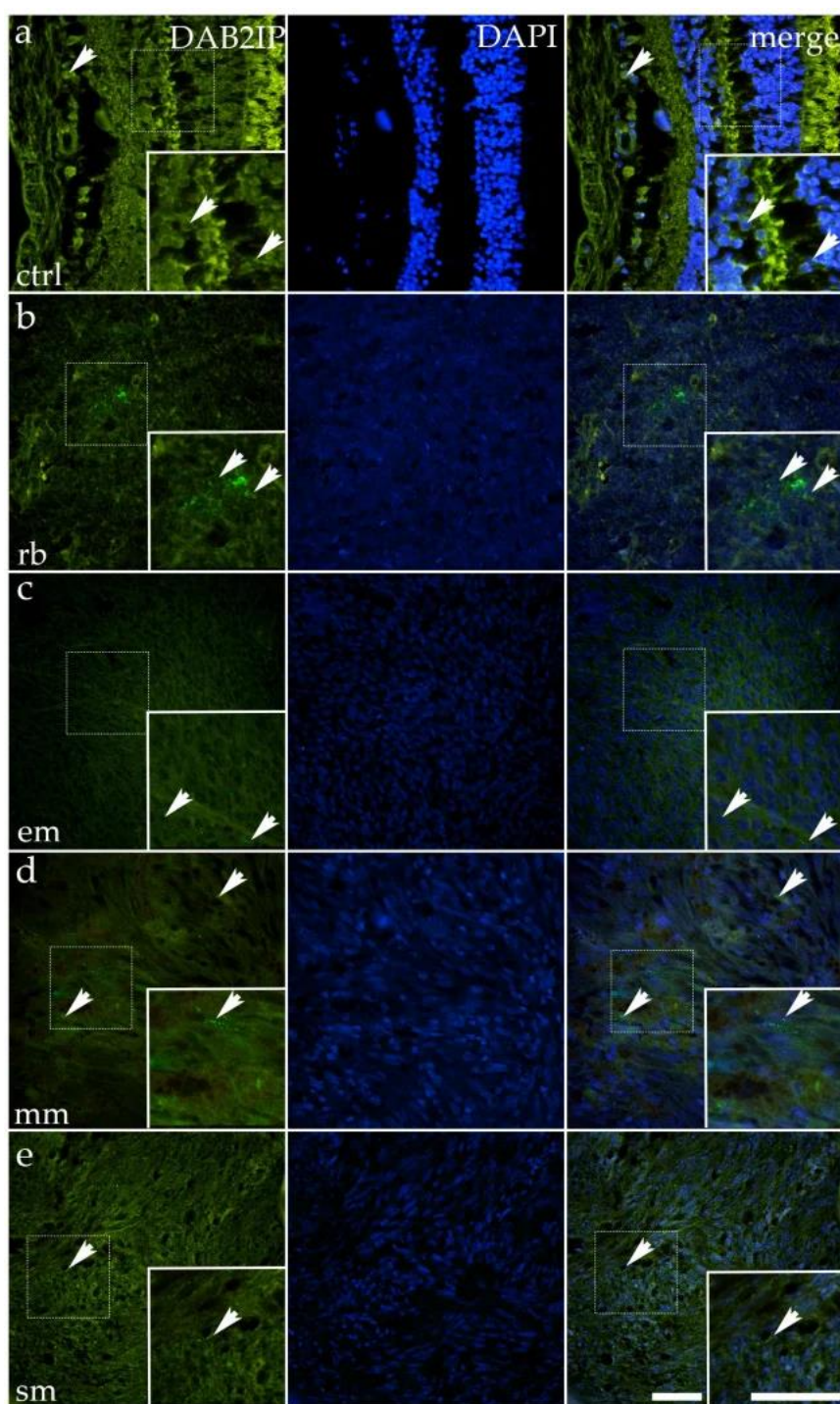
Vretenasti melanom zadržavao je više GIPC-1 nego miksoidni melanom, no ukupno obojenje i dalje je bilo slabije nego u kontroli. Ekspresija se u nekim izduženim stanicama doimala linearnom, dok su velika područja bila bez detektabilne fluorescencije. Strelice označavaju očuvane trake pozitivnosti. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu ($p = 0,0003$) (Slika 7).

Nasuprot tomu, epitelioidni melanom u velikoj je mjeri nalikovao kontrolnom obrascu. Tumorske nakupine pokazivale su umjerenu citoplazmatsku fluorescenciju unutar epitelu sličnih klastera, što je istaknuto strelicama. Statistička analiza pokazala je značajnu razliku u usporedbi s kontrolom ($p = 0,0032$) (Slika 7).

U cjelini, ekspresija GIPC-1 dobro je očuvana u kontrolnom tkivu i epitelioidnom melanomu, ali je značajno snižena u RB-u, miksoidnom melanomu i vretenastom melanomu, što odražava podtip-specifične razlike u održavanju epitelnih adaptornih proteina.

4.6. Ekspresija DAB2IP očuvana je u epitelioidnom melanomu, ali smanjena u retinoblastomu, miksoidnom melanomu i vretenastom melanomu

U kontrolnom okularnom tkivu DAB2IP bio je umjereno eksprimiran, pri čemu je zelena citoplazmatska fluorescencija uredno ocrtavala epitelne stanice. Signal je bio granularan i perinuklearan, stvarajući jasan kontrast u odnosu na okolne jezgre. Strelice na kontrolnom panelu ističu te kompaktne epitelne redove, u kojima je raspodjela DAB2IP odražavala očuvanu arhitekturu (Slika 11).



Slika 11. Imunofluorescentno bojenje DAB2IP, spojeno s bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), u kontrolnom tkivu i okularnim tumorima (a–e). Usporedna ekspresija DAB2IP prikazana je u kontroli (ctrl; (a)), retinoblastomu (rb; (b)), epitelioidnom melanomu (em; (c)), miksoidnom melanomu (mm; (d)) i vretenastom melanomu (sm; (e)). Strelice na panelima DAB2IP označavaju područja pozitivnog perinuklearnog/citoplazmatskog obojenja. Na spojenim panelima strelice prikazuju lokalizaciju DAB2IP u odnosu na jezgreno DAPI

obojenje. Povećanje: 40×; mjerilo: 50 μm (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

RB je pokazao smanjenu ekspresiju DAB2IP. Fluorescentni signal bio je slab i žarišan, ograničen na povremene stanice raspršene unutar gusto jezgrenih tumorskih područja. Strelice označavaju ta rijetka rezidualna žarišta. Kvantitativna analiza pokazala je značajno nižu ekspresiju u usporedbi s kontrolom ($p < 0,0001$) (Slika 7).

U epitelioidnom melanomu ekspresija DAB2IP bila je u velikoj mjeri usporediva s kontrolom. Tumorske nakupine zadržavale su citoplazmatsku fluorescenciju umjerenog intenziteta, a strelice označavaju očuvane epitelu slične klastere. Statistička analiza potvrdila je da nije bilo značajne razlike u usporedbi s kontrolom.

Miksoidni melanom pokazao je izražen gubitak DAB2IP. Vidljive su bile tek rijetke, slabo fluorescentne stanice, istaknute strelicama na tumorskom panelu. Kvantitativna analiza potvrdila je dramatično smanjenje u usporedbi s kontrolom ($p < 0,0001$) (Slika 7).

Vretenasti melanom pokazao je intermedijarnu ekspresiju. Neke izdužene tumorske stanice zadržavale su umjerenu fluorescenciju, no većina područja bila je slabo pozitivna ili negativna. Strelice naglašavaju očuvane trake signala unutar inače oslabljenog tkiva. Kvantitativna analiza potvrdila je značajno nižu ekspresiju u usporedbi s kontrolom ($p < 0,0001$) (Slika 7).

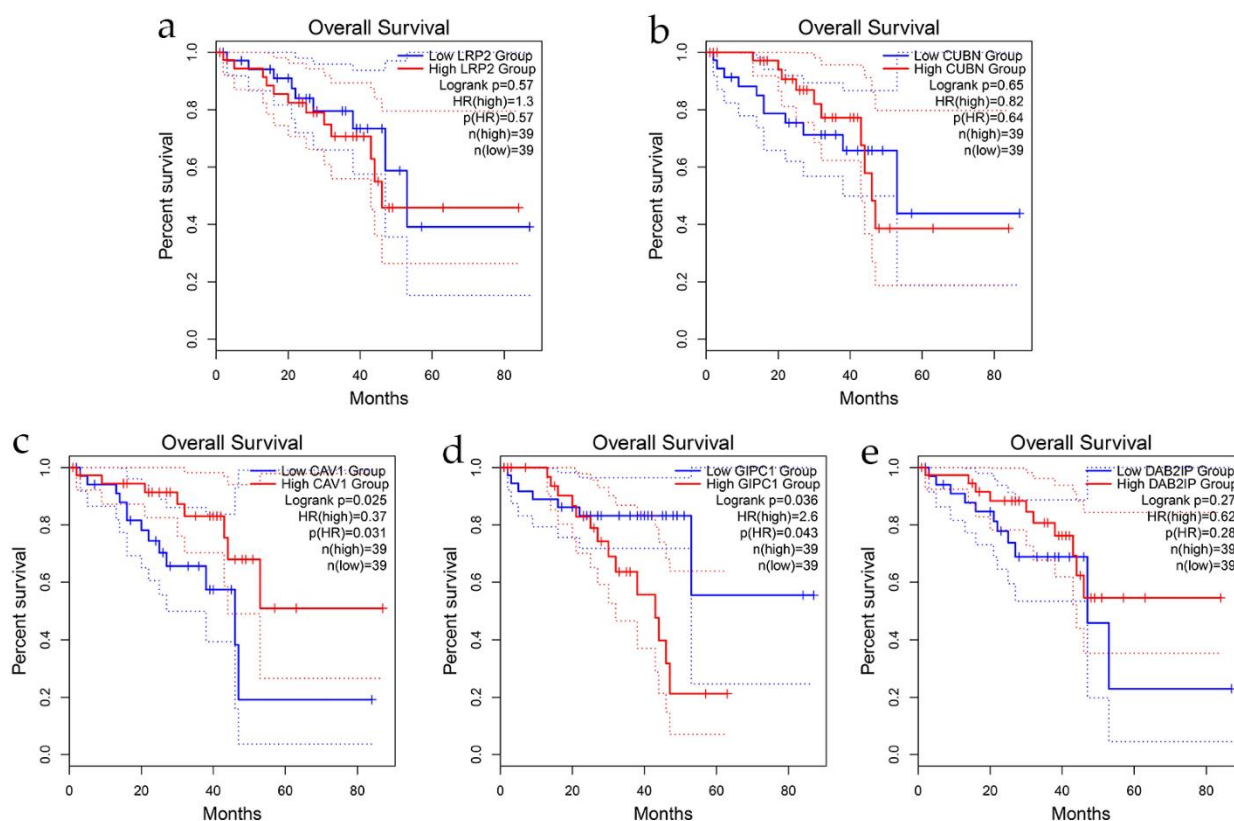
U cjelini, DAB2IP snažno je eksprimiran u kontrolnom tkivu i očuvan u epitelioidnom melanomu, ali značajno snižen u RB-u, miksoidnom melanomu i vretenastom melanomu, što upućuje na mogućnost da gubitak ovog tumorsupresorskog proteina prati neoplastičnu progresiju u određenim okularnim malignitetima.

4.7. Analize preživljenja

Radi procjene prognostičke važnosti LRP2, CUBN, DAB2IP, GIPC1 i CAV1 u uvealnom melanomu, provedena je analiza ukupnog preživljenja korištenjem mrežne platforme GEPIA2. Analiza se temeljila na podacima o genskoj ekspresiji iz TCGA kohorte uvealnog melanoma (UVM) ($n = 78$ bolesnika s dostupnim podacima o preživljenju). Bolesnici su stratificirani u skupine s visokom i niskom ekspresijom koristeći medijan ekspresije kao graničnu vrijednost, a razlike u preživljenju procijenjene su primjenom Log-rank testa.

Kaplan–Meierove krivulje preživljenja pokazale su da je visoka ekspresija CAV1 i GIPC1 značajno povezana s lošijim ukupnim preživljenjem (CAV1: HR = 3,0; 95 % CI 1,11–8,10; $p = 0,025$; GIPC1: HR = 2,6; 95 % CI 1,03–6,56; $p = 0,036$), što upućuje na potencijalnu

onkogenu ili tumorski promotivnu ulogu ovih gena u UVM-u (Slika 7). S obzirom na relativno mali broj ispitanika u TCGA-UVM kohorti ($n = 78$), intervali pouzdanosti su razmjerno široki, osobito za CAV1 i GIPC1, što odražava nesigurnost u procjeni veličine učinka. Radi procjene neovisne prognostičke vrijednosti uz prilagodbu za moguće zbunjujuće čimbenike, naknadno je provedena multivarijatna Coxova regresijska analiza proporcionalnih hazarda (Slika 14).

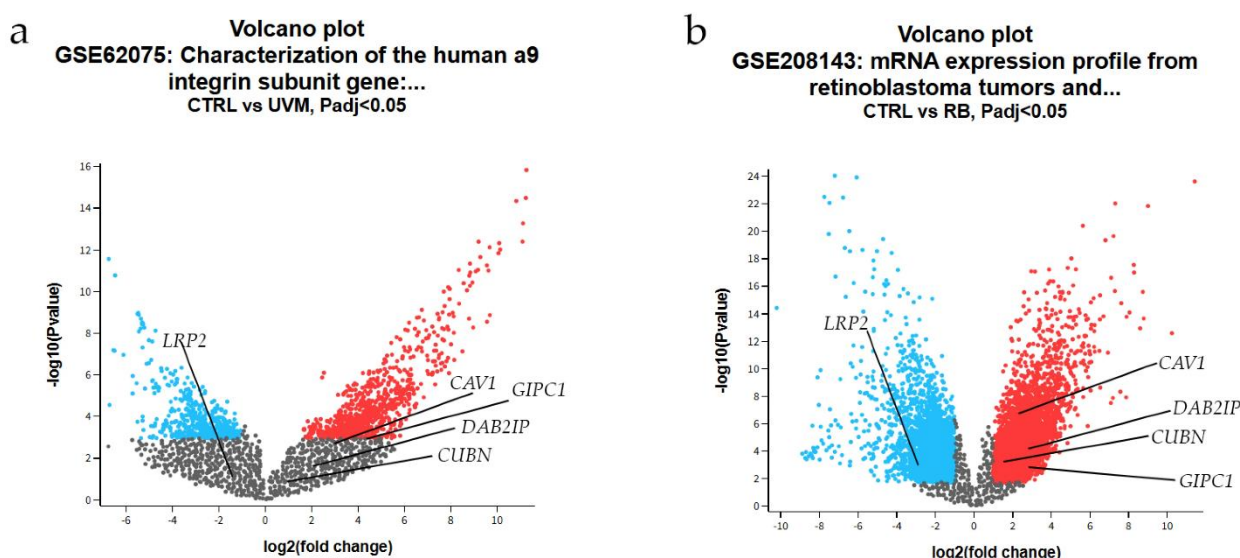


Slika 12. Kaplan–Meierove krivulje preživljenja koje prikazuju povezanost ukupnog preživljenja s razinama ekspresije Megalina (LRP2) (a), Cubilina (CUBN) (b), Caveolina-1 (CAV1) (c), Disabled homolog 2-interacting protein (DAB2IP) (d) i GIPC PDZ domain-containing protein 1 (GIPC1) (e) u bolesnika s uvealnim melanomom. Analiza je provedena korištenjem javno dostupne baze GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>, pristupljeno 30. srpnja 2025. godine), na temelju podataka iz kohorte The Cancer Genome Atlas (TCGA) Ocular Melanoma (UVM). Bolesnici su podijeljeni u skupine s visokom i niskom ekspresijom primjenom medijana ekspresije kao granične vrijednosti. Pune linije predstavljaju vjerojatnost preživljenja, isprekidane linije označavaju 95 %-tne intervale pouzdanosti, a okomite crtice označavaju cenzurirane slučajeve (bolesnike žive pri posljednjem praćenju ili izgubljene tijekom praćenja) (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

Nasuprot tomu, razine ekspresije LRP2 (HR = 1,3; 95 % CI 0,72–2,35; p = 0,57), CUBN (HR = 0,82; 95 % CI 0,47–1,43; p = 0,65) i DAB2IP (HR = 1,2; 95 % CI 0,68–2,12; p = 0,27) nisu bile značajno povezane s ukupnim preživljenjem (Slika 12).

4.8. Analiza diferencijalne genske ekspresije

Analiza diferencijalne ekspresije provedena je radi usporedbe uzoraka okularnih tumora s odgovarajućim kontrolama u dva neovisna transkriptomaska skupa podataka (Slika 13). U skupu podataka GSE62075, koji je uključivao primarne kulture humanih uvealnih melanocita i tri stanične linije uvealnog melanoma (T115, T142, T143), uočene su globalne transkripcijske razlike; međutim, nijedan od odabranih gena od interesa (LRP2, CUBN, CAV1, DAB2IP i GIPC1) nije dosegao statističku značajnost (Slika 13a). Nasuprot tomu, analiza skupa podataka GSE208143, koji je obuhvaćao tumore RB-a i pedijatrijske kontrolne mrežnice, pokazala je izražene razlike u ekspresiji. Konkretno, LRP2 bio je značajno snižen u RB-u u usporedbi s kontrolama, dok su CUBN, DAB2IP, GIPC1 i CAV1 bili značajno povišeni u tumorskom tkivu (Slika 13b).

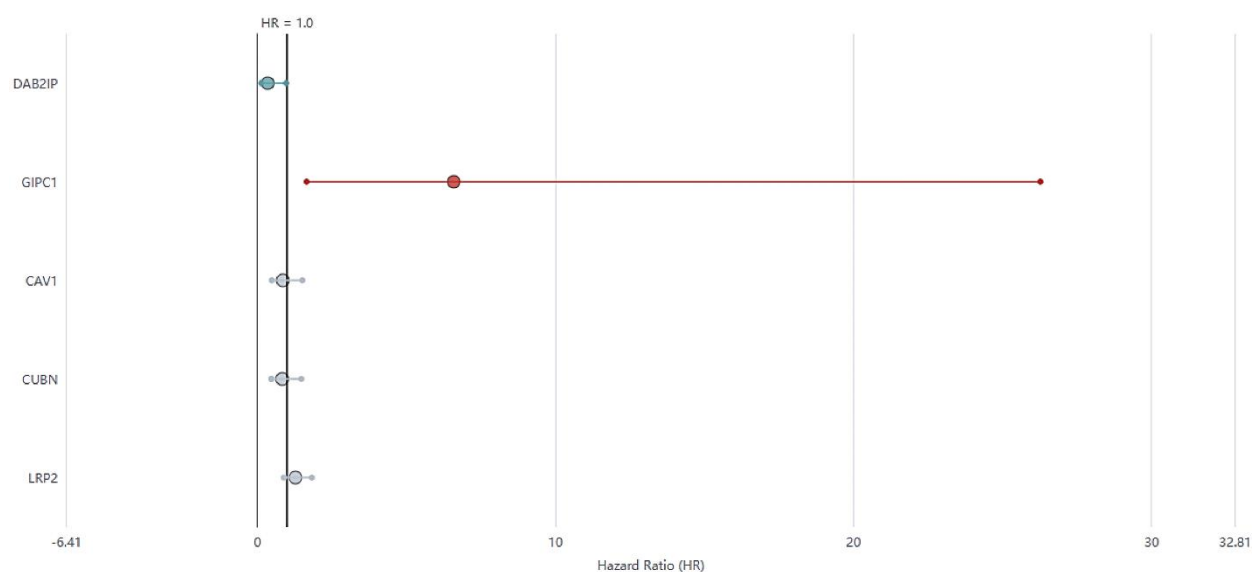


Slika 13. Vulkan grafovi koji prikazuju diferencijalnu gensku ekspresiju u dva transkriptomaska skupa podataka. Analiza diferencijalne ekspresije kojom se uspoređuju primarne kulture humanih uvealnih melanocita (CTRL) i tri stanične linije uvealnog melanoma (T115, T142, T143; UVM) iz skupa podataka GSE62075 (a). Analiza diferencijalne ekspresije kojom se uspoređuju tumori retinoblastoma (RB) i pedijatrijske kontrolne mrežnice (CTRL) iz skupa podataka GSE208143 (b). Na x-osi prikazan je $\log_2$ (fold change), a na y-osi $\log_{10}$ (prilagođene

p-vrijednosti). Svaka točka predstavlja jedan gen. Geni s prilagođenom p-vrijednošću manjom od 0,05 ($-\log_{10} > 1,3$) smatraju se značajno diferencijalno eksprimiranim i prikazani su obojeno: crveno za povišeno eksprimirane, a plavo za sniženo eksprimirane gene. Geni bez statističke značajnosti prikazani su sivom bojom. Označene su pozicije Megalina (LRP2), Cubilina (CUBN), Caveolina-1 (CAV1), GIPC PDZ domain containing family, member 1 (GIPC1) i Disabled homolog 2-interacting protein (DAB2IP). U GSE62075 nijedan od navedenih gena nije bio značajno diferencijalno eksprimiran između CTRL i UVM uzoraka. Nasuprot tomu, u GSE208143 LRP2 značajno je bio snižen u RB-u u usporedbi s kontrolama, dok su CUBN, CAV1, GIPC1 i DAB2IP bili značajno povišeni u tkivu RB-a (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

4.9. Multivarijatna Coxova regresijska analiza ekspresije gena i preživljenja u uvealnom melanomu

Radi procjene prognostičke važnosti odabranih gena u uvealnom melanomu provedena je multivarijatna Coxova regresijska analiza proporcionalnih hazarda. Od pet analiziranih gena, DAB2IP i GIPC1 pokazali su statistički značajnu povezanost s ukupnim preživljenjem (Slika 14). Ekspresija DAB2IP bila je povezana s povoljnijom prognozom, uz omjer hazarda (HR) od 0,348 (95 % interval pouzdanosti (CI): 0,126–0,962; $p = 0,042$), što ukazuje na to da su povišene razine ekspresije značajno povezane sa smanjenim rizikom smrtnosti. Suprotno tomu, GIPC1 je identificiran kao potencijalni čimbenik rizika, pri čemu je visoka ekspresija bila značajno povezana s lošijim ishodima preživljenja (HR = 6,591; 95 % CI: 1,653 – 26,271; $p = 0,00752$). Preostali geni — CAV1 (HR = 0,854; 95 % CI: 0,483 – 1,509; $p = 0,587$), CUBN (HR = 0,833; 95 % CI: 0,471 – 1,476; $p = 0,532$) i LRP2 (HR = 1,278; 95 % CI: 0,894 – 1,826; $p = 0,179$) — nisu dosegli statističku značajnost (Slika 14).



Slika 14. Multivarijatna Coxova regresijska analiza proporcionalnih hazarda kandidatskih gena u uvealnom melanomu (TCGA-UVM kohorta). Forest-plot grafikon generiran korištenjem mrežne platforme kircv3, koji prikazuje omjere hazarda (HR) s 95 %-tnim intervalima pouzdanosti (CI) za ekspresiju LRP2, CUBN, DAB2IP, GIPC1 i CAV1 u odnosu na ukupno preživljenje. Visoka ekspresija DAB2IP bila je povezana sa značajno smanjenim rizikom smrtnosti (protektivni čimbenik), dok je visoka ekspresija GIPC1 bila značajno povezana s povećanim rizikom smrtnosti (nepovoljan prognostički čimbenik). Preostali geni (CAV1, CUBN i LRP2) nisu dosegli statističku značajnost (Prema Kovačević et al, 2025 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0).

5. Rasprava

5.1. Pregled

Patogeneza okularnih tumora uključuje poremećaje u endocitozi, unos hranjivih tvari i unutarstaničnu signalizaciju (171). LRP2 i CUBN višeligandni su endocitni receptori ključni za receptorom posredovani transport (172, 173). CAV1 strukturni je protein kaveola s ulogama u fiziologiji mrežnice i okularnim bolestima (182-184). GIPC1 je adaptor koji povezuje receptore s PI3K–AKT i RhoA signalnim putovima, koordinirajući unutarstanični transport i pokretljivost (188-190). DAB2IP je tumorsupresorski protein koji ograničava signalizaciju ERK/AKT/NF- κ B i EMT u različitim karcinomima (194-196). Međutim, obrasci ekspresije ovih proteina u humanom RB-u i CM-u ostaju nedovoljno karakterizirani. U ovom radu sustavno je integrirana imunofluorescencija, javno dostupni transkriptomski podaci i analize preživljenja kako bi se razjasnila njihova podtip-specifična ekspresija u okularnim tumorima.

5.2. Smanjena ekspresija LRP2/Megalina u okularnim tumorima

U našoj kohorti LRP2 pokazao je tek slabu bazalnu imunofluorescenciju u kontrolnom okularnom tkivu te je bio jednoliko snižen u RB-u i svim podtipovima CM-a, što upućuje na to da gubitak LRP2 prati okularnu tumorogenezu. Budući da su podaci o LRP2 u okularnim tumorima prema podtipovima oskudni, srodni dokazi iz razvoja i drugih tipova tumora pomažu u kontekstualizaciji naših rezultata.

Rasmussen i sur. izvijestili su da tumori koji nastaju iz epitela pozitivnih na LRP2 unutar TCGA baze često utišavaju ovaj receptor. Niže razine LRP2 bile su povezane s dediferenciranim podtipovima i lošijim preživljenjem u karcinomu bubrežnih stanica svijetlog/papilarnog tipa, papilarnom karcinomu štitnjače, mezoteliomu i invazivnom karcinomu dojke, pri čemu je represija povezana s metilacijom predložena kao mogući mehanizam (171). Naši rezultati u skladu su s tim obrascem, budući da su i okularni tumori pokazali gubitak LRP2 u povezanosti s dediferencijacijom.

Iako nije izravno proučavan u velikim kohortama okularnog melanoma, istraživanja kožnog melanoma sugeriraju da tumori mogu aberantno steći ekspresiju LRP2 te ovisiti o njemu za proliferaciju i preživljenje. Suprotno tomu, karcinomi bez izražene bazalne epitelne ekspresije LRP2 mogu aberantno steći Megalin i iskoristiti njegove funkcije. Andersen i sur. pokazali su da više od 60 % malignih kožnih melanoma (u usporedbi s ~20 % nevusa) eksprimira LRP2 te da smanjenje LRP2 dovodi do smanjene proliferacije i preživljenja melanoma stanica, naglašavajući njegovu ulogu u potpori rasta u tom kontekstu (214). Naši podaci odstupaju od tog kožnog obrasca: u okularnom melanomu zabilježili smo dosljedno

smanjenje, a ne stjecanje LRP2, što ukazuje na tkivno-specifične razlike u ulozi LRP2 unutar melanocitne loze.

Funkcionalno, LRP2 posreduje endocitozu različitih liganada (retinoida, kompleksa vitamina D, lipoproteina, hormona) i modulira signalizaciju morfogena. Christ i sur. navode da u razvoju oka LRP2 ograničava aktivnost Sonic Hedgehog (SHH) putem uklanjanja liganada na rubu mrežnice; gubitak LRP2 dovodi do ektopične SHH signalizacije i hiperproliferacije, otkrivajući njegovu ulogu u ograničavanju rasta u okularnim tkivima (177). Ovaj mehanizam u skladu je s našim nalazima, jer je jednoliko smanjenje LRP2 u RB-u i CM-u kompatibilno s uklanjanjem kontrole rasta i poremećenim unosom mikronutrijenata koji potiču diferencijaciju (retinoidi/vitamin D).

Iako potječu izvan oka, podaci iz kolorektalnog karcinoma dodatno naglašavaju tkivno-specifičnost uloge LRP2 u tumorskoj biologiji. Proširujući tu kontekstualnu ovisnost izvan melanoma, Zhang i sur. zaključili su da u adenokarcinomu kolona viša ekspresija LRP2 korelira s lošijom prognozom i višim patološkim stadijem te da prisilna nadekspresija LRP2 povećava proliferaciju u COAD staničnim linijama, ponovno ilustrirajući da tumori mogu ili izgubiti LRP2 (uz dediferencijaciju) ili ga kooptirati radi potpore rastu, ovisno o tkivnom kontekstu — obrazac koji je suprotan našim podacima u okularnim tumorima (215). Zajedno, ovi nalazi ukazuju da se LRP2 u okularnim tumorima ponaša slično tumorsupresoru, povezan s diferencijacijom (u skladu s našim opaženim smanjenjem). Nasuprot tomu, u drugim tkivima (npr. koži, kolonu) može biti kooptiran za potporu rastu, što naglašava izraženu specifičnost ovisnu o tipu tumora. U tom okviru naši rezultati pozicioniraju gubitak LRP2 kao ponovljivo molekularno obilježje okularnih tumora, potičući buduća funkcionalna istraživanja kako bi se ispitalo može li obnova megalinom posredovanog unosa nutrijenata/morfogena ili ograničavanje aktivnosti SHH signalnog puta ublažiti proliferativnu prednost nastalu njegovim gubitkom.

Mehanističke posljedice gubitka LRP2 nadilaze poremećaj morfogene signalizacije te temeljno mijenjaju staničnu homeostazu hranjivih tvari. Endocitoza posredovana LRP2 normalno dostavlja retinoide i metabolite vitamina D, ključne regulatore epitelne diferencijacije i izlaska iz staničnog ciklusa, u unutarstanične odjeljke gdje aktiviraju nuklearne receptore (216-218). Konkretno, Megalin olakšava unos proteina koji vežu vitamin A i kompleksa vitamina D s proteinom koji veže vitamin D (DBP), omogućujući unutarstaničnu akumulaciju ovih lipofilnih vitamina (216, 217). Nakon internalizacije, ovi ligandi vežu se na receptor za vitamin D (VDR) i receptore za retinoičnu kiselinu (RAR/RXR), koji se premještaju u jezgru i izravno aktiviraju transkripciju inhibitora ciklin-ovisnih kinaza p21^{WAF1/CIP1} i p27^{KIP1}

(219-221). Ovi CDK inhibitori zaustavljaju stanice u G1 fazi, blokirajući prijelaz u S fazu i potičući diferencijaciju (221, 222). U okularnim tumorima jednoliko smanjenje LRP2 moglo bi stvoriti dvostruku proliferativnu prednost: prvo, uklanjanjem ograničenja SHH signalnog puta (kako su pokazali Christensen i sur.), i drugo, lišavanjem stanica diferencijacijskih signala koji se normalno prenose putem transkripcijskih programa ovisnih o vitaminima A i D (220-222). Ova konvergencija poremećenog uklanjanja morfogenata i smanjenog unosa mikronutrijenata može objasniti zašto je gubitak LRP2 jednoliko prisutan u RB-u i podtipovima CM-a unatoč njihovom različitom staničnom podrijetlu.

5.3. Podtip-specifični obrasci ekspresije CUBN

U ovoj seriji CUBN pokazao je različite, podtip-specifične obrasce ekspresije. Budući da su podaci o CUBN-u u okularnim tumorima prema podtipovima ograničeni, ove obrasce tumačimo u kontekstu njegove dobro utvrđene uloge u unosu hranjivih tvari i metabolizmu vitamina. U normalnom okularnom tkivu CUBN bio je prisutan duž epitelne ovojnice. U RB-u i epitelioidnom melanomu ekspresija CUBN-a bila je izrazito smanjena, dok je vretenasti melanom zadržavao ekspresiju na razinama sličnima kontrolnima. Posebno je uočeno da su miksoidni melanomi pokazivali povišenu ekspresiju CUBN-a, koja je nadmašivala razine u normalnom tkivu.

Gremel i sur. pokazali su da je protein CUBN eksprimiran u više od polovice karcinoma bubrežnih stanica svijetlog tipa te da je njegov gubitak korelirao s lošijom prognozom, neovisno o stadiju i gradusu tumora (176). Naši podaci paralelni su tom opažanju, budući da smanjenje CUBN-a u RB-u i epitelioidnom melanomu može također odražavati dediferencijaciju i agresivniji fenotip. U prilog tomu, Niinivirta i sur. navode da je pozitivnost CUBN-a predviđala bolje preživljenje bez progresije i ukupno preživljenje u bolesnika s metastatskim karcinomom bubrežnih stanica liječenih sunitinibom ili sorafenibom (180), naglašavajući CUBN kao marker povoljne biologije kada je zadržan.

Suprotno tomu, Wu i sur. izvijestili su da je CUBN mRNA prekomjerno eksprimirana u kolorektalnom karcinomu, pri čemu je visoka ekspresija korelirala s uznapredovalim stadijem i kraćim preživljenjem (181). Slično tomu, naš nalaz povišene ekspresije CUBN-a u miksoidnim melanomima odražava taj obrazac, sugerirajući da u određenim tumorskim kontekstima CUBN može biti kooptiran radi poticanja rasta ili promijenjenog metabolizma hranjivih tvari. Epigenetska kontrola dodatno usložnjava sliku: Aseem i sur. pokazali su da je CUBN podložan monoalelnoj ekspresiji i pozitivno reguliran putem PPAR α/γ , dok metilacija

DNA i deacetilacija histona potiskuju njegovu transkripciju (223). Ovi dokazi pružaju mehanistički okvir prema kojem bi gubitak CUBN-a u nekim okularnim tumorima mogao odražavati epigenetsko utišavanje.

Funkcionalno, CUBN višeligandni je receptor za vitamin B12, protein koji veže vitamin D, lipoproteine i komplekse željeza. Smanjenje CUBN-a u agresivnim tumorima može predstavljati metabolički pomak od receptorom posredovanog unosa hranjivih tvari prema alternativnim mehanizmima koji podupiru brzu proliferaciju. Gubitak CUBN-posredovanog unosa vitamina B12 narušava jednokarbonski metabolizam ključan za sintezu nukleotida (172, 224-228). CUBN posreduje endocitozu kompleksa intrinzični faktor–vitamin B12; unutar stanice vitamin B12 djeluje kao kofaktor metionin-sintaze, katalizirajući pretvorbu homocisteina u metionin – proces presudan za metilaciju DNA i biosintezu purina/pirimidina (225, 226). Smanjeni unos proteina koji veže vitamin D umanjuje VDR-ovisnu transkripciju p21/p27, čime se omogućuje proliferacija (176, 180, 220, 228). S obzirom na ograničenu okularnu literaturu, suzdržavamo se od širih generalizacija i naše zaključke ograničavamo na analizirane podtipove.

Zajedno, ovi nalazi upućuju na to da je CUBN smanjen u agresivnim tipovima okularnih tumora, ali očuvan ili povišen u manje agresivnim ili miksoidnim oblicima, sugerirajući njegovu ulogu kao markera stanja diferencijacije i potencijalnog posrednika tumorskog metabolizma u okularnoj onkologiji.

5.4. Kontekstualno ovisna ekspresija CAV1 kroz podtipove melanoma

U ovoj seriji CAV1 pokazao je podtip-specifične obrasce ekspresije. Budući da su podaci o CAV1 u okularnim tumorima prema podtipovima ograničeni, ove obrasce tumačimo u kontekstu utvrđene biologije kaveola i okularne fiziologije. Protein CAV1 bio je snižen u RB-u, vretenastom melanomu i miksoidnom melanomu, ali povišen u epitelioidnom melanomu u usporedbi s normalnim okularnim tkivom. To sugerira da gubitak CAV1 može biti povezan s manje agresivnim ili diferenciranim tumorima, dok je njegova indukcija obilježje agresivnih fenotipova, poput epitelioidnog melanoma.

Stenzel i sur. analizirali su CAV1 u 51 uvealnom melanomu te utvrdili njegovu široku ekspresiju, s osobito visokim razinama u velikim tumorima sklonima metastaziranju (187). Naši rezultati podudaraju se s tim opažanjem, jer su epitelioidni melanoma, najagresivniji podtip, također pokazali povišene razine CAV1 proteina, podupirući povezanost Caveolina-1 s progresijom tumora u uvealnom melanomu.

Suprotno tomu, Doddi i sur. zaključuju da je CAV1 mRNA značajno snižena u metastatskom uvealnom melanomu u usporedbi s nemetastatskim slučajevima (229). To odstupa od naših podataka na razini proteina, koji su pokazali povišenu ekspresiju u agresivnim epitelioidnim tumorima. Ova nepodudarnost ukazuje na mogućnost posttranskripcijske ili posttranslacijske regulacije naglašavajući potrebu istodobne procjene razine transkripta i proteina radi potpunijeg razumijevanja biologije Caveolina-1 u okularnim tumorima.

Belkot i sur. navode da stanične linije uvealnog melanoma eksprimiraju znatno niže razine CAV1 u usporedbi sa staničnim linijama kožnog melanoma (230). Ovaj nalaz u skladu je s našim opažanjima u vretenastim i miksoidnim melanomima, gdje je ekspresija CAV1 bila snižena, što sugerira da je smanjenje Caveolina-1 karakteristično za određene podtipove okularnih tumora te ih može razlikovati od biologije kožnog melanoma.

Taskaeva i sur. utvrdili su da stanice uvealnog melanoma sadrže veću gustoću kaveola — plazmatskih membranskih struktura ovisnih o CAV1 — u usporedbi s normalnim melanocitima žilnice (231). To podupire naš nalaz povišene ekspresije CAV1 u epitelioidnom melanomu, jer povećani broj kaveola u uvealnom melanomu implicira funkcionalnu uključenost Caveolina-1 u progresiju tumora.

Naposljetku, Lobos-González i sur. pokazali su da u mišjim modelima melanoma nadekspresija Caveolina-1 smanjuje rast primarnog tumora, ali istodobno pojačava metastatsko širenje (185). Ova dvostruka uloga podudara se s našim nalazima: gubitak CAV1 u RB-u i vretenastom/miksoidnom melanomu sugerira tumorsupresorsku ulogu u manje agresivnim kontekstima, dok njegova povišena ekspresija u epitelioidnom melanomu upućuje na prometastatsku aktivnost.

Zajedno, ovi nalazi ukazuju da CAV1 djeluje kao kontekstualno ovisni regulator u okularnim tumorima: snižen je u RB-u i manje agresivnim melanomima, ali induciran u epitelioidnom melanomu, odražavajući njegovu dvostruku ulogu u supresiji tumora i poticanju metastaza.

5.5. Smanjena ekspresija GIPC1 i receptorni transport u okularnim tumorima

U ovoj seriji GIPC1 pokazao je podtip-specifične obrasce ekspresije. Budući da su podaci o GIPC1 u okularnim tumorima prema podtipovima ograničeni, ove nalaze tumačimo u kontekstu njegove utvrđene uloge u receptorom posredovanom unutarstaničnom transportu i signalizaciji. U normalnom okularnom tkivu GIPC1 bio je umjereno eksprimiran duž epitelnih

struktura. U RB-u, vretenastom melanomu i miksoidnom melanomu razine GIPC1 proteina bile su izrazito snižene, dok epitelioidni melanom nije pokazao značajnu razliku u odnosu na kontrolno tkivo.

Katoh i sur. izvijestili su da je GIPC1 često nadekspresiran u karcinomu dojke, jajnika i gušterače, gdje potiče proliferaciju i invaziju. Suprotno tomu, u određenim kontekstima, poput HPV-pozitivnog karcinoma vrata maternice, smanjenje GIPC1 doprinosi rezistenciji na signale suprimirajući rast (231). Naši rezultati razlikuju se od obrasca visoke ekspresije uočenog u mnogim karcinomima, budući da okularni tumori češće pokazuju smanjenu ekspresiju GIPC1, što sugerira da gubitak GIPC1 može pratiti dediferencijaciju u RB-u i vretenastom melanomu.

Li i sur. pokazali su da nadekspresija GIPC1 u želučanom karcinomu aktivira PDGFR-posredovanu PI3K–AKT signalizaciju, čime se potiče proliferacija i migracija tumorskih stanica (190). Nasuprot tomu, naša studija pokazuje da okularni tumori rijetko pokazuju nadekspresiju GIPC1, pri čemu epitelioidni melanom održava bazalne razine umjesto da povećava ekspresiju. To upućuje na to da GIPC1-posredovana PI3K–AKT signalizacija može imati manje središnju ulogu u okularnim malignitetima nego u želučanom ili karcinomu dojke.

Bao i sur. pokazali su da neuropilin-1 potiče stvaranje kompleksa GIPC1–Syx, koji aktivira RhoA i pokreće razgradnju p27^{Kip1}, čime se promiču proliferacija i migracija tumorskih stanica (193). U usporedbi s tim, naši nalazi sugeriraju da okularni tumori sa smanjenom ekspresijom GIPC1 mogu biti lišeni ove signalne osi, što potencijalno smanjuje invazivni potencijal u odnosu na tumore koji održavaju više razine GIPC1.

Siegel i sur. utvrđuju da GIPC1 djeluje i kao vezni partner i kao transkripcijski regulator MACC1, čime povećava metastatski potencijal kolorektalnog karcinoma (232). Suprotno tomu, naši podaci u okularnim tumorima pokazuju prevladavajuće smanjenje GIPC1, sugerirajući da GIPC1-posredovana pro-metastatska signalizacija možda nije dominantan mehanizam u mikrokolištu okularnih tumora. S obzirom na oskudne podatke u literaturi prema podtipovima, suzdržavamo se od širih generalizacija i zaključke ograničavamo na analizirane kontekste.

Zajedno, ovi nalazi ukazuju na to da je GIPC1 snižen u RB-u, vretenastom i miksoidnom melanomu, dok epitelioidni melanom zadržava ekspresiju sličnu kontroli. Za razliku od drugih karcinoma, u kojima nadekspresija GIPC1 potiče agresivnost, okularni tumori pokazuju drukčiji obrazac, što sugerira da gubitak GIPC1 može biti povezan s dediferencijacijom, ali ne nužno i s progresijom.

5.6. DAB2IP kao tumor supresor u okularnim malignitetima

U našoj analizi DAB2IP pokazao je podtip-specifične obrasce ekspresije. Budući da su podaci o DAB2IP u okularnim tumorima prema podtipovima ograničeni, ove nalaze tumačimo u svjetlu njegove utvrđene tumorsupresorske funkcije. Protein DAB2IP bio je značajno snižen u RB-u, vretenastom melanomu i miksoidnom melanomu u usporedbi s normalnim okularnim tkivom, dok u epitelioidnom melanomu nije uočena značajna razlika. To upućuje da je gubitak DAB2IP povezan s dediferenciranim tipovima tumora, dok epitelioidni melanom, unatoč svojoj agresivnosti, održava bazalnu ekspresiju.

Sun i sur. izvijestili su da je smanjenje DAB2IP u stanicama želučanog karcinoma potaknulo proliferaciju, migraciju i EMT putem aktivacije ERK signalnog puta (196). Ovaj nalaz podudara se s našim opažanjima u vretenastim i miksoidnim melanomima, gdje gubitak DAB2IP može poticati EMT-slične značajke i invazivnost.

Slično tomu, Wu i sur. pokazali su da ponovna ekspresija DAB2IP u kolorektalnom karcinomu suprimira proliferaciju i migraciju, smanjuje markere EMT-a te inhibira fosforilaciju AKT-a i ERK-a (233). Naši podaci za RB u skladu su s tim mehanizmom, budući da smanjeni DAB2IP može ukloniti inhibiciju PI3K–AKT/ERK signalizacije, čime se podupire rast tumora.

Smits i sur. dokazali su da EZH2-posredovana metilacija histona utišava DAB2IP u meduloblastomu, pridonoseći rezistenciji na apoptozu i lošijim ishodima (234). To pruža moguće objašnjenje za naše nalaze u RB-u, budući da oba tumora dijele razvojno podrijetlo iz neuralnih progenitorskih stanica i mogu prolaziti sličnu epigenetsku represiju DAB2IP.

Bellazzo i sur. identificirali su mikroRNA, poput miR-149-3p, koje izravno ciljaju DAB2IP, aktiviraju NF- κ B signalizaciju i potiču invazivnost (235). Taj mehanizam mogao bi objasniti izraženo smanjenje koje smo uočili u vretenastim i miksoidnim melanomima, dok epitelioidni melanom možda izbjegava takvu mikroRNA-posredovanu represiju, što bi objasnilo očuvanu ekspresiju unatoč agresivnom fenotipu.

Zhang i sur. pokazali su da DAB2IP snižava ekspresiju HSP90AA1, čime inhibira maligne karakteristike u kolorektalnom karcinomu. Utvrdili su da gubitak DAB2IP potiče proliferaciju, migraciju i rezistenciju na apoptozu, dok njegova ponovna ekspresija suzbija te značajke putem osi HSP90AA1/SRP9/ASK1/JNK (236). Ovi nalazi paralelni su našim rezultatima: u okularnim tumorima smanjeni DAB2IP može na sličan način ukloniti inhibiciju signalnih putova preživljenja, olakšavajući progresiju tumora.

Mehanistički gledano, gubitak DAB2IP stvara permisivno signalno okruženje putem koordinirane aktivacije više putova (237-239). Kao RAS-GAP protein, DAB2IP normalno

potiče hidrolizu RAS-GTP; njegov gubitak održava RAS-GTP u aktivnom obliku, dovodeći do konstitutivne fosforilacije ERK1/2 i ekspresije proliferativnih gena (237, 238). Istodobno, gubitak inhibicije PI3K (putem izavnog vezanja za podjedinicu p85) omogućuje nekontroliranu aktivaciju AKT-a, suprimirajući proapoptotske proteine BAD/FOXO i aktivirajući mTOR (239-241). Hiperaktivacija ERK-a i AKT-a konvergira s NF- κ B signalizacijom (koju DAB2IP inače inhibira), stvarajući samoodržavajuću petlju (238, 242). NF- κ B inducira transkripciju gena preživljenja (BCL-2, BCL-XL, survivin, c-IAPs, XIAP) koji blokiraju ekstrinzični (inhibicija kaspaze-8) i intrinzični (sprječavanje oslobađanja citokroma c iz mitohondrija) apoptotski put (242-245). Time se objašnjava zašto gubitak DAB2IP istodobno pojačava proliferaciju (ERK), potiče preživljenje (AKT/mTOR) i doprinosi terapijskoj rezistenciji (NF- κ B).

Zajedno, DAB2IP bio je značajno snižen u RB-u, vretenastom i mikroidnom melanomu, ali ne i u epitelioidnom melanomu, što sugerira da je njegov gubitak izraženiji u dediferenciranim histološkim podtipovima. Taj obrazac u skladu je s njegovom tumorsupresorskom ulogom, pri čemu epigenetska ili mikroRNA-posredovana represija oslobađa ERK/AKT/NF- κ B signalizaciju, proliferaciju, EMT i rezistenciju na apoptozu, dok očuvana ekspresija u epitelioidnom melanomu sugerira oslanjanje na alternativne onkogene programe.

5.7. Konceptualni pregled

Radi dodatnog konceptualnog razjašnjenja ovdje donosimo sintezni pregled koji integrira molekularne signalne putove s histopatološkim ponašanjem okularnih tumora. LRP2 i CUBN, kao ključni endocitni receptori za unos hranjivih tvari, čini se da su povezani sa statusom diferencijacije i unosom mikronutrijenata, pri čemu njihovo smanjenje u agresivnim histološkim podtipovima sugerira poremećeno vezanje liganada i dereguliranu signalizaciju morfogena. Caveolin-1 pokazuje kontekstualno ovisne uloge, djelujući kao tumorsupresor u RB-u i manje agresivnim melanomima, ali podupirući invazivne značajke u epitelioidnom melanomu. GIPC1 i DAB2IP, koji reguliraju PI3K–AKT, ERK i RhoA signalne putove, pretežno su sniženi u dediferenciranim tumorskim podtipovima, u skladu s oslobađanjem signalizacije koja potiče rast.

Zajedno, ove koordinirane promjene u endocitozi, organizaciji membrane, unosu hranjivih tvari i unutarstaničnoj signalizaciji oblikuju jedinstveni molekularni okvir koji je usklađen s histopatološkim obrascima opaženima među podtipovima okularnih tumora. Osim

njihove biološke važnosti, podtip-specifični proteinski obrasci identificirani u ovom radu imaju jasni translacijski potencijal. Uključivanje LRP2, CUBN, Caveolina-1, GIPC1 i DAB2IP u dizajn kliničkih ispitivanja vođenih biomarkerima moglo bi unaprijediti stratifikaciju rizika u uvealnom melanomu i RB-u te poduprijeti razvoj prognostičkih potpisa koji razlikuju agresivnu od indolentne bolesti. Ovi markeri mogu pomoći u definiranju kohorti obogaćenih biomarkerima, poboljšati odabir bolesnika i usmjeriti procjenu terapija ciljanih na signalne putove, čime bi se u konačnici doprinijelo individualiziranim strategijama praćenja i liječenja u okularnoj onkologiji.

5.8. Prognostičke povezanosti i transkriptomaska validacija

Kaplan–Meierova analiza preživljenja pokazala je da je visoka ekspresija CAV1 i GIPC1 povezana s lošijim ukupnim preživljenjem u uvealnom melanomu, dok LRP2, CUBN i DAB2IP nisu dosegli statističku značajnost. Prognostičke povezanosti koje smo uočili moraju se tumačiti u kontekstu veličine TCGA-UVM kohorte (n = 80 bolesnika). Iako su CAV1 i GIPC1 dosegli statističku značajnost u univarijantnoj analizi, relativno mali broj ispitanika ograničava statističku snagu, što se odražava u razmjerno širokim intervalima pouzdanosti. Ovi rezultati imaju karakter hipoteza-generirajućih nalaza te zahtijevaju potvrdu u većim, neovisnim kohortama prije moguće kliničke primjene. Gubitak prognostičke značajnosti CAV1 u multivarijantnim modelima unatoč univarijantnoj značajnosti implicira da se njegov učinak može posredovati ili biti pod utjecajem drugih kliničko-patoloških varijabli, naglašavajući važnost uključivanja više kovarijata u analize preživljenja. Nasuprot tomu, GIPC1 je zadržao neovisnu prognostičku značajnost i nakon multivarijantne prilagodbe, premda širok interval pouzdanosti odražava znatnu nesigurnost te zahtijeva vanjsku validaciju.

Radi procjene ponovljivosti i općenitosti rezultata analizirali smo više neovisnih transkriptomskih skupova podataka. Naše opažanje smanjene ekspresije LRP2 na razini proteina u okularnim tumorima izravno je potvrđeno na razini mRNA u skupu GSE208143 (RB u odnosu na kontrolnu mrežnicu), gdje su transkripti LRP2 bili značajno sniženi. Ova potvrda između platformi (imunofluorescencija proteina u odnosu na ekspresiju mRNA) povećava pouzdanost gubitka LRP2 kao dosljednog i ponovljivog molekularnog obilježja RB-a.

Međutim, uočene su izražene nepodudarnosti između razine proteina i mRNA za CUBN, CAV1, DAB2IP i GIPC1, koji su pokazali transkripcijsku povišenost u GSE208143 unatoč sniženoj ekspresiji proteina u većini tumorskih podtipova. Ove nepodudarnosti vjerojatno odražavaju posttranskripcijske regulatorne mehanizme u okularnim tumorima. Prvo, regulacija

posredovana mikroRNA: Bellazzo i sur. (235) pokazali su da miR-149-3p izravno cilja mRNA DAB2IP radi degradacije ili translacijske represije, pružajući presedan za posttranskripcijsko utišavanje unatoč povišenim razinama transkripta. Drugo, diferencijalna stabilnost proteina: Dai i sur. navode da DAB2IP podliježe ubikvitin–proteasom-posredovanoj razgradnji putem SCF^{Fbw7} (246), što može objasniti niske razine proteina unatoč visokoj razini mRNA. Treće, kompenzacijski transkripcijski odgovori mogu nastati kada stanice pojačavaju sintezu mRNA kao odgovor na gubitak proteina putem povratnih regulatornih petlji. Ovi nalazi naglašavaju da transkriptomsko profiliranje samo po sebi pruža nepotpunu informaciju o funkcionalnoj razini proteina, čime se ističe ključna važnost ortogonalne validacije na razini proteina, provedene u našoj studiji.

Analiza skupa GSE62075 (stanične linije uvealnog melanoma u odnosu na normalne melanocyte) nije pokazala značajnu diferencijalnu ekspresiju ni za jedan od pet analiziranih gena. Važno je istaknuti da odsutnost značajne diferencijalne ekspresije u staničnim linijama u usporedbi s normalnim melanocitima naglašava ograničenja *in vitro* i *in silico* transkriptomskih modela, koji često ne reproduciraju mikrokoliš, metaboličku regulaciju i regulaciju ovisnu o stupnju diferencijacije prisutnu u primarnim okularnim tumorima. Ta nepodudarnost dodatno podupire uključenost posttranskripcijskih regulatornih mehanizama u podlozi naših nalaza na razini proteina. Ovaj negativan nalaz odražava dobro dokumentirana ograničenja imortaliziranih staničnih linija, koje tijekom uspostave i pasiranja prolaze selekcijske pritiske što može izbrisati obrasce ekspresije prisutne u primarnim tumorima. Ranije studije dokumentirale su opsežnu transkriptomsku divergenciju između staničnih linija uvealnog melanoma i primarnih tumora (247, 248), naglašavajući da sustavi stanične kulture nedostatno reproduciraju tumorski mikrokoliš, stromalne interakcije i staničnu heterogenost inherentnu nativnim okularnim malignitetima. Paradoksalno, ovaj negativan rezultat u staničnim linijama dodatno osnažuje naše primarne nalaze, ističući nužnost proučavanja svježih primarnih tumorskih uzoraka, kako je provedeno u ovom radu.

Analiza TCGA podataka za uvealni melanom (n = 78 bolesnika) potvrdila je kliničku relevantnost izvan naše institucionalne kohorte. GIPC1 se pokazao kao neovisni nepovoljni prognostički čimbenik u multivarijantnoj analizi, dok je DAB2IP pokazao protektivnu povezanost. Ponovljivost prognostičke vrijednosti GIPC1 u neovisnim populacijama bolesnika podupire njegov potencijal kao biomarkera, premda je prije kliničke primjene nužna prospektivna provjera.

5.9. Ograničenja studije i budući smjerovi istraživanja

Nekoliko ograničenja zahtijeva razmatranje. Prvo, naša je studija deskriptivne i korelacijske naravi te ne uključuje funkcionalne validacijske eksperimente. Nismo proveli in vitro niti in vivo manipulacije (nadekspresiju, utišavanje ili gensko izbacivanje) LRP2, CUBN, CAV1, GIPC1 ili DAB2IP kako bismo utvrdili uzročnu povezanost između promjena u ekspresiji i tumorskog fenotipa. Iako naši podaci imunofluorescencije dokumentiraju obrasce ekspresije, a javno dostupni skupovi podataka pružaju prognostičke povezanosti, ta opažanja sama po sebi ne mogu razlučiti jesu li promjene u razinama proteina pokretači tumorogeneze ili popratni događaji maligne transformacije. Funkcionalna istraživanja korištenjem organoida dobivenih iz bolesnika, ksenograftnih modela ili genske modifikacije posredovane CRISPR-om bila bi potrebna za utvrđivanje uzročnosti i precizno razjašnjenje mehanističkog doprinosa svakog proteina inicijaciji, progresiji i metastaziranju okularnih tumora.

Drugo, naša institucionalna kohorta obuhvaća relativno malen broj uzoraka po podtipu tumora ($n = 10$ RB; $n = 10$ po podtipu melanoma), što ograničava statističku snagu i općenitost rezultata. Dizajn s jednom institucijom ograničava procjenu međuinstitucijske varijabilnosti te onemogućuje evaluaciju u različitim etničkim i geografskim populacijama.

Treće, presječni dizajn bilježi ekspresiju u jednoj vremenskoj točki te ne omogućuje procjenu vremenske dinamike tijekom evolucije tumora ili odgovora na liječenje. Longitudinalne studije sa serijskim biopsijama omogućile bi utvrđivanje jesu li promjene u ekspresiji rani događaji u tumorogenezi ili kasne manifestacije progresije.

Četvrto, iako smo integrirali javno dostupne transkriptomске skupove podataka, velike proteomske baze za okularne tumore zasad nisu dostupne, što ograničava mogućnost neovisne validacije na razini proteina. Nepodudarnosti između razine proteina i mRNA koje smo uočili dodatno naglašavaju važnost ortogonalne validacije, dok većina javnih skupova podataka pruža isključivo informacije na razini transkripta.

Peto, naš kvantitativni pristup imunofluorescenciji, premda strogo standardiziran, odražava relativnu, a ne apsolutnu količinu proteina te ne obuhvaća posttranslacijske modifikacije, subcelularnu lokalizaciju ili interakcije protein–protein koje mogu modulirati funkcionalnu aktivnost. Dodatno ograničenje predstavlja nepotpuna dostupnost kliničkih kovarijata (uključujući dob, spol i anatomske organe), što je onemogućilo potpunu multivarijatnu prilagodbu u analizama preživljenja. Budući multicentrični skupovi podataka sa standardiziranim metapodacima bit će nužni kako bi se takvi čimbenici mogli primjereno kontrolirati.

Nadalje, buduća istraživanja imala bi koristi od primjene prostorno razlučivih metoda profiliranja, uključujući multiplex imunofluorescenciju, slikovnu masenu citometriju te jednostančnu ili prostornu transkriptomiku, kako bi se precizno lokalizirala ekspresija proteina unutar tumorskih, stromalnih i vaskularnih kompartmenata te bolje karakterizirala regulacija ovisna o mikrookolišu.

Iako smo iskoristili dostupne javne transkriptomske skupove podataka, velike proteomske baze za okularne tumore i dalje su rijetke, što ograničava mogućnosti vanjske validacije na razini proteina. Uočene nepodudarnosti između proteina i mRNA naglašavaju hitnu potrebu za uparenim proteomsko-transkriptomskim profiliranjem istih uzoraka kako bi se sustavno razjasnili posttranskripcijski regulatorni mehanizmi. Buduće multicentrične studije trebale bi primijeniti integrirane multi-omiks pristupe (proteomika, transkriptomika, epigenomika) u većim kohortama radi potvrde ovih nalaza. Dodatno, funkcionalna potvrda u modelima organoida ili ksenografta dobivenih od bolesnika mogla bi razjasniti jesu li opažene promjene u ekspresiji pokretači ili popratni događaji tumorogeneze.

Zajedno, ove analize pozicioniraju GIPC1 kao neovisni prognostički biomarker i potencijalni onkogeni pokretač u uvealnom melanomu, dok DAB2IP djeluje kao protektivni tumorsupresor. CAV1 pokazuje se kontekstualno ovisnim, sa značajnošću ograničenom na univarijatne analize. Nepodudarnost između transkriptomskih i proteinskih nalaza naglašava važnost integrativnih analiza i specifičnog tumorskog konteksta pri evaluaciji kandidatskih biomarkera u okularnoj onkologiji.

6. Zaključci

Ova studija razgraničuje podtip-specifičnu ekspresiju pet endocitnih i signalnih proteina u normalnom okularnom tkivu, RB-u i uvealnom melanomu. LRP2 bio je jednoliko snižen. CUBN bio je snižen u RB-u i epitelioidnom melanomu, a očuvan ili povišen u ostalim podtipovima. CAV1 bio je povišen u epitelioidnom melanomu, a snižen u drugim podtipovima. GIPC1 i DAB2IP bili su očuvani u epitelioidnom melanomu te sniženi u RB-u i miksoidnom ili vretenastom melanomu. Integrirane analize povezale su višu ekspresiju GIPC1 i kontekstualno ovisnu ekspresiju CAV1 s lošijim preživljenjem. DAB2IP pokazao je protektivnu povezanost u multivarijantnim modelima. Nepodudarnosti između razine proteina i transkripta naglašavaju vrijednost višerazinskog profiliranja.

Ovi nalazi izdvajaju LRP2, CUBN, CAV1, GIPC1 i DAB2IP kao komplementarne markere stanja diferencijacije i tumorskog ponašanja u okularnoj onkologiji. Buduća istraživanja trebala bi uzeti u obzir ove molekularne potpise u većim multicentričnim kohortama. Prostorno integrirana proteotranskriptomika omogućila bi preciznije razlučivanje staničnog konteksta. Funkcionalni pokusi trebali bi ispitati unos hranjivih tvari posredovan Megalin-Cubilin sustavom, signalizaciju posredovanu CAV1 te regulaciju signalnih putova putem GIPC1/DAB2IP. Takvi naponi mogli bi unaprijediti stratifikaciju rizika i poduprijeti razvoj terapijskih strategija vođenih biomarkerima za RB i uvealni melanom.

7. Sažetak

Uvod/Ciljevi

Retinoblastom (RB) i uvealni melanom (UM) predstavljaju agresivne maligne tumore oka koji i dalje nose značajan rizik za očuvanje vida i preživljenje bolesnika, dok su dostupni molekularni pokazatelji diferencijacije i prognoze ograničeni. U ovom istraživanju analizirana je ekspresija proteina uključenih u procese endocitoze i signalizacije, uključujući Megalin (LRP2), Cubilin (CUBN), Caveolin-1, GAIP-interacting protein C-terminus 1 (GIPC1) i Disabled homolog 2-interacting protein (DAB2IP), s ciljem utvrđivanja postoje li obrasci ekspresije specifični za pojedine podtipove okularnih tumora te njihova povezanost s transkriptomskim profilima i preživljenjem.

Metode

Istraživanje je provedeno na formalinom fiksiranim i parafinom uklopljenim uzorcima humanog očnog tkiva koji su uključivali kontrolne uzorke ($n = 10$), retinoblastom ($n = 10$) i podtipove uvealnog melanoma (epitelioidni, vretenasti i miksoidni; ukupno $n = 30$). Imunofluorescentna ekspresija LRP2, CUBN, CAV1, GIPC1 i DAB2IP analizirana je pomoću programa ImageJ (verzija 1.54g) na standardiziranim poljima velikog povećanja. Za statističku obradu korištene su srednje vrijednosti po uzorku, uz primjenu Shapiro–Wilkova testa i jednosmjerne ANOVA analize s Tukeyjevim post hoc testom. Analiza javno dostupnih baza podataka obuhvatila je: (I) procjenu ukupnog preživljenja u TCGA-UVM kohorti putem platforme GEPIA2, (II) analizu diferencijalne ekspresije u GEO skupovima podataka (GSE62075: melanociti u odnosu na stanične linije UM-a; GSE208143: retinoblastom u odnosu na pedijatrijsku kontrolnu mrežnicu) te (III) multivarijatnu Coxovu regresijsku analizu proporcionalnih hazarda korištenjem platforme GEPIA3.

Rezultati

Ekspresija LRP2 bila je dosljedno smanjena u retinoblastomu i svim podtipovima uvealnog melanoma u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Snižena ekspresija CUBN-a zabilježena je u retinoblastomu i epitelioidnom melanomu, dok je u vretenastom melanomu ostala očuvana, a u melanomu s miksoidnim stanicama povećana. Povišena ekspresija CAV1 utvrđena je u epitelioidnom melanomu, dok je u retinoblastomu te miksoidnom i vretenastom melanomu bila smanjena. Ekspresija GIPC1 i DAB2IP ostala je očuvana u epitelioidnom melanomu, ali je bila značajno reducirana u retinoblastomu te miksoidnom i vretenastom melanomu. Analiza TCGA-UVM kohorte pokazala je povezanost više razine ekspresije mRNA za CAV1 i GIPC1 s lošijim ukupnim preživljenjem ($p \approx 0,025$ i $0,036$), dok za LRP2, CUBN i

DAB2IP nije pronađena statistički značajna povezanost. GEO analize nisu pokazale značajne razlike u ekspresiji analiziranih gena između staničnih linija UM-a i melanocita (GSE62075). Nasuprot tome, u retinoblastomu (GSE208143) utvrđena je smanjena ekspresija LRP2 te povećana ekspresija CUBN, CAV1, GIPC1 i DAB2IP.

Zaključci

Proteini povezani s endocitozom i signalnim putevima pokazuju različite obrasce ekspresije ovisno o podtipu okularnog tumora. Integracijom rezultata s javno dostupnim bazama podataka identificirani su CAV1 i GIPC1 kao potencijalni nepovoljni prognostički pokazatelji u uvealnom melanomu, dok poremećena regulacija LRP2/CUBN/DAB2IP upućuje na njihovu važnu ulogu u biologiji tumora otkriva te njihov potencijal kao biomarkera i mogućih terapijskih meta.

8. Laički sažetak

Uvod/Ciljevi

Retinoblastom i uvealni melanom su vrste tumora oka koje mogu ozbiljno ugroziti vid i život. Trenutno postoji malo pouzdanih pokazatelja koji bi pomogli liječnicima procijeniti kako će se bolest razvijati. U ovom istraživanju ispitivani su određeni proteini u tumorskim stanicama kako bi se vidjelo razlikuju li se između različitih vrsta tumora i mogu li biti povezani s ishodom bolesti.

Metode

Istraživači su analizirali uzorke zdravog tkiva oka i tumora koristeći laboratorijsku metodu koja omogućuje uočavanje i mjerenje proteina u stanicama. Rezultati su zatim statistički obrađeni. Također su korišteni javno dostupni podaci kako bi se dodatno provjerila povezanost tih proteina s preživljenjem pacijenata i razlikama između zdravih i tumorskih stanica.

Rezultati

Utvrđeno je da se razine pojedinih proteina razlikuju ovisno o vrsti tumora. Neki su proteini bili smanjeni u svim tumorima, dok su drugi varirali ovisno o podtipu tumora. Posebno je važno da su dva proteina (CAV1 i GIPC1) povezana s lošijim preživljenjem kod pacijenata s uvealnim melanomom. Dodatne analize pokazale su da se obrasci ekspresije ovih proteina razlikuju između tumorskih i zdravih stanica, osobito kod retinoblastoma.

Zaključci

Rezultati pokazuju da određeni proteini imaju različite uloge u tumorima oka i da bi mogli poslužiti kao korisni pokazatelji bolesti ili mete za razvoj novih terapija. Ovo istraživanje doprinosi boljem razumijevanju biologije tumora oka i može pomoći u budućem razvoju preciznijih metoda liječenja.

9. Summary

Linking Megalin, Cubilin, Caveolin-1, GIPC1 and Dab2IP Expression to Ocular Tumorigenesis: Profiles in Retinoblastoma, Choroidal Melanoma, and the Normal Human Eye

Background/Objectives

Retinoblastoma (RB) and uveal melanoma (UM) remain aggressive ocular malignancies associated with substantial risks to vision and patient survival, while reliable molecular indicators of differentiation and prognosis are still limited. This study evaluated the expression of proteins involved in endocytosis and signaling pathways, including Megalin (LRP2), Cubilin (CUBN), Caveolin-1, GAIP-interacting protein C-terminus 1 (GIPC1), and Disabled homolog 2-interacting protein (DAB2IP), to determine whether subtype-specific expression profiles exist in ocular tumors and whether these profiles correlate with transcriptomic signatures and survival outcomes.

Methods

Formalin-fixed, paraffin-embedded human ocular tissue samples included controls (n = 10), retinoblastoma specimens (n = 10), and UM subtypes (epithelioid, spindle, and mixoid; total n = 30). Immunofluorescent staining for LRP2, CUBN, CAV1, GIPC1, and DAB2IP was quantified using ImageJ software (version 1.54g) across standardized high-power microscopic fields. Mean values per specimen were used for statistical evaluation, applying the Shapiro–Wilk test and one-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc analysis. Publicly available datasets were additionally analyzed through: (I) overall survival assessment in TCGA-UVM via GEPIA2, (II) differential gene expression analysis in GEO datasets (GSE62075: melanocytes versus UM cell lines; GSE208143: retinoblastoma versus pediatric control retina), and (III) multivariate Cox proportional hazards regression using the GEPIA3 platform.

Results

LRP2 expression was consistently reduced in retinoblastoma and across all UM subtypes compared with controls. CUBN expression was decreased in retinoblastoma and epithelioid melanoma, preserved in spindle melanoma, and elevated in mixoid-cell melanoma. Increased CAV1 expression was observed in epithelioid melanoma, whereas reduced levels were detected in retinoblastoma as well as spindle and mixoid melanomas. GIPC1 and DAB2IP expression remained preserved in epithelioid melanoma but were markedly reduced in retinoblastoma and in spindle/mixoid melanoma subtypes. Within the TCGA-UVM cohort,

elevated mRNA expression of CAV1 and GIPC1 correlated with poorer overall survival ($p \approx 0.025$ and 0.036), while no statistically significant association was identified for LRP2, CUBN, or DAB2IP. GEO analyses demonstrated no significant expression differences for the investigated genes between UM cell lines and melanocytes (GSE62075). In contrast, retinoblastoma samples from GSE208143 showed downregulation of LRP2 alongside upregulation of CUBN, CAV1, GIPC1, and DAB2IP.

Conclusions

Proteins associated with endocytosis and intracellular signaling demonstrate distinct subtype-related expression patterns in ocular tumors. Integration with publicly available datasets identified CAV1 and GIPC1 as unfavorable survival-associated markers in UM, while dysregulation of LRP2/CUBN/DAB2IP appears to represent an important feature of ocular tumor biology, supporting their potential role as candidate biomarkers and therapeutic targets.

10.Lay summary

Background/Objectives

Retinoblastoma and uveal melanoma are types of eye cancer that can seriously threaten vision and life. Currently, there are limited reliable markers to help doctors predict how these diseases will progress. This study examined specific proteins in tumor cells to determine whether they differ between tumor types and whether they are linked to disease outcomes.

Methods

Researchers analyzed samples of healthy eye tissue and tumors using laboratory techniques that allow visualization and measurement of proteins within cells. The results were statistically analyzed. Publicly available datasets were also used to further examine whether these proteins are associated with patient survival and differences between healthy and tumor cells.

Results

The study found that the levels of certain proteins vary depending on the tumor type. Some proteins were reduced in all tumors, while others differed depending on the tumor subtype. Importantly, two proteins (CAV1 and GIPC1) were associated with poorer survival in patients with uveal melanoma. Additional analyses showed differences in protein expression between tumor and healthy cells, particularly in retinoblastoma.

Conclusions

These findings suggest that specific proteins play different roles in eye tumors and may serve as useful disease markers or targets for future therapies. This research improves our understanding of eye tumor biology and may support the development of more precise treatment approaches in the future.

11. Literatura

1. Rehman I, Hazhirkarzar B, Patel BC. Anatomy, Head and Neck, Eye. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Bitu Hazhirkarzar declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Bhupendra Patel declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2026.
2. Nguyen KH, Patel BC, Tadi P. Anatomy, Head and Neck: Retina. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Bhupendra Patel declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Prasanna Tadi declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2026.
3. Jager MJ, Shields CL, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Grossniklaus HE, Stern MH, et al. Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):24.
4. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA*. 2014;311(18):1901-11.
5. Dimaras H, Corson TW, Cobrinik D, White A, Zhao J, Munier FL, et al. Retinoblastoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15021.
6. Bekerman I, Gottlieb P, Vaiman M. Variations in eyeball diameters of the healthy adults. *J Ophthalmol*. 2014;2014:503645.
7. Shumway CL, Motlagh M, Wade M. Anatomy, Head and Neck, Eye Extraocular Muscles. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Mahsaw Motlagh declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Matthew Wade declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2026.
8. Willcox MDP, Argueso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):366-403.
9. Jozsa F, Hall WA. Neuroanatomy, Retina. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Walter Hall declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2026.
10. Boote C, Sigal IA, Grytz R, Hua Y, Nguyen TD, Girard MJA. Scleral structure and biomechanics. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2020;74:100773.
11. Ludwig PE, Lopez MJ, Sevensma KE. Anatomy, Head and Neck, Eye Cornea. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Michael Lopez declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Karlin Sevensma declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2026.
12. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(2):144-68.

13. Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31(5):377-406.
14. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018;66(2):190-4.
15. Sebag J. The vitreous : structure, function, and pathobiology. New York: Springer-Verlag; 1989.
16. Aerts I, Lumbroso-Le Rouic L, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F, Desjardins L. Retinoblastoma. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:31.
17. Kovačević P, Todorović P, Kelam N, Konjevoda S, Kunac N, Marin Lovrić J, et al. Linking Megalin, Cubilin, Caveolin-1, GIPC1 and Dab2IP Expression to Ocular Tumorigenesis: Profiles in Retinoblastoma, Choroidal Melanoma, and the Normal Human Eye. 2025;17(23):3785.
18. Kivela T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(9):1129-31.
19. Global Retinoblastoma Study G, Fabian ID, Abdallah E, Abdullahi SU, Abdulqader RA, Adamou Boubacar S, et al. Global Retinoblastoma Presentation and Analysis by National Income Level. *JAMA Oncol.* 2020;6(5):685-95.
20. Yun J, Li Y, Xu CT, Pan BR. Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma. *Int J Ophthalmol.* 2011;4(1):103-9.
21. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;129C(1):23-8.
22. Chantada GL, Qaddoumi I, Canturk S, Khetan V, Ma Z, Kimani K, et al. Strategies to manage retinoblastoma in developing countries. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;56(3):341-8.
23. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-3.
24. Benavente CA, Dyer MA. Genetics and epigenetics of human retinoblastoma. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:547-62.
25. Berry JL, Jubran R, Kim JW, Wong K, Bababeygy SR, Almarzouki H, et al. Long-term outcomes of Group D eyes in bilateral retinoblastoma patients treated with chemoreduction and low-dose IMRT salvage. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(4):688-93.
26. Rushlow DE, Mol BM, Kennett JY, Yee S, Pajovic S, Theriault BL, et al. Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet Oncol.* 2013;14(4):327-34.

27. Zugbi S, Ganiewich D, Bhattacharyya A, Aschero R, Ottaviani D, Sampor C, et al. Clinical, Genomic, and Pharmacological Study of MYCN-Amplified RB1 Wild-Type Metastatic Retinoblastoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9).
28. Eagle RC, Jr. The pathology of ocular cancer. *Eye (Lond)*. 2013;27(2):128-36.
29. Eagle RC, Jr. High-risk features and tumor differentiation in retinoblastoma: a retrospective histopathologic study. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(8):1203-9.
30. Albert D, Miller J, Azar D, Young L. Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology 2020.
31. Shields JA, Shields CL, Shields JA. Intraocular tumors : an atlas and textbook / Jerry A. Shields, Carol L. Shields. 2nd ed. ed. Philadelphia: Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
32. Shields CL, Shields JA. Diagnosis and management of retinoblastoma. *Cancer Control*. 2004;11(5):317-27.
33. Finger PT, Harbour JW, Karcioğlu ZA, Soo. Risk factors for metastasis in retinoblastoma. 2002;47 1:1-16.
34. Reese AB, Ellsworth RM. The evaluation and current concept of retinoblastoma therapy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1963;67:164-72.
35. Shields CL, Mashayekhi A, Au AK, Czyz C, Leahey A, Meadows AT, et al. The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmology*. 2006;113(12):2276-80.
36. Fabian ID, Reddy A, Sagoo MS. Classification and staging of retinoblastoma. *Community Eye Health*. 2018;31(101):11-3.
37. Rishi P, Attiku Y, Manchegowda PT, Agarwal A, Sharma M. Vitreous Seed Classification and Regression Patterns in Eyes With Retinoblastoma. *J Vitreoretin Dis*. 2021;5(2):121-9.
38. Kodetová M, Svojič K, Sirc J, Vaneček J, Pochop P. Therapy for Vitreous Seeding Caused by Retinoblastoma. A Review. *Ceska a slovenská oftalmologie : časopis České oftalmologické společnosti a Slovenské oftalmologické společnosti*. 2023;3(Ahead of Print):1001-14.
39. Abramson DH, Beaverson K, Sangani P, Vora RA, Lee TC, Hochberg HM, et al. Screening for retinoblastoma: presenting signs as prognosticators of patient and ocular survival. *Pediatrics*. 2003;112(6 Pt 1):1248-55.

40. Kaliki S, Shields CL, Rojanaporn D, Al-Dahmash S, McLaughlin JP, Shields JA, et al. High-risk retinoblastoma based on international classification of retinoblastoma: analysis of 519 enucleated eyes. *Ophthalmology*. 2013;120(5):997-1003.
41. Rodriguez-Galindo C, Orbach DB, VanderVeen D. Retinoblastoma. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):201-23.
42. Abramson DH, Scheffler AC. Update on retinoblastoma. *Retina*. 2004;24(6):828-48.
43. Balmer A, Munier F. Differential diagnosis of leukocoria and strabismus, first presenting signs of retinoblastoma. *Clin Ophthalmol*. 2007;1(4):431-9.
44. Ancona-Lezama D, Dalvin LA, Shields CL. Modern treatment of retinoblastoma: A 2020 review. *Indian J Ophthalmol*. 2020;68(11):2356-65.
45. Chronopoulos A, Babst N, Schiemenz C, Schutz JS, Heindl LM, Ranjbar M, et al. A Narrative Review - Therapy Options and Therapy Failure in Retinoblastoma. *Neurosignals*. 2022;30(S1):39-58.
46. Kumari N, Jain N, Saboo S, Parthasarathy R, Gupta V, Mahajan A, et al. Intra-arterial chemotherapy in refractory and advanced intraocular retinoblastoma. *Indian J Ophthalmol*. 2023;71(2):436-43.
47. Daniels AB, Patel SN, Milam RW, Kohanim S, Friedman DL, Koyama T. Effect of Intravenous Chemotherapy Regimen on Globe Salvage Success Rates for Retinoblastoma Based on Disease Class-A Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9).
48. Munier FL, Beck-Popovic M, Chantada GL, Cobrinik D, Kivela TT, Lohmann D, et al. Conservative management of retinoblastoma: Challenging orthodoxy without compromising the state of metastatic grace. "Alive, with good vision and no comorbidity". *Prog Retin Eye Res*. 2019;73:100764.
49. Machakuri K, Kaliki S. Bilateral enucleation for retinoblastoma: A study of 14 patients. *Oman J Ophthalmol*. 2022;15(2):188-92.
50. Zhao J, Feng Z, Leung G, Gallie BL. Retinoblastoma Survival Following Primary Enucleation by AJCC Staging. *Cancers (Basel)*. 2021;13(24).
51. Kim JW, Shah SN, Green S, O'Fee J, Tamrazi B, Berry JL. Tumour size criteria for Group D and E eyes in the International Classification System for Retinoblastoma: effects on rates of globe salvage and high-risk histopathologic features. *Acta Ophthalmol*. 2020;98(1):e121-e5.
52. Thakur S, Basnet R, Bajracharya K. Multidisciplinary Approach for Retinoblastoma Management. *Nepal J Ophthalmol*. 2021;13(24):234-6.

53. Tomar AS, Finger PT, Gallie B, Kivela TT, Mallipatna A, Zhang C, et al. High-risk Pathologic Features Based on Presenting Findings in Advanced Intraocular Retinoblastoma: A Multicenter, International Data-Sharing American Joint Committee on Cancer Study. *Ophthalmology*. 2022;129(8):923-32.
54. Chevez-Barrios P, Eagle RC, Jr., Krailo M, Piao J, Albert DM, Gao Y, et al. Study of Unilateral Retinoblastoma With and Without Histopathologic High-Risk Features and the Role of Adjuvant Chemotherapy: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2019;37(31):2883-91.
55. Sunwoo Y, Choi JY, Park HJ, Kim BK, Hong KT, Khwarg SI, et al. Twenty-Year Retrospective Study of Post-Enucleation Chemotherapy in High-Risk Patients with Unilateral Retinoblastoma. *Children (Basel)*. 2022;9(12).
56. McLaughlin CC, Wu X-C, Jemal A, Martin HJ, Roche LM, Chen VW. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. 2005;103(5):1000-7.
57. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal Melanoma: Trends in Incidence, Treatment, and Survival. *Ophthalmology*. 2011;118(9):1881-5.
58. Stålhammar G. Comprehensive causes of death in uveal melanoma: mortality in 1530 consecutively diagnosed patients followed until death. *JNCI Cancer Spectr*. 2023;7(6).
59. JENSEN OA. MALIGNANT MELANOMAS OF THE HUMAN UVEA. 1982;60(2):161-82.
60. Kujala E, Makitie T, Kivela T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(11):4651-9.
61. Stålhammar G, Herrspiegel C. Long-term relative survival in uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Communications Medicine*. 2022;2(1):18.
62. Barker CA, Kozlova A, Shoushtari AN, Hay JL, Francis JH, Abramson DH. Quality of Life Concerns in Patients with Uveal Melanoma after Initial Diagnosis. *Ocul Oncol Pathol*. 2020;6(3):184-95.
63. Huang Y, Guo Y. Quality of life among people with eye cancer: a systematic review from 2012 to 2022. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2024;22(1):3.
64. Carvajal RD, Sacco JJ, Jager MJ, Eschelman DJ, Olofsson Bagge R, Harbour JW, et al. Advances in the clinical management of uveal melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2023;20(2):99-115.
65. Nathan P, Hassel Jessica C, Rutkowski P, Baurain J-F, Butler Marcus O, Schlaak M, et al. Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(13):1196-206.

66. Damato BE, Dukes J, Goodall H, Carvajal RD. Tebentafusp: T Cell Redirection for the Treatment of Metastatic Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7).
67. Stalhammar G. Delays between Uveal Melanoma Diagnosis and Treatment Increase the Risk of Metastatic Death. *Ophthalmology*. 2024;131(9):1094-104.
68. Tarlan B, Kiratli H. Uveal Melanoma: Current Trends in Diagnosis and Management. *Turk J Ophthalmol*. 2016;46(3):123-37.
69. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye*. 2013;27(2):230-42.
70. Gallenga CE, Franco E, Adamo GG, Violanti SS, Tassinari P, Tognon M, et al. Genetic Basis and Molecular Mechanisms of Uveal Melanoma Metastasis: A Focus on Prognosis. 2022;Volume 12 - 2022.
71. Khan SA, Almalki WH, Arora S, Kesharwani P. Recent approaches for the treatment of uveal melanoma: Opportunities and challenges. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2024;193:104218.
72. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer Classification of Uveal Melanoma (Anatomic Stage) Predicts Prognosis in 7,731 Patients: The 2013 Zimmerman Lecture. *Ophthalmology*. 2015;122(6):1180-6.
73. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, Gamel JW. Modifications of Callender's Classification of Uveal Melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol*. 2018;195:lvi-lx.
74. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Mashayekhi A, Shields JA. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina*. 2012;32(7):1363-72.
75. Mellen PL, Morton SJ, Shields CL. American joint committee on cancer staging of uveal melanoma. *Oman J Ophthalmol*. 2013;6(2):116-8.
76. Bagger M, Andersen MT, Andersen KK, Heegaard S, Andersen MK, Kiilgaard JF. The prognostic effect of American Joint Committee on Cancer staging and genetic status in patients with choroidal and ciliary body melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):438-44.
77. Kaliki S, Shields CL, Shields JA. Uveal melanoma: estimating prognosis. *Indian J Ophthalmol*. 2015;63(2):93-102.
78. Kulbay M, Marcotte E, Remtulla R, Lau THA, Paez-Escamilla M, Wu KY, et al. Uveal Melanoma: Comprehensive Review of Its Pathophysiology, Diagnosis, Treatment, and Future Perspectives. 2024;12(8):1758.

79. McLean I, Foster W, Zimmerman LJDhdoS-. JW Gamel Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology., 1983, 96.77914-0.
80. de Klein A, Van Beek JGM, Kilic E, Naus N, Koopmans AE, Verdijk RM. Diagnosis, Histopathologic and Genetic Classification of Uveal Melanoma. In: Duc GHT, editor. Melanoma - From Early Detection to Treatment. London: IntechOpen; 2013.
81. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients. *Ophthalmology*. 2013;120(10):2066-71.
82. Dithmar S, Diaz CE, Grossniklaus HE. INTRAOCULAR MELANOMA SPREAD TO REGIONAL LYMPH NODES: Report of Two Cases. *RETINA*. 2000;20(1).
83. Damato EM, Damato BE. Detection and Time to Treatment of Uveal Melanoma in the United Kingdom: An Evaluation of 2384 Patients. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1582-9.
84. Krantz BA, Dave N, Komatsubara KM, Marr BP, Carvajal RD. Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. *Clin Ophthalmol*. 2017;11:279-89.
85. Das D, Rehman O, Bhattacharjee K, Bhattacharjee H, Barman MJ, Maity S, et al. Malignant choroidal melanoma with vitreous seeds: supported by histopathology and field emission scanning electron microscopy study. *Rom J Ophthalmol*. 2023;67(2):180-4.
86. Solnik M, Paduszyńska N, Czarnecka AM, Synoradzki KJ, Yousef YA, Chorągiewicz T, et al. Imaging of Uveal Melanoma—Current Standard and Methods in Development. 2022;14(13):3147.
87. Guner MK, Ferencsik K, Olsen TW, Dalvin LAJR. Optical coherence tomography findings in choroidal melanoma-associated subretinal fluid. 2022;42(11):2159-68.
88. Hoffmann K, Jung J, el Gammal S, Altmeyer P. Malignant Melanoma in 20-MHz B Scan Sonography. *Dermatology*. 2009;185(1):49-55.
89. Chattopadhyay C, Kim DW, Gombos DS, Oba J, Qin Y, Williams MD, et al. Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer*. 2016;122(15):2299-312.
90. Jiblawi A, Chanbour H, Tayba A, Khayat H, Jiblawi K. Magnetic Resonance Imaging Diagnosis of Choroidal Melanoma. *Cureus*. 2021;13(7):e16628.
91. Caminal JM, Sanz S, Carreras M, Català I, Arruga J, Roca G. Epibulbar Seeding at the Site of a Transvitreal Fine-Needle Aspiration Biopsy. *Archives of Ophthalmology*. 2006;124(4):587-9.

92. Scheffler AC, Gologorsky D, Marr BP, Shields CL, Zeolite I, Abramson DH. Extraocular Extension of Uveal Melanoma After Fine-Needle Aspiration, Vitrectomy, and Open Biopsy. *JAMA Ophthalmology*. 2013;131(9):1220-4.
93. Faulkner-Jones BE, Foster WJ, Harbour W, Smith ME, Dávila RMJAc. Fine needle aspiration biopsy with adjunct immunohistochemistry in intraocular tumor management. 2005;49(3):297-308.
94. Cohen V, Dinakaran S, Parsons M, Rennie IJE. Transvitreal fine needle aspiration biopsy: the influence of intraocular lesion size on diagnostic biopsy result. 2001;15(2):143-7.
95. Singh AD, Medina CA, Singh N, Aronow ME, Biscotti CV, Triozzi PLJBJoO. Fine-needle aspiration biopsy of uveal melanoma: outcomes and complications. 2016;100(4):456-62.
96. Bagger M, Tebering JF, Kiilgaard JFJO. The ocular consequences and applicability of minimally invasive 25-gauge transvitreal retinochoroidal biopsy. 2013;120(12):2565-72.
97. Jin E, Burnier JVJOO, Pathology. Liquid biopsy in uveal melanoma: are we there yet? 2021;7(1):1-16.
98. De Bruyn DP, Beasley AB, Verdijk RM, Van Poppelen NM, Paridaens D, De Keizer RO, et al. Is tissue still the issue? The promise of liquid biopsy in uveal melanoma. 2022;10(2):506.
99. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. 2014;158(5):1110-22.
100. Callejo S, Anteck E, Blanco P, Edelstein C, Burnier MJE. Identification of circulating malignant cells and its correlation with prognostic factors and treatment in uveal melanoma. A prospective longitudinal study. 2007;21(6):752-9.
101. Uguen AJAI, Morphology M. Digital Pathology Slides-based Measurement of Tumor Cells and Lymphocytes Within Cytology Samples Supports the Relevance of the Separation by Size of Nonhematological Tumor and Hematological Nontumor Cells in Liquid Biopsies. 2021;29(7):494-8.
102. Huebner H, Fasching PA, Gumbrecht W, Jud S, Rauh C, Matzas M, et al. Filtration based assessment of CTCs and CellSearch® based assessment are both powerful predictors of prognosis for metastatic breast cancer patients. 2018;18(1):204.
103. Mazzini C, Pinzani P, Salvianti F, Scatena C, Paglierani M, Ucci F, et al. Circulating tumor cells detection and counting in uveal melanomas by a filtration-based method. 2014;6(1):323-32.

104. Beasley A, Isaacs T, Khattak MA, Freeman JB, Allcock R, Chen FK, et al. Clinical application of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in uveal melanoma. 2018;2:1-12.
105. Bande MF, Santiago M, Muinelo-Romay L, Blanco MJ, Mera P, Capeans C, et al. Detection of circulating melanoma cells in choroidal melanocytic lesions. 2015;8(1):452.
106. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. 2004;10(24):8152-62.
107. Wang L, Balasubramanian P, Chen AP, Kummar S, Evrard YA, Kinders RJ, editors. Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Seminars in oncology*; 2016: Elsevier.
108. Tura A, Merz H, Reinsberg M, Lüke M, Jager MJ, Grisanti S, et al. Analysis of monosomy-3 in immunomagnetically isolated circulating melanoma cells in uveal melanoma patients. 2016;29(5):583-9.
109. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel KJNRC. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. 2011;11(6):426-37.
110. Valle-Inclan JE, Stangl C, de Jong AC, van Dessel LF, van Roosmalen MJ, Helmijr JC, et al. Optimizing Nanopore sequencing-based detection of structural variants enables individualized circulating tumor DNA-based disease monitoring in cancer patients. 2021;13(1):86.
111. Park JJ, Diefenbach RJ, Byrne N, Long GV, Scolyer RA, Gray ES, et al. Circulating tumor DNA reflects uveal melanoma responses to protein kinase C inhibition. 2021;13(7):1740.
112. Cabel L, Riva F, Servois V, Livartowski A, Daniel C, Rampanou A, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. 2017;28(8):1996-2001.
113. Bustamante P, Tsering T, Coblenz J, Mastromonaco C, Abdouh M, Fonseca C, et al. Circulating tumor DNA tracking through driver mutations as a liquid biopsy-based biomarker for uveal melanoma. 2021;40(1):196.
114. Bidard FC, Madic J, Mariani P, Piperno-Neumann S, Rampanou A, Servois V, et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. 2014;134(5):1207-13.
115. Fernandes BF, Belfort RN, Di Cesare S, Burnier Jr MNJCjooJcdo. Circulating uveal melanoma cells: should we test for them? 2008. p. 155-8.

116. Madhavan D, Zucknick M, Wallwiener M, Cuk K, Modugno C, Scharpff M, et al. Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. 2012;18(21):5972-82.
117. Ragusa M, Barbagallo C, Statello L, Caltabiano R, Russo A, Puzzo L, et al. miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications. 2015;16(9):1387-96.
118. Achberger S, Aldrich W, Tubbs R, Crabb JW, Singh AD, Triozzi PLJMi. Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease. 2014;58(2):182-6.
119. Pardo M, García Á, Antrobus R, Blanco MJ, Dwek RA, Zitzmann NJJopr. Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum. 2007;6(7):2802-11.
120. Song J, Merbs SL, Sokoll LJ, Chan DW, Zhang ZJCP. A multiplex immunoassay of serum biomarkers for the detection of uveal melanoma. 2019;16(1):10.
121. Boyd S, Tan D, Bunce C, Gittos A, Neale M, Hungerford J, et al. Vascular endothelial growth factor is elevated in ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. 2002;86(4):448-52.
122. Missotten GS, Notting IC, Schlingemann RO, Zijlmans HJ, Lau C, Eilers PH, et al. Vascular endothelial growth factor a in eyes with uveal melanoma. 2006;124(10):1428-34.
123. Im DH, Peng C-C, Xu L, Kim ME, Ostrow D, Yellapantula V, et al. Potential of aqueous humor as a liquid biopsy for uveal melanoma. 2022;23(11):6226.
124. Cochran AJ, Holland GN, Saxton RE, Damato BE, Foulds WR, Herschman HR, et al. Detection and quantification of S-100 protein in ocular tissues and fluids from patients with intraocular melanoma. *Br J Ophthalmol*. 1988;72(11):874-9.
125. Koseoglu ND, Correa ZM, Liu TYA. Artificial intelligence for ocular oncology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2023;34(5):437-40.
126. Zabor EC, Raval V, Luo S, Pelayes DE, Singh AD. A Prediction Model to Discriminate Small Choroidal Melanoma from Choroidal Nevus. *Ocular Oncology and Pathology*. 2021;8(1):71-8.
127. Chandrabhatla AS, Horgan TM, Cotton CC, Ambati NK, Shildkrot YE. Clinical Applications of Machine Learning in the Management of Intraocular Cancers: A Narrative Review. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2023;64(10):29.

128. Wan Q, Ren X, Wei R, Yue S, Wang L, Yin H, et al. Deep learning classification of uveal melanoma based on histopathological images and identification of a novel indicator for prognosis of patients. *Biological Procedures Online*. 2023;25(1):15.
129. Foti PV, Travali M, Farina R, Palmucci S, Spatola C, Raffaele L, et al. Diagnostic methods and therapeutic options of uveal melanoma with emphasis on MR imaging-Part I: MR imaging with pathologic correlation and technical considerations. *Insights into imaging*. 2021;12(1):66.
130. Kaliki S, Shields CL. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. *Eye (Lond)*. 2017;31(2):241-57.
131. Wong AJ, Scheffler AC, Teh BS. Overview of late complications of radiation therapy in uveal melanoma. *Chinese clinical oncology*. 2023;12(3):29.
132. Banou L, Tsani Z, Arvanitogiannis K, Pavlaki M, Dastiridou A, Androudi S. Radiotherapy in Uveal Melanoma: A Review of Ocular Complications. *Current oncology (Toronto, Ont)*. 2023;30(7):6374-96.
133. Bai H, Bosch JJ, Heindl LM. Current management of uveal melanoma: A review. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2023;51(5):484-94.
134. Jarczak J, Karska-Basta I, Romanowska-Dixon B. Deterioration of Visual Acuity after Brachytherapy and Proton Therapy of Uveal Melanoma, and Methods of Counteracting This Complication Based on Recent Publications. *Medicina*. 2023;59(6).
135. Wespiser M, Neidhardt E, Negrier S. Uveal melanoma: In the era of new treatments. *Cancer Treat Rev*. 2023;119:102599.
136. Nathan P, Hassel JC, Rutkowski P, Baurain JF, Butler MO, Schlaak M, et al. Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *N Engl J Med*. 2021;385(13):1196-206.
137. Chen LN, Carvajal RD. Tebentafusp for the treatment of HLA-A*02:01-positive adult patients with unresectable or metastatic uveal melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2022;22(10):1017-27.
138. Carvajal RD, Butler MO, Shoushtari AN, Hassel JC, Ikeguchi A, Hernandez-Aya L, et al. Clinical and molecular response to tebentafusp in previously treated patients with metastatic uveal melanoma: a phase 2 trial. *Nat Med*. 2022;28(11):2364-73.
139. Staeger R, Tastanova A, Ghosh A, Winkelbeiner N, Shukla P, Kolm I, et al. Tebentafusp elicits on-target cutaneous immune responses driven by cytotoxic T cells in uveal melanoma patients. *J Clin Invest*. 2025;135(12).

140. Carvajal RD, Nathan P, Sacco JJ, Orloff M, Hernandez-Aya LF, Yang J, et al. Phase I Study of Safety, Tolerability, and Efficacy of Tebentafusp Using a Step-Up Dosing Regimen and Expansion in Patients With Metastatic Uveal Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2022;40(17):1939-48.
141. Tomsitz D, Ruf T, Heppt M, Staeger R, Ramelyte E, Dummer R, et al. Tebentafusp in Patients with Metastatic Uveal Melanoma: A Real-Life Retrospective Multicenter Study. *Cancers*. 2023;15(13).
142. Rodrigues A, Cosman R, Joshua AM. LXS196 for Metastatic Uveal Melanoma - finally some progress. *Br J Cancer*. 2023;128(10):1791-3.
143. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet*. 2014;384(9948):1109-17.
144. Pelster MS, Gruschkus SK, Bassett R, Gombos DS, Shephard M, Posada L, et al. Nivolumab and Ipilimumab in Metastatic Uveal Melanoma: Results From a Single-Arm Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2021;39(6):599-607.
145. Yamada K, Takeuchi M, Fukumoto T, Suzuki M, Kato A, Mizuki Y, et al. Immune checkpoint inhibitors for metastatic uveal melanoma: a meta-analysis. *Scientific Reports*. 2024;14(1):7887.
146. Beigi YZ, Lanjanian H, Fayazi R, Salimi M, Hoseyni BHM, Noroozizadeh MH, et al. Heterogeneity and molecular landscape of melanoma: implications for targeted therapy. *Molecular Biomedicine*. 2024;5(1):17.
147. Tilgase A, Grīne L, Blāķe I, Borodušķis M, Rasa A, Alberts P. Effect of oncolytic ECHO-7 virus strain Rigvir on uveal melanoma cell lines. *BMC Research Notes*. 2020;13(1):222.
148. Liu S, Zhang J, Fang S, Zhang Q, Zhu G, Tian Y, et al. Macrophage polarization contributes to the efficacy of an oncolytic HSV-1 targeting human uveal melanoma in a murine xenograft model. *Experimental Eye Research*. 2021;202:108285.
149. Smith KER, Peng K-W, Pulido JS, Weisbrod AJ, Strand CA, Allred JB, et al. A phase I oncolytic virus trial with vesicular stomatitis virus expressing human interferon beta and tyrosinase related protein 1 administered intratumorally and intravenously in uveal melanoma: safety, efficacy, and T cell responses. 2023;Volume 14 - 2023.
150. LaRocca CJ, Warner SG. Oncolytic viruses and checkpoint inhibitors: combination therapy in clinical trials. 2018;7(1):e35.

151. Demirci H, Narvekar A, Murray C, Rich C. 842P A phase II trial of AU-011, an investigational, virus-like drug conjugate (VDC) for the treatment of primary indeterminate lesions and small choroidal melanoma (IL/CM) using suprachoroidal administration. *Annals of Oncology*. 2022;33:S934.
152. Ma S, Huis In't Veld RV, Houy A, Stern MH, Rich C, Ossendorp FA, et al. In Vitro Testing of the Virus-Like Drug Conjugate Belzupacap Sarotalocan (AU-011) on Uveal Melanoma Suggests BAP1-Related Immunostimulatory Capacity. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2023;64(7):10.
153. Chandran SS, Somerville RPT, Yang JC, Sherry RM, Klebanoff CA, Goff SL, et al. Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2017;18(6):792-802.
154. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures for Use in Adoptive Transfer Therapy for Melanoma Patients. *Journal of Immunotherapy*. 2003;26(4).
155. Gezgin G, Visser M, Ruano D, Santegoets SJ, de Miranda NFCC, van der Velden PA, et al. Tumor-Infiltrating T Cells Can Be Expanded Successfully from Primary Uveal Melanoma after Separation from Their Tumor Environment. *Ophthalmology Science*. 2022;2(2).
156. Alnefaie A, Albogami S, Asiri Y, Ahmad T, Alotaibi SS, Al-Sanea MM, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cells: An Overview of Concepts, Applications, Limitations, and Proposed Solutions. 2022;Volume 10 - 2022.
157. Forsberg EMV, Lindberg MF, Jespersen H, Alsén S, Bagge RO, Donia M, et al. HER2 CAR-T Cells Eradicate Uveal Melanoma and T-cell Therapy–Resistant Human Melanoma in IL2 Transgenic NOD/SCID IL2 Receptor Knockout Mice. *Cancer Research*. 2019;79(5):899-904.
158. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar Raj K, Mukherjee Sunil K. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003;67(4):657-85.
159. Wang Kevin C, Chang Howard Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell*. 2011;43(6):904-14.
160. Robertson AG, Shih J, Yau C, Gibb EA, Oba J, Mungall KL, et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell*. 2017;32(2):204-20.e15.

161. Aughton K, Kalirai H, Coupland SE. MicroRNAs and Uveal Melanoma: Understanding the Diverse Role of These Small Molecular Regulators. 2020;21(16):5648.
162. Worley LA, Long MD, Onken MD, Harbour JW. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Research*. 2008;18(3).
163. Smit KN, Chang J, Derks K, Vaarwater J, Brands T, Verdijk RM, et al. Aberrant MicroRNA Expression and Its Implications for Uveal Melanoma Metastasis. 2019;11(6):815.
164. Damato B, Duke C, Coupland SE, Hiscott P, Smith PA, Campbell I, et al. Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology*. 2007;114(10):1925-31.
165. Kapoor AG, Kaliki S, Vempuluru VS, Jajapuram SD, Ali MH, Mohamed A. Posterior uveal melanoma in 321 Asian Indian patients: analysis based on the 8th edition of American Joint Committee Cancer classification. *International ophthalmology*. 2020;40(11):3087-96.
166. Onken MD, Worley LA, Char DH, Augsburger JJ, Correa ZM, Nudleman E, et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1596-603.
167. Liao S, Wang JZ, Zagarella E, Paulus P, Dang N, Rawling T, et al. An update on inflammation in uveal melanoma. *Biochimie*. 2023;212:114-22.
168. Radivoyevitch T, Zabor EC, Singh AD. Uveal melanoma: Long-term survival. *PLOS ONE*. 2021;16(5):e0250939.
169. Missotten GS, Korse CM, van Dehn C, Linders TC, Keunen JE, Jager MJ, et al. S-100B protein and melanoma inhibitory activity protein in uveal melanoma screening. A comparison with liver function tests. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2007;28(2):63-9.
170. Gelmi MC, Jager MJ. Uveal melanoma: Current evidence on prognosis, treatment and potential developments. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2024;13(2):100060.
171. Rasmussen MQ, Tindbæk G, Nielsen MM, Merrild C, Steiniche T, Pedersen JS, et al. Epigenetic Silencing of LRP2 Is Associated with Dedifferentiation and Poor Survival in Multiple Solid Tumor Types. 2023;15(6):1830.
172. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, et al. The intrinsic factor–vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nature Medicine*. 1999;5(6):656-61.
173. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O, et al. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(11):1859-67.

174. Niemeier A, Willnow T, Dieplinger H, Jacobsen C, Meyer N, Hilpert J, et al. Identification of megalin/gp330 as a receptor for lipoprotein(a) in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19(3):552-61.
175. Zhai XY, Nielsen R, Birn H, Drumm K, Mildenerberger S, Freudinger R, et al. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney International*. 2000;58(4):1523-33.
176. Gremel G, Djureinovic D, Niinivirta M, Laird A, Ljungqvist O, Johannesson H, et al. A systematic search strategy identifies cubilin as independent prognostic marker for renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2017;17(1):9.
177. Christ A, Christa A, Klippert J, Eule JC, Bachmann S, Wallace Valerie A, et al. LRP2 Acts as SHH Clearance Receptor to Protect the Retinal Margin from Mitogenic Stimuli. *Developmental Cell*. 2015;35(1):36-48.
178. Storm T, Heegaard S, Christensen EI, Nielsen R. Megalin-deficiency causes high myopia, retinal pigment epithelium-macromelanosomes and abnormal development of the ciliary body in mice. *Cell and Tissue Research*. 2014;358(1):99-107.
179. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. 1994;91(21):9725-9.
180. Niinivirta M, Enblad G, Edqvist P-H, Pontén F, Dragomir A, Ullenhag GJ. Tumoral cubilin is a predictive marker for treatment of renal cancer patients with sunitinib and sorafenib. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2017;143(6):961-70.
181. Wu Y, Xu Y. Bioinformatics for The Prognostic Value and Function of Cubilin (CUBN) in Colorectal Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2020;26:e922447.
182. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying Y-S, Glenney JR, Anderson RGW. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992;68(4):673-82.
183. Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS. Identification of Caveolin and Caveolin-Related Proteins in the Brain. 1997;17(24):9520-35.
184. Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, et al. Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell*. 2011;144(3):402-13.
185. Lobos-González L, Aguilar L, Diaz J, Diaz N, Urra H, Torres VA, et al. E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. 2013;26(4):555-70.

186. Lobos-Gonzalez L, Aguilar-Guzmán L, Fernandez JG, Muñoz N, Hossain M, Bieneck S, et al. Caveolin-1 is a risk factor for postsurgery metastasis in preclinical melanoma models. *Melanoma Research*. 2014;24(2).
187. Stenzel M, Tura A, Nassar K, Rohrbach JM, Grisanti S, Lüke M, et al. Analysis of caveolin-1 and phosphoinositol-3 kinase expression in primary uveal melanomas. 2016;44(5):400-9.
188. Naccache SN, Hasson T, Horowitz A. Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. 2006;103(34):12735-40.
189. Reed BC, Cefalu C, Bellaire BH, Cardelli JA, Louis T, Salamon J, et al. GLUT1CBP(TIP2/GIPC1) Interactions with GLUT1 and Myosin VI: Evidence Supporting an Adapter Function for GLUT1CBP. 2005;16(9):4183-201.
190. LI T, ZHONG W, YANG L, ZHAO Z, WANG L, LIU C, et al. GIPC1 promotes tumor growth and migration in gastric cancer via activating PDGFR/PI3K/AKT signaling. 2024;32(2):361--71.
191. Yavelsky V, Rohkin S, Shaco-Levy R, Tzikinovsky A, Amir T, Kohn H, et al. Native human autoantibodies targeting GIPC1 identify differential expression in malignant tumors of the breast and ovary. *BMC Cancer*. 2008;8(1):247.
192. Muders MH, Vohra PK, Dutta SK, Wang E, Ikeda Y, Wang L, et al. Targeting GIPC/Synectin in Pancreatic Cancer Inhibits Tumor Growth. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(12):4095-103.
193. Bao R, Surriga O, Olson DJ, Allred JB, Strand CA, Zha Y, et al. Transcriptional analysis of metastatic uveal melanoma survival nominates NRP1 as a therapeutic target. *Melanoma Research*. 2021;31(1).
194. The role of homeostatic regulation between tumor suppressor DAB2IP and oncogenic Skp2 in prostate cancer growth. 5(15).
195. Min J, Liu L, Li X, Jiang J, Wang J, Zhang B, et al. Absence of DAB2IP promotes cancer stem cell like signatures and indicates poor survival outcome in colorectal cancer. *Scientific Reports*. 2015;5(1):16578.
196. Sun L, Yao Y, Lu T, Shang Z, Zhan S, Shi W, et al. DAB2IP Downregulation Enhances the Proliferation and Metastasis of Human Gastric Cancer Cells by Derepressing the ERK1/2 Pathway. 2018;2018(1):2968252.
197. Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, Hsieh J-T. Epigenetic Regulation of a Novel Tumor Suppressor Gene (hDAB2IP) in Prostate Cancer Cell Lines * 210. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(5):3121-30.

198. Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, Yano M, Ouchida M, Doihara H, et al. Aberrant Promoter Methylation in Human DAB2 Interactive Protein (hDAB2IP) Gene in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(6):2082-9.
199. Onken MD, Worley LA, Tuscan MD, Harbour JW. An Accurate, Clinically Feasible Multi-Gene Expression Assay for Predicting Metastasis in Uveal Melanoma. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2010;12(4):461-8.
200. Jama WMAJ. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. 2013;310(20):2191-4.
201. Kelam J, Kelam N, Filipović N, Komić L, Racetin A, Komić D, et al. Expression of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) candidate genes EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in normal human kidney development and CAKUT. 2024;15(6):702.
202. Komić J, Kelam N, Racetin A, Filipović N, Saraga-Babić M, Ihara D, et al. Spatial and Temporal Expression Patterns of EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in Yotari (*Dab1*^{-/-}) Mice: Implications for Understanding CAKUT Pathogenesis. 2025;26(13):6421.
203. Žužul S, Kelam N, Racetin A, Kovačević P, Konjevoda S, Filipović N, et al. Immunoexpression Patterns of Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 and Dab2IP in the Embryonic and Postnatal Development of the Kidneys in Yotari (*Dab1*^{-/-}) Mice. 2024;12(7):1542.
204. Ramos-Vara JAJVp. Technical aspects of immunohistochemistry. 2005;42(4):405-26.
205. Kelam J, Kelam N, Filipovic N, Komic L, Racetin A, Komic D, et al. Expression of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT) Candidate Genes EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in Normal Human Kidney Development and CAKUT. *Genes (Basel)*. 2024;15(6).
206. Todorović P, Kelam N, Racetin A, Filipović N, Katsuyama Y, Saraga-Babić M, et al. Expression Pattern of *Dab1*, *Reelin*, *PGP9.5* and *Sox2* in the Stomach of Yotari (*Dab1*^{-/-}) Mice. 2025;16(9):1013.
207. Pavic B, Ogorevc M, Boric K, Vukovic D, Saraga-Babic M, Mardesic SJB. Connexin 37, 40, 43 and Pannexin 1 Expression in the Gastric Mucosa of Patients with Systemic Sclerosis. 2023;11(9):2487.
208. Koo TK, Li MYJJocm. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. 2016;15(2):155-63.
209. McDonald JH. Handbook of biological statistics. 2014.
210. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. 2012;41(D1):D991-D5.

211. Duval C, Zaniolo K, Leclerc S, Salesse C, Guérin SLJEER. Characterization of the human $\alpha 9$ integrin subunit gene: Promoter analysis and transcriptional regulation in ocular cells. 2015;135:146-63.
212. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. 2015;43(7):e47-e.
213. Babu VS, Mallipatna A, Sa D, Dudeja G, Kannan R, Shetty R, et al. Integrated analysis of cancer tissue and vitreous humor from retinoblastoma eyes reveals unique tumor-specific metabolic and cellular pathways in advanced and non-advanced tumors. 2022;11(10):1668.
214. Andersen RK, Hammer K, Hager H, Christensen JN, Ludvigsen M, Honoré B, et al. Melanoma tumors frequently acquire LRP2/megalin expression, which modulates melanoma cell proliferation and survival rates. 2015;28(3):267-80.
215. Zhang J, Liu Z, Ma X, Shi Z, Zhao J, Xie Y, et al. Deciphering the interaction between the expression of LRP2 served as a mitochondrial metabolism-related gene and prognosis in colon cancer integrating multi-omics analysis. *Discover Oncology*. 2025;16(1):782.
216. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(4):256-66.
217. Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int*. 2016;89(1):58-67.
218. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell*. 1999;96(4):507-15.
219. Hu XT, Zuckerman KS. Role of cell cycle regulatory molecules in retinoic acid- and vitamin D₃-induced differentiation of acute myeloid leukaemia cells. 2014;47(3):200-10.
220. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996;10(2):142-53.
221. Wang QM, Jones JB, Studzinski GP. Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27 as a Mediator of the G1-S Phase Block Induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in HL60 Cells¹. *Cancer Research*. 1996;56(2):264-7.
222. Markiewicz A, Brożyna AA, Podgórska E, Elas M, Urbańska K, Jetten AM, et al. Vitamin D receptors (VDR), hydroxylases CYP27B1 and CYP24A1 and retinoid-related orphan receptors (ROR) level in human uveal tract and ocular melanoma with different melanization levels. *Scientific Reports*. 2019;9(1):9142.

223. Aseem O, Barth JL, Klatt SC, Smith BT, Argraves WS. Cubilin expression is monoallelic and epigenetically augmented via PPARs. *BMC Genomics*. 2013;14(1):405.
224. Fyfe JC, Madsen M, Hojrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A, et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood*. 2004;103(5):1573-9.
225. Quadros EV. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. 2010;148(2):195-204.
226. Seetharam B, Li N. Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitamins & Hormones*. 59: Academic Press; 2000. p. 337-66.
227. Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food and nutrition bulletin*. 2008;29(2 Suppl):S5-16; discussion S7-9.
228. Tokumoto M, Tsuruya K, Fukuda K, Kanai H, Kuroki S, Hirakata H. Reduced p21, p27 and vitamin D receptor in the nodular hyperplasia in patients with advanced secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2002;62(4):1196-207.
229. DODDI S, HAMOUD A-R, EBY HM, ZHANG X, IMAMI AS, SHEDROFF E, et al. Transcriptomic Analysis of Metastatic Uveal Melanoma and Differences in Male and Female Patients. 2024;21(4):350-60.
230. Bełkot K, Bubka M, Lityńska A. Expression of Caveolin-1 in Human Cutaneous and Uveal Melanoma Cells. *Folia Biologica*. 2016;64(3):145-51.
231. Katoh M. Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013;45(6):e26-e.
232. Siegel F, Schmidt H, Juneja M, Smith J, Herrmann P, Kobelt D, et al. GIPC1 regulates MACC1-driven metastasis. 2023;Volume 13 - 2023.
233. Wu G, Xu X, Wan D, Zhou D, Feng Y, Chen J, et al. DAB2IP decreases cell growth and migration and increases sensitivity to chemotherapeutic drugs in colorectal cancer. 2021. 2021;9(16):1317.
234. Smits M, van Rijn S, Hulleman E, Biesmans D, van Vuurden DG, Kool M, et al. EZH2-Regulated DAB2IP Is a Medulloblastoma Tumor Suppressor and a Positive Marker for Survival. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(15):4048-58.
235. Bellazzo A, Di Minin G, Valentino E, Sicari D, Torre D, Marchionni L, et al. Cell-autonomous and cell non-autonomous downregulation of tumor suppressor DAB2IP by microRNA-149-3p promotes aggressiveness of cancer cells. *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(7):1224-38.

236. Zhang M, Peng Y, Yang Z, Zhang H, Xu C, Liu L, et al. DAB2IP down-regulates HSP90AA1 to inhibit the malignant biological behaviors of colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2022;22(1):561.
237. Harrell Stewart DR, Clark GJ. Pumping the brakes on RAS – negative regulators and death effectors of RAS. *Journal of Cell Science*. 2020;133(3).
238. Min J, Zaslavsky A, Fedele G, McLaughlin SK, Reczek EE, De Raedt T, et al. An oncogene–tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor- κ B. *Nature Medicine*. 2010;16(3):286-94.
239. Xie D, Gore C, Liu J, Pong R-C, Mason R, Hao G, et al. Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis. 2010;107(6):2485-90.
240. Bellazzo A, Di Minin G, Collavin L. Block one, unleash a hundred. *Mechanisms of DAB2IP inactivation in cancer*. *Cell Death & Differentiation*. 2017;24(1):15-25.
241. Xie D, Gore C, Zhou J, Pong R-C, Zhang H, Yu L, et al. DAB2IP coordinates both PI3K-Akt and ASK1 pathways for cell survival and apoptosis. 2009;106(47):19878-83.
242. Wang C-Y, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF- κ B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation. 1998;281(5383):1680-3.
243. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(1):61-70.
244. Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(10):749-59.
245. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gélinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(4):382-7.
246. Negative regulation of DAB2IP by Akt and SCFFbw7 pathways.5(10).
247. Jager MJ, Magner JA, Ksander BR, Dubovy SR. Uveal Melanoma Cell Lines: Where do they come from? (An American Ophthalmological Society Thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2016;114:T5.
248. Strub T, Martel A, Nahon-Esteve S, Baillif S, Ballotti R, Bertolotto C. Translation of single-cell transcriptomic analysis of uveal melanomas to clinical oncology. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2021;85:100968.

12. Životopis

Ime i prezime: Petra Kovačević

Mjesto i datum rođenja: Zagreb, 1. listopada 1997.

Obrazovanje:

2023. – 2025. Druga i treća godina poslijediplomskog doktorskog studija iz područja biomedicine i zdravstva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2022./2023. Prva godina poslijediplomskog doktorskog studija iz područja biomedicine i zdravstva, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2016. – 2022. Sveučilište u Mostaru, Medicinski fakultet, Mostar

2012. – 2016. Osnovna škola Petra Preradovića, Zadar

Radno iskustvo:

Dom zdravlja Zadarske županije, Zadar, Hrvatska

13. srpnja 2023. – 25. veljače 2024. Dom zdravlja Zadarske, doktor medicine

26. veljače 2024. – danas; Klinika za očne bolesti – KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska – specijalizant oftalmologije

Članstva u strukovnim organizacijama:

Hrvatska liječnička komora (HLK)

Hrvatsko oftalmološko i optometrijsko društvo (HOOD)

Hrvatsko društvo zrakoplovne medicine HLZ

Hrvatska udruga sveučilišnih žena (HUSŽ)

Europsko društvo za kirurgiju katarakte i refraktivnu kirurgiju (ESCRS)

Europsko društvo za retinu (EURETINA)

Znanstveni radovi – reference:

1. Pap M, Sapina I, Laktašić Žerjavić N, Žagar I, Kovač Durmiš K, Kalebota N, **Kovačević P**, Caktaš IL, Dekleva V, Birkić D, Kolar Mitrović H, Perić P. Anti-TNF Therapy and the Risk of Malignancies and Infections in Inflammatory Rheumatic Diseases – Our

Experience. *Psychiatr Danub*. 2021 Spring-Summer; 33(Suppl 4):625-631. Znanstveni rad. (WOS): IF: 2.696

2. Racetin A, Filipović N, Lozić M, Ogata M, Gudelj Ensor L, Kelam N, **Kovačević P**, Watanabe K, Katsuyama Y, Saraga-Babić M, GlavinaDurdov M, Vukojević K. A Homozygous *Dab1*^{-/-} Is a Potential Novel Cause of Autosomal Recessive Congenital Anomalies of the Mice Kidney and Urinary Tract. *Biomolecules*. 2021 Apr 20;11(4):609. doi: 10.3390/biom11040609. Znanstveni rad IF: 6.064; JCR - Q2
3. COVID Surg Collaborative; Global Surg Collaborative. Timing of surgery following SARS-CoV-2 infection: an international prospective cohort study. *Anaesthesia*. 2021 Jun;76(6):748-758. doi: 10.1111/anae.15458. Epub 2021 Mar 9. Izvorni znanstveni rad. JCR/WoS: Q1, IF. 12.893
4. COVID Surg Collaborative; Global Surg Collaborative. SARS-CoV-2 infection and venous thromboembolism after surgery: an international prospective cohort study. *Anaesthesia*. 2021 Aug 24. doi: 10.1111/anae.15563. Izvorni znanstveni rad. WOS CC: JCR Q1, IF. 12.893
5. COVID Surg Collaborative; Global Surg Collaborative. Effects of pre-operative isolation on post operative pulmonary complications after elective surgery: an international prospective cohort study. *Anaesthesia*. 2021 Nov;76(11):1454-1464. doi: 10.1111/anae.15560. Epub 2021 Aug 9. Izvorni znanstveni rad. WOS CC: JCR Q1, IF. 12.893
6. COVID Surg Collaborative, Global Surg Collaborative. SARS-CoV-2 vaccination modelling for safe surgery to save lives: data from an international prospective cohort study. *Br J Surg*. 2021 Sep 27;108(9):1056-1063. doi: 10.1093/bjs/znab101. Izvorni znanstveni rad. WOS CC: JCR Q1, IF. 11.122

Broj citata: 19

7. Gusar I, Čanović S, Ljubičić M, Šare S, Perić S, Caktaš IL, **Kovačević P**, Paštar Z, Konjevoda S. Religiousness, Anxiety and Depression in Patients with Glaucoma, Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Retinopathy. *Psychiatr Danub*. 2021 Spring-Summer; 33(Suppl 4):965-973. PMID: 35026829. Izvorni znanstveni rad. WOS CC: IF. 2.696
8. Pupic-Bakrac J, Bozic T, Mikulic-Kajic M, Pupic-Bakrac A, DidovicPavicic A, **Kovaevic P**. Prevalence and profile of congenital heart defects in children with Down

- syndrome – experience of southwestern Bosnia and Herzegovina in 16 years. *Gynaecol Perinatol.* 2016;25(3):97-101. Znanstveni rad: Scopus
9. Pupic-Bakrac J, Bozic T, Pupic-Bakrac A, Rizikalo A, **Kovacevic P**. Coexistence of synchronous bilateral Wilms tumor and trisomy 21 – first report and review of literature. *Medicina fluminensis.* 2018;54(1):85-90. Znanstveni rad: Scopus
 10. Kaštelan S, Gverović Antunica A, Puzović V, Didović Pavičić A, Čanović S, **Kovačević P**, Vučemilović PAF, Konjevoda S. Non-Invasive Retinal Biomarkers for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Biomedicines.* 2025 Jan 24;13(2):283. doi: 10.3390/biomedicines13020283. PMID: 40002697; PMCID: PMC11852429. Znanstveni rad: Biomedicines
 11. Kaštelan S, Pavičić AD, Pašalić D, Nikuševa-Martić T, Čanović S, **Kovačević P**, Konjevoda S. Biological characteristics and clinical management of uveal and conjunctival melanoma. *Oncol Res.* 2024 Jul 17;32(8):1265-1285. doi: 10.32604/or.2024.048437. PMID: 39055896; PMCID: PMC11267116. Znanstveni rad: Oncology research
 12. Stanić R, Vukojević K, Filipović N, Benzon B, Ogorevc M, Kunac N, Čanović S, **Kovačević P**, Paradžik Šimunović M, Konjevoda S. The Effect of Prostaglandin F2 Analog Treatment on the Immuno expression of Fibrosis-Associated Factors in Patients with Glaucoma Undergoing Deep Sclerotomy. *Int J Mol Sci.* 2024 Nov 24;25(23):12618. doi: 10.3390/ijms252312618. PMID: 39684329; PMCID: PMC11640873. Znanstveni rad: Int. J. Mol. Sci.
 13. **Kovačević P**, Gusar I, Ljubičić M, Samardžić N, Caktaš D, Lovrić M, Lauš K, Pantalon P, Pantalon J, Gusar AM, Vukojević K. KNOWLEDGE, ATTITUDES AND BEHAVIOR OF MEDICAL STUDENTS REGARDING APPROPRIATE COVID-19 PROTECTION: A CROSS-SECTIONAL STUDY OF CROATIAN AND BOSNIAN MEDICAL STUDENTS. *Acta Clin Croat.* 2024 Dec;63(3-4):710-723. doi: 10.20471/acc.2024.63.03-04.32. PMID: 41050259; PMCID: PMC12490497. Znanstveni rad: Acta clinica Croatica
 14. Žužul S, Kelam N, Racetin A, **Kovačević P**, Konjevoda S, Filipović N, Pavlović N, Vukojević K. Immuno expression Patterns of Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 and Dab2IP in the Embryonic and Postnatal Development of the Kidneys in *Yotari (Dab1^{-/-})* Mice. *Biomedicines.* 2024 Jul 11;12(7):1542. Znanstveni rad: Biomedicines, IF 3.9
 15. **Kovačević P**, Todorović P, Kelam N, Konjevoda S, Kunac N, Marin Lovrić J, Vukojević K. Linking Megalin, Cubilin, Caveolin-1, GIPC1 and Dab2IP Expression to

Ocular Tumorigenesis: Profiles in Retinoblastoma, Choroidal Melanoma, and the Normal Human Eye. Cancers. 2025. Znanstveni rad

Ostalo:

Dobitnica je Rektorove nagrade za znanost (8. prosinca 2021.)

Dobitnica je Dekanove nagrade u akademskoj godini 2021./ 2022.

Studentska sekcija za hitnu medicinu, čija je osnivačica, dobitnik je Dekanove nagrade za 2021. godinu.

Sudjelovala je na EU projektu Interreg – IPA CBC „MELAdetect“ 2021. godine. Priključuje se EU projektu Personalized Medicine Inquiry-Based Education – PROMISE u okviru programa Erasmus+. U okviru navedenog projekta završila je dodatne module:

1. Prediktivna medicina
2. Preventivna medicina
3. Personalizirana medicina
4. Participatorna medicina

U okviru projekta sudjelovala je na konferenciji održanoj u Zagrebu 2021.

1. “1st learning expedition”, Pariz, 11. – 15. srpnja 2022.
2. “2nd learning expedition”, Split, 22. – 26. kolovoza 2022.

Aktivna je sudionica međunarodnih znanstvenih skupova:

1. 6th Congress of Emergency Medicine, Rijeka, March 25th – 27th, 2022
2. 17th Croatian Student Summit, CROSS17, Zagreb, April 27th – 30th, 2022
3. Tečaj naprednog održavanja života (ALS), Novi Sad, studeni 2022.
4. 9. međunarodni simpozij o glaukomu Glaucoma Codes u suradnji s Europskim glaukopskim društvom (EGS), Zagreb, 16. ožujka 2024.
5. 23. kongres Hrvatskog oftalmološkog i optometrijskog društva, Opatija, 9. – 12. svibnja 2024. – rad: "Ocular surface characteristics in pediatric vernal keratoconjunctivitis" ; Bembić M., Kovačević P., Galiot Delić M., Ivkić P. K., Perić S.
6. #04. Dalmatia Retina meeting, Šibenik, 7. – 9. lipnja 2024.
7. Macular Edema International Symposium, Split, 8. – 9. studenoga 2024.

8. 21. simpozij Suvremeno u oftalmologiji, Zagreb, 13. prosinca 2024.
9. 10th International Symposium Glaucoma Codes, Zagreb, March 7th – 8th, 2025
10. 2. simpozij Sekcije za orbitu, plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju oka Hrvatskog oftalmološkog društva, Zagreb, 28. veljače 2025.
11. 10. Miopija – poboljšajmo ishode liječenja, Zagreb, 29. ožujka 2025.
12. Ultrasound Course, Zagreb, April 11th – 12th, 2025
13. 24. kongres Hrvatskog oftalmološkog i optometrijskog društva, Vodice, 15. – 18. svibnja 2025. – rad: “Cubilin and Caveolin-1 as Biomarkers in Retinoblastoma and Uveal Melanoma: Potential Implications for Tumor Progression, Diagnosis, and Therapeutic Targeting”, Kovačević P., Vukojević N., Perić S., Kelam N., Ivić L., Filipović N., Kunac N., Vukojević K. Nagrada za HOOD za najbolji rad.
14. Kongres Hrvatskog društva za zrakoplovnu medicinu, Zadar, 22. – 24. svibnja 2025.
15. 10th Symposium of the CroCRS, Dubrovnik, October, 3rd – 5th, 2025
16. ESCRS – Virtual Reality (tečaj), Ljubljana, 1. – 2. prosinca 2025.