

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

KAROLINA MALIĆ TUDOR

**CD80 I CD163 POZITIVNI MAKROFAGI TE IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ
GLIPIKANA-3 U WILMSOVU TUMORU NAKON PROVEDENE
NEOADJUVANTNE KEMOTERAPIJE**

Doktorski rad

Split, 2026

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

KAROLINA MALIĆ TUDOR

**CD80 I CD163 POZITIVNI MAKROFAGI TE IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ
GLIPIKANA-3 U WILMSOVU TUMORU NAKON PROVEDENE
NEOADJUVANTNE KEMOTERAPIJE**

Doktorski rad

Split, 2026

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, Klinici za dječje bolesti KBC-a Split i Klinici za dječje bolesti Zagreb.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Split: Ur.br. 2181-147/01-06/LJ.Z.-25-02
Klasa:520-03/25-01/170.

Objavljeni znanstveni rad na kojem se temelji doktorska disertacija:

Malić Tudor K, Zekić Tomaš S, Dunatov Huljev A, Armanda Bogdan V, Matana A, Ogorevc M, Seiwerth S, Krušlin B, Stepan Giljević J, Kuzmić Prusac I. Tumor-associated macrophage polarization in Wilms' tumor after neoadjuvant chemotherapy. *Cancers (Basel)*. 2026;18(5):810. doi:10.3390/cancers18050810.

Mentor: doc.dr.sc. Sandra Zekić Tomaš

ZAHVALA

Hvala od srca mojoj mentorici, doc. dr. sc. Sandri Zekić Tomaš, na stručnom vodstvu i nesebičnoj podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada. Hvala Vam što ste svojim znanjem, iskustvom i predanošću usmjeravali moj rad.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Ivani Kuzmić Prusac, koja me uvela u svijet znanstvenog rada i usmjerila na prve korake toga puta. Hvala Vam na ideji, vremenu, znanju i spremnosti da svojim iskustvom pridonesete ovom radu.

Hvala dr. sc. Marinu Ogorevcu na nesebičnoj i dragocjenoj pomoći i vrijednom stručnom doprinosu.

Hvala dr. sc. Ani Dunatov Huljev na suradnji i uloženom vremenu pri izradi ovog rada.

Hvala svim koautorima moga rada.

Hvala mojim prijateljima, kolegama i cijeloj obitelji na razumijevanju, ohrabrenju i podršci tijekom svih ovih godina.

S posebnom ljubavlju zahvaljujem mojim roditeljima, Karmeli i Rafi, na bezuvjetnoj ljubavi i vjeri u mene. Dragi tata, u svemu što sam danas, zauvijek je i tvoj trag – u vrijednostima kojima si me učio, ljubavi koju si mi pružao i snazi koju si mi dao. Znam da si negdje gore ponosan.

Hvala mojoj sjevci Lovorki i sjevku Jurku koji više nisu s nama, a koji su svojom ljubavlju, dobrotom i prisutnošću ostavili neizbrisiv trag u mom životu i u našoj obitelji.

I na kraju, hvala mojoj djeci Leonu i Paoli i supruhu Leu, mom ponosu, osloncu i mojoj snazi. Vi ste moje najveće bogatstvo i razlog zbog kojeg svaki moj korak ima smisao.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Wilmsov tumor.....	3
1.2. Epidemiologija Wilmsova tumora.....	5
1.3. Genetika Wilmsova tumora	6
1.4. Klinička slika Wilmsova tumora	14
1.5. Dijagnostika Wilmsova tumora	14
1.6. Histopatologija Wilmsova tumora.....	15
1.7. Klasifikacija Wilmsova tumora i prognostički čimbenici	19
1.8. Liječenje Wilmsova tumora	21
1.9. M1 i M2 makrofagi	25
1.10. Glipikan-3	30
2. CILJEVI I HIPOTEZE	33
3. ISPITANICI I METODE	36
3.1. Ispitanici.....	38
3.2. Postupci i materijali	38
3.3. Imunohistokemijska analiza	39
3.4. Statističke analize.....	43
3.5. Hodogram istraživanja	44
4. REZULTATI	44
4.1. Karakteristike bolesnika i obilježja tumora	46
4.2. Preživljenje i prognostički čimbenici	47
4.3. Infiltracija makrofaga povezanih s tumorom.....	47
4.4. Omjer M1/M2 i povezanost s kliničko-patološkim obilježjima	52
4.5. Ukupna raspodjela TAM-ova nakon neoadjuvantne kemoterapije.....	53
4.6. Izražaj glipikana-3 (GPC3) i povezanost s kliničko-patološkim obilježjima.....	53
5. RASPRAVA.....	55
5.1. Ograničenja istraživanja	76
6. ZAKLJUČCI.....	77
7. SAŽETAK	80
8. LAIČKI SAŽETAK.....	83
9. SUMMARY	85
10. LAY SUMMARY.....	87
11. POPIS LITERATURE	87
12. ŽIVOTOPIS	104

POPIS POKRATA

WT – Wilmsov tumor

MM – metanefrički mezenhim

GDNF – engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*

Wnt9b – engl. *Wnt family member 9B*

WT1 – gen Wilmsova tumora 1 (engl. *Wilms tumor 1*)

ILNR – intralobarni nefrogeni ostatci

PLNR – perilobarni nefrogeni ostatci

WAGR – Wilmsov tumor, aniridija, genitourinarne anomalije i intelektualne teškoće

AD – autosomno dominantno

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

AMER1 – engl. *APC membrane recruitment protein 1*

IGF-2 – inzulinu sličan čimbenik rasta 2 (engl. *insulin-like growth factor 2*)

ICR1 – engl. *Imprinting Control Region 1*

ICR2 – engl. *Imprinting Control Region 2*

PI3K/Akt/mTOR – engl. *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin*

MAPK – engl. *mitogen-activated protein kinase*

RNA – ribonukleinska kiselina

CTCF – engl. *CCCTC-binding factor*

CDKN1C – engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*

DMR-LIT1 – engl. *Differentially Methylated Region LIT1*

LOI – gubitak imprintinga (engl. *loss of imprinting*)

LOH – gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity*)

UPD – uniparentalna disomija (engl. *uniparental disomy*)

BWS – Beckwith–Wiedemannov sindrom

SIOP – engl. *The European Society for Paediatric Oncology*

NWTSG – engl. *National Wilms Tumor Study Group*

N-MYC – engl. *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*

SCF – engl. *SKP1–Cullin–F-box*

FBXW7 – engl. *F-box and WD repeat domain-containing 7*

TP53 – tumor protein p53

DROSHA – engl. *Drosha ribonuclease III*
DIS3L2 – engl. *DIS3-like exosome 3'–5' exoribonuclease*
miRNA – mikroRNA (engl. *microRNA*)
DGCR8 – engl. *DiGeorge syndrome critical region 8*
XPO5 – engl. *Exportin 5*
TARBP2 – engl. *TAR RNA-binding protein 2*
NCAM1+/ALDH1+ – engl. *Neural Cell Adhesion Molecule 1/Aldehyde Dehydrogenase 1*
DDS – Denys–Drashov sindrom
AFP – α -fetoprotein
NSE – neuron-specifična enolaza
VMA – vanilmandelična kiselina
HVA – homovanilinska kiselina
COG – engl. *Children's Oncology Group*
UKCCSG – engl. *United Kingdom Children's Cancer Study Group*
VCR – vinkristin
ACT-D – aktinomicin D
NSS – kirurgija s poštedom nefrona (engl. *nephron-sparing surgery*)
DOXO – doksorubicin
HR-1 – visokorizična skupina 1 (engl. *high risk*)
TME – tumorsko mikrookruženje (engl. *Tumor Microenvironment*)
TAM – makrofagi povezani s tumorom (engl. *Tumor-Associated Macrophages*)
M-CSF – engl. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*
CSF1 – engl. *Colony-Stimulating Factor 1*
APC – stanice koje prezentiraju antigen (engl. *Antigen-Presenting Cells*)
MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*)
VCAM-1 – engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
TRM – tkivno rezidentni makrofagi (engl. *Tissue-Resident Macrophages*)
MDSC – mijeloidne supresorske stanice (engl. *Myeloid-Derived Suppressor Cells*)
Arg-1 – arginaza-1
NO – dušikov oksid
ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)
GM-CSF – engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*
Th1 – T pomoćnički limfociti tipa 1 (engl. *T helper 1*)
IFN- γ – interferon gama (engl. *Interferon gamma*)

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor- α*)
iNOS – inducibilna sintaza dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*)
NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
STAT6 – engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*
Treg – regulatorni T-limfociti (engl. *regulatory T cells*)
TGF- β – transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor- β*)
VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)
MMPs – matriksne metaloproteinaze (engl. *Matrix Metalloproteinases*)
HIF-1 α – hipoksijom inducibilni čimbenik 1 alfa (engl. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*)
HIF-2 α – hipoksijom inducibilni čimbenik 2 alfa (engl. *Hypoxia-Inducible Factor-2 α*)
NF- κ B – nuklearni faktor kappa B (engl. *Nuclear Factor kappa B*)
PD-ECGF – engl. *Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor*
PD-L1 – ligand programirane stanične smrti 1 (engl. *Programmed Death-Ligand 1*)
CXCL12 – stromalni čimbenik podrijetla 1 (engl. *Stromal Cell-Derived Factor 1*)
MAM – makrofagi povezani s metastazama (engl. *Metastasis-Associated Macrophages*)
EGF – epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*)
GPC – glipikani
GPI – glikozil-fosfatidil-inozitol
FGF – čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*)
SGB – Simpson–Golabi–Behmelov sindrom
HCC – hepatocelularni karcinom
HH – signalni put Hedgehog
GPC3 – glipikan-3
LDH – laktat-dehidrogenaza
OS – ukupno preživljenje (engl. *Overall Survival*)
EFS – preživljenje bez događaja (engl. *Event-Free Survival*)

1. UVOD

Tumori u djece predstavljaju rijetke bolesti koje imaju važan društveni i zdravstveni značaj. Vodeći su uzrok mortaliteta od prirodnih bolesti i drugi su najčešći uzrok smrti, nakon nesreća, u mlađih od 18 godina. Maligne bolesti i njihovo multimodalno liječenje utječu na somatski, hormonalni i neurološki razvoj djeteta (1).

Za razliku od karcinoma koji predstavljaju najčešći oblik malignih tumora u odrasloj dobi i čiji se nastanak povezuje, uz genetsku predispoziciju, s dugotrajnom izloženošću okolišnim čimbenicima, životnim navikama i stilu života, solidni tumori u djece predstavljaju poremećaj morfogeneze u tkivu embrija ili fetusa uzrokovan mutacijama gena ključnih za normalan biološki razvoj i diferencijaciju stanica. Izostanak potpune diferencijacije ili poremećaj migracije stanica stvaraju premaligne lezije i predispoziciju za nastanak solidnih tumora, koji se stoga nazivaju embrionalnim (1).

U maligne tumore bubrega ubrajamo: Wilmsov tumor (WT) ili nefroblastom, sarkom svijetlih stanica, kongenitalni mezoblastični nefrom, maligni rabdoidni tumor bubrega, karcinom bubrega, primitivni neuroektodermalni tumor i sinovijalni sarkom bubrega. Benigne tumore bubrega čine: nefroblastomatoza, cistični nefrom i angiomiolipom (2).

TUMORI BUBREGA U DJECE- WHO klasifikacija (5th edition)

1. nefroblastni i srodni tumori

Wilmsov tumor (nefroblastom)

Pedijatrijski cistični nefrom

2. molekularno definirani tumori bubrega

Karcinom povezan s MiT translokacijama

Karcinom bubrega s ALK-preraspodjelom

Eozinofilni solidni i cistični karcinom

SMARCB1-deficitarni medularni karcinom

3. metanefrički tumori

Metanefrički adenom

Metanefrički adenofibrom

Metanefrički stromalni tumor

4. mezenhimalni tumori bubrega

Osificirajući renalni tumor dojenčadi

Mezoblastični nefrom

Sarkom svijetlih stanica (engl. *clear cell sarcoma*)

Maligni rabdoidni tumor

Anaplastični sarkom

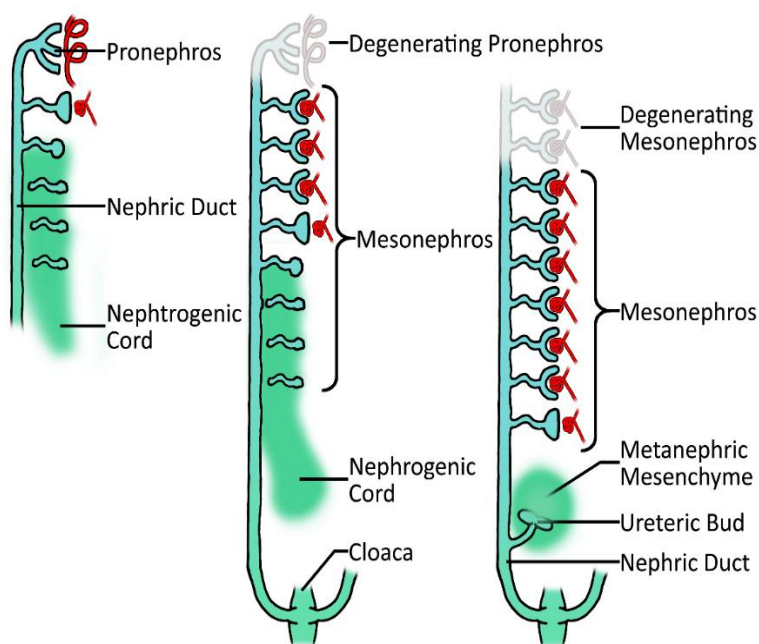
Renalni Ewing sarkom

1.1. Wilmsov tumor

Prvi opis Wilmsova tumora objavio je Thomas F. Rance 1814. godine. Tumor je nazvan po njemačkom kirurgu i patologu Maxu Wilmsu koji je 1899. godine u svojoj monografiji *Die Mischgeschwülste der Niere* opisao histološku građu WT-a kao mješavinu triju vrsta tkiva (3,4).

WT je mezodermalnog porijekla i nastaje u embrionalnom bubregu tijekom organogeneze. Razvoj bubrega se odvija kroz tri stadija:

- u 4. tjednu gestacije nastaje pronefros (predbubreg)- najraniji, primitivni, afunkcionalni oblik
- od 4.-8. tjedna gestacije stvara se mezonefros (prabubreg)- djelomično funkcionalan i važan u razvoju spolnog sustava
- od 5. tjedna gestacije formira se metanefros (definitivni bubreg), koji postaje funkcionalan od 10. tjedna trudnoće (5).



Slika 1. Prikaz razvoja bubrega. Preuzeto u izvornom obliku iz: Sawle, A. (2009). Development of embryonic nephrons. Wikimedia Commons. Licenca: Creative Commons Attribution–ShareAlike 3.0 Unported — CC BY-SA 3.0

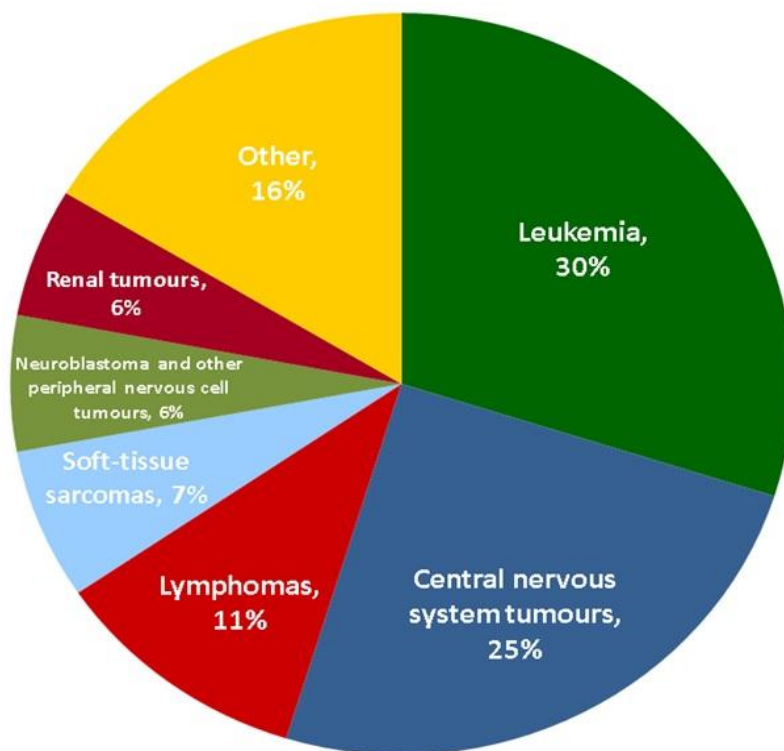
Bubreg nastaje iz mokraćovodnog pupoljka i metanefričkog mezenhima. Mokraćovodni pupoljak se stvara urastanjem epitelnih stanica Wolfovih kanala u intermedijarni mezoderm u 5. tjednu gestacije, a iz njega daljnjom diferencijacijom nastaju sabirni kanalići, ureter i bubrežna čašica (5). Mezenhimalne stanice oblikuju metanefrički mezenhim (MM)-blastem iz kojeg se diferenciraju epitelne stanice nefrona koje tvore Bowmanovu čahuru, proksimalne i distalne kanaliće te Henleovu petlju i Fox1d-pozitivne stanice iz kojih nastaje stroma bubrega (6). Mokraćovodni pupoljak i MM ostvaruju recipročnu mezenhimsko-epitelnu interakciju koja je temelj razvoja metanefrosa ili definitivnog bubrega. Signalizacija između tih dvaju embrionalnih tkiva regulira pravilnu morfogenezu i funkcionalnu organizaciju definitivnog bubrega putem precizno koordinirane mreže transkripcijskih čimbenika i signalnih puteva. Primjerice, metanefrički mezenhim luči GDNF (engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*), ključni čimbenik za razvoj metanefrosa koji se veže na c-RET receptor tirozin-kinaze na mokraćovodnom pupoljku, potiče njegov rast i ponavljano grananje. Signal iz mokraćovodnog pupoljka putem Wnt9b (engl. *Wnt Family Member 9b*) gena inducira izražaj i aktivaciju Wnt4 signalnog puta u metanefričkom mezenhimu, čime se pokreće mezenhimsko-epitelna tranzicija i formiranje nefronskog epitela. Notch signalni put je uključen u segmentaciju i proksimalno-distalnu organizaciju razvijajućeg nefrona, a WT1 (engl. *Wilm's tumor 1*) supresorski gen regulira diferencijaciju i preživljenje metanefričkog mezenhima i formiranje funkcionalnih jedinica bubrega-nefrona. Dakle, tranzicijom mezenhimalnih stanica u epitelne nastaje nefron, a MM (blastem) nestaje diferencijacijom u 36. tjednu gestacije (7).

Poremećaj razvoja bubrega uzrokuje perzistenciju rezidualnih blastemskih stanica (tzv. nefrogenih ostataka), koje mogu diferencirati u zrele stanice, sklerozirati, spontano iščeznuti, transformirati se u displastične cistične oblike, perzistirati u obliku žarišta blastemskih stanica, proliferirati stvarajući difuznu hiperplastičnu nefroblastomatozu ili maligno alterirati u WT stjecanjem stabilnih somatskih mutacija (genetičkih ili epigenetičkih), predstavljajući premalignu leziju (7). WT je jedini embrionalni solidni tumor dječje dobi koji nastaje iz prekursorskih lezija- nefrogenih ostataka koje dijelimo na intralobarne (ILNR), perilobarne (PLNR), miješane nefrogene ostatke i panlobarnu nefroblastomatozu. PLNR nastaju tijekom poremećaja kasne nefrogeneze, smješteni su na periferiji renalnog lobusa, oštro su ograničeni, većinom multifokalni i građeni od blastemskih i embrionalnih epitelnih stanica. Češće su zastupljeni u djece s hemihipertrofijom, Beckwith-Wiedemann-ovim i Perlman-ovim sindromom, trisomijom 13 i 18 te u sinkronom bilateralnom WT-u (7-10). ILNR su lokalizirani

unutar renalnog lobusa, renalnog sinusa i u pelvikalicealnom sustavu, nepravilnih su granica i unifokalni. Nastaju zbog poremećaja tijekom rane nefrogeneze koju oponašaju, trifazične su građe, s prevladavajućim nezrelim i zrelim stromalnim stanicama. Javljaju se u djece s WAGR (WT, aniridija, genitourinarne anomalije, mentalna retardacija) i Denys-Drash sindromom (pseudohermafroditizam, gonadalna disgeneza, kongenitalna glomerulopatija i zatajenje bubrega s difuznom mezangijskom sklerozom) (8-10). ILNR predstavljaju veći rizik za razvoj WT-a što je potvrđeno većom incidencijom WT-a kod WAGR i Denys-Drash sindroma nego kod djece s Beckwith-Wiedemann-ovim sindromom. Obilježja WT-a povezanog s ILNR su pojavnost u mlađoj životnoj dobi te povećan rizik metakrone pojave WT-a u kontralateralnom bubregu (9).

1.2. Epidemiologija Wilmsova tumora

Solidni tumori dječje dobi čine približno 30%, a maligni tumori bubrega 5-6% svih malignih bolesti dječje i adolescentne dobi (11).



Slika 2. Razdioba malignih bolesti u djece. Preuzeto u izvornom obliku iz: National Cancer Registration and Analysis Service (NCRAS), GOV.UK. Licenca: Open Government Licence v3.0 (OGL v3.0), Crown copyright.

WT ili nefroblastom je najčešći primarni maligni tumor bubrega u djece s incidencijom od 5 do 6 oboljelih na 1 000 000 djece godišnje, čineći 90% svih tumora bubrega u djece i adolescenata mlađih od 18 godina (10,12). Slijede ga prema učestalosti: sarkom svijetlih stanica (3.4%), kongenitalni mezoblastični nefrom (1.7%), maligni rabdoidni tumor (1.6%) i karcinom bubrega (1.9-5%)(13).

Kako se razvoj bubrega nastavlja tijekom prvih godina života, najveća učestalost WT-a je u 2. i 3. godini života, s medijanom dobi od 3.5 godine. Približno 76% WT-a se dijagnosticira u mlađih od 5 godina, dok je iznimno rijedak (<1%) i prognostički nepovoljan u adolescentnoj i odrasloj dobi. Javlja se sporadično, a u 1-2% slučajeva je nasljedan, pri čemu se nasljeđuje autosomno dominantno (AD), uz slabu penetrantnost gena. Većinom je unilateralan, multinodularan u 7% slučajeva, a u 5-8% oboljelih zahvaća oba bubrega. Javlja se u oba spola, nešto češće u djevojčica (omjer djevojčice:dječaci=1.1:1) (13-15). Unilateralni WT se javlja u kasnijoj dobi nego bilateralni. (16).

Prema podacima Hrvatskog registra za rak o učestalosti malignih bolesti u osoba mlađih od 18 godina u Hrvatskoj, incidencija WT-a iznosi stabilnih 5-6% godišnje, s pojavnošću od 67% oboljelih u dobi mlađoj od 5. godine života, što je u skladu s podacima međunarodnog društva za dječju onkologiju (17,18).

1.3. Genetika Wilmsova tumora

Istraživanja su potvrdila da je genetička, klinička i histološka heterogenost nefroblastoma kompleksna, jer je posljedica vrste genske mutacije, epigenetičkih promjena i razvojnog stadija bubrega u kojem je došlo do oštećenja DNA (deoksiribonukleinska kiselina), odnosno gena uključenih u regulaciju embrionalnog razvoja, proliferacije i diferencijacije stanica bubrega (19).

WT je genetički heterogen tumor, uzrokovan prirođenom (zametnom) ili stečenom (somatskom) mutacijom gena odgovornih za normalan razvoj bubrega, takozvanih tumor-supresorskih gena koji na staničnoj razini djeluju recesivno, pri čemu gubitak funkcije i posljedični razvoj tumora nastaju tek nakon inaktivacije oba alela. U navedene gene ubrajamo: *WT1* (11p13), *WT1* (17q12-q21), *WT2* (11p15.5), *WT2* (19q13.4), *WT3* (16q), *WT4* (17q12-q21), *WT5* (7p15-p11.2) i *WTX* (Xq11.1) (19,20).

Prvi utvrđeni gen povezan s WT-om je gen *WT1* (11p13 lokus), otkriven proučavanjem bolesnika s WAGR i Denys–Drash sindromom, u kojih je prisutna zametna mutacija gena *WT1* (21,22). Mutacija gena *WT1* može biti nasljedna ili sporadična, prema tzv. Knudsonovoj

hipotezi dvostrukog udarca (engl. *two hits*)(16). Nasljedni oblik WT-a se u određenim obiteljima prenosi autosomno dominantno s varijabilnom penetrantnošću. Nastaje zbog konstitucijske delecije ili inaktivacije jednog od dvaju alela gena *WT1* na 11p13 kromosomu u zametnoj stanici i potom postnatalno stečene somatske mutacije i posljedične inaktivacije drugog alela. *WT1* varijante predstavljaju jednu od najčešćih germinalnih genetskih promjena u WT-u s učestalošću od približno 10–15%. Suprotno, sporadični oblici WT-a nastaju postnatalnom inaktivacijom (mutacijom ili epigenetičkim utišavanjem) oba alela gena *WT1* u somatskoj stanici u različitom vremenskom razdoblju, uzrokujući malignu fenotipsku promjenu. Somatske mutacije gena *WT1*, najčešće u obliku delecija, identificirane su u približno 10–30 % slučajeva WT-a (23,24).

WT1 tumor-supresorski gen kodira sintezu nuklearnog transkripcijskog čimbenika s cink-prst (engl. *zinc finger*) DNA-vezujućim domenama i ima ključnu ulogu u regulaciji izražaja gena tijekom embrionalnog razvoja bubrega i urogenitalnog sustava (25,26). Međusobna interakcija gena *WT1* i Wnt/ β -katenin signalnog puta ima ključnu ulogu u nefrogenezi. β -katenin, kodiran genom *CTNNB1* na 3p22.1 kromosomu je glavni aktivator kanonskog Wnt signalnog puta koji potiče transkripciju i aktivaciju više gena, među kojima i gena *WT1*, u metanefrosu na početku nefrogeneze i posljedično staničnu proliferaciju, diferencijaciju, pokretljivost i preživljenje. Gen *WT1* održava osjetljivost stanica mokraćovodnog pupoljka na indukciju posredovanu Wnt9b/Wnt4 signalnim putem omogućujući mezenhimsko-epitelnu tranziciju metanefričkog mezenhima i početak stvaranja nefrona u ranoj nefrogenezi. Međutim, u kasnoj nefrogenezi, *WT1* suprimira Wnt/ β -katenin signalni put utišavanjem β -katenina, sprječava nekontroliranu proliferaciju stanica, potiče potpunu diferencijaciju epitelnih stanica bubrežnog parenhima i stvaranje nefrona. Gubitak ili inaktivacija gena *WT1* uzrokuje poremećaj normalne diferencijacije epitelnih elemenata nefrona (19,26).

Mutacija gena *CTNNB1* i posljedična aktivacija Wnt signalnog puta su prisutne u otprilike 15% sporadičnih WT-a. Smatraju se “kasnim” događajem u tumorigenezi WT-a odnosno protoonkogenom epigenetičkom mutacijom, jer nisu pronađene u nefrogenim ostacima bubrega (25,27,28). Također se pretpostavlja da je gubitak gena *WT1* u kasnijem stadiju razvoja bubrega, odnosno u fazi utišavanja Wnt signalnog puta, manje osjetljiv na *CTNNB1* mutaciju te je za nastanak WT-a potreban drugačiji genetski poticaj, što govori u prilog genetičkoj heterogenosti WT-a (19, 26, 29).

Gen *WTX*, poznat kao *AMER1* (engl. *APC membrane recruitment protein 1*) ili *FAM123B* je tumor-supresorski gen smješten na Xq11.1 lokusu. Njegove mutacije su utvrđene

s jednakom učestalošću kao i mutacije gena *WT1* u djece s WT-om, dakle radi se o istoj vrsti tumora bubrega s istom dobnom distribucijom (26). Delecije gena *WTX* su utvrđene u 30% nasljednih i u 15-20% sporadičnih WT-a (27, 28). Gen *WTX* kodira citoplazmatski protein koji djeluje kao negativni regulator Wnt/ β -katenin signalnog puta te fosforilacijom, ubikvitinacijom i proteasomalnom razgradnjom β -katenina sprječava njegov prijenos u jezgru i aktivaciju Wnt-ciljnih gena. Stoga delecija, mutacija ili epigenetička inaktivacija gena *WTX* narušava aktivnost destruktivnog kompleksa, stabilizira β -katenin te konstitutivno aktivira Wnt-posredovane transkripcije, dovodeći do nekontrolirane diobe stanica i tumorigeneze (26, 30). Međutim, kako je mutacija gena *CTNNB1* koji kodira sintezu β -katenina značajnije povezana s mutacijama u genu *WT1* nego u *WTX*, smatra se da je pri mutaciji gena *WTX* potrebna mutacija dvaju različitih staničnih signalnih puteva za nastanak WT-a, odnosno disregulacija Wnt/ β -katenin signalnog puta i /ili poremećena stanična adhezija. Istodobna mutacija gena *CTNNB1* i aktivacija Wnt signalnog puta su u približno 4% WT-a udružene sa somatskom mutacijom gena *MLLT1*, ključnog za regulaciju transkripcije gena, uzrokujući dominaciju ILNR u tkivu WT-a djece mlađe životne dobi. Istraživanja nisu potvrdila povezanost između mutacija gena *WT1* i *WTX* (26, 30).

Za razliku od mutacije tumor-supresorskog gena *WT1*, mutacija gena *WT2* je povezana s poremećajem genomskog imprintinga. Naime, regija 11p15 (H19 imprinting kontrolna regija) regulira izražaj IGF-2 (engl. *insulin-like growth factor 2*) i H19 putem specifičnih obrazaca metilacije, ovisno o roditeljskom porijeklu kromosoma. Sadrži dvije imprinting domene, ICR1 (engl. *Imprinting Control Region1*) i ICR2 (engl. *Imprinting Control Region2*), koje zajedno čine *WT2* lokus povezan s nastankom WT-a. U ICR1 domeni paternalno se izražava IGF2, ključni embrionalni čimbenik rasta koji potiče proliferaciju i inhibira apoptozu putem PI3K/Akt/mTOR (engl. *Phosphoinositide 3-kinases/protein kinase B/mechanistic Target Of Rapamycin*) i MAPK (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) signalnih puteva, dok se na maternalnom alelu iste domene izražava H19, nekodirajuća RNA (ribonukleinska kiselina) s tumor-supresorskom ulogom (31). Dakle, metilirani ICR1 na maternalnom alelu onemogućuje vezanje CTCF-a (engl. *CCCTC-binding factor*), ključnog regulatora trodimenzionalne strukture genoma i izražaj IGF-2, dok paternalni alel, koji nije metiliran, omogućuje vezanje CTCF-a, potiče izražaj IGF-2 i inhibira izražaj H19. Deregulacija ovih imprinting domena ima ključnu ulogu u poremećajima rasta i patogenezi nefroblastoma (31). IGF-2 je najviše izražen u nediferenciranom MM-u, dok je nakon početka indukcije nefrogeneze prisutan samo u stromalnim stanicama (19, 29).

Druga imprinting domena ICR2 uključuje gen *CDKN1C* (engl. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*) ili *p57KIP2*, maternalno izražen tumor-supresorski gen i važan negativni regulator stanične proliferacije te DMR-Lit1 (engl. *Differentially Methylated Region Lit1*), paternalno izražen “antisense” transkript koji sudjeluje u epigenetskoj regulaciji susjednih gena *Kip2/Lit* subdomene na kromosomu 11 i IGF-2 imprintingu. Deregulacija ovih imprinting domena ključna je u patogenezi niza poremećaja rasta i nastanka nefroblastoma. Aberantna epigenetska modifikacija, genomski imprinting i aberantna metilacija DMR-Lit1 i *Kip2-Lit1*, gubitak imprintinga (engl. *loss of imprinting* LOI) H19/ICR1, odnosno izražaja maternalnog alela, gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity* LOH) i duplikacija paternalnog alela s uniparentalnom disomijom (engl. *uniparental disomy* UPD) ili duplikacija paternalnog alela u regiji 11p15.5, uzrokuju pojačani izražaj IGF-2, nekontroliranu proliferaciju stanica i nastanak WT-a kao kod Beckwith- Wiedemannov-a sindroma (BWS) (19, 26, 32, 33).

Brown i suradnici su u svom istraživanju utvrdili da u genu *WT2* LOI na 11p15 lokusu predstavlja najčešći epigenetički poremećaj (60–80%), dok su promjene na 11p13 lokusu koje zahvaćaju gen *WT1* uglavnom posljedica mutacija ili delecija. Učestalost LOI na 11p15 je češća nego na 11p13, a oba događaja su vrlo česta u WT-u s incidencijom od 71-83%, s tim da predstavljaju zasebne, međusobno nepovezane epigenetičke defekte (29). Satoh i suradnici su u svom istraživanju potvrdili epigenetičku nestabilnost regije 11p15.5-p13 uz najčešću genetičku promjenu LOH na 11p15.5 lokusu (29%) i najčešću epigenetičku promjenu LOI IGF-2 (40%) u nefroblastomu (22). U sporadičnim slučajevima WT-a prisutnost LOH ili LOI na lokusu 11p predstavljaju vjerojatni sekundarni genetički događaj u nastanku tumora (34).

Nastanak WT-a se tradicionalno tumači putem 2 mehanizma:

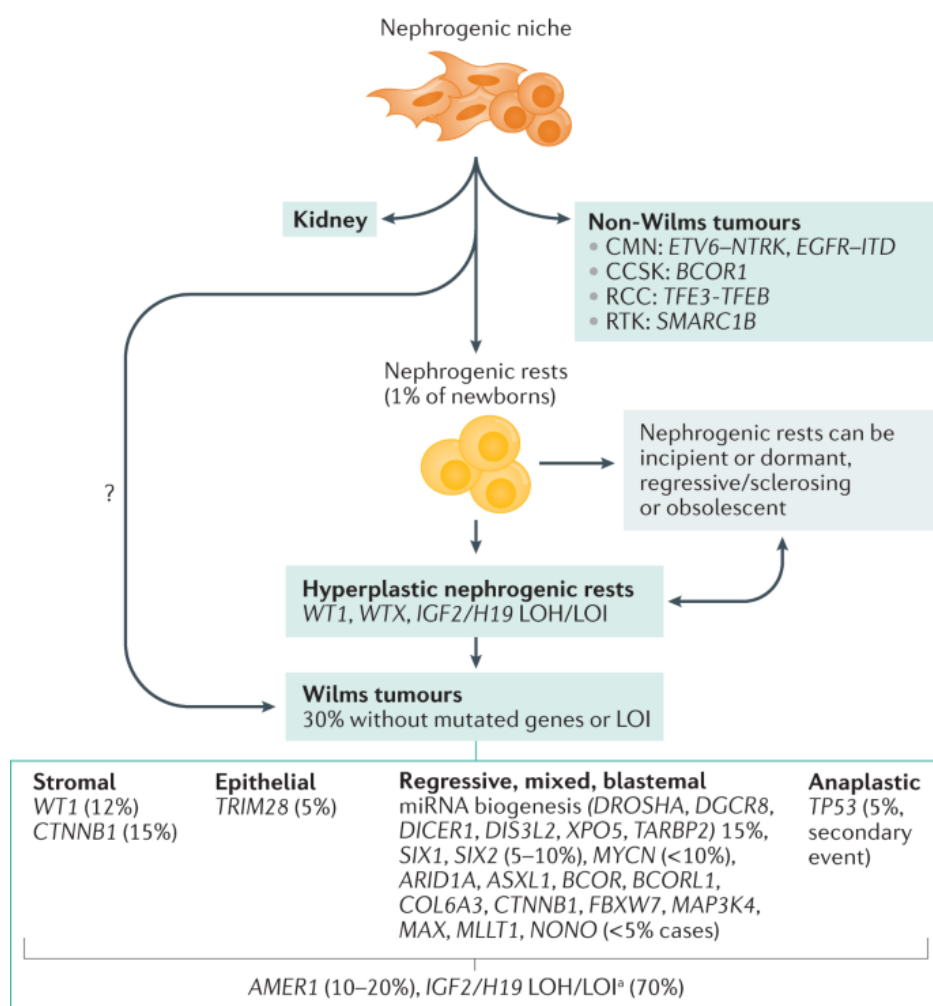
Tip I WT-a je uzrokovan mutacijom oba alela gena *WT1* dovodeći do nastanka intralobarnih nefrogenih ostataka (ILNR) koji onda akumuliraju posnatalno stečene somatske mutacije poput *CTNNB1* ili gena *WTX*, dovodeći do deregulacije Wnt signalnog puta. Genetička obilježja ove vrste tumora su: gubitak funkcije gena *WT1*, gubitak heterozigotnosti (LOH) za 1p i 16q te normalan imprinting uzorak za 11p15 lokus. Smatra se da ovi tumori nastaju tijekom kasne postindukcijske faze MM-a.

Tip II WT-a nastaje genetičkom ili epigenetičkom mutacijom na 11p15 lokusu koja uzrokuje hipermetilaciju ICR1 i poremećaj imprintinga, posljedično prekomjerni izražaj IGF-2 i nastanak perilobarnih nefrogenih ostataka (PLNR) u kojima naknadne somatske mutacije dovode do maligne promjene (25, 28).

Istraživanja na uzorcima WT-a su utvrdila dodatne genske promjene koje imaju prognostički značaj. Primjerice, višak genskog materijala na 1q kromosomu na uzorcima tkiva

unilateralnog WT-a stadija I-IV liječenih prema SIOP (engl. *The European Society for Paediatric Oncology*) WT 2001 protokolu neoadjuvantnom kemoterapijom povezan je s lošijim ishodom preživljenja, dvostruko većim rizikom relapsa i smrtnog ishoda (35). Ista zapažanja su ranije potvrđena u oboljelih s WT-om liječenih prema COG (engl. *The Children's Oncology Group*) protokolu, (prvotno nefrektomiranih), što znači da navedena promjena može biti značajan stratificirajući biljeg, neovisan o protokolu liječenja (35). Multiinstitucionalnim kliničkim ispitivanjem koje je provela *The National Wilms Tumor Study Group* (NWTSG) utvrđeno je da LOH na 1p ili 16q, odnosno gubitak funkcije gena u navedenim regijama, predstavlja nepovoljan prognostički čimbenik, češće prisutan u anaplastičnom WT-u, u djece dobi nakon 4. godine života i češće je povezan s lošijim odgovorom na primijenjeno liječenje i povećanim rizikom relapsa tumora, posebice ukoliko su obje promjene istodobno prisutne (21, 36, 37).

Prema prisutnim mutacijama gena *WT1*, *IGF2*, *CTNNB1* i *WTX* te heterozigotnosti za 1p i 16q i vrsti imprinting uzorka na 11p15 lokusu predlaže se razdioba WT-a u 5 podskupina što bi moglo pridonijeti stratifikaciji rizika i poboljšanju preživljenja bolesnika, individualizaciji terapije s naglaskom na primjenu manje intenzivne kemoterapije u prognostički povoljnih podskupina tumora (19).



Slika 3. Prikaz genskih mutacija Wilmsova tumora. Preuzeto iz: Spreafico, F., Fernandez, C.V., Brok, J. et al. Wilms tumour. Nat Rev Dis Primers 7, 75(2021). Licenca: CC BY 4.0, izvor: [https://doi.org/10.1038/s41572-021-00308-8].

Prekomjerna ekspresija *N-MYC* (engl. *v-myc avian neuroblastoma viral oncogene homolog*) protoonkogen je utvrđena u brojnim embrionalnim tumorima u djece poput neuroblastoma, meduloblastoma i rabdomiosarkoma (31). *N-MYC* gen kodira sintezu N-Myc proteina kojeg ciljano, pomoću SCF (engl. *Skp1-Cullin-F-box*) kompleksa, odnosno ubikvitin-proteasoma, razgrađuje ključni tumor-supresorski gen *FBXW7* (engl. *F-box/ WD-repeat domain-containing 7*). Istraživanja su potvrdila povećan broj kopija gena *N-MYC* u 8-9% WT-a, a mutaciju ili deleciju *FBXW7* u 4% WT-a, koje su većinom prisutne u prognostički nepovoljnom difuznom anaplastičnom WT-u (38).

TP53 (tumor protein 53), takozvani “čuvar staničnog genoma”, kodiran je genom na 17p kromosomu, a regulira popravak DNA, diobu i apoptozu stanice, inhibirajući staničnu proliferaciju potaknutu onkogenom ili stresom. Njegova mutacija uzrokuje Li-Fraumeni

sindrom koji stvara u nosioca sklonost razvoju različitih neoplazmi. Somatske mutacije TP53 prisutne su u manje od 5% visokorizičnih, difuzno anaplastičnih WT-a (25, 35, 39).

Određenu ulogu u nastanku WT-a imaju i mutacije gena za *SIX1/2*, *DICER1*, *DROSHA*, *DIS3L2*, *DGCR8*, *PALB2*, *PIK3CA*, *BRCA2*, *GPC3* te LOH na 11q i 22q lokusu (40).

SIX1 i SIX2 (sine oculis homeobox homolog 1/2) su transkripcijski čimbenici SIX obitelji koji su važni za normalan razvoj metanefričkog bubrega. Inhibiraju preranu diferencijaciju nezrelih progenitorskih mezenhimalnih stanica u nediferenciranom blastemu bubrega. Mutacija ili povećani izražaj SIX1/SIX2 uzrokuje perzistiranje primitivnog blastema, glavne histološke komponente WT-a i nastanak tumora (41). SIX1/SIX2 mogu djelovati udruženo s mutacijama gena *WT1*, aktivacijom Wnt/ β -katenin signalnog puta ili disregulacijom miRNA ili mogu aktivirati gene koji promiču proliferaciju stanica (npr. *CCND1*) (31).

Mutacije gena *DROSHA* (engl. *Drosha Ribonuclease III*) i gena *DICER1* smanjuju izražaj tumor- supresorskih gena obitelji Let7 uzrokujući poremećaj epitelne diferencijacije. Autosomno-recesivno nasljedna zametna mutacija gena *DIS3L2* (engl. *DIS-3-like exosome 3'-5' exoribonuclease*) uzrok je Perlman-ova sindroma, obilježenog prekomjernim rastom, makrosomijom, organomegalijom i 20-30% povećanim rizikom za nastanak WT-a zbog posljedične embrionalne displazije bubrega i stvaranja premalignih nefrogenih ostataka (PNRL)(40).

MikroRNA (engl. *micro ribonucleic acid miRNA*) su male ne-kodirajuće molekule RNA koje kontroliraju izražaj gena važnih za razvoj bubrega. miRNA sudjeluju u post-transkripcijskom utišavanju gena poput *DROSHA*, *DICER1*, *DGCR8* (engl. *DiGeorge syndrome critical region 8*), *XPO5* (engl. *Exportin 5*) i *TARBP2* (engl. *TAR RNA-binding protein 2*) i u slučaju njihove deregulacije doprinose nastanku WT-a (42).

Novija istraživanja na modelu matičnih stanica raka pretpostavljaju postojanje stanica unutar tumora koje se ponašaju poput matičnih stanica, ali koje mogu poticati nastanak i rast tumora. Smatra se da je populacija NCAM1+/ALDH1+ (engl. *Neural Cell Adhesion Molecule 1/Aldehyde Dehydrogenase1*) stanica u WT-u izvor matičnih stanica raka koje dediferencijacijom u mezenhimalne stanice potiču tumorigenezu (43). Pretpostavlja se da bi svaka histološka podgrupa WT-a nastajala iz različite matične tumorske stanice u različitom stadiju razvoja bubrega (7,25).

Kompleksnosti genske osnove WT-a pridonosi pojavnost WT-a u približno 10% kongenitalnih malformacijskih sindroma poput WAGR, Beckwith-Wiedemann-ova (BWS), Denys-Drash (DDS), Perlman-ova sindroma i neurofibromatoze tip I (von Recklinghausenova bolest) (10). WAGR sindrom je uzrokovan potpunom konstitucijskom delecijom jedne kopije

gena *WT1* i *PAX6* na kromosomu 11p13, a rizik za nastanak WT-a iznosi 33% (24). DDS je posljedica točkaste “missence” mutacije gena *WT1* u zametnoj stanici, s učestalošću razvoja WT-a od 90% (33). BWS (hemihipertrofija, visceromegalija, omfalokela, makrosomija, makroglosija, hipoglikemija) je uzokovan mutacijom gena *WT2* na 11p15.5 kromosomu, kao i gena na istom lokusu koji kodira sintezu IGF-2, važnog čimbenika feto-placentarnog rasta i organogeneze, s visokim mitogenim potencijalom. Poremećaj imprintinga za IGF-2 zbog LOH ili LOI koji dovode do uniparentalne disomije (20% slučajeva) ili hipermetilacije na H19/IGF2:IG-DMR maternalnog alela (5-10% slučajeva) te prekomjernog izražaja IGF-2 tijekom fetalnog života, uzrokuju nastanak ovog sindroma koji je visokorizičan za nastanak embrionalnih tumora poput hepatoblastoma i WT-a. Hipermetilacija na H19/IGF2:IG-DMR nosi 28% veći rizik za WT (33, 39).

Posebna podskupina WT-a su bilateralni WT-i (BWT) koji se javljaju u 5-7% svih WT-a. BWT, različito od unilateralnih tumora, imaju veću učestalost germinalnih predispozicijskih promjena i multifokalnost. Njihov nastanak najbolje ocrtava Knudsonova teorija “dvostrukog udara” (engl. *two hits*) gdje se prvi događaj odvija u prezigotičnoj ili zametnoj stanici ili u postzigotičnoj somatskoj stanici rane embrionalne dobi, dok je drugi događaj uvijek postzigotičan (16). Navedenu tvrdnju potkrepljuje činjenica da se BWT javlja u ranijoj dobi nego unilateralni WT i da su nefrogeni ostatci i multifokalni WT češći kod BWT (8, 9, 40). Sekvenciranje cijelog egzoma (WES) i cijelog genoma (WGS), u kombinaciji s analizom metilacijskog obrasca DNA, pokazalo je da germinalne (prezigotne) varijante gena *WT1* te rani postzigotni (somatski) epigenetički poremećaji imprintinga u regiji 11p15.5 (hipermetilacija H19/ICR1; LOI) u mezodermalnim progenitorskim stanicama predstavljaju početne događaje koji stvaraju molekularnu podlogu za razvoj BWT-a, a nastaju prije lateralizacije mezoderma odnosno primordijalnog bubrega i nakon embrionalne gastrulacije (40). BWT se često javlja u WAGR-u i BWS-u.

Za razliku od tumora povezanih s germinalnim varijantama gena *WT1*, poremećaji imprintinga na lokusu 11p15.5 (LOI ili paternalna uniparentalna disomija) često predstavljaju rani, početni događaj u podskupini BWT-a koji se javljaju u kasnijoj životnoj dobi. Status lokusa 11p15.5 bi mogao biti molekularni biljeg s ciljem bolje stratifikacije oboljelih u biološki različite podskupine WT-a (npr. *WT1*-povezane naspram 11p15-povezanih tumora), genetičkog savjetovanja obitelji u slučaju potvrđene germinalne predispozicije te procjene terapijskog odgovora i prognoze (40).

1.4. Klinička slika Wilmsova tumora

Najčešći klinički simptom WT-a je asimptomatska palpabilna ili vidljiva masa u trbuhu (75%), dok su rjeđe prisutni bol u trbuhu (23%), hematurija (24%), hipertenzija zbog povećane reninske aktivnosti (26%) ili koagulopatija uzrokovana stečenom von Willebrand-ovom bolešću. Nenapredovanje ili gubitak na tjelesnoj masi, konstipacija ili proljev, mučnina i povraćanje te vrućica također mogu biti klinički znaci WT-a. Pri pregledu treba obratiti pozornost na dismorfna obilježja i kongenitalne anomalije koje mogu upućivati na neki od sindroma povezanih s WT-om (45).

Prije počinjanja kemoterapije potrebna je procjena općeg stanja djeteta prema Lansky-evoj ljestvici (46):

• 100 – potpuno aktivna, normalna
• 90 – minimalna ograničenja u napornoj fizičkoj aktivnosti
• 80 – aktivna, ali puno brže se umaraju
• 70 – veća ograničenja u igri, manje vremena provode igrajući se
• 60 – većinu dana su u pokretu, ali aktivna igra je svedena na minimum, više se bave mirnijim aktivnostima
• 50 – većinu dana provode ležeći u krevetu, no ipak se preobuku iz pidžame, ne sudjeluju u aktivnoj igri, sudjeluju samo u mirnijim igrama i aktivnostima
• 40 – uglavnom u krevetu, sudjeluju samo u mirnijim aktivnostima
• 30 – vezani za krevet ; trebaju pomoć čak i pri mirnoj igri
• 20 – često spavaju, igranje je ograničeno na potpuno pasivne aktivnosti
• 10 – ne igraju se, ne izlaze iz kreveta
• 0 – bez reakcije

Tablica 1. Lanskyjeva skala procjene funkcionalnog statusa djece. Prilagođeno prema: Lansky SB, List MA, Lansky LL, Ritter-Sterr C, Miller DR. The measurement of performance in childhood cancer patients. *Cancer*.1987;60(7):1651–1656.doi:10.1002/1097-0142(19871001)60:7<1651::AID-CNCR2820600738>3.0.CO;2-J.

1.5. Dijagnostika Wilmsova tumora

WT se dijagnosticira kliničkim pregledom, laboratorijskim i slikovnim pretragama. Anamnestički podatci o početku simptoma i njihovom trajanju, ranijem kirurškom zahvatu ili malignoj bolesti, “in vitro” fertilizaciji te o postojanju sindromske ili neoplastičnih bolesti u obitelji pridonose pravilnom postavljanju dijagnoze.

Laboratorijske pretrage obuhvaćaju: kompletnu krvnu sliku, biokemijske pretrage uključujući pokazatelje funkcije bubrega, koagulogram i određivanje von Willebrand-ova čimbenika. Uzorkovanje tumorskih biljega poput α -fetoproteina (AFP) koji je biljeg tumora zametnog epitela i jetre te biljega neuroblastoma neuron-specifične enolaze (NSE), služi u diferencijalno dijagnostičke svrhe. Analizom urina procjenjuje se bubrežna funkcija, a određivanjem kateholamina vanilmandelične (VMA) i homovanilinske kiseline (HVA) u urinu potvrđuje se ili isključuje neuroblastom (20).

Slikovna obrada u dijagnostici WT-a je izuzetno važna, gdje se pomoću UZV, MSCT ili MRI trbuha opisuje kao solidna, inhomogena ili djelomično cistična, dobro ograničena tumorska masa, s prisutnim intratumorskim krvarenjem, nekrozama te vrlo rijetkim kalcifikacijama WT može nastati bilo gdje u bubregu, u meduli ili korteksu i može uzrokovati destrukciju bubrežnih čašica i pelvisa. Lokalnim širenjem zahvaća limfne čvorove hilusa bubrega ili paraortalne limfne čvorove. Zbog stečene koagulopatije, odnosno von Willebrand-ove bolesti, u renalnoj veni može nastati ugrušak koji se može dalje širiti u donju šuplju venu sve do desnog atrija srca (20, 45)..

Detaljnijom dijagnostičkom obradom utvrđuje se prisutnost tumora, lokalna proširenost bolesti, funkcija kontralateralnog bubrega te prisutnost udaljenih metastaza (češće u pluća i jetru, a rjeđe u kosti ili mozak). MSCT pluća je neophodna pretraga kojom se utvrđuju plućne metastaze pri čemu prisustvo 1 ili više nodula ≥ 3 -5 mm predstavlja pozitivan nalaz (20). Također je preporučljiva genetička analiza, odnosno određivanje zametne mutacije *WT1* gena u bolesnika, posebice onih s BWT-om (47).

Diferencijalno dijagnostički treba obradom isključiti: neuroblastom, limfom bubrega, nefroblastomatozu, karcinom bubrega, maligni rabdoidni tumor bubrega, teratom, ganglioneurom, angiomiolipom, adenom, hematom, cistu bubrega.

1.6. Histopatologija Wilmsova tumora

Makroskopski WT je velika, solitarna, dobro ograničena tvorba, koja je na prerezu mekana, žućkastosiva masa uz vidljiva žarišta cističnih promjena, krvarenja i nekroze. Prvu histološku klasifikaciju WT-a uspostavili su Beckwith i Palmer 1978. g. razdiobom primarno operiranih WT-a na anaplastične i ne-anaplastične (48, 49).

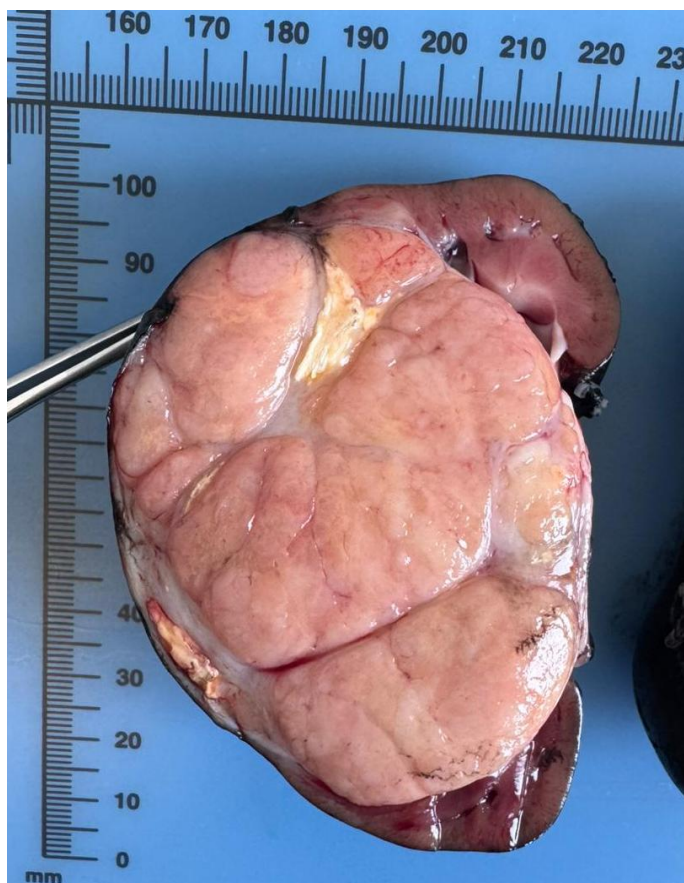


Slika 4. Makroskopski izgled bubrega s Wilmsovim tumorom. Slika preparata iz doktorskog istraživanja.



Slika 5. Makroskopski izgled bubrega s Wilmsovim tumorom na prerezu. Slika preparata iz doktorskog

istraživanja.



Slika 6. Rezna ploha bubrega s Wilmsovim tumorom. Slika preparata iz doktorskog istraživanja.

WT je mezodermalnog podrijetla i ima takozvanu trifazičnu histološku građu jer oponaša kompleksni razvojni put bubrežnog tkiva i diferencijaciju stanica, od primitivne blastemske do diferencirane epitelne i stromalne stanice, koje stoga nalikuju stanicama embrija u razvoju. Razlikujemo 3 histološke komponente nefroblastoma: blastemsku, stromalnu ili mezenhimalnu te epitelnu. Blastemska komponenta je građena od malih, gusto smještenih, nediferenciranih ili slabo diferenciranih stanica s visokim omjerom jezgra: citoplazma, raspoređenih difuzno ili u obliku gnijezda. Stromalni tip WT-a je građen od nezrelih mikroidnih ili mezenhimalnih stanica u koje pripadaju fibroblasti, mišićne, hrskavične ili koštane stanice. Epitelni tip WT-a obilježavaju stanice različitog stupnja diferencijacije. Mogu biti homologne oponašajući normalnu diferencijaciju bubrega (glomerularni ili epitelni tip) ili heterologne, građene od skvamoznih ili mucinoznih stanica koje se normalno ne nalaze u bubrežnom tkivu. Najčešći oblik epitelnog podtipa WT-a je tubularna diferencijacija (48-51). Anaplastični tip WT-a je obilježen ekstremnom poliploidijom, stanicama s velikom, hiperkromatskom jezgrom i multipolarnim mitozama (50). Anaplaziju prema lokalizaciji i

proširenosti unutar bubrežnog parenhima dijelimo na fokalnu ili difuznu. Fokalna anaplazija predstavlja prisutnost anaplastičnih stanica na jednom ili više ograničenih mjesta unutar tumora, bez ekstrarenalne pojavnosti. Difuzna anaplazija je obilježena anaplastičnim promjenama tumorskih stanica difuzno raspoređenih u tumorskom tkivu, njihovom prisutnošću na invazivnim lokalizacijama te na rubovima jednog ili više sekcijskih polja. Anaplazija je često povezana s mutacijama TP53 gena (50).

Patohistološka klasifikacija WT-a se prema Children's Oncology Group (COG) klasifikaciji temelji na tumorskom tkivu uzorkovanom biopsijom ili operativnim zahvatom, bez prethodne kemoterapije, dok se prema SIOP klasifikaciji tumorsko tkivo analizira nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije i potom operativnog uklanjanja bubrega zajedno s tumorom (52). Kemoterapijom djelujemo prvenstveno na nezrele, slabo diferencirane i proliferativne stanice, dok su diferencirana tkiva otpornija. Provedena neoadjuvantna kemoterapija značajno mijenja patohistološku sliku WT-a, razara prvenstveno blastemske stanice i manje diferencirane epitelne elemente, a potiče diferencijaciju stromalnih elemenata. Tipične promjene potaknute kemoterapijom su: koagulativni tip nekroze malih okruglih stanica ili neoplastičnih tubula, fibroza, hipocelularna stroma s makrofagima, depozitima hemosiderina i krvarenjem.

Patohistološka analiza tumorskog tkiva nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije kod SIOP protokola, osim što omogućuje postavljanje patohistološke dijagnoze bolesti, omogućuje i procjenu odgovora WT-a na primijenjeno liječenje određivanjem stupnja nekroze, udjela preostalih blastemskih ili anaplastičnih vijabilnih dijelova tumora te stvrštavanje bolesnika u određene skupine rizika, tzv „downstaging“ tumora.

Stupanj nekroze tumora nakon neoadjuvantne kemoterapije je važan prognostički čimbenik. Ukoliko nema vijabilnog tumorskog tkiva, radi se o potpuno nekrotičnom WT-u (nekroza >90%) s petogodišnjim preživljenjem od 98%, koji se javlja u približno 5-10% bolesnika.

Prisutnost blastemske komponente je prema SIOP-u drugi važan prognostički čimbenik. WT s predominantnom blastemskom komponentom, odnosno prisutnošću vijabilnih blastemskih stanica u više od 30% tumorskog tkiva (u najmanje 2/3 vijabilnog tkiva), ima 40% rizik relapsa te je prognostički nepovoljan i ubraja se u visokorizični WT (52).

Prisutnost regresivnih promjena u više od 2/3 (66%) tumorskog tkiva predstavlja regresivni tip, a ukoliko ih je <66%, tumor se subklasificira na: blastemski, epitelni, stromalni ili miješani podtip. Epitelni ili stromalni podtip WT-a podrazumijeva prisutnost navedene komponente u >66% vijabilnog tumora, dok u preostalom tumorskom tkivu smije biti

blastemske komponente <10%. U suprotnom se tumor klasificira kao miješani tip. Anaplazija može biti prisutna u blastemskoj, epitelnoj ili stromalnoj komponenti, a ukoliko je fokalna, s jasno definiranim žarištem anaplazije okruženim normalnim stanicama, tumor se subklasificira temeljem ostalih komponenti (50).

1.7. Klasifikacija Wilmsova tumora i prognostički čimbenici

Bolesnike možemo podijeliti u rizične skupine prema COG klasifikaciji ovisno o dobi, tumorskoj masi, stadiju bolesti (I-V), patohistološkom nalazu primarno nefrektomiranog tumora, prisustvu LOH 1p i 16q, dobitku (engl. *gain*) 1q i mutaciji TP53, a prema SIOP klasifikaciji ovisno o stadiju bolesti, volumenu tumora, nalazu patohistološke analize tumorskog tkiva nakon neodjauvantne kemoterapije (odgovor WT-a na liječenje) te prisustvu umnožene 1q promjene u tkivu WT-a (45).

WT se histološki može podijeliti prema COG klasifikaciji na: “favourable” (povoljne prognoze) i “unfavourable” (nepovoljne prognoze) WT. U “favourable” WT ubrajamo blastemski, epitelni i stromalni tip. Anaplastični WT, koji čini 5% svih WT-a, predstavlja “unfavourable” histološki tip, s dodatnom razdiobom na fokalnu i difuznu anaplaziju.

Prema SIOP klasifikaciji WT dijelimo na 3 skupine: niskog, intermedijarnog i visokog rizika. WT niskog rizika je potpuno nekrotični nefroblastom. Za razliku od COG-ove razdiobe, fokalna anaplazija zajedno s epitelnim, stromalnim, miješanim i regresivnim tipom WT-a pripada intermedijarnom riziku, dok su blastemski i difuzno anaplastični tip WT-a kemorezistentni tumori visokog rizika malignosti (50, 52).

Tablica 2. Razdioba WT prema COG i SIOP klasifikaciji. Preuzeto iz: Perlman EJ, Webster F, Chang KTE, Coulomb A, Galluzzo L, Graf NS, et al. Data set for reporting paediatric renal tumours: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR) Histopathology. 2025 Aug;87(2):183-196. doi: 10.1111/his.15450. Licenca: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).

Stadij WT	COG (prije kemoterapije)	SIOP (nakon kemoterapije)
I	Tumor ograničen na bubreg i potpuno uklonjen Bubrežna kapsula intaktna Tumor ne zahvaća vene, limfu ni renalni sinus Bez hematogenih metastaza Bez prethodne biopsije Negativni rubovi	Tumor ograničen na bubreg i potpuno uklonjen Bubrežna kapsula zahvaćena tumorom, ali je vanjska površina intaktna Tumor protrudira u pelvis ili ureter, ali ih ne infiltrira Krvne žile renalnog sinusa nisu zahvaćene
II	Tumor se proširio izvan bubrega, ali je potpuno uklonjen	Tumor se proširio izvan bubrega, ali je potpuno uklonjen

	Tumor zahvaća bubrežnu kapsulu	Tumor prodire kroz bubrežnu kapsulu u perirenalno masno tkivo
	Tumor zahvaća vene, limfne žile i renalne sinuse	Tumor zahvaća renalni sinus ili krvne ili limfne žile izvan bubrežnog parenhima, ali je potpuno uklonjen
	Tumor u renalnoj veni bez zahvaćenih rubova	Tumor zahvaća susjedne organe ili donju šuplju venu, ali je potpuno uklonjen
	Bez limfogenih i hematogenih metastaza	
	Negativni rubovi	
III	Nepotpuna ekscizija (rezidualni tumor) bez hematogenih metastaza	Nepotpuna ekscizija tumora koji se proširio izvan granica resekcije
	Zahvaćeni limfni čvorovi trbuha	Zahvaćeni limfni čvorovi trbuha, uključujući nekrotične promjene uzrokovane tumorom ili kemoterapijom
	Peritonealne presadnice	Rasap tumora prije ili za vrijeme operativnog zahvata
	Rasap tumora prije ili za vrijeme operativnog zahvata	Rasap tumora prije ili za vrijeme operativnog zahvata
	Velika ostatna tumorska masa	Peritonealne presadnice
	Biopsija tumora prije operativnog uklanjanja	Tumorski tromb na rubovima resekcije
	Rubovi zahvaćeni tumorom	Biopsija tumora prije operativnog uklanjanja (isključuje biopsiju iglom)
IV	Hematogene metastaze (pluća, jetra, kosti, mozak) ili u udaljene limfne čvorove izvan trbušno-zdjelične regije	Hematogene metastaze (pluća, jetra, kosti, mozak)
V	Bilateralni WT	Bilateralni WT

Tablica 3. Usporedba COG i SIOP histološke klasifikacije WT prema skupini rizika. Preuzeto iz: Vujanić GM, Parsons LN, D'Hooghe E, Treece AL, Collini P, Perlman EJ. Pathology of Wilms' tumour in International Society of Paediatric Oncology (SIOP) and Children's oncology group (COG) renal tumour studies: Similarities and differences. Histopathology. 2022 Jun;80(7):1026-1037. doi: 10.1111/his.14632. Licenca: CC BY-NC-ND 4.0.

Children's Oncology Group (COG)	International Society of Pediatric Oncology (SIOP)
1. <i>WT povoljne prognoze</i>	<i>Niski rizik</i>
Bez prisutne anaplazije	Mezoblastični nefrom
2. <i>WT s fokalnom anaplazijom</i>	Cistični, parcijalno diferencirani WT
Anaplazija potvrđena u jednom ili više žarišta unutar tumora bez ekstrarenalnog širenja	Potpuno nekrotični WT
Bez jezgre	<i>Intermedijarni rizik</i>
3. <i>WT s difuznom anaplazijom</i>	Epitelni, stromalni, miješani ili regresivni tip WT
Difuzna anaplazija	WT s fokalnom anaplazijom

Anaplazija na invazivnim mjestima ili ekstrarenalno	<i>Visoki rizik</i>
Lokalizirana anaplazija s teškom atipijom jezgre	Blastemski WT
Anaplazija u slučajnom uzorku bioptata	Difuzni anaplastični WT
Anaplazija koja zahvaća rub jedne ili više sekcija	“Clear cell” sarkom bubrega
Ne- Wilmsov tumor	Rabdoidni tumor bubrega

1.8. Liječenje Wilmsova tumora

WT predstavlja prvi primjer uspješnog multimodalnog liječenja maligne bolesti u djece. Uporaba suvremenih protokola liječenja koji se temelje na stadiju bolesti i histologiji WT-a, a sastoje se od kemoterapije, operativnog zahvata te u bolesnika visokog rizika i radioterapije, omogućila je značajan porast ukupnog preživljenja oboljelih s unilateralnim WT-om na 89.8%, odnosno 70% kod bilateralnog WT-a (12). Međutim, u 10% bolesnika s intermedijarnim rizikom i 30-50% bolesnika s visokorizičnim WT-om dolazi do relapsa bolesti s preživljenjem od približno 50% (45).

Postoji nekoliko protokola u liječenju WT-a: SIOP protokol koji se upotrebljava u Europi i državama izvan Europe, COG protokol, ranije NWTSG, u Sjevernoj Americi, protokol „United Kingdom Children Cancer Group“ (UKCCSG) u Velikoj Britaniji i protokol „Brazilian Wilms Tumor Study Group“ koji se rabi u Brazilu (50, 58).

Prvi multicentrični protokol u liječenju WT-a započeo je u Sjedinjenim Američkim Državama 1969.godine kao „National Wilm's Tumour Study group“ (NWTSG), koji je danas dio COG-a. Prema COG protokolu nefroblastom se prvo kirurški ukloni, potom se primjenjuje adjuvantna kemoterapija, osim ukoliko se radi o obostranom sinkronom tumoru. Patohistološka dijagnoza se postavlja na prethodno kemo- i radioterapijom netretiranom tumorskom tkivu (58). SIOP protokol primjenjuje prijeoperativnu (neoadjuvantnu) kemoterapiju smanjujući na taj način rizik kirurških komplikacija, rupture i rasapa tumora tijekom zahvata te potrebu za primjenom radioterapije. Ukoliko se na temelju kliničkih simptoma i dijagnostičke obrade ne može sa sigurnošću utvrditi radi li se o WT-u, dolazi u obzir „fine-needle“ biopsija (37, 58). Ishodi liječenja u COG i SIOP grupi su usporedivi i zadovoljavajući.

Operativno liječenje WT-a se sastoji od transperitonealno-transverzalnog pristupa uz totalnu nefro-ureterektomiju i uklanjanje regionalnih limfnih čvorova (najmanje 7), radi utvrđivanja lokalnih metastaza. Laparoskopski zahvat se također može primijeniti ukoliko

omogućava regionalnu limfadenektomiju. Nakon operativnog zahvata nastavlja se s adjuvantnom kemoterapijom u svih bolesnika (54). Izuzetak su dojenčad mlađa od 6 mjeseci u koje se ne primjenjuje neoadjuvantna kemoterapija, već se odmah učini operativni zahvat. Naime, u toj dobi se češće javlja kongenitalni mezoblastični nefrom koji se definitivno liječi kirurškim uklanjanjem i na taj način izbjegavamo primjenu citotoksične kemoterapije u ranoj dobi ili se može raditi o malignom rabdoidnom tumoru bubrega koji zahtijeva primjenu intenzivnijeg onkološkog liječenja (58).

Prvi SIOP protokol primijenjen je 1971.g i od tada je do danas uspješno smanjen intenzitet kemoterapije za većinu bolesnika, povećavajući ukupno preživljenje na gotovo 90%. Danas 2/3 oboljelih od WT-a primaju kemoterapiju koja se sastoji od samo 2 citostatika: vinkristin (VCR) i aktinomicin D (ACT D). Stoga je pravilna razdioba oboljelih prema stupnju rizika važna ne samo za preživljenje, već za smanjenjene ranih i kasnih komplikacija liječenja (55, 58).

Prijeoperativna kemoterapija prema SIOP (Umbrella SIOP-RTSG 2016) protokolu za WT stadija I-III se sastoji od primjene AV protokola, odnosno vinkristina (1.5 mg/m^2), u 1., 2., 3. i 4. tjednu liječenja te aktinomicina D ($45 \text{ } \mu\text{g/kg}$), u 1. i 3. tjednu liječenja, tijekom ukupno 4 tjedna. Kod histološki nepovoljnog podtipa WT, stadija IV ili metastaske bolesti dodaju se antraciklini (doksorubicin 50 mg/m^2) u 1. i 5. tjednu, a liječenje traje 6 tjedana, prema AVD protokolu. Bolesnici s bilateralnim WT-om se liječe vinkristinom i aktinomicinom D tijekom 12 tjedana (58).

Nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije slijedi radikalna nefrektomija s uklanjanjem bubrega zahvaćenog tumorom te sedam lokoregionalnih limfnih čvorova radi utvrđivanja lokalnog stadija bolesti (I-III), tijekom 5. ili 6., odnosno 7. ili 8. tjedna liječenja (u prognostički nepovoljnog WT). U slučaju BWT-a prvo se operira tumorom manje zahvaćen bubreg, prema principu „nephron sparing surgery“ (NSS), a potom se ukloni bubreg više zahvaćen tumorom. NSS se može provesti i u unilateralnom WT-u uz strogo utvrđene kriterije: tumor mora biti centralno smješten, okružen prstenom zdravog tkiva, volumena $<300 \text{ ml}$, uz dovoljno preostalog bubrežnog tkiva, nezahvaćenih limfnih čvorova i s odsutnošću WAGR ili DDS. Tek 3-9% djece će zadovoljiti navedene kriterije (58).

Postoperativna (adjuvantna) kemoterapija se određuje na temelju lokalnog stadija WT-a (I-III), histološkog podtipa i volumena WT-a utvrđenog prije liječenja slikovnom pretragom. Kod niskorizičnog WT-a stadija I nakon operativnog zahvata nije potrebna postoperativna kemoterapija.

WT stadija I i intermedijarnog rizika se liječi AV1 protokolom uz primjenu vinkristina

(4 doze u razmacima od jednog tjedna) i jedne doze aktinomicina D (ACTD) u 2. tjednu liječenja, tijekom 4 tjedna.

Kod WT-a stadija I i visokog rizika primjenjuje se AVD protokol tijekom 27 tjedana prema shemi: vinkristin (VCR) 1 x tjedno tijekom prvih 8 tjedana, potom u 11., 12., 14., 15., 17., 18., 20., 21., 23., 24., 26., i 27. tjednu (ukupno 20 doza), aktinomicin D (ACTD) u 2., 5., 8., 11., 14., 17., 20., 23., 26. tjednu (ukupno 9 doza) te doksorubicin (DOXO) u 2., 8. 14., 20. i 26. tjednu (ukupno 5 doza) (58).

Bolesnici s WT-om stadija II i III niskog i intermedijarnog rizika se liječe AV2 protokolom primjenom VCR i ACTD tijekom 27 tjedana.

WT stadija II i III visokog rizika, s volumenom tumora >500 ml nakon neoadjuvantne kemoterapije, te histološkim podtipovima koji nisu stromalni ni epitelni, liječi se prema WT HR-1 („high-risk“) protokolu primjenom 4 citostatika, gdje se naizmjenično primjenjuju ciklofosamid (prva 3 dana u tjednu: 1., 7., 13., 19., 25. i 31. (ukupno 6 ciklusa) s doksorubicinom (1. dana 1., 7., 13., 19., 25. i 31. tj- ukupno 6 doza) i etopozid (prva 3 dana 4., 10., 16., 22., 28. i 34. tj- ukupno 6 ciklusa) s karboplatinom (prva 3 dana u 4., 10., 16., 22., 28. i 34. tj- ukupno 6 ciklusa), tijekom 34 tjedna.

Prema analizi podataka iz provedenog SIOP 2001 protokola, dodatak doksorubicina regresivnom, miješanom i fokalno-anaplastičnom tipu WT s rezidualnim volumenom > 500 ml povećao je petogodišnje preživljenje sa 67% na 93% (58).

WT stadija IV (metastatski) je prisutan u otprilike 17% oboljelih. Liječi se neoadjuvantnom kemoterapijom s protokolom AVD (VCR 1 x tjedno, ACTD u 1., 3., 5. tj i DOXO u 1. i 5. tj) tijekom 6 tjedana. Potom se prije kirurškog zahvata slikovnim pretragama reevaluiraju primarni tumor i metastatska sijela. Nakon nefrektomije se primjenjuje adjuvantna terapija ovisno o histološkom podtipu WT-a i odgovoru plućnih metastaza na provedenu neoadjuvantnu kemoterapiju ili mogućnosti njihovog potpunog kirurškog uklanjanja. 61-67% plućnih metastaza će potpuno odgovoriti na kemoterapiju (56, 58).

Skupina A1 (plućne metastaze ≥ 3 i ≤ 5 mm) WT stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, niskog i intermedijarnog rizika, s potpunim odgovorom plućnih metastaza na neoadjuvantnu kemoterapiju ili potpunim kirurškim uklanjanjem, liječi se protokolom AVD150 s reduciranom dozom doksorubicina tijekom 27 tj.

Skupina A2 (plućne metastaze >5 mm) WT stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, niskog i intermedijarnog rizika, s potpunim odgovorom plućnih metastaza na neoadjuvantnu kemoterapiju ili potpunim kirurškim uklanjanjem, liječi se protokolom AVD250 tijekom 27 tj. U skupinama A1 i A2, ako se u reseciranoj plućnoj metastazi dokažu vijabilne tumorske

stanice, indicirana je, uz adjuvantnu kemoterapiju, radioterapija pluća/metastatskih sijela.

Skupina A3 s WT-om stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, niskog i intermedijarnog rizika, u kojih u reseciranoj plućnoj leziji histološki nije nađeno tumorsko ni nekrotično tkivo, liječi se prema protokolu za lokalizirani WT (56, 58).

Skupina B (plućne metastaze $\geq 3\text{mm}$) WT stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, niskog rizika, s rezidualnim ili multiplim inoperabilnim plućnim metastazama, liječi se protokolom AVD150 ako je u metastazi prisutna samo nekroza bez vijabilnih tumorskih stanica, odnosno protokolom AVD250 uz radioterapiju ako su u reseciranoj plućnoj metastazi prisutne vijabilne tumorske stanice tijekom ukupno 27 tjedana.

Skupina B (plućne metastaze $\geq 3\text{mm}$) WT stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, niskog rizika, bez utvrđenog vijabilnog tumorskog ili nekrotičnog tkiva u uklonjenom plućnom tkivu, liječi se prema protokolu za lokalizirani WT.

Skupina C (plućne metastaze $\geq 3\text{mm}$) WT stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, intermedijarnog rizika s rezidualnim ili multiplim inoperabilnim plućnim metastazama liječi se protokolom AVD250 tijekom ukupno 27 tjedana ako je u metastazi prisutna samo nekroza bez vijabilnih tumorskih stanica, odnosno intenziviranom terapijom s 4 lijeka (ciklofosfamid/doksorubicin i etopozid/karboplatina naizmjenično) tijekom 34 tjedna uz radioterapiju ako su prisutne vijabilne tumorske stanice u reseciranoj plućnoj metastazi.

Za skupinu C (plućne metastaze $\geq 3\text{mm}$) WT stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, intermedijarnog rizika, bez utvrđenog vijabilnog tumorskog i nekrotičnog tkiva u reseciranom plućnom tkivu, primjenjuje se protokol za lokalizirani WT (56, 58).

Skupina D WT stadija IV, lokalnog stadija I/II/III, visokog rizika, kao i oboljeli s progresivnom bolešću se također liječe protokolom s primjenom 4 lijeka, ali imaju značajno nepovoljniju prognozu nego nisko- i intermedijarno rizični WT-i.

Stadij V, odnosno BWT se liječi na slijedeći način: AV protokol 6 tjedana, potom parcijalna i/ili kompletna nefrektomija jednog bubrega. Zatim se nastavlja s AV protokolom još 6 tjedana do operativnog zahvata na drugom bubregu. Nakon utvrđivanja lokalnog stadija WT-a (I-III) i histološkog podtipa provodi se adjuvantna kemoterapija i ev. radioterapija kao kod unilateralnog WT-a (58).

Radioterapija se primjenjuje u liječenju WT-a u kojih postoji visoki rizik lokalnog relapsa, plućnih i inkompletno reseciranih jetrenih metastaza koje nisu odgovorile regresijom na neoadjuvantno liječenje te kao palijativna terapija moždanih i koštanih metastaza. Dakle, primjenjuje se u histološki povoljnom WT-u stadija III te histološki nepovoljnom WT-u stadija II. U slučaju rupture tumora i peritonealnog rasapa, što podrazumijeva svrstavanje WT-a u

stadij III, zrači se čitavi trbuh. (56-58).

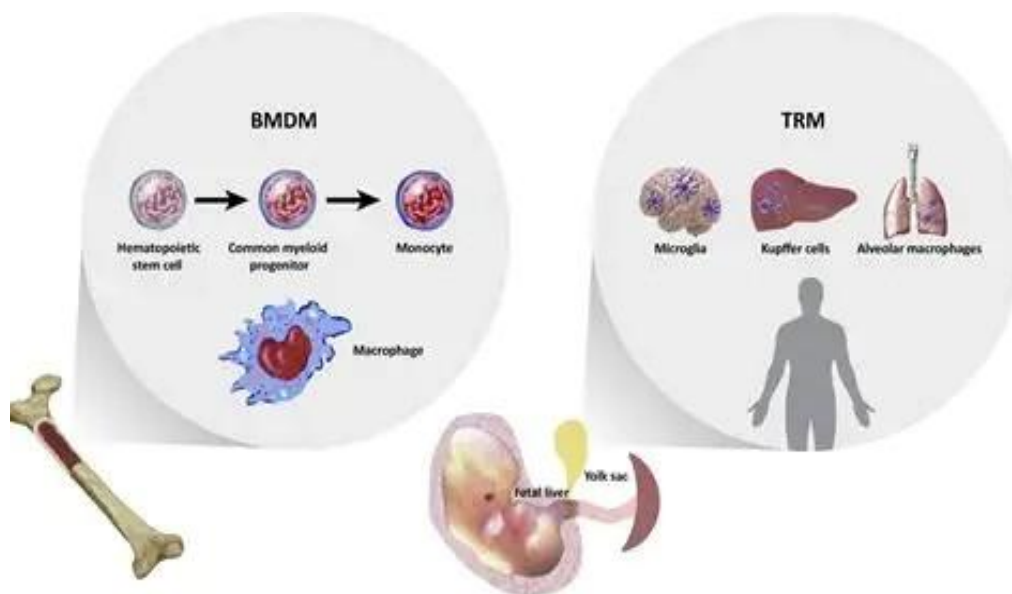
U slučaju relapsa WT-a, ovisno o kemoterapiji primijenjenoj u 1. liniji liječenja, početnom stadiju bolesti i histološkom podtipu tumora, primjenjuju se citostatici koji ranije nisu bili upotrebljavani, n.pr. za skupinu A: doksorubicin, ciklofosfamid, etopozid, karboplatina, za skupinu B: etopozid, karboplatina, ifosfamid ili ciklofosfamid, potom visoke doze melfalana i auto/alogena transplantacija krvotvornih matičnih stanica (ATMS), a za skupinu C kamptotekini (irinotekan, topotekan) ili novi lijekovi, jer se radi o WT-u koji je kemorezistentan na prethodno primijenjene citostatike (58).

1.9. M1 i M2 makrofagi

Solidni tumori su složeni biološki sustavi sastavljeni od malignih stanica i dinamičnog tumorskog mikrokoliša (engl. *Tumor Microenvironment*, TME). Obilježja tumora su: samodostatnost signala rasta, neograničen potencijal umnažanja, neosjetljivost na signale inhibicije rasta, izbjegavanje apoptoze, prateća neoangiogeneza, invazija tkiva i razvoj metastaza te upala koja često prati tumorsko tkivo (59). TME obuhvaća stromalne elemente, novonastale krvne žile, vezivno tkivo i imunološke stanice, među kojima makrofagi povezani s tumorom (engl. *Tumor Associated Macrophages*, TAM) predstavljaju dominantnu populaciju (61-63). Rudolf Virchow je u svom djelu “Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology” iz 1858. godine prvi opisao makrofage u tumorskom tkivu kao najzastupljeniju populaciju leukocita, istodobno ukazujući na važnu ulogu imunološkog sustava u nadzoru tumorskog rasta (60).

Makrofagi nastaju iz mijeloidnih progenitorskih stanica u koštanoj srži i dio su prirođenog (nespecifičnog) imunosnog sustava. Proliferaciju makrofaga potiče čimbenik koji stimulira kolonije makrofaga M-CSF (engl. *Macrophage-Colony-Stimulating Factor*), točnije CSF1 (engl. *Colony-Stimulating Factor 1*) koji pomoću CSFR1 receptora na prekursorskim stanicama koštane srži omogućuje stvaranje i diferencijaciju makrofaga. Njihova osnovna biološka uloga je fagocitoza, kojom uklanjaju mikroorganizme i druge strane tvari iz organizma, čineći 1. liniju obrane tkiva protiv patogenih čimbenika. To su ujedno i antigenprezentirajuće stanice (engl. *Antigen Presenting Cells*, APCs) koje predstavljaju antigene stanicama stečenog (specifičnog) imunosnog sustava, CD4⁺ pomagačkim T limfocitima putem MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*) II molekula. Makrofagi sudjeluju u raznim upalnim procesima i popravku oštećenja, omogućujući homeostazu tkiva (62). Porijeklo TAM-ova je višestruko: jedna vrsta stanica nastaje u koštanoj srži i potom iz cirkulirajućih

Ly6C+CCR2+ monocita, koji se lokalnom aktivacijom u tumorskom tkivu interakcijom $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha L\beta 2$ integrina i VCAM-1 (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) intercelularne adhezijske molekule, diferenciraju putem Notch signalnog puta u TAM-e. Druga vrsta TAM-ova nastaje iz makrofaga prisutnih u tkivu (engl. *Tissue-Resident Macrophages*, TRM) koji potiču iz eritromijelodnih progenitorskih CX3CR1+Kit+ stanica žumanjčane vreće ili jetre embrija i koji se samoobnavljaju u tkivima, neovisno o koštanoj srži, poput makrofaga u plućnim alveolama, peritoneumu, mikrogliji mozga i epidermalnih Langerhansovih stanica (64).



Slika 7. Nastanak i porijeklo makrofaga u ljudskom organizmu. Preuzeto u izvornom obliku iz: Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting tumor-associated macrophages in cancer. *Trends Immunol.* 2019;40(4):310-327. Licenca: CC BY-NC-ND 4.0, izvor: [doi:10.1016/j.it.2019.02.003].

TAM-ovi također mogu nastati diferencijacijom iz nezrelih mijeloidnih-supresorskih stanica MDSC (engl. *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) koje su patološki aktivirane u tumorima i kroničnim upalama. MDSC stvaraju arginazu-1 (Arg-1), dušikov oksid (NO) i reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) te blokiranjem proliferacije T-limfocita suprimiraju T-stanični imuni odgovor stvarajući imunosupresivno mikrookruženje oko tumora (62, 65).

Važno obilježje makrofaga je njihova plastičnost, odnosno sposobnost njihove polarizacije, pri čemu djelovanjem različitih okolišnih čimbenika i njihovih membranskih receptora, nastaje aktivacija različitih unutarstaničnih signalnih puteva i određenih gena. Posljedično nastaju

promjene „osobnosti“ i funkcionalnih svojstava makrofaga, kao što su stanična adhezija i migracija, proizvodnja citokina/kemokina i obrada antigena (65).

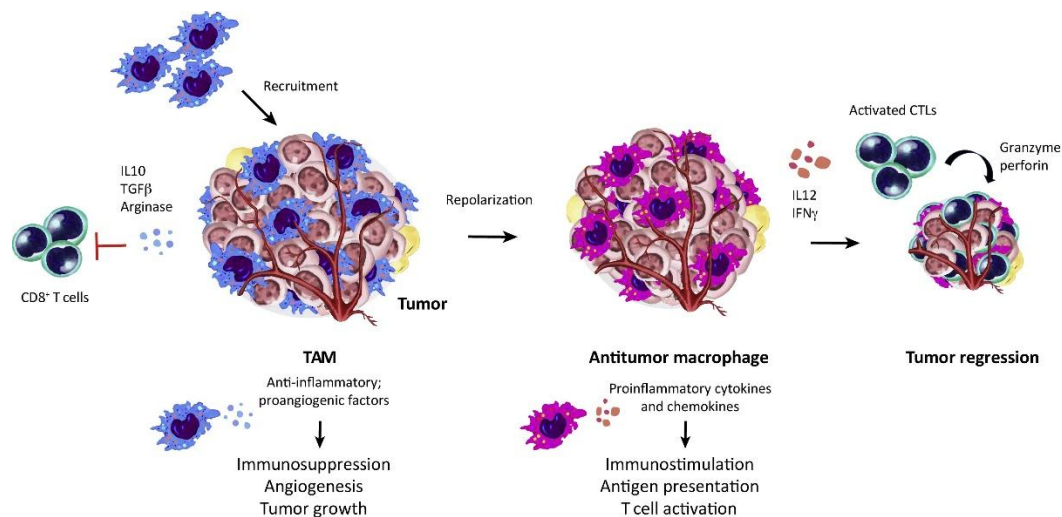
TAM-ove dijelimo na dva glavna podtipa: M1 i M2 makrofage (67). M1 makrofagi nastaju djelovanjem GM-CSF (engl. *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) i uz poticaj Th1 (engl. *T helper 1*) citokina: bakterijskih lipopolisaharida, IFN- γ (engl. *Interferon gama*), TNF- α (engl. *Tumor Necrosis Factor- α*), IL-12 i IL-13. Njihova fenotipska obilježja su izražaj biljega CD16, CD32, CD80 i iNOS (inducibilna sintaza dušikovog oksida). Izlučuju proinflamatorne citokine (IL-1, IL-6, IL-12 i IL-23), aktiviraju NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) oksidazu i iNOS djelujući citotoksično na mikroorganizme i tumorske stanice, zbog čega se smatraju upalnim fenotipom s antitumorskom aktivnošću (66).

Fenotipska obilježja M2 makrofaga su: CD163, CD206 i Arg-1 pozitivnost (67). Na nastanak M2 makrofaga, osim GM-CSF-a, utječu slijedeći Th2 citokini: IL-4 i IL-13 putem aktiviranja transkripcijskog čimbenika STAT6 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*), zatim IL-10 kojeg luče regulatorni T- limfociti (engl. *Treg*) preko aktiviranja STAT3, kao i drugi Th2 citokini i glukokortikoidni hormoni (62, 68).

M2 makrofagi smanjuju proizvodnju NO i upalnih citokina, a povećavaju sintezu Arg-1 i protuupalnih citokina poput TGF- β (engl. *Transforming Growth Factor- β*) i antagonista IL-1 receptora (IL-1RA). Dodatno, lučenjem citokina IL-10, IL-13, TGF- β , CCL2, CCL17, VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) i MMPs (engl. *Matrix Metalloproteinases*) promiču angiogenezu, remodeliranje i popravak tkiva, a suprimiranjem lučenja IFN- γ i posljedično smanjenim stvaranjem CD4⁺ regulatornih T limfocita, potiču proliferaciju maligno alteriranih stanica. Dakle, M2 predstavljaju imunosupresivni tip stanica koji doprinosi progresiji tumora (66, 67, 69).

U ranom stadiju tumorogeneze M1 makrofagi prisutni unutar TME-a predstavljaju prvi imuni odgovor organizma na prisutnost tumorskih stanica. Međutim, fiziološke promjene koje prate razvoj tumora, kao što su hipoksija posredovanjem čimbenika HIF-1 α i HIF-2 α (engl. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α ;2 α*), promjena razine glukoze i pH, mogu rezultirati fenotipskim prebacivanjem na M2 fenotip, koji mehanizmima poticanja kronične upale, imunosupresije, angiogeneze i invazije/metastaziranja promiču razvitak tumora (62). Ranija istraživanja su potvrdila da je povećana infiltracija M2 makrofaga u tumorskom tkivu razmjerna gustoći krvnih žila tumora (59, 66, 69). M2 makrofagi također potiču stromalne stanice na povećano lučenje ekstracelularnog matriksa čime se blokira antitumorsko djelovanje imunološkog sustava i potiče fibroza (64). Indukcija polarizacije makrofaga i njihovih fenotipskih promjena nastaje i zbog tkivno- specifičnih signala u TME-u. Upalni TME potiče gensku nestabilnost i

tumorskih i upalnih stanica. Stanice tumora lučenjem određenih kemokina potiču regrutiranje i infiltraciju makrofaga koji potom lučenjem citokina podržavaju rast i preživljenje tumorskih stanica. Primjerice, stanice tumora lučenjem IL-6 koji djeluje putem NF- κ B (engl. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) potiču stvaranje M2 makrofaga, vlastito preživljenje i angiogenezu (59).

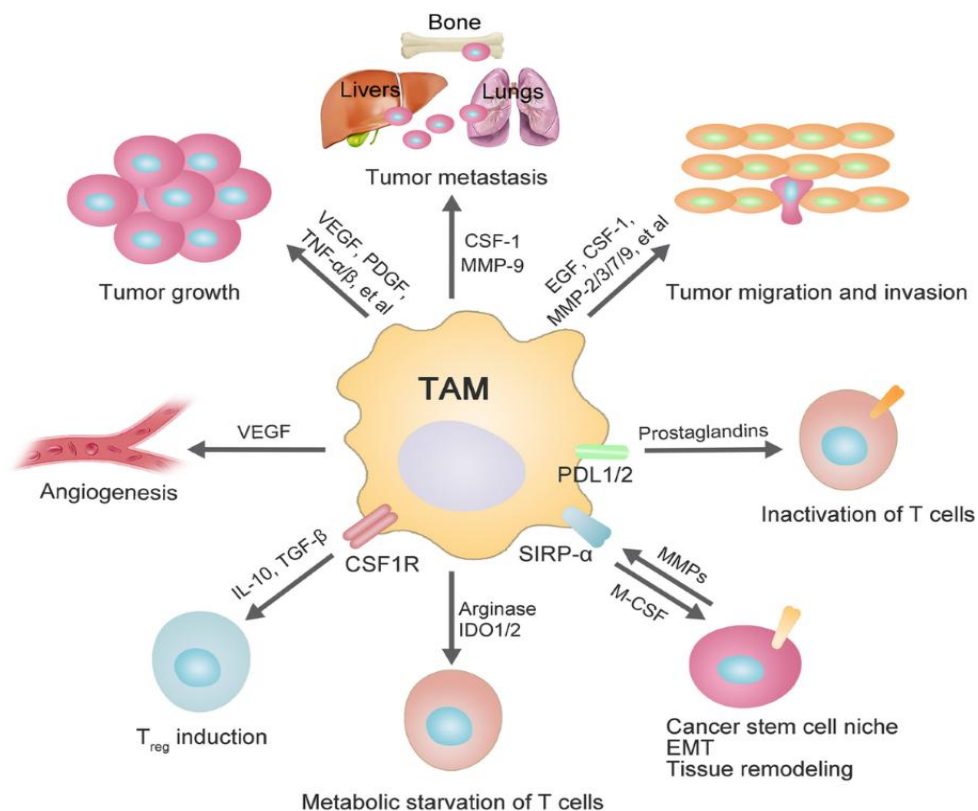


Slika 8. Shematski prikaz polarizacije tumoru-pridruženih makrofaga (TAM-ova) u fenotipove M1 i M2 te njihove uloge u modulaciji upale i tumorigenezi. Preuzeto u izvornom obliku iz: Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting tumor-associated macrophages in cancer. Trends Immunol. 2019;40(4):310-327. Licenca: CC BY-NC-ND 4.0, izvor: [doi:10.1016/j.it.2019.02.003].

Fujieda i sur. su u svom istraživanju potvrdili povećani izražaj IL-10 i PD-ECGF (engl. *Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor*) u uzorcima karcinoma glave i vrata (70). IL-10 je važan imunomodulator koji smanjuje sintezu citokina u Th1 limfocitima uzrokujući smanjenje stanično posredovane citotoksičnosti, tumor-antigen prezentaciju i imunološku anergiju. Specifičnije, IL-10 potiče povećani izražaj programiranog liganda smrti-1 (engl. *Programmed Death-Ligand 1*, PD-L1) na površini monocita i TAM-ova. Vezanjem PD-L1 za receptor PD-1 na aktiviranim efektorskim T-stanicama dolazi do inhibicije njihove funkcije i slabljenja protutumorskog imunološkog odgovora. PD-ECGF je razmjeran razini IL-10, pojačano je izražen u hipoksiji i acidozi te proangiogenom aktivnošću pomaže invazivnosti tumora (70). Kompleksnost uzajamnog zbivanja između tumora i TME-a potvrđuje dokazano autokrino izlučivanje kemokina CXCL12 (engl. *Stromal Cell-Derived Factor-1*) u tumorskom tkivu koji potiče diferencijaciju makrofaga u M2 fenotip (62).

Makrofagi povezani s metastazama (engl. *Metastasis-Associated Macrophages*, MAM) imaju važnu ulogu u invaziji i širenju tumora. Predstavljaju dominantne stanice na mjestu razaranja bazalne membrane tijekom rane tumorigeneze i na invazivnoj fronti tumora tijekom maligne transformacije. Tumorske stanice potiču njihovo stvaranje pojačanom ekspresijom CSF1 (engl. *Colony Stimulating Factor 1*). MAM pomoću svojih proteaza (katepsina, matriks metaloproteinaza MMP2, MMP7 i MMP i serinskih proteaza) potiču razgradnju izvanstaničnog matriksa omogućavajući prolazak tumorskih stanica kroz gustu stromu, a lučenjem epidermalnog čimbenika rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*, EGF) pridonose njihovoj migraciji u susjedne i udaljene organe (59, 69,71). Smatra se da TAM-ovi lučenjem S100A8 i serumskog amiloida A3 mogu regrutirati makrofage u ciljnim organima formirajući premetastatske niše koje doprinose širenju i progresiji tumora što u konačnici narušava antitumorski imunitet i smanjuje odgovor tumora na kemoterapiju, radioterapiju i imunoterapiju (62).

Dominacija M2 makrofaga u TME-u konačno uzrokuje anergiju tj. nesposobnost antitumorske imunosne reakcije zbog oslabljene prezentacije antigena, inhibicije proliferacije T limfocita i nemogućnosti stvaranja specifičnih protutijela te preživljavanje tumorskih stanica, njihovu proliferaciju, invaziju, metastaziranje i kemorezistenciju (59, 66, 69, 71).

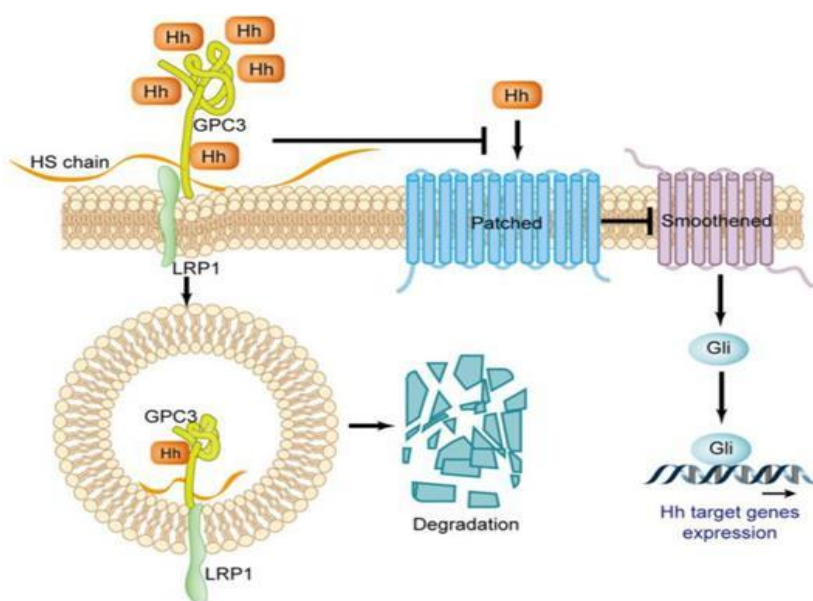


Slika 9. Uloga tumoru-pridruženih makrofaga (TAM-ova) u stvaranju imunosupresivnog tumorskog mikrookruženja, poticanju tumorske progresije, angiogeneze, invazije i metastatskog širenja. Preuzeto u izvornom obliku iz: Chen Y, et al. Tumor-associated macrophages : an accomplice in solid tumor progression. J Biomed Sci. 2019 Oct 20;26(1):78. Licenca: CC BY 4.0, izvor: [doi: 10.1186/s12929-019-0568-z].

Biološka uloga M1 i M2 makrofaga u WT-u, kao i njihov utjecaj na odgovor na liječenje i klinički ishod, još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Do sada, ograničen broj studija je istraživao TAM-ove u WT-u liječenom prema SIOP protokolu, a ta su istraživanja provedena na relativno malim skupinama bolesnika (67, 72).

1.10. Glipikan-3

Glipikani (GPC) predstavljaju obitelj membranskih heparan-sulfat (HS) proteoglikana, građenih od proteinske jezgre i heparan-sulfatnih lanaca, koji su vezani za staničnu membranu pomoću glikozil-fosfatidil-inozitol (GPI) sidra (73).



Slika 10. Prikaz građe glipikana. Preuzeto u izvornom obliku iz: Guo M, et al. Glypican-3: A New Target for Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. J Cancer 2020; 11(8):2008-2021. Licenca: CC BY 4.0, izvor: [doi: 10.7150/jca.39972].

Obitelj glipikana se u sisavaca sastoji od 6 članova koji su svrstani u 2 podskupine: prva sadrži GPC1, GPC2, GPC4 i GPC6, a druga GPC3 i GPC5 (74). Glipikani su dominantno izraženi tijekom embrionalnog razvoja sisavaca pri čemu stimuliranjem ili inhibiranjem

signalnih puteva poput Wnt i Hedgehog, zatim faktora rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*, FGF), IGF-1 i morfogenih bjelančevina kostiju, sudjeluju u proliferaciji i regulaciji rasta, razvoja i diferencijacije pojedinih organa poput mozga, kostiju, bubrega i organa probavnog sustava, dok su u postnatalnim tkivima epigenetički “utišani” metilacijom DNA (75). Mutacije glipikana uzrok su pojedinih nasljednih sindroma.

GPC3 je 65 kD bjelančevina građena od 580 aminokiselina, čija je sinteza kodirana genom lokaliziranim na X (Xq26) kromosomu (76, 77). GPC3 je prvi član obitelji glipikana čija se mutacija i posljedični gubitak funkcije povezuje s nastankom Simpson-Golabi-Behmel (SGB) sindroma, obilježenog pre- i postnatalnim prekomjernim rastom, makrocefalijom, dismorfijom lica, rascjepom nepca, širokim korijenom nosa, polidaktilijom, sindaktilijom, prekobrojnim prsnim bradavicama, cističnim i displastičnim bubrezima, srčanom greškom, sraštanjem kralješaka i rebra te pupčanom i preponskom kilom. Složenost malformacija kod SGB sindroma potvrđuje važnu ulogu GPC3 u morfogenezi brojnih organa (jetre, bubrega, muškog genitalnog sustava, neurona leđne moždine i dorzalnih ganglija) tijekom embrionalnog razvoja, ali na još uvijek nedovoljno utvrđen način (74, 76-78). Oboljeli od SGB sindroma imaju povećani rizik nastanka embrionalnih tumora poput hepatoblastoma, hepatocelularnog karcinoma (HCC), Wilmsova tumora, neuroblastoma i tumora zametnog epitela (“yolk-sac” tumor, koriokarcinom) (79).

Brojna istraživanja su potvrdila pojačan izražaj GPC3 u tkivima i organima zahvaćenim malignom transformacijom, iako je u fiziološkim uvjetima njegov izražaj normalno utišan (77). Izražaj GPC3 u tumorskim stanicama povezan je s poremećajem ključnih signalnih putova, posebice Wnt/ β -katenin i Hedgehog (HH) signalizacije, što pridonosi proliferaciji, preživljenju i invazivnosti tumorskih stanica (75).

Prisutnost GPC3 je prvi put otkrivena u uzorcima tkiva hepatocelularnog karcinoma (HCC) 1997.g, u kojem formiranjem kompleksa “glipikan-Wnt-faktor rasta” posreduje u aktivaciji Wnt signalnog puta i na taj način potiče proliferaciju, diferencijaciju i migraciju tumorskih stanica kao prognostički nepovoljan čimbenik (75, 80). Istraživanja su potvrdila gotovo 100% specifičnost izražaja GPC3 u razlikovanju HCC od drugih tumora jetre, što ga čini korisnim serumskim biljekom HCC-a (77, 81). GPC3 je također pojačano izražen u “yolk sac” germinativnim tumorima testisa i ovarija (približno 100%), značajnije nego AFP (60-92%) i u koriokarcinomu testisa (82%), dok u seminomima, disgerminomima, nezrelim i zrelim teratomima nije izražen, omogućujući diferencijalnu dijagnozu navedenih tumora zametnog epitela (77, 82).

GPC3, nazvan i esencijalnim proteinom nefrogenoze, ima važnu ulogu u morfogenezi i razvoju bubrega. Njegov izražaj u fetalnom bubregu iznosi 100%, posebice u mokraćovodnom pupoljku i sustavu sabirnih kanalića, ovisno o stadiju nefrogenoze. Istraživanja na genetičkom modelu miševa utvrdila su kako GPC3 genetičkim moduliranjem BMP2-Smad signalnog puta inhibira proliferaciju i grananje stanica mokraćovodnog pupoljka (83). Stoga njegova inaktivacija uzrokovana mutacijom gena uzrokuje povećanu proliferaciju stanica mokraćovodnog pupoljka, cističnu degeneraciju sabirnih kanalića, apoptozu stanica sabirnih kanalića medule bubrega i medularnu cističnu displaziju bubrega (78). Suprotno, mutacija gena koja uzrokuje prekomjerni izražaj GPC3 potiče nekontrolirani rast stanica WT-a putem IGF-2 i Wnt/ β -katenin signalnog puta (74). Istraživanja su potvrdila pojačan izražaj GPC3 u primarnom WT-u (77%) i u metastaskom WT-u (93%), većinom u epitelnoj komponenti te u blastemskom i prognostički nepovoljnom ("unfavourable") tipu WT-a (78, 79).

Uloga GPC3 u tumorigenezi WT-a ostaje nedovoljno razjašnjena. White i sur. su identificirali somatske točkaste mutacije gena GPC3 u 2 od 41 slučaja sporadičnih WT-a, koje bi mogle biti povezane s inicijacijom, razvojem i/ili progresijom pojedinih WT-a (84). Istraživanje u kojem su analizirane promjene metilacije gena GPC3 u embrionalnim tumorima s ciljem procjene epigenetske regulacije njegovog izražaja, pokazalo je da metilacija promotora GPC3 ne objašnjava u potpunosti regulaciju izražaja ovog gena u embrionalnim tumorima, pa ni u WT-u. U normalnim tkivima metilacija promotora GPC3 pokazuje spolno uvjetovane razlike, osobito kod X-vezanih gena, no ne predstavlja ključni mehanizam utišavanja GPC3. U tumorskim tkivima prisutne su promjene metilacijskog obrasca (gubitak u neuroblastomu, pojačanje u WT), ali bez značajne povezanosti s izražajem GPC3 (85). Gillian i sur. su proučavali prisutnost somatskih mutacija gena GPC3 u 64 uzorka prethodno neliječenih WT-a, isključujući slučajeve povezane sa sindromima poput SGBS. Rezultati su pokazali da je samo u jednom slučaju bila prisutna tumor-specifična delecija cijelog gena GPC3, dok su u dva slučaja identificirani polimorfizmi bez potvrde funkcionalno značajnih mutacija (86). Povećani izražaj GPC3 utvrđen je u 29 od 36 analiziranih WT uzoraka te se dovodi u vezu sa stupnjem diferencijacije tumorskih stanica i različitim udjelom epitelne, blastemske i stromalne komponente, koje pokazuju različit obrazac izražaja GPC3. Autori zaključuju da disfunkcija GPC3 u WT-u nije izravno povezana s inicijacijom tumorigeneze, ali bi mogla na još nerazjašnjen način doprinositi razvoju pojedinih sporadičnih oblika WT-a (86). Sukladno tome, GPC3 bi mogao predstavljati potencijalni biljeg za precizniju stratifikaciju bolesnika s WT-om

te odabir intenzivnijeg terapijskog pristupa, uz mogućnost primjene ciljane (engl. *target*) terapije.

Mali je broj istraživanja istodobnog prisustva makrofaga u mikrookolišu tumora i izražaja GPC3 u tumorskom tkivu te njihove uloge u nastanku i progresiji tumora.

Takai i sur. su prvi u svojoj studiji na ksenograftnim modelima imunohistokemijskom metodom utvrdili povezanost povećanog izražaja GPC3 na membrani stanica HCC-a s povećanom prisutnošću CD68+ makrofaga u tkivu tumora, pri čemu GPC3 vjerojatno potiče infiltraciju makrofaga, a udruženi promiču remodeliranje tkiva i angiogenezu, važne za rast i razvoj tumora (87).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Primarna hipoteza:

U Wilmsovu tumoru nakon neoadjuvantne kemoterapije sastav tumorskog mikrookoliša obilježen je prevladavanjem M2 makrofaga, dok omjer M1/M2 makrofaga i izražaj glipikana-3 (GPC3) koreliraju s patohistološkim i kliničkim obilježjima tumora te mogu predstavljati potencijalne prognostičke biljege i pokazatelje biološkog ponašanja tumora.

Sekundarne hipoteze:

1. Broj M1 i M2 makrofaga te omjer M1/M2 razlikuju se između histoloških prognostičkih skupina i rizičnih skupina Wilmsova tumora.
2. Veća infiltracija M2 makrofaga povezana je s nepovoljnijim patohistološkim i kliničkim obilježjima tumora (veći volumen tumora, uznapredovali stadij, nepovoljniji histološki podtip i promijenjeni laboratorijski parametri).
3. Izražaj glipikana-3 (GPC3) povezan je s određenim patohistološkim i kliničkim obilježjima Wilmsova tumora te može odražavati biološku aktivnost tumora.
4. Postoji povezanost između polarizacije makrofaga (M1 i M2) i izražaja glipikana-3 u Wilmsovu tumoru, što upućuje na moguću interakciju između tumorskog mikrookoliša i signalnih molekula uključenih u rast i progresiju tumora.

Ciljevi istraživanja:

1. Odrediti ukupan broj M1 i M2 makrofaga te omjer M1/M2 u tumoru i to zasebno za svaku histološku prognostičku skupinu tumora (povoljna i nepovoljna histološka skupina) te rizičnu skupinu tumora.
2. Istražiti korelaciju broja M1 i M2 makrofaga te omjera M1/M2 s patohistološkim parametrima (volumen i fokalnost tumora, te prisutnost nekroze), demografskim (spol i dob), kliničkim (stadij tumora) i laboratorijskim parametrima (vrijednosti ureje i kreatinina, laktat-dehidrogenaze (LDH), feritina, NSE, AFP).
3. Odrediti imunohistokemijski izražaj GPC3 u tumoru zasebno za svaku histološku prognostičku skupinu tumora (povoljna i nepovoljna histološka skupina) te rizičnu skupinu tumora.

4. Istražiti korelaciju imunohistokemijskog izražaja GPC3 s patohistološkim parametrima (volumen i fokalnost tumora, te prisutnost nekroze), demografskim (spol i dob), kliničkim (stadij tumora) i laboratorijskim parametrima (vrijednosti ureje i kreatinina, LDH, feritina, NSE, AFP).

5. Istražiti korelaciju broja M1 i M2 makrofaga te omjera M1/M2 i imunohistokemijskog izražaja GPC3 u Wilmsovu tumoru s obzirom na histološku prognostičku skupinu tumora te rizičnu skupinu tumora.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U retrospektivno kohortno istraživanje su bili uključeni bolesnici s Wilmsovim tumorom koji su liječeni u KBC-u Split i Klinici za dječje bolesti Zagreb u razdoblju od 1. siječnja 2000. do 31. prosinca 2017. godine.

Kriteriji za uključenje u studiju su bili:

1. Bolesnici mlađi od 18. godina s histološki potvrđenom dijagnozom Wilmsova tumora
2. Bolesnici liječeni neoadjuvantnom kemoterapijom i nefrektomijom prema SIOP (engl. *International Society of Pediatric Oncology*) protokolu
3. Dostupnost potpunih kliničkih podataka i redovito petogodišnje onkološko praćenje
4. Dostupnost patohistoloških podataka i parafinskih blokova tumorskog tkiva

Kriteriji isključenja su bili:

1. Druga vrsta tumora bubrega
2. Primarno operirani Wilmsovi tumori
3. Nepotpuno kliničko praćenje
4. Nedostupnost patohistoloških podataka ili parafinskih blokova tumorskog tkiva

Nakon provedenog onkološkog i kirurškog liječenja bolesnici su redovito praćeni prema SIOP protokolu, od datuma postavljanja dijagnoze do kraja petogodišnjeg praćenja, uključujući uvid u povijest bolesti, datum postavljanja dijagnoze, datum operacije, patohistološki nalaz, terapijski protokol, datum posljednje kontrole ili smrtnog ishoda.

Izračun potrebne veličine uzorka proveden je uporabom programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2>.

Za izračun smo koristili podatke dobivene analizom ukupnog broja makrofaga iz pilot pokusa na 10 uzoraka, sa sljedećim parametrima: $\mu_1=120$, $\mu_2=300$, $\sigma=150$, $\text{power}=80\%$, $p=0.05$, za što je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka po skupini $n=11$.

3.2. Postupci i materijali

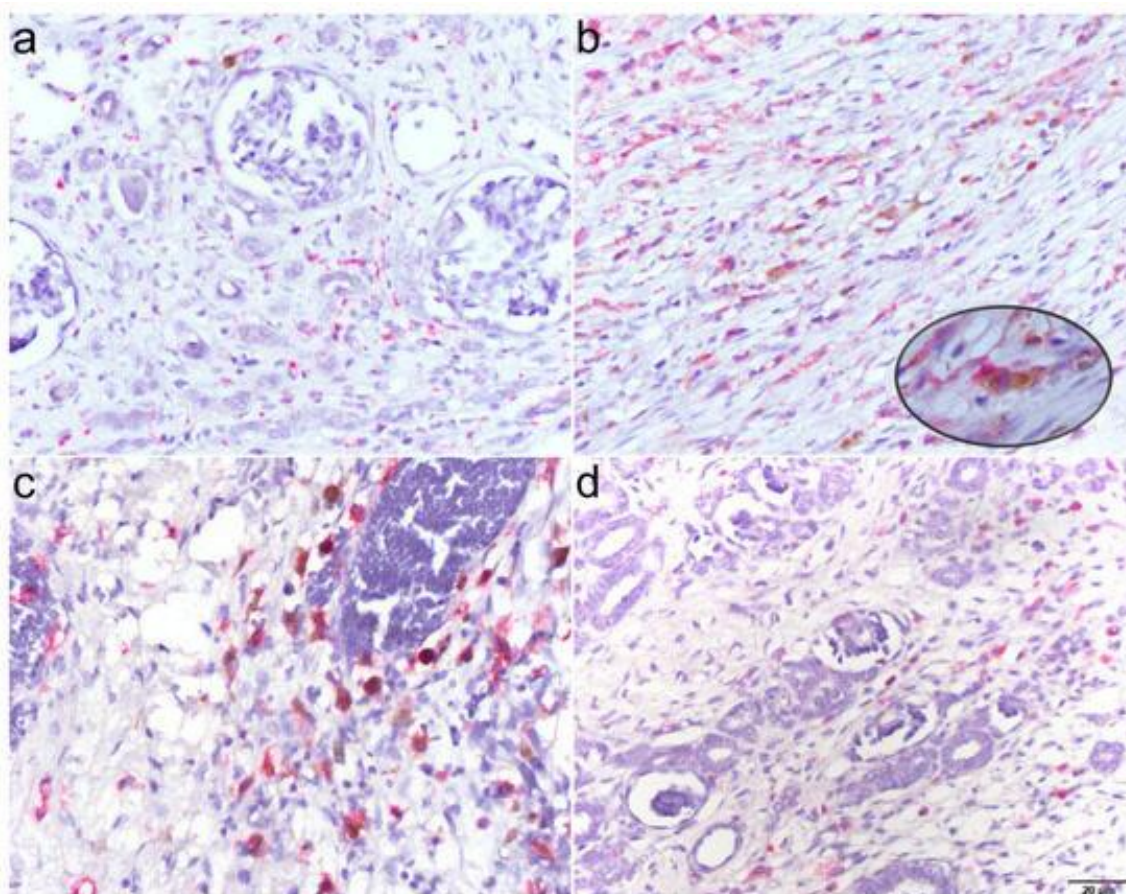
Uzorci tumorskog tkiva, operativno uklonjeni nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije, su u obliku parafinskih blokova prikupljeni iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, Kliničkog zavoda za patologiju i

citologiju Ljudevit Jurak KBC-a Sestre milosrdnice i Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Histološke preparate tkiva tumora obojene hemalaun-eozinom, potom dvostruko imunohistokemijski obilježene uporabom protutijela za CD80, CD163 i GPC3 antigen je ponovno pregledao patolog. Za mikroskopsku analizu preparata koristio se mikroskop marke Olympus BX41. Mikroskopskim pregledom utvrđen je: histološki tip tumora, postotni udio nekroze, blastemske, epitelne i anaplastične komponente, kvantitativni izražaj M1, M2 makrofaga te GPC3. Ostali podaci su prikupljeni iz papirnate arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak KBC Sestre milosrdnice, Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavoda za dječju hematologiju i onkologiju Klinike za dječje bolesti KBC-a Split i Zavoda za onkologiju i hematologiju Klinike za dječje bolesti Zagreb.

3.3. Imunohistokemijska analiza

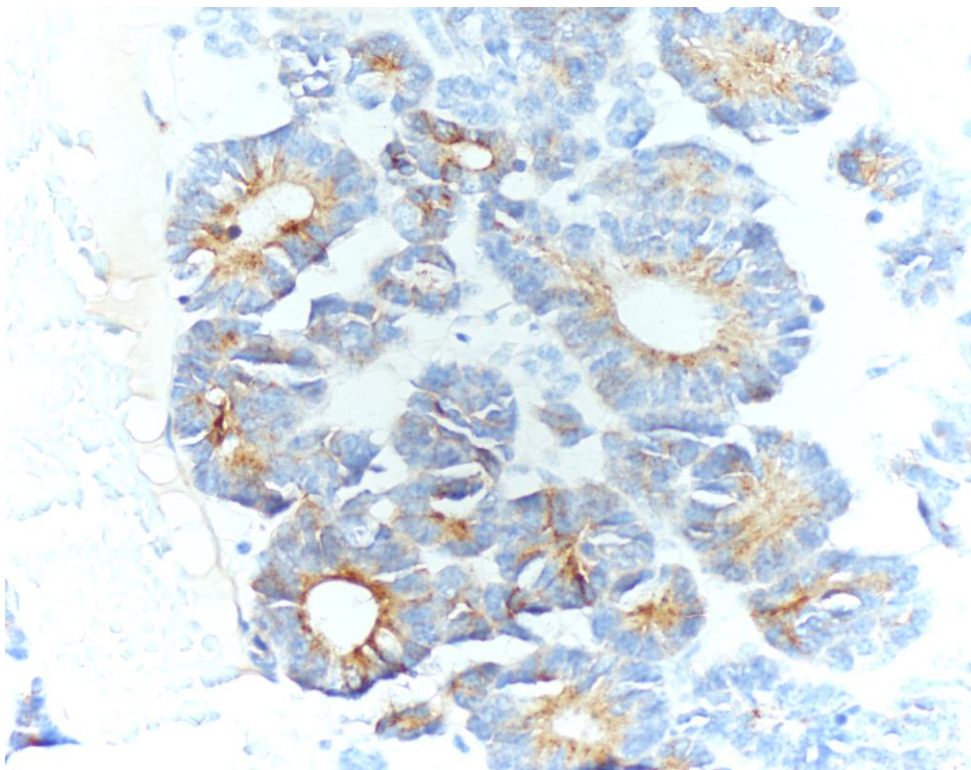
Dvostruko imunohistokemijsko bojenje provedeno je uporabom kompleta UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit i UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, SAD). Reprezentativni presjeci tumorskog tkiva obrađeni su na automatiziranoj platformi za bojenje (Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module; Ventana Roche, Tucson, AZ, SAD) u skladu s uputama proizvođača.

Za razlikovanje subpopulacija makrofaga rabljeno je kunićje anti-CD80 (Abcam; razrjeđenje 1:1000) i mišje anti-CD163 protutijelo spremno za uporabu (Ventana Medical Systems) za identifikaciju M1, odnosno M2 makrofaga. Smeđe citoplazmatsko bojenje (DAB) smatralo se pokazateljem CD80-pozitivnih M1 makrofaga, dok je crveno citoplazmatsko bojenje (alkalna fosfataza) smatrano pozitivnim za M2 makrofage koji izražavaju CD163 (Slika 13).

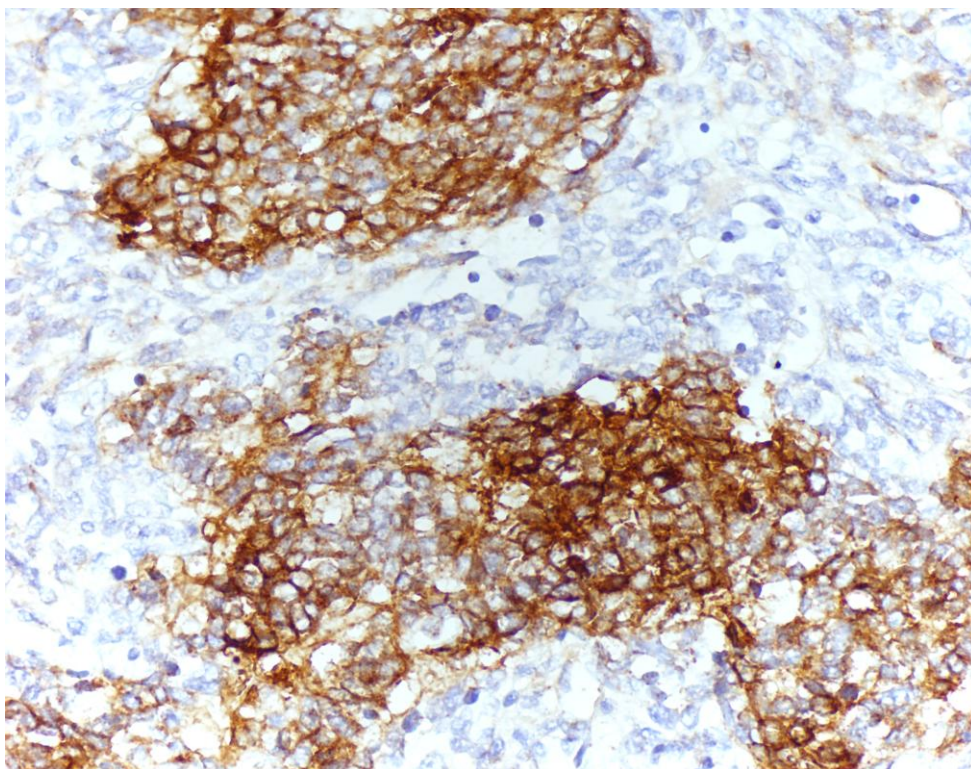


Slika 11. Histološke slike koje prikazuju raspodjelu makrofaga M1 i M2 u normalnom bubrežnom tkivu i uzorcima Wilmsova tumora. Dvostruko imunohistokemijsko bojenje rabljeno je za označavanje CD80-pozitivnih (smeđih) M1 makrofaga i CD163-pozitivnih (crvenih) M2 makrofaga. Niska gustoća M1 i M2 makrofaga uočena je u normalnom bubrežnom tkivu (**a**), dok je visoka gustoća bila prisutna u područjima regresije tumora. Umetak: CD80-pozitivni (smeđi) M1 makrofagi i CD163-pozitivni (crveni) M2 makrofagi (povećanje 400×) (**b**). M1 i M2 makrofagi su bili prisutni u stromi tumora, kao i u blastemskim (**c**) i epitelnim komponentama (**d**). Općenito, M2 makrofagi su bili zastupljeniji u tumorskom mikrookolišu u usporedbi s M1 makrofagima. Sve slike snimljene su pri ukupnom povećanju od 200×.

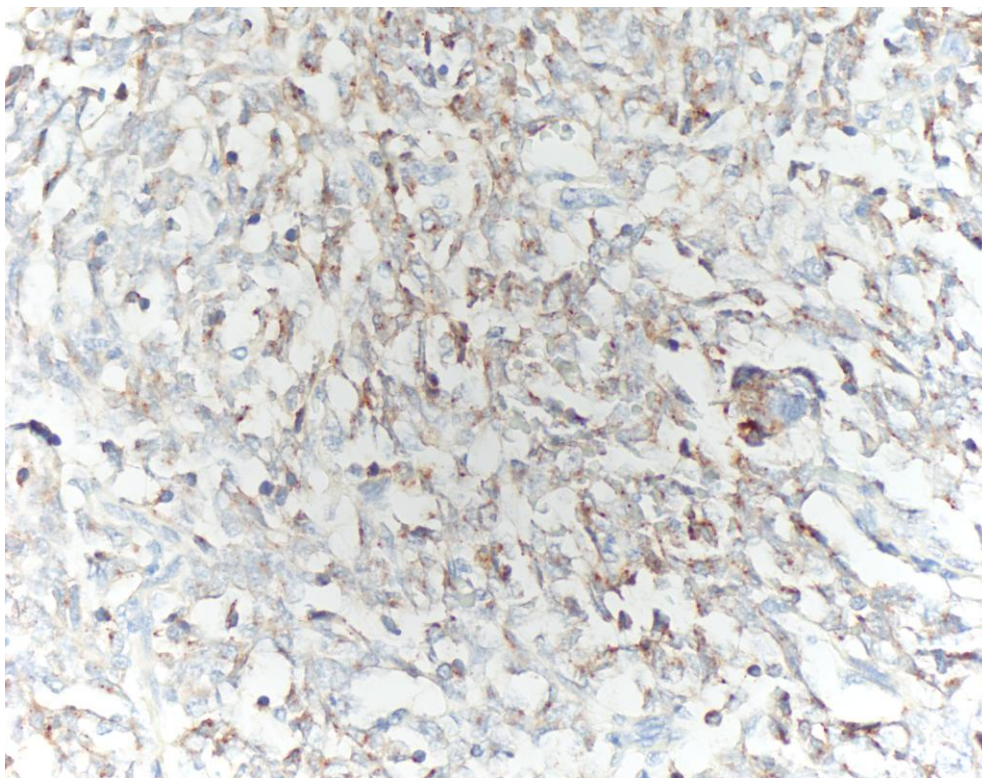
Za procjenu imunohistokemijskog izražaja GPC3 rabljeno je primarno mišje monoklonoalno protutijelo anti-Glypican 3 (GC33, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, SAD). Pozitivnim obojenjem smatrano je smeđe citoplazmatsko i/ili membransko obojenje tumorskih stanica.



Slika 12: pozitivno membransko i citoplazmatsko obojenje u epitelnoj komponenti tumora, povećanje 400x.



Slika 13: pozitivno membransko i citoplazmatsko obojenje u blastemskoj komponenti tumora, povećanje 400x



Slika 14: pozitivno membransko i citoplazmatsko obojenje u stromalnoj komponenti tumora, povećanje 400x.

Tumoru pridruženi makrofagi (TAM-ovi) u uzorcima Wilmsova tumora kvantificirani su prebrojavanjem CD80-pozitivnih (M1) i CD163-pozitivnih (M2) makrofaga. Za svaki uzorak pozitivno obojene stanice su brojane unutar standardiziranog područja od 1 mm², koristeći vidna polja pri velikom povećanju (ukupno povećanje 400×). Za analizu su odabrana područja s najvećom gustoćom makrofaga, dok su nekrotična područja isključena. Izračunati su apsolutni brojevi M1 i M2 makrofaga, kao i omjer M1/M2 te su uključeni u daljnje statističke analize. Kako bi se procijenila povezanost između gustoće TAM-ova i kliničkih ili patohistoloških parametara, tumorski uzorci klasificirani su kao pozitivni ili negativni na infiltraciju M1 i M2 TAM-ova primjenom pristupa temeljenog na graničnoj vrijednosti, kako su prethodno opisali Tian i sur. (67). Ukratko, izračunate su medijanske vrijednosti broja M1 i M2 TAM-ova u svim uzorcima te su korištene kao granične vrijednosti. Uzorci s brojem TAM-ova ispod medijana klasificirani su kao negativni, dok su oni s brojem jednakim ili većim od medijana klasificirani kao pozitivni za odgovarajući podtip makrofaga. Ista strategija klasifikacije primijenjena je neovisno za M1 i M2 TAM-ove.

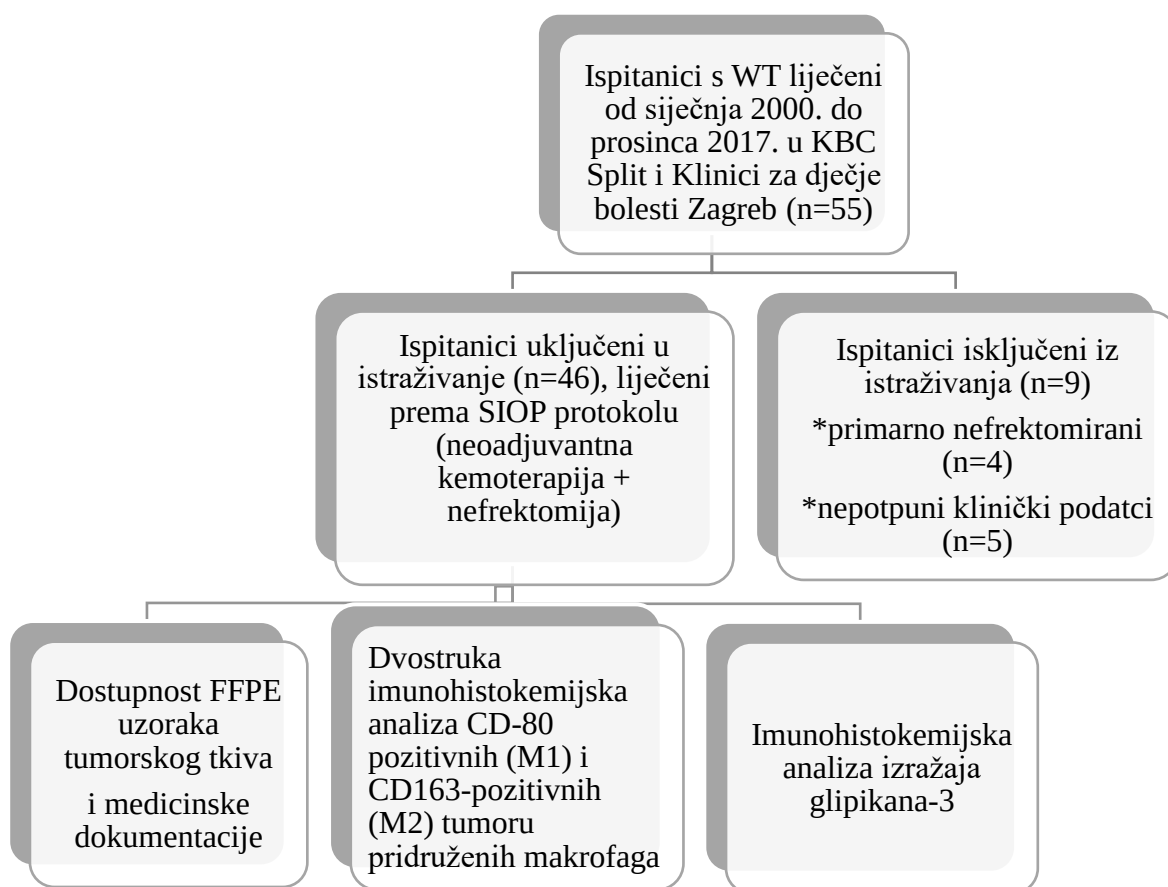
Uzorci Wilmsova tumora su smatrani GPC3 pozitivni ako je barem 10% tumorskih stanica bilo pozitivno na membransko i/ili citoplazmatsko bojenje, neovisno o intenzitetu

bojenja. Intenzitet GPC3 bojenja za GPC3 pozitivne uzorke je označen kao 1+ (slabo), 2+ (umjereno) i 3+ (jako) prema intenzitetu bojenja većine pozitivnih stanica. Ukoliko su citoplazmatsko i membransko bojenje različitog procijenjenog intenziteta, kao intenzitet bojenja tumora je uzeta veća vrijednost (78, 82).

3.4. Statističke analize

Sve statističke analize provedene su uporabom softvera GraphPad Prism (verzija 9.0.0; GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Kontinuirane varijable prikazane su kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija (SD). Raspodjela podataka procijenjena je Shapiro–Wilkovim testom. Mann–Whitneyjev U-test primijenjen je za procjenu razlika u ukupnom broju tumoru-pridruženih makrofaga (TAM) i omjerima M1/M2 te za izražaj GPC3 između skupina bolesnika stratificiranih prema kliničko-patološkim obilježjima. Povezanosti između kategorijskih varijabli analizirane su Pearsonovim χ^2 testom. Vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

3.5. Hodogram istraživanja



4. REZULTATI

4.1. Karakteristike bolesnika i obilježja tumora

U završnu analizu uključeno je ukupno 46 pedijatrijskih bolesnika nakon primjene kriterija uključenja i isključenja. Kliničke karakteristike i laboratorijski nalazi su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Kliničke značajke i laboratorijski nalazi ispitivane kohorte (n = 46)

Varijabla	Udio po kategorijama
Dob (mjeseci)	<24: 13 (28,3%); ≥24: 33 (71,7%)
Spol	Muški: 19 (41,3%); Ženski: 27 (58,7%)
Klinička prezentacija*	Palpabilna masa: 15 (32,6%); Hematurija: 2 (4,3%); Abdominalna bol: 1 (2,2%)
Lateralnost tumora	Desno: 17 (37,0%); Lijevo: 21 (45,7%); Bilateralno: 8 (17,4%)
Ureja (mmol/L)	Normalna: 31 (67,4%); Snižena: 15 (32,6%)
Kreatinin (μmol/L)	Normalan: 37 (80,4%); Povišen: 9 (19,6%)
LDH (U/L)	Normalan: 12 (26,1%); Povišen: 26 (56,5%); Nije određen: 8 (17,4%)
Feritin (ng/mL)	Normalan: 20 (43,5%); Povišen: 14 (30,4%); Nije određen: 12 (26,1%)
Analiza urina	Normalna: 35 (76,1%); Patološki: 11 (23,9%)
NSE (ng/mL)	Normalan: 20 (43,5%); Povišen: 15 (32,6%); Nije određen: 11 (23,9%)
AFP (ng/mL)	Normalan: 20 (43,5%); Povišen: 6 (13,0%); Nije određen: 20 (43,5%)

*Neki pacijenti su imali više od jednog simptoma, stoga zbroj postotaka ne iznosi 100%

Pokrate: LDH, laktat dehidrogenaza; NSE, neuron-specifična enolaza; AFP, alfa-fetoprotein

Medijan dobi u trenutku postavljanja dijagnoze iznosio je 36,5 mjeseci (interkvartilni raspon 15,75–54,75 mjeseci). Devetnaest bolesnika je bilo muškog spola (41,3%), metastatska bolest je bila prisutna u 11 bolesnika (23,9%), dok su kongenitalne anomalije utvrđene u 8 bolesnika (17,4%). Svi bolesnici liječeni su neoadjuvantnom kemoterapijom prema protokolu SIOP–RTSG. Protokol SIOP 2001 primijenjen je u 37 bolesnika (80,4%), dok je 9 bolesnika (19,6%) liječeno prema protokolu SIOP 2014. Srednji volumen tumora prije provedbe neoadjuvantne kemoterapije iznosio je $333,66 \pm 286,89$ mL. Tumori volumena manjeg od 500 mL činili su 76,1% slučajeva, dok je 23,9% tumora imalo volumen ≥ 500 mL. Većina tumora bila je unifokalna (89,1%) te je nakon patohistološke analize klasificirana kao stadij I (65,2%). Nekroza koja je zahvaćala manje od 60% tumorske mase zabilježena je u 35 tumora (76,1%), dok su tri tumora (6,5%) klasificirana kao WT niskog rizika s više od 90% tumorske nekroze. Najčešći histološki podtip bio je miješani (45,7%), slijede regresivni (17,4%), blastemski (15,2%), epitelni (10,9%) i stromalni (8,7%) podtip. Difuzna anaplazija utvrđena je u jednom tumoru. Ukupno su 34 bolesnika (73,9%) klasificirana u skupinu srednjeg rizika, dok je 9

bolesnika (19,6%) svrstano u skupinu visokog rizika. Tumor koji je početno klasificiran kao niskorizični bio je bilateralan; a kako je kontralateralni tumor pokazivao blastemski obrazac, sukladno tome, reklasificiran je u visokorizičnu skupinu.

4.2. Preživljenje i prognostički čimbenici

Petogodišnje ukupno preživljenje (engl. *Overall Survival*, OS) i preživljenje bez progresije bolesti (engl. *Event Free Survival*, EFS) iznosili su po 94,5%, što je usporedivo s objavljenim podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO), uz blago nižu stopu mortaliteta. Tri bolesnika preminula su od WT-a: dvoje sa stadijem III bolesti i jedan sa stadijem V bolesti. Dvoje od tih bolesnika imalo je tumor volumena ≥ 500 mL, dok je jedan imao tumor volumena < 500 mL. Histološki su dva tumora bila blastemska, a jedan anaplastičan. Dvoje bolesnika je preminulo nakon relapsa WT-a s plućnim metastazama, dok je jedan bolesnik preminuo zbog diseminirane metastatske bolesti za zahvaćenim plućima, jetrom i kostima. Zbog ograničenog broja ispitanika s progresijom bolesti provedba analize preživljenja nije bila moguća. Umjesto toga, poznati prognostički čimbenici, uključujući dob u trenutku dijagnoze, stadij tumora, volumen tumora, rizična skupina i histološki podtip, upotrijebljeni su kao surogatni pokazatelji prognoze. Nisu utvrđene značajne povezanosti između dobi bolesnika ili volumena tumora i razine serumskih tumorskih biljega. Uznapredovali stadij tumora bio je značajno povezan s povišenim razinama LDH ($\chi^2 = 8,095$; $p = 0,004$) te povišenim razinama kreatinina ($\chi^2 = 5,014$; $p = 0,025$). Nepovoljna histologija bila je povezana sa sniženim razinama serumske ureje ($\chi^2 = 3,937$; $p = 0,047$).

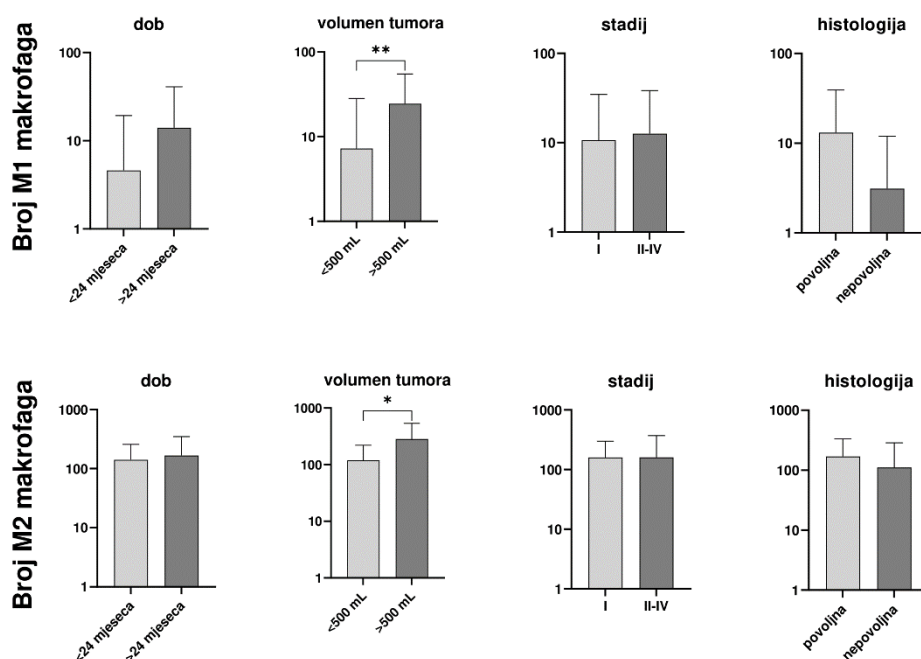
4.3. Infiltracija makrofaga povezanih s tumorom

Analiza ukupnog broja makrofaga povezanih s tumorom (engl. *tumor-associated macrophages*, TAM) pokazala je statistički značajno veći broj TAM-ova u tumorima volumena ≥ 500 mL ($p = 0,033$) te u unifokalnim tumorima ($p = 0,012$) (Tablica 4). Za ostale analizirane kliničko-patološke varijable nisu utvrđene statistički značajne razlike u ukupnom broju TAM-ova (Tablice 5, 6 i 7) (Slika 15).

Tablica 5. Povezanost patohistoloških čimbenika s ukupnim brojem tumoru-pridruženih makrofaga (TAM) i omjerom M1/M2 makrofaga

Patohistološki čimbenik	Kategorija (n)	Ukupni broj TAM (aritmetička sredina ± SD)	P	Omjer M1/M2 (aritmetička sredina ± SD)	P
Volumen tumora	<500 mL (35)	127,0 ± 107,8	0,033	0,048 ± 0,130	0,020
	≥500 mL (11)	308,7 ± 275,9		0,078 ± 0,085	
Fokalnost tumora	Unifokalan (41)	185,8 ± 183,0	0,012	0,062 ± 0,126	0,230
	Multifokalan (5)	44,8 ± 33,5		0	
Udio nekroze tumora	<60% (35)	171,9 ± 198,3	0,376	0,042 ± 0,112	0,152
	≥60% (11)	166,0 ± 97,2		0,099 ± 0,141	
Histologija tumora	Povoljna (38)	182,3 ± 177,6	0,086	0,066 ± 0,130	0,201
	Nepovoljna (8)	114,1 ± 182,9		0,006 ± 0,016	
Skupina rizika	Intermedijarni (34)	175,2 ± 184,3	0,271	0,050 ± 0,117	0,669
	Visoki (9)	133,3 ± 180,5		0,021 ± 0,048	

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD). P-vrijednost je izračunata uporabom Mann–Whitney U testa. Statistički značajna P-vrijednost (<0,05)



Slika 15. Grafovi prikazuju ukupan broj M1 i M2 tumoru-pridruženih makrofaga u uzorcima Wilmsova tumora, razvrstanim prema poznatim prognostičkim čimbenicima (dob bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze, volumen tumora, stadij tumora i histološki tip tumora). Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (okomita crta) te su analizirani Mann–Whitneyjevim U-testom. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$.

Tablica 6. Povezanost demografskih i kliničkih značajki s ukupnim brojem tumoru-pridruženih makrofaga (TAM) i omjerom M1/M2 makrofaga

Klinički pokazatelj	Kategorija (n)	Ukupni broj TAMova (aritmetička sredina $\pm$ P SD)	Omjer (aritmetička sredina $\pm$ SD)	M1/M2 (aritmetička sredina P)
Dob	<24 mjeseca (13)	145,3 $\pm$ 121,6	0,750	0,020 $\pm$ 0,062
	$\geq$ 24 mjeseca (33)	180,4 $\pm$ 197,1	0,069 $\pm$ 0,135	0,170
Spol	Muški (19)	202,9 $\pm$ 227,7	0,577	0,067 $\pm$ 0,144
	Ženski (27)	147,6 $\pm$ 133,7	0,047 $\pm$ 0,103	0,878
Stadij tumora	I (30)	169,5 $\pm$ 147,0	0,289	0,054 $\pm$ 0,125
	II–IV (16)	172,2 $\pm$ 231,8	0,058 $\pm$ 0,116	0,552
Metastaze	Da (11)	233,8 $\pm$ 258,6	0,426	0,045 $\pm$ 0,068
	Ne (35)	150,5 $\pm$ 144,0	0,059 $\pm$ 0,133	0,391
Kongenitalne anomalije	Da (8)	137,0 $\pm$ 111,8	0,782	0,025 $\pm$ 0,052
	Ne (38)	177,5 $\pm$ 189,9	0,062 $\pm$ 0,130	0,685
Kemoterapijski protokol	SIOP 2001 (37)	156,6 $\pm$ 153,7	0,474	0,055 $\pm$ 0,128
	SIOP 2014 (9)	227,2 $\pm$ 261,2	0,055 $\pm$ 0,086	0,801
Podatci su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija (SD). P-vrijednosti su izračunate uporabom Mann–Whitney U testa. Statistički značajna P-vrijednost (<0,05)				

Tablica 7. Povezanost laboratorijskih nalaza s ukupnim brojem tumoru-pridruženih makrofaga (TAM) i omjerom M1/M2 makrofaga

Laboratorijski nalaz	Kategorija (n)	UkupniTAMovi (mean ± SD)	P	Omjer M1/M2 (mean ± SD)	P
LDH	Normalan (12)	152,9 ± 179,1	0,659	0,036 ± 0,118	0,254
	Povišen (26)	183,7 ± 196,8		0,077 ± 0,137	
Feritin	Normalan (20)	156,8 ± 132,5	0,736	0,067 ± 0,145	0,653
	Povišen (14)	171,8 ± 188,2		0,069 ± 0,130	
NSE	Normalan (20)	143,2 ± 175,3	0,156	0,024 ± 0,092	0,027
	Povišen (15)	220,0 ± 215,3		0,124 ± 0,164	
AFP	Normalan (20)	178,9 ± 187,1	0,941	0,063 ± 0,140	0,708
	Povišen (6)	123,3 ± 96,8		0,114 ± 0,186	
Urea	Normalna (31)	147,0 ± 137,2	0,590	0,065 ± 0,139	0,690
	Snižena (15)	219,0 ± 241,3		0,036 ± 0,070	
Kreatinin	Normalan (37)	173,1 ± 192,2	0,698	0,035 ± 0,091	0,008
	Povišen (9)	159,6 ± 112,4		0,138 ± 0,187	
Analiza urina	Normalan (35)	173,5 ± 196,9	0,404	0,044 ± 0,107	0,468
	Patološki (11)	160,7 ± 105,9		0,091 ± 0,155	
Podatci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD). P-vrijednost je izračunata uporabom Mann–Whitney U testa. Statistički značajna P-vrijednost (<0,05)					

Analizom M1 i M2 makrofaga zasebno utvrđeno je da tumori volumena ≥ 500 mL imaju statistički značajno veći broj M1 makrofaga ($p = 0,006$) i M2 makrofaga ($p = 0,084$) (Tablica 5). Nisu utvrđene statistički značajne razlike s obzirom na dob u trenutku postavljanja dijagnoze, stadij tumora niti histološki podtip (Tablice 8, 9 i 10).

Tablica 8. Povezanost patohistoloških čimbenika s prisutnošću M1 i M2 tumoru-pridruženih makrofaga (TAM)

Čimbenik	Kategorija (n)	M1 TAMovi n(%)	P	M2 TAMovi n(%)	P
Volumen tumora	<500 mL (35)	7 (20,0)	0,006	15 (42,9)	0,084
	≥500 mL (11)	7 (63,6)		8 (72,7)	
Fokalnost tumora	Unifokalan (41)	14 (34,1)	0,117	23 (56,1)	0,018
	Multifokalan (5)	0 (0)		0 (0)	
Udio nekroze tumora	<60% (35)	9 (25,7)	0,215	16 (45,7)	0,299
	≥60% (11)	5 (45,5)		7 (63,6)	
Histologija tumora	Povoljna (38)	13 (34,2)	0,225	21 (55,3)	0,120
	Nepovoljna (8)	1 (12,5)		2 (25,0)	
Skupina rizika	Intermedijarni (34)	10 (29,4)	0,669	18 (52,9)	0,295
	Visoki (9)	2 (22,2)		3 (33,3)	

Prisutnost makrofaga definirana je uporabom medijanskih graničnih (cutoff) vrijednosti za M1 i M2 tumoru-pridružene makrofage.

Povezanosti su analizirane uporabom Pearsonova hi-kvadrat (χ^2) testa.

Statistički značajna P-vrijednost (<0,05)

Tablica 9. Povezanost demografskih i kliničkih značajki povezanih s bolešću s prisutnošću M1 i M2 tumoru-pridruženih makrofaga (TAM)

Klinički pokazatelji	Kategorija (n)	M1 TAMovi n(%)	P	M2 TAMovi n(%)	P
Dob	<24 mjeseci (13)	2 (15,4)	0,164	6 (46,2)	0,743
	≥24 mjeseci (33)	12 (36,4)		17 (51,5)	
Spol	Muški (19)	6 (31,6)	0,888	11 (57,9)	0,369
	Ženski (27)	8 (29,6)		12 (44,4)	
Stadij tumora	I (30)	8 (26,7)	0,447	18 (60,0)	0,063
	II–IV (16)	6 (37,5)		5 (31,3)	
Metastaze	Da (11)	5 (45,5)	0,215	5 (45,5)	0,730
	Ne (35)	9 (25,7)		18 (51,4)	
Kongenitalne anomalije	Da (8)	2 (25,0)	0,713	3 (37,5)	0,437
	Ne (38)	12 (31,6)		20 (52,6)	
Kemoterapijski protokol	SIOP 2001 (37)	11 (29,7)	0,833	18 (48,6)	0,710
	SIOP 2014 (9)	3 (33,3)		5 (55,6)	

Prisutnost makrofaga definirana je uporabom medijanskih graničnih (cutoff) vrijednosti za M1 i M2 tumoru-pridružene makrofage. Povezanosti su analizirane uporabom Pearsonova hi-kvadrat (χ^2) testa. Statistički značajna P-vrijednost (<0,05)

Tablica 10. Povezanost laboratorijskih nalaza s prisutnošću M1 i M2 tumoru-pridruženih makrofaga (TAM)

Laboratorijski parametar	Kategorija (n)	M1 TAMovi n(%)	P	M2 TAMovi n(%)	P
LDH	Normalan (12)	2 (16,7)	0,257	6 (50,0)	0,825
	Povišen (26)	9 (34,6)		12 (46,2)	
Feritin	Normalan (20)	5 (25,0)	0,499	11 (55,0)	0,268
	Povišen (14)	5 (35,7)		5 (35,7)	
NSE	Normalan (20)	3 (15,0)	0,040	9 (45,0)	0,625
	Povišen (15)	7 (46,7)		8 (53,3)	
AFP	Normalan (20)	6 (30,0)	0,877	8 (40,0)	0,250
	Povišen (6)	2 (33,3)		4 (66,7)	
Urea	Normalna (31)	10 (32,3)	0,699	16 (51,6)	0,753
	Snižena (15)	4 (26,7)		7 (46,7)	
Kreatinin	Normalan (37)	8 (21,6)	0,008	18 (48,6)	0,710
	Snižen (9)	6 (66,7)		5 (55,6)	
Analiza urina	Normalan (35)	10 (28,6)	0,624	16 (45,7)	0,299
	Patološki (11)	4 (36,4)		7 (63,6)	

Prisutnost makrofaga definirana je uporabom medijanskih graničnih (cutoff) vrijednosti za M1 i M2 tumoru-pridružene makrofage.

Povezanosti su analizirane uporabom Pearsonova hi-kvadrat (χ^2) testa.

Statistički značajna P-vrijednost (<0,05)

4.4. Omjer M1/M2 i povezanost s kliničko-patološkim obilježjima

Omjer M1/M2 bio je statistički značajno viši u tumorima volumena ≥ 500 mL ($p = 0,020$) (Tablica 5) te u bolesnika s povišenim serumskim vrijednostima NSE ($p = 0,027$) u usporedbi s bolesnicima s urednim vrijednostima kreatinina, odnosno NSE (Tablica 7). Za ostale analizirane kliničko-patološke značajke nisu uočene statistički značajne razlike u omjeru M1/M2. Bolesnici s regresivnim tumorima imali su statistički značajno viši omjer M1/M2 ($0,152 \pm 0,140$) u usporedbi s bolesnicima s miješanim ($0,038 \pm 0,102$; $p = 0,007$), epitelnim (0 ; $p = 0,003$) i blastemskim podtipovima tumora ($0,007 \pm 0,018$; $p = 0,006$). Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ukupnog broja TAM-ova i pojedinih histoloških podtipova. Međutim, omjer M1/M2 pokazao je snažnu pozitivnu korelaciju s ukupnim brojem TAM-ova ($r = 0,580$; $p < 0,001$).

Pozitivnost tumora na M1 makrofage bila je statistički značajno povezana s volumenom tumora ≥ 500 mL ($\chi^2 = 7,527$; $p = 0,006$), povišenim serumskim vrijednostima NSE ($\chi^2 = 4,212$; $p = 0,040$) te povišenim serumskim vrijednostima kreatinina ($\chi^2 = 6,938$; $p = 0,0008$) (Tablice 7 i 8). Pozitivnost tumora na M2 makrofage bila je statistički značajno povezana s unifokalnom pojavnosti tumora ($\chi^2 = 5,610$; $p = 0,018$) (Tablica 8). Druge statistički značajne povezanosti nisu utvrđene.

4.5. Ukupna raspodjela TAM-ova nakon neoadjuvantne kemoterapije

Općenito, Wilmsovi tumori liječeni neoadjuvantnom kemoterapijom su pokazali značajno nižu infiltraciju M1 makrofagima u usporedbi s M2 makrofagima. M2 makrofagi su predstavljali prevladavajuću populaciju makrofaga unutar tumorskog mikrookoliša. Suprotno, makrofagi povezani s tumorom (TAM-ovi) nisu bili prisutni u nefrogenim ostatcima te su samo rijetko uočeni u susjednom normalnom bubrežnom parenhimu.

4.6. Izražaj glipikana-3 (GPC3) i povezanost s kliničko-patološkim obilježjima

Od 45 analiziranih tumora, 26 (57,8%) je bilo pozitivno na GPC3 bojenje, a 19 (42,2%) negativno. Analiza intenziteta izražaja GPC3 u uzorcima Wilmsova tumora provedena je određivanjem najvišeg intenziteta bojenja (citoplazmatski i/ili membranski) za pozitivne uzorke: 2 uzorka (7,7%) su bila slabog intenziteta (1+), 6 uzoraka (23,1%) je bilo umjerenog (2+), a 18 uzoraka (69,2%) je bilo jakog intenziteta bojenja (3+), pa su za analizu kombinirani 1+ i 2+ uzorci kao bi se osigurao dovoljan broj uzoraka po skupini. Slabiji intenzitet GPC3 bojenja (1+/2+) bio je statistički značajno povezan s višim serumskim vrijednostima feritina ($\chi^2 = 11,61$; $p = 0,001$) (Tablica 11). Što se tiče podudarnosti najvišeg intenziteta citoplazmatskog i membranskog bojenja: u 13 uzoraka (50%) su citoplazmatsko i membransko bojenje bili jednako izraženi; u 8 uzoraka (30,8%) je intenzitet membranskog bojenja bio jači od citoplazmatskog, a u 5 uzoraka (19,2%) je bio veći intenzitet citoplazmatskog u usporedbi s membranskim bojenjem. Negativnost tumora na GPC3 bila je statistički značajno povezana s povišenim serumskim vrijednostima LDH ($\chi^2 = 5,111$; $p = 0,024$), NSE ($\chi^2 = 9,188$; $p = 0,002$) i kreatinina ($\chi^2 = 4,825$; $p = 0,038$) te s visokim udjelom ($>60\%$ analiziranog tkiva) tumorske nekroze ($\chi^2 = 5,554$; $p = 0,018$). Nisu utvrđene statistički značajne razlike s obzirom na dob i spol u trenutku postavljanja dijagnoze, stadij i volumen tumora niti histološki podtip tumora s izražajem GPC3 u tkivu WT-a (Tablice 11 i 12).

Tablica 11. Povezanost demografskih i kliničkih značajki te laboratorijskih nalaza s izražajem glipikana-3 (GPC3)

Kliničke značajke	Glipikan-3		χ^2	P	Intenzitet bojanja		χ^2	P
	Negativan	Pozitivan			1+ / 2+	3+		
Dob								
<24 mjeseci (N=13)	5	8	0.106	0.745	1	7	1.811	0.178
≥24 mjeseci (N=32)	14	18			7	11		
Spol								
Muški (N=19)	10	9	1.461	0.227	4	5	1.208	0.272
Ženski (N=26)	9	17			4	13		
Stadij								
I (N=30)	10	20	2.915	0.088	6	14	0.024	0.877
II-IV (N=15)	9	6			2	4		
Metastaze								
Da (N=11)	6	5	0.906	0.341	2	3	0.123	0.726
Ne (N=34)	13	21			7	15		
Kongenitalne anomalije								
Da (N=8)	3	5	0.089	0.766	0	5	2.751	0.097
Ne (N=37)	16	21			8	13		
Protokol kemoterapije								
1 (N=36)	15	21	0.023	0.880	6	15	0.248	0.619
2 (N=9)	4	5			2	3		
LDH								
Normalan (N=12)	2	10	5.111	0.024	3	7	0.095	0.757
Povišen (N=25)	14	11			4	7		
Feritin								
Normalan (N=20)	6	14	1.877	0.171	1	13	11.61	0.001
Povišen (N=13)	7	6			5	1		
NSE								
Normalan (N=19)	3	16	9.188	0.002	4	12	0.420	0.517
Povišen (N=15)	10	5			2	3		
AFP								
Normalan (N=19)	7	12	0.329	0.566	4	8	1.364	0.243
Povišen (N=6)	3	3			0	3		
Urea								
Normalan (N=30)	11	19	1.139	0.286	4	15	3.128	0.077
Povišen (N=15)	8	7			4	3		
Kreatinin								
Normalan (N=37)	13	24	4.285	0.038	7	17	0.376	0.540
Povišen (N=8)	6	2			1	1		
Analiza urina								
Normalan (N=34)	13	21	0.906	0.341	7	14	0.337	0.562
Patološki (N=11)	6	5			1	4		

Tablica 12. Povezanost patohistoloških čimbenika i prisutnosti M1 i M2 makrofaga s izražajem glipikana-3 (GPC-3)

Patohistološki čimbenici	Glipikan-3		χ^2	P	Intenzitet bojanja		χ^2	P
	Negativan	Pozitivan			1+ / 2+	3+		
Volumen tumora								
<500 mL (N=34)	13	21	0.906	0.341	5	16	2.483	0.115
≥500 mL (N=11)	6	5			3	2		
Fokalnost tumora								
Unifokalan (N=41)	17	24	0.109	0.741	7	17	0.376	0.540
Multifokalan (N=4)	2	2			1	1		
Udio nekroze tumora								
<60% (N=34)	11	23	5.554	0.018	8	15	1.507	0.220
>60% (N=11)	8	3			0	3		
Histologija tumora								
Povoljna (N=37)	15	22	0.241	0.623	8	14	2.101	0.147
Nepovoljna (N=8)	4	4			0	4		
Skupina rizika								
Intermedijarni (N=33)	11	22	1.481	0.224	8	14	2.101	0.147
Visoki (N=9)	5	4			0	4		
Status M1 makrofaga								
Pozitivni (N=14)	8	6	1.855	0.173	2	4	0.024	0.877
Negativni (N=31)	11	20			6	14		
Status M2 makrofaga								
Pozitivni (N=23)	9	14	0.184	0.668	4	10	0.069	0.793
Negativni (N=22)	10	12			4	8		

Razmatrajući prisutnost M1 i M2 makrofaga i istodobnog izražaja GPC3 u tkivu tumora utvrdili smo da je u 31 ispitivanom uzorku WT-a status M1 makrofaga bio negativan, uz istodobno negativan izražaj GPC3 u 11 ispitivanih uzoraka WT-a, ali bez statistički značajne povezanosti. Suprotno, povećana prisutnost M2 makrofaga je bila popraćena jako pozitivnim (3+) istodobnim izražajem GPC3 u 14 od 23 uzorka WT-a, ali bez statistički značajne povezanosti (Tablica 12).

5. RASPRAVA

WT predstavlja jedan od najuspješnijih primjera multimodalnog liječenja zloćudnih tumora u pedijatrijskoj onkologiji, s ukupnim stopama preživljenja od približno 90% (88, 89). Primjena kemoterapije, kirurškog zahvata i, u odabranim visokorizičnim slučajevima, radioterapije dovela je do izvrsnih ishoda, osobito u bolesnika s WT-om povoljne histologije, dok je preživljenje i dalje niže u bolesnika s obostranim WT-om ili visokorizičnim histološkim podtipovima (90). Približno 10–15% djece će razviti visokorizični WT obilježen nepovoljnom histologijom s difuznom anaplazijom ili blastemskom predominacijom te posljedično, otpornošću na terapiju, relapsom i nižim stopama preživljenja (91-93). Ovi izazovi potaknuli su kontinuirana istraživanja novih biljega s ciljem poboljšanja stratifikacije rizika, smanjenja toksičnosti terapije te unaprjeđenja ishoda u visokorizičnih bolesnika.

Prema trenutno važećem sustavu stratifikacije rizika SIOP-RTSG (engl. *International Society of Paediatric Oncology- Renal Tumor Study Group*), utvrđeni prognostički čimbenici uključuju dob bolesnika, stadij bolesti i volumen tumora prije provedene neoadjuvantne kemoterapije, patohistološki podtip nakon neoadjuvantne kemoterapije, umnoženost 1q kromosomske regije (engl. *1q gain*) te odgovor plućnih metastaza u stadiju IV bolesti (91). U našoj kohorti medijan dobi pri postavljanju dijagnoze iznosio je 36,5 mjeseci, što je u skladu s prethodnim izvješćima koja su utvrdila da se WT najčešće javlja u 2. i 3. godini života (88, 94, 95). Analize SIOP-93-01 i SIOP-2001 kohorti velikih razmjera pokazale su da je starija dob pri dijagnozi povezana s većim volumenom tumora, višim stadijem tumora, većom učestalošću visokorizičnih histoloških podtipova i višim stopama relapsa što potvrđuje dob kao snažan prognostički pokazatelj (88, 94).

Volumen tumora prije neoadjuvantne kemoterapije još je jedan važan prognostički pokazatelj unutar SIOP protokola, pri čemu granična vrijednost ≥ 500 mL identificira bolesnike s povećanim rizikom (90, 96). U ovom istraživanju većina tumora bila je manja od 500 mL te su svrstani u srednji rizik, što odražava kohortu s općenito povoljnim početnim obilježjima. Histološki, tumori koji pokazuju difuznu anaplaziju ili perzistentnu blastemsku predominaciju nakon neoadjuvantne kemoterapije smatraju se visokorizičnim i češće se uočavaju u uznapređovalim stadijima bolesti (35, 94, 97). Perzistencija blastemskih komponenti nakon kemoterapije povezana je s otpornošću na liječenje i lošijim ishodom (90, 91, 93, 96, 98). U našoj kohorti blastemska histologija većinom je zabilježena u djece starije od 24 mjeseca, a smrtni ishodi pojavili su se isključivo među bolesnicima s blastemskim ili anaplastičnim podtipovima, što naglašava udruženi prognostički utjecaj dobi i histologije. Osim intrinzičnih obilježja tumora, sve se veća pozornost usmjerava na tumorski mikrookoliš (engl. *Tumor Microenvironment*, TME) kao ključnu odrednicu progresije tumora i terapijskog odgovora.

TME se sastoji od imunoloških stanica, krvnih žila, izvanstaničnog matriksa i stromalnih komponenti koje zajednički podupiru rast tumora, invaziju i metastaziranje. Tijekom rane tumorigeneze, klasično aktivirani M1 makrofagi mogu djelovati kao prva linija imunološkog odgovora, iskazujući antitumorsku aktivnost (66, 69). Međutim, dinamične promjene unutar TME-a poput hipoksije, promijenjene dostupnosti glukoze i promjena pH vrijednosti potiču polarizaciju makrofaga prema alternativno aktiviranom, imunosupresivnom M2 fenotipu (66, 69, 98-100). M2 makrofagi olakšavaju remodeliranje tkiva, angiogenezu i izbjegavanje imunološkog nadzora, čime u konačnici narušavaju antitumorski imunitet i smanjuju osjetljivost tumora na kemoterapiju, radioterapiju i imunoterapiju (71, 99, 100).

Brojna istraživanja koja su analizirala imunološki odgovor u različitim malignim bolestima, uključujući tumore dojke, bubrega, središnjeg živčanog sustava i debelog crijeva u odraslih, utvrdila su povezanost povećane gustoće M2 makrofaga u solidnim tumorima s uznapredovalim stadijem, progresijom bolesti, razvojem metastaza, lošijom prognozom i kraćim preživljenjem (103- 109). U metaanalizi koja je obuhvatila 55 studija Zhang je potvrdio nepovoljan prognostički utjecaj povećane gustoće TAM-ova na preživljenje bolesnika sa karcinomom želuca, dojke, mokraćnog mjehura, jajnika i planocelularnim karcinomom usne šupljine (110).

Prognostička važnost TAM-a u WT-u još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, osobito u kontekstu neoadjuvantne kemoterapije. Većina dosadašnjih istraživanja analizirala je TAM-ove u primarno resektiranim uzorcima WT-a liječenima prema protokolu COG (67, 71, 100, 111). Tian i sur. su potvrdili povećanu gustoću M1 i M2 makrofaga u primarno nefrektomiranom tumorskom tkivu WT-a u usporedbi sa susjednim normalnim bubrežnim tkivom, pri čemu su M2 makrofagi bili zastupljeniji u tumorima višeg stadija (67). Slično tomu, Liou i sur. izvijestili su o povezanosti infiltracije makrofaga sa stadijem tumora i mikrovaskularnom invazijom u pretežito prethodno neliječenim uzorcima WT-a (100). Suprotno tome, naša studija je bila usmjerena isključivo na uzorke WT-a liječene neoadjuvantnom kemoterapijom prema SIOP protokolu. Uočili smo da su i M1 i M2 makrofagi općenito bili rijetki u vijabilnom tumorskom tkivu nakon kemoterapije, uz izrazito nižu infiltraciju M1 makrofaga i prevladavanje M2 makrofaga unutar TME-a. Važno je istaknuti da TAM-ovi uglavnom nisu bili prisutni u nefrogenim ostacima te su se samo rijetko nalazili u susjednom normalnom bubrežnom parenhimu, što upućuje na specifičan odgovor TME-a u WT-u. Relativno niska gustoća TAM-ova u našoj kohorti, u usporedbi s izvješćima o gustoći TAM-ova u prethodno neliječenom WT-u, može odražavati učinak neoadjuvantne kemoterapije na TME. Kemoterapija može smanjiti ukupnu infiltraciju makrofaga i/ili

modulirati njihovu polarizaciju, iako izostanak uparenih uzoraka prije i nakon liječenja onemogućuje donošenje konačnih zaključaka. Izostanak prisutnosti TAM-ova u nefrogenim ostatcima je znakovit jer upućuje na to da je novačenje makrofaga povezana s malignom transformacijom, a ne s preneoplastičnim stanjem i da je vjerojatno potaknuta tumor-specifičnim signalnim mehanizmima. Uočena povezanost višeg omjera M1/M2 s regresivnim histološkim promjenama WT-a dodatno podupire hipotezu da polarizacija makrofaga može služiti kao pokazatelj odgovora WT-a na neoadjuvantnu kemoterapiju. Ukoliko se potvrde u opsežnijim studijama, profiliranje TAM-ova moglo bi predstavljati dopunu postojećim modelima procjene rizika, no navedeni su rezultati trenutačno istraživačke naravi i zahtijevaju potvrdu u prospektivnim istraživanjima.

Analizirajući ukupan broj TAM-ova s drugim obilježjima WT-a u našem smo istraživanju kvantitativnom analizom utvrdili značajno veći ukupan broj TAM-ova u WT-ima s volumenom ≥ 500 mL i u unifokalnim tumorima, dok nismo uočili značajnu povezanost između gustoće TAM-ova i stadija tumora ili histološkog podtipa. Treba naglasiti da se nalazi koji se odnose na histološke podskupine i fokálnost tumora trebaju tumačiti s oprezom, zbog ograničene veličine uzorka studijske kohorte. Zasebna analiza subpopulacija makrofaga pokazala je veću zastupljenost i M1 i M2 makrofaga u većim tumorima, što podupire tezu da tumorska masa modulira novačenje imunoloških stanica. Omjer M1/M2 korelirao je pozitivno s ukupnim brojem TAM-ova i bio je značajno viši u tumorima većeg volumena, kao i kod bolesnika s povišenim razinama NSE i kreatinina u serumu. Premda zasad ne postoje serumski biljezi specifični za WT, uočene povezanosti mogu upućivati na agresivniju tumorsku biologiju i izmijenjena metabolička ili upalna stanja. Značajno je da je regresivni histološki podtip WT-a pokazao znatno viši omjer M1/M2 u usporedbi s miješanim, epitelnim i blastemskim podtipovima. Ovo zapažanje je posebno važno, jer regresivni tumori odražavaju povoljan odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju. Prevlast M1 makrofaga unutar ovih tumora može ukazivati na to da pro-inflamatorni mikrookoliš doprinosi povećanoj osjetljivosti na kemoterapiju i regresiji tumora. U tom kontekstu, povećani omjer M1/M2 makrofaga mogao bi predstavljati ne samo biljeg imunološke aktivacije, već i potencijalni indikator terapijskog odgovora. Iako komponente stromalnog i vezivnog tkiva karakteristične za regresivne tumore mogu djelomično olakšati infiltraciju M1 makrofaga, povezanost između prevlasti M1 makrofaga i regresije tumora sugerira biološki značajnu interakciju između polarizacije makrofaga i odgovora na liječenje.

Potrebne su daljnje studije kako bi se utvrdilo može li modulacija polarizacije TAM-ova poboljšati učinkovitost kemoterapije u WT-u. Dosadašnja istraživanja pokazala su jasnu

povezanost između stadija WT-a i ukupnog preživljenja, pri čemu bolesnici u stadiju I ostvaruju izrazito visoku stopu preživljenja od 95,5 %, dok je u stadiju IV ukupno preživljenje značajno niže i iznosi 75,3 % (108). Suprotno prethodnim izvještajima, nismo uočili značajne razlike u raspodjeli makrofaga među stadijima WT-a. Ova nepodudarnost može odražavati ograničenu veličinu uzorka, ali također upućuje na mogućnost da sama neoadjuvantna kemoterapija modulira sastav TAM-ova, potencijalno prikrivajući razlike ovisne o stadiju koje su uočene u neliječenim tumorima (67).

Naši nalazi su u skladu s rastućim dokazima koji ističu složene interakcije između imunih stanica i komponenti WT-a. Maturu i sur. demonstrirali su infiltraciju TAM-ova i u stromalnim i epitelnim tumorskim odjeljcima i potvrdili povezanost između izražaja upalnih biljega i gustoće makrofaga (71). Sherif i sur. su pokazali da je infiltracija makrofaga u terapijski neliječenom WT-u povezana s angiogenim signaliziranjem i nepovoljnim ishodom (111). Znakovito, Fiore i suradnici utvrdili su da blastemska i epitelna komponenta WT-a mogu suprimirati aktivnost stanica prirodnih ubojica (engl. *Natural Killer*, NK) te poticati polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu, čime doprinose stvaranju imunosupresivnog TME i izbjegavanju imunološkog odgovora, čak i nakon neoadjuvantne kemoterapije (89). U tom kontekstu, nedavna studija Wanga i sur. izvijestila je o nalazima koji su u velikoj mjeri u skladu s našim opažanjima. Autori su istraživali infiltraciju TAM-ova u uzorcima WT-a kod pacijenata liječenih neoadjuvantnom kemoterapijom ili kemoterapijom primijenjenom nakon operativnog zahvata. Pokazali su visoku regrutaciju TAM-ova u tkivima WT-a, pozitivnu korelaciju između infiltracije TAM-ova i M2 makrofaga sa stadijem tumora, kao i povezanost između povećane prisutnosti M2 makrofaga nakon provedene kemoterapije i lošijeg ishoda. Iako se njihova studija razlikovala od naše u pogledu heterogenosti liječenja, metodologije i uključivanja analize preživljenja, obje studije podržavaju koncept da polarizacija TAM-ova, posebno prevlast M2 makrofaga, igra značajnu ulogu u progresiji WT-a i može predstavljati klinički relevantnu metu s ciljem bolje prognostičke stratifikacije i terapijske modulacije (112). U cjelini, navedeni rezultati podržavaju tezu o značajnoj biološkoj ulozi mikrookoliša WT-a (TME) koji može predstavljati važan prognostički čimbenik i potencijalnu terapijsku metu. Slični obrasci polarizacije makrofaga opisani su kod različitih solidnih tumora u dječjoj populaciji. Primjerice, u tumorima mozga, prvenstveno u SHH (engl. *Sonic Hedgehog*) meduloblastomima i gliomima visokog stupnja malignosti, TAM-ovi često pokazuju M2 fenotip, doprinoseći razvoju imunološki supresivnog (engl. *immune-cold*) mikrookoliša koji ograničava učinkovite antitumorske imunološke odgovore, suprimira T-staničnu aktivnost, potiče progresiju tumora i otpornost na liječenje. Također, u retinoblastomu, osteosarkomu,

hepatoblastomu i visokorizičnom neuroblastomu, M2-polarizirani makrofagi potiču bijeg tumora od imunološkog nadzora, angiogenezu, proliferaciju tumorskih stanica i smanjenje učinkovitosti kemoterapije kroz kompleksne interakcije između TME i imunološkog sustava, uključujući stvaranje imunološki supresivnih citokina. Sveukupno, ovi nalazi dodatno podupiru koncept da je polarizacija makrofaga ključni mehanizam imunološke modulacije u dječjim malignim bolestima te istodobno ukazuju na njezin potencijal kao prognostičkog biljega i terapijske mete u WT-u (113-117).

Glipikan-3 (GPC3) je membranski heparan-sulfat proteoglikan koji sudjeluje u regulaciji rasta, diferencijacije i stanične signalizacije brojnih tkiva i organa tijekom embrionalnog razvoja. U fiziološkim uvjetima njegov je izražaj ograničen na embrionalna/fetalna tkiva i tkiva dojenčadi do navršene 1. godine života, osobito jetre i bubrega, dok je u većini normalnih postnatalnih tkiva minimalan ili odsutan (75). U onkologiji, GPC3 je prepoznat kao onkofetalni antigen koji je značajno prekomjerno izražen u hepatocelularnom karcinomu odraslih i u hepatoblastomu u djece, a njegov izražaj je opisan i u drugim solidnim tumorima poput tumora zametnog epitela, neuroblastoma, WT-a te rijetko rabdomiosarkoma (75). Izražaj GPC3 može biti membranski, citoplazmatski ili udruženi. Ranije studije su povezivale ukupnu pozitivnost GPC3 s agresivnijim tumorskim fenotipom i lošijom prognozom, bez jasne razlike između membranskog i citoplazmatskog izražaja (117-119). Citoplazmatski izražaj, prognostički povoljniji, nastaje zbog pojačane sinteze GPC3, njegovog poremećenog transporta do membrane gdje treba biti usidren i posljedičnog nakupljanja u citoplazmi. Iako membranski izražaj GPC3 odgovara njegovoj fiziološkoj lokalizaciji, novije studije provedene na uzorcima HCC-a u odraslih upućuju da dominantno membranski izražaj može biti pokazatelj agresivnijeg tumorskog fenotipa i slabije diferenciranosti tumora, lošijeg odgovora na liječenje i kraćeg preživljenja. (120, 121).

Izražaj GPC3 u pedijatrijskim solidnim tumorima češći je u embrionalnim i slabije diferenciranim tumorima (122). Tumori koji potječu iz tkiva koja fiziološki izražavaju GPC3 tijekom razvoja, poput jetre i bubrega, često pokazuju njegovu pojačanu ekspresiju, što vjerojatno pridonosi malignoj transformaciji i tumorigenezi. Naime, GPC3 potiče proliferaciju stanica i inhibira diferencijaciju putem Wnt/ β -katenina, Hedgehog i FGF (engl. *The Fibroblast Growth Factor*) signalnih puteva, koji su često deregulirani u pedijatrijskim embrionalnim tumorima (123). Zynger i sur. su imunohistokemijskom metodom pokazali snažan izražaj GPC3 u svim uzorcima hepatoblastoma, uključujući primarne tumore i metastaze, posebno u agresivnijim i uznapredovalim tumorima, ali bez jasne razlike i prognostičkog značaja između membranskog i citoplazmatskog izražaja. Pojačan izražaj GPC3 je zabilježen i u

postkemoterapijskim uzorcima rezidualnog tumora te u područjima vaskularne invazije (77, 124).

Istraživanje provedeno na velikom broju solidnih tumora u djece potvrdilo je pojačan izražaj GPC3 u brojnim tumorima: u atipičnom teratoidnom/rabdoidnom tumoru središnjeg živčanog sustava, kraniofaringeomu, malignom rabdoidnom tumoru i alveolarnom rabdomiosarkomu. Nasuprot tome, Ewingov sarkom, primitivni neuroektodermalni tumor (PNET), sinovijalni sarkom, meduloblastom i pilocitični astrocitom nisu pokazivali izražaj GPC3. Autori su također prvi put imunohistokemijski dokazali pojačan izražaj GPC3 u 38 % uzoraka WT-a, dominantno prisutan u epitelnoj komponenti, ali bez jasne stratifikacije prema prethodnom liječenju (122). Toretzky i sur. utvrdili su pojačan izražaj GPC3 u uzorcima primarno nefrektomiranih WT-a, što upućuje na moguću ulogu GPC3 u poticanju tumorigeneze (125). Pojačan izražaj GPC3 prisutan je u značajnom dijelu WT-a u usporedbi s normalnim bubrežnim tkivom i tumorima bubrega odraslih (123). Daljnje imunohistokemijske studije potvrdile su pojačan izražaj GPC3 u 77% primarnih i 93% metastatskih WT-a, većinom u epitelnoj komponenti te u blastemskom i prognostički nepovoljnom (engl. *unfavourable*) podtipu WT-a (78). U kasnijim istraživanjima pokazano je da je pojačani izražaj GPC3 povezan s blastemskim odnosno prognostički nepovoljnim histološkim podtipovima te sa stadijem bolesti i lošijim ishodom, iako nije potvrđen kao neovisni prognostički čimbenik (79). Jačina izražaja GPC3 u WT-u odražava najčešće stupanj embrionalne diferencijacije i slabiju diferenciranost, ali bez jasne definicije značaja membranskog nasuprot citoplazmatskom izražaju. Uz konstitucijske mutacije gena GPC3 povezanih sa SGBS-om, u nekim WT-a opisane su i somatske mutacije. Mehanizam ponovne indukcije GPC3 nije potpuno razjašnjen, no promjene metilacije promotora GPC3 opisane su u WT-u i neuroblastomu (123). Naša studija, temeljena na SIOP protokolu, analizirala je izražaj GPC3 u WT-ima prethodno liječenima neoadjuvantnom kemoterapijom prema SIOP protokolu. Od 45 analiziranih uzoraka tumorskog tkiva, 26 (57,8%) je bilo pozitivno na bojenje GPC3, a 19 (42,2%) negativno. U 8 uzoraka (30,8 %) utvrđen je jači intenzitet membranskog u odnosu na citoplazmatsko bojenje, dok je u 5 uzoraka (19,2 %) zabilježen izraženiji citoplazmatski intenzitet. U 50 % (13) uzoraka WT-a pozitivnih na izražaj GPC3 uočen je istodobni membranski i citoplazmatski obrazac izražaja GPC3, što može upućivati na histološku heterogenost tumora, ali i na moguće učinke neoadjuvantne kemoterapije.

U našem istraživanju utvrdili smo statistički značajnu povezanost između izostanka izražaja GPC3 u uzorcima WT-a i povišenih serumskih vrijednosti LDH, NSE i kreatinina, što se može protumačiti metaboličkim promjenama tumorskog tkiva. Naime, tumori s nižom

ekspresijom GPC3 sadržavali su veći udio nekrotičnog tkiva, a bolesnici s takvim tumorskim obilježjima imali su više serumske vrijednosti LDH, NSE, kreatinina i feritina. Međutim, dobiveni rezultati ne upućuju na to da je izražaj GPC3 izravno povezan s navedenim serumskim biljezima ili bubrežnom funkcijom. Stoga je vjerojatnije da je opažena povezanost posljedica izraženije tumorske nekroze nego izravnog utjecaja GPC3 na navedene laboratorijske parametre.

Nadalje, utvrdili smo statistički značajnu povezanost između negativnog izražaja GPC3 i visokog udjela nekroze ($> 60\%$ analiziranog tkiva) u uzorcima WT-a. Ovaj nalaz možemo objasniti učinkom prijeoperativne kemoterapije na izražaj GPC3, odnosno selektivnim smanjenjem ili gubitkom ekspresije GPC3 u područjima zahvaćenima opsežnom nekrozom. Istraživanjem nismo utvrdili statistički značajnu povezanost između demografskih obilježja oboljelih, stadija bolesti i histološkog podtipa WT-a, što se može protumačiti veličinom ispitivane kohorte s prevagom WT-a intermedijarnog rizika.

Istražujući istodobnu prisutnost M1 i M2 makrofaga i jačinu izražaja GPC3 u uzorcima WT-a utvrdili smo da je povećana prisutnost M2 makrofaga u tumorskom mikrookolišu bila praćena izrazito pozitivnim (3+) izražajem GPC3 u tkivu tumora. Iako nije uočena statistički značajna povezanost, primijećen je očiti trend istovremenog prisustva M2 makrofaga i izražaja GPC3 u WT-u.

Sveukupno, nalazi upućuju na potencijalnu ulogu GPC3 kao biljega povezanog s određenim biološkim karakteristikama WT-a, no za potvrdu njegove prognostičke i prediktivne vrijednosti potrebna su dodatna istraživanja na većim kohortama bolesnika. Zbog visokog tumorski specifičnog izražaja i ograničene prisutnosti u zdravim tkivima u djece dobi nakon navršene 1. godine života, GPC3 predstavlja potencijalni dijagnostički biljeg i atraktivnu terapijsku metu.

Pojedine studije na WT-ima su ispitivale izražaj GPC3 na uzorcima WT-a molekularno-genetičkim metodama. Tako je izražaj mRNA GPC3 analiziran metodom real-time PCR-a (engl. *Polymerase Chain Reaction*, qPCR) u primarno nefrektomiranom WT-u pri čemu je utvrđen njegov pojačan izražaj u više od 50% uzoraka tumora, većinom u blastemskom i prognostički nepovoljnom (engl. *unfavourable*) podtipu. Autori su potvrdili značajnu povezanost pojačanog izražaja GPC3 s histološkim podtipom WT-a, stadijem bolesti i ishodom liječenja (79). Analiza izražaja mRNA GPC3 genomskom microarray metodom aCGH (engl. *array Comparative Genomic Hybridisation*) te imunohistokemijskim metodama u uzorcima prethodno neliječenih WT-a, drugih tumora bubrega te fetalnog i adultnog normalnog bubrežnog tkiva potvrdila je pojačani izražaj GPC3 u 77% primarnih i u 93% metastatskih

WT-ima, dominantno u miješanom bifazičnom i blastemskom podtipu WT-a, dok stromalni podtip WT-a i svi adultni tumori bubrega nisu pokazivali izražaj GPC3. Iako uloga GPC3 u patogenezi WT-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, njegov pojačan izražaj mogao bi imati značajnu primjenu u histopatološkoj dijagnostici WT-a te u postterapijskom praćenju oboljelih od WT-a (78).

Iako je u WT-u dokazana prisutnost TAM-ova s prevladavanjem M2 makrofaga koji imunosupresivnim djelovanjem potiču tumorsku progresiju te nepovoljniji klinički ishod, zatim pojačan izražaj GPC3, koji je u normalnom adultnom bubrežnom tkivu uglavnom odsutan ili slabo izražen, do sada nisu opisane studije koje izravno povezuju izražaj GPC3 s polarizacijom M1 i M2 makrofaga u WT-u (74, 77, 124, 126, 127).

Međutim, istraživanja u drugim tumorskim modelima pokazala su da terapije usmjerene protiv GPC3 ili GPC3-specifični imunološki odgovor mogu remodelirati tumorski mikrookoliš povećanjem infiltracije i aktivnosti CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita te drugih imunoloških stanica, što podupire potencijal GPC3 kao mete imunoterapije (128). Primjer su istraživanja na ksenograftnim modelima koja su potvrdila povezanost pojačanog izražaja GPC3 na stanicama HCC i pojačani izražaj gena povezanih s M2 makrofagima. Također je potvrđen pojačan izražaj CSF1 koji inducira diferencijaciju TAM-ova u M2 makrofage te CCL5 i CCL3 citokina koji potiču regrutaciju M2 makrofaga. Dakle, pojačan izražaj GPC3 i prisutnost M2 makrofaga potiču rast i metastaziranje tumora (87).

U našim rezultatima ukupan broj makrofaga je bio veći u GPC3 negativnim uzorcima, a u dijelu WT-a s pozitivnim izražajem GPC3 bio je veći u tumorima s intenzitetom izražaja 1+ i 2+. Omjer M1/M2 makrofaga je bio viši u uzorcima koji su bili GPC3 negativni, dok je među GPC3 pozitivnim uzorcima bio viši u onima s jačim izražajem (3+). Razmatrajući pojedinačan broj M1 i M2 makrofaga, M2 makrofagi su bili zastupljeniji u uzorcima WT-a s pozitivnim izražajem GPC3, osobito u uzorcima s jačim izražajem (3+). S obzirom na usporedno postojanje pojačanog izražaja GPC3 i dominacije M2 makrofaga u WT-u, može se pretpostaviti moguća uloga GPC3 u oblikovanju imunološkog mikrookoliša tumora. Međutim, ta pretpostavka za sad ostaje nedovoljno istražena i zahtijeva dodatna istraživanja. Zahvaljujući značajnom napretku u dijagnostici i liječenju WT-a danas se očekuje dugoročno preživljenje u 85–90% oboljelih. Unatoč tome, relaps bolesti javlja se u približno 50 % bolesnika s prognostički nepovoljnim podtipovima WT-a, uključujući anaplastični i postkemoterapijski blastemski podtip (129, 130). Bilateralni WT povezan je s lošijom prognozom u usporedbi s unilateralnim oblikom tumora, uz ukupno preživljenje od približno 70 %. Također, u oko 14 % oboljelih razvija se kronično bubrežno zatajenje (97).

Približno četvrtina preživjelih, od toga 60% mlađe životne dobi, manifestirat će „kasne posljedice“ onkološkog liječenja: zatajenje bubrega, srčanu dekompenzaciju, poremećaj rasta, endokrinološki poremećaj, neplodnost, hipertenziju i/ili nastanak sekundarne neoplazme, a 20% će preminuti unutar 30 godina od postavljanja dijagnoze WT-a (129, 130).

Poremećaj bubrežne funkcije predstavlja jednu od kasnih komplikacija liječenja WT-a. Zatajenje bubrega nastaje rijetko, tek u 0.6% unilateralnih i u 12% bilateralnih WT-a. Najvažniji čimbenici rizika za nastanak kroničnog bubrežnog oštećenja su primjena zračenja preostalog bubrega i kemoterapijskog protokola za liječenje visokorizičnog WT-a. Poštedni operativni zahvat (engl. *nephron sparing surgery*, NSS) kod bilateralnog WT-a, izbjegavanje primjene nefrotoksičnih lijekova i optimalna primjena radioterapije su mjere prevencije oštećenja bubrežne funkcije, kao i nadzor funkcije preostalog bubrega (129).

Srčana dekompenzacija nastaje zbog kardiotsičnog djelovanja antraciklinskog citostatika doksorubicina i zračenja plućnih metastaza, ukoliko je pritom zahvaćen srčani mišić. U NWTSG studiji incidencija srčanog zatajenja 20 godina nakon dijagnoze WT-a iznosila je 4,4% u bolesnika liječenih doksorubicinom u prvoj liniji te 17,4% u onih liječenih zbog relapsa bolesti. Smanjena srčana kontraktilnost je utvrđena u 25% preživjelih od WT-a. Kardiotsičnost doksorubicina je razmjerna primjenjenoj kumulativnoj dozi, stoga se svim bolesnicima, a posebno onim koji su primili više od 250 mg/m² doksorubicina, preporuča cjeloživotni nadzor srčane funkcije (EKG, UZV, procjena ejekcijske frakcije) (129).

Terapija zračenjem je vrlo toksična i uzrokuje značajne nuspojave: poremećaj rasta i razvoja kralježnice, rebara, hipoplaziju dojki i mišića trupa te fibrozu pluća, ovisno o primijenjenoj ukupnoj dozi i polju zračenja (129).

Liječenje WT-a utječe i na plodnost. Žene koje su tijekom liječenja WT-a bile zračene imaju značajno povećan rizik neplodnosti (80%), spontanih pobačaja (22%), prijevremenog poroda (41.5%), nedonošenosti (25.6%) i zastoja rasta ploda (9.3%) (130).

Osim kasnih komplikacija, osobe liječene od WT-a imaju 3,4 x veći rizik za obolijevanjem od sekundarne maligne bolesti, s godišnjom incidencijom od 7,6:10 000 preživjelih. Prema istraživanju NWTSG grupe kumulativni rizik nastanka sekundarne neoplazme iznosi 1,6% za razdoblje od 15 godina. Najčešće se radi o osteosarkomima, sarkomima mekih tkiva, tumorima dojke, karcinomu štitnjače, akutnim leukemijama, limfomima, gastrointestinalnim tumorima i melanomu. Navedeni sekundarni tumori se javljaju, očekivano, s povećanom učestalošću unutar tkiva koje je bilo zahvaćeno zračenjem, stoga radioterapija predstavlja najvažniji rizični čimbenik za nastanak sekundarne neoplazme (73%). Istodobna primjena doksorubicina u liječenju WT-a povećava štetnost zračenja (130).

U današnje vrijeme cijelogenomska, epigenetička i proteomička istraživanja WT-a usmjerena su na pronalaženje potencijalnih molekularnih biljega koji bi omogućili bolju stratifikaciju bolesnika, optimizaciju provedbe 1. linije kemoterapije, smanjenje doze citostatika te prevenciju kasnih posljedica liječenja u bolesnika s WT-om niskog i intermedijarnog rizika. Istodobno, cilj je omogućiti intenzifikaciju liječenja bolesnika čije tumorsko tkivo sadrži biljege povezane s lošijim preživljenjem i povećanim rizikom relapsa bolesti, radi poboljšanja ukupnog preživljenja i primjene ciljane terapije (35, 90, 129, 130). Danas se u liječenju WT-a istražuju novi terapijski pristupi koji uključuju inhibitore angiogeneze i VEGF-a (bevacizumab, pazopanib), inhibitore tirozin-kinaze (imatinib, dasatinib, nilotinib, ruksolitinib, krizotinib), mTOR inhibitore (everolimus, temsirolimus), inhibitore IGF signalnog puta te inhibitore Aurora-kinaze (alisertib) (37). Jedno od obilježja pedijatrijskih tumora jest prevladavanje stanica naivnog imunološkog sustava u TME-u, suprotno od adultnih tumora u kojima dominiraju T limfociti. Za razliku od tumora odraslih, koji najčešće potječu iz epitelnih stanica zbog postupnog nakupljanja velikog broja genetskih mutacija tijekom vremena, pedijatrijski tumori uglavnom nastaju iz embrionalnih stanica zbog epigenetskog i transkripcijskog reprogramiranja potaknutog manjim brojem mutacijskih događaja. To objašnjava znatno niže mutacijsko opterećenje i manji broj izraženih potencijalnih neoantigena, što ograničava osjetljivost pedijatrijskih tumora na imunološko liječenje usmjereno na specifične antigene (131, 132). Heterogenost WT-a, mali broj slučajeva uključenih u klinička ispitivanja, imunosupresivni TME, poteškoće identificiranja imunogenih antigena i manjak mikrosatelitske nestabilnosti otežavaju primjenu imunoterapije u liječenju WT-a (131).

Brojna istraživanja pokazala su da su TAM-ovi, osobito M2 makrofagi, dominantne upalne stanice TME-a povezane s proliferacijom tumora, slabijim odgovorom na liječenje, uznapređovalim stadijem i lošijom prognozom u brojnim solidnim tumorima, iako su njihove interakcije s tumorskom stromom u djece još nedovoljno istražene (103-108, 109, 111). U studiji koja je analizirala infiltraciju tumoru-pridruženih leukocita (TAL) u pedijatrijskim tumorima poput WT-a, neuroblastoma, osteosarkoma, hepatoblastoma, Ewing-ovog sarkoma i rabdomiosarkoma, kao i u adultnim tumorima, utvrđena je dominantnost populacije M2 makrofaga. U adultnim tumorima su, osim makrofaga, bile prisutne i S100+ dendritičke stanice, NK-stanice i T limfociti, što se tumači hipotezom o važnosti prolongirane kronične upale u nastanku adultnih tumora (61). Meta-analiza Zhang i sur. pokazala je negativan utjecaj infiltracije M2 makrofaga na preživljenje bolesnika u karcinomu želudca, dojke, jajnika, mokraćnog mjehura i štitnjače (110). Više od 80% imunohistokemijskih studija provedenih na

uzorcima tumora u odraslih (karcinom pločastih stanica jednjaka, karcinom dojke, želudca) potvrdilo je poveznicu između većeg broja TAM-ova i lošije kliničke prognoze i preživljenja (133). Suprotno navedenom, Lee i sur. utvrdili su povećanu prisutnost M1 makrofaga u prognostički nepovoljnom SHH meduloblastomu, što je kontradiktorno s antitumorskim djelovanjem M1 makrofaga, a upućuje na specifičnu ulogu TME-a u ovom tipu tumora (108). Dosadašnja istraživanja su potvrdila kako različite stanice TME-a i same tumorske stanice mogu usmjeravati polarizaciju makrofaga prema M1 ili M2 fenotipu. Stoga se TAM-ovi smatraju potencijalnim biljezima uznapredovale bolesti te mogućom terapijskom metom ciljane terapije (64, 133, 134). Kao što neoadjuvantna kemoterapija u WT-u omogućuje procjenu osjetljivosti tumora na primijenjeno liječenje (vinkristin, aktinomicin D i u uznapredovalim slučajevima doksorubicin), tako bi i prisutnost M2 makrofaga mogla služiti kao prognostički pokazatelj i potencijalni molekularni biljeg ciljane antitumorske terapije. Inhibicija M2 makrofaga mogla bi pridonijeti primjeni manje toksične terapije WT-a, smanjenju težine „kasnih posljedica“ liječenja te povećanju ukupnog preživljenja i poboljšanju kvalitete života bolesnika (71, 135, 136, 137). Terapijski pristupi usmjereni na TAM-ove prvenstveno se temelje na dvjema strategijama: smanjenju broja TAM-ova, koja uglavnom pokazuje ograničenu učinkovitost i prolazan terapijski učinak te njihovoj repolarizaciji iz protumorskog M2 u antitumorski M1 fenotip, koristeći pritom funkcionalnu plastičnost makrofaga (65, 138). U tom kontekstu, imunoterapija raka predstavlja obećavajući terapijski pristup temeljen na pojačavanju antitumorskog imunološkog odgovora tijekom standardnog liječenja (138).

Mogućnosti uvođenja novih metoda liječenja su slijedeće:

1) Blokiranje stvaranja M2 makrofaga u tumorskom tkivu

CCL2/MCP-1(engl. *Chemokine C-C motif ligand 2/ Monocyte Chemoattractant Protein-1*) je ključni upalni kemokin koji putem CCR2 receptora potiče M2 polarizaciju makrofaga te je pojačano izražen u solidnim tumorima. Inhibicija osi CCL2/CCR2 (npr. carlumab-om) u pretkliničkim modelima karcinoma gušterače, prostate i dojke smanjuje rast i metastaziranje tumora, dok inhibicija CCR2 primjenom CCR2 inhibitora PF-04136309 u kombinaciji s Folfirinox-om poboljšava odgovor na liječenje. Dodatno, inhibitori M-CSF/CSF1R, poput trabectedin-a, induciraju apoptozu makrofaga, smanjuju M2 polarizaciju, angiogenezu i metastaziranje te povećavaju infiltraciju citotoksičnih (CD8+) T-limfocita (133).

2) Supresija preživljenja TAM-ova u tumorskom mikrokolišu

CSF1/CSF1R signalni put ključan je za stvaranje monocita i polarizaciju TAM-ova. Njegova inhibicija (npr. Pexidartinib-om) predstavlja važan terapijski pristup. Apoptozu

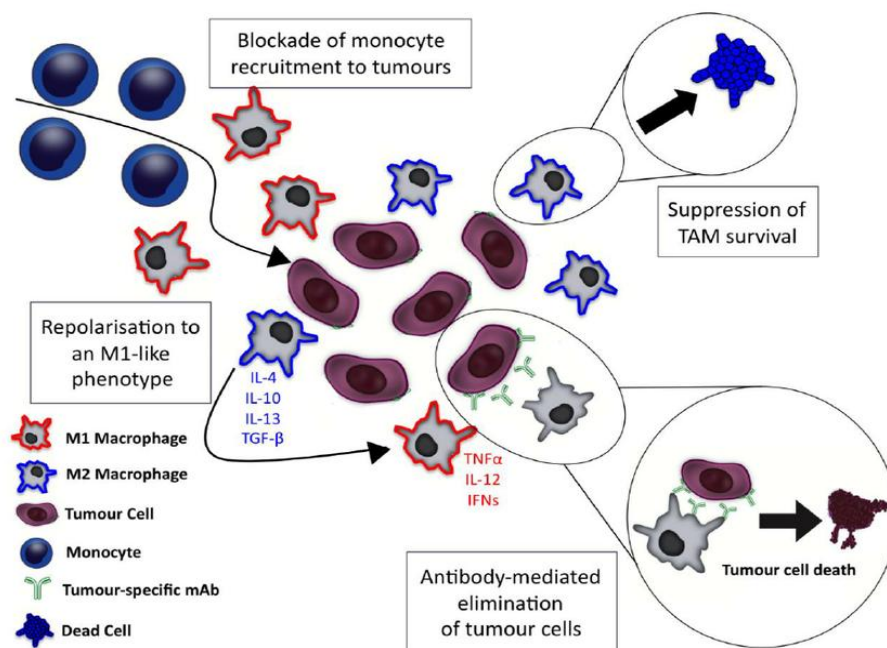
makrofaga mogu inducirati liposomalni bisfosfonati, alemtuzumab te trabectedin, koji je odobren za liječenje karcinoma jajnika i sarkoma mekih tkiva. Dodatno, legumain, pojačano izražen u M2 makrofagima, terapijska je meta anti-DNA-legumain cjepiva koje aktivira CD8+ T-limfocite i potiče eliminaciju M2 makrofaga (62).

3) Repolarizacija M2 u M1 makrofage

Repolarizacija TAM-ova iz M2 u M1 fenotip može se potaknuti aktivacijom proinflamatornih signalnih puteva, osobito NF- κ B puta, primjenom agonista Toll-like receptora (TLR), kao što su poly(I), LPS, imiquimod i CpG-ODN, kao i modulacijom CD40 i IL-10 signalizacije agonističkim anti-CD40 te blokirajućim anti-IL-10 protutijelima. Time se povećava lučenje protuupalnih i antitumorskih citokina (IL-12, IFN- γ , TNF- α) i jača imunološki antitumorski odgovor. Dodatno, istodobna primjena CpG-ODN-a, CCL16 i blokade receptora za IL-10 može smanjiti tumorsku masu pojačavanjem lokalnog antitumorskog imunološkog odgovora. Inhibicija signalnog puta STAT3 potiče repolarizaciju TAM-ova iz M2 u M1 fenotip, što je opisano u različitim eksperimentalnim modelima, uključujući gliome. Aktivacija CD40 signalizacije primjenom agonističkih anti-CD40 protutijela povećava izražaj molekula MHC II i kostimulacijskih molekula poput CD86 te posljedično pojačava citotoksični imunološki odgovor. Također, timozin α 1 može potaknuti diferencijaciju TAM-ova prema fenotipu dendritičkih stanica, čime se pojačava antitumorski imunitet te potencijalno poboljšava preživljenje u metastatskoj bolesti (62).

4) Terapija monoklonalnim protutijelima koja pojačava antitumorsku aktivnost M1 makrofaga

Ciljana terapija anti-CD40 monoklonalnim protutijelima koja aktiviraju NF- κ B signalni put i anti-IL-10 blokirajućim monoklonalnim protutijelima koja uklanjaju imunosupresivni učinak IL-10 udružena sa standarnim liječenjem (kemoterapijom i radioterapijom) predstavlja daljnu mogućnost liječenja tumora poticanjem antitumorskog djelovanja M1 makrofaga (59, 62).



Slika 16. Shematski prikaz terapijskih strategija usmjerenih na TAM-ove, uključujući inhibiciju njihova nakupljanja, reprogramiranje imunosupresivnog M2 fenotipa prema protuupalnom M1 fenotipu te aktivaciju antitumorskog imunološkog odgovora. Preuzeto iz: Josephs DH, Bax HJ, Karagiannis SN. Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2015;7(2):334-351. Licenca: CC BY 4.0, izvor: [doi:10.2741/E735].

Osim navedenih, istražuju se dodatne mogućnosti imunoterapije WT-a. Složenost interakcija između TME-a i tumorskih stanica potvrđuju istraživanja na WT-u, koja su pokazala izražaj liganada za PD-1 (engl. *Programmed Death-1*) i TIGIT (engl. *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) na tumorskim stanicama (101). Navedeno otvara mogućnost imunoterapije uz aktivaciju NK stanica putem signalizacije IL-15, osobito u HLA-I (engl. *Human Leukocyte Antigen-I*) negativnim tumorima koji su “nevidljivi” CD8⁺ T limfocitima (110, 140, 141).

Polarizacija makrofaga je reverzibilan proces što pruža mogućnost inhibicije prelaska M1 u M2 fenotip ciljanjem NF-κB i STAT3 primjenom ATRA-e (engl. *All-Trans Retinoic Acid*), modulacijom redoks sustava (auranofin + vitamin C) te utišavanjem ID4 (engl. *Inhibitor of Differentiation 4*) (89).

Ključnu ulogu u polarizaciji makrofaga prema M2 fenotipu ima transkripcijski čimbenik STAT3, koji regulira izražaj brojnih medijatora, uključujući IL-6, IL-10 i VEGF, pridonoseći rastu tumora, angiogenezi i supresiji antitumorskog imunološkog odgovora (142). Dodatnu razinu regulacije predstavljaju mikroRNA (miRNA), koje sudjeluju u kontroli

diferencijacije, proliferacije i migracije stanica. Među njima se miRNA-506 ističe kao tumorsupresorska miRNA čija inhibicija signalnog puta STAT3 i modulacija izražaja IL-10 mogu potaknuti repolarizaciju TAM-ova iz M2 u M1 fenotip. Posljedično dolazi do povećane proizvodnje dušikovog oksida (NO), pojačane apoptoze tumorskih stanica i poboljšanog odgovora na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka imunološkog odgovora, uključujući anti-PD-1 protutijela. U pankreatičnom duktalnom adenokarcinomu (PDAC) snižen izražaj miRNA-506 povezan je s lošijom prognozom i imunosupresivnim TME-em, obilježenim smanjenom infiltracijom CD8⁺ T-limfocita. Ovi nalazi upućuju na potencijalnu primjenu terapija temeljenih na miRNA u kombinaciji s inhibitorima imunoloških kontrolnih točaka u liječenju imunoterapijski rezistentnih tumora (142).

Hipoksija u solidnim tumorima, posredovana HIF-1, potiče neoangiogenezu putem VEGFR-a i M2 polarizaciju makrofaga. Nadella i sur. pokazali su da niskodozno zračenje može reprogramirati makrofage u M1 fenotip, povećati iNOS i NO, potaknuti infiltraciju CD8⁺ T limfocita te smanjiti angiogenezu i pojačati antitumorski odgovor (143).

Istraživanje na stanicama visokoproliferativnog glioma IV. stupnja pokazalo je da lučenje M-CSF-a potiče polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu, pridonoseći tumorskoj proliferaciji. Izražaj M-CSF-a i zastupljenost M2 makrofaga se stoga smatraju potencijalnim prognostičkim biljezima i terapijskim metama (144).

Sherif i sur. pokazali su da visoki indeks imunološkog citotoksičnog odgovora (ICR), koji odražava Th1-dominantni citotoksični imunološki profil, korelira s boljom prognozom u osteosarkomu i neuroblastomu, dok takva povezanost nije uočena u WT-u. Lošije preživljenje povezano je s aktivacijom Wnt/ β -katenin signalnog puta i „wound-healing” tipom tumorskog mikrookoliša, obilježenog dominacijom M2 makrofaga, pojačanom angiogenezom i povećanom proliferacijom tumorskih stanica. Dodatno, uočen je doprinos aktivacije mTORC1 signalnog puta, koji predstavlja potencijalnu terapijsku metu, uključujući primjenu inhibitora poput rapamicina (111, 145).

Imunološke kontrolne točke PD-1 i CTLA-4 putem liganda (CD80/CD86) na antigenprezentirajućim stanicama reguliraju T-stanični odgovor na infekcije i maligne bolesti i sprječavaju autoimunost. PD-1 putem liganda PD-L1 posreduje imunoinhibiciju, dok CTLA-4 kompetitivno inhibira CD28-posredovanu kostimulaciju T limfocita vezanjem za CD80/CD86, čime suzbija protutumorski odgovor. Stoga, blokada CTLA-4 i PD-1/PD-L1 osi predstavlja ključni mehanizam imunoterapije solidnih tumora. CTLA-4 inhibicija pojačava ranu aktivaciju T stanica, a PD-1/PD-L1 blokada reaktivira iscrpljene T limfocite u TME-u (146). U kliničkoj primjeni registrirana su anti-CTLA-4 protutijela (ipilimumab), anti-PD-1 protutijela

(nivolumab, pembrolizumab) te anti-PD-L1 protutijela (atezolizumab, durvalumab, avelumab), koja se koriste u liječenju različitih solidnih tumora (99).

Tumorski kemokini i citokini, uključujući CCL2, CCL3, CXCL12, IL-6, IL-1 β , CSF-1 i VEGF-A, potiču infiltraciju monocita i M2 polarizaciju u TME-u, čime doprinose razvoju imunosupresivnog TME-a, osobito u uvjetima hipoksije. Ovi učinci djelomično su posredovani CXCL12–CXCR4/CXCR7 osi te inhibicijom RUNX3 signalnog puta (62, 64, 68). Središnju ulogu u migraciji i polarizaciji makrofaga u TME-u ima CCL2 (MCP-1), kojeg stvaraju stromalne i endotelne stanice oštećenih tkiva, ali i tumorske stanice (65, 146). CCL2 djeluje putem CCR2 receptora potičući mobilizaciju monocita iz koštane srži i njihovu migraciju u upalna i tumorska tkiva, gdje doprinose imunosupresiji i remodeliranju mikrookoliša (65, 146). Uloga CCL2–CCR2 osi potvrđena je u tumorigenezi pankreatičnog, ezofagealnog, hepatocelularnog karcinoma i karcinoma dojke (65). Dodatno, CCL2 i IL-6 potiču polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu te njihovo preživljenje, djelomično inhibirajući apoptozu povećanjem izražaja antiapoptotičkih proteina, uključujući cFLIP, Bcl-2 i Bcl-xL. Blokada CCR2 signalnog puta stoga predstavlja potencijalnu terapijsku strategiju s ciljem pojačanja antitumorskog imunološkog odgovora (146).

PI3K γ je izoforma fosfatidilinozitol-3-kinaze dominantno izražena u mijeloidnim stanicama, koja doprinosi infiltraciji imunoloških stanica u TME-u i progresiji tumora. Njegova inhibicija smanjuje izražaj imunosupresivnih čimbenika, uključujući IL-10, TGF- β i CCL2, te potiče stvaranje proinflamatornih citokina poput TNF- α i IL-12 u antigen-prezentirajućim stanicama. Posljedično dolazi do aktivacije T-limfocita i repolarizacije TME-a prema protutumorskom M1 fenotipu. U pretkliničkim modelima inhibicija PI3K γ , osobito u kombinaciji s inhibitorima kontrolnih točaka (anti-PD-1 protutijela: pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab; anti-PD-L1 protutijela: durvalumab; anti-CTLA-4 protutijela: ipilimumab), rezultira smanjenjem rasta tumora i poboljšanjem preživljenja (147). IL-4 i signalizacija PI3K/Akt/mTOR dodatno potiču polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu, što je obilježeno povećanom ekspresijom arginaze-1 (Arg1) i smanjenom ekspresijom inducibilne NO-sintaze (iNOS/NOS2). Suprotno, inhibicija navedenih signalnih putova pomiče funkcionalnu ravnotežu makrofaga prema M1 fenotipu, obilježenom pojačanim izražajem iNOS-a i povećanom produkcijom dušikovog oksida (NO), čime se pojačava njihova tumoricidna aktivnost (148). CCL2 dodatno potiče infiltraciju monocita te regrutaciju mijeloidno deriviranih supresorskih stanica (engl. Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC), čime doprinosi stvaranju imunosupresivnog TME-a i progresiji tumora. Modulacija ovih

signalnih i metaboličkih putova predstavlja potencijalnu strategiju za poticanje antitumorskog imunološkog odgovora i inhibiciju rasta tumora (64).

MDSC predstavljaju nezrele imunosupresivne mijeloidne stanice koje se nakupljaju u TME pod utjecajem tumorskih kemokina. U hipoksiji, posredovanoj HIF-1 α , MDSC aktiviraju Arg1 i iNOS, što dovodi do razgradnje L-arginina i stvaranja NO, smanjujući broj i funkcionalnu aktivnost T-limfocita te doprinoseći imunosupresiji i progresiji tumora. Primjena kemoterapije, uključujući gemcitabin, 5-fluorouracil, cisplatinu i docetaksel, smanjuje broj MDSC-a u tumoru, a docetaksel može dodatno potaknuti repolarizaciju makrofaga prema proinflamatornom M1 fenotipu, čime se potencijalno pojačava antitumorski imunološki odgovor (149).

JAK2/STAT3 signalni put ima ključnu ulogu u promicanju tumorskog rasta i imunosupresivnog TME-a, potičući polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu. Stoga predstavlja potencijalnu terapijsku metu za reprogramiranje TAM-ova (150, 151). Inhibicija JAK2/STAT3 puta pokazala je učinkovitost u pretkliničkim modelima karcinoma dojke, pluća i metastatskog karcinoma želuca, uključujući primjenu miRNA-214 i molekularnog inhibitora JAK2, AG490 (150, 151). Uz JAK2/STAT3, polarizaciju makrofaga moduliraju i Toll-like receptori (TLR) na imunim stanicama. Primjena TLR7/8 agonista resiquimoda može potaknuti repolarizaciju makrofaga prema proinflamatornom M1 fenotipu. Ograničavajući čimbenik je toksičnost resiquimoda, što trenutačno ograničava njegovu kliničku primjenu (150).

Istraživanje primjene nanokompleksa koji selektivno cilja M2 makrofage na eksperimentalnom modelu melanoma u miševa pomoću specifičnog M2 peptida, potvrdilo je mogućnost poticanja repolarizacije iz protumorskog M2 u protutumorski M1 fenotip, uz povećano lučenje proupalnih citokina (IL-12 i TNF- α), aktiviranje citotoksičnih T-limfocita i NK stanica i pojačavanje antitumorskog imunološkog odgovora (152).

Primjena bispecifičnih T-stanično preusmjeravajućih protutijela (engl. *T cell-Redirecting Antibodies*, TRAB) predstavlja inovativnu strategiju u liječenju tumora s niskom imunogenosti, odnosno onih u kojima se ne stvara dovoljno neoantigena. Ova terapija, u kombinaciji s inhibitorima kontrolnih točaka, antitumorskim cjepivima i CAR-T (engl. *Chimeric Antigen Receptor T-cell*) stanicama, pruža revolucionarni pristup u onkologiji (153). TRAB djeluju tako da preusmjeravaju T-limfocite prema tumorskim stanicama, čime se aktivira T-limfocitima posredovana citotoksičnost i omogućuje ciljano uništavanje malignih stanica. Klasičan primjer je blinatumomab, koji veže CD19 na površini B-stanica akutne limfoblastične leukemije (B-ALL) i CD3 na T-limfocitima, pospješujući citotoksični odgovor T-limfocita prema malignim B-stanicama (154). TRAB su osobito važni u liječenju slabije

imunogenih tumora, gdje tradicionalni pristupi imunoterapiji nisu dovoljno učinkoviti. Njihova kombinacija s inhibitorima kontrolnih točaka, cjepivima i CAR-T terapijom otvara nove mogućnosti u imunoterapiji tumora i preživljenju bolesnika (153).

Izražaj GPC3 u stanicama WT-a također predstavlja potencijalnu terapijsku metu za razvoj ciljanih pristupa liječenja, uključujući cjepiva, monoklonska i bispecifična protutijela, konjugate protutijelo-lijek i adaptivne stanične terapije, u liječenju uznapredovalog i metastatskog WT-a (155).

Kliničko iskustvo primjene imunoterapije usmjerene na GPC3 u liječenju tumora dječje dobi i dalje je vrlo ograničeno. Dosadašnja istraživanja su provedena na hepatoblastomu, WT-u, germinativnim tumorima i rabdomiosarkomima, u kojima je utvrđen pojačani izražaj GPC3. Istraživani terapijski pristupi uključuju: GPC3-peptidna cjepiva, monoklonska i bispecifična protutijela, CAR-T stanice te citotoksične T-limfocite usmjerene na GPC3 (123). Ishiguro i sur. su razvili ERY974, humanizirano IgG bispecifično protutijelo koje se veže na GPC3 na tumorskim stanicama i CD3 receptore na T-limfocitima, čime aktivira citotoksične T-limfocite protiv tumora. Učinkovitost ovog pristupa potvrđena je na mišjim modelima tumora (153).

GPC3 se, kao onkofetalni protein, pokazao posebno prikladnom metom za razvoj bispecifičnih T-stanično preusmjeravajućih protutijela (TRAB) zbog svog visokog izražaja u tumorskim tkivima jetre, bubrega, pluća, ovarija, testisa i gastrointestinalnog sustava i ograničene prisutnosti u zdravim tkivima odraslih osoba. Navedeno omogućuje usmjeravanje imunološkog odgovora prema tumorskim stanicama te smanjuje rizik od sistemne toksičnosti i nuspojava povezanih sa sindromom oslobađanja citokina (engl. *Cytokine Release Syndrome*, CRS) (155-157).

Istraživanja su pokazala da bispecifično protutijelo ERY974, usmjereno na GPC3 i CD3, potiče T-limfocitima posredovanu citotoksičnost, ali i značajno modulira TME, pretvarajući ga u izraženije proinflamatorno i antitumorsko okruženje (153). Sličan učinak opisan je i za GPC3/CD47 bispecifično protutijelo u liječenju HCC-a. Blokadom CD47 uklanja se inhibitorni signal za fagocitozu (engl. „*don't eat me*” signal), čime se povisuje omjer M1/M2 makrofaga, pojačava fagocitna aktivnost makrofaga i antitumorski imunološki odgovor (158). Imunoterapija peptidnim cjepivima usmjerenima na tumorske neoantigene i antigene poput GPC3, omogućuje poticanje specifičnog citotoksičnog T-staničnog odgovora bez značajnijih autoimunih nuspojava (159). U prvom kliničkom ispitivanju GPC3 cjepiva u bolesnika s uznapredovalim HCC-om potvrđena je sigurnost njegove primjene te je u 85,4 % ispitanika zabilježeno povećanje broja GPC3-specifičnih CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita u perifernoj

krvi i tumorskom tkivu, što upućuje na učinkovitu aktivaciju antitumorskog imunološkog odgovora (159).

Multicentrična studija GPC3-peptidnog cjepiva provedena u 18 pedijatrijskih bolesnika pokazala je razvoj GPC3-specifičnog citotoksičnog T-staničnog odgovora u 39 % bolesnika s hepatoblastomom. U pet ispitanika istodobno je zabilježeno četverogodišnje preživljenje bez recidiva bolesti, što upućuje na potencijalnu kliničku korist ove terapijske strategije u odabranoj skupini bolesnika (159).

Najnoviji pristupi u imunoterapiji uključuju razvoj personalizirane tumorske imunoterapije prilagođene molekularnim obilježjima pojedinih tumora. Primjer je GPC3-usmjerena CAR-T terapija, u kojoj se T limfociti genetski modificiraju uvođenjem kimeričkog antigenskog receptora (engl. *Chimeric Antigen Receptor*, CAR) specifičnog za GPC3, čime se omogućuje selektivno prepoznavanje i uništavanje tumorskih stanica koje izražavaju ovaj antigen. Na taj način stvoreno anti-GPC3-GC33 humanizirano monoklonalno protutijelo inducira protutijelima ovisnu stanično posredovanu citotoksičnost protiv GPC3-pozitivnih stanica HCC-a i omogućuje selektivno prepoznavanje i uništavanje tumorskih stanica koje izražavaju GPC3 (159). Navedeni rezultati podupiru daljnji razvoj GPC3 usmjerene imunoterapije, uključujući primjenu TCR-genetski modificiranih T-limfocita, kao moguće adjuvantne terapije u relapsnim i refraktornim pedijatrijskim solidnim tumorima (160).

Li i sur. razvili su novu generaciju CAR-T stanica temeljenih na nanoprotutijelima koje prepoznaju unutarstanične tumorske antigene prezentirane putem HLA molekula. U pretkliničkim istraživanjima pokazali su učinkovito ciljanje antigena WT1 i GPC3 te izraženu antitumorsku aktivnost, čime su proširili mogućnosti primjene CAR-T terapije na unutarstanične tumorske ciljeve (161).

Dodatnu mogućnost liječenja predstavlja codrituzumab, rekombinantno humanizirano anti-GPC3 protutijelo. Iako u kliničkim ispitivanjima nije pokazalo značajnu terapijsku učinkovitost, vezanjem za CD16/FcγRIIIa receptore na NK stanicama potiče protutijelima ovisnu citotoksičnost (engl. *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC) te može pridonijeti produljenju preživljenja bolesnika s visokorizičnim HCC-om (123). Zhou i sur. identificirali su novi GPC3 epitop, označen kao Pro-12, koji omogućuje snažnije i specifičnije vezanje protutijela na stanice HCC-a. Na temelju ovog epitopa razvijeno je bispecifično protutijelo usmjereno na GPC3/CD3, koje inhibira Wnt/ β -katenin i PI3K/AKT signalne puteve te aktivacijom T limfocita ostvaruje izravni citotoksični učinak na tumorske stanice (162).

Iako pojedina istraživanja upućuju na moguću povezanost prisutnosti makrofaga i izražaja GPC3 u različitim tumorima, dostupni podatci su oskudni, a u WT-u, prema dostupnoj literaturi, takva povezanost još nije istražena, posebice nakon primijenjene neoadjuvantne kemoterapije.

Takai i sur. prvi su imunohistokemijski utvrdili povezanost pojačanog izražaja GPC3 u HCC-u s povećanom infiltracijom CD68⁺ makrofaga. Pretpostavlja se da GPC3 posredno potiče infiltraciju makrofaga, sugerirajući njihovu moguću zajedničku ulogu u angiogenezi i rastu tumora. Zbog visokog izražaja u tumorskim stanicama GPC3 predstavlja potencijalnu metu ciljane imunoterapije, uključujući primjenu peptidnih cjepiva. Primjer klinički razvijenog pristupa je GC33, humanizirano monoklonsko protutijelo usmjereno na GPC3, koje modulira funkciju GPC3 i potiče antitumorski odgovor makrofaga, pri čemu ovaj učinak djelomično nastaje neovisno o protutijelima posredovanoj staničnoj citotoksičnosti (ADCC) (87). GPC3 predstavlja potencijalnu terapijsku metu u HCC-u ne samo zbog svoje uloge u aktivaciji signalnih putova Wnt/ β -katenin i Hedgehog i poticanju tumorskog rasta, već i zbog mogućnosti aktivacije makrofagima posredovanog antitumorskog odgovora. Vezanjem terapijskih protutijela na GPC3 dolazi do opsonizacije tumorskih stanica, koje zatim prepoznaju Fc γ receptori na makrofagima, čime se aktivira protutijelima ovisna fagocitoza tumorskih stanica (engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP). Sličan mehanizam potvrđen je u terapiji leukemija i limfoma rituksimabom te anti-HER2 (trastuzumab) i anti-EGFR (cetuksimab) protutijelima u karcinomu dojke i debelog crijeva (163).

Kliničko iskustvo primjene imunoterapije usmjerene na GPC3 u liječenju tumora dječje dobi i dalje je vrlo ograničeno. Unatoč tome, GPC3 predstavlja potencijalni probirni biljeg u svrhu bolje stratifikacije bolesnika, osobito u visokorizičnom i prognostički nepovoljnom WT-u. Njegov pojačani izražaj bi mogao pomoći u odabiru bolesnika koji bi mogli imati koristi od intenziviranog ili ciljano usmjerenog imunoterapijskog liječenja, kao i u postterapijskom praćenju bolesti (160).

Slično ulozi M2 makrofaga u stvaranju imunosupresivnog TME-a i smanjenju odgovora na kemoterapiju, povećani izražaj GPC3 povezuje se s pojačanim izražajem proteina uključenih u razvoj višestruke rezistencije na lijekove. Stoga prisutnost GPC3 u tumorskom tkivu, zajedno s infiltracijom M2 makrofaga, može biti pokazatelj tumora s agresivnijim biološkim ponašanjem, izraženijim imunosupresivnim fenotipom i potencijalno slabijim odgovorom na liječenje, što zahtijeva daljnja istraživanja, osobito u Wilmsovu tumoru (123, 155).

Budući da je GPC3 fiziološki izražen u brojnim tkivima tijekom fetalnog razvoja i u dojenčadi, posebice u jetri i bubrezima, terapije usmjerene na GPC3 u djece mogle bi izazvati veću toksičnost nego u odraslih te potencijalno nepovoljno utjecati na rast i razvoj. Zbog toga bi primjenu ovakvih terapija možda trebalo ograničiti na djecu dobi nakon navršene 1. godine života (123, 132).

5.1. Ograničenja istraživanja

Ova studija ima nekoliko ograničenja. Relativno mala veličina kohorte, kao i uključivanje bolesnika samo iz dvaju centara, može ograničiti generalizaciju naših nalaza. Zbog ograničenog uzorka nismo mogli provesti multivarijatne analize, stoga nije moguće isključiti mogućnost da su uočene povezanosti između analiziranih parametara barem djelomično međusobno uvjetovane. Prospektivne studije s većim kohortama potrebne su kako bi se ispitalo ostaju li ove povezanosti neovisne nakon odgovarajućih statističkih prilagodbi. Dodatno, kvantifikacija TAM-ova temeljila se na jednoj imunohistokemijskoj metodi. Buduće studije trebale bi primijeniti komplementarne metodologije, poput multipleks imunohistokemije s dodatnim biljezima M1 (CD86, iNOS) i M2 (CD203, CD204) makrofaga ili transkriptomskim profiliranjem, kako bi se bolje karakterizirali fenotipovi makrofaga. Izravne usporedbe WT-a liječenog s i bez neoadjuvantne kemoterapije bile bi osobito informativne za razjašnjenje promjena induciranih terapijom u TME-u.

Analiza izražaja GPC-3 je provedena primjenom jedne imunohistokemijske metode. Buduća istraživanja trebala bi uključiti molekularno-genetičke metode, poput kvantitativne analize mRNA GPC3 real-time PCR metodom, kako bi se preciznije utvrdila povezanost izražaja GPC3 s kliničkim i patohistološkim obilježjima WT-a.

Također, analiza preživljenja nije provedena zbog malog broja događaja u ispitivanoj kohorti. Stoga su buduća istraživanja koja uključuju veće populacije bolesnika i dulje razdoblje praćenja nužna za adekvatnu procjenu prognostičke vrijednosti polarizacije TAM-ova i jačine izražaja GPC3 u WT-u.

Prema našim saznanjima, ovo je istraživanje prvo koje sustavno procjenjuje populacije M1 i M2 makrofaga i izražaj GPC3 u WT-u nakon prijeoperativne kemoterapije u reprezentativnoj kohorti pedijatrijskih bolesnika.

Unatoč navedenim ograničenjima, naša studija pruža nova saznanja o raspodjeli TAM-ova u WT-u liječenom neoadjuvantnom kemoterapijom, pri čemu model odražava suvremenu

kliničku praksu u većini zemalja članica SIOP-a. Također, pruža uvid u izražaj GPC3 kao potencijalnog onkofetalnog biljega WT-a.

S obzirom na trajni rizik od relapsa kod visokorizičnog WT-a i pojavu farmakoloških strategija usmjerenih na M2 makrofage i GPC3 (104, 105, 152), opravdano je daljnje istraživanje TAM-ova i GPC3 kao prognostičkih biljega i terapijskih ciljeva.

6. ZAKLJUČCI

U ovoj studiji karakterizirali smo razdiobu M1 i M2 makrofaga u WT-u nakon neoadjuvantne kemoterapije te pokazali nisku ukupnu infiltraciju makrofaga uz prevlast M2-polariziranih stanica te pozitivan izražaj GPC3. Nadalje, pokazali smo da je polarizacija TAM-ova povezana s volumenom tumora, odabranim biokemijskim pokazateljima i histološkim podtipom WT-a. Ovi nalazi upućuju na to da sastav makrofaga može odražavati biologiju tumora i odgovor na liječenje u post-neoadjuvantnom okruženju. Buduće studije trebale bi potvrditi ova zapažanja u većim, neovisnim kohortama s produženim praćenjem te uključiti funkcionalne analize kako bi se razjasnila mehanicistička uloga M2 makrofaga u odgovoru na kemoterapiju i potencijalnoj otpornosti na liječenje. Dublje razumijevanje biologije TAM-ova u ovom kontekstu moglo bi konačno podržati razvoj novih prognostičkih biljega i terapijskih strategija usmjerenih na makrofage u WT-u.

U ovom istraživanju izostanak izražaja GPC3 bio je povezan s povišenim serumskim biljezima i većim udjelom nekroze, što može odražavati povoljan učinak kemoterapije. Dobiveni rezultati upućuju na potencijalnu dijagnostičku važnost GPC3 kao biljega povezanog s određenim biološkim karakteristikama WT-a, no njegova prognostička i prediktivna vrijednost zahtijeva potvrdu u većim, neovisnim kohortama bolesnika. Zbog visokog tumorski specifičnog izražaja i ograničene prisutnosti u zdravim tkivima u djece dobi nakon 1. godine života, GPC3 predstavlja potencijalni dijagnostički biljeg i atraktivnu terapijsku metu.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Wilmsov tumor (WT) najčešći je maligni tumor bubrega u dječjoj dobi. Iako je liječenje uspješno u većine bolesnika, molekularni i imunološki mehanizmi povezani s biologijom tumora, odgovorom na liječenje i prognozom još nisu u potpunosti razjašnjeni. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati razdiobu M1 i M2 makrofaga, izražaj glipikana-3 (GPC3) te njihovu povezanost s kliničkim, biokemijskim i histopatološkim obilježjima WT-a nakon neoadjuvantne kemoterapije.

Materijali i metode:

U istraživanje su uključeni uzorci tumorskog tkiva bolesnika s WT-om nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije. Imunohistokemijskim metodama analizirani su biljezi povezani s polarizacijom makrofaga i izražajem GPC3. Dobiveni rezultati uspoređeni su s kliničkim podacima, volumenom tumora, biokemijskim parametrima i histološkim podtipom tumora.

Rezultati:

Analizom je utvrđena niska ukupna infiltracija makrofaga uz prevlast M2-polariziranih makrofaga u tumorskom mikrokruženju. Polarizacija tumoru pridruženih makrofaga (TAM) bila je povezana s volumenom tumora, odabranim biokemijskim parametrima i histološkim podtipom WT-a. U većine uzoraka zabilježen je pozitivan izražaj GPC3, dok je izostanak njegovog izražaja bio povezan s povišenim serumskim biljezima i većim udjelom tumorske nekroze, što može upućivati na povoljniji odgovor na kemoterapiju.

Zaključak:

Rezultati ovog istraživanja upućuju na važnu ulogu tumorskog mikrokruženja, osobito M2-polariziranih makrofaga, u oblikovanju bioloških obilježja Wilmsova tumora nakon neoadjuvantne kemoterapije. GPC3 se nameće kao potencijalni dijagnostički biljeg i terapijska meta zbog svog visokog izražaja specifičnog za tumorsko tkivo te ograničene prisutnosti u zdravim tkivima. Za potvrdu prognostičke i prediktivne vrijednosti tumoru-pridruženih makrofaga (TAM-ova) i GPC3 potrebna su daljnja istraživanja na većim, neovisnim kohortama bolesnika, kao i razvoj novih terapijskih pristupa usmjerenih na modulaciju tumorskog mikrokruženja.

8. LAIČKI SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je istražiti razdiobu M1 i M2 makrofaga i izražaj glipikana-3 (GPC3) u uzorcima Wilmsova tumora (WT) te njihovu povezanost s kliničkim, biokemijskim i histopatološkim obilježjima tumora, a nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije. Rezultati su pokazali da u tumorskom mikrokolišu prevladavaju M2 makrofagi, koji su ujedno bili zastupljeniji u uzorcima WT-a s pozitivnim izražajem GPC3, osobito u uzorcima s jačim izražajem (3+), što ukazuje na moguću ulogu GPC3 u oblikovanju imunološkog mikrokoliša tumora. Zaključno, GPC3 bi mogao biti potencijalni dijagnostički biljeg i terapijska meta zbog svog visokog izražaja specifičnog za tumorsko tkivo te ograničene prisutnosti u zdravim tkivima.

9. SUMMARY

Title: PRESENCE OF CD80- AND CD163-POSITIVE MACROPHAGES AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF GLYPICAN-3 IN WILMS TUMOR AFTER NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

Aim of the study:

Wilms tumor (WT) is the most common malignant renal tumor in childhood. Although treatment is successful in the majority of patients, the molecular and immunological mechanisms underlying tumor biology, treatment response, and prognosis remain incompletely understood. The aim of this study was to analyze the distribution of M1 and M2 macrophages, the expression of glypican-3 (GPC3), and their association with clinical, biochemical, and histopathological characteristics of WT following neoadjuvant chemotherapy.

Materials and Methods:

Tumor tissue samples from patients with WT following neoadjuvant chemotherapy were included in this study. Immunohistochemical methods were used to analyze markers associated with macrophage polarization and GPC3 expression. The obtained results were correlated with clinical data, tumor volume, biochemical parameters, and histological tumor subtype.

Results:

The analysis revealed low overall macrophage infiltration with a predominance of M2-polarized macrophages within the tumor microenvironment. Tumor-associated macrophage (TAM) polarization was associated with tumor volume, selected biochemical parameters, and histological subtype of WT. Positive GPC3 expression was observed in the majority of tumor samples, whereas the absence of GPC3 expression was associated with elevated serum biomarkers and a greater extent of tumor necrosis, which may indicate a favorable response to chemotherapy.

Conclusion:

The findings of this study highlight the important role of the tumor microenvironment, particularly M2-polarized macrophages, in shaping the biological characteristics of Wilms tumor following neoadjuvant chemotherapy. GPC3 emerges as a potential diagnostic biomarker and therapeutic target due to its high tumor-specific expression and limited presence in normal tissues. Further studies involving larger, independent patient cohorts are required to validate the prognostic and predictive value of tumor-associated macrophages (TAMs) and GPC3, as well as to support the development of novel therapeutic strategies targeting the tumor microenvironment.

10. LAY SUMMARY

The aim of the study was to examine the distribution of M1 and M2 macrophages and the expression of glypican-3 (GPC3) in Wilms tumor samples, as well as their connection with clinical, biochemical, and histopathological characteristics of the tumor, after neoadjuvant chemotherapy. The results showed that M2 macrophages dominate the tumor microenvironment, and they were also more common in WT samples with positive GPC3 expression, especially in samples with stronger expression (3+), suggesting a possible role of GPC3 in shaping the tumor's immune microenvironment. In conclusion, GPC3 could be a potential diagnostic marker and therapeutic target due to its high expression in tumor tissue and limited presence in healthy tissues.

11. POPIS LITERATURE

1. Dome JS, Mullen EA, Argani P. Pediatric renal tumors. In: Orkin SH, Nathan DG, editors. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood. Osmo izdanje. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. str. 1714-46.
2. Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE, editors. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood. Osmo izdanje. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. str. 1714-46.
3. WHO Classification of Tumours Editorial Board ed. Pediatric Tumours, WHO Classification of Tumours, Volumen 7. Peto izdanje. Lyon: IARC Publications, 2022.
4. Rance TF. Case of fungus hematodes of the kidneys. *Med Phys J* 1814; 32: 19 - 25.
5. Wilms M. Die Mischgeschwülste der Niere. Leipzig, A Georgi, 1899.
6. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev.* 2000;92:31-45.
7. Li H, Hohenstein P, Kuure S. Embryonic kidney development, stem cells and the origin of Wilms tumor. *Genes (Basel).* 2021;12:318.
8. Gadd S, Huff V, Huang CC, Ruteshouser EC, Dome JS, Grundy PE, et al. Clinically relevant subsets identified by gene expression patterns support a revised ontogenic model of Wilms tumor: a Children's Oncology Group Study. *Neoplasia.* 2012; 14:742-756.
9. Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr Pathol.* 1990;10:1-36.
10. Beckwith JB. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. *Am J Med Genet.* 1998;79:268-73.
11. Szycho E, Apps J, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor: biology, diagnosis and treatment. *Transl Pediatr.* 2014;3:12-24.
12. Davidoff AM. Wilms tumor. *Adv Pediatr.* 2012;59:247-67.
13. Espinoza AF, Onwuka E, Siegel DA, Dai S, Vasudevan SA, Scheurer ME, et al. Incidence and Survival of Children and Adolescents With Wilms Tumor, United States, 2001-2020. *Cancer Med.* 2025. doi: 10.1002/cam4.70598.
14. Nakata, K, Colombet, M, Stiller, CA, Pritchard-Jones, K, Steliarova-Foucher, E, IICC-3 Contributors. Incidence of childhood renal tumours: An international population-based study. *Int. J. Cancer.* 2020; 147: 3313-27.
15. Green DM, D'Angio GJ, Beckwith JB, Breslow NE, Grundy PE, Ritchey ML, Thomas PR. Wilms tumor. *CA Cancer J Clin.* 1996;46:46-63.

16. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, et al.
International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study.
Lancet Oncol. 2017;18:719-31.
17. Knudson AG, Strong LC: Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney.
J Nat Cancer Inst 1972;48:313–324.
18. Jurić I, Pogorelić Z, Kuzmić-Prusac I, Biočić M, Jakovljević G, Stepan J, et al.
Expression and prognostic value of the Ki-67 in Wilms' tumor: experience with 48 cases.
Pediatr Surg Int. 2010;26:487-93.
19. Croatian National Cancer Registry . Cancer Incidence in Croatia 2017. Croatian Institute of Public Health; Zagreb, Croatia: 2020. [(accessed on 2 May 2025)]. Bulletin no. 42.
Available online: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/bilten-incidencija-raka-u-hrvatskoj-2017-godine>.
20. Gadd S, Huff V, Walz AL, Ooms AHAG, Armstrong AE, Gerhard DS, et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat Genet.* 2017;49:1487-94.
21. Vujanić GM, Gessler M, Ooms AHAG, Collini P, Coulomb-l'Hermine A, D'Hooghe E, et al. The UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 Wilms tumour pathology and molecular biology protocol. International Society of Paediatric Oncology–Renal Tumour Study Group (SIOP–RTSG). *Nat Rev Urol.* 2018;15:693-701.
22. Grundy PE, Breslow NE, Li S, Perlman E, Beckwith JB, Ritchey ML, et al.; National Wilms Tumor Study Group. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol.* 2005;23:7312-21.
23. Satoh Y, Nakadate H, Nakagawachi T, Higashimoto K, Joh K, Masaki Z, et al.
Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer.* 2006;95:541-7.
24. Dong L, Pietsch S, Englert C. Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. *Kidney Int.* 2015;88:684-90.
25. Bonetta L, Kuehn SE, Huang A, Law DJ, Kalikin LM, Koi M, et al. Wilms tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. *Science* 1990;250:994-7.
26. Hohenstein P, Pritchard-Jones K, Charlton J. The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors. *Genes Dev.* 2015;29:467-82.

27. Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:461-70.
28. Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, et al. Mutational activation of the β -catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms tumors. *Cancer Res*. 1999;59:3880-2.
29. Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of β -catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res*. 2000;60:6288-92.
30. Brown KW, Power F, Moore B, Charles AK, Malik KTA. Frequency and timing of loss of imprinting at 11p13 and 11p15 in Wilms' tumor development. *Mol Cancer Res*. 2008;6:1114-23.
31. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science*. 2007;315:642-5.
32. Brok J, Treger TD, Gooskens SL, van den Heuvel-Eibrink MM, Pritchard-Jones K. Biology and treatment of renal tumours in childhood. *Eur J Cancer*. 2016;68:179-95.
33. Reeve AE, Eccles MR, Wilkins RJ, Bell GI, Millow LJ. Expression of insulin-like growth factor-II transcripts in Wilms' tumour. *Nature*. 1985;317:258-60.
34. Sélénou C, Brioude F, Giabiconi E, Sobrier ML, Netchine I. IGF2: Development, Genetic and Epigenetic Abnormalities. *Cells*. 2022;11:1886.
35. Maschietto M, Charlton J, Perotti D, Radice P, Geller JI, Pritchard-Jones K, Weeks M. The IGF signalling pathway in Wilms tumours: a report from the ENCCA Renal Tumours Biology-driven drug development workshop. *Oncotarget*. 2014;5:8014-26.
36. Chagtai T, Christina Zill, Linda Dainese, Jenny Wegert, Suvi Savola, Sergey Popov, et al. Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. *J Clin Oncol*. 2016;34:3195-203.
37. Dome JS, Perlman EJ, Graf N. Risk stratification for wilms tumor: current approach and future directions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2014:215-23.
38. Nelson M.V., van den Heuvel-Eibrink MM, Graf N, Dome JS. New approaches to risk stratification for Wilms tumor. *Curr Opin Pediatr*. 2021;33: 40-8.

39. Williams RD, Al-Saadi R, Chagtai T, Popov SD, Messahel B, Sebire NJ, et al. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms tumor. *Clin Cancer Res.* 2010;16:2036-45.
40. Maschietto M, Williams RD, Chagtai T, Popov SD, Sebire NJ, Vujanic GM, et al. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS One.* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0092596.
41. Murphy AJ, Cheng C, Williams J, Shaw TI, Pinto MP, Dieseldorff-Jones K, et al. Genetic and epigenetic features of bilateral Wilms tumor predisposition in patients from the Children's Oncology Group AREN18B5-Q. *Nat Commun.* 2023 Dec 18;14(1):8006. doi: 10.1038/s41467-023-43730-0.
42. Kobayashi A, Valerius MT, Mugford JW, Carroll TJ, Self M, Oliver G, McMahon AP. Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell.* 2008;3:169-81.
43. Charlton J, Pavasovic V, Pritchard-Jones K. Biomarkers to Detect Wilms Tumors in Pediatric Patients: Where are We Now? *Future Oncology.* 2015;11:2221-34.
44. Shukrun R, Pode-Shakked N, Pleniceanu O, Omer D, Vax E, Peer E, et al. Tumorigenesis of Wilms tumor: involvement of cancer stem cells and the epithelial-mesenchymal transition. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61:482-90.
45. Maciaszek JL, Oak N, Nichols KE. Recent advances in Wilms' tumor predisposition. *Hum Mol Genet.* 2020;29:138-49.
46. Irtan S, Ehrlich PF, Pritchard-Jones K. Wilms tumor: "State-of-the-art" update, 2016. *Semin Pediatr Surg.* 2016;25:250-6.
47. Lansky SB, List MA, Lansky LL, Ritter-Sterr C, Miller DR. The measurement of performance in childhood cancer patients. *Cancer.* 1987;60:1651-6.
48. Van den Heuvel-Eibrink MM, Hol JA, Pritchard-Jones K, van Tinteren H, Furtwängler R, Verschuur AC, et al. International Society of Paediatric Oncology — Renal Tumour Study Group (SIOP–RTSG). *Nat Rev Urol.* 2017;14:743-52.
49. Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer.* 1978;41:1937-48.
50. Vujančić GM, Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. *J Clin Pathol.* 2010;63:102-9.
51. Vujančić GM, Parsons LN, D'Hooghe E, Treece AL, Collini P, Perlman EJ. Pathology of Wilms' tumour in International Society of Paediatric Oncology (SIOP) and Children's

- oncology group (COG) renal tumour studies: Similarities and differences. *Histopathology*. 2022;80:1026-37.
52. Ooms AHAG, Vujanić GM, D'Hooghe E, Collini P, L'Herminé-Coulomb A, Vokuhl C, et al. Renal Tumors of Childhood-A Histopathologic Pattern-Based Diagnostic Approach. *Cancers (Basel)*. 2020. doi: 10.3390/cancers12030729.
 53. Perlman EJ, Webster F, Chang KTE, Coulomb A, Galluzzo L, Graf NS, et al. Data set for reporting paediatric renal tumours: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR)*Histopathology*. 2025;87:183-96.
 54. National Comprehensive Cancer Network Pediatric Wilms Tumor Guidelines (Version 2.2025).
 55. Lopes RI, Lorenzo A. Recent advances in the management of Wilms' tumor. *F1000Res*. 2017. doi: 10.12688/f1000research.10760.1.
 56. de Kraker J, Graf N, van Tinteren H, Pein F, Sandstedt B, Godzinski J, et al. Reduction of postoperative chemotherapy in children with stage I intermediate-risk and anaplastic Wilms' tumour (SIOP 93-01 trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364:1229–35.
 57. Verschuur A, Van Tinteren H, Graf N, Bergeron C, Sandstedt B, de Kraker J. Treatment of pulmonary metastases in children with stage IV nephroblastoma with risk-based use of pulmonary radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2012;30:3533–39.
 58. Warmann SW, Furtwängler R, Blumenstock G, et al. Tumor biology influences the prognosis of nephroblastoma patients with primary pulmonary metastases: Results from SIOP 93-01/GPOH and SIOP 2001/GPOH. *Ann Surg*. 2011;254:155–62.
 59. Vujanić GM, Gessler M, Ooms AHAG, et al. Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP–RTSG 2016 protocol. *Nature Reviews Urology*. 2018;15:743–52.
 60. Josephs D H, Bax H J, Karagiannis S N, 2015. Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2015;7:293-308.
 61. Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin: August Hirschwald; 1858.
 62. Vakkila J, Jaffe R, Michelow M, Lotze MT. Pediatric cancers are infiltrated predominantly by macrophages and contain a paucity of dendritic cells: a major nosologic difference with adult tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2049-54.

63. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol*. 2017;10:58.
64. Meng J, Chen Y, Lu X, Ge Q, Yang F, Bai S, Liang C, Du. Macrophages and monocytes mediated activation of oxidative phosphorylation implicated the prognosis and clinical therapeutic strategy of Wilms tumour. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022;20:3399-408.
65. Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting tumor-associated macrophages in cancer. *Trends Immunol*. 2019;40:310-27.
66. Lampiasi N, Azzolina A. The Dual Role of Macrophages in Cancer: From Tumor Development to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2020. doi:10.3390/ijms21165838.
67. Poh A R, Ernst M. Targeting macrophages in cancer: from bench to bedside. *Front Oncol*. 2018. doi: 10.3389/fonc.2018.00049.
68. Tian K, Wang X, Wu Y, Wu X, Du G, Liu W, et al. Relationship of tumour-associated macrophages with poor prognosis in Wilms' tumour. *J Pediatr Urol*. 2020. doi: 10.1016/j.jpuro.2020.03.016.
69. Sánchez-Martín L, Estecha A, Samaniego R, Sánchez-Ramón S, Vega MÁ, Sánchez-Mateos P. The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood*. 2011;117:88-97.
70. Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol*. 2012;167:195-205.
71. Fujieda S, Sunaga H, Tsuzuki H, Fan GK, Saito H. IL-10 expression is associated with the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*. 1999;136:1–9.
72. Maturu P, Overwijk WW, Hicks J, Ekmekcioglu S, Grimm EA, Huff W, et al. Characterization of the inflammatory microenvironment and identification of potential therapeutic targets in Wilms tumors. *Trans Oncol*. 2014;7:484-92.
73. Holl EK, Routh JC, Johnston AW, Frazier V, Rice HE, Tracy ET, Nair SK. Immune expression in children with Wilms tumor: A pilot study. *J Pediatr Urol*. 2019. doi:10.1016/j.jpuro.2019.06.017.
74. Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, Pullano R, et al. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol*. 1999;146:255–64.

75. Filmus J. The function of glypicans in the mammalian embryo. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;322:694–98.
76. Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell.* 2008;14:700–11.
77. Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet.* 1996;12:241–7.
78. Wang SK, Zynger DL, Hes O, Yang XJ. Discovery and diagnostic value of a novel oncofetal protein: glypican 3. *Adv Anat Pathol.* 2014;21:450–60.
79. Tretiakova M, Zynger DL, Luan C, Andeen NK, Finn LS, Kocherginsky M, et al. Glypican 3 overexpression in primary and metastatic Wilms tumors. *Virchows Arch.* 2015;466:67–76.
80. Wari MN, Vallontheiel AG, Ahmed A, Saxena D, Iyer VK, Mathur SR, et al. Glypican-3 mRNA expression level in Wilms tumor: correlation with histological type, stage, and outcome. *Pediatr Surg Int.* 2017;33:695–703.
81. Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res.* 1997;57:5179–84.
82. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306:16–25.
83. Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, Roncalli M, Karamitopoulou E, Terracciano LM. Glypican-3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 2008;129:899–906.
84. Hartwig S, Hu MC, Cella C, Piscione T, Filmus J, Rosenblum ND. Glypican-3 modulates inhibitory Bmp2-Smad signaling to control renal development in vivo. *Mech Dev.* 2005;122:928–938.
85. White GRM, Kelsey AM, Varley JM, Birch JM. Somatic glypican 3 (GPC3) mutations in Wilms' tumour. *Br J Cancer.* 2002;86:1920–22.
86. Boily G, Saikali Z, Sinnett D. Methylation analysis of the glypican 3 gene in embryonal tumours. *Br J Cancer.* 2004;90:1606–11.
87. Gillan TL, Hughes R, Godbout R, Grundy PE. The Simpson-Golabi-Behmel gene, GPC3, is not involved in sporadic Wilms tumorigenesis. *Am J Med Genet A.* 2003;122A:30–36.

88. Takai H, Ashihara M, Ishiguro T, Terashima H, Watanabe T, Kato A, Suzuki M. Involvement of glypican-3 in the recruitment of M2-polarized tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2009;8:2329–38.
89. Hol JA, Lopez-Yurda MI, Van Tinteren H, Van Grotel M, Godzinski J, Vujanic G, et al. Prognostic significance of age in 5631 patients with Wilms tumour prospectively registered in International Society of Paediatric Oncology (SIOP) 93-01 and 2001. *PLoS One.* 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0221373.
90. Fiore P. F., Vacca P, Tumino N, Besi F, Pelosi A, Munari E, et al. Wilms' Tumor Primary Cells Display Potent Immunoregulatory Properties on NK Cells and Macrophages. 2021. doi: 10.3390/cancers13020224.
91. van den Heuvel-Eibrink MM, van Tinteren H, Bergeron C, Coulomb-L'Hermine A, de Camargo B, Leuschner I, et al. Outcome of localised blastemal-type Wilms tumour patients treated according to intensified treatment in the SIOP WT 2001 protocol, a report of the SIOP Renal Tumour Study Group (SIOP-RTSG). *Eur J Cancer.* 2015;51:498-506.
92. Groenendijk A, Spreafico F, de Krijger RR, Drost J, Brok J, Perotti D, et al. Prognostic Factors for Wilms Tumor Recurrence: A Review of the Literature. *Cancers (Basel).* 2021. doi: 10.3390/cancers13133142.
93. Liu L, Song Z, Gao XD, Chen X, Wu XB, Wang M, et al. Identification of the potential novel biomarkers as susceptibility gene for Wilms tumor. *BMC Cancer.* 2021. doi: 10.1186/s12885-021-08034-w.
94. Dome JS, Cotton CA, Perlman EJ, Breslow NE, Kalapurakal JA, Ritchey ML, et al. Treatment of anaplastic histology Wilms' tumor: results from the fifth National Wilms' Tumor Study. *J Clin Oncol.* 2006;24:2352-8.
95. Breslow N, Sharples K, Beckwith JB, Takashima J, Kelalis PP, Green DM, et al. Prognostic factors in nonmetastatic, favorable histology Wilms' tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study *Cancer* 1991;68:2345-53.
96. Haruta M, Arai Y, Okita H, Tanaka Y, Takimoto T, Sugino RP, et al. Combined Genetic and Chromosomal Characterization of Wilms Tumors Identifies Chromosome 12 Gain as a Potential New Marker Predicting a Favorable Outcome Neoplasia. 2019;21:117-31.
97. Reinhard H, Semler O, Bürger D, Bode U, Flentje M, Göbel U, et al. Results of the SIOP 93-01/GPOH trial and study for the treatment of patients with unilateral nonmetastatic Wilms Tumor. *Klin Padiatr.* 2004;216:132-40.
98. Irtan S, Van Tinteren H, Graf N, van den Heuvel-Eibrink MM, Heij H, Bergeron C, et al.

- Evaluation of needle biopsy as a potential risk factor for local recurrence of Wilms tumour in the SIOP WT 2001 trial. *Eur J Cancer*. 2019;116:13-20.
99. Weirich A, Leuschner I, Harms D, Vujanic GM, Tröger J, Abel U, et al. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Ann Oncol*. 2001;12:311-9.
 100. Devaud C, John LB, Westwood JA, Darcy PK, Kershaw MH
Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2013. doi: 10.4161/onci.25961.
 101. Liou P, Bader L, Wang A, Yamashiro D, Kandel JJ. Correlation of tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in Wilms tumor. *Vasc Cell*. 2013. doi: 10.1186/2045-824X-5-5.
 102. Hont AB, Dumont B, Sutton KS, Anderson J, Kentsis A, Drost J, et al. The tumor microenvironment and immune targeting therapy in pediatric renal tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2023. doi:10.1002/pbc.30110.
 103. Fujieda S, Inuzuka M, Tanaka N, Sunaga H, Fan GK, Ito T, et al. IL-10 expression is associated with the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*. 1999;136:1-9.
 104. Munir MT, et al. Tumor-Associated Macrophages as Multifaceted Regulators of Breast Tumor Growth. *Int J Mol Sci*. 2021. doi: 10.3390/ijms22126526.
 105. Cersosimo F, Lonardi S, Bernardini G, Telfer B, Mandelli GE, Santucci A, et al. Tumor-Associated Macrophages in Osteosarcoma: From Mechanisms to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2020. doi: 10.3390/ijms21155207.
 106. Fujiwara T, Healey J, Ogura K, Yoshida A, Kondo H, Hata T, et al. Role of Tumor-Associated Macrophages in Sarcomas. *Cancers (Basel)*. 2021. doi: 10.3390/cancers13051086.
 107. Kazumasa Mori, et al. Infiltration of M2 tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma correlates with tumor malignancy. *Cancers (Basel)*. 2011;3:3726-39. doi: 10.3390/cancers3043726.
 108. Hu JM, et al. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predict aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8:21526-38.
 109. Lee C, et al. M1 macrophage recruitment correlates with worse outcome in SHH Medulloblastomas. *BMC Cancer*. 2018. doi: 10.1186/s12885-018-4457-8.

110. Pinto ML, et al. The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.01875.
111. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2012. doi:10.1371/journal.pone.0050946.
112. Sherif S, Roelands J, Mifsud W, Ahmed EI, Raynaud CM, Rinchai D, et al. The immune landscape of solid pediatric tumors. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022. doi: 10.1186/s13046-022-02397-z.
113. Wang Z., Jin L., Wang J., Tian X., Mi T., Li M., Zhang Z., Wu X., Li M., Liu J., et al. Recruitment and polarization typing of tumor-associated macrophages is associated with tumor progression and poor prognosis in Wilms tumor patients. *PLoS ONE.* 2024. doi: 10.1371/journal.pone.0309910.
114. Yao B., Delaidelli A., Vogel H., Sorensen P.H. Pediatric Brain Tumours: Lessons from the Immune Microenvironment. *Curr. Oncol.* 2023;30:5024–46.
115. Cuadrado-Vilanova M., Liu J., Paco S., Aschero R., Burgueño V., Sirab N., Pascual-Pasto G., Correa G., Balaguer-Lluna L., Castillo-Ecija H., et al. Identification of immunosuppressive factors in retinoblastoma cell secretomes and aqueous humor from patients. *J. Pathol.* 2022;257:327–39.
116. Zhao Y., Zhang B., Zhang Q., Ma X., Feng H. Tumor-associated macrophages in osteosarcoma. *J. Zhejiang Univ. B.* 2021;22:885–92.
117. Münter D., de Faria F.W., Richter M., Aranda-Pardos I., Hotfilder M., Walter C., Paga E., Inserte C., Albert T.K., Roy R., et al. Multiomic analysis uncovers a continuous spectrum of differentiation and Wnt-MDK-driven immune evasion in hepatoblastoma. *J. Hepatol.* 2025;83:367–82.
118. Yu W., Biyik-Sit R., Uzun Y., Chen C.-H., Thadi A., Sussman J.H., Pang M., Wu C.-Y., Grossmann L.D., Gao P., et al. Longitudinal single-cell multiomic atlas of high-risk neuroblastoma reveals chemotherapy-induced tumor microenvironment rewiring. *Nat. Genet.* 2025;57:1142–54.
119. Wu Y, Liu H, Weng H, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2009;100:1223-29.
120. Shimizu Y, Suzuki T, Yoshikawa T, Endo I, Nakatsura T. Next-generation cancer immunotherapy targeting glypican-3. *Front Oncol.* 2019. doi:10.3389/fonc.2019.00248.

121. Kim YH, Lee JH, Kim KS, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2009;100:1223-29.
122. Kaseb AO, Hassan M, Lacin S, Abdel-Wahab R, Amin HM, Shalaby A, et al. Evaluating clinical and prognostic implications of glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:69916-26.
123. Chan ES, Pawel BR, Corao DA, Venneti S, Russo P, Santi M, Sullivan LM. Immunohistochemical expression of glypican-3 in pediatric tumors: an analysis of 414 cases. *Pediatr Dev Pathol.* 2013;16:272-77.
124. Ortiz MV, Roberts SS, Glade Bender J, Shukla N, Wexler LH. Immunotherapeutic targeting of GPC3 in pediatric solid embryonal tumors. *Front Oncol.* 2019. doi:10.3389/fonc.2019.00108.
125. Zynger DL, Gupta A, Luan C, Chou PM, Yang GY, Yang XJ. Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. *Hum Pathol.* 2008;39:224-30.
126. Toretsky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, Voigt RW, Strauch ED, Sun CC, Huber R, Meltzer SJ, Schlessinger D. Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001;23:496-99.
127. Qian Y, et al. Relationship of tumour-associated macrophages with poor prognosis in Wilms' tumour. *J Pediatr Urol.* 2020. doi:10.1016/j.jpuro.2020.03.016.
128. Rogers S, et al. Correlation of tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60:1096-101.
129. Gao H, Li K, Tu H, Pan X, Jiang H, Shi B, Kong J, Wang H, Yang S, Gu J, Li Z. Development of T cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20:6418–28.
130. Wright KD, Green DM, Daw NC. Late effects of treatment for wilms tumor. *Pediatr Hematol Oncol.* 2009;26:407-13.
131. Lee JS, Padilla B, DuBois SG, Oates A, Boscardin WJ, Goldsby RE. Second malignant neoplasms among children, adolescents and young adults with Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62:1259-64.
132. Hont AB, Cruz CR, Ulrey R, O'Brien B, Stanojevic M, Datar A, et al. Immunotherapy of relapsed and refractory solid tumors with ex vivo expanded multi-tumor associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes: A phase I study. *J Clin Oncol.* 2019;37:2349-59.

133. Palmisani F, Kovar H, Kager L, Amann G, Metzelder M, Bergmann M. Systematic review of the immunological landscape of Wilms tumors. *J Pers Med*. 2024. doi:10.3390/jpm14080842.
134. Nywening TM, Wang-Gillam A, Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Cusworth BM, et al. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:651–62.
135. Anfray C, Ummarino A, Andón FT, Allavena P. Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses. *Cells* 2019;9:46.
136. Josephs DH, Bax HJ, Karagiannis SN. Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2015;7:334-51.
137. Sawa-Wejksza K, Kandefer-Szerszeń M. Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66:97-111.
138. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002;196:254-65.
139. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2019;19:369–82.
140. Anderson NR, Minutolo NG, Gill S, Klichinsky M. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2021;81:1201-8.
141. Pinto A, et al. Wilms' tumor primary cells display potent immunoregulatory properties on NK cells and macrophages. *Front Immunol*. 2021. doi:10.3389/fimmu.2020.614716.
142. Mattis AJ, Chen JF, Gonzalez IA, Rais R, Dehner LP, Pfeifer J, He M. Immune checkpoint markers and tumour mutation burden in Wilms tumour: a study of 59 cases. *Pathology*. 2024;56:814-25.
143. Yang T, Han Y, Chen J, Liang X, Sun L. MiR-506 promotes antitumor immune response in pancreatic cancer by reprogramming tumor-associated macrophages toward an M1 phenotype. *Biomedicines*. 2023. doi:10.3390/biomedicines11112874.
144. Nadella V, Singh S, Jain A, Jain M, Vasquez KM, Sharma A, et al. Low dose radiation primed iNOS⁺ M1 macrophages modulate angiogenic programming of tumor derived endothelium. *Mol Carcinog*. 2018;57:1664-71.

145. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol.* 2008;216:15-24.
146. Cantoni C, Vellone VG, Cafferata B, Gaggero G, Serra M, Spreafico F, et al. Tumor microenvironment and immune response against Wilms tumor: evasion mechanisms and implications for immunotherapeutic approaches. *Cancers (Basel).* 2026. doi:10.3390/cancers18060908.
147. Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b⁺ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem.* 2009;284:34342-54.
148. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem C, Gorjestani S, et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature.* 2016;539:437-42.
149. Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of organ injury and repair by macrophages. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:593-626.
150. Belderbos RA, Aerts JGJV, Vroman H. Enhancing Dendritic Cell Therapy in Solid Tumors with Immunomodulating Conventional Treatment. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;13:67-81.
151. Lampiasi N, Azzolina A, Umezawa K, Montalto G, Cervello M. The role of macrophages in hepatocellular carcinoma and the potential use of macrophage-targeted therapies. *World J Gastroenterol.* 2014;20:14133-39.
152. Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, et al. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology.* 2013;80:273-82.
153. Han S, Wang W, Wang S, Yang T, Zhang G, Wang D, et al. Tumor microenvironment remodeling and tumor therapy based on M2-like tumor associated macrophage-targeting nano-complexes. *Theranostics.* 2021;11:2892-916.
154. Ishiguro T, Sano Y, Komatsu SI, Kamata-Sakurai M, Kaneko A, Kinoshita Y, et al. An anti-glypican 3/CD3 bispecific T cell-redirecting antibody for treatment of solid tumors. *Sci Transl Med.* 2017. doi:10.1126/scitranslmed.aal4291.
155. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16:57-66.

156. Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*. 2011;47:333-338.
157. Ishiguro T, Sano Y, Komatsu SI, Kamata-Sakurai M, Kaneko MK, Kato Y, et al. An anti-glypican 3 bispecific antibody for cancer immunotherapy. *Cancer Sci*. 2021;112:1878-88.
158. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25:625-38.
159. Du K, Li Y, Liu J, Chen W, Wei Z, Luo Y, Liu H, Qi Y, Wang F, Sui J. A bispecific antibody targeting GPC3 and CD47 induced enhanced antitumor efficacy against dual antigen-expressing HCC. *Mol Ther*. 2021;29:1572-1584.
160. Shimizu Y, Suzuki T, Yoshikawa T, Endo I, Nakatsura T. Next-generation cancer immunotherapy targeting glypican-3. *Front Oncol*. 2019. doi:10.3389/fonc.2019.00248.
161. Tsuchiya N, Hosono A, Yoshikawa T, Shoda K, Nosaka K, Shimomura M, et al. Phase I study of glypican-3-derived peptide vaccine therapy for patients with refractory pediatric solid tumors. *Oncoimmunology*. 2017. doi:10.1080/2162402X.2017.1377872.
162. Li H, Zhong D, Luo H, Shi W, Xie S, Qiang H, et al. Nanobody-based CAR T cells targeting intracellular tumor antigens. *Biomed Pharmacother*. 2022. doi:10.1016/j.biopha.2022.113919.
163. Zhou X, Liu Y, Liu X, Song X, Li S, Chen P, Jiang X, Li Y. Novel GPC3 N-terminal bispecific antibody exhibits dual anti-tumor effect against tumor cells. *Invest New Drugs*. 2025;43:588-601.
164. Weiskopf K, Weissman IL. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *mAbs*. 2015;7:303-10.

12. ŽIVOTOPIS

Opći podatci:

Ime i prezime: Karolina Malić Tudor, dr.med.

Datum rođenja: 20.06.1969.

Mobitel: +385 91 5612960

E-mail: karolina.malic-tudor@kbsplit.hr, malictudor.k@gmail.com

Školovanje:

1984.-1988. Zdravstvena škola, Split, smjer laborantski tehničar

1988.-1994. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski studij Split

Stečena titula: doktor medicine

2000.-2002. Poslijediplomski stručni studij iz Hitne i intenzivne medicine, Sveučilište u Zagrebu

2007-2011. Specijalizacija iz pedijatrije

Stečena titula: specijalist pedijatrije

2008-2010. Poslijediplomski stručni studij Biomedicina razvojne dobi, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

2017.-2019. Uža specijalizacija iz dječje hematologije i onkologije

06./2018.-12.2018. Uža specijalizacija iz dječje hematologije i onkologije u referentnim centrima: KBC Zagreb i Klinici za dječje bolesti, Klaićeva, Zagreb

Stečena titula: uži specijalist dječje hematologije i onkologije

2017. – danas polaznica Poslijediplomskog doktorskog studija Biologija novotvorina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Radno iskustvo:

1996.-1998. Dom zdravlja Splitsko-dalmatinske županije, liječnički pripravnički staž

1998. -2004. Dom zdravlja Hvar, Hitna medicinska pomoć, liječnik opće medicine

2004- 2007. Ustanova za hitnu medicinsku pomoć Split, liječnik opće medicine

2007-2015. Dom zdravlja Splitsko-dalmatinske županije- specijalist pedijatar

od 2015.- Klinički bolnički centar Split; Klinika za dječje bolesti; Odjel za dječju

hematologiju i onkologiju- specijalist

pedijatar, uži specijalist dječje hematologije i onkologije

Dodatna edukacija:

Preceptorship Pediatric and Adolescent ALL, Utrecht, the Netherlands, November 25.-26.2021, PrincessMaxima Center, pediatric oncology.

2018.- Klinika za dječje bolesti Zagreb

2018.- Klinika za dječje bolesti, KBC Zagreb

2017. - Open medical institute, the Salzburg CHOP seminar.

2008.- APLS tečaj

Od 2007.- Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, Split, redoviti polaznik

Nastavna aktivnost:

2017.-danas: suradničko zvanje naslovnog asistenta pri Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, znanstveno područje Biomedicina i zdravstvo, znanstveno polje Kliničke medicinske znanosti, znanstvena grana Pedijatrija

- sudjelujem u nastavi dodiplomskog studija Medicinskog fakulteta sveučilišta u Splitu na hrvatskom i engleskom jeziku, zatim studija Dentalne medicine Sveučilišta u Splitu i Fakulteta zdravstvenih znanosti Sveučilišta u Splitu)

- sudjelujem u nastavi poslijediplomskog specijalističkog studija Pedijatrija (Pedijatrijska hematologija i onkologija, Pedijatrijska imunologija).

Članstva u strukovnim organizacijama:

Hrvatska liječnička komora

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko pedijatrijsko društvo

Sekcija za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju (SEPHO)

Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti (KROHEM)

- Radna skupina za bolesti hemostaze i tromboze

- Radna skupina za benigne hematološke bolesti

Nacionalna grupa za renalne tumore pri Umbrella SIOP RTSG

Europsko društvo za pedijatrijsku onkologiju (The European Society for Paediatric Oncology-SIOPE).

Jezici:

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici: engleski

Znanstveni doprinos- publikacije i sažetci sa skupova:

1. Rogulj M, Malić Tudor K, Bralić T, Jukić Guć J, Ogorevc M, Čubelić J, Kapor Jeričević S. Folic acid level of children with atopy/asthma and children without chronic allergic disease: should we consider nutritional fortification? *Nutrients*. 2026;18(9):1368. doi:10.3390/nu18091368.
2. Malić Tudor K, Zekić Tomaš S, Dunatov Huljev A, Armanda Bogdan V, Matana A, Ogorevc M, Seiwerth S, Krušlin B, Stepan Giljević J, Kuzmić Prusac I. Tumor-associated macrophage polarization in Wilms' tumor after neoadjuvant chemotherapy. *Cancers (Basel)*. 2026;18(5):810. doi:10.3390/cancers18050810.
3. Quarello P, Dandis R, Van den Heuvel-Eibrink M, et al. Characteristics and outcome of congenital mesoblastic nephroma: a report of 378 patients registered on SIOP 93-01, SIOP WT 2001, UK-Import, and AIEOP protocols. *Pediatr Blood Cancer*. 2025;72(Suppl):S360.
4. Ondrova B, Vinakurau S, Zapletalova S, et al. Clinical results, acute and late toxicity after proton radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma in pediatric patients: retrospective analysis. *Pediatr Blood Cancer*. 2025;72(Suppl):S205.
5. Malić Tudor K. Primarni i sekundarni tumori pluća u djece – mogućnosti i izazovi imunološkog liječenja. In: Pavić I, Mladinov S, editors. *Imunološka terapija u pulmologiji*. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2024.

6. Malić Tudor K, Armanda V. Stečena koagulopatija u trogodišnjeg dječaka s makrohematurijom – prikaz bolesnika. *Paediatr Croat.* 2024;68(1):48-54. doi:10.13112/PC.2024.7.
7. Moreira DC, Qaddoumi I, Chen Y, Bhakta N, Chantada GL, Santana VM, et al.; Global Registry of COVID-19 in Childhood Cancer. Outcomes of SARS-CoV-2 infection in 126 children and adolescents with central nervous system tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2023;70(8):e30402. doi:10.1002/pbc.30402.
8. Kranjčec I, Matijašić Stjepović N, Buljan D, Ružman L, Malić Tudor K, Jović Arambašić M, Pavlović M, Rajačić N, Lovrinović Grozdanić K, Brković T, Šantić K, Roganović J. Management of childhood iron deficiency anemia in a developed country—A multi-center experience from Croatia. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(24):3607. doi:10.3390/diagnostics13243607.
9. Runjic E, Jelcic Kadic A, Bastian L, Lozic M, Buljubasic Soda M, Petrovic M, Malić Tudor K, Kuljis D, Armanda V, Lozic B. Clinical and cytogenetic characteristics of children with leukemia: 20-year retrospective study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2023;45(2):e161-e166. doi:10.1097/MPH.0000000000002529.
10. Malić Tudor K, Batinić M, Rogulj M, Armanda V, Zekić Tomas S, Franić Simić I. A 16-year-old adolescent with mediastinal seminoma: a case report and literature review. *J Pediatr Rev.* 2022;10(4):331-340. doi:10.32598/jpr.10.4.1048.1.
11. Mukkada S, Bhakta N, Chantada GL, Chen Y, Vedaraju Y, Faughnan L, et al.; Global Registry of COVID-19 in Childhood Cancer. Global characteristics and outcomes of SARS-CoV-2 infection in children and adolescents with cancer (GRCCC): a cohort study. *Lancet Oncol.* 2021;22(10):1416-1426. doi:10.1016/S1470-2045(21)00454-X.
12. Malić Tudor K, Armanda V, Kuljiš D, Demo M. Dijagnostički pristup djetetu s anemijom. *Paediatr Croat.* 2021;65(Supl 1):59-68.
13. Malić Tudor K, Čulić S, Armanda V, Kuljiš D. Uspješna primjena rituksimaba u dječaka s Evansovim sindromom - prikaz bolesnika. *Paediatr Croat.* 2017;61(4):187-190. doi:10.13112/PC.2017.27.
14. Meštrović J, Sršen S, Malić Tudor K. Djeca s posebnim zdravstvenim potrebama u hitnoj pedijatrijskoj službi. *Paediatr Croat.* 2011;55(1):7-9. doi:10.13112/pc.805.

Autorstvo sveučilišnih priručnika i stručne literature:

Malić Tudor K. Primarni i sekundarni tumori pluća u djece – mogućnosti i izazovi imunološkog liječenja. In: Pavić I, Mladinov S, editors. Imunološka terapija u pulmologiji. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2024.

Prijevod poglavlja Merck Manuals Pedijatrija 2023.

-poglavlje 348: Tumori dječje dobi

-poglavlje 349: Perinatalni hematološki poremećaji

Aktivno sudjelovanje kao predavač:

12. Kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija 13.-16. listopada 2016.:“Od autoimune hemolitičke anemije do Evansovog sindroma“- poster prezentacija.

Open medical institute, the Salzburg CHOP seminar "Pediatric Hematology/Oncology, 23.-29.04.2017., aktivni sudionik s prikazom slučaja: Non Hodgkin's lymphoma DLBCL in infant. "Global Experts Meeting on European Pediatrics, Roma, 17.-19.10.2019. aktivni sudionik s predavanjem: Successful treatment a boy with Evans syndrome.

37. Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, Split, 19.–23. travnja 2021., aktivni sudionik, predavač s temom: „Dijagnostički pristup djetetu s anemijom“.

38. Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, Split, 25.-29.travnja 2022., aktivni sudionik s predavanjem „Ishod Covid19 infekcije u djece s malignom bolešću“.

15. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva, Rovinj, 12.-15.10.2023., Klinička i citogenetska obilježja djece oboljele od leukemije- poster prezentacija

XVII poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije 9.-12.5.2024. Imunološka terapija u pulmologiji. Malić Tudor K. Primarni i sekundarni tumori pluća u djece – mogućnosti i izazovi imunološkog liječenja.

6-7.9.2024.: KROHEM- 4. sastanak radne skupine za benigne hematološke bolesti- Brijuni, Liječenje akutne bolne epizode u dječaka s drepanocitozom-prikaz slučaja.