

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

IVANKA URLIĆ, dr. med.

**IZRAŽAJ INVERSINA, ARH i GIPC1 U SVIJETLOSTANIČNOM KARCINOMU
BUBREGA**

Doktorski rad

Split, 2025.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

IVANKA URLIĆ, dr. med.

**IZRAŽAJ INVERSINA, ARH i GIPC1 U SVIJETLOSTANIČNOM KARCINOMU
BUBREGA**

Doktorski rad

Split, 2025.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za temeljna istraživanja krvožilnog sustava pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Natalija Filipović

ZAHVALE

Neizmjereno hvala dragoj mentorici i prijateljici prof. dr. sc. Nataliji Filipović na usmjerenju i vođenju, na strpljenju i upornosti, nesebičnoj pomoći, izdvojenom vremenu i dostupnosti, neovisno bio radni dan ili ne. Hvala na cjelokupnom trudu u svim etapama izrade ovog rada. Od srca hvala na bezuvjetnoj velikoj osobnoj podršci i poticanju kroz sve godine.

Hvala dragoj prof. dr. sc. Katarini Vukojević na ukazanoj prilici. Hvala Vam na podršci i pomoći u realizaciji ovog rada.

Hvala dragoj prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov na doprinosu ovom radu svojim konstruktivnim savjetima. Hvala Vam na toplini, trudu, dostupnosti i ekspeditivnosti.

Hvala djelatnicima Klinike za onkologiju i radioterapiju KBC Split na stručnoj pomoći u svakodnevnom radu, a najviše hvala dragoj doc. dr. sc. Mariji Ban, na pomoći svojim savjetima i prijedlozima i u izradi ovog rada. Hvala na uvijek otvorenim vratima.

Hvala kolegi i prijatelju doc. dr. sc. Benjaminu Benzoni, hvala dr. sc. Aniti Racetin i dr. sc. Neli Kelam.

Hvala svim koautorima objavljenog rada.

Hvala mojoj Marini, Erci, Gogi, Sonji i Rozani, pravim riječima biste me uvijek potaknule za nastaviti dalje.

Neizmjereno hvala suprugu Marjanu, mom vjetru u leđa, osloncu i najvećem navijaču. Hvala ti na velikoj podršci, na pomoći i motivaciji, a najviše na razumijevanju. Hvala našim trima malim suncima, što su me istrpjeli posljednjih mjeseci.

Beskrajno, riječima neizrecivo hvala mojim roditeljima, mami Adi i tati Milanu, bez kojih ne bih uspjela, koji su me podupirali na svakom koraku u životu pa tako i u ovom izazovu. Hvala vam na svojoj ljubavi i brizi, hvala na nebrojenim cjelodnevnim čuvanjima jednog ili svo troje djece, čineći to uz neopisivu lakoću i toplinu. Hvala na beskrajnim satima provedenim s bebama oko zgrade fakulteta. Omogućili ste mi da se mogu posvetiti radu, od prvih pokušaja bojenja uzoraka nekoliko godina unatrag do zadnjeg napisanog retka.

Ovaj rad je vaše vrijeme, vaš uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak bubrega.....	2
1.1.1. Epidemiologija	2
1.1.2. Etiologija.....	3
1.1.3. Patologija svijetlostaničnog karcinoma bubrega.....	4
1.1.4. Dijagnostika raka bubrega	5
1.1.5. Određivanje stadija raka bubrega.....	6
1.1.6. Liječenje raka bubrega	8
1.1.6.1. Liječenje lokaliziranog i lokoregionalnog raka bubrega.....	8
1.1.6.2. Adjuvantno liječenje lokalnog i lokoregionalnog raka bubrega	9
1.1.6.3. Liječenje metastatskog raka bubrega	10
1.1.7. Prognoza	12
1.2. WNT signalizacijski put.....	14
1.2.1. Uloga WNT signalizacijskog puta u zloćudnim tumorima	15
1.2.2. Inversin	16
1.3. Vezikularni transport.....	18
1.3.1. ARH.....	19
1.3.2. GIPC1	22
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	25
3. METODE I MATERIJALI	27
3.1. Ispitanici.....	28
3.2. Postupci.....	29
3.2.1. Imunofluorescencijsko bojenje	29
3.2.1.1. Mikroskopska analiza	30
3.2.2. Izolacija RNA i RT-qPCR za <i>INVS</i>	31
3.3. Statistički postupci.....	32
3.4. Bioinfomatička analiza	33
3.4.1. Izražaj <i>INVS</i> u bubregu i <i>INVS</i> interaktomska mreža.....	33
3.4.2. Preživljenje i statistička analiza u TCGA-KIRC kohorti	33
3.4.3. Povezanost <i>INVS</i> , njegovog interaktoma i imunosnog mikrokoliša	34
4. REZULTATI	35
4.1. Demografska i kliničko-patološka obilježja.....	36
4.2. Izražaj <i>INVS</i> i mRNA <i>INVS</i> u svijetlostaničnom karcinomu bubrega	37

4.3. Izražaj ARH u svijetlostaničnom karcinomu bubrega	40
4.4. Izražaj GIPC1 u svijetlostaničnom karcinomu bubrega	43
4.5. Rezultati mRNA <i>INVS</i> rtPCR analize	45
4.6. Usporedba izražaja <i>INVS</i> , <i>ARH</i> i <i>GIPC1</i> s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega	46
4.6.1. Usporedba izražaja <i>INVS</i> s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega.....	46
4.6.2. Usporedba izražaja <i>ARH</i> s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega.....	48
4.6.3. Usporedba izražaja <i>GIPC1</i> s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega.....	50
4.7. Dodatna bioinformatička analiza iz javno dostupne baze TCGA-KIRC.....	53
4.7.1. Analiza povezanosti izražaja <i>INVS</i> u ccRCC-u s preživljenjem bolesnika	53
4.7.2. Analiza povezanosti izražaja <i>INVS</i> interakcijskih partnera u ccRCC-u i preživljenja bolesnika.....	55
4.7.3. Analiza povezanosti izražaja <i>INVS</i> i njegovih interakcijskih partnera u ccRCC-u s leukocitnom infiltracijom i imunomodulatorima.....	58
4.7.4. Analiza povezanosti izražaja <i>ARH</i> i <i>GIPC1</i> u ccRCC-u sa preživljenjem bolesnika	61
5. RASPRAVA	63
6. ZAKLJUČCI.....	69
7. SAŽETAK	71
8. SUMMARY	73
9. LAIČKI SAŽETAK	75
10. LITERATURA.....	77
11. ŽIVOTOPIS.....	98

POPIS KRATICA I OZNAKA

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO)

ASR - dobno standardizirana stopa (eng. *age-standardized rate*)

MIR - omjer mortaliteta i incidencije (eng. *mortality-to-incidence ratio*)

BMI – indeks tjelesne mase (eng. *body mass index*)

RCC - rak bubrežnih stanica (eng. *renal cell carcinoma*)

ccRCC - svijetlostanični karcinom bubrega (eng. *clear cell renal cell carcinoma*)

VHL - von Hippel-Lindau

HIF1 α - hipoksija inducibilni transkripcijski faktor 1 α (eng. *hypoxia inducible transcription factor alpha*)

AD - autosomno dominantno

MET - mezenhimsko-epitelna transformacija (eng. *mesenchymal epithelial transition*)

mTOR – mehanistički cilj rapamicina (eng. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*)

ISUP - Međunarodno udruženje uroloških patologa (eng. *International Society of Urological Pathology*)

eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (eng. *estimated glomerular filtration rate*)

MSCT - kompjutorizirana tomografija (eng. *multi slice computed tomography*)

MRI - magnetska rezonanca (eng. *Magnetic Resonance Imaging*)

AJCC - Američko društvo za rak (*American Joint Committee on Cancer*)

TNM – tumor, limfni čvor, metastaza (eng. *tumor, node, metastasis*)

NCCN - Nacionalna sveobuhvatna mreža za borbu protiv raka (eng. *National Comprehensive Cancer Network*)

NSS – parcijalna nefrektomija (engl. *nephron-sparing surgery*)

DFS - preživljenje bez znakova bolesti (eng. *disease free survival*)

TKI - tirozin kinazni inhibitor

VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

PDGFR- α i - β - receptor za faktor rasta krvnih pločica - α i - β (eng. *platelet-derived growth factor receptor - α i - β*)

FGFR1 - receptor za faktor rasta fibroblasta (eng. *fibroblast growth factor receptor 1*)

FLT3 - fms-slična tirozin kinaza 3 (eng. *fms-related tyrosine kinase 3*)

c-KIT - receptor faktora matičnih stanica (eng. *stem cell factor receptor*)

RET - preuređen tijekom transfekcije (eng. *rearranged during transfection*)

CSF1R - faktor stimulacije kolonija 1 (eng. *colony stimulating factor 1*)

PD-1 - programirani protein 1 stanične smrti (eng. *programmed-death protein 1*)

PD-L - programirani ligand stanične smrti 1 (PD-L1) i 2 (PD-L2) (eng. *programmed-death ligand1 and 2*)

NED – bez dokaza bolesti (eng. *no evidence disease*)

OS - ukupno preživljenje (eng. *overall survival*)

MSKCC - Memorijalni centar za rak Sloan Kettering (eng. *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*)

IMDC - Međunarodni konzorcij za bazu podataka metastatskog karcinoma bubrežnih stanica (eng. *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium*)

LDH - laktat dehidrogenaza

ANC - apsolutni broj neutrofila (eng. *absolute neutrophil count*)

AXL – nepodoban (grč. *anexelekto*)

CTLA4 - citotoksični -T limfocitni antigen 4 (eng. *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*)

CD80/86 - klaster diferencijacije 80/86 (eng. *cluster of differentiation 80/86*)

ITK - interleukin-2 inducibilna T -stanična kinaza (eng. *interleukin-2 inducible T-cell kinase*)

LCK - limfocitno - specifični protein tirozin kinaza (eng. *lymphocyte-specific protein tyrosin kinase*)

c-FMS = CSF1R receptor za faktor stimulacije kolonija 1 (eng. *Colony-stimulating factor 1 receptor*)

ECOG PS - status performansi Istočne kooperativne onkološke grupe (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*)

UISS - Integrirani sustav stadija Sveučilišta u Kaliforniji, Los Angeles (eng. *UCLA - The University of California, Los Angeles Integrated Staging System*)

SSIGN – Stadij, Veličina, Gradus i Nekroza (eng. *Stage, Size, Grade, and Necrosis*)

CaIX - karboanhidraza IX (eng. *carbonic anhydrase*)

HIF – faktor induciran hipoksijom (eng. *hypoxia-inducible factor*)

PTEN - homolog fosfataze i tenzina (eng. *phosphatase and tensin homolog*)

CXCR4 - C-X-C kemokin receptor tipa 4 (eng. *C-X-C chemokine receptor type 4*)

miRNA – mikro RNA (eng. *microRNA*)

SNP - polimorfizmi jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphisms*)

KIM-1 - molekula oštećenja bubrega (eng. *Kidney-Injury Molecule-1*)

INVS - inversin

ARH - autosomno recesivna hiperkolesterolemija (eng. *autosomal recessive hypercholesterolemia*)

GIPC1 – protein koji interagira s GAIP-om C- terminalnim dijelom (engl. *GAIP interacting protein C-terminus*)

WNT – "bez krila-vezano mjesto za integraciju" (eng. *"Wingless-related integration site"*)

FZD – obitelj receptora Frizzled - sedmerostruki transmembranski receptor (eng. *Frizzled*)

LRP – protein srodan s receptorom za lipoprotein niske gustoće (eng. *low-density lipoprotein receptor-related protein*)

TCF - T stanični faktor (eng. *T-cell factor*)

APC - adenomatozna polipoza kolona (eng. *adenomatous polyposis coli*)

GSK3b - glikogen sintaza kinaza 3β

CK1 - kreatin kinaza 1 (eng. *creatine kinase 1*)

DVL - Dishevelled

PCP - planarna stanična polarnost (eng. *planar cell polarity*)

JNK - Jun N terminalna kinaza

EMT - epitelno-mezenhimalna tranzicija (eng. *epithelial-mesenchymal transition*)

MCDK - multicistična bubrežna displazija (eng. *multicystic dysplastic kidneys*)

FSGS - fokalna segmentalna glomeruloskleroza (eng. *focal segmental glomerulosclerosis*)

CNF - nefrotski sindrom finskog tipa (eng. *nephrotic syndrome of the Finnish type*)

NSCLC - nesitnostanični karcinom pluća (engl. *non-small cell lung cancer*)

GTP - gvanozin trifosfat (eng. *guanosine triphosphate*)

GDP - gvanozin difosfat (eng. *guanosine diphosphate*)

LDLRAP1 – gen za adaptorski protein-1 receptor lipoproteina niske gustoće (eng. *low density lipoprotein receptor adaptor protein-1*)

LDLR - receptor lipoproteina niske gustoće (eng. *low density lipoprotein receptor*)

VLDLR - receptor lipoproteina vrlo niske gustoće (eng. *very-low-density-lipoprotein receptor*)

LRP – protein vezan uz receptor lipoproteina niske gustoće (eng. *low density lipoprotein receptor-related protein*)

CoA - koenzim A (eng. *coenzyme A*)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (eng. *messenger ribonucleic acid*)

ER⁺ - estrogen receptor pozitivni

HER2 - humani epidermalni faktor rasta (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*)

TNBC - trostruko negativni rak dojke (eng. *triple-negative breast cancer*)

HMG-CoA - β-hidroksi β-metilglutaril-CoA (eng. *β-Hydroxy β-methylglutaryl-CoA*)

IGF-1R - receptor faktora rasta sličnog inzulinu-1 (eng. *insulin-like growth factor-1 receptor*)

GPCR - receptori vezani s G proteinom (eng. *G protein-coupled receptors*)

APPL - adaptorski protein koji sadrži homolog plekstrina, leucinski patentni zatvarač i domene za vezanje fosfotirozina (eng. *adaptor protein containing pleckstrin homology, leucine zipper and phosphotyrosine binding domains*)

MYO6 - miozin 6

PDZ - Postsinaptička gustoća-95, veliki Diskovi, Zonula occludens-1 (eng. *Post-synaptic density-95, Disks-large, Zonula occludens-1*)

NTRK1 - neurotrofična tirozin receptorska kinaza 1 (eng. *Neurotrophic tyrosine receptor kinase 1*)

NRP1 - Neuropilin-1

GLUT1 - protein za transport glukoze tipa 1 (eng. *glucose transporter protein type 1*)

SDC4 – sindekan-4 (eng. *Syndecan-4*)

SEMA4C – semaforin-4C (eng. *Semaphorin-4C*)

VANGL2 - Van Gogh-nalik protein 2 (eng. *Van Gogh-like 2*)

RGS 19 -regulator G proteinske signalizacije 19(eng. *regulator of G protein signaling 19*)

Hbc - jezgreni protein virusa hepatitisa B (eng. *Hepatitis B virus core protein*)

PDGF - faktor rasta krvnih pločica (eng. *platelet-derived growth factor*)

PI3K - fosfatidilinozitol-3 kinaza (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKB/AKT - protein kinaza B (eng. *protein kinase B*)

mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina (eng. *messenger ribonucleic acid*)

rtPCR kvantitativna lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (eng. *reverse transcription Polymerase Chain Reaction*)

PBS - otopina fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*)

DAPI - 4',6 diamidino-2-fenilindol (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

TCGA KIRC - (eng. *The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Clear Cell Carcinoma*)

TLR4 - (eng. *Toll-like receptor 4*)

TME- tumorski mikrookoliš (eng. *tumor immune microenvironment*)

TAMs - tumor povezani makrofazi (eng. *tumor-associated macrophages*)

CD4+Th - pomoćničke CD4+ T stanice (eng. *CD4+T helper*)

NK – prirodno ubilačke stanice (eng. *natural killer*)

PCSK9 - proproteinska konvertaza subtilizin/keksin tip 9 (eng. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*)

ApoC1 - apolipoprotein C1

STAT3 - transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (eng. *Signal transducer and activator of transcription 3*)

circABCA1 – cirkulirajući transporter ABCA1 član 1 koji veže ATP (eng. *circulating ATP-binding cassette transporter ABCA1 member 1*)

CERP - regulatorni protein kolesterolskog izlučivanja (eng. *cholesterol efflux regulatory protein*)

SCARB1 - receptor čistača klase B član 1 (eng. *Scavenger Receptor Class B Member 1*)

HDL-C - kolesterol lipoprotein visoke gustoće (eng. *high density lipoprotein cholesterol*)

LDL-C - kolesterol lipoproteina niske gustoće (eng. *low-density lipoprotein cholesterol*)

1. UVOD

1.1. Rak bubrega

1.1.1. Epidemiologija

Od zloćudnih novotvorina u odraslih, 2% otpada na rak bubrega. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka pri Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), u svijetu je u 2022. godini rak bubrega dijagnosticiran u 432 463 bolesnika (1). Bubrež je po učestalosti deveto sijelo raka kod muškaraca i četrnaesto kod žena (2). Posljednjih 35 godina incidencija raka bubrega u svijetu kontinuirano raste, najviše u zemljama Centralne i Južne Amerike, a najmanje u afričkim zemljama. Geografske razlike su, između ostalog, posljedica određenih rizičnih životnih i prehrambenih navika, socioekonomskog stanja i dostupnosti zdravstvene skrbi (1). Prema projekciji *Globocan*-a, broj oboljelih od raka bubrega je u porastu i do 2030. godine dosegnut će 475.000 oboljelih u svijetu (3). U 2020. godini je dobno standardizirana stopa incidencije raka bubrega (eng. *age-standardized rate*, ASR) bila 4,6/100 000 (6,1/100 000 u muškaraca i 3,2/100 000 u žena), a najviša je bila u zemljama s vrlo visokim indeksom ljudskog razvoja (eng. *human development index*, HDI). Broj umrlih od raka bubrega je u 2022. godini bio 175 000, a omjer mortaliteta i incidencije (eng. *mortality-to-incidence ratio*, MIR) iznosio je 0,39. Paradoksalno je viša stopa mortaliteta u zemljama s visokim i vrlo visokim HDI-om, ali je zato MIR niži u odnosu na zemlje s niskim dohotkom (0,33 prema 0,66). Navedeno ukazuje na utjecaj cjelokupnog razvitka određene populacije na zdravstveni standard, odnosno kvalitetu i dostupnost zdravstvene skrbi, prepoznavanje kliničkih manifestacija i otkrivanje bolesti, učinkovitost dostupnih terapija na ishod bolesti i specifičnosti sakupljanja epidemioloških podataka (2). Dobno standardizirana stopa mortaliteta od raka bubrega u 2020. godini bila je 1,8/100 000 (2,5/100 000 u muškaraca i 1,2/100 000 u žena) (1). Najviša je bila u zemljama srednje i istočne Europe (3,4/100.000), a najmanja u jugoistočnoj Aziji (0,61/100 000) (1). U zemljama s visokim HDI-om kumulativni rizik mortaliteta od raka bubrega do 74. godine života je 0,20% (1).

Prema godišnjem izvješću hrvatskog Registra za rak pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, u 2022. godini je dijagnosticirano 948 bolesnika s rakom bubrega - 617 muškaraca i 331 žena, što je 5%, odnosno 2% oboljelih od svih zloćudnih bolesti. U Hrvatskoj je u muškaraca bubrež peto najčešće sijelo raka. U 2022. godini bilo je 345 smrti s rakom bubrega kao osnovnim uzrokom smrti (217 muškaraca i 128 žena) te je MIR za rak bubrega u Hrvatskoj iznosio 0,36. (3). Rak bubrega obično se javlja nakon 40. godine života, s najvećom učestalošću u 6. i 7. desetljeću, a češće obolijevaju muškarci, pri čemu je omjer M:Ž = 1,5:1 (5,6).

1.1.2. Etiologija

Rak bubrega je vrlo heterogena bolest čija je biologija različita, a u etiopatogenezu i progresiju uključeni su mnogi (ne)promjenjivi čimbenici kao što su dob, spol, pušenje (relativni rizik 1,4-2,5), pretilost, posebno BMI (eng. *body mass index*) ≥ 30 , pri čemu rizik raste 20-35% kod povišenja BMI-a za svakih 5 kg/m² i hipertenzija te izloženost azbestu, kadmiju i naftnim derivatima. Dugotrajna intermitentna dijaliza, pogotovo ako je u podlozi bila stečena cistična bolest bubrega, povisuje rizik i 3-9% takvih bolesnika oboli od raka bubrega. Dugotrajno uzimanje kombinacije analgetika paracetamola i aspirina povisuje rizik od raka bubrega. Osobe s obiteljskom anamnezom raka bubrega su pod većim rizikom od te bolesti (6,7).

Morfološki se u najvećem broju slučajeva radi o karcinomu bubrežnih stanica (eng. *renal cell carcinoma*, RCC), dok su sarkom bubrega i primarni maligni limfom izuzetno rijetki. Od karcinoma najčešći je svijetlostanični karcinom (engl. *clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC), a rjeđi papilarni, kromofobni, Bellinijev karcinom i drugi.

Molekularnom metodom se u 50-82% svijetlostaničnih karcinoma bubrega utvrdi somatska mutacija von Hippel-Lindau (*VHL*) tumor-supresorskog gena. Mutacija na 3p25-26 nastaje delecijom, translokacijom ili bialelnom alteracijom u nekoliko stotina bubrežnih tubularnih stanica, zbog čega dođe do gubitka 3p kromosoma najčešće već u djetinjstvu/adolescenciji. Naknadno drugi alel podlegne somatskoj mutaciji ili epigenetskoj inaktivaciji uslijed hipermetilacije (8). Zbog nedostatka tumor-supresorskog proteina VHL, akumulira se hipoksijom inducirani transkripcijski čimbenik HIF1 α (eng. *hypoxia inducible transcription factor alpha*) koji potiče prepisivanje gena povezanih s hipoksijom kao što su *VEGF*, *PDGF β* , *GLUT1*, *TGF α* , *CAIX*, *EPO* i metaloproteinaza (9).

Opisano je nekoliko nasljednih sindroma koji predisponiraju nastanak nasljednog RCC, koji se javlja u 3% svih slučajeva. To su BAP1 tumor- predispozicijski sindrom, Cowden sindrom u kojem je povećan rizik za razvoj svih, a najčešće papilarnog karcinoma, Birt-Hogg-Dubé sindrom s povećanom sklonošću nastanka kromofobnog karcinoma, sindrom nasljednog papilarnog raka bubrega koji se nasljeđuje autosomno dominantno (AD) i nastaje zbog aktivacije protoonkogenog *c-MET* (eng. *mesenchymal epithelial transition*) na 7q31, nasljedna lejomiomatoza koja se AD nasljeđuje, a bolesnici imaju lejomioime kože i maternice te papilarni solitarni agresivni karcinom bubrega i, naposljetku, tuberozna skleroza (10–12).

Najčešći oblik nasljednog ccRCC-a je Von Hippel-Lindau (*VHL*) bolest, s incidencijom 1:36 000 novorođenčadi (2,13). Bolest se AD nasljeđuje, uzrokovana je inaktivacijom *VHL* na kromosomu 3p25-26 i karakterizirana ranom pojavom multiplih bilateralnih ccRCC-a u 40-50%

oboljelih, feokromocitomom, retinalnim angiomom i hemangioblastomom moždanog debla, malog mozga ili leđne moždine. U ccRCC-u se vrlo rijetko nađu promjene u genima *SETD2*, *BAP1* i *PBRM1* ili disregulacija signalnog puta mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) zbog mutacije *MTOR*, *TSC1*, *PIK3CA* ili *PTEN*, a koje utječu na progresiju, agresivnost i prognozu bolesti.

1.1.3. Patologija svijetlostaničnog karcinoma bubrega

Kao što je prije rečeno, 85% raka bubrega otpada na karcinom bubrežnih stanica, od kojih je najzastupljeniji svijetlostanični karcinom bubrega, sa 70% slučajeva, a rjeđi papilarni karcinom (10-15%) i kromofobni karcinom (4-11%), iznimno rijedak Bellinijev karcinom i drugi (14).

U više od 95% slučajeva se ccRCC javlja sporadično i prezentira kao unilateralna unicentrična solidna masa; makroskopski su dobro diferencirani ccRCC zlatnožute do narančaste boje radi visokog sadržaja lipida. Tumor je okružen pseudočahurom, na prerezu solidan i/ili cističan, sa žarištima fibroze, nekroze ili krvarenja. Bilateralne i multicentrične mase tipične su za nasljedni oblik ccRCC-a.

Svijetlostanični karcinom bubrega i papilarni karcinom nastaju iz epitela proksimalnog zavijenog kanalića (15,16), a kromofobni karcinom iz distalog dijela nefrona.

Histološki je ccRCC građen od alveolarnih nakupina atipičnih epitelnih stanica s okruglastom jezgrom, uložениh u dobro vaskulariziranu stromu. Citoplazma stanica je najčešće svijetla zbog visokog sadržaja glikogena, kolesterola i fosfolipida, a rjeđe eozinofilna i fino granulirana zbog mnoštva mitohondrija. Prvotni sustav stupnjevanja po Fuhrmanovoj, zamijenjen je 2012. Sustavom WHO i Međunarodnog udruženja uroloških patologa (eng. *International Society of Urological Pathology*, ISUP). Histološki gradus svijetlostaničnog i papilarnog karcinoma bubrega određuje se u 4 stupnja, ovisno o izgledu i veličini tumorskih stanica i vidljivosti jezgrice (G 1-4):

- G1 jezgrice odsutne ili bazofilne, vidljive na velikom povećanju (400x)
- G2 jezgrice eozinofilne i vidljive na velikom povećanju (400x), ali se ne vide na malom povećanju (100x)
- G3 jezgrice eozinofilne i vidljive na malom povećanju (100x)
- G4 izraženi pleomorfizam jezgara i/ili multinuklearne velike stanice i/ili rabdoidno/sarkomatoidno diferencirane tumorske stanice (17).

Gradus karcinoma bubrega određen po WHO/ISUP sustavu važan je čimbenik za prognozu bolesti i uključen je u postojeće prognostičke modele za procjenu rizika od povrata bolesti kod lokalizirane i lokoregionalne bolesti. Dokazano je da ccRCC s > 40% eozinofilne komponente ima lošiji klinički ishod (18).

1.1.4. Dijagnostika raka bubrega

Karcinom bubrega obično raste podmuklo i daje simptome tek u uznapredovaloj fazi. U 60-80% bolesnika otkrije se slučajno tijekom radioloških pretraga koje se provode zbog simptoma koji nisu povezani s urološkim sustavom. Najčešći prvi simptom je hematurija, a javlja se u 60% bolesnika. U 10% slučajeva bolest se prezentira klasičnim trijasom u koji spada lumbalna bol, makrohematurija i palpabilna abdominalna tvorba, a povezan je s uznapredovalom bolesti i lošim ishodom (19). Normokromna anemija kronične bolesti nađe se u 30% oboljelih. U 10-40% oboljelih javlja se paraneoplastični sindrom, najčešće policitemija (3-10%), hiperkalcemija (20%) ili hipertenzija (40%). U sklopu paraneoplastičnog sindroma vrlo rijetko se javlja Cushingov sindrom, proteinska enteropatija, galaktoreja, hipoglikemija, ginekomastija u muškarca, odnosno hirzutizam i amenoreja kod žena.

U dijagnostici raka bubrega obvezne su laboratorijske pretrage: kompletna krvna slika i biokemijske pretrage krvi s pokazateljima jetrene funkcije kroz vrijednosti aspartat aminotransaminaze, alanin aminotransaminaze, bilirubina, alkalne fosfataze i laktat dehidrogenaze; korigirana serumski kalcij, serumski kreatinin i ureja, procjena glomerularne filtracije (eng. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) i koagulacije, sedimentacija eritrocita i analiza urina.

Obično se UZV-om trbuha incidentalno otkrije bubrežna masa i postavi sumnja na tumor, što treba potvrditi višeslojnom kompjutoriziranom tomografijom (eng. *multi slice computed tomography*, MSCT) trbuha i zdjelice uz primjenu kontrastnog sredstva, pretragom koja predstavlja 'zlatni standard' u dijagnostici raka bubrega. Rendgenska snimka srca i pluća je obvezna, a odluke o MSCT prsišta, scintigrafiji skeleta, magnetskoj rezonanci (eng. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) mozga donose se ako postoji indikacija. Indikacije su postojanje simptoma presadnica u kosti, povišena vrijednost alkalne fosfataze, neurološki simptomi i drugo. MRI trbuha je potrebna kod sumnje na infiltraciju krvnih žila, najčešće donje šuplje vene. Konačna dijagnoza postavlja se mikroskopski iz iglene biopsije tumora ili nakon kirurškog zahvata.

1.1.5. Određivanje stadija raka bubrega

Za odluku o planu liječenja i/ili praćenja bolesnika s rakom bubrega potrebno je odrediti stadij bolesti u vrijeme dijagnoze, koji se temelji na 8. izdanju Klasifikacije Američkog društva za rak (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*)/ *tumor, node, metastasis* (TNM) iz 2017. godine (Tablica 1 i 2). U klasifikaciji se opisuju veličina i lokalna proširenost tumora (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) i postojanje udaljenih metastaza (M) (20).

U lokalnom širenju opisano je zahvaćanje fibrozne ovojnice koja obavija bubrege i susjedno masno tkivo, tzv. Gerotine ovojnice.

Tablica 1. Klasifikacija raka bubrega prema 8. izdanju AJCC (American Joint Committee on Cancer)/TNM (TNM = tumor, node, metastasis) iz 2017. godine. Preuzeto sa American Cancer Society, Kidney Cancer Stages National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology, Kidney cancer. Pristupljeno 22. rujna 2025.

Primarni tumor

TX Nije moguće procijeniti primarni tumor

T0 Bez dokaza primarnog tumora

T1 ≤ 7 cm u najvećem promjeru

T1 ograničen na bubreg

T1a ≤ 4 cm u najvećem promjeru

T1b > 4 cm ali ≤ 7 cm u najvećem promjeru

T2 ≥ 7 cm u najvećem promjeru

T2 Ograničen na bubreg

T2a > 7 cm ali ≤ 10 cm u najvećem promjeru

T2b > 10 cm u najvećem promjeru

T3 Tumor zahvaća glavne vene ili invadira perinefritičko tkivo, ali se ne širi izvan Gerotine ovojnice, ni u nadbubrežnu žlijezdu

T3a Tumor zahvaća bubrežne vene ili njene segmentalne ogranke, ili invadira perirenalno i/ili renalno sinusno masno tkivo, ali ne iza Gerotine fascije

T3b Tumor zahvaća donju šuplju venu u njenom dijelu ispod ošita

T3c Tumor zahvaća donju šuplju venu, u njenom dijelu iznad ošita (u prsištu), ili je urastao u stjenku donje šuplje vene

T4 Tumor se proširio izvan Gerotine ovojnice, uključujući istostranu nadbubrežnu žlijezdu

Regionalni limfni čvorovi

NX Regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti

N0 Nema metastaza u regionalne limfne čvorove

N1 Metastaze u regionalne limfne čvorove

Distalne metastaze

M0 Bez

M1 Distalne metastaze, uključujući širenje u distalne limfne čvorove

Legenda: T tumor, N limfni čvor, M udaljena metastaza

Tablica 2. Stadij raka bubrega prema AJCC/TNM klasifikaciji

Stadij	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1-2	N1	M0
	T3	NX, N0-1	M0
IV	T4	Bilo koji N	M0
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

Legenda: T tumor, N limfni čvor, M udaljena metastaza

1.1.6. Liječenje raka bubrega

1.1.6.1. Liječenje lokaliziranog i lokoregionalnog raka bubrega

Liječenje lokaliziranog i lokoregionalnog RCC-a odnosi se na stadij bolesti I, II i III. Kirurška resekcija je 'zlatni standard' za liječenje lokalnog RCC-a i uključuje parcijalnu ili radikalnu nefrektomiju. Kod odluke o vrsti operativnog zahvata treba uzeti u obzir dobrobiti i rizike oba zahvata, s ciljem da se dobro izbalansira optimalna dugotrajna funkcija bubrega i očekivano preživljenje specifično za tumor.

Parcijalna nefrektomija (engl. *nephron-sparing surgery* - NSS) je pošten zahvat koji se provodi kod malog unilateralnog RCC-a, zatim RCC-a u bolesnika sa solitarnim bubregom ili neadekvatnom funkcijom kontralateralnog bubrega, jer su nakon radikalne nefrektomije takvi bolesnici pod povećanim rizikom od kroničnog bubrežnog zatajenja te kod bilateralnih tumora bubrega. Cilj parcijalne nefrektomije je postići optimalnu kontrolu tumora uz minimalno trajanje ishemije. Prednosti zahvata su očuvanje bubrežne funkcije, smanjenje ukupnog mortaliteta i rizika od kardiovaskularnog događaja (20). Parcijalna nefrektomija jest metoda izbora u liječenju tumora promjera < 7cm (T1a i T1b) u bolesnika s urednom funkcijom kontraletarnog bubrega, jer su ishodi jednaki kao kod radikalne nefrektomije (22). Uz to, onkološki ishodi su jednaki bez obzira je

li zahvat izveden otvorenim kirurškim putem ili laparoskopski (23), a preživljenje bez znakova bolesti (eng. *disease-free survival*, DFS) jednako nakon sedam godina praćenja (24).

Radikalna nefrektomija obuhvaća perifascijalnu resekciju bubrega, resekciju perirenalnoga masnog tkiva i regionalnih limfnih čvorova, uz resekciju istostrane nadbubrežne žlijezde ako se radi o velikom tumoru lociranom na gornjem polu bubrega, ili su nepravilnosti nadbubrežne žlijezde otkrivene MSCT-om (25). Resekcija regionalnih limfnih čvorova u ovom sijelu nije terapijska metoda jer se ne postiže dobit u ukupnom preživljenju i vremenu bez progresije bolesti u usporedbi s radikalnom nefrektomijom bez resekcije regionalnih limfnih čvorova (25). Međutim, limfadenektomija je dijagnostički važna jer su pokazatelji agresivnosti (gradus tumora, prisutnost sarkomatoidne diferencijacije, veličina i stadij tumora i nekroza) povezani s većom vjerojatnošću pozitivnih limfnih čvorova (27,28). Radikalna nefrektomija je metoda izbora u slučaju lokoregionalne bolesti, u slučaju širenja tumora u donju šuplju venu, kod lokalno uznapredovalog tumora ili ako je lokalizacija tumora nepovoljna za izvođenje parcijalne nefrektomije. Neovisno je li način izvedbe otvorenim zahvatom ili laparoskopski, konvencionalno, ili sve češće robotski asistirano, ishodi radikalne nefrektomije su isti, s podjednakim preživljenjem bez pojave bolesti (29,30).

Ablativne metode kao što su krioablacija, mikrovalna ablacija i radiofrekventna ablacija su moguća alternativna terapijska opcija kod liječenja starijih bolesnika s popratnim komorbiditetima kod kojih bi operativni zahvat bio rizičan, ili kod bolesnika s T1b tumorom koji nisu za kirurški zahvat.

1.1.6.2. Adjuvantno liječenje lokalnog i lokoregionalnog raka bubrega

U ranijim kliničkim istraživanjima analizirana je moguća dobit od adjuvantne primjene tirozin kinaznih inhibitora (TKI) usmjerenih na receptor za vaskularni endotelni čimbenik rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) nakon nefrektomije zbog RCC-a. Prethodno je potvrđena klinička dobit primjene tih lijekova u bolesnika s metastatskom bolesti. Studija ASSURE je proučavala upotrebu sunitiniba ili sorafeniba (31), PROTECT upotrebu pazopaniba (32), a ATLAS studija upotrebu aksitiniba (33), ali su rezultati navedenih studija kontradiktorni. Ni u jednoj studiji nije postignuta dobit u preživljenju bez progresije bolesti. To je ostvareno tek u studiji S-TRAC uz upotrebu sunitiniba u skupini visokorizičnih bolesnika s ccRCC-om (34). Ciljne proangiogene i onkogene mete za djelovanje sunitiniba su VEGFR1, 2, 3, receptor za čimbenik rasta trombocita α i β (PDGFR α i β eng. *platelet-derived growth factor receptor*), receptor za

čimbenik rasta fibroblasta (FGFR1, eng. *fibroblast growth factor receptor 1*), FLT3 (eng. *fms-related tyrosine kinase 3*), c-KIT (eng. *stem cell factor receptor*), protoonkogeni RET (eng. *rearranged during transfection*) i MET te CSF1R (eng. *colony stimulating factor 1*). U dvije meta-analize pet randomiziranih kliničkih studija koje su proučavale tirozin kinazne inhibitore (TKI) u adjuvantnoj primjeni kod liječenja RCC-a autori zaključuju da sunitinib ima ograničenu učinkovitost uz znatnu toksičnost. Zato je svrstan u kategoriju 3 u adjuvantnom liječenju stadija III ccRCC-a visokog rizika.

Studija faze III KEYNOTE-564 iz 2021. godine, pokazala je klinički i statistički značajno produljenje DFS-a adjuvantnom primjenom pembrolizumaba. To je monoklonalno protutijelo na PD-1 (engl. *programmed death-1*) na T limfocitu koji se s njime veže i onemogućava blokadu ligandima programirane stanične smrti 1 i 2 (eng. *programmed-death ligand 1 and 2*, PD-L1 i PD-L2); pri tom je profil toksičnosti prihvatljiv (35). Nakon toga je imunoterapija pembrolizumabom odobrena i uvrštena u smjernice kao standard liječenja adjuvantnom terapijom kod bolesnika sa srednjim i visokim rizikom od povrata bolesti nakon nefrektomije zbog ccRCC-a (14). Treba razmotriti jednogodišnju primjenu pembrolizumaba nakon nefrektomije kod bolesnika s tumorom stadija 2 i gradusom 4 ili sarkomatoidnom diferencijacijom; s tumorom stadija 3 i višim te kod zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, kao i kod metastatske bolesti bez dokaza bolesti, stadija M1 nakon nefrektomije i resekcije presadnica, uz uvjet da nema dokaza bolesti (eng. *no evidence disease*, NED). Studija iz 2024. godine dokazala je klinički i statistički značajnu dobit i u ukupnom preživljenju (eng. *overall survival*, OS) uz godišnju administraciju pembrolizumaba (36).

1.1.6.3. Liječenje metastatskog raka bubrega

Na multidisciplinarnom timu donosi se odluka o liječenju na temelju procjene rizika s obzirom na stadij bolesti, histološki tip tumora, bolesnikovo opće stanje, dob i pripadajuće komorbiditete. Kod metastatske bolesti treba uzeti u obzir i sjelo metastatske bolesti, u skladu s prognostičkim kriterijima MSKCC-a (eng. *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*) i IMDC-a (eng. *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium*) (37,38). Navedeni modeli su razvijeni kako bi se kombiniranjem neovisnih prognostičkih čimbenika bolesnici s metastatskim karcinomom bubrega mogli stratificirati u različite prognostičke skupine i prema njima odrediti liječenje i prognozu.

Prvi prognostički model, MSKCC razvijen je u Memorial Sloan Kettering centru u New Yorku analizom prognostičkih čimbenika u metastatskom karcinomu liječenom interferonom alfa.

Model uključuje pet neovisnih nepovoljnih prognostičkih čimbenika: 1. vrijeme od dijagnoze do početka liječenja <12 mjeseci, 2. Karnofskyjev indeks < 80%, 3. serumska laktat dehidrogenaza (LDH) viša 1,5 puta od gornje granice normalne vrijednosti, 4. korigirana vrijednost serumskog kalcija viša od gornje granice normalne vrijednosti, 5. serumski hemoglobin niži od donje granice normalne vrijednosti. Slijedeći, IMDC ili Hengov model nastao je analizom bolesnika s metastatskim karcinomom bubrega liječenih ciljanom terapijom usmjerenom prema VEGF-u. Po tom modelu, svi navedeni pokazatelji osim LDH su neovisni prediktori preživljenja, uz dodatna dva neovisna nepovoljna prognostička čimbenika - apsolutni broj neutrofila (eng. *absolute neutrophil count*, ANC) i broj trombocita koji su viši od gornje granice normalne vrijednosti. Na temelju broja negativnih prognostičkih čimbenika, bolesnici se stratificiraju u povoljnu prognostičku skupinu (bez ijednog navedenog čimbenika), srednju (intermedijarnu) s 1- 2 čimbenikom i nepovoljnu s 3 do 5 (tj. 6) čimbenika. U povoljnoj skupini medijan OS-a nije bio dosegnut, a 2-godišnje preživljenje je bilo 75%, u srednjoj skupini medijan OS-a je 27 mjeseci, a 2-godišnje preživljenje 53%, dok je u nepovoljnoj prognostičkoj skupini medijan OS-a bio 8,8 mjeseci, a 2-godišnje preživljenje 7% (38).

Prema Američkim smjernicama za liječenje metastatskog karcinoma bubrega, u prvoj liniji liječenja za sve prognostičke skupine nekoliko je preporučenih terapijskih opcija: kombinacija aksitiniba (selektivni TKI VEGFR) s pembrolizumabom (39), sukladno rezultatima studije KEYNOTE – 426 (40); kombinacija kabozantiniba s nivolumabom (anti- PD-1 protutijelo) (41), sukladno rezultatima studije CheckMate 9ER (41). Kabozantinib je višestruki TKI, jer djeluje na VEGFR, MET i AXL (grč. *anexelekto*). Za sve prognostičke skupine preporuča se i kombinacija lenvatiniba s pembrolizumabom (43), sukladno rezultatima studije CLEAR (44). Lenvatinib je nespecifični višestruki TKI za VEGFR-1, -2 i -3, FGFR-1, -2, -3 i -4, PDGFR i RET. Za lošu i srednju prognostičku skupinu preporuča se za liječenje metastatske bolesti u prvoj liniji kombinacija imunoterapije ipilimumabom i nivolumabom, praćena monoterapijom nivolumabom (45), sukladno rezultatima studije CheckMate 214 (46). Ipilimumab je monoklonoalno protutijelo koje specifično blokira interakciju citoskičnog T limfocitnog antigena 4 (eng. *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CTLA4) na aktiviranim T stanicama i liganda CD80/86 (eng. *cluster of differentiation*), na antigen prezentirajućim stanicama. U prvoj liniji liječenja za sve prognostičke skupine mogu se preporučiti aksitinib s avelumabom (47), sukladno rezultatima studije JAVELIN Renal 101(48) te TKI pazopanib (48), sukladno rezultatima studije COMPARZ (49) i sunitinib (51,52). Pazopanib je višestruki TKI i inhibitor angiogeneze, inhibira VEGFR, PDGFR L I B, c-KIT, ITK (eng. *interleukin-2 receptor inducible T-cell kinase*), LCK (eng. *lymphocyte-specific protein tyrosin kinase*) i transmembranski glikoprotein receptor tirozin kinazu c-FMS (poznat i kao

CSF1R). Za liječenje bolesnika iz nepovoljne i srednje prognostičke skupine moguće je liječenje monoterapijom temsirolimusom (mTOR inhibitor) (53).

Prema hrvatskim smjernicama za liječenje metastatskog raka bubrega koje su Omrčen i suradnici objavili u vrijeme liječenja i kliničkog praćenja naših ispitanika, sunitinib je bio preporuka u prvoj liniji liječenja metastatske bolesti za povoljnu i srednju prognostičku skupinu (Tablica 3) (54).

Tablica 3. Liječenje metastatskog svijetlostaničnog karcinoma bubrega u prvoj liniji, hrvatske smjernice. Preuzeto i prilagođeno od Omrčen i suradnici, 2019.

Stupanj rizika	Terapija
Niski rizik	sunitinib ili pazopanib ili bevacizumab + interferon alfa (IA) IL-2 kod odabranih bolesnika (IIA)
Srednji rizik	kabozantinib (IIA) nivolumab + ipilimumab (IA) sunitinib ili pazopanib (IA) bevacizumab + interferon alfa (IA)
Visoki rizik	kabozantinib (IIA) nivolumab + ipilimumab (IA) temsirolimus (IIA) sunitinib (IIB) ili pazopanib (III)

1.1.7. Prognoza

Sustav WHO/ISUP-a za stupnjevanje svijetlostaničnog karcinoma bubrega koristan je kod prognoziranja ishoda bolesti. Prognostički modeli uključuju različite rizične čimbenike, a služe za individualnu procjenu rizika za relaps bolesti nakon provedenog kirurškog zahvata. U raznim modelima uvrštene su različite kombinacije deskriptora: histološki podtip, opseg bolesti, nuklearni gradus, prisutnost nekroze, stadij tumora i ECOG PS (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*) (54–56). Neki prognostički modeli primjenjivi su na sve histološke tipove RCC-a. To su UISS (eng. *UCLA (The University of California, Los Angeles Integrated Staging System)*) koji obuhvaća veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, gradus i ECOG PS (57) i

SSIGN model (eng. *Stage, Size, Grade, and Necrosis*), koji uključuje stadij tumora, veličinu tumora, gradus i nekrozu (58). GRANT model primjenjuje se za papilarni karcinom bubrega i uključuje gradus tumora, dob bolesnika, zahvaćenost limfnih čvorova i veličinu tumora, a Leibovichev model za ccRCC, papilarni i kromofobni karcinom i uključuje veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, gradus tumora i nekrozu (56,59).

U svrhu poboljšanja postojećih prognostičkih modela u predikciji mogućeg povrata bolesti nakon nefrektomije, istraživana je potencijalna prognostička uloga molekularnih biljega karboanhidraze IX (eng. *carbonic anhydrase*, CaIX) (60), VEGF, HIF (eng. *hypoxia-inducible factor*) (61), Ki-67, p53, p21 (62), biljega staničnog ciklusa - PTEN (eng. *phosphatase and tensin homolog*) (63), E-kadherina, osteopontina (64), biljega stanične adhezije CD44, CXCR4 (eng. *C-X-C chemokine receptor type 4*) (65), PD-L1, miRNA (eng. *microRNA*), SNP-ova (eng. *single nucleotide polymorphisms*) i molekule oštećenja bubrega (eng. *Kidney-Injury Molecule-1*, KIM-1) (66,67). Većina navedenih biljega povezana je s prognozom ccRCC-a. Izražaj gena *BAP1* i *PBRM1* (na kromosomu 3p u regiji koja je u deleciji u preko 90% ccRCC-ova) je neovisni prognostički čimbenik povrata bolesti (68,69). Gubitak kromosoma 9p i 14q povezan je s lošijim preživljenjem bolesnika s ccRCC-om (70). Međutim, ni jedan od istraživanih molekularnih čimbenika nije uvršten u dosadašnje prognostičke modele, jer nisu validirani u vanjskim neovisnim multicentričnim studijama.

Trećina bolesnika se inicijalno prezentira metastatskom bolešću. S druge strane, kod lokalizirane/lokoregionalne bolesti, unatoč provedenom kirurškom zahvatu, 20-50% bolesnika će dobiti povrat bolesti, najčešće u obliku udaljenih metastaza (55,71,72). Rasap bolesti rezultira ukupno visokom stopom mortaliteta, s oko 175 000 smrti u svijetu godišnje (73,74) te je MIR u raku bubrega nizak, 0,39 (2). Preživljenje ovisi o stadiju bolesti pa je 5-godišnja stopa preživljenja za stadij I - 93%, za stadij II/III - 72,5%, a za stadij IV 12% (75).

Unatoč suvremenim modalitetima liječenja i uvođenju novih lijekova adjuvantno ili u metastatskom stadiju, karcinom bubrega i dalje ima visoku stopu mortaliteta. Preživljenje u metastatskoj bolesti je 20 mjeseci u SAD i 17 mjeseci u zapadnoj Europi (75). Stoga su potrebni novi prognostički pokazatelji i molekularni biljezi koji bi pomogli u izboru individualiziranih, riziku prilagođenih protokola za bolesnike s lokalnom i lokoregionalnom bolešću, kod kojih bi se mogao ustanoviti povećani rizik za povrat bolesti.

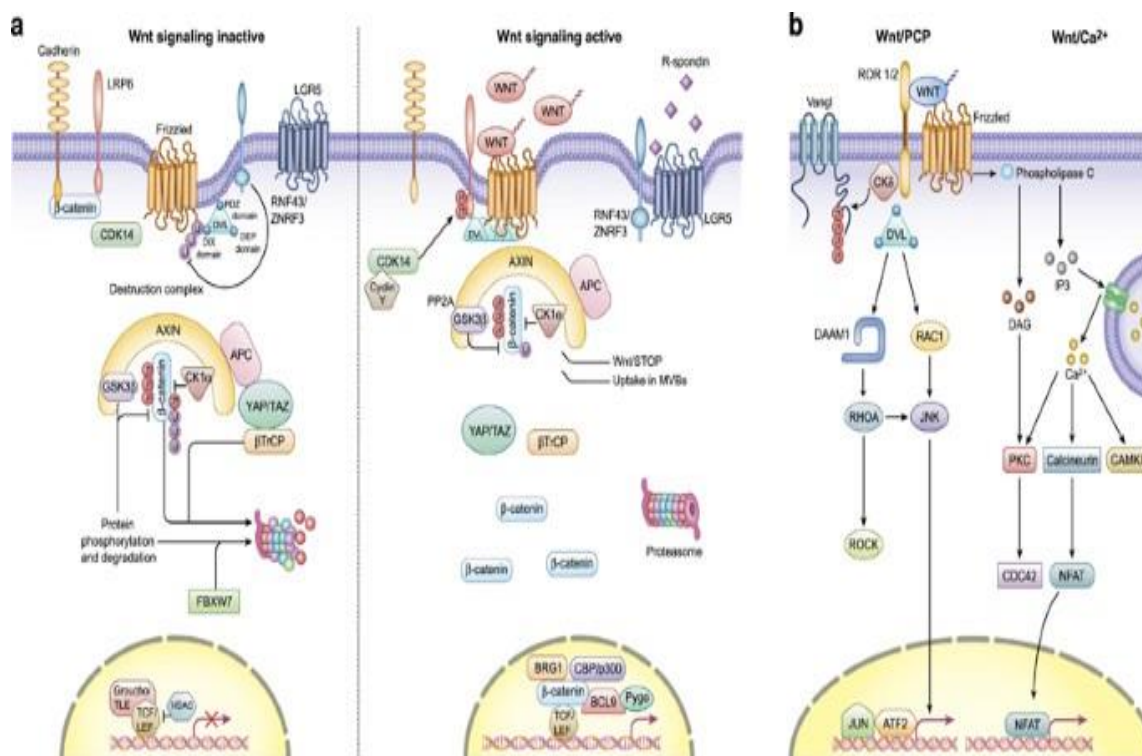
Dosad nije istraživana uloga inversina (INVS), proteina autosomno recesivne hiperkolesterolemije (eng. *autosomal recessive hypercholesterolemia*, ARH) i proteina GIPC1 (engl. *GAIP interacting protein C-terminus*) u svijetlostaničnom karcinomu bubrega. Po prvi put su istraženi u ovom radu kako bi se osvijetlila njihova uloga u patogenezi i prognozi ccRCC-a. INVS

je sastavni dio WNT (eng. *Wingless-related integration site*) signalizacijske kaskade, a ime mu je kombinacija skraćenica engleskih riječi 'integration' i 'wingless'. ARH i GIPC1 su u interakciji uključeni u vezikularni transport. ARH je među glavnim citoplazmatskim proteinima uključenim u endogeni metabolizam kolesterola, a GIPC1 transmembranski protein povezan s mnogim ekstracelularnim i intracelularnim proteinima.

1.2. WNT signalizacijski put

Evolucijski vrlo očuvan WNT signalizacijski put aktivira se vezivanjem WNT liganda i glikoproteina. Esencijalan je u embriogenezi i homeostazi tkiva, regulira razvojne procese i sudjeluje u koordinaciji stanične diferencijacije, migracije i proliferacije (76). WNT signalizacijski put u fiziološkim uvjetima održava finu ravnotežu između stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze. WNT signalizacijska kaskada započinje vezivanjem glikoproteina na receptor FZT (engl. *Frizzled*) i koreceptore LRP5 ili LRP6 (eng. *low-density lipoprotein receptor-related protein*). Aktivacija kanonskog WNT signalizacijskog puta, odnosno o β -kateninu ovisnog WNT signaliziranja, kontrolira se izvanstaničnim WNT signalom. Nakon tog signala se u citoplazmi akumulira β -katenin i translocira u jezgru, gdje s transkripcijskim čimbenicima i koaktivatorima, kao što je TCF/Lef1 (eng. *T cell factor/lymphoid enhancer factor 1*) potiče izražaj ciljnih gena (77). U odsutnosti WNT signala, citoplazmatski β -katenin se fosforilira multiproteinskim destrukcijskim kompleksom kojeg sačinjavaju aksin, protein adenomatoznog polipoznog kolona (eng. *adenomatous polyposis coli*, APC), glikogen sintaza kinaza 3 β (GSK3 β) i kazein kinaza 1 (eng. *casein kinase1*, CK1) te postaje meta za proteasomsku degradaciju. Destrukcijski kompleks se inaktivira vezivanjem WNT liganda na FTZ i uključanjem DVL (engl. *Dishevelled*), što potiče akumulaciju β -katenina u citoplazmi i translokaciju u jezgru. β -katenin djeluje na transkripcijski represor *c-Myc* i sastavnice WNT puta Axin2.

Osim kanonskog Wnt signalizacijskog puta, postoje alternativne WNT signalne kaskade u kojima WNT signali reguliraju polarnost epitelnih stanica i sudjeluju u procesu planarne stanične polarnosti (eng. *planar cell polarity*, PCP). WNT/PCP put uključuje FZD i DVL, ali se nizvodna kaskada razlikuje od kanonskog WNT puta jer je WNT/PCP neovisan o β -kateninskoj stabilizaciji i TCF/Lef1. Signalni put WNT/PCP aktivira GTPazu Rho i Rac i JNK (eng. *Jun N terminal kinase*) (Slika 1) (78).



Slika 1. Prikaz signalizacijske kaskade WNT signalizacijskog puta **a.** Inaktivan kanonski WNT signalizacijski put; aktiviran vezivanjem izvanstaničnog WNT liganda na receptor FZT (engl. *Frizzled*) i koreceptore LRP5 ili LRP6. Uključenjem DVL (engl. *Dishevelled*) destrukcijski kompleks koji se sastoji od: aksina, proteina adenomatoznog polipoznog kolona (APC, eng. *adenomatous polyposis coli*), glikogen sintaza kinaze 3 β (GSK3 β) i kazein kinaze 1 (eng. *casein kinase1*, CK1) se inaktivira, što potiče akumulaciju β -katenina u citoplazmi, njegovu translokaciju u jezgru i prepisivanje gena. **b.** Nekanonski WNT signalizacijski put. Preuzeto od Zhan T. i sur., Oncogene, 2016. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>. Licenca: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

1.2.1. Uloga WNT signalizacijskog puta u zloćudnim tumorima

U nekim je tumorima WNT/ β -kateninska signalizacija poremećena zbog vodećih (engl. *driver*) mutacija ili povećane receptorske aktivnosti posredovane WNT-ligandom. Genske i epigenetske alteracije signalnog puta rezultiraju aberantnom aktivacijom koja je važna u karcinogenezi. Prevelika aktivacija WNT/ β -kateninskog puta povezana je s povećanom proliferacijom i epitelno-mezenhimalnom pretvorbom (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) održanjem samoobnavljajuće sposobnosti matičnih stanica raka, neoangiogeneza i metastaziranjem. WNT signalni put ima utjecaj na matične tumorske stanice djelovanjem na

inicijaciju, razvoj/ili održanje stanica raka (76). Aberantna aktivacija WNT-PCP signalnog puta povezana je sa zloćudnijim fenotipom tumorskih stanica jer potiče invaziju i metastaziranje (76,78).

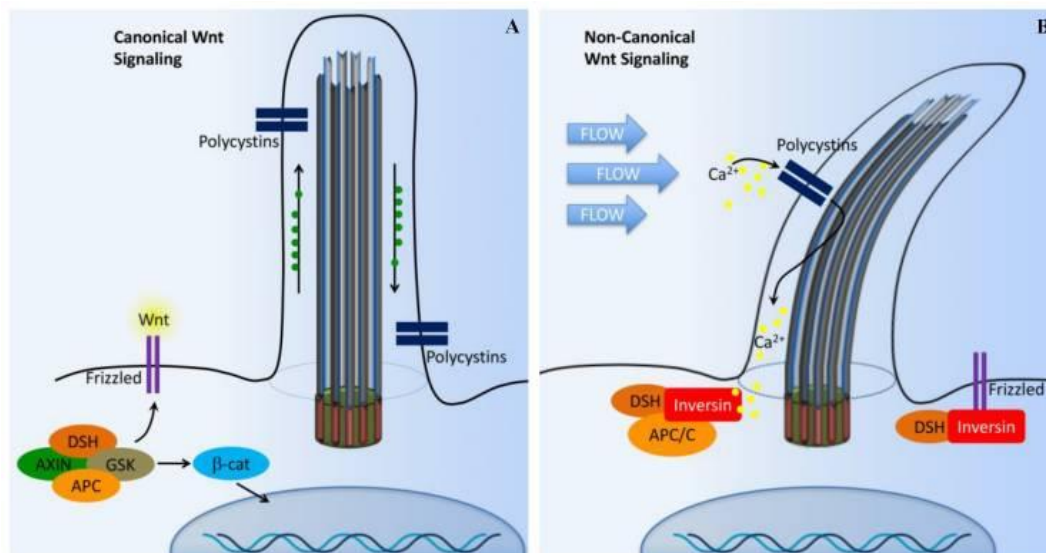
Transkripcija onkogene *c-Myc* i *Cyclin D-1* ide preko WNT signalizacijskog puta. Uključenost WNT signalizacijskog puta u karcinogenezu i tumorsku progresiju je prvi put dokazana u karcinomu debelog crijeva (79), a abnormalna konstitutivna aktivacija Wnt/ β -kateninskog puta, odnosno aktivacija β -katenina i u odsutnosti WNT liganda u hepatocelularnom karcinomu (80), karcinomu dojke (81), karcinomu prostate (82), melanomu (84), glioblastomu (85) i osteosarkomu (86). WNT signalizacija je nužna za inicijaciju adenokarcinoma gušterače. U staničnim linijama karcinoma gušterače WNT signalizacija djeluje protumorigeno i povezana je s agresivnošću tumora (87–89). U mnogim tipovima raka je nađena opsežna disregulacija WNT puta zbog mutacije gena *APC*, *AXIN*, *CTNNB1*, *GSK3 β* i *TCF7*.

1.2.2. Inversin

Inversin (INVS, nefrocistin-2) je jedan od glavnih čimbenika uključenih u regulaciju WNT signalnog puta. INVS je cilijarni protein kodiran genom *NPHP2* i ima 1065 aminokiselina (76,90–92). INVS regulira razvojne procese i ima ulogu u homeostazi tkiva i koordinaciji stanične migracije (90,91). INVS održava inhibiciju kanonskog WNT signalizacijskog puta degradacijom citoplazmatskog proteina DSH ili DVL-1 (engl. *Dishevelled-1*) povećanjem njegove ubikvitinacije. Tako se održava niska razina nizvodne komponente signalnog puta, β -katenina (90,91). U bubregu je INVS lociran u primarnim cilijama, organelama koje se poput antene pružaju iz epitelnih stanica u lumen bubrežnih kanalića (Slika 2). INVS ima ulogu u razvoju bubrega još od pronefrosa te u lijevo-desnoj simetriji; utječe na staničnu diobu i polarizaciju primarnih cilija. Nedostatak INVS rezultira konstitutivnom aktivacijom kanonskog WNT signalnog puta, što je povezano s abnormalnim primarnim cilijama, stvaranjem cista i nastankom policistične bolesti bubrega (Slika 2). U njih se ubrajaju multicistična bubrežna displazija (eng. *multicystic dysplastic kidneys*, MCDKs), fokalna segmentalna glomeruloskleroza (eng. *focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS) i nefrotski sindrom finskog tipa (eng. *nephrotic syndrome of the Finnish type*, CNF) (90,91). Mutacija INVS uzrokuje nefronoftizu tip II - autosomno recesivno (AR) nasljednu cističnu bolest bubrega karakteriziranu ekstenzivnim cistama bubrega, *situs inversus*-om i zatajenjem bubrega (93,94).

Prema studiji Simons i suradnika, cilijarni protein INVS je molekularni „prekidač“ (engl. *switch*) između WNT/ β -katenin i WNT/PCP signalne kaskade (Slika 2) i zato ima učinak na diobu,

polarizaciju cilija, razvoj bubrega i formiranje cista. Autori su na animalnom modelu *Xenopus laevis* dokazali da je INVS potreban za konvergentne ekstenzijske pokrete tijekom embrionalnog razvoja, što je obrazac tipičan za PCP signalizaciju. Prejaki izražaj INVS, kao i nedostatak endogenog INVS imaju utjecaj na embrionalni razvoj (91). Autori zaključuju da INVS može promijeniti ravnotežu između WNT signalnih kaskada u korist PCP signalizacije, a mutacija INVS rezultira prekomjernim β -kateninskim signaliziranjem koje potiče cistogenezu (91).



Slika 2. Prikaz inversina u primarnoj ciliji tubularne epitelne stanice u bubregu i uloga Wnt signalizacijskog puta u cistogenezi. A) WNT kanonički signalizacijski put. B) Uloga inversina kao molekularnog „prekidača” između WNT kanonskog i nekanonskog signalizacijskog puta. Inversin interagira sa citoplazmatskim Dishevelled (DVL) i potiče njegovu degradaciju, dolazi do blokiranja WNT kanonskog signalizacijskog puta te DVL vezan uz membranu prebacuje signaliziranje na nekanonsku WNT/PCP kaskadu. Preuzeto od Pala R. i sur., International Journal of Molecular Sciences, 2017. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms18112272>. Licenca: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Za razliku od dobro poznate uloge INVS u regulaciji WNT signalizacijskog puta tijekom razvoja i u patogenezi bubrežnih bolesti (76, 90–94), uloga INVS u zloćudnim tumorima nije dovoljno istražena. Jiang i suradnici su dokazali da je INVS nepovoljan prognostički čimbenik u karcinomu pluća nemalih stanica (NSCLC engl. *non small cell lung cancer*). Izražaj INVS je bio visok u karcinomu, a slab/negativan u okolnom zdravom plućnom tkivu te povezan s lošijim

ishodom (95). Navedena studija autora iz 2017. godine, koliko nam je poznato, jedina je istraživala ulogu INVS u zloćudnim tumorima.

1.3. Vezikularni transport

Vezikule omogućuju unutarstanični ili transmembranski transport molekula između različitih odjeljaka okruženih membranom te olakšavaju prijenos proteina i drugih molekula između endoplazmatskog retikuluma, Golgijeva aparata i lizosoma. Vezikularni transport je nužan u organizaciji eukariotske stanice jer ima ključnu ulogu u sekreciji, endocitozi i dinamici organela te ciljanoj dopremi proteina do odabrane organele, a na nivou stanice uključuje endocitozu i egzocitozu. Molekula koja se prenosi selektivno se upakira u vezikulu koje je prepoznaje i fuzira s pripadajućom ciljnom membranom.

Prvi korak u vezikularnom transportu je stvaranje vezikule pupanjem stanične membrane. Citoplazmatska površina transportne vezikule je prekrivena proteinima. Poznate su tri vrste tako obloženih vezikula: vezikule obložene klatrinom preuzimaju izvanstanične molekule iz plazmaleme i prenose do Golgijevog aparata/lizosoma, a vezikule koje nisu obložene klatrinom nego COP-om (engl. *coat protein*, COP), nastaju pupanjem iz endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog kompleksa.

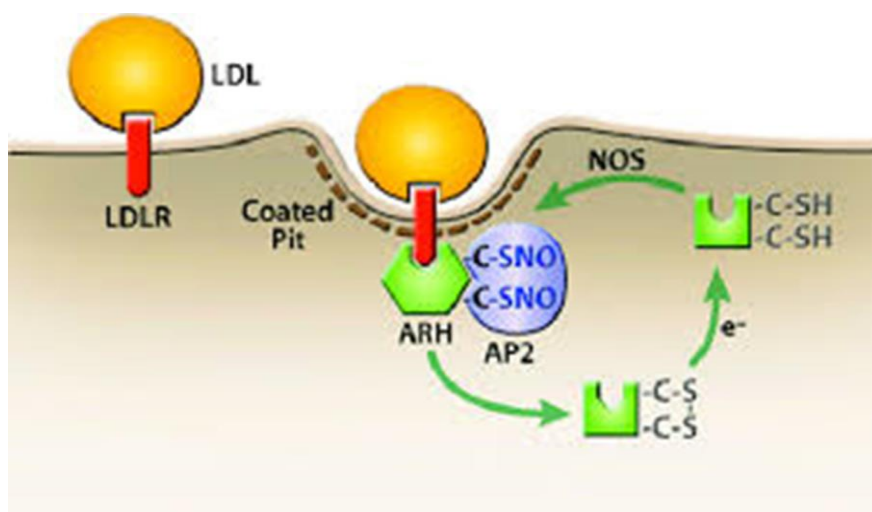
U vezikulama obloženim klatrinom se na citosolnoj površini membrane stvara klatrinski oblog sastavljen od podjedinica ‘triskeliona’ - tri velika i tri mala polipeptidna lanca koji određuju geometriju klatrinskog omotača. Podjedinice oblikuju heksagonsku ili pentagonsku strukturu, tj. kaveole koje pupanjem rastu, a endocitozom nastane vezikula. Adaptorni proteini posreduju vezanje klatrina na plazmalemu i trans-Golgijevu mrežu, specifični su za receptor i biraju molekulu za transport/inkorporiranje u stanicu. Zajedno s tropljivim molekulama za transport hvataju različite transmembranske proteine i receptore (tzv. ‘*cargo*’ receptori). Kad pupoljak dovoljno naraste, odvoji se od membrane i formira vezikulu. Protein dinamin veže GTP (eng. *guanosine triphosphate*) oko vrata svakog pupoljka i tako oslobađa pupoljak od membrane, ili lokalno naruši staničnu membranu mijenjajući njen lipidni sastav i tako nastane vezikula obložena klatrinom.

Vezikularni transport ovisi o proteinima koji vežu GTP i kontroliraju vremenske i prostorne promjene membrane u vezikulama obloženim klatrinom ili neklatrinom. Ti se proteini ponašaju kao molekularni „prekidači“ između aktivnog stanja s vezanim GTP-om i inaktivnog stanja nakon hidrolize s vezanim GDP-om (eng. *guanosine diphosphate*). Kratko nakon stvaranja transportne

vezikule, uklanja se klatrinski omotač i u citosolu ostaje ogoljena transportna vezikula koja se prenosi do ciljnih organela (96).

1.3.1. ARH

ARH je adaptorni citosolni protein kodiran genom *LDLRAP1* (eng. *low density lipoprotein receptor adaptor protein-1*), jedan od glavnih proteina uključenih u metabolizam kolesterola i masnih kiselina (97). Njegova funkcija je okupljanje LDL receptora (eng. *low density lipoprotein receptor*, LDLR) u endocitički mehanizam, na način da fosfotirozin- vezujuća domena ARH-a na specifičan način reagira s citoplazmatskim repom LDLR (Slika 3). Aktivnost ARH-a ciklira između tri poznate forme: inaktivne, nenitrozilirane; aktivne nitrozilirane i disulfid vezanog stanja (Slika 3).



Slika 3. Prikaz aktivnosti proteina ARH. Fosfotirozin-vezujuća domena ARH-a reagira s citoplazmatskim repom LDLR. Iz slobodnog, inaktivnog, sulfhidrilnog (SH) oblika ARH-a se uz djelovanje sintaze dušikovog oksida (NOS, eng. *Nitric oxide synthases*) stvara aktivni, nitrozilirani oblik proteina ARH. Katalizacija vodi u inaktivaciju, disulfidni (SS) oblik ARH-a. Redukcijom uz citosolnu reduktazu (e⁻) iz disulfidno vezanog ARH-a nastaje slobodna sulfhidrilna (SH) forma. Aktivna forma ARH-a prikazana kao heksagon; inaktivna kao kvadrat. Preuzeto od Zhao Z. i sur., *Journal of Lipid Research*, 2013. Dostupno na: <https://doi.org/10.1194/jlr.M033167>. Licenca: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Mutacije gena *LDLRAP1* u području domene koja veže fosfotirozin imaju za posljedicu slabiju funkciju LDL-a i defektnu internalizaciju LDLR u jetri. AR familijarna hiperkolesterolemija

je karakterizirana poremećajem metabolizma lipida, upalom krvnih žila, nastankom aterosklerotskih plakova, povećanim kardiovaskularnim rizikom, pretilošću i inzulinskom rezistencijom (97,98). U 90% slučajeva su mutacije *LDLR* uzrok ove bolesti (99). Mutacije *LDLR* imaju ulogu u nastanku ateroskleroze povezane s reumatoidnim artritisom te potencijalno mogu služiti kao dijagnostički alat za prognozu progresije reumatoidnog artritisa (100).

Osim ARH-a, *LDLR*, *VLDLR* (eng. *very-low-density-lipoprotein receptor*), *LRP* imaju ulogu u vezivanju i internaliziranju lipoproteina *LDL* i *VLDL* i reguliraju njihov unos u stanicu. Ranije je istraživana njihova uloga u tumorima. *LRP6* je ujedno koreceptor za *WNT* signalni put. *LRP6* je važan u metabolizmu lipoproteina i triglicerida, homeostazi glukoze i nastanku ateroskleroze (101). Metabolizam kolesterola je ključan za homeostazu tumorskih stanica i može utjecati na osjetljivost na terapiju, progresiju i metastaziranje tumora, što je dokazano u karcinomu dojke (101). U tumorskim stanicama dolazi do preraspodjele u metabolizmu kolesterola i masnih kiselina i narušenog odnosa sinteze i degradacije.

Histološki je u stanicama *ccRCC*-a karakteristična svijetla obilna citoplazma ispunjena lipidima i glikogenom, što sugerira njihov mogući utjecaj na progresiju tumora. Metaboličko reprogramiranje zloćudnih stanica u *ccRCC*-u zasniva se na povećanju anaerobne glikolize aktivacijom pentoza-fosfatnog puta i sinteze masnih kiselina, a smanjenju oksidacije masnih kiselina i oksidativne fosforilacije (103–106). Specifične metaboličke alteracije, posebno smanjena aktivnost ciklusa limunske kiseline i stvaranja energije putem oksidacije acetil koenzima A (*CoA*), a povećana aktivnost pentoza-fosfatnog puta i sinteze masnih kiselina, povezane su s agresivnošću tumora i kraćim preživljenjem bolesnika s *ccRCC*-om (103,107). Metaboličke promjene u *ccRCC*-u su povezane s kliničkim stadijem. Povećana biosinteza masnih kiselina i smanjena oksidativna fosforilacija povezani su s ranijim stadijima, dok u kasnijim stadijima prevladavaju obrnuti metabolički obrasci s metabolizmom glutaciona kao vodećim (104). U *ccRCC*-u metaboličko reprogramiranje ovisi o gradusu tumora pa je Warburgov efekt prisutniji u tumorima višeg gradusa i to na račun smanjenja ciklusa limunske kiseline i oksidativnog metabolizma. Promjene ovisne o gradusu zapažene su u metabolizmu masnih kiselina, glutamina i glutaciona (105). U većem stadiju, višem gradusu, kod većeg promjera tumora i kraćeg preživljenja nađen je manji izražaj specifičnih enzima oksidacije masnih kiselina (108).

Istraživana je prediktivna vrijednost proteina uključenih u metabolizam kolesterola. U raku jajnika izražaj *LDLR* može odrediti učinkovitost terapije i terapijski ishod. U studiji na epitelnim stanicama raka jajnika je otkriveno da nedostatak *LDLR* može povećati osjetljivost, a prekomjerni izražaj *LDLR* smanjiti osjetljivost epitelnih stanica raka jajnika na citotoksične učinke cisplatine. Stoga izražaj *LDLR* ima potencijalnu prediktivnu vrijednost kao biljeg osjetljivosti na kemoterapiju

cisplatinom u raku jajnika (109). Također, u NSCLC je dokazano da kolesterol potiče rezistenciju na terapiju TKI-ima (110).

Na modelu RCC-a ispitivana je uloga LDLR u staničnoj proliferaciji, staničnom ciklusu i invaziji. Izražaj LDLR je viši u RCC-u nego u zdravom bubrežnom parenhimu i povišen u progresiji RCC-a. Eksperimentalno izazvan nedostatak LDLR u stanicama RCC-a zaustavio je stanični rast, migraciju i invaziju i inducirao arest staničnog ciklusa u G1/S fazi. Time je otkrivena važna uloga LDLR u karcinogenezi RCC-a, ali i moguća prediktivna uloga LDL i LDLR u budućnosti. Identificirana je interakcija između LDLR i EGFR, s obzirom da je EGFR signaliziranje smanjeno nakon izuzimanja LDLR (111,112).

Na preko 4000 ispitanika i 10 solidnih tumora ispitana je uloga različitih LRP-a i njihova povezanost s preživljenjem. Dokazano je da je u tumorima najviše izražen LRP1. Izražaj nekoliko mRNA *LRP* bio je povezan s lošijim ishodom urotelnog karcinoma. Visok izražaj mRNA *LRP1* bio je povezan lošijim preživljenjem u adenokarcinomu gušterače, visoki izražaj mRNA *LDLR* s lošijim ishodom hepatocelularnog karcinoma, karcinoma pluća i gušterače te visoki izražaj mRNA *LRP10* s kraćim preživljenjem. Međutim, u RCC-u je visoki izražaj mRNA *LRP2* bio povezan s dužim preživljenjem (113).

Važnost izražaja gena uključenih u metabolizam kolesterola utvrđena je nedavno u karcinomu jednjaka. Identificirana su četiri gena povezana s prognozom karcinoma jednjaka, između kojih *LDLRAP1* ima povoljnu prognostičku vrijednost jer bolesnici s visokim izražajem njegova proteina imaju bolji odgovor na terapiju i duže preživljenje (114).

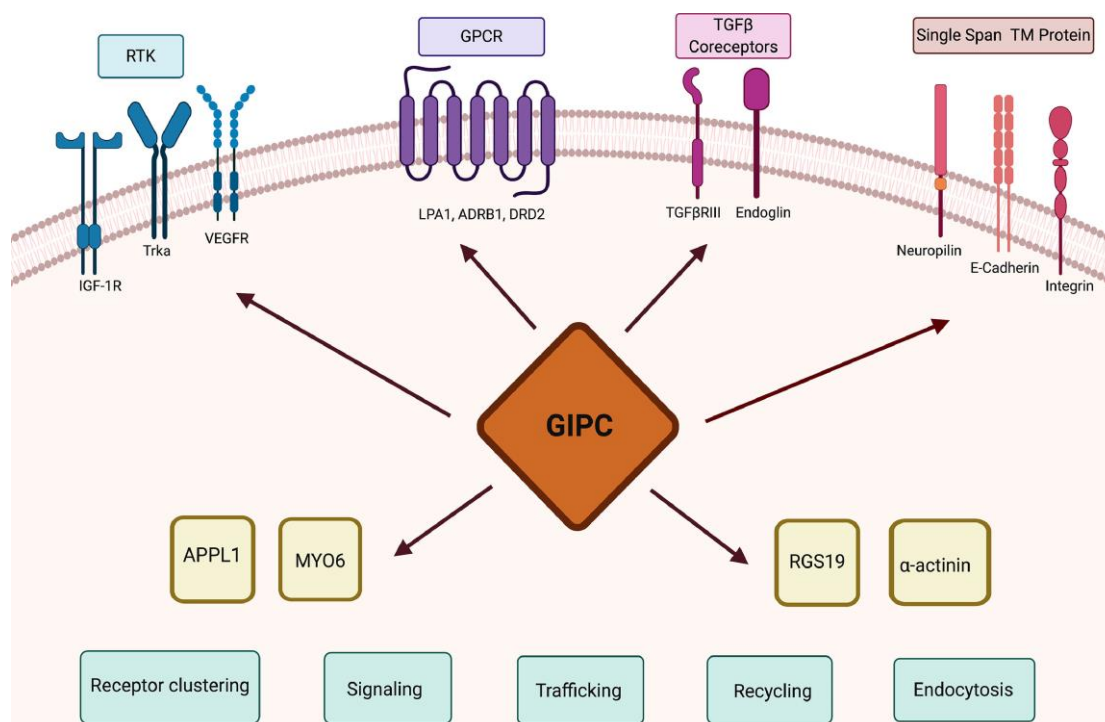
Prognostička važnost izražaja gena čiji proteini služe za unos kolesterola i metabolizam lipida se razlikuje u različitim tipovima raka dojke. Metabolit kolesterola 27-hidroksikolesterol selektivno potiče proliferaciju stanica u estrogen-receptor pozitivnim (ER+) tumorima dojke. Enzimi uključeni u biosintezu kolesterola i metaboliti 27-hidroksikolesterol i 25-hidroksikolestrol povezani su s rezistencijom ER+ tumora dojke na endokrinu terapiju (115). Antipenko i suradnici su dokazali da je proteinski izražaj gena *LDLR* i *LDLRAP1* povezanih s egzogenim unosom kolesterola značajno viši u HER2-pozitivnom (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*) raku dojke u odnosu na trostruko negativni rak dojke (eng. *triple-negative breast cancer*, TNBC). Također je veći izražaj 12 od 13 gena uključenih u endogenu biosintezu kolesterola, ali nije dokazan njihov prognostički značaj. U TNBC-u dislipidemija potiče progresiju tumora (102). LDLR je jače izražen u tumorskim stanicama nego u stanicama tumorskog imunog mikrookoliša i povezan s genima u matičnim stanicama raka dojke. LDLR suprimira proliferaciju imunosnih stanica i može doprinijeti progresiji tumorskih stanica (116).

Prediktivna vrijednost enzima uključenih u metabolizam kolesterola razlikuje se ovisno o tipu raka dojke. Upotreba statina, inhibitora hidroksi-metilglutaril-koenzim A (eng. *β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA, HMG-CoA*) reduktaze, smanjuje proliferaciju sekundarnih tumora. Statini mogu inhibirati rast TNBC-a u kombinaciji s doksorubicinom ili docetakselom (117). Dugotrajna upotreba statina smanjuje rizik povrata ER+ raka dojke, a kod ER- raka dojke povećavaju rizik povrata bolesti u prvih pet godina (118).

1.3.2. GIPC1

GIPC1 (sinektin) je ključni protein u GIPC obitelji receptora, kodiran *GIPC1* genom (119). Građen je od 333 aminokiseline i ima masu 36 kDa. Funkcija GIPC obitelji je regulacija G proteinskog signaliziranja. GIPC1 je u interakciji s mnoštvom receptora i proteina citoskeleta i u normalnim uvjetima adaptorski protein bitan za izražaj receptora na površini stanice, membransku translokaciju i endocitozu, stvaranje proteinskih kompleksa i angiogenezu. Do sad je poznato preko 50 proteina s kojima su u interakciji, uključujući VEGFR, IGF-1R (eng. *insulin-like growth factor-1 receptor*) (120), GPCR (eng. *G protein-coupled receptors*) i APPL (eng. *adaptor protein containing pleckstrin homology, leucine zipper and phosphotyrosine binding domains*) (121), od kojih mnogi imaju važnu ulogu u neurološkom i kardiovaskularnom razvoju. GIPC1 je nužan u interakciji između transmembranskih receptora, što postiže regulacijom sljedećih receptora na površini stanice: TGF β RIII (eng. *transforming growth factor β receptor type III*) (122), endoglina, RTK, GPCR i IGF1R (120) ili njihovom internalizacijom za ubranu endosomalnu signalizaciju. Također, GIPC1 stabilizira aktinski snop, staničnu adheziju, citokinezu i staničnu migraciju interakcijom s α -aktininom-1 (123), E-kadherinom i integrinima (124). GIPC1 ima ulogu u citoplazmatskom signaliziranju i migraciji proteina jer reagira s miozinom 6 (Myo6) (Slika 4). GIPC1 postiže učinak djelovanjem kroz središnji dio tzv. PDZ (eng. *Post-synaptic density-95, Disks-large, Zonula occludens-1*) domenu (119), koja veže i stabilizira brojne transmembranske receptore i signalne proteine IGF-1R, NTRK1 (eng. *Neurotrophic tyrosine receptor kinase 1*), TGF β R3, LRP1 (eng. *low density lipoprotein receptor-related protein 1*), NRP1 (Neuropilin-1) (125,126), GLUT1 (eng. *glucose transporter protein type 1*) (127), SDC4 (eng. *Syndecan-4*) (128), SEMA4C (eng. *Semaphorin-4C*), integrin α 5, VANGL2 (eng. *Van Gogh-like 2*) i virusne proteine. Većina PDZ liganda za GIPC su transmembranski proteini, a neki isključivo intracelularni kao APPL (121) i RGS 19 (eng. *regulator of G protein signaling 19*) (129) ili onkoproteini HBVc (eng. *Hepatitis B virus core protein*) (130), E6 (131) i Tax (132). GIPC je svestrani protein koji kontrolira mnoštvo

staničnih i patofizioloških procesa. Osim središnje PDZ domene, sastavnice GIPC1 su GH1 domena (N-terminalni dio) koja sudjeluje u dimerizaciji proteina i GH2 domena (C-terminalni dio) koja se veže za retrogradni protein miozin VI (MYO6), motorni protein koji prenosi vezane receptore u endocitične vezikule (133,134). GIPC djeluje kao adaptorski protein jer veže PDZ-vezujuće proteine na MYO6, kako bi ostvario promet različitih transmembranskih proteina u endocitne vezikule (134).



Slika 4. Prikaz GIPC ovisnih signalnih kompleksa. GIPC interagirira s različitim transmembranskim receptorima kako bi podržao njihovo zadržavanje površini stanice (TGFβRIII i endoglin) ili internalizaciju (IGF1R). GIPC također interagirira s citoplazmatskim signalnim i motornim proteinima (Myo6). Preuzeto od Ahmed T. i sur., Neoplasia, 2021. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.12.004>. Licenca: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Disregulacija proteinske aktivnosti GIPC zbog manjka ili prevelikog izražaja može poremetiti interakciju s čimbenicima rasta i signalnom mrežom za stanično preživljenje, što potiče onkogenezu i tumorsku progresiju (119). Posljednjih godina je porastao interes za ulogu GIPC u biologiji tumora. GIPC reagira s membranskim receptorima i intracelularnim proteinima, regulira

biologiju tumorskih stanica i tumorsku vaskularizaciju. Većina receptora koji se vežu na GIPC i njihove citoplazmatske efektorske molekule potiču tumorigenezu i metastatsku progresiju, ali neki pokazuju snažni tumor-supresivni učinak. Povećani izražaj GIPC1 nalazi se u karcinomu želuca (135), dojke (136), jajnika (137) i gušterače (138). U njima GIPC1 potiče proliferaciju i invaziju tumorskih stanica i povezan je s lošijom prognozom. U karcinomu želuca GIPC1 povećava izražaj PDGFR- α i PDGFR- β , odnosno tirozin-kinaze i proto-onkogeni koji reagiraju na PDGF, što aktivira PIK3/AKT signalni put (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) i potiče angiogenezu, limfangiogenezu, proliferaciju i migraciju tumorskih stanica (135). GIPC1 je uključen u progresiju tumorskih stanica u gliomu (139) i karcinomu pluća (140).

Nasuprot tome, sniženi izražaj GIPC1 nađen je u karcinomima grlića maternice (131), bubrega (141), debelog crijeva (142) i prostate (141), u kojima GIPC1 potiče tumor-supresivne učinke - smanjuje proliferaciju i migraciju i povećava apoptozu tumorskih stanica. Oponirajući učinci GIPC-a u tumoru su posljedica različitih signalnih puteva u koje je uključen, tipa PDZ liganda i jačine povezanosti s tumorskim stanicama (143).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja

U preparatima svjetlostaničnog karcinoma bubrega obojenim imunofluorescentnom metodom i računalno analiziranim

- kvantificirati i usporediti izražaj INVS, ARH i GIPC1 u tumoru i okolnom zdravom bubrežnom parenhimu
- analizirati povezanost izražaja INVS, ARH i GIPC1 s praćenim kliničko-patološkim pokazateljima i mjerama ishoda
- uraditi analizu mRNA (eng. *messenger ribonucleic acid*) za INVS metodom rtPCR (eng. *reverse transcription Polymerase Chain Reaction*) i usporediti s izražajem INVS imunofluorescentnom metodom.

Hipoteze

Izražaj INVS je smanjen u svjetlostaničnom karcinomu bubrega u odnosu na zdravi parenhim bubrega i povezan s nepovoljnim prognostičkim pokazateljima.

Izražaj ARH i GIPC1 su povećani u svjetlostaničnom karcinomu bubreg u odnosu na zdravi bubrežni parenhim i povezani s nepovoljnim progostičkim pokazateljima.

3. METODE I MATERIJALI

Ova presječna restrospektivna studija urađena je na Zavodu za patologiju Sveučilišne kliničke bolnice Mostar (SKB Mostar) i Laboratoriju za morfologiju Zavoda za histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru u sklopu projekta prof. dr. sc. Violete Šoljić, na kojem su surađivale pristupnica i mentorica. Imunofluorescentno bojenje, mikroskopska analiza i statistička obrada urađeni su u Laboratoriju za temeljna istraživanja krvožilnog sustava na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog vijeća Kliničke bolnice Mostar (broj protokola 01-I-245/21 i 141/24).

3.1. Ispitanici

U uzorku su 34 ispitanika koji su zbog primarnog svijetlostaničnog karcinoma bubrega bili podvrgnuti nefrektomiji u Sveučilišnoj kliničkoj bolnici Mostar (SKB), BiH, u razdoblju od 1. siječnja 2009 do 31. prosinca 2019. godine. Parafinski blokovi tumorskog tkiva i zdravog bubrežnog parenhima prikupljeni su iz arhive Zavoda za patologiju SKB Mostar, a klinički podaci iz Klinike za urologiju i Klinike za onkologiju iste ustanove.

Originalni histološki preparati bojeni hemalaun-eozinom (HE) su revidirani od strane iskusnog patologa i analizirani su patohistološki pokazatelji.

Kliničko praćenje ispitanika bilo je od datuma nefrektomije do zaključenja studije 31. ožujka 2022. godine ili do datuma smrti, a izraženo u mjesecima kao ukupno preživljenje (OS).

Tijekom praćenja svi ispitanici razvili su metastatsku bolest, 21 s postavljenom dijagnozom po nefrektomiji, a 13 tijekom kliničkog praćenja. Preživljenje bez znakova bolesti (DFS) računato je od datuma postavljanja patološke dijagnoze do datuma prvog pozitivnog nalaza kontrolne dijagnostičke obrade (MSCT abdomena, MSCT toraksa, scintigrafija skeleta, CT glave), na kojem je zabilježena morfološka progresija bolesti. Nakon dijagnosticirane metastatske bolesti, ispitanici su prema tad važećim smjernicama dobre kliničke prakse bili liječeni sunitinibom (54). Praćeni kliničko-patološki pokazatelji: dob, spol, TNM stadij, gradus tumora, prisutnost nekroze i krvarenja u tumoru, mjesto i broj metastatskih sijela, ECOG PS, IMDC prognostička grupa, nepovoljni čimbenici u prognostičkom modelu (vrijeme od dijagnoze do metastatske bolesti kraće od 12 mjeseci, serumski kalcij viši od gornje granice normalne vrijednosti, serumski hemoglobin niži od donje granice normalne vrijednosti, ANC i broj trombocita viši od gornje granice normalne vrijednosti). Kriteriji uključenja bili su da ispitanici prije nefrektomije nisu bili liječeni

specifičnom onkološkom terapijom, da uz ccRCC nemaju drugi zloćudni tumor, niti su bili liječeni specifičnom onkološkom terapijom za tu bolest, da nemaju komorbiditeta ili su lošeg općeg stanja, da u vrijeme dijagnosticiranja ccRCC nisu imali kroničnu bubrežnu bolest, uključujući dijabetičku nefropatiju, što bi moglo utjecati na izražaj ispitivanih biljega. Od ukupno 55 ispitanika koji su u promatranom razdoblju bili operirani od ccRCC, njih 34 je prema navedenim kriterijima uključeno u studiju. Svi ispitanici su imali kliničko praćenje do kraja studije, relevantne kliničko-patološke podatke i dovoljno tumorskog i tkiva zdravog bubrežnog parenhima u parafinskom bloku.

3.2. Postupci

3.2.1. Imunofluorescencijsko bojenje

Nakon totalne nefrektomije je tkivo tumora/okolnog zdravog bubrežnog parenhima bilo fiksirano u 10% neutralnom formalinu. Preuzeti isječci su dehidrirani u gradijentu alkohola u histokinetu, izbistreni u ksilolu i parafinirani te uklopljeni u parafinske blokove. Parafinski blokovi su na rotacijskom mikrotomu izrezani na rezove debljine 3 μ m i montirani na histološka stakalca. Prije bojenja su preparati deparafinirani ksilenom i rehidrirani u gradijentu alkohola do vode, kuhani 30 minuta u puferu natrijevog citrata (pH 6.0) na 95 stupnjeva radi otvaranja antigena, ohlađeni su na sobnoj temperaturi i isprani u otopini fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline* – PBS). Potom je apliciran protein-blokirajući pufer (ab64226) tijekom 15 minuta i nakon njega odgovarajuće primarno protutijelo (Tablica 4). Preparati su inkubirani na sobnoj temperaturi u tamnoj vlažnoj komori preko noći. Poslije višestrukih ispiranja u PBS-u, aplicirano je odgovarajuće sekundarno protutijelo (Tablica 4) i preparati inkubirani u tamnoj vlažnoj komori na sobnoj temperaturi 1 sat. Histološki rezovi su potom isprani u PBS-u. Kontrastno su obojeni DAPI-jem (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), pokriveni medijem (ImmuMount, Shandon, Pittsburgh, PA) i pokrovnicom.

Tablica 4. Primarna i sekundarna protutijela korištena u istraživanju.

	Protutijelo (izvorni naziv)	Domaćin	Šifra br.	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna	Polyclonal anti-inversin antibody	Kunić	ab65187	1:50	Abcam, Cambridge, UK
	Polyclonal anti-ARH antibody	Kunić	GTX64629	1:100	GeneTex, SanAntonio, Texas
	Polyclonal anti-GIPC1 antibody	Kunić	14822-1-AP	1:100	Proteintech Group, Inc., Rosemont, IL, SAD,
Sekundarno	Anti - Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 AniPure Donkey	Magarac	711-545-152	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD

3.2.1.1. Mikroskopska analiza

Preparati su pregledani na fluorescencijskom mikroskopu (BX61, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani na velikom povećanju (400x) pomoću digitalne kamere DS-Ri2 (Nikon, Tokyo, Japan), opremljenom s NIS-Elements F softverom (verzija 4.60). Fotografirano je najmanje 10 vidnih polja velikog povećanja (VPVP) tumora i najmanje 10 VPVP okolnog zdravog bubrežnog parenhima.

Za objektivno utvrđivanje imunofluorescentnog izražaja INVS, ARH i GIPC1 u mikrofotografijama korišten je ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Inicijalno je oduzeta crvena komponenta slike i apliciran filter medijana s polumjerom od 20 piksela. Potom je primijenjen algoritam „Triangle” za određivanje graničnog (engl. *threshold*) praga za INVS, ARH odnosno GIPC1 i izmjeren postotak (%) pozitivnog područja uz funkciju *analyze particles*. Koristeći ImageJ, u obrađenim mikrofotografijama mjerenje % površine pod pozitivnim signalom vršeno je bez ograničenja minimalne veličine ili oblika analiziranog objekta. U svakoj mikrofotografiji je srednja vrijednost postotka površine pod pozitivnim signalom upotrijebljena kao mjera postotka pozitivne površine tkiva tumora/zdravog bubrežnog parenhima. U preparatu je analizirano cijelo područje tumora, odnosno zdravog bubrežnog parenhima. Slike za prikaz su obrađene u programu Adobe Photoshop (Adobe Inc., San Jose, CA) uz oduzimanje pozadine i blagi kontrast.

3.2.2. Izolacija RNA i RT-qPCR za INVS

Izolirana je RNA iz tumorskog tkiva primarnog ccRCC-a u 28 ispitanika i 10 uzoraka zdravog bubrežnog parenhima. Postupak je započeo rezanjem multiplih rezova tumorskog tkiva i zdravog bubrežnog parenhima, debljine 5 μm , koji su stavljeni u mikroepruvete, potom deparafinizirani ksilenom i centrifugirani na 14 000 rpm kroz 2 minute. Dobiveni precipitat je dalje tretiran sukladno uputama proizvođača GenElute™ FFPE RNA Purification Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka). Protokol je započeo deparafiniziranjem tkiva, kroz višestruka ispiranja u ksilenu i etanolu, praćeno dodatkom proteinaze K i odgovarajućeg pufera za lizu tkiva. Potom je dodan etanol staničnom lizatu te je otopina aplicirana u spin-kolonu. Vezana RNA isprana je sa spin-kolone pomoću pufera za ispiranje. Za mjerenje ukupne koncentracije RNA u svakom uzorku korišten je Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Svi uzorci su razrijeđeni na jednaku koncentraciju, od 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, odnosno do najniže izmjerene koncentracije RNA.

Nakon izolacije RNA, upotrijebljen je iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (144), za analizu izražaja humanog INVS gena. Uz pomoć Primer-BLAST softvera (NCBI, Bethesda, MD) dizajnirane su početnice koje su korištene u RT-qPCR metodi (Tablica 5). Softver koristi Primer3 verziju 2.5.0 za dizajniranje PCR početnica, a potom BLAST i algoritam poravnanja kako bi se izbjegli parovi početnica koji mogu uzrokovati nespecifične amplifikacije. Svi uzorci su pripremljeni dvostruko, a RPL13a je bio korišten kao referentni gen. Mastermix je sadržavao RNA, odabrane početnice (Tablica 4), SYBR® Green Taq

ReadyMix za kvantitativni RT-PCR i vodu bez nukleaze. Za analizu je korišten sustav Applied Biosystems™ 7500 RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Voda bez nukleaze, umjesto cDNA uzorka, služila je kao negativna kontrola, a uzorci zdravog bubrežnog parenhima pozitivna kontrola (145). Kao metoda relativne kvantifikacije qPCR-a upotrijebljena je $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoda (146). Neupareni *t*-test korišten je za usporedbu između dvije istraživane skupine.

Tablica 5. Početnice korištene u RT-rtPCR.

Transkript	'Forward' početnica	'Reverse' početnica	T _m F/R	CG% F/R
RPL13a	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	63.1/60.5	52.17/40.00
INVS*	TGCACTATGCTGCTCAGAGTAA	GCCAGCTGCCCCACATAAAGG	59.50/61.67	45.45/60.00

*INVS početnice su dizajnirane za prepoznavanje 3 varijante: *Homo sapiens* inversin (INVS), transkript varijanta 1, *Homo sapiens* inversin (INVS), transkript varijanta 4 i *Homo sapiens* inversin (INVS), transkript varijanta 5

3.3. Statistički postupci

Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa koji se nalazi na mrežnoj stranici University of California San Francisco <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun su korišteni preliminarni podaci dobiveni iz pilot istraživanja na 10 uzoraka temeljem analize fotografija tumora i okolnog zdravog bubrežnog parenhima za izražaj inversina, sa sljedećim parametrima; $\mu_1 = 0,27$, $\mu_2 = 0,65$, $\sigma = 0,40$, $\text{power} = 80\%$, $p = 0,05$, pri čemu je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka $n = 19$.

Statistička obrada je izvršena uz pomoć programa GraphPad Prism 8 Softwer (version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA). Za usporedbu izražaja istraživanih biljega između tumora i zdravog bubrežnog parenhima, odnosno usporedbu između dvije istraživane skupine podataka, korišten je neupareni *t*-test. Statistička značajnost je određena na $p < 0.05$. Rezultati su interpretirani na razini značajnosti $p < 0,05$.

Spearmanovim i Pearsonovim koeficijentom korelacije su izražene povezanosti između kliničko - patoloških karakteristika i imunohistokemijskog izražaja biljega.

3.4. Bioinformatička analiza

3.4.1. Izražaj INVS u bubregu i INVS interakcijska mreža

Podatci iz baze Human Protein Atlas, HPA (145, 147-149) (<https://www.proteinatlas.org/>) (pristupljeno 1. ožujka 2024.) su upotrijebljeni kako bismo potvrdili izražaj mRNA *INVS* i proteina u različitim tkivima, uključujući i bubrege, kao i prisutnost mRNA *INVS* u različitim tumorima, uključujući i ccRCC, kao i u različitim staničnim linijama normalnih stanica bubrega i staničnim linijama tumora bubrega. Koristili smo podatke transkriptomске analize bubrega u HPA iz GSE131685 baze podataka (150) kako bismo potvrdili izražaj mRNA *INVS* u različitim klasterima stanica normalnih ljudskih bubrega. STRING baza podataka, 12.0 verzija (151) (pristupljeno 23. rujna 2023., s upitom “INVS” i *Homo sapiens*) je upotrijebljena kako bismo odredili INVS interakcijsku mrežu. Kao rezultat, identificirali smo 10 INVS partnera.

3.4.2. Preživljenje i statistička analiza u TCGA-KIRC kohorti

Klinički podaci ccRCC-a (TCGA-KIRC baza podataka) i RNA-sekvencija iz TCGA portala su preuzeti sa University of California Santa Cruz (UCSC) Xena baze podataka (152) (<https://xenabrowser.net/datap>) (pristupljeno 10. svibanj 2024.) te je istraživana povezanost izražaja INVS, ARH i GIPC1 sa preživljenjem. Uzorci bez podataka o izražaju INVS, ARH i GIPC1 su uklonjeni filtriranjem te je preostalo 605 uzoraka. Korišteni su podaci za ekspresiju samo u primarnom tumoru (N = 533) i u uzorcima normalnog solidnog tkiva (N = 72). Podaci iz primarnog tumora (533 uzorka) su upotrijebljeni za analizu i izradu Kaplan–Meierovih krivulja. Medijan je korišten kao granična vrijednost. Različite Kaplan–Meierove krivulje su uspoređene uz pomoć log-rank testa i χ^2 te su navedene p vrijednosti (χ^2 distribucija). Analiza diferencijalne ekspresije INVS uz Welch-ov t-test je korištena zbog usporedbe M1 (N = 79) u odnosu na M0 (N = 422) patološki M stadij (za podatke u kojima je M stadij poznat). Jednostrani ANOVA test je korišten za usporedbu podataka o ekspresiji INVS, u odnosu na histološki gradus tumora, a nakon uklanjanja uzoraka za koje nije bilo podataka - GX (N = 5) i null (N = 3) pa je usporedba napravljena na 525 uzoraka različitih gradusa: (G1-14, G2 - 229, G3 - 206, G4 - 76).

3.4.3. Povezanost INVS, njegovog interaktoma i imunosnog mikrookoliša

U svrhu otkrivanja mehanizama djelovanja INVS i njegovog interaktoma na patogenezu ccRCC-a i kliničke ishode ispitanika, upotrijebili smo TISIDB (153) (<http://cis.hku.hk/TISIDB/inde>) (pristupljeno 1. ožujka 2024.), kako bismo istražili povezanost izražaja INVS i njegovih partnera na leukocitnu infiltraciju u ccRCC-u (iz KIRC kohorte). Procijenili smo povezanost izražaja INVS i gena od interesa u njegovom interaktomu (NPHP3, DVL1, DVL3 i ANKS6) sa tumorskom infiltracijom imunološkim stanicama uz upotrebu različitih algoritama (XCELL, TIMER, QUANTISEQ, EPIC, CIBERSORT, CIBERSORT-ABS i MCPCOUNTER). Koristili smo GEPIA bazu podataka (154) (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) (pristupljeno 9. veljače 2024.), kako bismo istražili povezanost izražaja INVS i njegovih partnera s genima imunoloških kontrolnih točaka u ccRCC-u (iz KIRC kohorte) (155,156). Dodatno smo upotrijebili TIMER 2.0 (157) (<http://timer.cistrome.org/>) (pristupljeno 29. siječnja i 9. veljače 2024.), kako bismo istražili moguću povezanost izražaja INVS u ccRCC-u (iz KIRC kohorte) sa različitim imunomodulatorima. Analizirali smo i bazu podataka autora Miao i suradnika (2018) (158), kako bismo istražili potencijalni odgovor u izražaju INVS i njegovih interaktomskih partnera nakon terapije različitim inhibitorima kontrolnih točaka (pembrolizumab, ipilimumab, nivolumab i atezolizumab) u ccRCC-u, NSCLC-u, urotelnom karcinomu i melanomu.

4. REZULTATI

4.1. Demografska i kliničko-patološka obilježja

Srednja dob ispitanika bila je 60,3 godine (raspon: 46–76). Srednja dob muškaraca je bila 60,7 (raspon: 49–76) godina, a žena 59,9 (raspon: 46–76). Muški spol je bio zastupljeniji (nešto manje od 3/4 muškaraca i 1/4 žena). Ispitanici su bili dobrog općeg stanja, većinom ECOG PS 0 (16 ispitanika) i ECOG 1 (13 ispitanika). Nijedan ispitanik nije bio ECOG PS 3 ni 4. U vrijeme postavljanja patološke dijagnoze, TNM stadij bolesti 3 je bio najzastupljeniji, u više od polovine ispitanika. Gradus tumora 2 i 3 su bili jednako zastupljeni (po 14 tumora), a 6 tumora klasificirano u gradus 4. Gradus 1 nije bio zastupljen. Većina ispitanika je dobila povrat bolesti unutar godinu dana od postavljene dijagnoze, a pluća su bila najčešće sjelo metastatske bolesti (u 3/4 ispitanika), potom kosti (u 1/3 ispitanika). Većina ispitanika je u vrijeme dijagnosticiranja metastatske bolesti imala jedno metastatsko sjelo, a trećina ispitanika 2 metastatska sjela. Podjednako su bile zastupljene srednja (15 ispitanika) i loša (16 ispitanika) IMDC prognostička skupina. Navedena obilježja ispitanika prikazana su u Tablici 6.

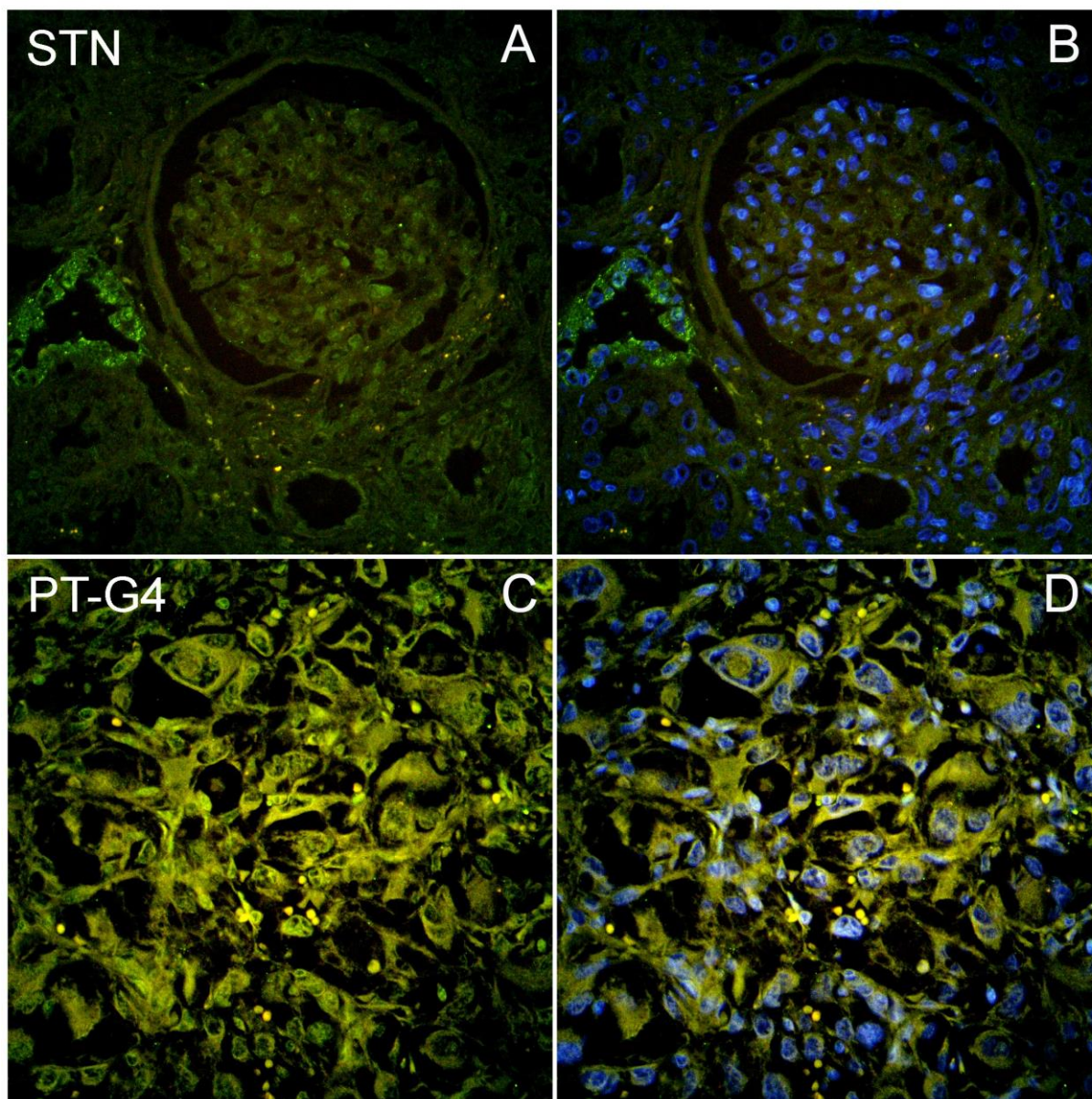
Tablica 6. Raspodjela demografskih i kliničko patoloških pokazatelja kod 34 ispitanika podvrgnutih nefrektomiji zbog svijetlostaničnog karcinoma bubrega

	N (%)
Karakteristike	
Broj bolesnika	34
Dob (godine)	
Srednja vrijednost (raspon)	60,7 (46-76)
Spol	
Ženski	10 (29)
Muški	24 (70,5)
ECOG PS	
0	16 (47)
1	13 (38)
2	5 (14,7)
3	0
4	0
Gradus tumora	
1	0
2	14 (41)
3	14 (41)
4	6 (17,6)
TNM stadij bolesti	

I	9 (26)
II	2 (5,9)
III	19 (55,8)
IV	4 (11,7)
Pojava metastatske bolesti, mjeseci	
<12	28 (82)
≥12	6 (17,6)
Metastatsko sijelo	
pluća	25 (73,5)
jetra	5 (14,7)
limfni čvorovi	4 (11,7)
kost	10 (29)
samo kost	3 (8,8)
mozak	1 (2,9)
Broj metastatskih sijela	
1	21 (61,7)
2	10 (29)
3	2 (5,8)
4	1 (2,9)
IMDC prognostička skupina	
povoljna	3 (8,8)
srednja	15 (44)
loša	16 (47)
Medijan ukupnog preživljenja	
mjeseci (raspon)	32,6 (2-118)

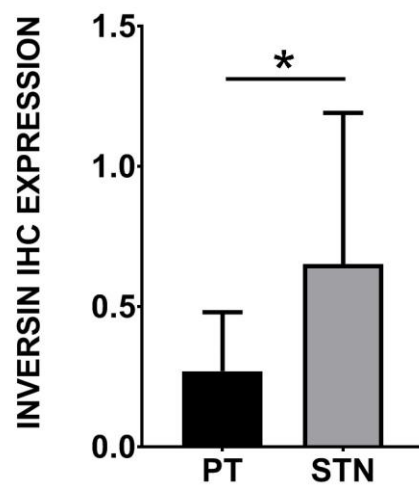
4.2. Izražaj INVS i mRNA *INVS* u svjetlostaničnom karcinomu bubrega

INVS je bio značajno slabije izražen u stanicama ccRCC-a, nego u stanicama okolnog zdravog bubrežnog parenhima ($p < 0,05$) (Slika 5a, b i c). U zdravom bubrežnom parenhimu, najveća imunoreaktivnost INVS je zapažena u tubularnom epitelu, ali je bila prisutna i u glomerulima, u citoplazmi i/ili jezgri, dok je u tumoru pronađen vrlo slab izražaj, pretežno u jezgri (Slika 5a).

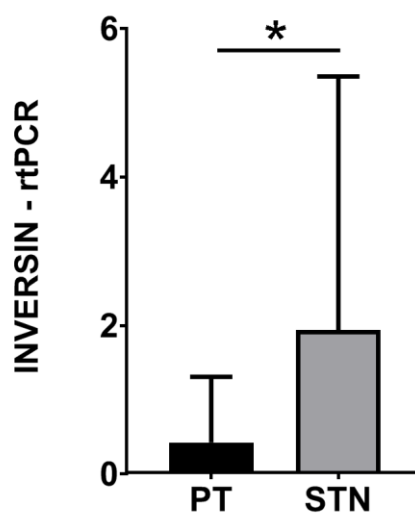


Slika 5a. Usporedba izražaja inversina (INVS) u zdravom bubrežnom parenhimu (A, B) i svjetlostaničnom karcinomu bubrega gradusa 4 (C, D). INVS se vidi kao zeleni točkasti signal, dok je jezgra modra, obojena s DAPI (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*); povećanje $\times 400$.

STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT-G4 - eng. *primary tumor grade 4*



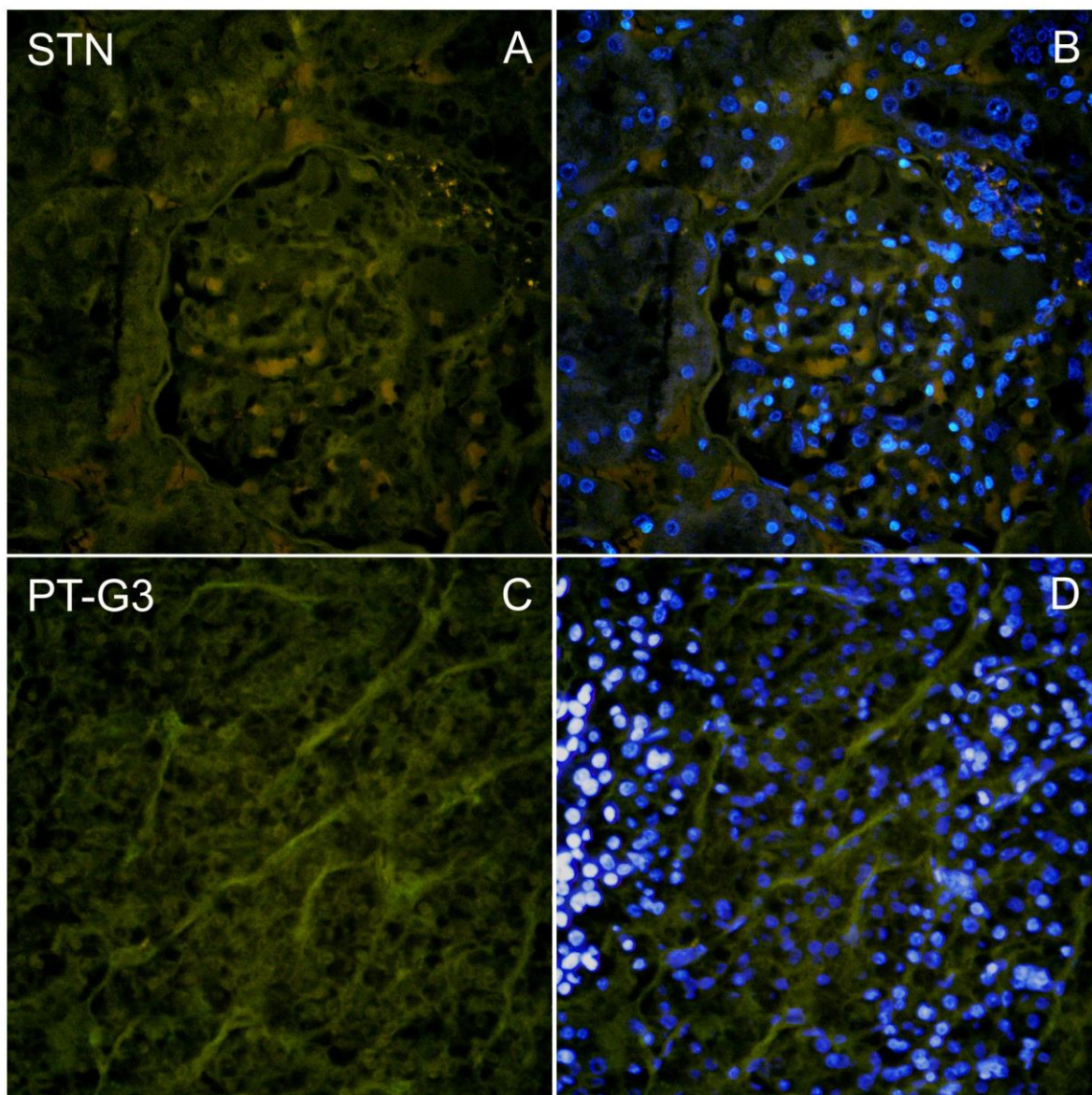
Slika 5b. Usporedba kvantificiranog imunofluorescencijskog izražaja INVS između svjetlostaničnog karcinoma i okolnog zdravog bubrežnog parenhima. * $p < 0,05$; Scale bar = 50 μm ; STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT - eng. *primary tumor*



Slika 5c. Usporedba vrijednosti *mRNA INVS* između svjetlostaničnog karcinoma i okolnog zdravog bubrežnog parenhima. * $p < 0,05$; Scale bar = 50 μm ; STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT - eng. *primary tumor*

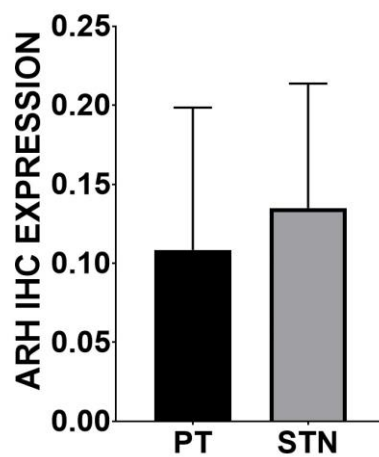
4.3. Izražaj ARH u svijetlostaničnom karcinomu bubrega

Imunofluorescentni izražaj ARH je bio vrlo slabo izražen, nešto slabiji u tumoru nego u okolnom zdravom bubrežnim parenhimu, a usporedbom kvantificiranih signala nije nađena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) (Slika 6a i 6b). U zdravom bubrežnom parenhimu, najveća imunoreaktivnost ARH je bila u tubularnom epitelu i glomerulima, dok je imunoreaktivnost u tumoru bila ograničena na citoplazmu, u vidu blago difuznog obojenja.



Slika 6a. Usporedba izražaja ARH u zdravom bubrežnom parenhimu (A, B) i svjetlostaničnom karcinomu bubrega gradusa 3 (C, D). ARH se vidi kao zeleni točkasti signal, dok je jezgra modra obojena s DAPI (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*); povećanje $\times 400$, scale bar 50 μm .

STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT - G3 - eng. *primary tumor grade 3*

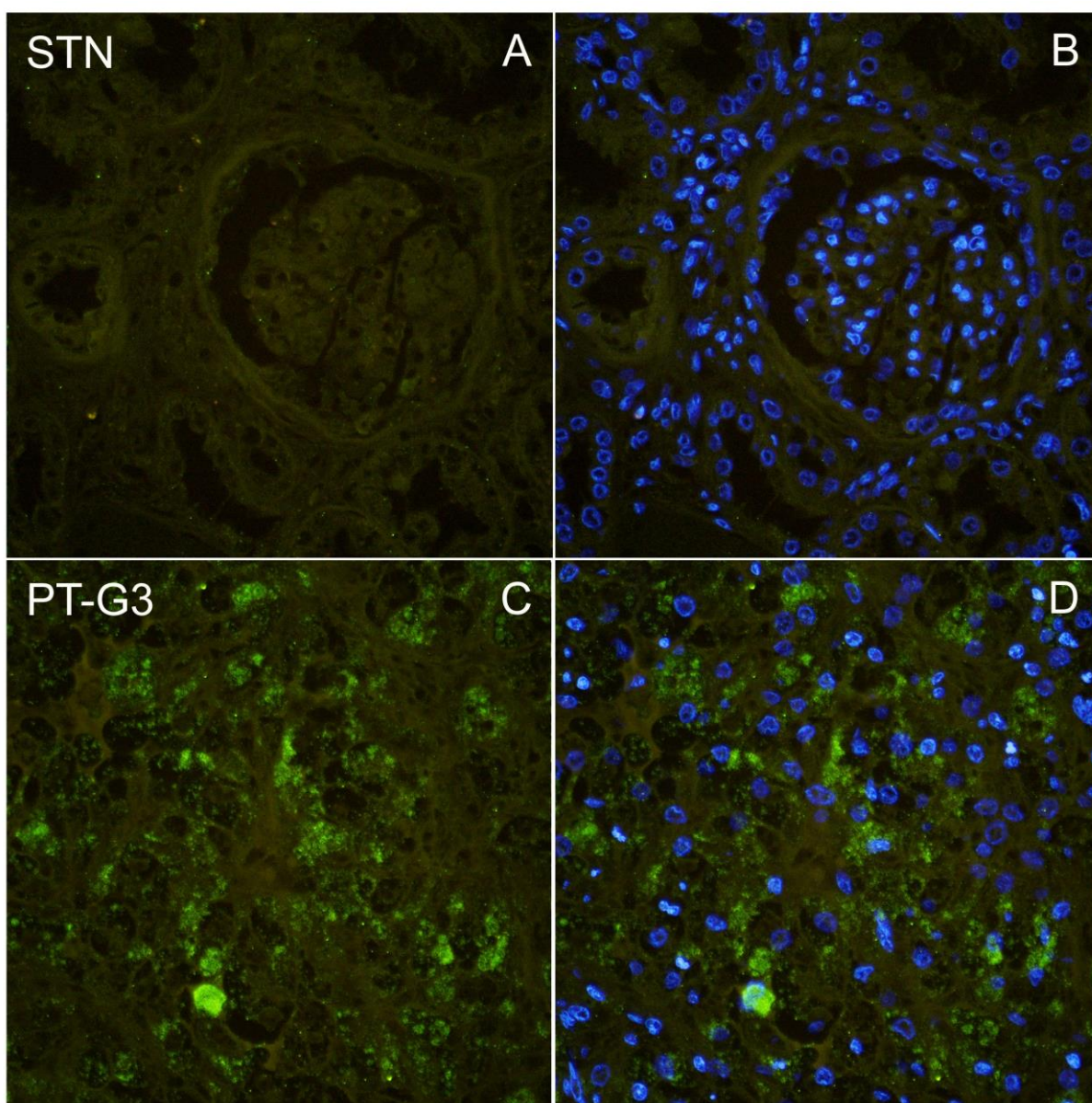


Slika 6b. Usporedba kvantificiranog imunofluorescencijskog izražaja ARH između svjetlostaničnog karcinoma bubrega i okolnog zdravog bubrežnog parenhima.

* $p < 0,05$; scale bar = 50 μm ; STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT - eng. *primary tumor*

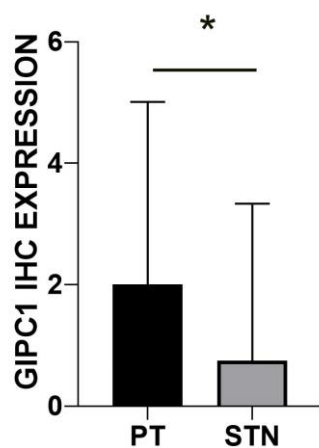
4.4. Izražaj GIPC1 u svijetlostaničnom karcinomu bubrega

Imunofluorescentni izražaj GIPC1 se značajno razlikovao u ccRCC-u i okolnom zdravom bubrežnom parenhimu ($p < 0,05$) (Slika 7a i 7b). U ccRCC-u je imunoreaktivnost bila jača i izražena većinom u citoplazmi zloćudnih stanica, dok je u zdravom bubrežnom parenhimu bila slaba i izražena uglavnom u citoplazmi epitelnih stanica kanalića, ali je bila prisutna i u glomerulima, u obliku vrlo sitnih granula.



Slika 7a. Usporedba izražaja GIPC1 u zdravom bubrežnom parenhimu (A, B) i svjetlostaničnom karcinomu bubrega gradusa 3 (C, D). GIPC1 se vidi kao zeleni točkasti signal, dok je jezgra modro obojena s DAPI (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*); povećanje $\times 400$; Scale bar 50 μm .

STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT - G3 - eng. *primary tumor grade 3*

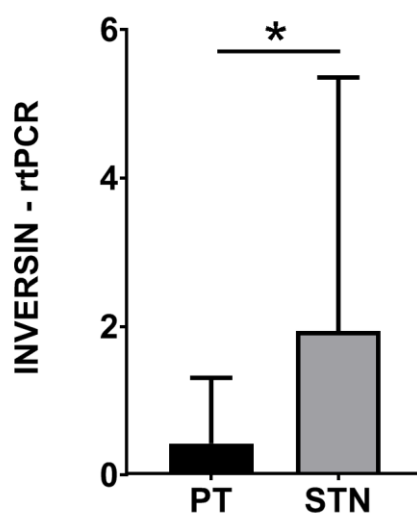


Slika 7b. Usporedba kvantificiranog imunofluorescencijskog izražaja GIPC1 između svjetlostaničnog karcinoma i okolnog zdravog bubrežnog parenhima.

* $p < 0,05$; Scale bar 50 μm ; STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT - eng. *primary tumor*

4.5. Rezultati mRNA *INVS* rtPCR analize

Uzorci primarnih ccRCC-a 28 ispitanika i 10 uzoraka zdravog bubrežnog parenhima bili su analizirani metodom rt-PCR analize. Urađena analiza kvantifikacije mRNA *INVS* pomoću rtPCR potvrdila je rezultate imunofluorescencije za izražaj *INVS*. Izražaj mRNA *INVS* bio je značajno manji u tkivu ccRCC-a, nego u okolnom zdravom bubrežnom parenhimu ($p < 0,05$). (Slika 8).



Slika 8. Usporedba vrijednosti mRNA *INVS* između svjetlostaničnog karcinoma bubrega i okolnog zdravog bubrežnog parenhima.

* $p < 0,05$; Scale bar = 50 μm ; STN - eng. *solid normal renal tissue*; PT - eng. *primary tumor*

4.6. Usporedba izražaja INVS, ARH i GIPC1 s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega

Istraživani biljezi su analizirani po svim praćenim pokazateljima.

4.6.1. Usporedba izražaja INVS s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega

Izražaj INVS u tumoru pokazuje negativnu povezanost sa životnom dobi ispitanika u vrijeme početka liječenja (Pearsonov koeficijent korelacije $R = -0,367$, $p = 0,046$). Druge varijable nisu značajno povezane s imunofluorescentnim izražajem INVS (Tablica 7).

Tablica 7. Povezanost izražaja INVS u svijetlostaničnom karcinomu bubrega s praćenim kliničko - patološkim varijablama.

KARAKTERISTIKE	Izražaj INVS u tumoru		
		N	p
Spol	Muški	24	0,4868
	Ženski	10	
Gradus tumora	2	14	0,2902
	3	14	
	4	6	
Patološki T	1	8	0,5514
	2	2	
	3	21	
	4	3	
Patološki N	nepoznat	21	0,4916
	negativan	11	
	pozitivan	2	
Patološki M	nepoznat	33	0,7896
	negativan	1	
	pozitivan	0	
Stadij bolesti prema TNM	1	9	0,5458
	2	2	
	3	19	
	4	4	
Nekroza	ne	7	0,7314
	da	27	
Krvarenje u tumoru	ne	19	0,6751
	da	15	
Infiltracija kapsule	ne	4	0,3125
	da	30	
Kirurško liječenje	da	34	0,6091
	ne	0	

Bubreg	desni lijevi	14 20	0,7844
Vrijeme od dijagnoze do udaljenih metastaza	tijekom onkološkog praćenja inicijalno	13 21	0,5676
Vrijeme od dijagnoze do pojave udaljenih metastaza	≥12 mj <12 mj	6 28	0,2797
Broj metastaza	solitarne multiple	2 32	0,366
IMDC prognostička grupa	povoljna intermedijarna loša	3 15 16	0,8979
Hemoglobin <	da ne	17 17	0,9698
Kalcij u krvi >	da ne	7 27	0,6256
ANC >	da ne	9 25	0,4734
Trc >	da ne	6 28	0,4536
Karnofsky PS < 80	da ne	19 15	0,6907
Vrijeme od dijagnoze do liječenja	≥12 mj <12 mj	6 28	0,7603
ALP	uredna povišena	25 9	0,174
LDH	uredna povišena	27 7	0,8429
Metastaza pluća	da ne	25 9	0,3233
Metastaza limfni čvorovi	da ne	4 30	0,4718
Metastaza kosti	da ne	10 24	0,826
Metastaza jetra	da ne	5 29	0,1721
Metastaza bubreg	da ne	1 33	0,3208
Metastaza mozak	da ne	1 33	0,6444
Metastaza drugo	da ne	5 29	0,9202
Dob u vrijeme operacije	<60 ≥60	16 19	0,0813*
Dob na početku terapije	<60 ≥60	14 21	0,0461*
DMFS			0,3324*
Medijan OS		- 0 , 0 8 9 0 6	0,5949*

	1	21	
	2	10	
	3	2	
Broj metastatskih sijela	4	1	0,7761*

p statistička vrijednost za Spearmanov koeficijent korelacije, p* statistička vrijednost za Pearsonov koeficijent korelacije; statistički značajna vrijednost < 0,05 vrijedi za oboje, masno otisnute i podcrtane statistički značajne povezanosti

Legenda N broj ispitanika T tumor, N limfni čvor, M udaljena metastaza, IMDC eng. *International Metastatic RCC Database Consortium*, ANC eng *Absolute Neutrophil Count*, Trc trombociti, ALP alkalna fosfataza, LDH laktat dehidrogenaza DMFS eng *Disease Metastatic Free Survival*, OS eng. *Overall Survival*

4.6.2. Usporedba izražaja ARH s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega

Izražaj ARH u tumoru pokazuje negativnu povezanost s pojavom metastaza u jetru (Spearmanov koeficijent korelacije $R = -0.3373$, $p = 0.0412$). Druge varijable nisu značajno povezane s imunofluorescentnim izražajem ARH. Povezanost ARH u ccRCC-u s kliničko-patološkim varijablama prikazana je u Tablici 8.

Tablica 8. Povezanost izražaja ARH u svijetlostaničnom karcinomu bubrega s praćenim kliničko-patološkim varijablama.

KARAKTERISTIKE	Izražaj ARH u tumoru		
	N		p
Spol	Muški	24	0,7018
	Ženski	10	
Gradus tumora	1	0	0,7475
	2	14	
	3	14	

	4	6	
	1	8	
	2	2	
	3	21	
Patološki T	4	3	0,5514
	nepoznat	21	
	negativan	11	
Patološki N	pozitivan	2	0,8593
	nepoznat	33	
	negativan	1	
Patološki M	pozitivan	0	0,8812
	1	9	
	2	2	
Stadij bolesti prema TNM	3	19	
	4	4	0,9328
	ne	7	
Nekroza	da	27	0,1556
	ne	19	
Krvarenje u tumoru	da	15	0,7739
	ne	4	
Infiltracija kapsule	da	30	0,517
	da	34	
Kirurško liječenje	ne	0	0,9979
	desni	14	
Koji bubreg	lijevi	20	0,4649
	tijekom onkološkog praćenja	13	
Vrijeme od dijagnoze do udaljenih metastaza	inicijalno	21	0,5523
	≥12 mj	6	
Vrijeme od dijagnoze do pojave udaljenih metastaza	<12 mj	28	0,1958
	solitarne	2	
Broj metastaza	multiple	32	0,9446
	povoljna	3	
IMDC prognostička grupa	intermedijarna	15	
	loša	16	0,8491
	da	17	
Hemoglobin <	ne	17	0,7101
	da	7	
Kalcij u krvi >	ne	27	0,8205
	da	9	
ANC >	ne	25	0,6117
	da	6	
Trc >	ne	28	0,942
	da	19	
Karnofsky PS < 80	ne	15	0,6771
	≥12 mj	6	
Vrijeme od dg. do liječenja	<12 mj	28	0,7288
	uredna	25	
ALP	povišena	9	0,9087
	uredna	27	
LDH	povišena	7	0,6782
	da	25	
Metastaza pluća	ne	9	0,1068
	da	4	
Metastaza limfni čvorovi	ne	30	0,0897
Metastaza kosti	da	10	0,698

	ne	24	
Metastaza jetra	da	5	
	ne	29	<u>0,0412</u>
Metastaza bubreg	da	1	
	ne	33	0,8229
Metastaza mozak	da	1	
	ne	33	0,8302
Metastaza drugo	da	5	
	ne	29	0,2431
Dob u vrijeme operacije	<60	16	
	≥60	19	0,4813*
Dob na početku terapije	<60	14	
	≥60	21	0,6239*
DMFS			0,4845*
Medijan OS			0,2997*
Broj metastatskih sijela	1	21	
	2	10	
	3	2	
	4	1	0,0777*

p statistička vrijednost za Spearmanov koeficijent korelacije, p* statistička vrijednost za Pearsonov koeficijent korelacije; statistički značajna vrijednost < 0,05 vrijedi za oboje, masno otisnute i podrtane statistički značajne povezanosti

Legenda N broj ispitanika T tumor, N limfni čvor, M udaljena metastaza, IMDC eng. *International Metastatic RCC Database Consortium*, ANC eng *Absolute Neutrophil Count*, Trc trombociti, ALP alkalna fosfataza, LDH laktat dehidrogenaza DMFS eng. *Disease Metastatic Free Survival*, OS eng. *Overall Survival*

4.6.3. Usporedba izražaja GIPC1 s kliničko-patološkim varijablama u svijetlostaničnom karcinomu bubrega

GIPC1 je jače izražen u tumorskom tkivu kod žena (Spearmanov koeficijent korelacije $r = 0,3758$, $p = 0,0407$). GIPC1 je značajno povezan s postojanjem metastaza, tj patološkim M stadijem (Spearmanov koeficijent korelacije $r = 0,3598$; $p = 0,0366$). GIPC1 je jače izražen u tumoru ispitanika koji su dobili metastazu ranije (Spearmanov koeficijent korelacije $r = 0,5503$; $p = 0,0007$) i u tumoru ispitanika koji su započeli liječenje <12 mjeseci od postavljanja dijagnoze (Spearmanov koeficijent korelacije $r = 0,4837$; $p = 0,0038$). Izražaj GIPC1 je bio veći u ccRCC-u s pN pozitivnim statusom (Spearmanov koeficijent korelacije $r = 0,4507$; $p = 0,0075$). Jači izražaj GIPC1 u ccRCC-u bio je povezan s multiplim

metastatskim sijelima (Spearmanov koeficijent korelacije $r = 0,3805$; $p = 0,0264$). Druge varijable nisu značajno povezane s imunofluorescentnim izražajem GIPC1 (Tablica 9).

Tablica 9. Povezanost izražaja GIPC1 u svijetlostaničnom karcinomu bubrega s praćenim kliničko-patološkim varijablama.

KARAKTERISTIKE	Izražaj GIPC u tumoru	
	N	p
Spol	Muški	24
	Ženski	10
		0,0407
Gradus tumora	1	0
	2	14
	3	14
	4	6
		0,7694
Patološki T	1	8
	2	2
	3	21
	4	3
		0,2556
Patološki N	nepoznat	21
	negativan	11
	pozitivan	2
		0,8608
Patološki M	nepoznat	33
	negativan	1
	pozitivan	0
		0,0366
Stadij bolesti prema TNM	1	9
	2	2
	3	19
	4	4
		0,1604
Nekroza	ne	7
	da	27
		0,7966
Krvarenje u tumoru	ne	19
	da	15
		0,1308
Infiltracija kapsule	ne	4
	da	30
		0,0651
Kirurško liječenje	da	34
	ne	0
		0,0131
Koji bubreg	desni	14
	lijevi	20
		0,2568
Vrijeme od dijagnoze do pojave udaljenih metastaza	tijekom onkološkog praćenja	13
	inicijalno	21
		0,0007
Vrijeme od dijagnoze do pojave udaljenih metastaza	≥ 12 mj	6
	< 12 mj	28
		0,2192
Broj metastaza	solitarne	2
	multiple	32
		0,0264
IMDC prognostička grupa	povoljna	3
	intermedijarna	15
	loša	16
		0,1521
Hemoglobin <	da	17
	ne	17
		0,7667
Kalcij >	da	7
	ne	27
		0,4126

ANC >	da ne	9 25	0,2119
Trc >	da ne	6 28	0,2163
Karnofsky PS < 80	da ne	19 15	0,7522
Vrijeme od dijagnoze do liječenja	≥12 mj <12 mj	6 28	0,0038
ALP	uredna povišena	25 9	0,1183
LDH	uredna povišena	27 7	0,0911
Metastaza pluća	da ne	25 9	0,7407
Metastaza limfni čvorovi	da ne	4 30	0,0075
Metastaza kosti	da ne	10 24	0,3114
Metastaza jetra	da ne	5 29	0,0855
Metastaza bubreg	da ne	1 33	0,2601
Metastaza mozak	da ne	1 33	0,5438
Metastaza drugo	da ne	5 29	0,3048
Dob u vrijeme operacije	<60 ≥60	16 19	0,1923*
Dob na početku terapije	<60 ≥60	14 21	0,1197*
DMFS			0,5964*
MEDIAN OS			0,9994*
Broj metastatskih sijela	1 2 3 4	21 10 2 1	0,087*

p statistička vrijednost za Spearmanov koeficijent korelacije, p* statistička vrijednost za Pearsonov koeficijent korelacije; statistički značajna vrijednost < 0,05 vrijedi za oboje, masno otisnute i podcrtane statistički značajne povezanosti

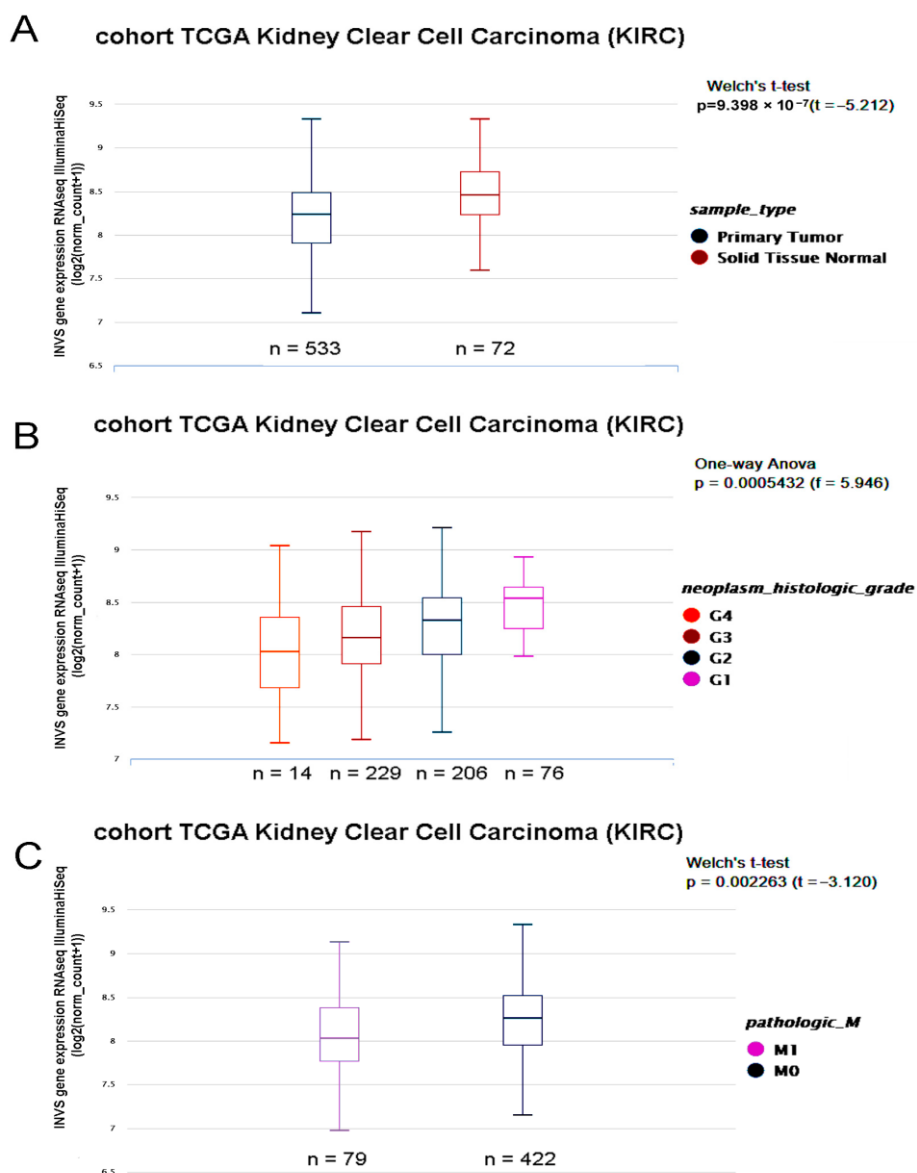
Legenda N broj ispitanika T tumor, N limfni čvor, M udaljena metastaza, IMDC eng. *International Metastatic RCC Database Consortium*, ANC eng. *Absolute Neutrophil Count*, Trc trombociti, ALP alkalna fosfataza, LDH laktat dehidrogenaza DMFS eng. *Disease Metastatic Free Survival*, OS eng. *Overall Survival*

4.7. Dodatna bioinformatička analiza iz javno dostupne baze TCGA-KIRC

U svrhu opširnije analize prognostičkog potencijala analiziranih biljega, poslužili smo se podacima iz TCGA KIRC (eng. *The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Clear Cell Carcinoma*) baze podataka da bi istražili moguću povezanost INVS, ARH i GIPC1 s mjerama ishoda u ccRCC-u i potencijalne mehanizme u kojima INVS i njegovi interaktomski partneri sudjeluju u patogenezi ccRCC-a. Analizirali smo njihov utjecaj na diferencijaciju tumora, pojavu metastaza, leukocitnu infiltraciju tumorskog mikrookoliša i izražaj imunomodulatornih gena.

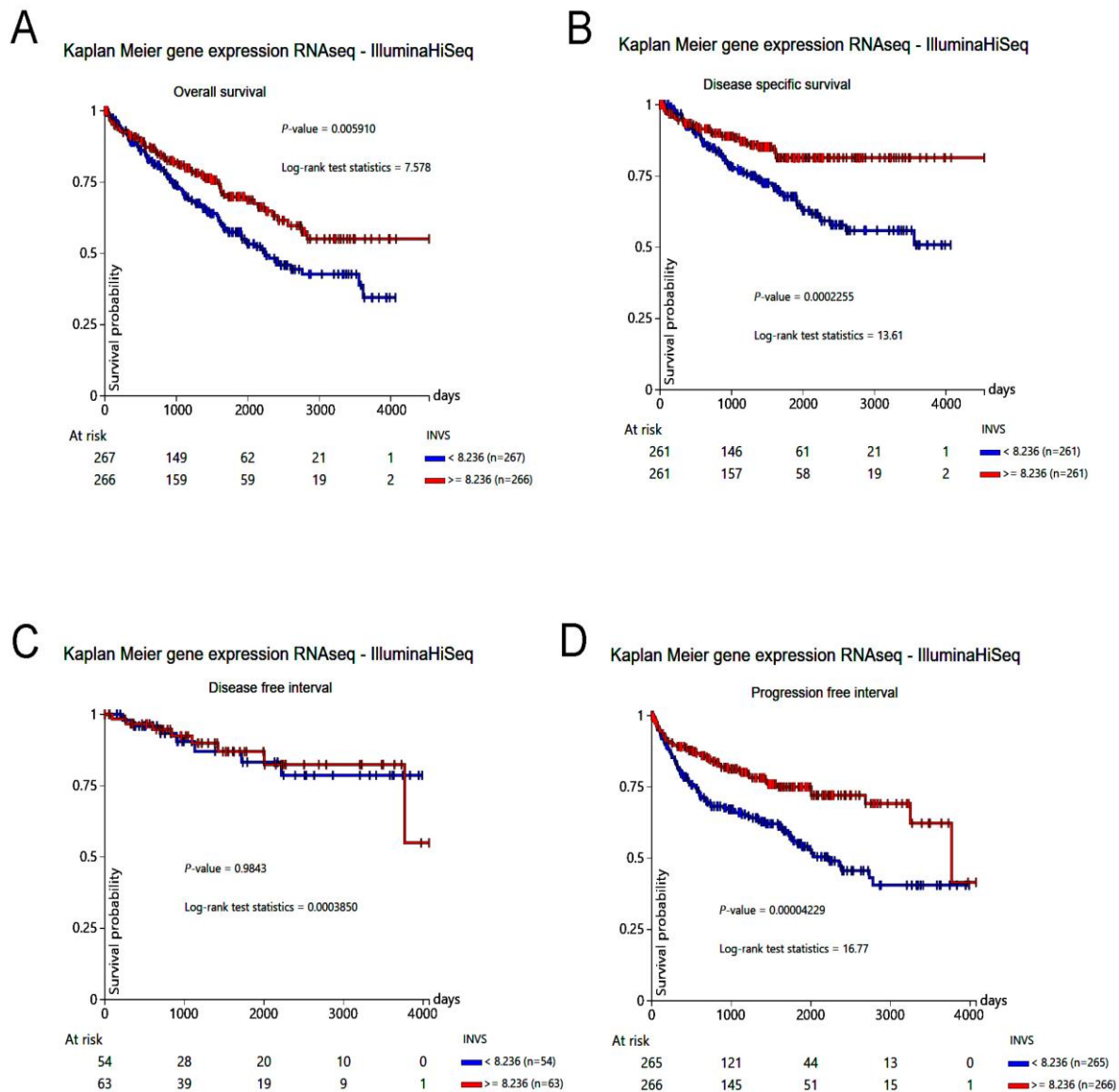
4.7.1. Analiza povezanosti izražaja INVS u ccRCC-u s preživljenjem bolesnika

Kako bi procijenili prognostički potencijal ispitivanih biljega, analizirali smo podatke iz javno dostupne baze TCGA-KIRC (eng. *The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Clear Cell Carcinoma*). Bioinformatičkom analizom potvrdili smo da je izražaj RNA INVS značajno niži u tumoru nego u zdravom bubrežnom parenhimu (Slika 9A), kao i značajnu povezanost izražaja INVS s gradusom tumora i pojavom metastaza. Postoji značajna povezanost izražaja RNA INVS s gradusom ccRCC-a, na način da je najmanji izražaj u gradusu 4, a najveći u gradusu 1 (Slika 9B), kao i manji izražaj INVS u metastatskom nego u nemetastatskom ccRCC-u (Slika 9C).



Slika 9. Analiza izražaja RNA *INVS* u primarnom ccRCC-u iz javno dostupne baze TCGA-KIRC s obzirom na (A) okolni zdravi bubrežni parenhim, (B) gradus tumora i (C) metastatski status.

Utvdili smo i da je slabiji izražaj RNA *INVS* u ccRCC-u povezan s kraćim ukupnim preživljenjem, kraćim preživljenjem specifičnim za bolest i kraćim vremenom do progresije bolesti (Slika 10).

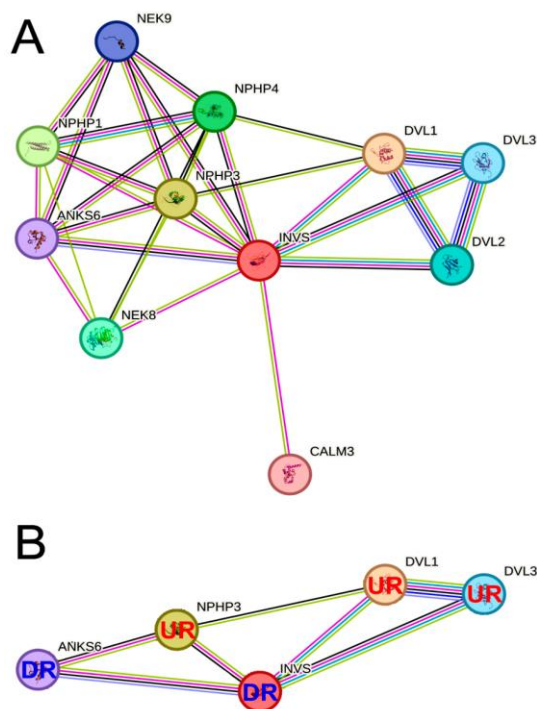


Slika 10. Povezanost ishoda bolesti s izražajem RNA *INVS* u svjetlostaničnom karcinomu bubrega iz javno dostupne TCGA-KIRC baze. Prikazane su Kaplan–Meierove krivulje (A) ukupnog preživljenja, (B) preživljenja specifičnog za bolest, (C) vremena bez znakova bolesti i (D) vremena do progresije bolesti (D).

4.7.2. Analiza povezanosti izražaja *INVS* interakcijskih partnera u ccRCC-u i preživljenja bolesnika

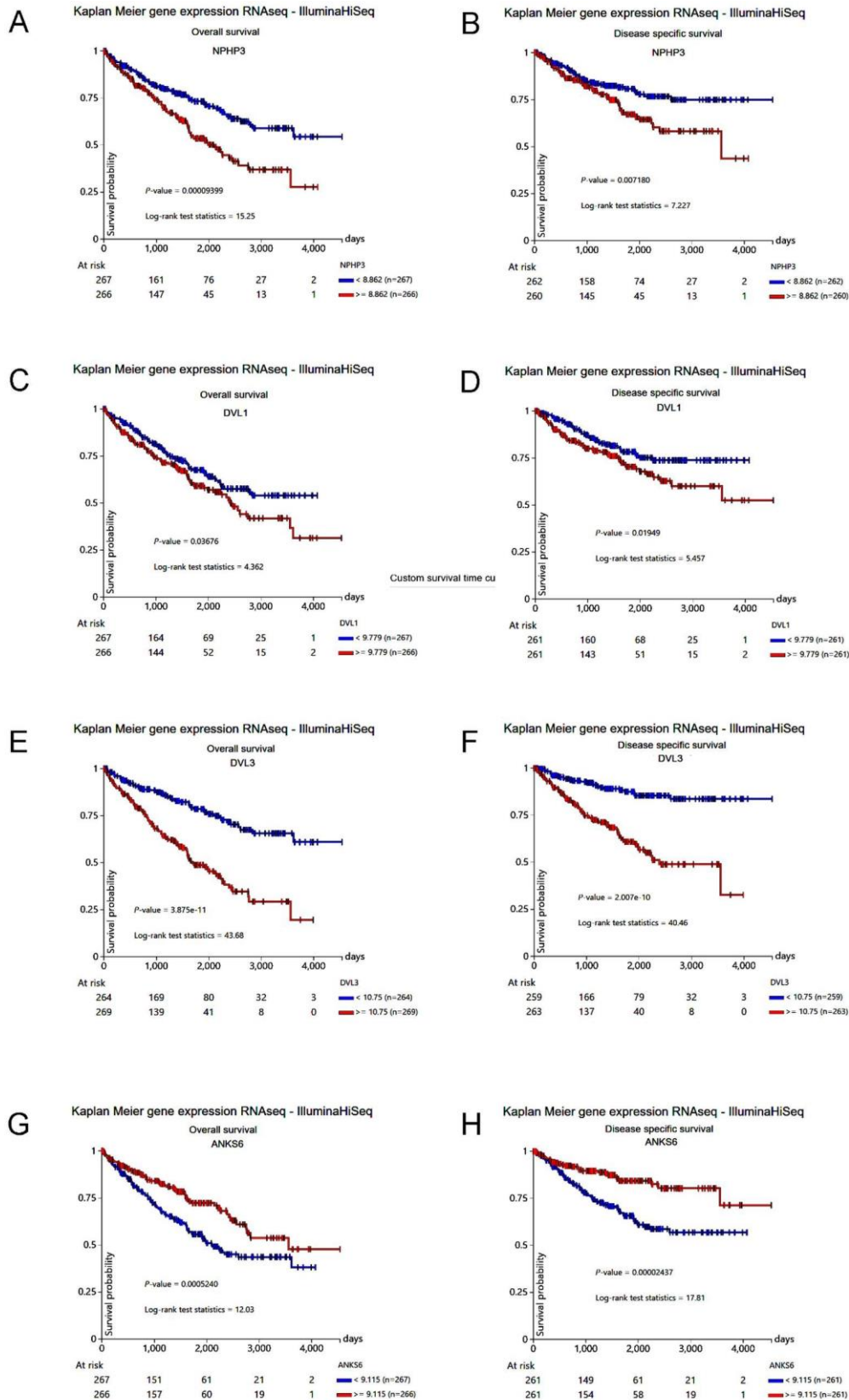
Kako bismo otkrili potencijalnu ulogu *INVS* u patogenezi ccRCC-a, analizom STRING baze utvrdili smo s kojim je čimbenicima *INVS* u interakciji te utvrdili deset partnera u *INVS* interakcijskoj mreži (Slika 11A). Izražaj četiri od deset *INVS* partnera je

značajno povezan s mjerama ishoda u ccRCC-u. To su NPHP3, DVL1, DVL3 i ANKS6 (Slika 11B). Izražaj NPHP3, DVL1, DVL3 je značajno veći u primarnom tumoru, dok je izražaj ANKS6 značajno manji u ccRCC-u, u odnosu na zdravi bubrežni parenhim.



Slika 11. (A) INVS konektomska mreža prema STRING bazi podataka. (B) INVS konektomska mreža nakon uklanjanja INVS partnera koji prema TCGA-KIRC značajno ne utječu na preživljenje. UR je konektomski partner čiji je prejak izražaj povezan s lošijim preživljenjem, a DR konektomski partner čiji je slabiji izražaj povezan s lošijim preživljenjem.

Navedeni čimbenici, zajedno s INVS, u ccRCC-u imaju utjecaj na ukupno preživljenje i/ili preživljenje specifično za bolest (Slika 12). Manji izražaj ANKS6 RNA je negativni prediktor preživljenja, dok je veći izražaj NPHP3, DVL1 i DVL3 povezan s lošijim preživljenjem (Slika 12).



Slika 12. Mjere ishoda ispitanika sa svjetlostaničnim karcinomom bubrega, grupirani prema izražaju četiri INVS interakcijska partnera u tumorskom tkivu: NPH3, DVL1, DVL3 i ANKS6. Kaplan–Meier krivulja ukupnog preživljenja (A, C, E, G) i preživljenja specifičnog za bolest (B, D, F, H). Prikazani su samo statistički značajni partneri INVS-a.

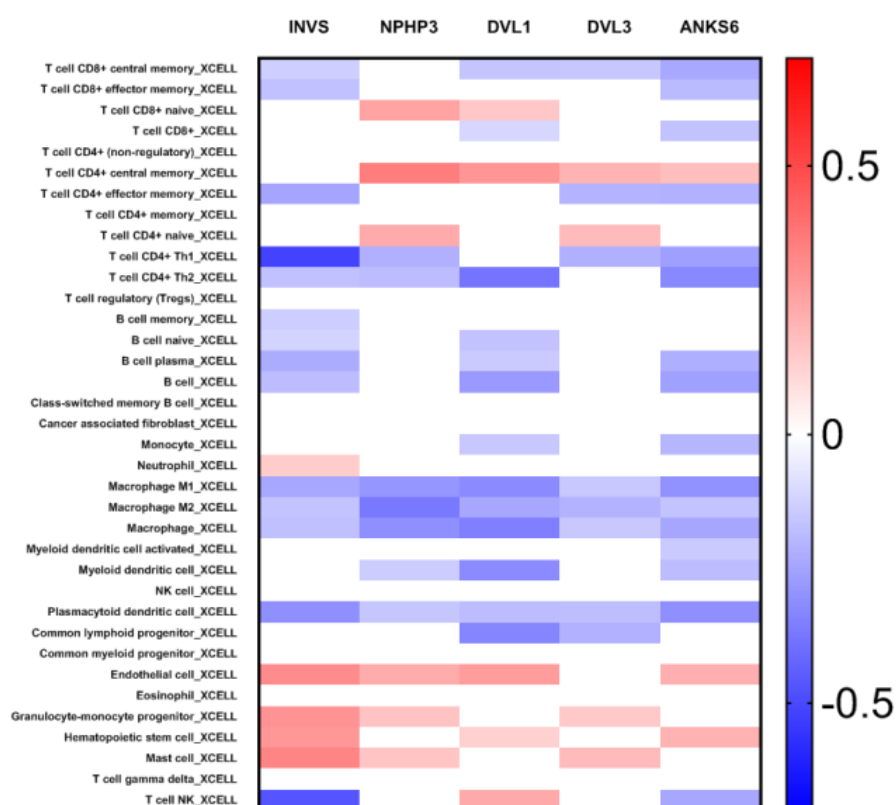
Dodatnom analizom, otkrili smo da je izražaj RNA DVL3 pozitivno povezan s gradusom ccRCC-a, a izražaj ANKS6 negativno. Također, utvrdili smo da je izražaj DVL3 značajno veći, dok je izražaj ANKS6 značajno manji u metastatskom ccRCC-u, u odnosu na nemetastatski primarni tumor. Analizirajući samo grupu metastatskih ccRCC-ova, DVL3 je bio snažni prediktor ukupnog preživljenja.

4.7.3. Analiza povezanosti izražaja INVS i njegovih interakcijskih partnera u ccRCC-u s leukocitnom infiltracijom i imunomodulatorima

U svrhu otkrivanja potencijalnih mehanizama povezanosti INVS i njegovih interakcijskih partnera s patogeneom ccRCC-a i mjerama ishoda, upotrebom podataka iz baze GEPIA istražili smo povezanost izražaja INVS i gena od interesa u njegovom interaktomu (*NPHP3*, *DVL1*, *DVL3* i *ANKS6*) s infiltracijom tumorskog mikrookoliša (TME) imunim stanicama (Slika 13). Koristili smo različite algoritme (XCELL, TIMER, QUANTISEQ, EPIC, CIBERSORT, CIBERSORT-ABS, i MCPCCOUNTER) te njihovu povezanost s izražajem gena za inhibitore kontrolnih točaka (Slika 14).

Izražaj svih gena od interesa, osim *NPHP3* je bio značajno negativno povezan s infiltracijom CD8⁺ T stanica (XCELL INVS $\rho = -0,1363$, $p = 0,0236$, *DVL1* $\rho = -0,1644$, $p = 0,0031$, *DVL3* $\rho = -0,1541$, $p = 0,0064$, *ANKS6* $\rho = -0,2405$, $p = 0,21e^{-06}$). Najsnažnija negativna povezanost utvrđena je između izražaja INVS i infiltrata pomoćničkih CD4⁺ T (eng. CD4⁺T helper, CD4⁺ Th) stanica ($-0,52$ u XCELL; $p = 4,57e^{-31}$) i prirodnoubilačkih (eng. *natural killer*, NK) stanica ($-0,47$, u XCELL; $p < 0,0001$) (Slika 13). Također je utvrđena značajna pozitivna povezanost izražaja INVS i infiltracije neutrofilima ($\rho > 0,60$ u MPCCOUNTER i QUANTISEQ; $p < 0,0001$), endotelnim stanicama ($\rho > 0,47$ u MPCCOUNTER i EPIC; $p < 0,0001$) i mijeloidnim dendritičkim stanicama ($\rho = 0,43$ u MPCCOUNTER; $p < 0,0001$),

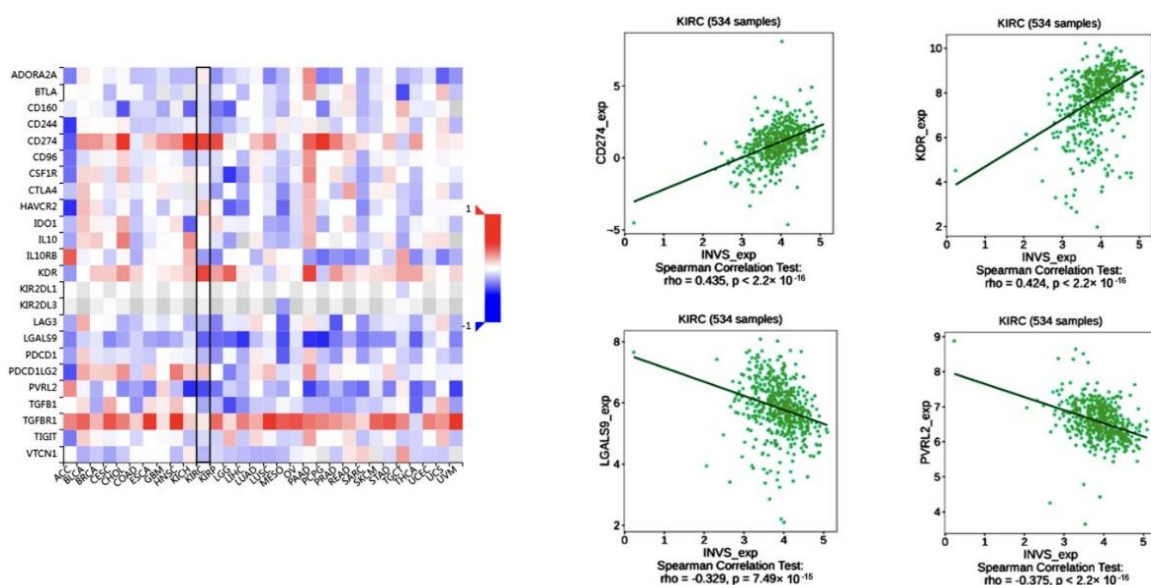
Rezultati su otkrili značajnu negativnu povezanost svih gena od interesa sa infiltracijom M1 makrofaga (XCELL INVS rho = -0.2421, p = 1,52e⁻⁰⁶, NPHP3 rho = -0.2904, p = 4,41 e⁻⁰⁹, DVL1 rho = -0,3209, p = 1,26e⁻¹⁰, DVL3 rho = -0.1512, p = 0,00495, ANKS6 rho = -0.3027, p=2,38e⁻⁰⁹), M2 makrofaga (XCELL INVS rho = -0.1665, p = 0,0017, NPHP3 rho = -0.3693, p=2,07e⁻¹⁴, DVL1 rho = -0.2417, p = 3,72e⁻⁰⁶, DVL3 rho = -0.2143, p = 2,73e⁻⁰⁵, ANKS6 rho = -0.1663, p = 0,0024), ukupnih makrofaga (INVS rho = -0.1752, p = 0,0008, NPHP3 rho = -0,3078, p = 3,69e⁻¹⁰, DVL1 rho = -0.3521, p = 1,01e⁻¹², DVL3 rho = -0,1516, p = 0,0049, ANKS6 rho = -0.2448, p = 2,65e⁻⁰⁶), dendritičkih stanica (XCELL INVS rho = -0,310, p = 6,91e⁻¹⁰, NPHP3 rho = -0.157, p = 0,0049, DVL1 rho = -0.185, p = 0,0008, DVL3 rho = -0,180, p = 0,0009, ANKS6 rho = -0,309, p=150e⁻⁰⁹) i T stanica (CIBERSORT INVS rho = -0,135, p = 0,0189, NPHP3 rho = -0.174, p = 0,0014, DVL1 rho = -0,263, p = 2,96e⁻⁰⁷, DVL3 rho = -0,285, p = 1,88e⁻⁰⁸, ANKS6 rho = -0,201, p = 0,0003).



Slika 13. Analiza povezanosti izražaja INVS i INVS interaktomskih partnera i obilnosti tumor infiltrirajućih leukocita u TCGA-KIRC, uz upotrebu XCELL algoritma. Prikazane su značajne povezanosti u boji (p < 0,05), a neznčajne (p > 0,05) su označene bijelom.

Dodatno, otkrili smo značajnu povezanost između izražaja INVS i njegovih interakcijskih partnera s izražajem gena za imunomodulatore. Najznačajniji rezultati bili su povezanost izražaja INVS s izražajem imunoinhibitornih gena *CD274* (PD - L1) ($\rho = 0,435$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$), *KDR* ($\rho = 0,424$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$), *LGALS9* ($\rho = -0,329$, $p = 7,49 \times 10^{-15}$) i *PVRL2* ($\rho = -0,375$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) (Slika 14).

Izražaj NPHP3 je bio značajno povezan s izražajem *CTLA4* ($\rho = 0,27$, $p = 5,7 \times 10^{-10}$), a izražaj *DVL3* u korelaciji s izražajem *CD274* (PD-L1), *CTLA4*, *LAG3* i *PDCD1*.

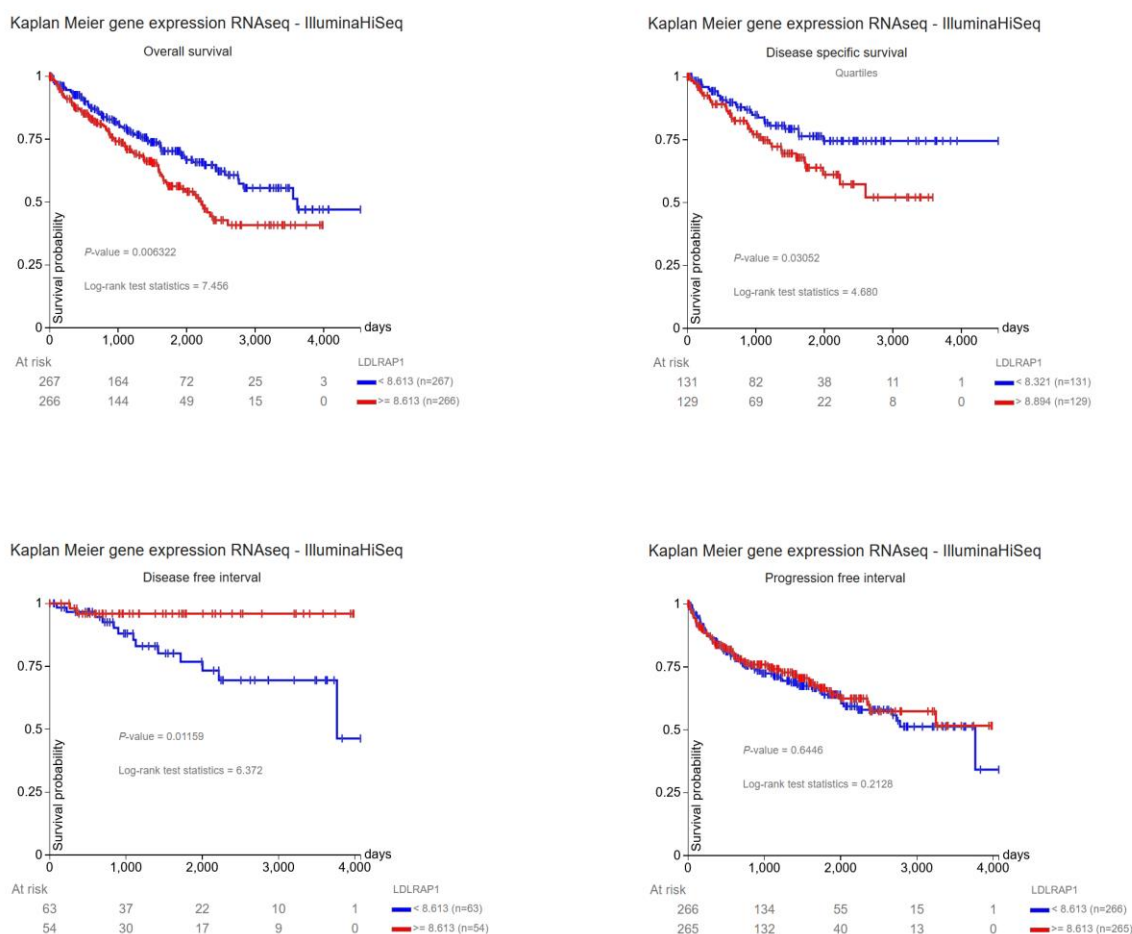


Slika 14. Analiza povezanosti izražaja *INVS* s izražajem imunoinhibitornih gena: *CD274*, *KDR*, *IL10RB*, *LAG3*, *LGALS9*, *PVRL2*, *PDCD1*, *TIGIT* u različitim tumorima iz TCGA (uz pomoć TISIDB portala), KIRC baza je naglašena crnom bojom. Značajne povezanosti izražaja *INVS* iz KIRC baze, $\rho \geq 0,3$ (za *CD274* i *KDR*) i $\rho \geq -0,3$ (za *LGALS9* i *PVRL2*) su prikazane u raspršenim grafikonima.

Unatoč povezanosti s izražajem gena za kontrolne imunološke točke, istražujući bazu autora Miao i suradnika, 2018. (158), nije pronađen odgovor u izražaju *INVS* i njegovih interakcijskih partnera, nakon terapije raznim inhibitorima kontrolnih točaka (pembrolizumab, ipilimumab, nivolumab i atezolizumab) u ccRCC-u, ni u drugim „imunološki ovisnim“ tumorima – NSCLC-u, urotelnom karcinomu i melanomu.

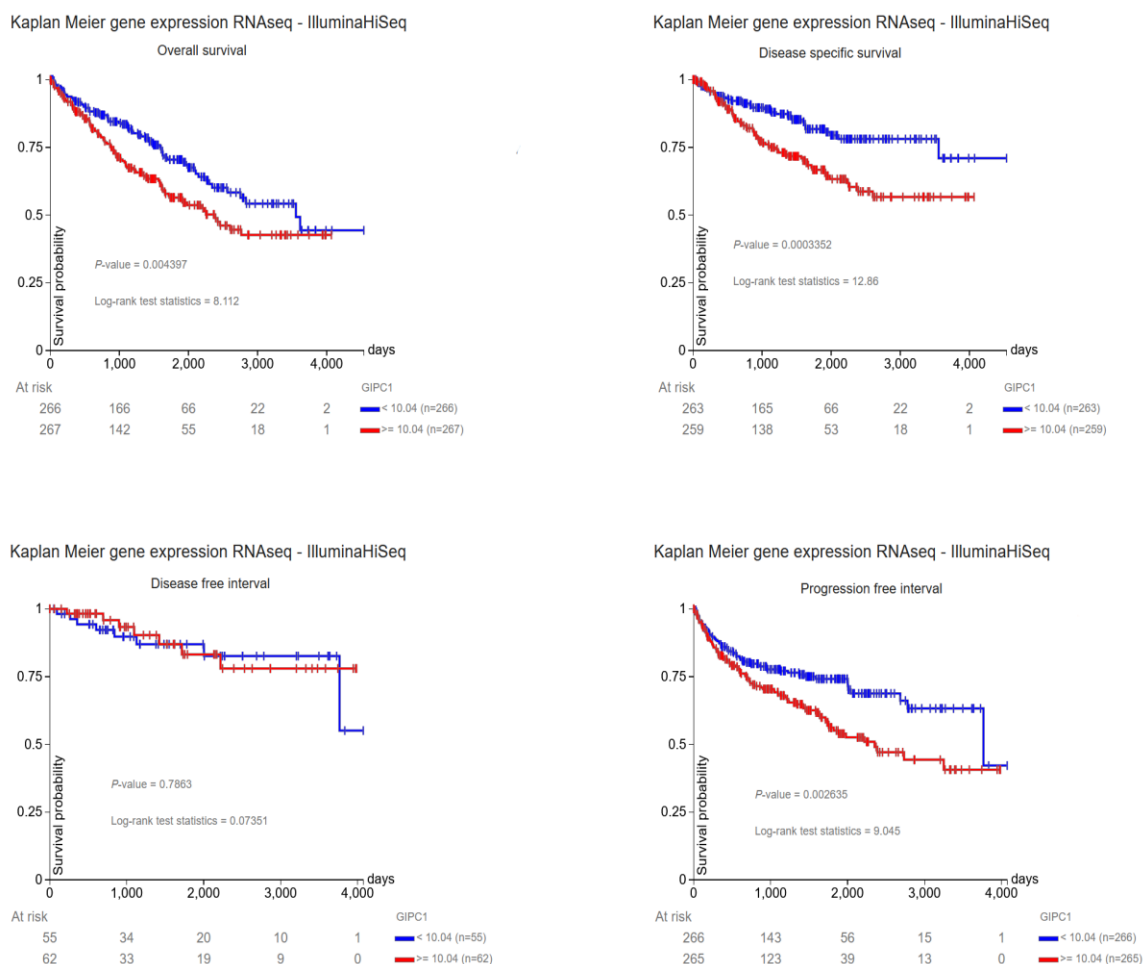
4.7.4. Analiza povezanosti izražaja ARH i GIPC1 u ccRCC-u sa preživljenjem bolesnika

Bioinformatičkom analizom podataka iz baze TCGA-KIRC istražili smo utjecaj i druga dva istraživana proteina na mjere ishoda u ccRCC-u te utvrdili pozitivnu povezanost izražaja ARH s ukupnim preživljenjem, preživljenjem specifičnim za bolest i vremenom bez bolesti (Slika 15).



Slika 15. Mjere ishoda ispitanika sa svijetlostaničnim karcinomom bubrega, grupirane prema izražaju ARH u tumorskom tkivu: Kaplan–Meier krivulja sveukupnog preživljenja (A), preživljenja specifičnog za bolest (B), vremena bez znakova bolesti (C) i vremena do progresije bolesti (D), dobiveno analizom podataka iz TCGA-KIRC.

Također, utvrdili smo i povezanost izražaja GIPC1 u ccRCC-u s ukupnim preživljenjem i preživljenjem specifičnim za bolest, na način da tumori s većim izražajem GIPC1 imaju lošije navedene mjere ishoda (Slika 16).



Slika 16. Mjere ishoda ispitanika sa svijetlostaničnim karcinomom bubrega, grupirane prema izražaju GIPC1 u tumorskom tkivu: Kaplan–Meier krivulja sveukupnog preživljenja (A), preživljenja specifičnog za bolest (B), vremena bez znakova bolesti (C) i vremena do progresije bolesti (D), dobiveno analizom podataka iz TCGA-KIRC.

5. RASPRAVA

Karcinom bubrega najčešće kasno daje simptome pa operativno liječenje često ne znači i ozdravljenje, s obzirom da kroz određeno vrijeme kod polovine bolesnika bolest progredira metastatskim rasapom. Postojećim prognostičkim modelima mogu se izdvojiti bolesnici s većim rizikom povrata bolesti koje je, ovisno o čimbenicima rizika, potrebno podvrgnuti češćim kontrolama i/ili adjuvantnoj terapiji. Lijekovi donose određenu terapijsku korist u liječenju metastatske bolesti, kao i adjuvantna terapija u visokorizičnom ccRCC-u, ali je unatoč tome mortalitet od RCC-a i dalje visok i neophodno je pronaći biljega koji bi imali prognostičku i prediktivnu vrijednost. U ovom radu smo istražili tri biljega: INVS – protein primarne cilije u tubularnom epitelu bubrega iz kojeg nastaje svjetlostanični karcinom bubrega; ARH – protein uključen u metabolizam kolesterola kojim obiluje citoplazma zloćudnih epitelnih stanica u ccRCC-u i GIPC1 – svestrani membranski protein kojeg ima u tubularnom epitelu. Željeli smo istražiti imunoekspresiju INVS, ARH i GIPC1 te izražaj mRNA *INVS* u ccRCC-u i usporediti je s ekspresijom tih proteina u okolnom zdravom bubrežnom parenhimu, kao i sa svim praćenim kliničko - patološkim pokazateljima naša 34 ispitanika. Za provjeru relevantnosti naših rezultata, uradili smo bioinformatičku analizu iz javno dostupnih baza.

INVS, protein primarne cilije, zadužen je za blokiranje kanonskog WNT signalnog puta pa su mutacija *INVS* i gubitak tog proteina povezani s nepravilnostima primarne cilije, nastankom cista i bubrežnih bolesti (91,92). U ovom je radu INVS istražen u ccRCC-u, tumoru podrijetla epitela proksimalnih kanalića, koji fiziološki kao funkcionalnu organelu ima primarnu ciliju. Dobiveni su sukladni rezultati usporedbom imunohistokemijskog izražaja INVS i mRNA *INVS* u tumoru i okolnom bubrežnom parenhimu, sa značajno manjim izražajem INVS i mRNA *INVS* u tkivu tumora. Viša životna dob je rizični čimbenik za ccRCC (8). U našem je radu utvrđena negativna korelacija izražaja INVS s dobi ispitanika. Negativni izražaj INVS je bio češći u ccRCC-u starijih ispitanika, što se uklapa u činjenicu da je aberantna aktivacija WNT signalne kaskade zbog manjka INVS češća u starijoj nego u mlađoj dobi. Bioinformatičkom analizom iz javno dostupne baze TCGA-KIRC smo provjerili i potvrdili naše rezultate, a daljnjom analizom tih podataka utvrdili da je manjak INVS u ccRCC-u povezan s kraćim OS, preživljenjem specifičnim za bolest i kraćim PFS-om. Prema literaturi, postoji značajna povezanost između niskog izražaja INVS u tumoru i lošijeg ishoda, upravo zbog konstitutivne aktivacije kanonskog WNT signalnog puta i β -katenina uključenog u

karcinogenezu (159). U eksperimentalnoj studiji na mišjem modelu dokazano je da prejaki izražaj β -katenina inducira tumor bubrega. U nekoliko studija utvrđena je povezanost RCC-a s hipermetilacijom ili delecijom gena koji su povezani s β -kateninom i WNT signalnim putem (159). U glioblastomu, WNT signalni put u normoksičnim uvjetima potiče mobilnost i invaziju tumorskih stanica i EMT, što potiče rast tumora i održavanje gliomskih matičnih stanica, a ujedno dovodi do kemo- i radiorezistencije tumora (160,161).

Metastatski rasap u mnogim zloćudnim tumorima pa tako i u ccRCC-u dovodi do smrtnog ishoda (162–164). Stoga su indikatori predikcije metastatskog potencijala važni u individualiziranom protokolu praćenja i za prognozu mogućeg povrata bolesti. Analizom STRING baze proteina utvrdili smo s kojim je čimbenicima *INVS* u interakciji. To su NPHP3, DVL1, DVL3 i ANKS6, koji u ccRCC-u imaju utjecaj na ukupno preživljenje i/ili preživljenje specifično za bolest, iz čega se može zaključiti da *INVS* i proteini iz njegove istaknute interaktomske grupe mogu biti klinički korisni prognostički indikatori u ccRCC-u. Analiza javno dostupne baze TGCA-KIRC pokazuje da su izražaj *INVS* i interaktomskog partnera *ANKS6* značajno manji u metastatskom ccRCC-u, nego u nemetastatskom ccRCC-u. *INVS* je uključen u procese stanične polarnosti i kontrole stanične migracije te se pretpostavlja da negativan/niski izražaj *INVS* u ccRCC-u doprinosi metastatskom potencijalu tumora. Izražaj drugog *INVS* interaktomskog partnera - DVL3 je značajno veći u metastatskom ccRCC-u, nego u nemetastatskom ccRCC-u. Povezanost navedenih biljega s metastatskim procesom može objasniti nižu stopu preživljenja ispitanika s ccRCC-om kod kojih su izraženi. Izražaj DVL3 je značajno povezan i s OS bolesnika s metastatskim ccRCC pa ima prognostički potencijal, ali i moguću prediktivnu ulogu kao terapijska meta. Razvoj molekula usmjerenih na inhibiciju DVL3 u pretkliničkim studijama bi u budućim kliničkim studijama mogao doprinijeti produženju OS i/ili dužem preživljenju specifičnom za bolest u metastatskom ccRCC-u, s visokim izražajem DVL3. Ranije je otkrivena uloga DVL3 u patogenezi i prognozi raka debelog crijeva (165), jetre (166), adenokarcinomu pluća (167) i gušterače (168) te karcinomu prostate (169). Nedavna studija pokazala je da DVL3 povećava proliferaciju i migraciju zloćudnih stanica raka prostate putem TLR4 (eng. *Toll-like receptor 4*) (169). Ali, uloga DVL3 u raku bubrega još uvijek nije istraživana.

Poznato je da je gradus ccRCC-a jedan od čimbenika koji je povezan s rizikom od povrata bolesti i prognozom (94). Podaci dobiveni bioinformatičkom analizom pokazali su značajnu povezanost izražaja RNA *INVS* s gradusom ccRCC-a, na način da je najmanji izražaj kod gradusa 4, a najveći kod gradusa 1.

Sukladno našim zapažanjima, bolesnici dijagnosticirani u ranim stadijima ccRCC-a, koji imaju negativan/slabi izražaj INVS i jaki izražaj DVL3 u tumoru imaju veći rizik od metastatskog rasapa. S obzirom da se podatci o izražaju INVS i DVL3 lako i brzo dobiju imunohistokemijskom analizom tumorskog tkiva, može se uspostaviti individualizirani protokol praćenja bolesnika pod povećanim rizikom od povrata bolesti, odnosno razmotriti pul mogućih kandidata za adjuvantnu imunoterapiju.

U ccRCC-u je tumorski imuni mikrookoliš sastavljen od T stanica (>50%), makrofaga povezanih s tumorom (31%) i ostalih stanica (170). Limfociti, plazma stanice, makrofagi i neutrofili u tumorskom mikrookolišu imaju prognostički značaj (170–177). Korištenjem različitih analitičkih algoritama, zapazili smo u TISIDB bazi povezanost izražaja mRNA *INVS* i interakomskih partnera s upalnim infiltratom, imunomodulatornim i imunoinhibitornim molekulama. Izražaj *INVS* je značajno povezan s infiltracijom neutrofilima, endotelnim i mijeloidnim dendritičkim stanicama u tumorskom mikrookolišu. Nađena je negativna povezanost između izražaja *INVS* i infiltracije Th1 pomoćničkih T limfocita i NK stanica. Vrlo niski izražaj *INVS* u ccRCC-u ne samo da je povezan s lošijom prognozom, nego i s manjom infiltracijom neutrofila i monocita, a brojnijim Th1 pomoćničkim T stanicama i T NK stanicama. Sveukupno, ovi podatci naglašavaju ulogu *INVS* i njegovih interakomskih partnera u regulaciji upalnog staničnog infiltrata u tumorskom mikrookolišu u ccRCC-u, koji utječe na preživljenje. U literaturi se opisuje „imunogenični karakter“ ccRCC-a i narušeni fenotip i funkcija efektorskih T stanica koje su „iscrpljene“ i nesposobne kontrolirati rast tumora. Opažanje da ccRCC sa slabim izražajem *INVS* i njegovih interakomskih partnera nije odgovorio na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka ni u drugim „imunološki ovisnim“ tumorima, govori o nepovoljnoj ulozi tog interaktoma u regulaciji upalnog tumorskog mikrookoliša.

Adaptorni citosolni protein ARH je preko svoje domene koja veže fosfotirozin u interakciji s LDL receptorom. Prema Mishri i suradnicima, mutacija njegova gena *LDLRAP1* izaziva nedostatak ARH proteina i vodi u AR hiperkolesterolemiju, upalu krvnih žila i nastanak aterosklerotskih plakova, pretilost i inzulinsku rezistenciju. Kolesterol je nužan za rast i progresiju tumora, a njegov je metabolizam u zloćudnim stanicama reprogramiran. ARH je dosad malo istraživani u karcinogenezi. U svom uzorku utvrdili smo manji izražaj proteina ARH u ccRCC-u, nego u zdravom bubrežnom parenhimu, ali bez statistički značajne razlike. Analizirajući javno dostupnu bazu TCGA-KIRC, utvrdili smo da je veći izražaj mRNA *ARH* povezan s lošijim ishodom i stoga nepovoljan prognostički čimbenik. Uzrok navedenoj

nepodudarnosti rezultata je najvjerojatnije u malom uzorku uključenom u naše istraživanje. Analizom korelacija provedenom na 34 ispitanika utvrdili smo da je slab/negativan izražaj ARH povezan s većom vjerojatnošću jetrenih metastaza. Za objašnjenje navedene povezanosti potrebna su daljnja istraživanja (14,178), s obzirom da ne postoje studije o uključenosti ARH-a u proces/tropizam metastaziranja.

Međutim, istraživao je utjecaj drugih proteina koji sudjeluju u metabolizmu kolesterola na preferencijalno sijelo metastaziranja. U novijoj literaturi spominje se utjecaj enzima PCSK9 (eng. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) uključenog u egzogenu sintezu kolesterola, na tropizam metastaza nekog tumora (179). Tako je na mišjem modelu istražen metastatski tropizam (jetra ili pluća) apliciranjem humanih staničnih linija adenokarcinoma gušterače. PCSK9 negativno regulira unos LDL-kolesterola u stanicu i o njemu ovisi krajnji put sinteze kolesterola kao pokretača metastaziranja adenokarcinoma gušterače. Stanice adenokarcinoma gušterače s niskim izražajem PCSK9 preferencijalno koloniziraju tkivo jetre bogato LDL-om, a ne tkivo pluća siromašno LDL-om. U jetri se u lizosomu aktivira mTORC1 i vrši konverzija u 24-hidroksikolesterol te dolazi do metaboličkog reprogramiranja jetrenog mikrokoliša. PCSK9 djeluje na distalni put kolesterola kao pokretača metastaziranja adenokarcinoma gušterače (179,180).

U istraživanju metastatskog tropizma proučavane su stanične linije adenokarcinoma kolona koje su stvorile jetrene metastaze. U zloćudnim stanicama pojačano su aktivni signalni putevi koji uključuju masne kiseline i kolesterol, a smanjeno aktivni signalni putovi vezani za ribosome, što ukazuje na neravnotežu u sintezi proteina i lipida. U staničnim linijama jetrenih metastaza izvor energije bile su masne kiseline koje su preko koenzima A sintetizirale kolesterol, a primjenom statina njihov je rast suprimiran. To ukazuje da rast stanica adenokarcinoma kolona sklonog metastaziranju u jetru ovisi o kolesterolu pa bi primjena statina mogla doprinijeti učinkovitijem liječenju (181).

U ccRCC je jako izražen apolipoprotein C1 (ApoC1) koji značajno utječe na migraciju i proliferaciju tumorskih stanica. Nakon EMT, ApoC1 potiče metastaziranje tumorskih stanica i aktivaciju STAT3 (eng. *Signal transducer and activator of transcription 3*) u tumoru. STAT3 je važan u moduliranju prijenosa kolesterola u makrofage i njihovu polarizaciju u M2 fenotip (182). U recentnom istraživanju identificirana je cirkulirajuća RNA povezana s metabolizmom lipida, circABCA1 (eng. *circulating ATP-binding cassette transporter ABCA1 member 1*). ABCA1, drugim imenom regulatorni protein kolesterolskog izlučivanja (eng. *cholesterol efflux regulatory protein*, CERP), je regulator fosfolipidne homeostaze i staničnog kolesterola. Viši izražaj circABCA1 nađen je u ccRCC-u i povezan s višim stadijem bolesti i

postojanjem metastaza. Ova cirkulirajuća RNA povećava izražaj SCARB1 (eng. *Scavenger Receptor Class B Member 1*), receptora za kolesterol lipoprotein visoke gustoće (eng. *high density lipoprotein cholesterol*, HDL-C) s posljedičnim povećanjem unosa kolesterola u stanicu i aktiviranja kaskade F1R/PI3K/AKT/mTOR. Također, circABCA1 olakšava polarizaciju makrofaga u M2 fenotip i djeluje protumorigeno, poticanjem unosa kolesterola u stanice ccRCC-a iz tumorskog mikrookoliša (183).

U našem istraživanju izražaj GIPC1 bio je značajno veći u ccRCC-u nego u okolnom zdravom bubrežnom parenhimu. Analizom iz javno dostupne baze podataka TCGA-KIRC, utvrdili smo da je veći izražaj GIPC1 bio povezan sa lošijim OS ispitanika s ccRCC-om. Analizom korelacija u našem uzorku utvrdili smo da je veći izražaj GIPC1 povezan s pozitivnim M stadijem. Veći izražaj GIPC1 u ccRCC-u povezan je s pozitivnim nodalnim statusom te brojem metastatskih sjela. Ranije je potvrđeno da je povišeni izražaj GIPC1 povezan s proliferacijom i invazijom tumorskih stanica te lošijom prognozom karcinoma želuca (135), dojke (136), jajnika (137) i gušterače (138). U karcinomu želuca GIPC1 potiče angiogenezu, limfangiogenezu, proliferaciju i migraciju zloćudnih stanica (135).

U zaključku, izražaj ispitivanih biljega vezanih za primarnu ciliju, metabolizam kolesterola i signaliziranje preko G proteina ukazuje na njihovu prognostičku vrijednost u ccRCC-u. Nedostaci studije su vezani uz mali uzorak, što nam nije dopuštalo analizu kliničkih ishoda. Dokazali smo značajne razlike u izražaju analiziranih biljega u tumoru i okolnom zdravom bubrežnom parenhimu te značajnu povezanost s određenim kliničko-patološkim pokazateljima, od kojih je najvažniji povezanost izražaja GIPC1 s multiplim metastazama. Kako bismo provjerili naše rezultate, poslužili smo se javno dostupnom bazom TCGA-KIRC i ispitali prognostičku vrijednost navedenih biljega. Pronašli smo da INVS s konektomskim partnerima utječe na proliferaciju stanica, metastatski rasap i mjere ishoda bolesnika s ccRCC-om, a utjecaj izražaja ovih proteina na tumorski imuni mikrookoliš upozorava na njihov mogući prediktivni značaj u primjeni imunoterapije. Bioinformatičkom analizom smo utvrdili prognostički nepovoljan utjecaj ARH i GIPC1 u ccRCC-u. Značajna povezanost kliničko-patoloških pokazatelja s izražajem ARH, GIPC1 te INVS polazna je osnova za opsežnija istraživanja, kako bi se utvrdila njihova prognostička i/ili prediktivna vrijednost. Naši rezultati doprinose boljem razumijevanju uloge proteina INVS, ARH i GIPC1 na razvoj i progresiju tumora, kao i prognozu bolesnika s ccRCC-om te mogu biti polazna osnova za složenije studije.

6. ZAKLJUČCI

1. Izražaj *INVS* kao i mRNA *INVS* su značajno manji u svijetlostaničnom karcinomu bubrega nego u okolnom zdravom bubrežnom parenhimu.
2. Imunofluorescentni izražaj *INVS* u tumoru je negativno povezan sa životnom dobi.
3. Prema rezultatima analize ccRCC u TCGA-KIRC, negativni izražaj RNA *INVS* češći je u G4 tumorima i u ispitanika s pozitivnim metastatskim statusom (M1).
4. Prema rezultatima analize ccRCC u TCGA-KRCC, slabi izražaj RNA *INVS* je negativni prediktor preživljenja bolesnika s ccRCC-om.
5. Izražaj *ARH* je manji je u ccRCC-u nego u okolnom zdravom bubrežnom parenhimu, ali bez statistički značajne razlike.
6. Negativni/slabi imunofluorescentni izražaj *ARH* negativno je povezan s metastaziranjem u jetru.
7. Prema rezultatima analize ccRCC u TCGA-KIRC, veći izražaj RNA *ARH* je negativni prediktor preživljenja bolesnika s ccRCC-om.
8. Imunofluorescentni izražaj *GIPC1* značajno je veći u ccRCC-u nego u okolnom zdravom bubrežnom parenhimu.
9. Imunofluorescentni izražaj *GIPC1* je značajno povezan s pozitivnim N statusom i brojem metastatskih sjela.
10. Prema rezultatima analize ccRCC u TCGA-KIRC, veći izražaj RNA *GIPC1* je negativni prediktor preživljenja bolesnika s ccRCC-om.

7. SAŽETAK

Naslov: Izražaj inversina, ARH i GIPC1 u svijetlostaničnom karcinomu bubrega

Cilj: Unatoč boljoj dijagnostici i novim modalitetima liječenja, stopa povrata bolesti i mortalitet od svijetlostaničnog karcinoma bubrega (ccRCC) su visoki pa se traže novi prognostički biljezi i moguće terapijske mete. Cilj studije je ispitati je li izražaj inversina (INVS), proteina autosomno recesivne hiperkolesterolemije (ARH) i GIPC1, proteina normalno prisutnih u bubrezima, promijenjen u ccRCC-u i kako je povezan s kliničko-patološkim pokazateljima i ishodom bolesti.

Materijali i metode: U kohorti od 34 nefrektomiranih ispitanika s ccRCC-om je imunofluorescencijskom metodom ispitan izražaj INVS, ARH i GIPC1 u tumoru i okolnom zdravom bubrežnom parenhimu i imunoreaktivnost kvantificirana na mikrofotografijama pomoću Image J softvera. Za kvantifikaciju *INVS* mRNA korištena je rt qPCR metoda. Učinjena je analiza povezanosti kliničko-patoloških parametara s imunofluorescentnim izražajem navedenih biljega. Za širu analizu prognostičkog potencijala i mogućeg utjecaja biljega na patogenezu ccRCC-a, provedena je bioinformatička analiza uz korištenje podataka iz TCGA-KIRC, STRING i TISIDB baza.

Rezultati: Izražaj INVS, odnosno mRNA *INVS* značajno je manji u tumoru nego u zdravom bubrežnom parenhimu ($p < 0,05$). Izražaj ARH se ne razlikuje, a izražaj GIPC1 je značajno veći u tumoru nego zdravom bubrežnom parenhimu ($p < 0,05$). Postoji značajna povezanost izražaja INVS sa dobi na početku terapije ($p = 0,046$). Izražaj ARH je značajno povezan s pojavom metastaza u jetru ($p = 0,04$), a izražaj GIPC1 s češćim pozitivnim N statusom ($p = 0,007$) i brojnošću metastatskih sijela ($p = 0,02$).

Bioinformatičkom analizom smo utvrdili povezanost analiziranih biljega s mjerama ishoda. Slabiji/negativan izražaj mRNA *INVS* u ccRCC povezan je s kraćim ukupnim preživljenjem (OS), kraćim preživljenjem specifičnim za bolest i kraćim vremenom do progresije bolesti (DFS) ($p < 0,05$). Veći izražaj ARH povezan je s kraćim OS i kraćim preživljenjem specifičnim za bolest ($p < 0,05$), a veći izražaj GIPC1 povezan s lošijim mjerama ishoda ($p < 0,05$). Izražaj *INVS* i njegovih interakcijskih partnera je povezan s gradusom tumora, pojavom metastaza, leukocitnom infiltracijom u tumorskom mikrookolišu i izražajem gena kontrolne imunološke točke (sve $p < 0,05$).

Zaključak: Negativni izražaj INVS i pozitivni izražaj ARH-a i GIPC1-a su nepovoljni prognostički čimbenici u ccRCC-u.

8. SUMMARY

Title: Expression of inversin, ARH and GIPC1 in clear cell renal cell carcinoma

Aim of the study: Despite improved diagnostics and new treatment modalities, the recurrence rate and mortality of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) are high, and new prognostic markers and potential therapeutic targets are needed. The aim of the study was to investigate whether the expression of inversin (INVS), an autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein, and GIPC1 (GAIP interacting protein C-terminus), a protein normally present in the kidney, is altered in ccRCC and how it is associated with clinicopathological parameters and disease outcome.

Materials and Methods: In a cohort of 34 nephrectomized subjects with ccRCC, the expression of INVS, ARH and GIPC1 in the tumor and surrounding healthy renal parenchyma was examined by immunofluorescence method and immunoreactivity was quantified on photomicrographs using Image J software. The rt qPCR method was used to quantify INVS mRNA. An analysis of the relationship between clinical and pathological indicators and the immunofluorescent expression of the mentioned proteins was performed. For a broader analysis of the prognostic potential and possible influence of proteins on the pathogenesis of ccRCC, a bioinformatics analysis was performed using data from the TCGA-KIRC, STRING and TISIDB databases.

Results: The expression of INVS, or INVS mRNA, is significantly lower in the tumor than in the healthy renal parenchyma ($p < 0,05$). The expression of ARH does not differ, and the expression of GIPC1 is significantly higher in the tumor than in the healthy renal parenchyma ($p < 0,05$). There is a significant correlation between the expression of INVS and the age obtained at the beginning of therapy ($p = 0,046$). The expression of ARH is significantly associated with the occurrence of liver metastases ($p = 0,04$), and the expression of GIPC1 with a more frequent positive N status ($p = 0,007$) and the number of metastatic sites ($p = 0,02$). Bioinformatic analysis was used to determine the association of the analyzed proteins with outcome measures. Lower/negative expression of INVS mRNA in ccRCC was associated with shorter overall survival (OS), shorter disease-specific survival, and shorter time to disease progression (DFS) ($p < 0,05$). Higher expression of ARH was associated with shorter OS and shorter disease-specific survival ($p < 0,05$), and higher expression of GIPC1 was associated with worse outcome measures ($p < 0,05$). Expression of INVS and its interactome partners was associated with tumor progression, metastasis, leukocyte infiltration in the tumor microenvironment, and expression of immune checkpoint genes ($p < 0,05$).

Conclusion: Negative expression of INVS and positive expression of ARH and GIPC1 are unfavorable prognostic factors in ccRCC.

9. LAIČKI SAŽETAK

Unatoč boljoj dijagnostici i novim modalitetima liječenja, stopa povrata bolesti i smrtnost od svijetlostaničnog karcinoma bubrega su visoki pa je potrebno tragati za novim prognostičkim biljezima i mogućim terapijskim metama. Cilj studije je ispitati je li izražaj inversina (INVS), proteina autosomno recesivne hiperkolesterolemije (ARH) i GIPC1 (engl. *GAIP interacting protein C-terminus*); proteina normalno prisutnih u bubrežima, promijenjen u svijetlostaničnom karcinomu bubrega te kako je povezan s kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika i ishodom bolesti.

U kohorti od 34 ispitanika kojima je urađen kirurški zahvat kojim se otklanja bubreg, istraživao je izražaj navedenih biljega u tumoru i okolnom zdravom bubrežnom parenhimu imunofluorescencijskom metodom. Imunoreaktivnost je kvantificirana na mikrofotografijama pomoću Image J softwera. Za kvantifikaciju *INVS* mRNA korištena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Za opširniju analizu prognostičkog potencijala i mogućeg utjecaja biljega na nastanak svijetlostaničnog karcinoma bubrega, provedena je bioinformatička analiza uz korištenje podataka iz TCGA-KIRC (eng. *The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Clear Cell Carcinoma*), STRING i TISIDB baza.

Izražaj *INVS* odnosno *INVS* mRNA su manji u tumoru nego u zdravom bubrežnom parenhimu. Izražaj *ARH* se ne razlikuje, a izražaj *GIPC1* je veći u tumoru nego zdravom bubrežnom parenhimu. Postoji povezanost izražaja *INVS* s dobi na početku terapije. Izražaj *ARH* je povezan s pojavom metastaza u jetru, a *GIPC1* sa češćim metastazama u limfne čvorove i brojnijim udaljenim metastazama.

Bioinformatičkom analizom potvrdili smo povezanost analiziranih biljega s nepovoljnim ishodom. Slabiji/negativan izražaj RNA *INVS* u tumoru je povezan s kraćim ukupnim preživljenjem, preživljenjem specifičnim za bolest i vremenom do progresije bolesti. Veći izražaj *ARH* povezan je s kraćim ukupnim preživljenjem i kraćim preživljenjem specifičnim za bolest, kao što je veći izražaj *GIPC1* povezan s lošijim ishodom bolesnika. Izražaj *INVS* i nekih proteina s kojima je u interakciji je povezan s diferencijacijom tumora, pojavom metastaza, leukocitnim nakupljanjem u tumorskom mikrookolišu te izražajem gena za kontrolne imunološke točke.

U zaključku, negativni izražaj *INVS*-a i pozitivni izražaj *ARH*-a i *GIPC1*-a su nepovoljni prognostički čimbenici u svijetlostaničnom karcinomu bubrega.

10. LITERATURA

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L i sur. Global Cancer Observatory: Cancer Today. [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 2024 [citirano 15. studenog 2024.] Dostupno na: <https://gco.iarc.who.int/today>
2. Cirillo L, Innocenti S, Becherucci F. Global epidemiology of kidney cancer. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2024;39:920–8.
3. Du Z, Chen W, Xia Q, Shi O, Chen Q. Trends and projections of kidney cancer incidence at the global and national levels, 1990–2030: a Bayesian age-period-cohort modeling study. *Biomark Res*. 2020;8:16.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2022. godini.[Internet]. HZJZ, 2025. [citirano 3. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2022-godini/>.
5. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J I SUR. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology*. 2019;75:74–84.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA A Cancer J Clinicians*. 2019;69:7–34.
7. Petejova N, Martinek A. Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2016;160:183–94.
8. Atkins MB, El Bakouny Z, Choueiri TK. Epidemiology, pathology, and pathogenesis of renal cell carcinoma. [Internet]. UpToDate 2025. [citirano 20. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-pathology-and-pathogenesis-of-renal-cell-carcinoma#H640028829>.
9. Mitchell TJ, Turajlic S, Rowan A, Nicol D, Farmery JHR, O’Brien T I SUR. Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell*. 2018;173:611–623.

10. Nezami BG, MacLennan G, Kidney tumor, Renal cell carcinoma – common, Clear cell. [Internet]. PathologyOutlines.com, Inc., 2024. [citirano 20. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignanttrccclear.html>.
11. Adeniran AJ, Shuch B, Humphrey PA. Hereditary Renal Cell Carcinoma Syndromes: Clinical, Pathologic, and Genetic Features. *American Journal of Surgical Pathology*. 2015;39:e1–18.
12. Carlo MI, Hakimi AA, Stewart GD, Bratslavsky G, Brugarolas J, Chen YB i sur. Familial Kidney Cancer: Implications of New Syndromes and Molecular Insights. *European Urology*. 2019;76:754–64.
13. Przybycin CG, Magi-Galluzzi C, McKenney JK. Hereditary Syndromes With Associated Renal Neoplasia: A Practical Guide to Histologic Recognition in Renal Tumor Resection Specimens. *Advances in Anatomic Pathology*. 2013;:245–63.
14. Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, Alva A, Bagshaw H, Baine M i sur. NCCN Guidelines® Insights: Kidney Cancer, Version 2.2024: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2024;22:4–16.
15. Li Y, Lih TSM, Dhanasekaran SM, Mannan R, Chen L, Cieslik M i sur. Histopathologic and proteogenomic heterogeneity reveals features of clear cell renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer Cell*. 2023;41:139-163.
16. Frew IJ, Moch H. A Clearer View of the Molecular Complexity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2015;10:263–89.
17. Delahunt B, Srigley JR, Montironi R, Egevad L. Advances in Renal Neoplasia. *Urology*. 2014;83:969–74.
18. Cheng J, Chen W, Schwaab T, Kauffman E, Xu B. Prognostic Value of Eosinophilic Cytoplasmic Components in Clear Cell Renal Cell Carcinoma [Internet]. *Genitourinary Pathology*, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, 2024. [citirano 20. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/modpathol201516.pdf#page=10>

19. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2002;7:135–40.
20. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK i sur. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA A Cancer J Clinicians*. 2017;67:93–9.
21. Zini L, Perrotte P, Capitanio U, Jeldres C, Shariat SF, Antebi E i sur. Radical versus partial nephrectomy: Effect on overall and noncancer mortality. *Cancer*. 2009;115:1465–71.
22. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Nephron Sparing Surgery for Appropriately Selected Renal Cell Carcinoma Between 4 and 7 Cm Results in Outcome Similar to Radical Nephrectomy. *Journal of Urology*. 2004;171:1066–70.
23. Gill IS, Kavoussi LR, Lane BR, Blute ML, Babineau D, Colombo JR i sur. Comparison of 1,800 Laparoscopic and Open Partial Nephrectomies for Single Renal Tumors. *Journal of Urology*. 2007;178:41–6.
24. Lane BR, Gill IS. 7-Year Oncological Outcomes After Laparoscopic and Open Partial Nephrectomy. *Journal of Urology*. 2010 Feb;183(2):473–9.
25. O’Malley RL, Godoy G, Kanofsky JA, Taneja SS. The Necessity of Adrenalectomy at the Time of Radical Nephrectomy: A Systematic Review. *Journal of Urology*. 2009;181:2009–17.
26. Blom JHM, Van Poppel H, Maréchal JM, Jacqmin D, Schröder FH, De Prijck L i sur. Radical Nephrectomy with and without Lymph-Node Dissection: Final Results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Randomized Phase 3 Trial 30881. *European Urology*. 2009;55:28–34.
27. Blute ML, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zincke H. A protocol for performing extended lymph node dissection using primary tumor pathological features for patients

- treated with radical nephrectomy for clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Urology*. 2004;172:465–9.
28. Shi X, Feng D, Li D, Zhang F, Wei W. The Role of Lymph Node Dissection for Non-Metastatic Renal Cell Carcinoma: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2022;11:790381.
 29. Berger A, Brandina R, Atalla MA, Herati AS, Kamoi K, Aron M, et al. Laparoscopic Radical Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma: Oncological Outcomes at 10 Years or More. *Journal of Urology*. 2009;182:2172–6.
 30. Burgess NA, Koo BC, Calvert RC, Hindmarsh A, Donaldson PJ, Rhodes M. Randomized Trial of Laparoscopic v Open Nephrectomy. *Journal of Endourology*. 2007;21:610–3.
 31. Haas NB, Manola J, Uzzo RG, Flaherty KT, Wood CG, Kane C, et al. Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387:2008–16.
 32. Motzer RJ, Haas NB, Donskov F, Gross-Goupil M, Varlamov S, Kopyltsov E i sur. Randomized Phase III Trial of Adjuvant Pazopanib Versus Placebo After Nephrectomy in Patients With Localized or Locally Advanced Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2017;35:3916–23.
 33. Gross-Goupil M, Kwon TG, Eto M, Ye D, Miyake H, Seo SI i sur Axitinib versus placebo as an adjuvant treatment of renal cell carcinoma: results from the phase III, randomized ATLAS trial. *Ann Oncol*. 2018;29:2371–8.
 34. Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, George DJ, Pantuck AJ, Patel A i sur. Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *N Engl J Med*. 2016;375:2246–54.
 35. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang YH i sur. Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2022;385:683–94.

36. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Symeonides SN i sur. Overall Survival with Adjuvant Pembrolizumab in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2024;390:1359–71.
37. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-Alfa as a Comparative Treatment for Clinical Trials of New Therapies Against Advanced Renal Cell Carcinoma. *JCO*. 2002;20):289–96.
38. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C i sur. Prognostic Factors for Overall Survival in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Agents: Results From a Large, Multicenter Study. *JCO*. 2009;27:5794–9.
39. Food and Drug Administration. FDA approves pembrolizumab plus axitinib for advanced renal cell carcinoma. [Internet]. FDA, 2019. [citirano 20. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-plus-axitinib-advanced-renal-cell-carcinoma>.
40. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019 Mar 21;380(12):1116–27.
41. Food and Drug Administration. FDA approves nivolumab plus cabozantinib for advanced renal cell carcinoma. [Internet] FDA, 2021. [citirano 20. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-nivolumab-plus-cabozantinib-advanced-renal-cell-carcinoma>
42. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Boursin MT, Zurawski B i sur. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021;384:829–41.
43. Food and Drug Administration. FDA approves lenvatinib plus pembrolizumab for advanced renal cell carcinoma. [Internet] FDA, 2021. [citirano 20. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-lenvatinib-plus-pembrolizumab-advanced-renal-cell-carcinoma>.

44. Choueiri TK, Eto M, Motzer R, De Giorgi U, Buchler T, Basappa NS i sur. Lenvatinib plus pembrolizumab versus sunitinib as first-line treatment of patients with advanced renal cell carcinoma (CLEAR): extended follow-up from the phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology*. 2023;24:228–38.
45. Food and Drug Administration. FDA approves nivolumab plus ipilimumab combination for intermediate or poor-risk advanced renal cell carcinoma. [Internet] FDA, 2018. [citirano 20. studenog 2025.] Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-nivolumab-plus-ipilimumab-combination-intermediate-or-poor-risk-advanced-renal-cell>.
46. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK i sur. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;378:1277–90.
47. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380:1103–15.
48. Haanen JBAG, Larkin J, Choueiri TK, Albiges L, Rini BI, Atkins MB i sur. Extended follow-up from JAVELIN Renal 101: subgroup analysis of avelumab plus axitinib versus sunitinib by the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium risk group in patients with advanced renal cell carcinoma. *ESMO Open*. 2023;8:101210.
49. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J i sur. Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial. *JCO*. 2010;28):1061–8.
50. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J i sur. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2013;369:722–31.
51. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S i sur. Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *JCO*. 2009;27:3584–90.

52. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O i sur. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356:115–24.
53. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A i sur. Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356:2271–81.
54. Omrčen T, Boraska Jelavić T, Šitum M, Vilović K, Dolić K, Zahirović D. i sur. Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika s rakom bubrega [Internet]. *Liječnički vijesnik*, 2019;141(11–12).
55. Lee BH, Feifer A, Feuerstein MA, Benfante NE, Kou L, Yu C i sur. Validation of a Postoperative Nomogram Predicting Recurrence in Patients with Conventional Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *European Urology Focus*. 2018;4:100–5.
56. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED i sur. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: A stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer*. 2003 Apr;97(7):1663–71.
57. Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A, et al. Use of the University of California Los Angeles Integrated Staging System to Predict Survival in Renal Cell Carcinoma: An International Multicenter Study. *JCO*. 2004;22:3316–22.
58. Parker WP, Cheville JC, Frank I, Zaid HB, Lohse CM, Boorjian SA i sur. Application of the Stage, Size, Grade, and Necrosis (SSIGN) Score for Clear Cell Renal Cell Carcinoma in Contemporary Patients. *European Urology*. 2017;71:665–73.
59. Leibovich BC, Lohse CM, Cheville JC, Zaid HB, Boorjian SA, Frank I i sur. Predicting Oncologic Outcomes in Renal Cell Carcinoma After Surgery. *European Urology*. 2018;73:772–80.
60. Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J i sur. Carbonic Anhydrase IX Is Not an Independent Predictor of Outcome for Patients With Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *JCO*. 2007;25:4757–64.

61. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD i sur. Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007;13:7388–93.
62. Novacescu D, Feciche BO, Cumpănas AA, Bardan R, Rusmir AV, Bitar YA i sur. Contemporary Clinical Definitions, Differential Diagnosis, and Novel Predictive Tools for Renal Cell Carcinoma. *Biomedicines*. 2022;10:2926.
63. Fan C, Zhao C, Wang F, Li S, Wang J. Significance of PTEN Mutation in Cellular Process, Prognosis, and Drug Selection in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2019;9:357.
64. Sim SH, Messenger MP, Gregory WM, Wind TC, Vasudev NS, Cartledge J i sur. Prognostic utility of pre-operative circulating osteopontin, carbonic anhydrase IX and CRP in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2012;107:1131–7.
65. Rasti A, Abolhasani M, Zanjani LS, Asgari M, Mehrazma M, Madjd Z. Reduced expression of CXCR4, a novel renal cancer stem cell marker, is associated with high-grade renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143:95–104.
66. Zhang KJ, Wilson GD, Kara S, Majeske A, Zhang PL, Hafron JM. Diagnostic role of kidney injury molecule-1 in renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol*. 2019;51:1893–902.
67. Scelo G, Muller DC, Riboli E, Johansson M, Cross AJ, Vineis P, et al. KIM-1 as a Blood-Based Marker for Early Detection of Kidney Cancer: A Prospective Nested Case–Control Study. *Clinical Cancer Research*. 2018;24:5594–601.
68. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, Zhrebker L, Pavía-Jiménez A, Rathmell WK i sur. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *The Lancet Oncology*. 2013;14:159–67.
69. Pawłowski R, Mühl SM, Sulser T, Krek W, Moch H, Schraml P. Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression. *Intl Journal of Cancer* 2013;132:E11–7

70. Kroeger N, Klatte T, Chamie K, Rao PN, Birkhäuser FD, Sonn GA i sur. Deletions of chromosomes 3p and 14q molecularly subclassify clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2013;119:1547–54.
71. Speed JM, Trinh QD, Choueiri TK, Sun M. Recurrence in Localized Renal Cell Carcinoma: a Systematic Review of Contemporary Data. *Curr Urol Rep*. 2017;18:15.
72. Klatte T, Rossi SH, Stewart GD. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol*. 2018;36:1943–52.
73. Naik P, Dudipala H, Chen YW, Rose B, Bagrodia A, McKay RR. The incidence, pathogenesis, and management of non-clear cell renal cell carcinoma. *Therapeutic Advances in Urology*. 2024;16:17562872241232578.
74. Wei H, Miao J, Cui J, Zheng W, Chen X, Zhang Q i sur. The prognosis and clinicopathological features of different distant metastases patterns in renal cell carcinoma: analysis based on the SEER database. *Sci Rep*. 2021;11:17822.
75. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A i sur. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World J Oncol*. 2020;11:79–87.
76. Veland IR, Montjean R, Eley L, Pedersen LB, Schwab A, Goodship J i sur. Inversin/Nephrocystin-2 Is Required for Fibroblast Polarity and Directional Cell Migration. Katoh M, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e60193.
77. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016;99:141–9.
78. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36:1461–73.
79. Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (Review). *Oncol Rep* 2005;14:1583-8
80. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487:330–7.
81. Xu C, Xu Z, Zhang Y, Evert M, Calvisi DF, Chen X. β -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2022;132:e154515.

82. Xu X, Zhang M, Xu F, Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer*. 2020;19:165.
83. Francis JC, Thomsen MK, Taketo MM, Swain A. β -Catenin Is Required for Prostate Development and Cooperates with Pten Loss to Drive Invasive Carcinoma. Clurman BE, editor. *PLoS Genet*. 2013;9:e1003180.
84. Xue G, Romano E, Massi D, Mandalà M. Wnt/ β -catenin signaling in melanoma: Preclinical rationale and novel therapeutic insights. *Cancer Treat Rev*. 2016;49:1–12.
85. Blacher E, Ben Baruch B, Levy A, Geva N, Green KD, Garneau Tsodikova S i sur. Inhibition of glioma progression by a newly discovered CD38 inhibitor. *Intl Journal of Cancer*. 2015;136:1422–33.
86. Chen C, Zhao M, Tian A, Zhang X, Yao Z, Ma X. Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget*. 2015;6:17570–83.
87. Zhang Y, Morris JP, Yan W, Schofield HK, Gurney A, Simeone DM, et al. Canonical Wnt Signaling Is Required for Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Research*. 2013;73:4909–22.
88. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -Catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers. *Gastroenterology*. 2012;142:219–32.
89. Arensman MD, Kovochich AN, Kulikauskas RM, Lay AR, Yang PT, Li X i sur. WNT7B mediates autocrine Wnt/ β -catenin signaling and anchorage-independent growth in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*. 2014;33:899–908.
90. Singla V, Reiter JF. The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. *Science*. 2006;313:629–33.
91. Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Krönig C i sur. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet*. 2005;37:537–43.
92. Solic I, Racetin A, Filipovic N, Mardesic S, Bocina I, Galesic-Ljubanovic D i sur. Expression Pattern of α -Tubulin, Inversin and Its Target Dishevelled-1 and Morphology

- of Primary Cilia in Normal Human Kidney Development and Diseases. *IJMS*. 2021;22:3500.
93. Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM i sur. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet*. 2003;34:413–20.
 94. Stokman M, Lilien M, Knoers N. Nephronophthisis-Related Ciliopathies. [Internet]. GeneReviews® Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993[ažurirano 2024]. Dostupno na: : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368475/>
 95. Jiang GY, Zhang Y, Zhang XP, Lin XY, Yu JH, Wang EH. Inversin correlates with the malignant phenotype of non-small cell lung cancer and promotes the invasiveness of lung cancer cells. *Tumour Biol*. 2017;39:101042831769117.
 96. Alberts B, Johnson A, Lewis J. The Molecular Mechanisms of Membrane Transport and the Maintenance of Compartmental Diversity. [Internet]. U: Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Dostupno na:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26859/>.
 97. He G, Gupta S, Yi M, Michaely P, Hobbs HH, Cohen JC. ARH Is a Modular Adaptor Protein That Interacts with the LDL Receptor, Clathrin, and AP-2. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:44044–9.
 98. Leigh T, Kawai T, Preston K, Kelemen S, Okune R, St Paul A i sur. Deletion of LDLRAP1 Induces Atherosclerotic Plaque Formation, Insulin Resistance, and Dysregulated Insulin Response in Adipose Tissue. *The American Journal of Pathology*. 2022;192:1092–108.
 99. Alves AC, Azevedo S, Benito-Vicente A, Graça R, Galicia-Garcia U, Barros P i surl. LDLR variants functional characterization: Contribution to variant classification. *Atherosclerosis*. 2021;329:14–21.
 100. Arida A, Legaki AI, Kravvariti E, Protogerou A, Sfrikakis PP, Chatzigeorgiou A. PCSK9/LDLR System and Rheumatoid Arthritis-Related Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:738764.

101. Go GW, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med*. 2012;85:19–28.
102. Antipenko ID, Olkhovik DM, Solopova ON, Khayretdinova GA, Kalacheva OS, Makarova JA, et al. The Expression of the LDLR, LDLRAP1, and PCSK9 Genes has Prognostic Significance in Triple-negative Breast Cancer. *CMC*. 2025;32:7045–61.
103. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013;499:43–9.
104. Hakimi AA, Reznik E, Lee CH, Creighton CJ, Brannon AR, Luna A i sur. An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016;29:104–16.
105. Wettersten HI, Hakimi AA, Morin D, Bianchi C, Johnstone ME, Donohoe DR i sur. Grade-Dependent Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer Revealed by Combined Proteomics and Metabolomics Analysis. *Cancer Research*. 2015;75:2541–52.
106. Neely BA, Wilkins CE, Marlow LA, Malyarenko D, Kim Y, Ignatchenko A i sur. Proteotranscriptomic Analysis Reveals Stage Specific Changes in the Molecular Landscape of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. Sun LZ, editor. *PLoS ONE*. 2016;11:e0154074.
107. Gatto F, Nookaew I, Nielsen J. Chromosome 3p loss of heterozygosity is associated with a unique metabolic network in clear cell renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:E866-75
108. Zhao Z, Lu J, Han L, Wang X, Man Q, Liu S. Prognostic significance of two lipid metabolism enzymes, HADHA and ACAT2, in clear cell renal cell carcinoma. *Tumor Biol*. 2016 Jun;37(6):8121–30.
109. Chang WC, Wang HC, Cheng WC, Yang JC, Chung WM, Ho YP i surl. LDLR-mediated lipidome–transcriptome reprogramming in cisplatin insensitivity. *Endocrine-Related Cancer*. 2020;27:81–95.
110. Pan Z, Wang K, Wang X, Jia Z, Yang Y, Duan Y i sur. Cholesterol promotes EGFR-TKIs resistance in NSCLC by inducing EGFR/Src/Erk/SP1 signaling-mediated ERRA re-expression. *Mol Cancer*. 2022;21:77.

111. Zhang GM, Chen W, Yao Y, Luo L, Sun LJ. LDLR promotes growth and invasion in renal cell carcinoma and activates the EGFR pathway. *neo*. 2022;69:113–22.
112. Zhang GM, Wang MY, Liu YN, Zhu Y, Wan FN, Wei QY i sur. Functional variants in the low-density lipoprotein receptor gene are associated with clear cell renal cell carcinoma susceptibility. *Carcinogenesis*. 2017;38:1241–8.
113. Gonias SL, Karimi-Mostowfi N, Murray SS, Mantuano E, Gilder AS. Expression of LDL receptor-related proteins (LRPs) in common solid malignancies correlates with patient survival. Pizzo SV, editor. *PLoS ONE*. 2017;12:e0186649.
114. Tan L, Su X, Ma Y, Zeng C, Yue H, Zeng T i sur. Cholesterol Metabolism-related Characteristics Predict Therapeutic Response and Survival in Esophageal Cancer. *Journal of Advanced Research*. 2025;S2090123225004345.
115. Simigdala N, Gao Q, Pancholi S, Roberg-Larsen H, Zvelebil M, Ribas R i sur. Cholesterol biosynthesis pathway as a novel mechanism of resistance to estrogen deprivation in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2016;18:58.
116. Yuan Q, Lu X, Guo H, Sun J, Yang M, Liu Q i sur. Low-density lipoprotein receptor promotes crosstalk between cell stemness and tumor immune microenvironment in breast cancer: a large data-based multi-omics study. *J Transl Med*. 2023;21:871.
117. O’Grady S, Crown J, Duffy MJ. Statins inhibit proliferation and induce apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Med Oncol*. 2022;39:142.
118. Sim Y, Lim C, Phyu N, Tan KTB, Chew LST, Wong CY i sur. The Impact of Statin Use and Breast Cancer Recurrence - A Retrospective Study in Singapore. *Front Oncol*. 2022;12:835320.
119. Katoh M. Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. *Exp Mol Med*. 2013;45:e26–e26.
120. Booth RA, Cummings C, Tiberi M, Liu XJ. GIPC Participates in G Protein Signaling Downstream of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:6719–25.

121. Varsano T, Dong MQ, Niesman I, Gacula H, Lou X, Ma T i sur. GIPC Is Recruited by APPL to Peripheral TrkA Endosomes and Regulates TrkA Trafficking and Signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26:8942–52.
122. Blobbe GC, Liu X, Fang SJ, How T, Lodish HF. A Novel Mechanism for Regulating Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:39608–17.
123. Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *The Journal of cell biology*. 1995;130:67–77.
124. Spicer E, Suckert C, Al-Attar H, Marsden M. Integrin $\alpha 5\beta 1$ Function Is Regulated by XGIPC/kermit2 Mediated Endocytosis during *Xenopus laevis* Gastrulation. Beier F, editor. *PLoS ONE*. 2010;5:e10665.
125. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G. Neuropilin-2 and Neuropilin-1 Are Receptors for the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and of Placenta Growth Factor-2, but Only Neuropilin-2 Functions as a Receptor for the 145-Amino Acid Form of VEGF. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:18040–5.
126. Wang L, Mukhopadhyay D, Xu X, Wang L, Mukhopadhyay D, Xu X. C terminus of RGS GAIP interacting protein conveys neuropilin 1 mediated signaling during angiogenesis. *The FASEB Journal*. 2006;20:1513–5.
127. Bunn RC, Jensen MA, Reed BC. Protein Interactions with the Glucose Transporter Binding Protein GLUT1CBP That Provide a Link between GLUT1 and the Cytoskeleton. Guidotti G, editor. *MBoC*. 1999;10:819–32.
128. Gao Y, Li M, Chen W, Simons M. Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol*. 2000;184:373–9.
129. De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farquhar MG. GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:12340–5.

130. Razanskas R, Sasnauskas K. Interaction of hepatitis B virus core protein with human GIPC1. *Arch Virol*. 2010;155:247–50.
131. Favre-Bonvin A, Reynaud C, Kretz-Remy C, Jalinot P. Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein Binds the Cellular PDZ Protein TIP-2/GIPC, Which Is Involved in Transforming Growth Factor β Signaling and Triggers Its Degradation by the Proteasome. *J Virol*. 2005;79:4229–37.
132. Rousset R, Fabre S, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P. The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene*. 1998;16:643–54.
133. Arden SD, Puri C, Au JSY, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI Is Required for Targeted Membrane Transport during Cytokinesis. Holzbaaur E, editor. *MBoC*. 2007;18:4750–61.
134. Naccache SN, Hasson T, Horowitz A. Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:12735–40.
135. Li T, Zhong W, Yang L, Zhao Z, Wang L, Liu C i sur. GIPC1 promotes tumor growth and migration in gastric cancer via activating PDGFR/PI3K/AKT signaling. *OR*. 2024;32:361–71.
136. Wang L, Lau JS, Patra CR, Cao Y, Bhattacharya S, Dutta S i sur. RGS-GAIP–Interacting Protein Controls Breast Cancer Progression. *Molecular Cancer Research*. 2010;8:1591–600.
137. Hempel N, How T, Dong M, Murphy SK, Fields TA, Blobe GC. Loss of Betaglycan Expression in Ovarian Cancer: Role in Motility and Invasion. *Cancer Research*. 2007 ;67:5231–8.
138. Pal K, Pletnev AA, Dutta SK, Wang E, Zhao R, Baral A i sur. Inhibition of Endoglin–GIPC Interaction Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13:2264–75.

139. Zhang G, Chen L, Sun K, Khan AA, Yan J, Liu H i sur. Neuropilin-1 (NRP-1)/GIPC1 pathway mediates glioma progression. *Tumor Biol.* 2016;37:13777–88.
140. Mikhaylenko DS, Lyubchenko LN, Zborovskaya IB, Strelnikov VV, Zaletayev DV. Analysis of Polymorphic Variants of Gene GIPC1 CGG Repeats in Healthy Individuals and in Patients with Breast Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer. *Russ J Genet.* 2005;41:1059–62.
141. Kirikoshi H, Katoh M. Expression of human GIPC1 in normal tissues, cancer cell lines, and primary tumors. *Int J Mol Med.* 2002;9:509-13
142. Paek AR, You HJ. GAIP-Interacting Protein, C-Terminus Is Involved in the Induction of Zinc-Finger Protein 143 in Response to Insulin-like Growth Factor-1 in Colon Cancer Cells. *Molecules and Cells.* 2011;32:415–20.
143. Ahmed T, Mythreye K, Lee NY. Strength and duration of GIPC-dependent signaling networks as determinants in cancer. *Neoplasia.* 2021;23:181–8.
144. Tomić T, Tomić D, Vukoja M, Kraljević M, Ljevak I, Glamočlija Ui sur. Clinical Significance and Expression Pattern of RIP5 and VGLL4 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients Treated with Sunitinib. *Biomedicines.* 2024;12:149.
145. Karlsson M, Zhang C, Méar L, Zhong W, Digre A, Katona B i sur. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv.* 2021;7:eabh2169.
146. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001;25:402–8.
147. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A i sur. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347:1260419.
148. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H i sur. A subcellular map of the human proteome. *Science.* 2017;356:eaal3321.
149. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G i sur. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science.* 2017;357:eaan2507.

150. Liao J, Yu Z, Chen Y, Bao M, Zou C, Zhang H i sur. Single-cell RNA sequencing of human kidney. *Sci Data*. 2020;7:4.
151. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R i sur. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*. 2023;51:D638–46.
152. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, Repečka K, McDade F, Kamath A i sur. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol*. 2020;38:675–8.
153. Ru B, Wong CN, Tong Y, Zhong JY, Zhong SSW, Wu WC i sur. TISIDB: an integrated repository portal for tumor–immune system interactions. Wren J, editor. *Bioinformatics*. 2019;35:4200–2.
154. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*. 2017;45:W98–102.
155. Brech D, Herbstritt AS, Diederich S, Straub T, Kokolakis E, Irmeler M i sur. Dendritic Cells or Macrophages? The Microenvironment of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma Imprints a Mosaic Myeloid Subtype Associated with Patient Survival. *Cells*. 2022;11:3289.
156. Perutina I, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Ogorevc M, Filipović N i sur. Disturbances in Switching between Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Characterize Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1*^{−/−} (yotari) Mice. *Biomedicines*. 2023;11:1321.
157. Li T, Fu J, Zeng Z, Cohen D, Li J, Chen Q i sur. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Research*. 2020;48:W509–14.
158. Miao D, Margolis CA, Gao W, Voss MH, Li W, Martini DJ i sur. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. *Science*. 2018;359:801–6.

159. Banumathy G, Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*. 2010;10:658–64.
160. Liu Y, Shen Y, Sun T, Yang W. Mechanisms regulating radiosensitivity of glioma stem cells. *Neo*. 2017;64:655–65.
161. Manfreda L, Rampazzo E, Persano L. Wnt Signaling in Brain Tumors: A Challenging Therapeutic Target. *Biology*. 2023;12:729.
162. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and Prognostic Stratification of 670 Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *JCO*. 1999;17:2530–2530.
163. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, BouMerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P i sur. Validation and Extension of the Memorial Sloan-Kettering Prognostic Factors Model for Survival in Patients With Previously Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma. *JCO*. 2005;23:832–41.
164. Kim K, Zhou Q, Christie A, Stevens C, Ma Y, Onabolu O i sur. Determinants of renal cell carcinoma invasion and metastatic competence. *Nat Commun*. 2021;12:5760.
165. Li Z, Yang Z, Liu W, Zhu W, Yin L, Han Z i sur. Disheveled3 enhanced EMT and cancer stem-like cells properties via Wnt/ β -catenin/c-Myc/SOX2 pathway in colorectal cancer. *J Transl Med*. 2023;21:302.
166. Chan DW, Chan C, Yam JWP, Ching Y, Ng IOL. Prickle-1 Negatively Regulates Wnt/ β -Catenin Pathway by Promoting Dishevelled Ubiquitination/Degradation in Liver Cancer. *Gastroenterology*. 2006;131:1218–27.
167. Cui Y, Tang C, Guo J, Sun Y, Ke Z. Dishevelled Segment Polarity Protein 3: A Novel Prognosis-related Marker in Pan-driver-gene-negative Lung Adenocarcinoma. *J Cancer*. 2023;14:3028–38.
168. Cai X, Wang Z, Lin S, Chen H, Bu H. Ginsenoside Rg3 suppresses vasculogenic mimicry by impairing DVL3-maintained stemness via PAAD cell-derived exosomal miR-204 in pancreatic adenocarcinoma. *Phytomedicine*. 2024 Apr;126:155402.

169. Zhang Y, Lin N, Liu X, Yao T. Dishevelled Segment Polarity Protein 3 (DVL3) Induced by Bacterial LPS Promotes the Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells through the TLR4 Pathway. *Archivos Españoles de Urología*. 2024;77:193.
170. Lin E, Liu X, Liu Y, Zhang Z, Xie L, Tian K, et al. Roles of the Dynamic Tumor Immune Microenvironment in the Individualized Treatment of Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Immunol*. 2021;12:653358.
171. Qi Y, Xia Y, Lin Z, Qu Y, Qi Y, Chen Y i sur. Tumor-infiltrating CD39+CD8+ T cells determine poor prognosis and immune evasion in clear cell renal cell carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69:1565–76.
172. Nishida K, Kawashima A, Kanazawa T, Kidani Y, Yoshida T, Hirata M i sur. Clinical importance of the expression of CD4+CD8+ T cells in renal cell carcinoma. *International Immunology*. 2020;32:347–57.
173. Tessier-Cloutier B, Twa DD, Marzban M, Kalina J, Chun HE, Pavey N i sur. The presence of tumour-infiltrating neutrophils is an independent adverse prognostic feature in clear cell renal cell carcinoma. *The Journal of Pathology CR*. 2021;7:385–96.
174. Cordeiro MD, Ilario EN, Abe DK, Carvalho PAD, Muniz DQB, Sarkis AS i sur. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Cancer Outcome in Locally Advanced Clear Renal Cell Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2022;20:102–6.
175. Wu F, Chen J, Yao K, Fan D, Wang M, Liu Y i sur. The Infiltration of Neutrophil Granulocytes Due to Loss of PTEN Was Associated with Poor Response to Immunotherapy in Renal Cell Carcinoma. *JIR*. 2022;15:6553–67.
176. Wang J, Huang F, Zhao J, Huang P, Tan J, Huang M i sur. Tumor-Infiltrated CD8+ T Cell 10-Gene Signature Related to Clear Cell Renal Cell Carcinoma Prognosis. *Front Immunol*. 2022;13:930921.
177. Ghatalia P, Gordetsky J, Kuo F, Dulaimi E, Cai KQ, Devarajan K, et al. Prognostic impact of immune gene expression signature and tumor infiltrating immune cells in localized clear cell renal cell carcinoma. *j immunotherapy cancer*. 2019 Dec;7(1):139.

178. Lee CH, Kang M, Kwak C, Ko YH, Kim JK, Park JY i sur. Sites of Metastasis and Survival in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results From the Korean Renal Cancer Study Group Database. *J Korean Med Sci.* 2024;39:e293.
179. Rademaker G, Hernandez GA, Dahal S, Miller-Phillips L, Li AL, Luan C i sur. PCSK9 dependent cholesterol acquisition and utilization underlies metastatic organ preference in pancreatic cancer. [Internet]. *BioRxiv*, 2025. [citirano 25. studenog 2025]. Dostupno na: : <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.04.22.649912>
180. Rademaker G, Hernandez GA, Seo Y, Dahal S, Miller-Phillips L, Li AL i sur. PCSK9 drives sterol-dependent metastatic organ choice in pancreatic cancer. *Nature.* 2025;643:1381–90.
181. Taniguchi K, Sugihara K, Miura T, Hoshi D, Kohno S, Takahashi C i sur. Cholesterol synthesis is essential for the growth of liver metastasis-prone colorectal cancer cells. *Cancer Sci.* 2024;115:3817–28.
182. Guo F, Ma Z, Wang H, Han Z. Transcriptome analysis combined with single-cell analysis identified that APOC1 influences cholesterol transport by macrophages in ccRCC. *Sci Rep.* 2025;15:34724.
183. Ning H, Jiang Y, Li B, Ren J, Wang C, Wei L i sur. CircABCA1 promotes ccRCC by reprogramming cholesterol metabolism and facilitating M2 macrophage polarization through IGF2BP3-mediated stabilization of SCARB1 mRNA. *Mol Cancer.* 2025;24:199.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivanka Urlić

Datum rođenja: 19.08.1988.

E-mail: ivanka.drazic@gmail.com

Školovanje

-
- 2014 - sada - doktorski studij 'Biologija novotvorina', Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
 - 9/2006 - 6/2012 - Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
 - 2002 - 2006 - I gimnazija Split

Radno iskustvo

-
- 5/2022 – specijalistica onkologije i radioterapije, Klinika za onkologiju i radioterapiju, Klinički bolnički centar Split
 - 11/2015 – 5/2022 – specijalizantica Klinike za onkologiju i radioterapiju, Klinički bolnički centar Split
 - 5/2014 – 11/2015 – doktorica medicine u timu 1 HP Primošten, Zavod za hitnu medicinu Šibensko-kninske županije
 - 3-4/2014 – volontiranje u ordinaciji liječnika obiteljske medicine
 - 11/2012 – 11/2013 – stažista, Klinički bolnički centar Split
 - 8/2012 – Sveučilišna bolnica 'G. Martino' Messina, Sicilija - profesionalna razmjena u sklopu međunarodne razmjene studenata medicine pri IFMSA - rad na odjelu Interne medicine – hematologije
 - 2009/2010 i 2010/2011 – demonstrator na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Profesionalno usavršavanje

-
- 11/2021 – upisan tečaj 'Ultrazvuk dojki'
 - ESMO Preceptorship on Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms, 4/2019., Prag, Czech Republic
 - 9. Regionalni onkološki forum, 10/2018. Krakow, Poljska

- ESTRO School, Target Volume Determination – From Imaging to Margins, 9/2018., Moscow, Russia
- Melanoma Preceptorship, 11/2016, Jerusalem, Israel
- redovito sudjelovanje na stručnim onkološkim sastancima i kongresima u Hrvatskoj
- 11/2014 – Tečaj naprednog održavanja života (Advanced Life Support Provider Course), Hrvatsko društvo za reanimatologiju HLZ-a

Aktivnosti

- 2010. - 2011. – predsjednica Odbora za javno zdravstvo udruge CroMSIC podružnice Zagreb
 - voditeljica projekta Kvalitativno istraživanje ruralnog zdravlja
 - voditeljica javnih radionica unutar projekta MRAK kampanja: edukacija srednjoškolaca i opće populacije o prevenciji i ranom otkrivanju najučestalijih karcinoma u RH, organiziranje Dana narcisa

Publikacije

- **Urlić I**, Šoljić V, Vukoja M, Marijanović I, Kraljević M, Urlić M, Marić S, Vukojević K, Filipović N. Identifying an Inversin as a Novel Prognostic Marker in Patients with Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25:12120.
- Urlić M, **Urlić I**, Urlić H, Mašek T, Benzon B, Vitlov Uljević M, Vukojević K, Filipović N. Effects of Different n6/n3 PUFAs Dietary Ratio on Cardiac Diabetic Neuropathy. *Nutrients.* 2020; 12:276.
- Ban M, Petrić Miše B, Majić A, **Dražić I**, Vrdoljak E. Efficacy and safety of palbociclib in heavily pretreated patients with HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Future Oncol.* 2018; 14:537-544.

- Sović S, Vitale K, Keranović A, **Dražić I**, Džakula A, Jelaković B. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in some rural areas of Sisak – Moslavina county, Croatia. *Periodicum Biologorum*. 2011;113: 321-326.
- Džakula A, Keranović A, Crnica V, Majer M, Janev Holcer N, Sović S, Bolić B, Domokuš NA, **Dražić I**, Vugrinčić M, Zibar D, Blažević N, Friščić T, Korać T, Bander I, Vuletić S. Risk factors for cardiovascular disease in rural area of Croatia. *Collegium Antropologicum*. 2012;36:245-249.

Suradnja u pisanju udžbenika

- Vrdoljak E i suradnici, *Klinička onkologija: 4. obnovljeno i izmijenjeno izdanje*, 2024. Medicinska naklada

Kongresni sažeci

- Ban M, **Dražić I**; Buljubašić M, Bajić Ž; Petrić Miše B, Strikić A, Božić M, Ledina D, Vrdoljak E. Differences in the overall survival (OS) of primary and secondary metastatic breast cancer (MBC) patients: A retrospective study. 2018;50-52. 14th Central European Oncology Congress - CEOC, 2018., Opatija
- Ban M, Bajić Ž, Buljubašić M, **Dražić I**, Petrić Miše B, Strikić A, Božić M, Ledina D, Vrdoljak E. Correlation of the progression free survival after 1st treatment line (PFS1) with overall survival (OS) changes in metastatic breast cancer (MBC): Retrospective cohort study. 2018;53-57. 14th Central European Oncology Congress – CEOC, 2018., Opatija

Jezici

Engleski