

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Oliver Pavlović

IMUNOHISTOKEMIJSKA EKSPRESIJA WNT-4 KAO
PREDSKAZATELJ BIOLOŠKOG PONAŠANJA
SVJETLOSTANIČNOG KARCINOMA BUBREGA

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Oliver Pavlović

IMUNOHISTOKEMIJSKA EKSPRESIJA WNT-4 KAO
PREDSKAZATELJ BIOLOŠKOG PONAŠANJA
SVJETLOSTANIČNOG KARCINOMA BUBREGA

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Tvrтко Hudolin, dr. med.

Komentor: Doc. dr. sc. Ivan Miškulin

Rad je izrađen na Klinici za urologiju KBC Zagreb.

Rad ima 92 lista.

ZAHVALA:

Zahvaljujem se svojim mentorima na stalnom poticanju, razumijevanju i podršci pri izradi ovog rada. Također se zahvaljujem osoblju Klinike za urologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavoda za urologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek na pomoći. Posebno se zahvaljujem svojoj supruzi i djeci kojima i posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Anatomija i fiziologija.....	1
1.2. Embriologija bubrega.....	1
1.3. Wnt (engl. Wingless-related integration site) proteini.....	2
1.4. Karcinom bubrega.....	6
1.4.1. Incidencija, etiologija i prevencija.....	6
1.4.2. Rizični čimbenici.....	7
1.4.3. Klinička slika, pregled i obrada bolesnika.....	7
1.4.4. Dijagnostika.....	8
1.4.5. Liječenje karcinoma bubrega.....	13
1.4.6. Patologija.....	15
1.4.7. Kontrola i praćenje bolesnika.....	22
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
4. USTROJ STUDIJE.....	25
5. ISPITANICI.....	26
6. METODE ISTRAŽIVANJA.....	28
6.1. Patohistološka analiza i imunohistokemija.....	28
6.2. Mikroskopiranje.....	29
6.3. Statističke metode.....	29
6.3.1. Određivanje potrebne veličine uzorka (broja bolesnika).....	29
7. REZULTATI.....	32
7.1. Opći i klinički podaci bolesnika.....	32
7.2. Wnt-4 ekspresija.....	37
7.4. Provjera ciljeva istraživanja.....	42
7.4.1. Provjera prvog cilja istraživanja.....	42
7.4.3. Provjera trećeg cilja istraživanja.....	58
8. RASPRAVA.....	62
8.1. Uvod u raspravu.....	62
8.2. Tijek rasprave i komentar.....	63
9. ZAKLJUČCI.....	68

10. SAŽETAK.....	69
11. SUMMARY.....	70
12. LITERATURA.....	73
13. ŽIVOTOPIS	85

POPIS KRATICA

AJCC - engl. *The American Joint Committee on Cancer*

APC - *Adenomatous polyposis coli*, *APC gen*, *Apc protein*

BHD - *Birt-Hogg-Dubé syndrome*

BIS - Bolnički informatički sustav

CRP - C reaktivni protein

CT - Kompjuterizirana tomografija

GSK -3 - Glikogen sintetaza kinaza-3 enzim

HE - Hemalaun-eozin

HLRCC – Nasljedna leiomiomatoza i karcinom bubrega (engl. *Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer*)

HPRC - Nasljedni papilarni karcinom bubrega (engl. *Hereditary papillary renal carcinoma*)

KBC - Klinički bolnički centar

VHL - Von Hippel-Lindau bolest

KKS - Kompletna krvna slika

LDH - Laktat dehidrogenaza

LVI - limfovaskularna invazija

LSD - engl. *Least Significant Difference*

MSCT - Višeslojna kompjuterizirana tomografija (engl. *Multislice computed tomography*)

MR - Magnetska rezonanca

PET-CT - Pozitronska emisijska tomografija s kompjutoriziranom tomografijom

PHD - Patohistološka dijagnoza

RTG - Rendgenska snimka

RMSSE – engl. *Root mean squared scaled error*

SE - Sedimentacija eritrocita

SSKB - Svjetlostanični karcinom bubrega

TNM, (pTNM) - T - opis primarnog tumora, N - stanje regionalnih limfnih čvorova, N - prisutnost udaljenih metastaza, (patološki TNM)

UZV - Ultrazvuk

VEGF - Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VHL - Von Hippel-Lindau bolest

Wnt - engl. *Wingless - related integration site*

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Ultrazvučni prikaz novotvorine gornjeg pola desnog bubrega	9
Slika 1.2. CT prikaz karcinoma lijevog bubrega	11
Slika 1.3. CT prikaz multiplih metastaza karcinoma bubrega u jetri.....	11
Slika 1.4. MR abdomena s vidljivom novotvorinom gornjeg pola desnog bubrega u T2 fazi	12
Slika 1.5. Kirurški odstranjen bubreg s okolnim masnim tkivom	16
Slika 1.6. Fuhrman nuklearni gradus svjetlostaničnog karcinoma bubrega	18
Slika 7.1. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u zdravom tkivu bubrega	38
Slika 7.2. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u zdravom tkivu +++, izražen pozitivitet	39
Slika 7.3. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u karcinomu +, slab pozitivitet	39
Slika 7.4. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u karcinomu -, nema pozitiviteta	40
Slika 7.5. Wnt-4 ++ u stanicama karcinoma bubrega, umjereni intenzitet	40
Slika 7.6. Wnt-4 +++ ekspresija u karcinomu bubrega, difuzna izražena pozitivna reakcija u tumorskim stanicama	41
Slika 7.7. Wnt-4 +++ ekspresija u karcinomu bubrega, difuzna izražena pozitivna reakcija u tumorskim stanicama	41
Slika 7.8. Razlika između ekspresije Wnt-4 u zdravom tkivu i svjetlostaničnom karcinomu	43
Slika 7.9 Analiza varijance za tumor grade u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	44
Slika 7.10. Analiza varijance za MSCT najveći promjer tumora (cm) u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	46
Slika 7.11. Analiza varijance za veličinu tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	48

Slika 7.12. Analiza varijance za sarkomatoidnu komponentu u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	49
Slika 7.13. Analiza varijance za nekrozu u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	51
Slika 7.14. Analiza varijance za LVI u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	52
Slika 7.15. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na metastaze	54
Slika 7.16. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM skupine T1 i T3	55
Slika 7.17. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM podskupine T1a+T1b i T3a+T3b	56
Slika 7.18. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na Fuhrmanov gradus	57
Slika 7.19. Preživljavanje bolesnika u odnosu na ekspresiju Wnt-4	59
Slika 7.20. Preživljavanje bolesnika u odnosu na TNM skupine T1 i T3	60
Slika 7.21. Preživljavanje bolesnika u odnosu na Fuhrmanov gradus.....	60

POPIS TABLICA

Tablica 1.1. Fuhrman gradus karcinoma bubrega	17
Tablica 1.2. TNM klasifikacijski sustav karcinoma bubrega (7. AJCC izdanje).....	20
Tablica 1.3. Stadiji bolesti na osnovu TNM (7. AJCC izdanje).....	21
Tablica 6.1. Određivanje veličine uzorka kod primjene analize varijance i t-testa	30
Tablica 7.1. Osnovni statistički procjenjivači numeričkih parametara.....	32
Tablica 7.2. Apsolutna i relativna učestalost pojedinih kategorija opisnih parametara.....	33
Tablica 7.3. Statistička razlika između proteinske ekspresije Wnt-4 u normalnom tkivu bubrega (Wnt-4 N) i svjetlostaničnom karcinomu bubrega (Wnt-4 T) testirana t-testom za nezavisne uzorke	42
Tablica 7.4. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje gradusa tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	44
Tablica 7.5. Statistička razlika između vrijednosti gradusa tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	45
Tablica 7.6. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje najvećeg promjera tumora na CT u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	46
Tablica 7.7. Statistička razlika između vrijednosti najvećeg promjera tumora na CT u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	47
Tablica 7.8. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje veličine tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	47
Tablica 7.9. Statistička razlika između vrijednosti veličine tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4	48

Tablica 7.10. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje sarkomatoidne komponente u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	49
Tablica 7.11. Statistička razlika između vrijednosti sarkomatoidne komponente u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	50
Tablica 7.12. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje nekroze u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	50
Tablica 7.13. Statistička razlika između vrijednosti nekroze u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	51
Tablica 7.14. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje LVI u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	52
Tablica 7.15. Statistička razlika između vrijednosti LVI u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.....	53
Tablica 7.16. Proteinska ekspresiju Wnt-4 u odnosu na bolesnike bez i sa metastazama	53
Tablica 7.17. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM skupine T1 i T3	54
Tablica 7.18. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM podskupine T1a+T1b i T3a+T3b	55
Tablica 7.19. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na Fuhrmanov gradus	56
Tablica 7.20. Preživjeli i umrli bolesnici u odnosu na ekspresiju Wnt-4	58
Tablica 7.21. Preživljavanje u mjesecima bolesnika prema ekspresiji Wnt-4.....	59
Tablica 7.22. Preživljavanje bolesnika prema TNM skupinama	60
Tablica 7.23. Preživljavanje bolesnika u odnosu na Fuhrmanov gradus.....	60

1. UVOD

1.1. Anatomija i fiziologija

Bubrezi su parni organi, ovalnog izgleda, smješteni u retroperitoneumu. S prednje strane omeđeni su trbušnom šupljinom, a sa stražnje paravertebralnom muskulaturom. Leže na velikom slabinskom mišiću (*lat. musculus psoas major*) tako da je uzdužna os bubrega kosa s gornjim polom orijentiranim prema medijalno u odnosu na donji. Desni bubreg je obično nižeg položaja, jer je potisnut jetrom i zauzima prostor između vrha prvog lumbalnog kralješka do trećeg lumbalnog kralješka, a lijevi zauzima prostor između dvanaestog torakalnog i trećeg lumbalnog kralješka. Pozicija bubrega varira ovisno o disanju, položaju tijela i eventualnom postojanju anatomskih anomalija. Uzdužni promjer bubrega je od 10 - 12 centimetara, a poprečni od 5 - 7,5 centimetara. Bubreg odraslog muškarca teži od 125 - 170 grama, a bubreg odrasle žene je lakši za 10 - 15 grama (1, 2).

Osnovna funkcionalna jedinica bubrega naziva se nefron i u jednom bubrega ima od 250 000 do 2 milijuna nefrona. Dijelovi nefrona su bubrežno tjelešće, proksimalni zavijeni kanalić, tanki i debeli krak Henleove petlje i distalni zavijeni kanalić. Nefron filtrira krv, izlučuje otpadne tvari, reapsorbira vodu i otopljene tvari, a ima i određenu endokrinu funkciju (3, 4, 5).

1.2. Embriologija bubrega

Organogeneza bubrega započinje u trećem tjednu fetalnog razvoja. Bubreg se razvija kroz tri faze iz intermedijarnog mezoderma. Razvoj bubrega zapravo započinje spajanjem tkiva ureteralnog pupoljka i metanefrogenog mezenhima te nakon toga nizom međusobnih interakcija koje dovode do razvoja i maturacije u normalno tkivo bubrega, odnosno nefron.

Predbubreg (*lat. Pronefros*) se razvija u cervikalnoj regiji krajem trećeg tjedna gestacije, a sastoji se od glomusa, tubula i kanalića. Glomus nije fizički u vezi s tubulima, otvara se u celomsku šupljinu i filtrira krv. Tubuli se također otvaraju u celomsku šupljinu i sakupljaju filtrat. *Pronefros* ne funkcionira kao ekskrecijski organ. Kako se pronefrički vod spušta prema kaudalno, glomus i tubuli regrediraju, a kaudalni dio pronefričkog voda ostaje i postaje mezonefrički vod (primarni mokraćovod). Prabubreg (*lat. Mesonefros*) ili Wolfovo tijelo predstavlja drugu fazu bubrežnog razvoja. Razvija se sredinom 4. tjedna gestacije, nastaje kaudalnije od pronefrosa, a sadrži 20 - 40

nefrona, koji se sastoje od glomerula vezanih na tubule, s proksimalnim i distalnim segmentom od kojih su neki direktno u vezi sa primarnim mokraćovodom koji postaje odvodni kanal prabubrega ili Wolfov kanal. Nakon 6. tjedna gestacije najvećim dijelom atrofira, a ostaju samo dijelovi od kojeg se u muškaraca razvijaju ductuli efferentes i paradidymis, a kod žena epoophoron i paraoophoron. Kasnije kod muškaraca Wolfov kanal ostaje, dok kod žena atrofira. Definitivni bubreg (lat. *Metanefros*) razvija se interakcijom mokraćovodnog pupoljka i mezenhima kaudalnog intermedijarnog mezoderma, koji se zove metanefrički mezoderm ili blastem. Metanefrički mezoderm inducira mokraćovodni pupoljak koji se izdiže, grana i tvori nakapnicu i čašice. Pod utjecajem mokraćovodnog pupoljka metanefrički mezenhim se diferencira u glomerule, proksimalne i distalne kanaliće i Henleovu petlju. Nakon 8. tjedana gestacije nefroni i sabirni sustav se razvijaju paralelno. Prvi nefroni nastaju u jukstamedularnoj zoni, a zadnji u vanjskom dijelu kore bubrega. Nakon rođenja metanefrogeno tkivo nestaje, a time i mogućnost stvaranja novih nefrona. Iako fetalni bubreg nema važnosti kao ekskrecijski organ on počinje funkcionirati, već u drugoj polovici fetalnog života (6, 7).

1.3. Wnt (engl. Wingless-related integration site) proteini

Spajanjem tkiva ureteralnog pupoljka i metanefrogenog mezenhima te nakon toga nizom međusobnih interakcija dolazi do razvoja i maturacije te nastanka normalnog tkiva bubrega, odnosno nefron. Veliki broj različitih molekula je uključen u ovaj složeni proces, od koštanih morfo-genetskih proteina, do različitih faktora rasta.

Wnt proteini su skupina glikoproteina bogatih cisteinom koji kao ligandi stimuliraju receptore i vrlo su važni za normalni razvoj, ali i funkciju organizma te su uključeni u brojne biološke procese, od razvoja i određivanja stanične sudbine, odnosno njezinog ponašanja, do organogeneze, ali i za nastanak i razvoj različitih bolesti uključujući maligne te se smatraju jednim od najstarijih signalnih molekula u životinjskom svijetu (8). Njihov signal, odnosno kanonski put β -katenina je visoko očuvan u brojnim vrstama i smatra se najvažnijim mehanizmom za prijenos informacija putem Wnt proteina, dok se nekanonski, β -katenin neovisni put koji uključuje kalcij/kalmodulin-ovisnu kinazu II i protein kinazu C, ali i fosfolipaze C kao i fosfodiesteraze smatra važnim za nastanak i razvoj tumora, ali i za različite upalne i neurodegenerativne procese, odnosno bolesti (9). Međutim, isto tako je pokazano da nekanonski put ima važnu ulogu u razvoju određenih organskih sustava i da je uloga kanonskog i nekanonskog puta međusobno povezana, ovisna i kompleksna (10).

Originalno su otkriveni i opisani u Vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) gdje su važni između ostalog i za normalno pozicioniranje stanica te razvoj krila (11). Brojne životinjske vrste imaju WNT gene, ali oni nisu nađeni u jednostaničnim organizmima, ukazujući na njihovu važnu ulogu za nastanak i razvoj višestaničnih organizama (12).

Do sada je opisano 19 WNT gena, a dio su visoko očuvanog razvojnog puta koji ima više različitih uloga u nastanku različitih organskih sustava uključivo bubrega i ženskog spolnog sustava (13, 14). Wnt proteini se vežu na engl. *Frizzled* proteine i dovode do njihove aktivacije, odnosno njihovom aktivacijom se nastavlja niz preko engl. *Dishevelled* proteina koji inhibiraju enzim glikogen sintetaza kinazu-3 (GSK-3). U nedostatku Wnt proteina GSK-3 fosforilira nekoliko važnih proteina, među njima i β -katenin, što ih obilježava za destrukciju, odnosno njihovo uništenje (15). β -katenin je važan proliferacijski protein, koji može postojati u nekoliko oblika u stanici, naime može biti vezan za citoplazmatsku domenu međustaničnih adhezijskih molekula kao što je E-kadherin, slobodan u citoplazmi, odnosno može biti prisutan u jezgri. Vrlo brzo nakon njegove sinteze u citoplazmi β -katenin se spaja s Apc (engl. *the adenomatous polyposis coli*) proteinom i aksinom koji pomažu njegove vezanje za GSK-3 i daljnju ubikvitinaciju, odnosno brzo uništavanje putem ubikvitina i proteasoma, što predstavlja glavni mehanizam selektivne razgradnje proteina. Međutim, kada je aktivnost GSK-3 inhibirana, β -katenin, umjesto da bude uništen, disocira od kompleksa s Apc proteinom te se njegovo poluvrijeme života poveća više puta, a on se nakuplja se u stanici, odnosno ulazi u jezgru, što dovodi do aktivacije različitih molekula, odnosno gena u jezgri uključujući i gene za rast i dijeljenje stanice (16).

Kada se promatra cijeli Wnt put, radi se zapravo o vrlo složenom mehanizmu čiji je opis u većini literature pojednostavljen, ali i različit, između ostalog, jer ga različite stanice koriste na različite načine, a on može imati više od jedne funkcije u stanici. Isto tako brojne druge molekule koje su direktno ili indirektno uključene u ovaj put imaju različite funkcije. Već ranije spomenuti GSK-3 fosforilira i druge proteine koji su važni za rast i razvoj stanice, ali je važan i za regulaciju metabolizma glikogena, a β -katenin ima ulogu i kao dio staničnog adhezijskog mehanizma povezujući E-kadherin sa staničnim citoskeletom, dok Apc protein ima važnu ulogu kao supresor tumora. Naime, pokazano je da transformacija normalnih stanica kolona u karcinomske nastaje kada je APC gen mutiran i ne može više spriječiti translokaciju β -katenina u jezgru. Pored karcinoma kolona slične promjene, odnosno povišenje razine Wnt protein, ali i β -katenina zbog

poremećaja njegove razgradnje i posljedično povišena koncentracija u jezgri su nađene i kod drugih karcinoma kao što su karcinom prostate, endometrija, ovarija, ali i kod melanom i karcinoma dojke. Potvrđena je i važna uloga Wnt puta u matičnim stanicama od embrionalnih, mezenhimalnih i crijevnih, preko hematopoetskih do folikula dlake gdje ima nekoliko važnih funkcija uključivo samo obnovljivost stanica, ali i njihovu diferencijaciju i proliferaciju (17 - 19).

WNT geni kodiraju veliki broj sekretornih proteina od kojih su najvažniji Wnt-1, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-6, Wnt-7a i Wnt7-b. Wnt-1 je otkriven prije više od 40 godina kao proto-onkogen uključen u razvoj karcinoma dojke u miševa (20).

Wnt-5a je važan za polarnost stanica odnosno za njezino gibanje što omogućava nastanak tkiva i organa tijekom embrionalnog razvoja, naime pokazani su brojni poremećaji u polarizaciji stanica u Wnt-5a engl. „*knockout*“ miševa (21). Wnt-5a ekspresija je povećana u većini tumora i povezana je s prognozom karcinoma, ali i s imunologijom tumora te bi se mogao smatrati i biomarker Wnt-6, odnosno Wnt-6 je morfogenetski faktor važan za normalnu trudnoću kod miševa, a kod ljudi ima važnu ulogu u razvoju bubrega (formiranju tubula) i zubi, adipogenezi, ali i u nekim bolestima kao što su infarkt miokarda, dijabetička nefropatija te u upalnim procesima kao kod infekcije *Mycobacterium tuberculosis*, dok je za Wnt-7 pokazano da ima važnu ulogu u embrionalnoj angiogenezi odnosno formiranju barijere krv-mozak (22 - 24).

Fluorescentna in situ hibridizacije mapirala je WNT4 gene na kromosomu 1p35 (25).

Wnt-4 protein (oznake UniProtKB-P56705 (WNT4_HUMAN)), odnosno glikoprotein, koji spada u skupinu signalnih proteina koji su važni za normalni razvoj urogenitalnog sustava (26). Stark je sa suradnicima istraživao ekspresiju 12 WNT gena kod miševa i našao visoku ekspresiju Wnt-4 u bubrežnom mezenhimu od jedanaestog dana oplodnje te da je epitelna transformacija metanefrogenog mezenhima u bubregu koji se razvija pod kontrolom Wnt-4 proteina (27).

Wnt proteini nužni su za okupljanje stanica u skupine kod kojih će onda doći do potpune epitelijalne diferencijacije, odnosno do formiranja nefrona (28). Također je pokazano, da kod Wnt-4 *-/-* miševa („*knockout*“) ne dolazi do ovakve promjene te samim time izostaje normalni razvoj bubrega (29).

Iako sam mehanizam djelovanje Wnt-4 nije do kraja razjašnjen, smatra se da on djeluje na autokrinom principu, potičući svoju ekspresiju te nakon što je postignuta dovoljno visoka razina,

odnosno nakon što je koncentracija stanica dovoljno velika, postižu se uvjeti za normalno formiranje nefrona. Dodatni dokaz o važnoj ulozi Wnt proteina u razvoju normalnog bubrega, odnosno nefrona dolazi iz studija koje su pokazale da litij dovodi do aktivacije Wnt puta i mezenhimno-epitelne tranzicije, odnosno formiranja nefrona (30).

WNT-4 gen se smatra i genom spolne determinacije, jer je Wnt-4 protein važan za razvoj ženskog spola između ostalog potičući razvoj oocita, odnosno prevenirajući nastanka testisa te da je ovaj proces ovisan o dozi, odnosno količini Wnt proteina (31). Smatra se također da WNT-4 ima važnu ulogu u održavanju ženskog fenotipa kontrolom ovarijalne steroidogeneze (32).

Wnt signalni put, odnosno Wnt-4 imaju važnu ulogu u razvoju dojke, odnosno u njezinoj funkciji tijekom trudnoće, uz pomoć, odnosno posredovanje progesterona (33).

Pored toga što je Wnt-4 potreban za normalan razvoj bubrega i spolnih organa, promjena Wnt-4, odnosno Wnt proteina je pokazana i kod različitih bolesti, uključivo i različite tumorske bolesti. Huguet i suradnici su istraživali ekspresiju Wnt-4 u staničnim linijama, odnosno u normalnom, benignom i karcinomskom tkivu dojke i našli razliku u ekspresiji u normalnom i malignom tkivu zaključujući da je Wnt-4 ekspresija povezana s abnormalnom proliferacijom tkiva dojke (34). Nađena je značajna promjena Wnt proteina kod bolesnika s različitim vrstama leukemija, ali je isto tako pokazana i njihova važna uloga kod normalne hematopoeze (35). Pokazana je također i važna uloga Wnt proteina preko beta-katenina u tumorima nadbubrežne žlijezde (36).

Abnormalna ekspresija Wnt proteina je nađena kod karcinoma bubrega, hepatocelularnog karcinoma, karcinoma štitnjače te pločastih karcinoma glave i vrata (37).

Također je na životinjskim kulturama bubrežnih stanica pokazano da upotreba karcinogena kao što je Arsen može dovesti do značajnih promjena nekoliko molekula koje su važne za normalni razvoj bubrega, pa tako i promjena Wnt-4 te samim time inducirati karcinomski fenotip stanica (38).

Sve ovo ukazuje na važnu ulogu Wnt-4 ne samo u razvoju normalnog bubrega, homeostazi različitih organa, odnosno organskih sustava nego i na njegove promjene u različitim tumorima, pa tako moguće i kod svjetlostaničnog karcinoma bubrega.

1.4. Karcinom bubrega

1.4.1. Incidencija, etiologija i prevencija

Karcinom bubrega čini oko 2 - 3 % karcinoma i jedna je od najčešćih uroloških malignih bolesti, s više od 330 000 novo dijagnosticiranih slučajeva godišnje, najviše u Europi, Sjevernoj Americi, Australiji i Japanu (39).

Procjenjuje se da u Europskoj Uniji godišnje od karcinoma bubrega oboli oko 85 000, a umre oko 35 000 bolesnika (40).

U Republici Hrvatskoj je 2017. godine bilo 830 novootkrivenih karcinoma bubrega, a u odnosu na neke druge europske zemlje kod nas je mortalitet i dalje u uzlaznom trendu (41).

Karcinom bubrega se nešto češće javlja u muškaraca u odnosu na žene (odnos 2 : 1), najčešće u šestom i sedmom desetljeću života (42).

Etiologija karcinoma bubrega je vjerojatno posredovana brojnim faktorima u složenoj interakciji između organizma i okoliša. Od različitih faktora rizika koji se povezuju s karcinomom bubrega najvažnijim se smatraju pušenje i prekomjerna tjelesna težina (43). U dimu cigarete nalazi se nekoliko tisuća kemijskih komponenti od kojih su više od 60 dokazani karcinogeni (44). Velika većina njih se nakon metaboliziranja u jetri, koncentrira i izlučuje putem bubrega i samim time povećava vjerojatnost nastanka malignih oboljenja ne samo bubrega, nego i mokraćnog sustava u cjelini. Smatra se da bi i neki drugi faktori kao što su povišeni tlak, ali i rad u određenim granama kemijske industrije, odnosno s određenim tvarima kao što je azbest mogli imati važnu ulogu u nastanku karcinoma bubrega (45, 46). Također je pokazano da prekomjerna tjelesna težina, ali i upotreba hormona, posebice estrogena može povećati rizik nastanka karcinoma bubrega, a od nedavno se i šećerna bolest može smatrati faktorom rizika za nastanak ove bolesti (47).

Kao i za većinu ostalih karcinoma i kod karcinoma bubrega postoji povećana vjerojatnost nastanak i razvoja unutar obitelji te se smatra da ova forma čini oko 2 - 3 % slučajeva karcinoma bubrega (48).

1.4.2. Rizični čimbenici

- Pušenje
- Zlouporaba i dugotrajno korištenje analgetika
- Prekomjerna tjelesna težina
- Pozitivna obiteljska anamneza
- Hipertenzija (49)
- Određena genetska oboljenja von *Hippel-Lindau* bolest (VHL), *Hereditary leiomyomatosis, renal cell cancer* (HLRCC), *Birt-Hogg-Dubé syndrome* (BHD)
- Nasljedni papilarni karcinom bubrega (HPRC (npr. von Hippel-Lindau))
- Nasljedni čimbenici npr. papilarni karcinom bubrega s multiplim bilateralnim papilarnim karcinomima bubrega koji uglavnom nastaju u drugom desetljeću života i imaju lošu prognozu.

Nisu poznate specifične mjere koje bi prevenirale nastanak karcinoma, mada je pokazano da umjerena konzumacija alkohola i fizička aktivnost smanjuju rizik od nastanka ove bolesti (50). Postoje općenite preventivne aktivnosti za smanjenje vjerojatnosti nastanak malignih bolesti, pa samim time i karcinoma bubrega kao što su izbjegavanje izloženosti rizičnim čimbenicima te zdrava prehrana i redovita tjelesna aktivnost. Sekundarna prevencija predstavlja rano otkrivanje i liječenje karcinoma bubrega, a tercijarna se odnosi na postupke oporavka koji poboljšavaju kvalitetu života kod bolesnika s karcinomom bubrega (51).

1.4.3. Klinička slika, pregled i obrada bolesnika

Danas se većina tumorskih tvorbi u bubrezima otkriva slučajno. Naime, zbog široke dostupnosti, odnosno upotrebe različitih slikovnih metoda u prvom redu ultrazvuka (UZV), ali i kompjuterizirane tomografije (CT) veliki broj karcinoma bubrega se otkriva u ranom stadiju kad bolesnici nemaju tegobe koje bi se mogle povezati s ovom bolesti (52). Samim time klinički pregled bolesnika, iako važan, ima ograničenu vrijednost. Naime, moguće je napipati tumorsku tvorbu u abdomenu, ali tumor mora biti velik, a bolesnik konstitucionalno pogodan, što često nije slučaj. Od ostalih znakova uznapredovalog karcinoma bubrega, mogu se napipati povećani limfni čvorovi na vratu, odnosno ustanoviti edemi donjih ekstremiteta koji mogu upućivati na zahvaćenost vene tumorom (53). Ove promjene često zahtijevaju dodatnu dijagnostičku, odnosno radiološku obradu.

Klasični trijas simptoma koji uključuje bolove lumbalno, makrohematuriju i palpabilnu masu u trbuhu danas je rijedak (6 – 10 %) i uglavnom pozitivno korelira s agresivnim histološkim oblikom, odnosno s uznapredovalom fazom bolesti (54).

Isto tako paraneoplastični sindrom je nešto što se rijetko viđa te je uglavnom prisutan kod bolesnika koji imaju simptomatski karcinom bubrega (55).

Ukoliko postoje metastaze bolesnik se može žaliti na bolove u kostima, dugotrajan suhi kašalj, ali imati i neurološke tegobe (56).

Bolesnicima je potrebno napraviti niz laboratorijskih nalaza s ciljem dobivanja uvida u stanje bubrega i organizma u cjelini, ali i u sklopu pripreme za biopsiju, odnosno operaciju. Među najvažnijim su: kompletna krvna slika (KKS), sedimentacija eritrocita (SE), jetreni enzimi, alkalna fosfataza, laktatdehidrogenaza (LDH), serumska koncentracija kalcija, koagulogram, analiza sedimenta urina te citologija urina kod sumnje na postojanje karcinoma prijelaznog epitela (57).

1.4.4. Dijagnostika

Slikovne metode pokazuju veličinu i proširenost primarnog tumorskog procesa, status regionalnih limfnih čvorova i nadbubrežne žlijezde, zahvaćenost venskog sustava tumorskim procesom, prisutnost metastaza, status drugih organa, ali i funkciju i morfoloiju drugog bubrega. Za prikaz tumora bubrega, odnosno za procjenu stadija bolesti koriste se rendgenska snimka (RTG) srca i pluća, ultrazvuk (UZV) abdomena, kompjuterizirana tomografija (CT) abdomena i zdjelice, odnosno CT toraksa, CT angiografija (ukoliko je potrebno dobiti dodatne informacije o statusu krvnih žila), magnetska rezonanca (MR) abdomena, scintigrafija kostiju i pozitronska emisijska tomografija s kompjuteriziranom tomografijom (PET-CT) (58).

Ultrazvuk

Ultrazvuk je obično prva metoda za prikaz promjena na bubrezima koja ima nekoliko prednosti. Naime, radi se o široko dostupnoj, brznoj, relativno jednostavnoj i jeftinoj metodi koja ne zahtijeva nikakvu posebnu pripremu bolesnika te ga ne izlaže ionizirajućem zračenju. Bolesnika se najčešće pregledava u konvencionalnom B-modu sondom od 3 - 6 MHz (Slika 1.1.). Ultrazvuk se smatra za najbolju metodu probira asimptomatskih bolesnika, on može također dobro razlikovati cistične od solidnih lezija.

Široka upotreba UZV značajno je povećala stopu otkrivanja karcinoma bubrega, naime do 83 % asimptomatskih karcinoma bubrega je otkriveno na ovaj način (59). Međutim oko 30 % tumora otkrivenih UZV je ≤ 3 cm te je za njihovo precizno otkrivanje CT bolje metoda.

CT prikazuje 75 % tumora veličine od 1 - 1,5 cm, a UZV samo 28 %, kod većih tumora od 1,5 - 2 cm, CT otkriva 100 %, a UZV 58 % promjena, dok je za promjene veličine od 2,5 - 3 cm postotak detekcije podjednak i iznosi gotovo 100 % (60).

Do 77 % karcinoma bubrega koji su ≤ 3 cm se prikazuju kao hiperehogeni, dok je ostatak izoehogen ili hipoehogen u odnosu na normalno tkivo bubrega (61).

Nove varijante UZV kao što je kontrastni UZV gdje se koriste mikromjehurići plina koji može prikazati mikrocirkulaciju i samim time s visokom osjetljivošću i specifičnošću prikazati bubrežne mase vjerojatno će imati važnu ulogu u budućnosti (62).

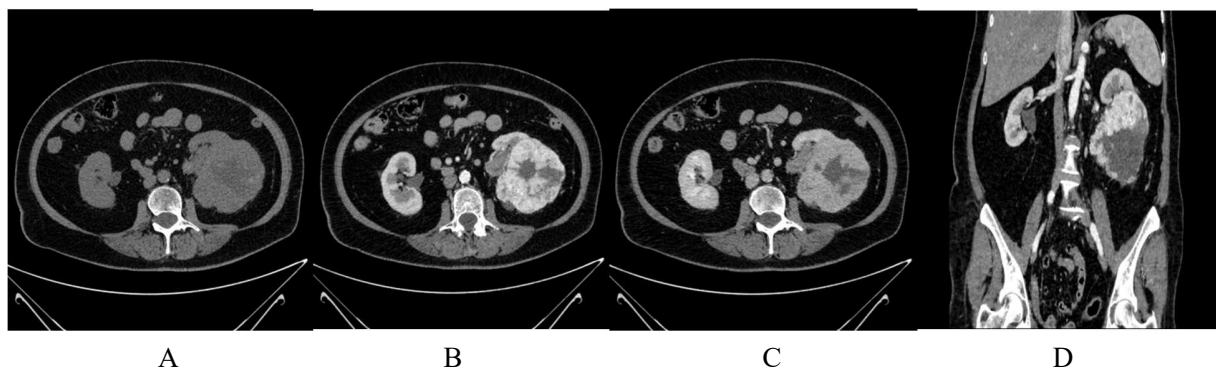


Slika 1.1. Ultrazvučni prikaz novotvorine gornjeg pola desnog bubrega. Izvor: Zavod za urologiju KBC Osijek

Kompjuterizirana tomografija

CT urografija, odnosno CT abdomena i zdjelice se smatra za najvažniju metodu prikaza patologije na bubregu uključujući i karcinom bubrega, odnosno predstavlja zlatni standard za otkrivanje bubrežni tumora. Važno je da se snimanje izvodi po slojevima od 0,3 centimetra, uz upotrebu

intravenskog kontrasta te u tri faze snimanja, nativnoj, arterijskoj i venskoj fazi, mada je moguće i alternativno snimanje u dvije faze da bi se smanjilo zračenje (Slika 1.2.). Prije CT-a potrebno je odrediti serumsku koncentraciju kreatinina koja treba biti u granicama normale. Povećanje Hounsfieldovih jedinica za 15 se smatra značajnim za karcinom bubrega, ali i brzo ispiranje kontrasta uzrokovano njegovom hipervaskularizacijom te izražena heterogenost zbog prisutnosti nekroze, krvarenja i cističnih dijelova (63). Pored prikaza primarnog tumora, odnosno njegovih dimenzija, prikazuje se i odnos tumora prema krvnim žilama i kanalnom sustavu bubrega, ali i odnos tumora prema okolnom tkivu i okolnim strukturama. Posebno je važno da se opiše izgled i broj arterije, jer iako većina bolesnika ima jednu renalnu arteriju, postoje bolesnici koji imaju dvije, tri pa i više njih, a to je potrebno znati zbog planiranja operativnog zahvata (64). Isto tako je važno opisati nalaz na veni, eventualno zahvaćanje, odnosno prisutnost tumorskog tromba, kao i status limfnih čvorova i nadbubrežne žlijezde. CT-om se također dobivaju podaci stanju drugog bubrega kao i prisutnost metastaza (Slika 1.3.), što je sve vrlo bitno za daljnje liječenje i praćenje bolesnika. Danas se za preciznije određivanje stadija preporuča uz prikaz abdomena i zdjelice napraviti i snimku toraksa, osim kod bolesnika koji imaju klinički T1a stadij bolesti, odnosno malu vjerojatnost metastaza (65).



Slika 1.2. CT prikaz karcinoma lijevog bubrega. A - nativni prikaz u transverzalnom presjeku , B - arterijska kontrastna faza u transverzalnom presjeku , C - venska kontrastna faza u transverzalnom presjeku, D - arterijska kontrastna faza u koronarnom presjeku. Izvor: BIS KBC Osijek



Slika 1.3. CT prikaz multiplih metastaza karcinoma bubrega u jetri. Izvor: BIS KBC Osijek

Magnetska rezonanca (MR)

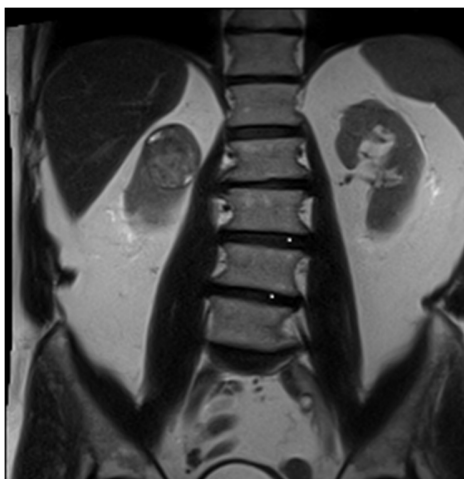
Magnetska rezonanca abdomena (Slika 1.4.) nije našla široku primjenu u prikazu promjena na bubregu, odnosno karcinomu bubrega zbog nekoliko razloga. Naime, MR je skuplja metoda u odnosu na CT, zahtijeva više vremena za izvođenje te je manje dostupna i ne može se koristiti kod bolesnika koji imaju metalne implantate. Kontrastno sredstvo koje je na bazi gadolinija može kod malog broja bolesnika i to uglavnom onih koji imaju uznapredovalu akutnu ili kroničnu bubrežnu bolest, oštetiti tkivo bubrega, ali i uzrokovati fibrozne promjene u organizmu u cjelini te bolesnika izložiti značajnom morbiditetu i mortalitetu (66).

MR ima i određene prednosti u odnosu na CT u prvom redu izbjegavanje ionizirajućeg zračenja što nije nebitno pogotovo ukoliko se radi o mlađim bolesnicima, odnosno bolesnicima koji su već liječeni od bolesti koje su zahtijevale terapiju zračenjem ili učestale CT pretrage zbog liječenja i praćenja, odnosno koji su alergični na jodna kontrastna sredstva. Isto tako se smatra metodom izbora kod trudnica te najboljom metodom za prikaz granice tumorskog tromba u veni kavi, mada danas novi CT uređaji mogu isto tako vrlo dobro prikazati tumorski tromb i njegov odnos prema okolini.

Uloga MR mogla bi biti važnija od CT za dijagnostiku kompleksnih bubrežnih cista, naime MR je pokazala senzitivnost od 71 % i specifičnost od 91 % u odnosu na CT (36 % i 76 %) (67). MR s gadolinijem je osjetljivija nego kontrastni CT za otkrivanje tumora ≤ 2 cm (68).

Koje je mjesto novih metoda, baziranih na magnetskoj rezonanci kao što su difuzijski mjerene snimke pokazati će daljnja istraživanja.

Na slikovnom prikazu MR abdomena (Slika 1.3.) vidi se u području gornjem pola desnog bubrega dijelom egzofitična kuglasta žarišna promjena, inhomogena,, dominantno T2 međuintenziteta signala, umjerene celularnosti , umjereno do izraženo vaskularizirana s vidljivom pseudokapsulom koja je oštro ograničena.



Slika 1.4. MR abdomena s vidljivom novotvorinom gornjeg pola desnog bubrega u T2 fazi.

Izvor: BIS KBC Osijek

Scintigrafija kostiju

Scintigrafija kostiju u načelu se savjetuje za bolesnike koji imaju bolove u kostima, odnosno koji imaju povišenu razinu serumske alkalne fosfataze (69). Ona se radi u ≤ 5 % bolesnika koji idu na operaciju karcinoma bubrega, međutim moguće je da ovakav pristup nije dobar, jer ne uključuje sve potencijalne faktore koje ukazuju na prisustvo metastaza i samim time dovode do toga da se metastaze ne dijagnosticiraju, odnosno ne dijagnosticiraju na vrijeme. Zbog toga se u novije vrijeme savjetuje upotreba prognostičkih modela koji bolje predviđaju vjerojatnost koštanih

metastaza, jer u predviđanje uključuju više parametara kao što su TN status, ali i serumsku razinu trombocita i hemoglobina kao i neke druge parametre (70).

Pozitronska emisijska tomografija s kompjuteriziranom tomografijom

PET-CT s 18F-deoksiglukozom se ne primjenjuje rutinski kao metoda za prikaz karcinoma bubrega zbog svoje slabe senzitivnosti i specifičnosti.

Moguće je da će nove metode koje koriste različita monoklonska protutijela, kao na primjer Girentuximab koji prepoznaje ugljikovu anhidrazu IX, imati veću ulogu u otkrivanju karcinoma bubrega korištenjem PET-CTa (71).

1.4.5. Liječenje karcinoma bubrega

Operativne metode

Kirurško liječenje, odnosno operativni zahvat (radikalna nefrektomija) predstavlja najbolju metodu liječenja lokalizirane bolesti. Zbog ranijeg otkrivanja karcinoma bubrega danas se kod značajnog broja bolesnika koji imaju manji volumen, odnosno stadij bolesti, može napraviti parcijalna (djelomična) nefrektomija, kod koje se odstranjuje tumor, uz čuvanje ostatnog, zdravog tkiva bubrega (72).

Biopsija bubrega

Biopsija bubrega s patohistološkom verifikacijom dolazi u obzir kod malih tumora bubrega koji podliježu aktivnom praćenju i eventualno su kandidati za ablativno liječenje karcinoma ili kod bolesnika s inoperabilnim, odnosno metastatskim stadijem bolesti (73).

Biopsija se dobro podnosi i može se izvoditi pod kontrolom UZV ili CT u lokalnoj ili općoj anesteziji (u načelu ako se planira u istom aktu i izvođenje minimalno invazivnih procedura) ima visoku osjetljivost i specifičnost za dokazivanje malignosti te mali rizik značajnih komplikacija. Za liječenje karcinoma bubrega kao uostalom i za liječenje drugih bolesti postoji čitav niz različitih metoda. Od kirurških koje mogu biti minimalno invazivne kao što su laparoskopija i robotska

kirurgija do vrlo opsežnih i zahtjevnih kao što je otvorena kirurgija s vađenjem tumorskog tromba iz vene kave. Pored kirurškog liječenja postoji i sustavna terapija za liječenje uznapredovale bolesti koja se bazira na kemoterapiji odnosno imunoterapiji, ali i na novim lijekovima čija uloga se tek mora dokazati, odnosno potvrditi. Postoji i posebna skupina postupaka koji se izvode pod kontrolom slikovnih metoda (uglavnom CT) gdje se u karcinom postavljaju različite sonde / probe te se tumor izlaže različitim izvorima /vrstama energije, odnosno smrzavanju s ciljem liječenja bolesti.

Radikalna nefrektomija

Klasična definicija radikalne nefrektomije uključuje odstranjenje bubrega s tumorom, okolnim masnim tkivom, regionalnim limfnim čvorovima i istostranom nadbubrežnom žlijezdom, zapravo sadržaj unutar Gerotove fascije. Međutim, danas se zbog značajnog smanjenja stadija bolesti u prvom redu zbog široke upotrebe slikovnih metoda u većini slučajeva izvodi modificirana radikalna nefrektomija. Naime, ukoliko na CT-u nema promjena u nadbubrežnoj žlijezdi koje bi ukazivale na metastaze karcinoma bubrega, odnosno nema povećanih limfnih čvorova, odstranjivanje nadbubrežne žlijezde i regionalnih limfnih čvorova predstavlja prekomjerno liječenje (engl. *overtreatment*) za veliki broj bolesnika (74, 75). Nadalje, odstranjivanje nadbubrežne žlijezde i limfnih čvorova zahtijeva dodatno vrijeme, odnosno produžuje operativni zahvat te bolesnika izlaže dodatnim rizicima i mogućim komplikacijama, a bez dokazanih prednosti (76). Ukoliko se na CT pokažu suspektne promjene na nadbubrežnoj žlijezdi, odnosno povećani limfni čvorovi, onda se ove strukture odstranjuju, mada je važno napomenuti da se i u ovakvim slučajevima kasnijom patohistološkom analizom u nadbubrežnoj žlijezdi najčešće nađu benigne promjene, a ne metastaze karcinoma bubrega. Isto tako je pokazano da je razlikovanje na CT povećanih hiperplastičnih limfnih čvorova u odnosu na one koji su povećani zbog metastaza jasno ovisno o veličini, često zapravo nemoguće (77).

Radikalna nefrektomija može biti napravljena otvorenim, laparoskopskim, odnosno robotskim pristupom. Otvoreni pristup spada u najstariju metodu liječenja koja se s manjim modifikacijama izvodi čitav niz godina, dok se laparoskopski, odnosno robotski pristup koristi u novije vrijeme. Svaki pristup ima svojih prednosti i nedostataka, ali nove su metode zbog svoje minimalne invazivnosti, manjeg gubitka krvi, manje razine boli nakon operacije, brže mobilizacije bolesnika, ali i kraće hospitalizacija u sve većoj upotrebi i vjerojatno će u budućnosti činiti najzastupljeniju

kiruršku metodu. One zahtijevaju novu tehnologiju koja nije jeftina i traže dodatnu edukaciju ne samo operatera nego cijelog kirurškog tima te u početku traju nešto duže nego otvorene operacije, međutim u konačnici imaju određene prednosti pred otvorenom operacijom i sve se više koriste za operativno liječenje karcinoma bubrega (78).

Parcijalna resekcija bubrega

Parcijalna resekcija bubrega predstavlja metodu gdje se odstranjuje tumor uz čuvanje ostatnog, zdravog tkiva bubrega. Ova metoda se savjetuje kod volumenom manjih tumora bubrega koji su anatomski smješteni tako da se odstranjenje tumora može izvesti na relativno siguran način bez da se ugrozi bolesnika, odnosno da ostane dovoljan dio funkcionalnog tkiva bubrega koji bi opravdao ovakav zahvat. Kod parcijalne resekcije često se dodatno uzima dio tkiva za patohistološku analizu s ciljem postizanja negativnih kirurških rubova. Ova metoda ima nešto veći rizik postoperativnog krvarenja te ozljede kanalnog sustava kao i pozitivnih kirurških rubova u odnosu na radikalnu nefrektomiju, ali i omogućava čuvanje ostatnog zdravog tkiva bubrega te smanjuje rizik gubitka bubrežne funkcije.

1.4.6. Patologija

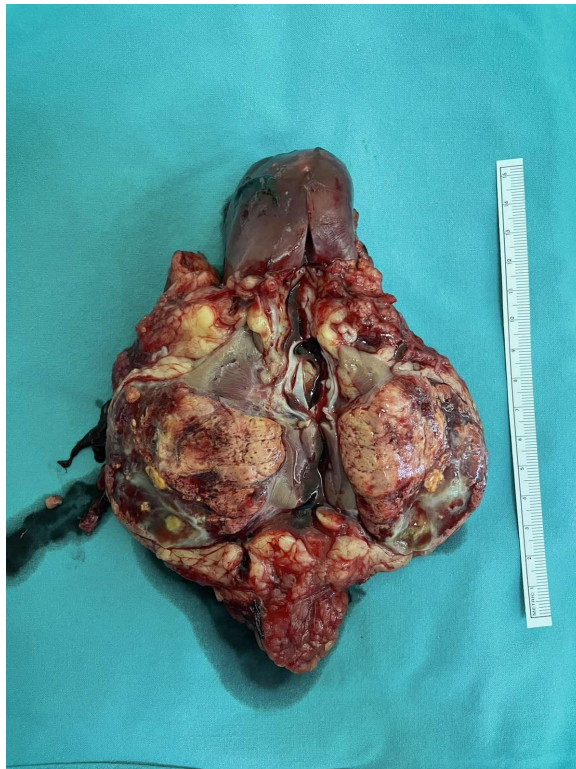
Makroskopski izgled i patohistološka slika

Nakon operativnog liječenja slijedi patohistološka analiza tkiva. Postoji više vrsta karcinoma bubrega. Najčešće bolesnici imaju svjetlostanični karcinom bubrega, a zatim papilarni (tip I i tip II) i kromofobni karcinom bubrega (79).

Zadnja klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije iz 2016. godine se zasniva na predominantnim citoplazmatskim karakteristikama, arhitekturi, anatomskoj lokaciji te povezanosti s drugim bubrežnim bolestima, ali i različitim molekularnim mehanizmima ili obiteljskim sindromima (80). Histološka dijagnoza opisuje histološki tip karcinoma, broj tumorskih žarišta, veličinu i smještaj, prisutnost sarkomatoidnih karakteristika, Fuhrmanov nuklearni gradus (Slika 1. 2. , Tablica 1.), tumorsku nekrozu, mikroskopsku proširenost tumora, kirurške rubove, odnosno njihovu zahvaćenost tumorom, limfovaskularnu invaziju, postojanje, odnosno zahvaćenost limfnih

čvorova u preparatu, a također opisuje i eventualne patohistološke promjene u neneoplastičnom, zdravom dijelu bubrega.

Svjetlostanični karcinom bubrega (SSKB) je najčešća histološka varijanta i čini oko 85 % karcinoma bubrega. U usporedbi s ostalim karcinomima (papilarnim i kromofobnim) SSKB ima najlošiju prognozu, mada se ova razlika smanjuje, odnosno nestaje nakon korekcije za stadij i gradus (81, 82). Makroskopski tumor je na reznoj plohi zlatno žute boje te dobro ograničen prema okolnom tkivu (Slika 1.5.).



Slika 1. 5. Kirurški odstranjen bubreg s okolnim masnim tkivom. U donjem polu se vidi tumor veličine 5 cm. Izvor: Arhiva Zavoda za urologiju KBC Osijek.

Prognostički čimbenici

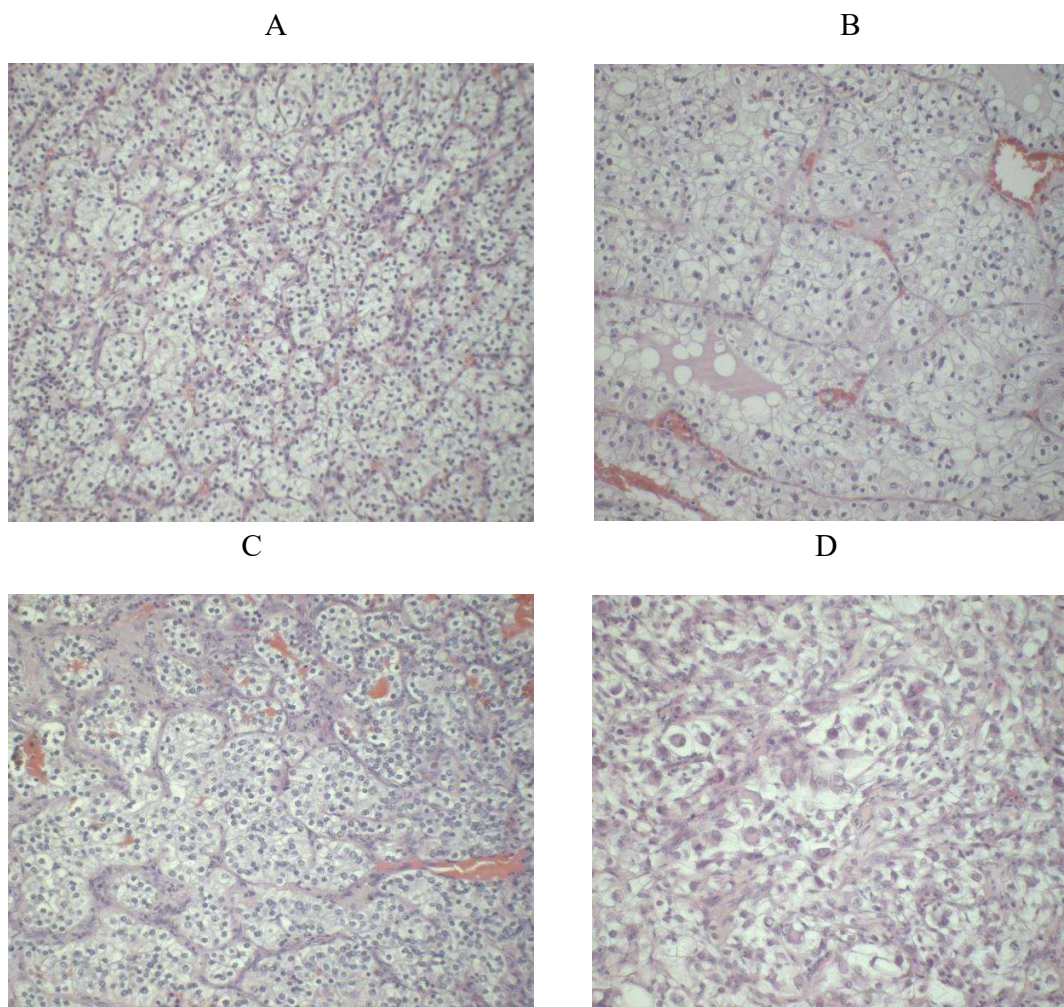
Ovisno o vrsti karcinoma, ali i njegovoj veličini i gradusu, infiltraciji limfovaskularnih prostora, odnosno okolnog tkiva te prisutnosti metastaza u limfnim čvorovima, kao i drugim patohistološkim parametrima, bolesnici imaju različitu prognozu, odnosno različitu vjerojatnost progresije i povrata bolesti. Prognostički čimbenici mogu se podijeliti na kliničke, anatomske, histološke i molekularne.

Anatomske čimbenici su veličina tumora, invazija kapsule, venski prodor, zahvaćenost nadbubrežne žlijezde i lokalnih limfnih čvorova te prisutnost udaljenih metastaza.

U najvažnije histološke čimbenike bitne za prognozu spadaju tip tumora i Fuhrman nuklearni gradus (Tablica 1.1.; Slika 1.6.) i TNM klasifikacija (Tablica 1.2.), prisutnost sarkomatoidnih komponenti i limfovaskularne invazije te tumorska nekroza.

Tablica 1. 1. Konvencionalni Fuhrman nuklearni gradus kod karcinoma bubrega (81)

	Fuhrman nuklearni gradus
Gradus I	Okrugle, jednolike jezgre veličine oko 10 μm . Nukleoli su neprimjetni na povećanju 400x
Gradus II	Nepravilne jezgre veličine oko 15 μm . Nukleoli se uočavaju na povećanju 400x
Gradus III	Izrazito nepravilne jezgre veličine oko 20 μm . Nukleoli istaknuti i vidljivi na povećanju 100x
Gradus IV	Stanice su bizarnog izgleda i lobulirane jezgre



Slika 1. 6. Fuhrman nuklearni gradus svjetlostaničnog karcinoma bubrega. A - gradus I, B - gradus II, C - gradus III, D - gradus IV. Uvećanje 200x, HE. Izvor: Arhiva Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek.

Tablica 1.2. TNM klasifikacijski sustav karcinoma bubrega (7. AJCC izdanje)

Tx		Tumor se ne može odrediti
T0		Nema primarnog tumora
T1		Tumor ograničen na bubreg, veličina < 7 cm
	T1a	Tumor ograničen na bubreg, veličina ≤ 4 cm
	T1b	Tumor ograničen na bubreg, veličina > 4 cm i ≤ 7 cm
T2		Tumor ograničen na bubreg, veličina > 7 cm
	T2a	Tumor ograničen na bubreg, veličina > 7 cm i ≤ 10 cm
	T2b	Tumor ograničen na bubreg, veličina > 10 cm
T3		Tumor zahvaća bubrežnu venu/segmentalne vene ili perinefritično tkivo, ali ne i ipsilateralnu nadbubrežnu žlijezdu i nije se proširio izvan Gerotine fascije
	T3a	Tumor zahvaća bubrežnu venu/segmentalne vene ili pijelokanalni sustav ili perirenalnu i/ili hilusnu mast, ali nije se proširio izvan Gerotine fascije
	T3b	Tumor se proširio u donju šuplju venu ispod razine dijafragme
	T3c	Tumor se proširio u donju šuplju venu iznad razine dijafragme ili je zahvatio njenu stijenkku na bilo kojoj razini
T4		Tumor se proširio izvan Gerotine fascije ili je izravno zahvatio ipsilateralnu nadbubrežnu žlijezdu
N0		Bez metastaza u limfnim čvorovima
N1		Metastaze u limfnih čvorova
M0		Bez udaljenih metastaza
M1		Udaljene metastaze

Cheville je sa suradnicima analizirao podatke od 2385 bolesnika s karcinomom bubrega, od čega su 83,2 % bili bolesnici sa svjetlostaničnim karcinomom bubrega (SSKB) te ustanovio da oni imaju lošiju prognozu u usporedbi s drugim histološkim tipovima karcinoma bubrega (papilarni i kromofobni) te da su TNM stadij (Tablica 1.3.), veličina tumora i prisutnost sakromatoidne komponente, ali i nuklearni gradus značajno povezani sa smrtnošću od svjetlostaničnog, papilarnog

i kromofobnog karcinoma bubrega, dok je prisutnost nekroze bila značajno povezana sa smrtnošću od svjetlostaničnog i kromofobnog, ali ne i od papilarnog karcinoma bubrega (83). Također je pokazano da bi tumorska nekroza mogla imati važnu ulogu kao prediktor povratka bolesti kod bolesnika s pT1a SSKB koji inače imaju malu vjerojatnost povratka bolesti (84). Belsante sa suradnicima navode da je limfovaskularna invazija kod 333 bolesnika s nemetastatskim SSKB ograničenim na organ, neovisni prediktor preživljenja slobodnog od bolesti i preživljenja specifičnog za rak (85). Bedke je sa suradnicima također pokazao da su mikrovaskularna i limfovaskularna invazija povezane s lošijom prognozom i metastaziranjem karcinoma bubrega te preporučio njihovo rutinsko određivanje s ciljem boljeg predviđanja preživljenja, odnosno boljeg odabira adjuvantne terapije (86).

Navedena istraživanja su pokazala važnu ulogu histoloških prognostičkih faktora kako zasebno tako i u kombinaciji, odnosno ukoliko ih je dva ili više prisutno u karcinomu bubrega, povećavajući vjerojatnost progresije i povrata bolesti.

Tablica 1.3. Stadiji bolesti na osnovu TNM (7. AJCC izdanje)

Stadij I	T1	N0	M0
Stadij II	T2	N0	M0
Stadij III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadij IV	T4	bilo koji N	M0
	bilo koji T	bilo koji N	M1

Molekularni prognostički faktori

Postoji više molekularnih prognostičkih faktora za SSKB, međutim većina njih se još uvijek ne koristi rutinski i zapravo su još u fazi detaljnih istraživanja. Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) je jedan od najvažnijih, budući da se radi o regulatoru angiogeneze i limfogeneze koji je često povišen u SSKB, štoviše godinama se rutinski koriste lijekovi, odnosno protutijela koja djeluju na VEGF. Međutim, njegova prognostička uloga u SSKB nije do kraja jasna, jer su istraživanja pokazala oprečne, odnosno suprotne rezultate (87).

Ugljikova anhidraza IX (engl. *Carbonic Anhydrase IX*) je transmembranski protein koji se koristi kao marker hipoksije, a njegova povišena ekspresija je nađena kod velikog broja karcinoma gdje je važan za razvoju metastatskog oblika bolesti, ali i kemorezistencije (88). Kod karcinoma bubrega njegova ekspresija je češća kod SSKB u odnosu na druge histološke tipove te ga se može koristiti za razlikovanje SSKB u odnosu na kromofobni karcinom bubrega odnosno onkocitom, ali i kao prognostički marker za sam SSKB (89).

p53 je jedan od najvažnijih tumorskih supresora koji kontrolira, odnosno inhibira progresiju i dijeljenje stanica koje imaju oštećenja DNA, a njegova disfunkcija zbog bilo kojeg razloga je povezana s razvojem različitih karcinoma uključujući i SSKB (90, 91). p53 je jedan od najviše istraživanih proteina i na koji točno način tumorska stanica, da bi mogla napredovati neutralizira njegovo djelovanje i jeli ga zaista neutralizira ili ga zapravo manje ili više izmijenjenog koristi za svoje razvoj i napredak kao što su neki zaključili, teško je biti siguran (92).

Logično je pretpostaviti, a to je i dokazano kod nekih tumora da tumorske stanice u određenim fazama svoga rasta i razvoje koriste, odnosno iskorištavaju postojeće, ali i aktiviraju neke u određenom trenutku neaktivne stanične mehanizme između ostalog djelujući na različite molekule, modificirajući ih i mijenjajući njihovu originalnu ulogu.

Wnt-4 je razvojni protein koji je prisutan u normalnom, ali i tumorskom tkivu. Njegova, odnosno prognostička uloga različitih članova Wnt signalnog puta u SSKB nije do sada detaljnije istraživana. Međutim, promijenjena razina ekspresije je pokazana u različitim bolestima i različitim karcinomima uključujući u urološke karcinome. Isto tako je za neke druge članove Wnt puta kao što je Wnt-5a u gastrointestinalnom stromalnom tumoru pokazano da njegova neutralizacija

korištenjem monoklonskih protutijela gotovo kompletno blokira migraciju i invazivnost karcinomskih stanica, odnosno pokazana je njegova prognostička uloga (93). Samim time moguće je da i Wnt-4 ima prognostičku ulogu. Međutim, njegova uloga je sve osim jednostavna, naime pokazano je da između ostalog djeluje i preko beta-katenin ovisnog, ali i neovisnog puta te da može djelovati i stimulirajuće i suprimirajuće te je zbog toga nazvan “problematično dijete” Wnt signalnog puta. Također je pokazano da se Wnt proteini vežu na više od 15 receptora što sve ukazuje na njihovu vrlo složenu ulogu (94).

Prilikom procjene stvarne prognostičke, ali i terapijske uloge molekularnih markera potrebno je uzeti više stvari u obzir, od načina dokazivanja njegove prisutnosti, odnosno upotreba različitih metoda, ali i samog uzorka tkiva, odnosno samog bolesnika i njegovog genomskog polimorfizma, do epigenetskih promjena unutar samog tumora. Isto tako je moguće da će se bolje predviđanje prognostičke i terapijske uloge postići korištenjem, odnosno kombinacijom dva ili više molekularnih markera, u međuvremenu njihova rutinska upotreba se još uvijek ne preporuča.

1.4.7. Kontrola i praćenje bolesnika

Karcinom bubrega je složena bolest čiji ishod ovisi o brojnim, različitim faktorima te nažalost kod određenog broja bolesnika dolazi do njegovog napredovanja i smrtnog ishoda usprkos poduzetim metoda liječenja. Zbog toga je vrlo važno bolesnike nakon operacije karcinoma bubrega redovito kontrolirati i pratiti s ciljem što bolje kvalitete života i što boljeg preživljenja (95). Protokol praćenja se može dosta razlikovati između urologa unutar iste ustanove, ali isto tako i među različitim ustanovama pa i među državama. Zbog toga se savjetuje praćenje po preporukama Europskog urološkog društva gdje shema praćenja ovisio o samom karcinomu, odnosno u kojoj se skupini rizika za povrat bolesti nalazi. Kod bolesnika koji su niskog rizika povrata bolesti periodi praćenja, odnosno kontrolni CT se radi rjeđe u odnosu na bolesnike koji imaju srednji, odnosno visoki rizik za povrat bolesti kada se kontrole redovitije. Petogodišnje preživljenje specifično za rak iznosi 91 %, 74 %, 67 % i 32 % za TNM stadije I, II, III i IV (96).

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Proteinska ekspresija Wnt-4 je različita u normalnom tkivu bubrega u usporedbi sa svjetlostaničnim karcinomom bubrega, a kod svjetlostaničnog karcinoma ekspresija je različita s obzirom na klinički i patohistološki stadij te gradus bolesti.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Istražiti proteinsku ekspresiju Wnt-4 u normalnom tkivu bubrega te je usporediti sa ekspresijom u svjetlostaničnom karcinomu bubrega.
2. Usporediti proteinsku ekspresiju Wnt-4 s parametrima koji su važni za prognozu i liječenje bolesnika sa svjetlostaničnim karcinomom bubrega (klinički i patohistološki TNM stadij i gradus bolesti).
3. Pratiti bolesnike u vremenskom periodu od minimalno godinu dana te usporedit ekspresiju i eventualnu progresiju, povrat bolesti i preživljenje bolesnika.

4. USTROJ STUDIJE

Istraživanje je provedeno kao retrospektivno, kohortno istraživanje (97).

5. ISPITANICI

U ovo istraživanje uključeno je 185 bolesnika sa svjetlostaničnim karcinom bubrega koji su operirani na Klinici za urologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb u vremenskom periodu od 1. 1. 2016. do 31. 12. 2018. godine. Uzorci tkiva su dobiveni korištenjem arhiviranog patohistološkog materijala karcinomskog tkiva s Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb. Dio bolesnika je operiran radikalnom nefrektomijom, a dio parcijalnom nefrektomijom. Iz istraživanja su isključeni bolesnici koji su imali ranije maligne bolesti ili bubrežne ciste za koje se pokazalo da bi se mogle povezati s indukcijom ili inhibicijom gena koji kodiraju molekule Wnt signalnog puta, odnosno s potencijalnim utjecajem na ekspresiju Wnt proteina.

Prije operacija analizirani su opći podaci bolesnika (dob, spol, lokacija tumora, desni u usporedbi s lijevim bubregom) kao i slikovni nalazi za procjenu preoperativnog kliničkog stadija bolesti (RTG srca i pluća, UZV abdomena, CT abdomena i zdjelice i scintigrafija kostiju). Nakon operacije, odnosno po dobivanju patohistološkog nalaza dobiveni su podaci o samim karcinomima (histološki gradus, prisutnost tumorske nekroze, limfovaskularna invazija, zahvaćenost limfnih čvorova, TNM stadij bolesti).

Bolesnici su praćeni minimalno godinu dana standardnim metodama praćenja (laboratorijski nalazi, RTG srca i pluća, UZV abdomena, CT abdomena i zdjelice) prema preporukama Europskog urološkog društva (98). Oni koji su na slikovnim metodama imali opisane promjene koje odgovaraju sekundarizmima su vođeni kao bolesnici s metastazama, a oni kod kojih se promjene nisu opisivale kao bolesnici bez metastaza.

Podaci su dobiveni uvidom u bolnički informatički sustav (BIS), u medicinsku dokumentaciju iz drugih ustanova, odnosno u telefonskom kontaktu s bolesnicima ili obitelji.

U analizi preživljenja evidentirano je vrijeme do kada su praćeni, odnosno do kada postoje zadnji podaci o njihovom statusu nakon operacije.

Za ovo istraživanje dobivena je suglasnost Etičkog povjerenstva KBC Zagreb od 5. 10. 2020. Klasa: 8. 1. 20/160 - 2 ; Broj: 02/21 AG. Također je dobivena suglasnost Etičkog povjerenstva Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijeku od 16. studenog 2020. Klasa: 602 - 04/20 - 08/07; Broj 2158 - 61 - 07 - 20 - 182.

6. METODE ISTRAŽIVANJA

6.1. Patohistološka analiza i imunohistokemija

Patohistološka analiza tumora učinjena je prema važećim stručnim standardima. Za svaki uzorak određena je: veličina tumora u tri dimenzije, makroskopska i mikroskopska proširenost tumora, histološki tip, nuklearni gradus, odsustvo ili prisustvo te postotak nekroze i sarkomatoidne komponente, prisustvo ili odsustvo limfovaskularne invazije te zahvaćenost limfnih čvorova. Na osnovu svih parametara definiran je pTNM.

Tkivo je fiksirano u 10 % puferiranom formalinu koji je napravljen od 37 % - og formaldehida stabiliziranog s 10 % metanola. Formalin je fiksativ koji spada u aldehidnu skupinu fiksativa. Proces dehidracije tkiva napravljen je u engl. *Tissue-Tek VIP Sekura* aparatu. Proces fiksacije i dehidracije u uzlaznom nizu alkohola trajao je 16 sati. Dehidrirano tkivo uklopljeno je u parafinske blokove i rezano na mikrotomu proizvođač *Leica*, model SM2000R. Debljina tkivnog reza bila je 3 - 4 mikrona. Deparafiniranje i demaskiranje tkivnog antigena napravljeno je u potpuno automatiziranom sustvu *PT Linku* Dako koristeći pufer *EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution High pH* sastava Tris/EDTA pufer pH 9. Ovaj proces trajao je 20 minuta na maksimalnoj temperaturi od 97 °C. Tkivni rezovi isprani su *EnVision™ FLEX Wash Buffer* (20x) koji se sastoji od TRIS pufera u zasoljenom pripravku koji sadrži *Tween 20*, pH 7.6. Radna otopina priređena je dilucijom 1:20 što bi odgovaralo za 1 L: 950 mL destilirane vode sa 50 mL *Wash Buffer* (20x). Nakon ispiranja rezova inkubirano je primarno monoklonalno mišje protutijelo Wnt-4 ((B-6): sc - 376279 *Santa Cruz Biotechnology*, INC). Inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Primarno protutijelo razrijeđeno je u omjeru 1:50 sa *EnVision™ FLEX Antibody Diluentom*. Nakon inkubacije primarnog protutijela preparati su isprani *EnVision™ FLEX Wash Bufferom*. Kako bi se blokirala tkivna peroksidaza, nakon ispiranja puferom dodala se *EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent* (RTU) kroz 10 minuta. Preparati su ponovo isprani *EnVision™ FLEX Wash Buffer*. i dodano je sekundarno protutijelo *EnVision™ FLEX/HRP* (RTU) kroz 30 minuta. Za vizualizaciju antigena korišten je *EnVision™ FLEX Substrate Working Solution* koji se priređuje dodavanjem 1 mL *EnVision™ FLEX Substrate Buffer* + 1 kap *EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen*. Obojeni preparati isprani su destiliranom vodom, a zatim su se kontrastirali hemalaunom 1 minutu, *Mayer's Lillie's Modification Histological Staining Reagent®*

Dako, Nakon kontrastiranja stakalca su uronjena u mlaku vodu kroz 10 minuta. Montiranje pokrovnice napravilo se manualno s *Tissue Tek® Glas Mount Containing* proizvođača *Sakura*.

Za procjenu imunohistokemijske ekspresije korištena je negativna reakcija (-) : nema obojenja u stanicama, slabo pozitivna reakcija (+) : do uključivo 10 % stanica pozitivno, umjereno pozitivna reakcija (++) : 11 - 50 % stanica pozitivno, jako pozitivna reakcija (+++) : više od 50 % stanica pozitivno.

Makroskopski zdravo tkivo bubrega korišteno je kao unutrašnja kontrola tijekom imunohistokemijske analize preparata. Za pozitivnu kontrolu koristili smo tkivo slezene u kojoj se u stanicama bijele pulpe vidio citoplazmatski pozitivitet na Wnt-4, a kao negativnu izostanak primarnog protutijela.

6.2. Mikroskopiranje

Uzorci tumora izdvojeni su iz arhive parafinskih blokova Kliničkog Zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb, a patolog je identificirao najreprezentativniji parafinski blok za imunohistokemijsku analizu.

Nakon imunohistokemijskog bojenja patolog je analizirao preparate na svjetlosnom mikroskopu Leica DMLB. Imunohistokemijskim bojenjem na Wnt-4 u zdravom tkivu bubrega uočen je citoplazmatski pozitivitet epitelnih stanica proksimalnih, distalnih i kanalića srži, dok su stanice Bowmanove čahure i glomerula bile negativne. U tumorskom tkivu uočen je citoplazmatski pozitivitet tumorskih stanica.

6.3. Statističke metode

Statistička analiza podataka provedena je programom *STATISTICA 6.1*, StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA.

6.3.1. Određivanje potrebne veličine uzorka (broja bolesnika)

Potrebna veličina uzorka određena je Power analizom uz pretpostavke da će se statističko testiranje provesti na razini značajnosti 95 % ($\alpha = 0,05$) i snagu testa 90 % ($Power\ Goal = 0,90$) te da je razlika između vrijednosti ekspresije Wnt-4 u svjetlostaničnom karcinomu bubrega i normalnom

tkivu bubrega između 50 % i 70 % vrijednosti standardne devijacije. Rezultat Power analize je pokazao da je 150 uzoraka svjetlostaničnog karcinoma bubrega i 40 odgovarajućih dijelova zdravog tkiva dovoljno za dokazivanje ciljeva studije. Proteinska ekspresija Wnt-4, kao glavni parametar istraživanja, poprima četiri moguće vrijednosti (neg, +, ++, +++) te će se statistički testirati analizom varijance (ANOVA) za četiri skupine. Pretpostavka je da standardizirani efekt kod analize varijance iznosi trećinu vrijednosti standardne devijacije (RMSSE=0,33).

Tablica 6.1. Određivanje veličine uzorka kod primjene analize varijance i t-testa

Statistički parametar	Vrijednos t
Broj skupina	4
RMSSE*	0,33
Pogreška I vrste (a)	0,05
Snaga testa	0,90
Potrebna veličina uzorka (po skupini)	45

*RMSSE (*Root Mean Square Standardized Effect*) – standardizirani efekt kod analize varijance i t-testa

Podaci o pacijentima i uzorcima tkiva opisani su deskriptivnom statistikom (numerički podaci) i frekvencijskim tablicama (opisni podaci). Za numeričke parametre koji su korišteni u statističkom testiranju normalnost distribucije provjerena je Kolmogorov-Smirnov testom, a homogenost varijance je provjerena F-testom. Za testiranje statističke razlike između vrijednosti ekspresije Wnt-4 u svjetlostaničnom karcinomu bubrega i normalnom tkivu bubrega korišten je t-test za nezavisne uzorke. Za testiranje statističke razlike između vrijednosti ekspresije Wnt-4 i numeričkih parametara korištena je analiza varijance (ANOVA) i post hoc Fisher LSD test u okviru analize varijance. Za testiranje statističke razlike između vrijednosti ekspresije Wnt-4 i opisnih parametara korišten je hi-kvadrat test.

Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazani su grafički i numerički (tablično).

Preživljenje bolesnika analizirano je multivarijatnom Cox regresijom, a grafički prikazano Kaplan-Meier krivuljom. Statistička razlika između preživljenja dviju različitih skupina bolesnika testirana je Cox-Mantel testovima, a razlika između više različitih skupina bolesnika testirana je hi-kvadrat testom.

Statističko testiranje provedeno je na razini značajnosti od 95 % ($\alpha = 0,05$).

7. REZULTATI

7.1. Opći i klinički podaci bolesnika

Ukupno je 185 bolesnika uključenu u ovu studiju, 69 (37,3 %) žena i 116 (62,7 %) muškaraca. Prosječna dob bolesnika je bila 60,2 godine (34 - 83). Sto osam (58,4 %) bolesnika je imalo tumor u desnom bubrega, a 77 (41,6 %) u lijevom bubregu. S obzirom na lokaciju tumora 72 (38,9 %) bolesnika su imala tumor na gornjem polu, 62 (33,5 %) u srednjem dijelu, a 51 (27,6 %) na donjem polu bubrega. Šest bolesnika je imalo klinički suspektne metastaze pluća, 3 (1,6 %) metastaze jetre, 12 (6,5 %) metastaze u limfnim čvorovima, 9 (5 %) u nadbubrežnoj žlijezdi i 4 (2,2 %) na kostima.

Radikalna nefrektomija je napravljena kod 127 (68,6 %), a parcijalna kod 58 (31,4 %) bolesnika. Prosječna veličina tumora je bila 5,32 (1 - 19) cm. Devet (4,9 %) bolesnika je imalo tumor Fuhrmanovog gradusa 1, 108 (58,4 %) gradusa 2, 53 (28,6 %) gradusa 3 i 15 (8,1 %) gradusa 4. Invazija renalne kapsule je nađena kod 30 (16,2 %), renalne vene kod 45 (24,9 %), a vene kave kod 4 (2,2 %) bolesnika. Masno tkivo je bilo zahvaćeno kod 56 (30,3 %) bolesnika, 6 (3,2 %) bolesnika je imalo pozitivne limfne čvorove, dok kod 109 (58,9 %) limfadenektomija nije napravljena. Adrenalektomija je napravljena u 40 (21,6 %) bolesnika, od kojih je 5 imalo metastaze. Sto jedanaest (60 %) bolesnika je imalo T1, 8 (4,3 %) T2, 64 (34,6 %) T3 i 2 (1,1 %) T4 stadij bolesti. Svi podaci su prikazani u Tablicama 7.1 i 7.2.

Tablica 7.1. Osnovni statistički procjenjivači numeričkih parametara

Parametar	N	Prosjek	Medijan	Raspon	SD
Godine	184	60,24	61,0	34,0 - 83,0	10,910
Kreatinin (μmol / L)	112	86,20	82,0	11,0 - 272,0	32,477
CRP (mg/ L)	72	20,08	3,5	0,3 - 291,7	46,768
CT najveći promjer u cm	185	5,35	4,5	1,2 - 15,0	3,103
PHD najveći promjer u cm	185	5,32	4,5	1,0 - 19,0	3,394
Broj limfnih čvorova	75	6,23	5,0	1,0 - 26,0	4,364
Sarkomatoidna komponenta %	184	1,03	0,0	0,0 - 95,0	8,249
Nekroza %	177	4,76	0,0	0,0 - 70,0	12,395
Limfovaskularna invazija	185	0,31	0,0	0,0 - 1,0	0,463

Tablica 7.2. Apsolutna i relativna učestalost pojedinih kategorija opisnih parametara

Parametar	Broj	%
Spol		
Muški	116	62,7
Ženski	69	37,3
Wnt-4 svjetlostaniči karcinom		
Neg.	61	33,0
+	63	34,1
++	32	17,3
+++	29	15,7
Wnt-4 zdravo tkivo		
+	1	2,6
++	6	17,1
+++	28	80,3
Lateralizacija		
Desno	108	58,4
Lijevo	77	41,6
Etiologija		
Slučajan nalaz	78	42,2
Zbog drugih razloga / tegoba	86	46,5
Hematurija	12	6,5
Obrada u sklopu metastatske bolesti	9	4,9
RTG srca i pluća		
Negativan	179	96,8
Pozitivan	6	3,2
Lokacija tumora		
donji pol	51	27,6
gornji pol	72	38,9

Parametar	Broj	%
središnji dio	62	33,5
CT jetra		
Negativno	182	98,4
Pozitivno	3	1,6
CT limfni čvorovi		
Negativno	173	93,5
Pozitivno	12	6,5
CT nadbubrežna žlijezda		
Negativno	175	95,0
Pozitivno	9	5,0
CT kosti		
Negativno	180	97,6
Pozitivno	4	2,4
Scintigrafija kostiju		
Pozitivno	3	1,7
Negativno	3	1,7
Nepoznato	178	96,6
Vrsta kirurškog zahvata		
Parcijalna nefrektomija	58	31,4
Radikalna nefrektomija	127	68,6
Gradus tumora		
1	9	4,9
2	108	58,4
3	53	28,6
4	15	8,1
Bubrežna kapsula		
Negativno	154	83,2

Parametar	Broj	%
Pozitivno	30	16,2
Nepoznato	1	0,5
Bubrežna vena		
Negativno	131	70,8
Pozitivno	46	24,9
Nepoznato	8	4,3
Vena kava		
Negativno	181	97,8
Pozitivno	4	2,2
Masno tkivo		
Negativno	129	69,7
Pozitivno	56	30,3
Limfni čvorovi		
Negativno	70	37,8
Pozitivno	6	3,2
Nepoznato	109	58,9
Nadbubrežna žlijezda		
Negativno	35	18,9
Pozitivno	5	2,7
Nepoznato	145	78,4
TNM grupa		
T1	111	60,0
T2	8	4,3
T3	64	34,6
T4	2	1,1
TNM podgrupa		

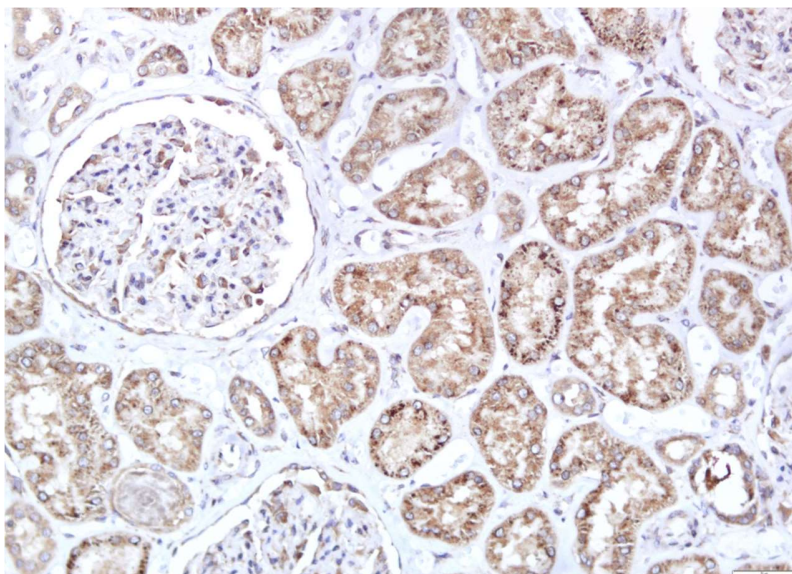
Parametar	Broj	%
T1a	85	45,9
T1b	22	11,9
T2a	4	2,2
T2b	2	1,1
T3a	45	24,3
T3b	14	7,6
T3c	1	0,5
Nepoznato	12	6,5
TNM limfni čvorovi		
N0	68	36,8
N1	4	2,2
Nx	113	61,1
TNM metastaze		
Mx	180	97,3
M1	5	2,7
Sadašnji status		
Bez bolesti	125	67,6
Nepoznato	26	14,1
Metastaze	20	10,8
Smrt zbog metastaza	11	5,9
Smrt zbog drugih razloga	2	1,1
Povrat bolesti	1	0,5
RTG srca i pluća		
Negativno	12	6,5
Pozitivno	1	0,5
Nepoznato	172	93,0
CT / UZV		
Negativno	141	76,2
Nepoznato	12	6,5

Parametar	Broj	%
Pozitivno	22	11,9
umro od metastaza	10	5,4
Metastaze		
Ne	163	88,1
Da	22	11,9

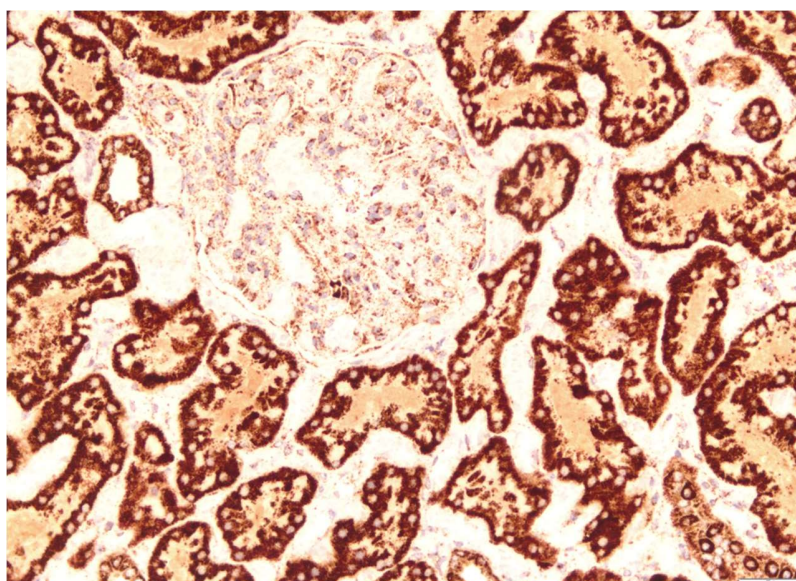
7.2. Wnt-4 ekspresija

Wnt-4 ekspresija u zdravom tkivu bubrega je bila visoka, prosječno 2,8 (0 - 3), a u tumorskom 1,2 (1 - 3) ($p < 0,001$) sa statistički značajnom razlikom od 99 % ($\alpha = 0,01$) (Tablica 7.3. i Slika 7.8.) Većina bolesnika je imala tumore gradus 2 i 3 te je nađena proporcijalna korelacija između Wnt-4 pozitiviteta i povećanja gradusa tumora ($p = 0,403$), ali bez statistički značajne razlike (Slika 7.9.). Otprilike ista Wnt-4 ekspresija (1,18 u usporedbi s 1,17) je nađena kada su uspoređeni patološki stadiji T1 i T3 (budući da smo imali samo 8 bolesnika s T2 i 2 bolesnika s T4 stadijem, oni su isključeni iz analize) ($p = 0,929$). Isti rezultati su dobiveni kada su uspoređeni T1a u usporedbi s T1b te T3a u usporedbi s T3b podgrupom-. Prilikom usporedbe veličine tumora u centimetrima za sve bolesnika nađena je slaba negativna korelacija između veličine tumora i Wnt-4 ekspresije, odnosno veći tumori su imali manju Wnt-4 ekspresiju ($r = -0,1240$, $p = 0,093$, statistička značajnost na razini 90 % ($\alpha = 0,1$)). Bolesnici sa suspektnim metastazama su imali veću srednju Wnt-4 ekspresiju 1,5 u usporedbi s 1,1 kod bolesnika bez metastaza, ali bez značajne razlike između njih ($p = 0,104$) (Slika 7.15.).

Prosječno vrijeme praćenja je bilo 33 mjeseca (12 - 60). Nije bila razlike u preživljenju između Wnt-4 negativne i Wnt-4 pozitivne grupe ($p = 0,578$) (Slika 7.20.). Pokazana je razlika u preživljenju između skupina T1 i T3. Naime, bolesnici iz T1 skupine su imali duže preživljenje u odnosu na bolesnike iz T3 skupine ($p < 0,001$).

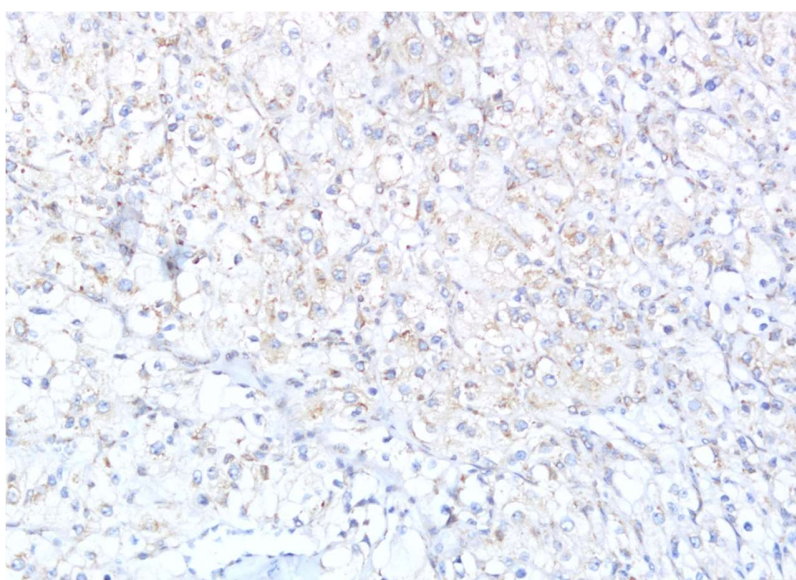


Slika 7.1. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u zdravom tkivu bubrega. Izražen uniforman citoplazmatski pozitivitet u tubularnim epitelnim stanicama. Povećanje 200x. Izvor: Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb



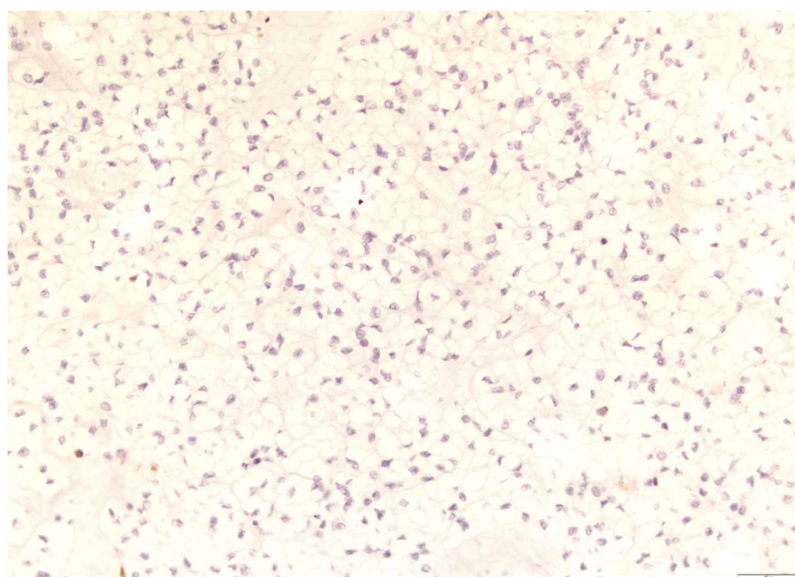
Slika 7.2. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u zdravom tkivu +++, izražen pozitivitet.

Povećanje 200x. Izvor: Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb

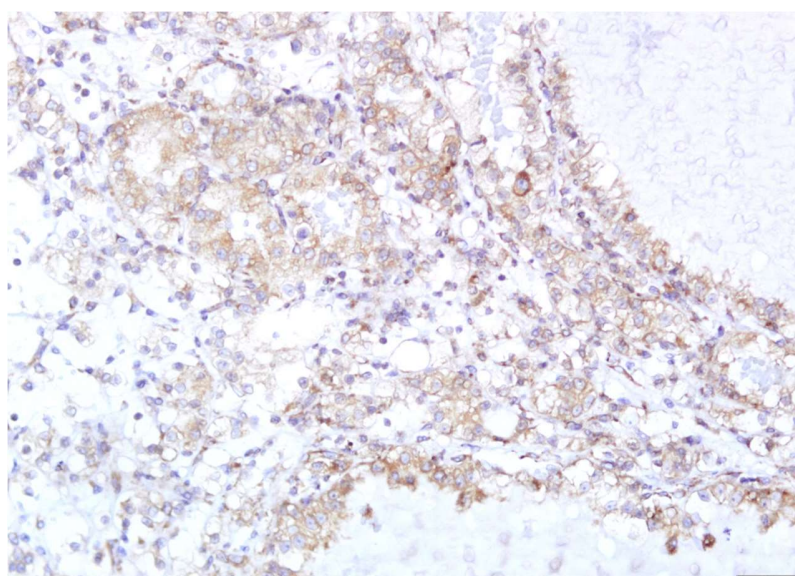


Slika 7.3. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u karcinomu + , slab pozitivitet (povećanje

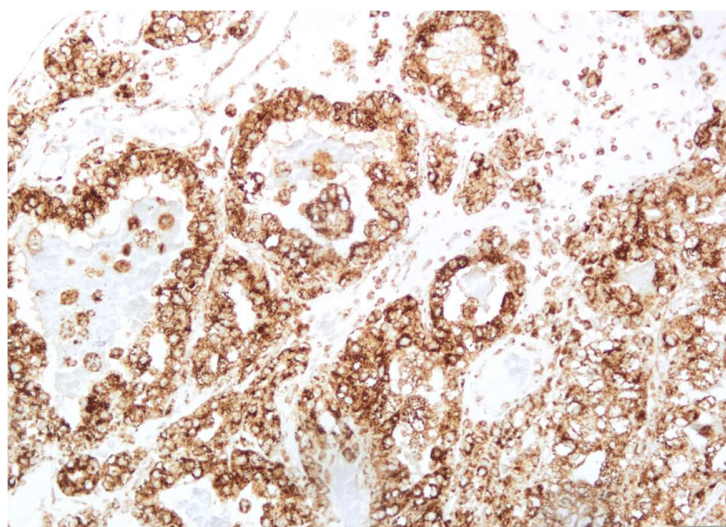
200x).Povećanje 200x. Izvor: Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb



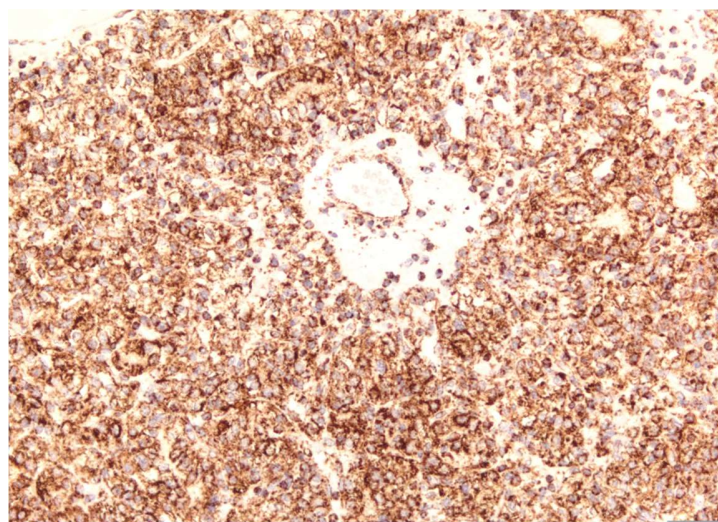
Slika 7.4. Imunohistokemijsko bojanje na Wnt-4 u karcinomu -, nema pozitiviteta (povećanje 200x). Izvor: Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb



Slika 7.5. Wnt-4 ++ u stanicama karcinoma bubrega, umjereni intenzitet (povećanje 200x). Izvor: Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb



Slika 7.6. Wnt-4 +++ ekspresija u karcinomu bubrega, difuzna izražena pozitivna reakcija u tumorskim stanicama (povećanje 200x). Izvor: Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb



Slika 7.7. Wnt-4 +++ ekspresija u karcinomu bubrega, difuzna izražena pozitivna reakcija u tumorskim stanicama (povećanje 200x). Izvor: Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb

7.4. Provjera ciljeva istraživanja

Kolmogorov-Smirnov test normalnosti distribucije pokazao je da vrijednosti numeričkih parametara koji su korišteni u statističkom testiranju značajno ne odstupaju od normalne distribucije, a F-test je pokazao da je zadovoljena homogenost varijance, pa su korišteni parametrijski testovi (t-test i ANOVA).

7.4.1. Provjera prvog cilja istraživanja

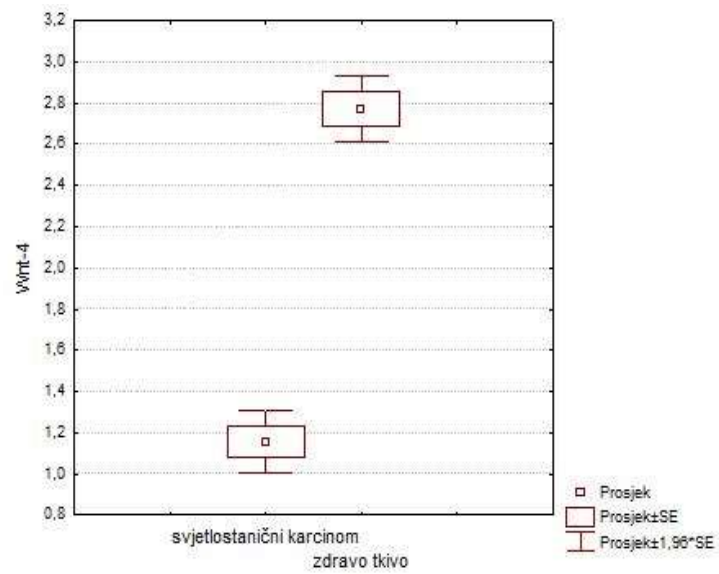
Testiranje statističke razlike između proteinske ekspresije Wnt-4 u normalnom tkivu bubrega i svjetlostaničnom karcinomu bubrega.

Za ovo testiranje proteinska ekspresija Wnt-4 je promatrana kao ordinarna varijabla. Kako povećanjem uzorka svaka distribucija teži normalnoj distribuciji (Središnji granični teorem), pokazalo se da Wnt-4 vrijednosti značajno ne odstupaju od normalne distribucije pa je korišten t-test.

Tablica 7.3. Statistička razlika između proteinske ekspresije Wnt-4 u normalnom tkivu bubrega (Wnt-4 N) i svjetlostaničnom karcinomu bubrega (Wnt-4 T) testirana t-testom za nezavisne uzorke.

	Prosjek	Prosjek	T	ss	P	N	N	SD	SD
	Wnt-4 N	Wnt-4 T				Wnt-4 N	Wnt-4 T	Wnt-4 N	Wnt-4 T
Wnt-4 N vs. Wnt-4 T	1,2	2,8	- 8,869	218	<0,001	185	35	1,05	0,49

ss – stupnjevi slobode, SD – standardna devijacija



SE standardna pogreška

Slika 7.8. Razlika između ekspresije Wnt-4 u zdravom tkivu i svjetlostaničnom karcinomu

T-test za nezavisne uzorke pokazuje da postoji statistički značajna razlika između proteinske ekspresije Wnt-4 u zdravom tkivu i svjetlostaničnom karcinomu ($p < 0,001$).

Prvi cilj istraživanja je postignut, a time je i prvi dio hipoteze prihvaćen.

7.4.2. Provjera drugog cilja istraživanja

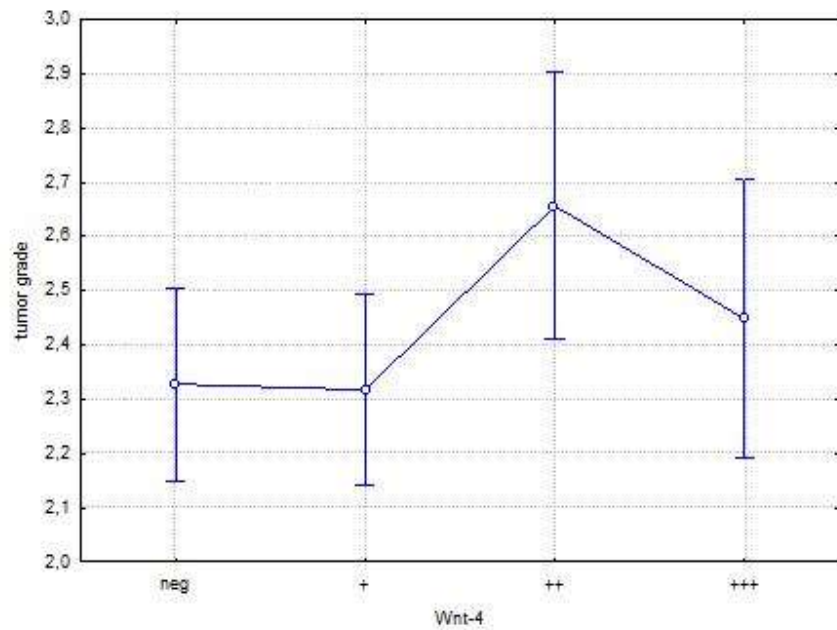
Usporediti proteinsku ekspresiju Wnt-4 s parametrima koji su važni za prognozu i liječenje bolesnika sa svjetlostaničnim karcinomom bubrega (klinički i patohistološki TNM stadij i gradus bolesti).

Testiranje povezanosti tumor grade i proteinske ekspresije Wnt-4

Za ovo testiranje gradus tumora je promatran kao ordinarna varijabla. Kako povećanjem uzorka svaka distribucija teži normalnoj distribuciji (Središnji granični teorem), pokazalo se da vrijednosti gradusa tumora značajno ne odstupaju od normalne distribucije pa je korištena analiza varijance (ANOVA) i kao post hoc test Fisher LSD test.

Tablica 7.4. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje gradusa tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Wnt-4	N	Gradus tumora	
		Prosjek	SD
Neg	59	2,27	0,448
+	52	2,31	0,466
++	25	2,40	0,500
+++	25	2,44	0,506



Slika 7.9. Analiza varijance za tumor grade u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Tablica 7.5. Statistička razlika između vrijednosti gradusa tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

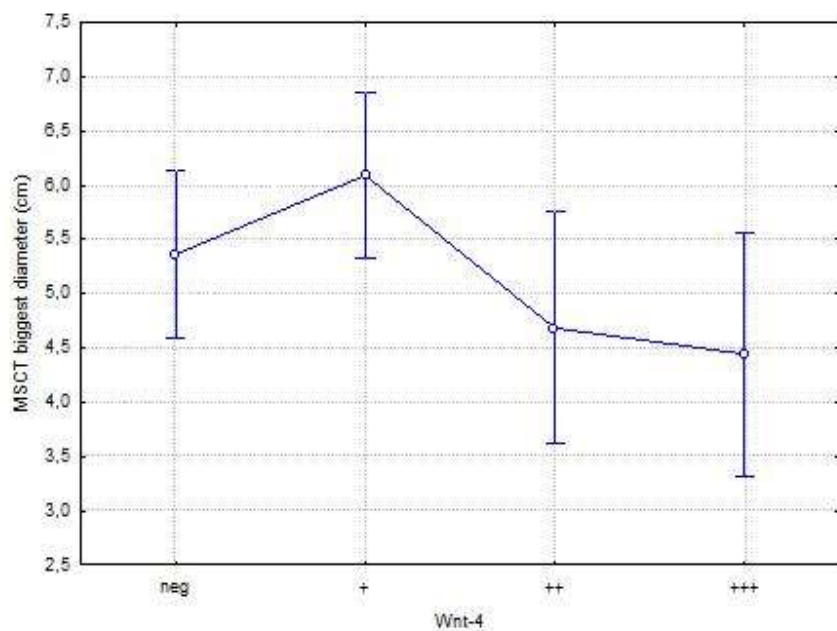
Parametar	WNT	P
Gradus tumora	neg vs +	0,934
	neg vs ++	0,034
	neg vs +++	0,449
	+ vs ++	0,028
	+ vs +++	0,408
	++ vs +++	0,250

Bolesnici sa višom ekspresijom Wnt-4 imaju viši tumor grade. Vrijednosti tumor grade se statistički značajno razlikuju između Wnt-4 neg i Wnt-4 ++, te između Wnt-4 + i Wnt-4 ++ ($p < 0,05$), dok ostale razlike nisu statistički značajne ($p > 0,05$).

Testiranje povezanosti najvećeg promjera tumora na CT i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.6. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje najvećeg promjera tumora na CT u cm u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Wnt-4	N	CT najveći promjer (cm)	CT najveći promjer (cm)
		Prosjek	SD
Neg	61	5,36	2,813
+	63	6,09	3,452
++	32	4,68	3,053
+++	29	4,44	2,648



Slika 7.10. Analiza varijance za MSCT najveći promjer tumora (cm) u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Tablica 7.7. Statistička razlika između vrijednosti najvećeg promjera tumora na CT u cm u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4 (Fischer LSD test)

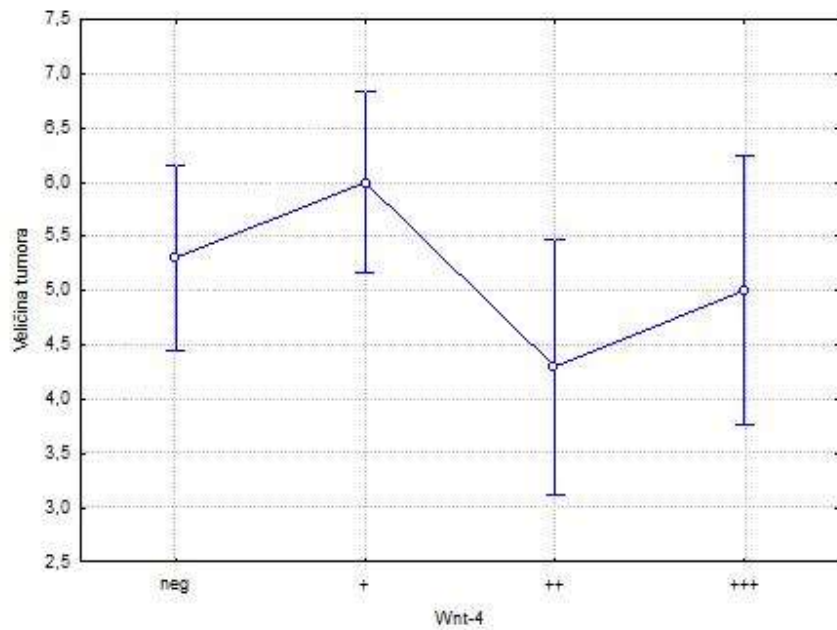
Parametar	Wnt-4	P
MSCT najveći promjer tumora	neg vs +	0,188
	neg vs ++	0,311
	neg vs +++	0,185
	+ vs ++	0,036
	+ vs +++	0,018
	++ vs +++	0,761

Bolesnici sa višom ekspresijom Wnt-4 imaju manji promjer na MSCT-u. Najveći promjeri tumora na MSCT-u se statistički značajno razlikuju između Wnt-4 + i Wnt-4 ++ te između Wnt-4 + i Wnt-4 +++ ($p < 0,05$), dok ostale razlike nisu statistički značajne ($p > 0,05$).

Testiranje povezanosti veličine tumora i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.8. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje veličine tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Wnt-4	N	Veličina tumora (cm)	Veličina tumora (cm)
		Prosjek	SD
neg	61	5,30	3,089
+	63	6,00	3,639
++	32	4,30	2,816
+++	29	5,00	3,847



Slika 7.11. Analiza varijance za veličinu tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Tablica 7.10. Statistička razlika između vrijednosti veličine tumora u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4 (Fisher LSD test)

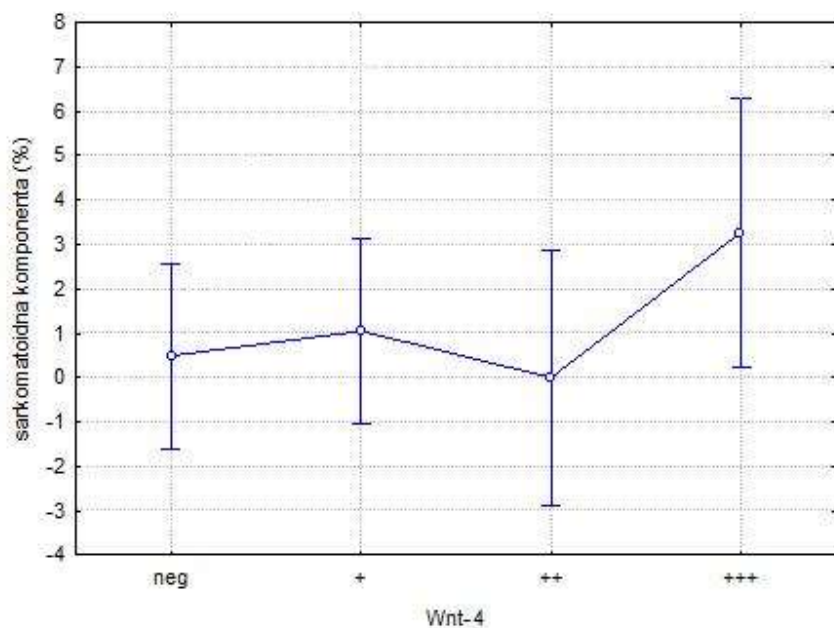
Parametar	Wnt-4	p
Veličina tumora	neg vs +	0,253
	neg vs ++	0,173
	neg vs +++	0,692
	+ vs ++	0,021
	+ vs +++	0,190
	++ vs +++	0,416

Vrijednosti veličine tumora statistički su značajno više u bolesnika sa Wnt-4 + nego u bolesnika sa Wnt-4 ++ ($p < 0,05$), dok ostale razlike nisu statistički značajne ($p > 0,05$).

Testiranje povezanosti sarkomatoidne komponente (%) i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.10. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje sarkomatoidne komponente u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Wnt-4	N	sarkomatoidna komponenta	
		prosjeak	SD
Neg	61	0,5	3,84
+	62	1,0	6,60
++	32	0,0	0,00
+++	29	3,3	17,64



Slika 7.12. Analiza varijance za sarkomatoidnu komponentu u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.

Tablica 7.11. Statistička razlika između vrijednosti sarkomatoidne komponente u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4 (Fisher LSD test)

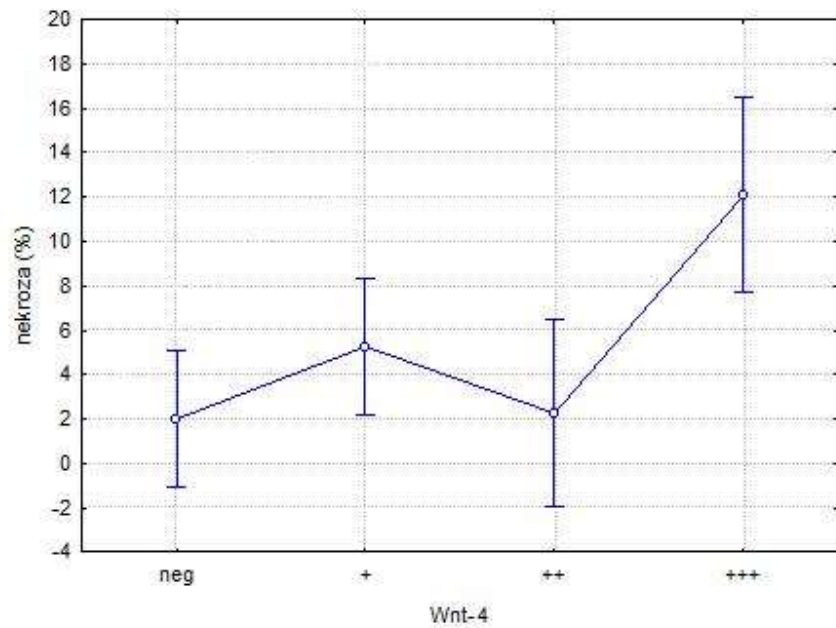
Parametar	WNT	P
Sarkomatoidna komponenta	neg vs +	0,709
	neg vs ++	0,785
	neg vs +++	0,136
	+ vs ++	0,560
	+ vs +++	0,232
	++ vs +++	0,123

Vrijednosti sarkomatoidne komponente nisu statistički značajno povezane sa ekspresijom Wnt-4 ($p > 0,05$). Iz deskriptivne statistike je vidljivo da je sarkomatoidna komponenta kod bolesnika sa Wnt-4 +++ viša nego Wnt-4 neg, WNT-4 + i Wnt-4 ++, ali na ovom uzorku bolesnika ta razlika nije statistički značajna.

Testiranje povezanosti nekroza (%) i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.12. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje nekroze u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4.

Wnt-4	N	nekroza	nekroza
		prosjek	SD
neg	59	2,0	5,32
+	58	5,3	12,12
++	31	2,3	5,60
+++	29	12,1	22,26



Slika 7.13. Analiza varijance za nekrozu u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Tablica 7.13. Statistička razlika između vrijednosti nekroze u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4 (Fisher LSD test)

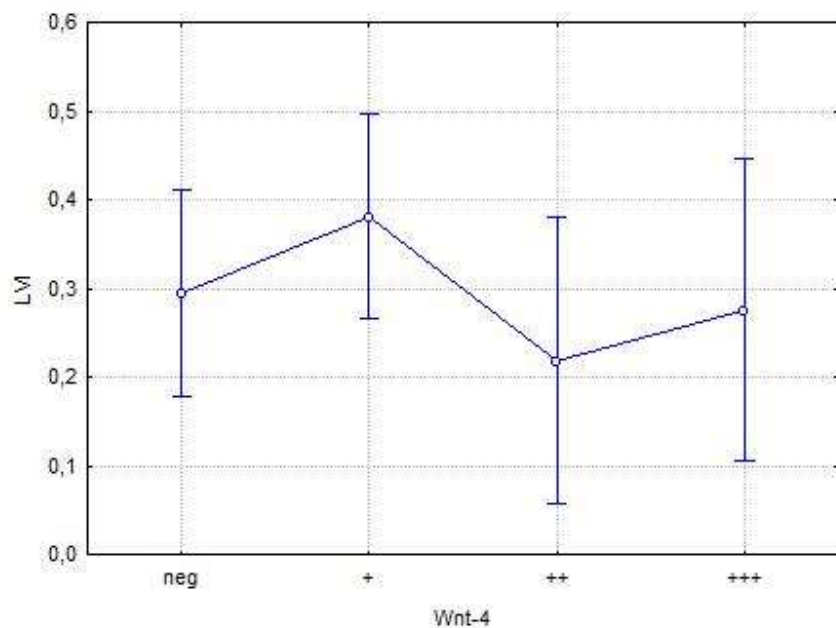
Parametar	Wnt-4	P
Nekroza	neg vs +	0,143
	neg vs ++	0,923
	neg vs +++	<0,001
	+ vs ++	0,262
	+ vs +++	0,013
	++ vs +++	0,002

Vrijednosti nekroze kod bolesnika sa Wnt-4 +++ statistički značajno više nego kod bolesnika sa Wnt-4 neg, Wnt-4 + i Wnt-4 ++ ($p < 0,01$).

Testiranje povezanosti LVI i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.14. Prosječna vrijednost i standardno odstupanje LVI u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Wnt-4	N	LVI	
		prosjeak	SD
Neg	61	0,3	0,46
+	63	0,4	0,49
++	32	0,2	0,42
+++	29	0,3	0,45



Slika 7.14. Analiza varijance za limfovaskularnu invaziju (LVI) u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

Tablica 7.15. Statistička razlika između vrijednosti LVI u odnosu na proteinsku ekspresiju Wnt-4

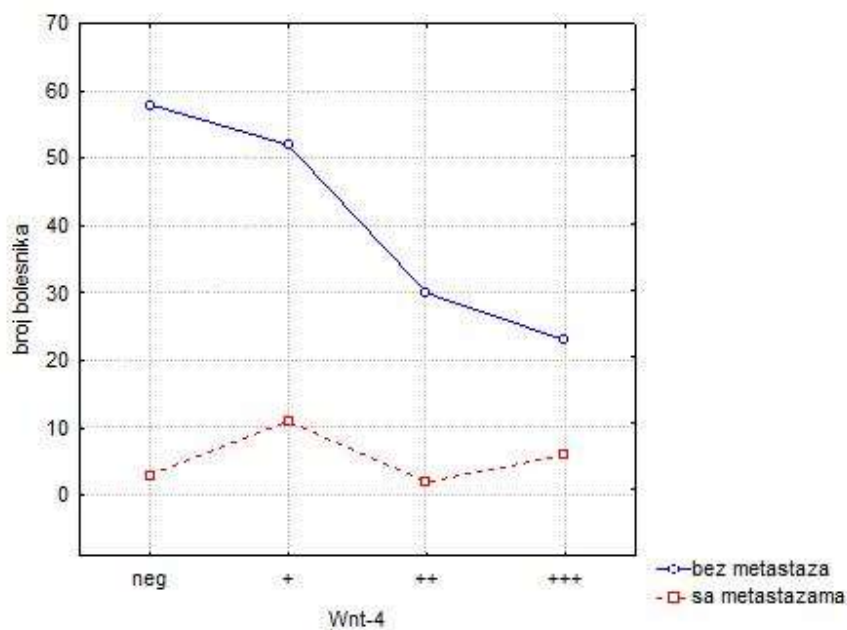
(Fisher LSD test)

Parametar	Wnt-4	P
LVI	neg vs +	0,303
	neg vs ++	0,451
	neg vs +++	0,854
	+ vs ++	0,108
	+ vs +++	0,313
	++ vs +++	0,631

Pokazuje se da vrijednosti LVI nisu statistički značajno povezane sa ekspresijom Wnt-4 ($p > 0,05$).

Testiranje povezanosti metastaza i proteinske ekspresije Wnt-4**Tablica 7.16.** Proteinska ekspresiju Wnt-4 u odnosu na bolesnike bez i s metastazama

Wnt-4	bolesnici bez metastaza	Bolesnici sa metastazama
Neg	58 (95,1 %)	3 (4,9 %)
+	52 (82,5 %)	11 (17,5 %)
++	30 (93,8 %)	2 (6,2 %)
+++	23 (79,3 %)	6 (20,7 %)



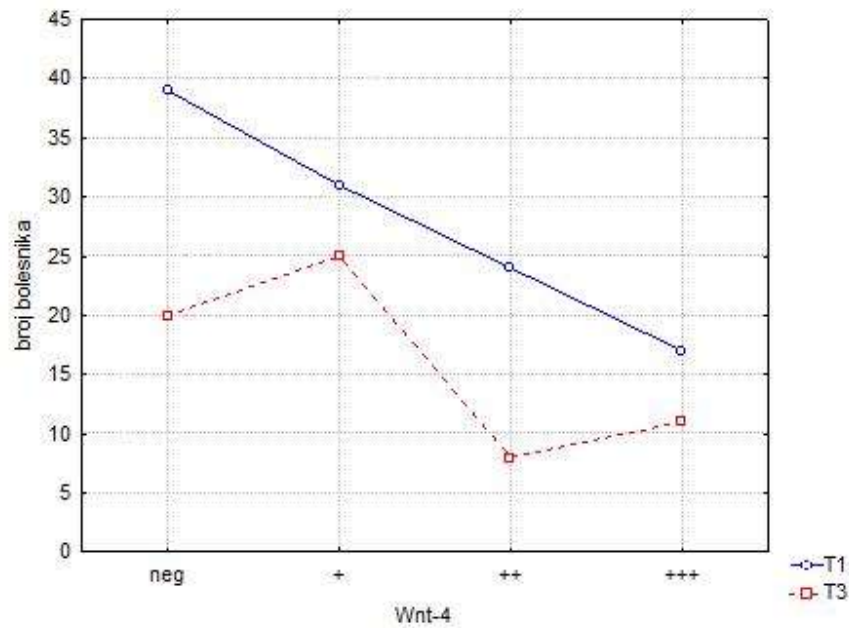
Slika 7.15. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na metastaze

Bolesnici bez metastaza imaju statistički granično značajno višu proteinsku ekspresiju Wnt-4 nego bolesnici sa metastazama (hi-kvadrat = 7,810, $p = 0,05$).

Testiranje povezanosti TNM skupina i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.17. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM skupine T1 i T3

Wnt-4	T1	T3
neg	39 (66,1%)	20 (33,9 %)
+	31 (55,4%)	25 (44,6 %)
++	24 (75,0%)	8 (25,0 %)
+++	17 (60,7%)	11 (39,3 %)



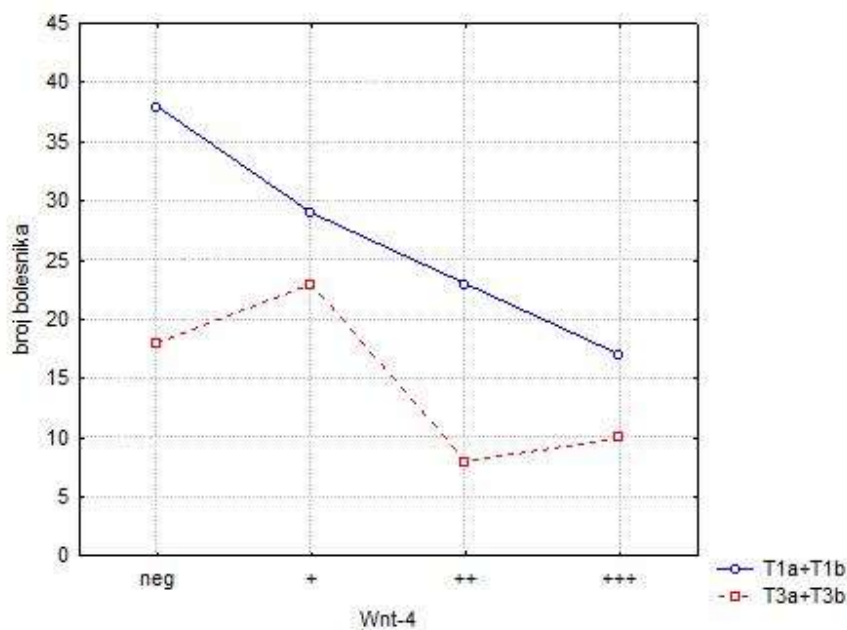
Slika 7.16. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM skupine T1 i T3.

Proteinska ekspresija Wnt-4 nije statistički značajno povezana sa TNM skupinama T1 i T3 (hi-kvadrat = 3,691, $p = 0,297$).

Testiranje povezanosti TNM podskupina i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.18. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM podskupine T1a + T1b i T3a + T3b

Wnt-4	T1a+T1b	T3a+T3b
neg	38 (67,9 %)	18 (32,1 %)
+	29 (55,8 %)	23 (44,2 %)
++	23 (74,2 %)	8 (25,8 %)
+++	17 (63,0 %)	10 (37,0 %)



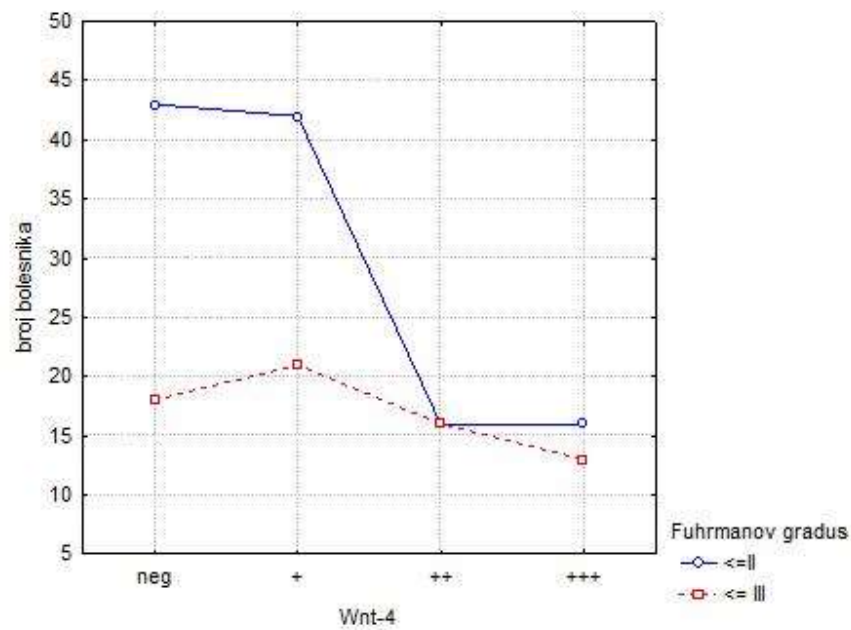
Slika 7.17. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na TNM podskupine T1a + T1b i T3a + T3b.

TNM podskupine T1a + T1b i T3a + T3b imaju podjednaku ekspresiju Wnt-4, razlika nije statistički značajna (hi-kvadrat = 3,305, $p = 0,347$).

Testiranje povezanosti Fuhrmanovog gradusa i proteinske ekspresije Wnt-4

Tablica 7.19. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na Fuhrmanov gradus

Wnt-4	Fuhrmanov gradus	Fuhrmanov gradus
	$\leq II$	$\leq III$
neg	43 (70,5 %)	18 (29,5 %)
+	42 (66,7 %)	21 (33,3 %)
++	16 (50,0 %)	16 (50,0 %)
+++	16 (55,2 %)	13 (44,8 %)



Slika 7.18. Proteinska ekspresija Wnt-4 u odnosu na Fuhrmanov gradus.

Fuhrmanov gradus \leq II i \leq III ima podjednaku ekspresiju Wnt-4, razlika nije statistički značajna (hi-kvadrat = 4,933, p = 0,178).

7.4.3. Provjera trećeg cilja istraživanja

Analiza preživljavanja

Tablica 7.20. Preživjeli i umrli bolesnici u odnosu na ekspresiju Wnt-4

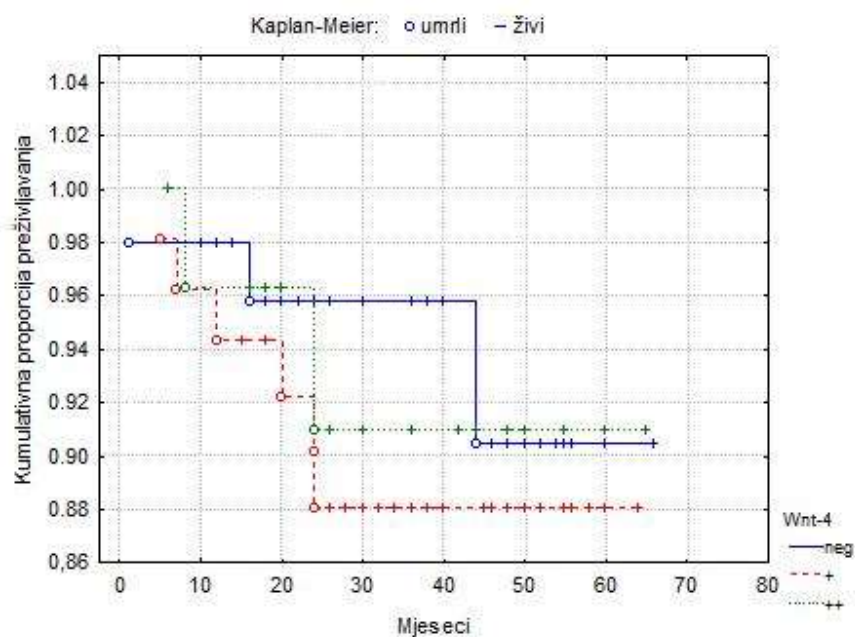
Wnt-4	preživjeli	umrli	Ukupno
neg	47	3	50
	94,0%	6,0%	
+	47	6	53
	88,7%	11,3%	
++	26	2	28
	92,9%	7,1%	
+++	26	0	26
	100,00%	0,00%	
Sveukupno	146	11	157

Kod bolesnika sa ekspresijom Wnt-4 vrijednosti +++ nema umrlih, pa se za tu skupinu bolesnika +++ ne može provesti analiza preživljavanja.

Tablica 7.21. Preživljavanje u mjesecima bolesnika prema ekspresiji Wnt-4

Wnt-4	Medijan	Prosjek	SD	Umrli	Preživjeli	Ukupno
Neg	28,0	33,4	16,3	3	47	50
+	36,0	34,9	14,9	6	47	53
++	25,0	30,2	15,6	2	26	28
Ukupno	30,0	33,3	15,6	11	120	131

Hi-kvadrat test pokazuje da nema statistički značajne razlike u preživljavanju bolesnika u odnosu na ekspresiju Wnt-4 (hi-kvadrat=1,1; p=0,578).

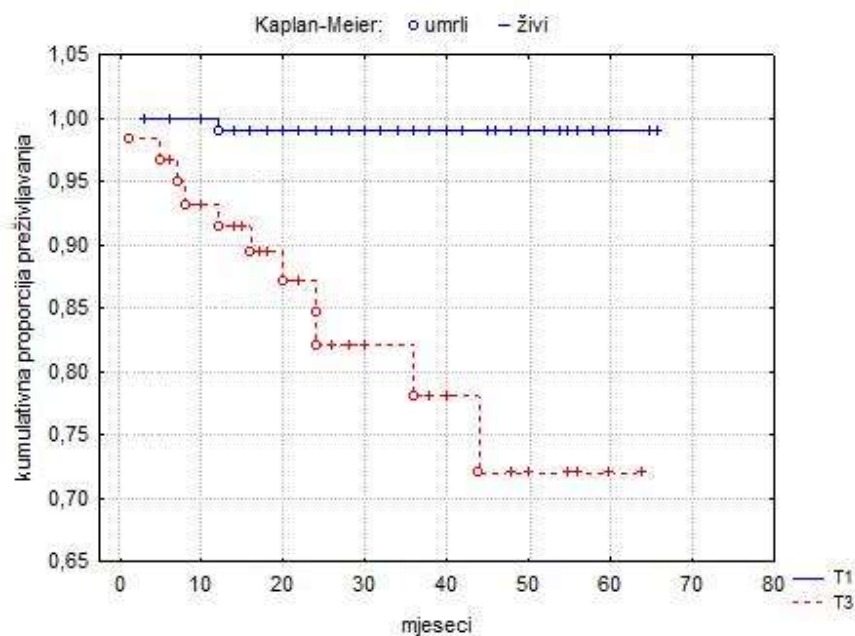


Slika 7.19. Preživljavanje bolesnika u odnosu na ekspresiju Wnt-4.

Tablica 7.23. Preživljavanje bolesnika prema TNM skupinama

TNM grupa	Živi	Umrli	Ukupno	Preživljavanje
T1	98	0	98	100 %
T3	41	10	51	80 %
Ukupno	139	10	149	93 %

Cox-Mantel Test je pokazao da je preživljavanje bolesnika u skupini T1 statistički značajno veće nego preživljavanje bolesnika u skupini T3 (Test statistic = 4,197 p = 0,00003).

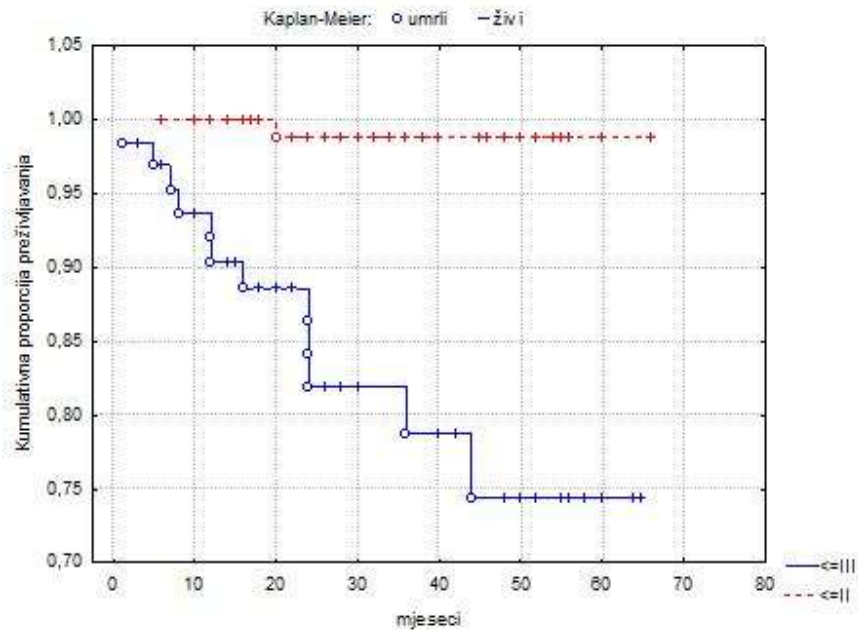


Slika 7.20. Preživljavanje bolesnika u odnosu na TNM skupine T1 i T3.

Tablica 7.24. Preživljavanje bolesnika u odnosu na Fuhrmanov gradus

Fuhrmanov gradus	Živi	Umrli	Ukupno	Preživljavanje
≤ II	109	1	110	99%
≤ III	53	12	65	82%
Ukupno	162	13	175	93%

Cox-Mantel Test pokazuje da je preživljavanje bolesnika sa Fuhrmanovim gradusom \leq II statistički značajno više nego kod bolesnika sa Fuhrmanovim gradusom \leq III (Test statistic = -4,211, p = 0,00003)



Slika 7.21. Preživljavanje bolesnika u odnosu na Fuhrmanov gradus

8. RASPRAVA

8.1. Uvod u raspravu

SSKB je histološki najčešća forma karcinoma bubrega čija dijagnostika, liječenje i prognoza ovise o brojnim faktorima. Velika većina karcinoma bubrega se danas otkriva slučajno zbog široke upotrebe slikovnih metoda koje su indicirane zbog drugih tegoba ili bolesti koje pacijenti imaju, odnosno prilikom sistematskih pregleda. Zbog toga se većina karcinoma bubrega otkriva u ranijem stadiju bolesti, često nižeg histološkog gradusa te su samim time uz upotrebu novih terapijskih mogućnosti rezultati liječenja za većinu bolesnika bolji u odnosu na ranije. Međutim, usprkos svim ovim pomacima prema naprijed, karcinom bubrega je i dalje ozbiljna bolest koja zahtijeva agresivno liječenje te uzrokuje značajan morbiditet i mortalitet bolesnika. Štoviše u nekim zemljama Europske unije kao što je Hrvatska, mortalitet od ove bolesti je i dalje u blagom povećanju (42).

Od svih histološki podtipova SSKB ima najveći metastatski potencijal te je odgovoran za > 90 % metastaza, dok petogodišnje preživljenje bolesnika sa metastatskom bolesti iznosi samo 12 % (99).

Kao što postoje različiti tipovi, odnosno podtipovi karcinoma bubrega vjerojatno i između njih ima bitnih razlika uzrokovanih između ostalog i različitim genima, odnosno različitom genetskom bazom tumora, ali i epigenetskim promjenama. Da bismo mogli što bolje predvidjeti tijek ove bolesti i da bismo je mogli što bolje liječiti, moramo poznavati njezin razvoj i napredak, ali i imati prognostičke faktore koji će je najbolje karakterizirati.

U rutinskoj praksi karcinom bubrega ne predstavlja značajniji dijagnostički problem, štoviše većina ih ima jasnu patohistološku sliku i dobro opisan imunohistokemijski profil. Međutim, postavlja se pitanje koliko dobro možemo karakterizirati karcinom bubrega, odnosno SSKB samo na osnovu morfologije i nekoliko do sada poznatih tumorskih markera, tim više što ekspresija nekih od njih može biti dosta različita, odnosno heterogena po učestalosti, intenzitetu, lokaciji, ali i prisutnosti u karcinomu, odnosno u zdravom tkivu. Naime, neki od njih su pozitivni, neki negativni, a neki imaju heterogenu ekspresiju, odnosno fokalno su pozitivni (100). Do sada je napravljen veliki broj studija o prognostičkoj ulozi različitih molekularnih markera za karcinom bubrega, od prognostičkih

markera koji su uključeni u stanični ciklus, odnosno njegovu regulaciju, različitih citokina i faktora rasta, odnosno angiogeneze, preko upalnih markera do cirkulirajućih/krvnih markera (101). Međutim, još uvijek nemamo ne idealan, nego čak ni dobar marker za karcinom bubrega, odnosno za SSKB. Idealna marker trebao bi biti visoko specifičan i osjetljiv, jednostavan za dokazivanje/upotrebu, široko dostupan, jeftin i pouzdan te bi trebao korelirati sa stadijem bolesti, ali i imati ulogu u praćenju odgovora na terapiju, odnosno liječenja te procjeni vjerojatnosti progresije i povrata bolesti. Različite studije istih markera često su pokazale različite, odnosno konfliktne rezultate i moguće je da je veći problem u njihovom dizajnu, od odabira bolesnika, izbora laboratorijskih metoda, preko analize i tumačenja rezultata nego u samom markeru, mada su i tu moguće bitne razlike ovisno o polimorfizmu odgovornih gena, izoformama, odnosno ko - i / ili post-translacijskim modifikacijama samog markera (102). Vjerojatno će napredak tehnologije i bolji dizajn kao i uniformnost istraživanja na većem broju uzoraka, odnosno bolesnika u budućnosti pomoći u rješavanju ovog problema.

8.2. Tijek rasprave i komentar

Razvoj organizma započinje aktiviranjem različitih molekularnih putova koji omogućavaju nastanak i rast različitih tkiva i organa. Nakon toga slijedi strogo kontrolirana homeostaza između staničnog rasta, odnosno diobe i smrti stanice. Kada se ona značajno poremeti nastaju različite bolesti među kojima i karcinomi. Kako točno nastaju ti poremećaji i koji su sve kontrolni putevi, odnosno koje su molekule u to uključene možemo samo pretpostaviti. Vjerojatno važnu ulogu imaju i određeni razvojni proteina koji bi kod karcinoma imali sličnu ili istu ulogu kao kod razvoja i rasta organizma, ali u ovom slučaju za korist tumorskih stanica.

WNT geni spadaju u skupinu visoko očuvanih, ubikvitarnih gena koji kodiraju veliku skupinu od do sada opisanih 19 proteina uključenih u čitav niz različitih staničnih procesa, od razvoja i rasta organizam, odnosno njegovih pojedinih dijelova do njihovog normalnog funkcioniranja pa do uloge u nastanku i razvoju različitih bolesti uključujući i različite karcinome, odnosno malignome. Wnt proteini su nužni za grupiranje bubrežnih progenitornih stanica, nakon čega slijedi epitelna diferencijacija, odnosno formiranje nefrona kao što je pokazano visokom Wnt-4 ekspresijom u bubregu koji se razvija (26, 28, 103). Međutim, visoka razina Wnt-4 ekspresije je nađena i u razvijenom, odraslom normalno tkivu bubrega, uglavnom u proksimalnim tubulima. U našoj studiji koristili smo normalno tkivo bubrega da bi odredili razinu Wnt-4 ekspresije u njemu, ali isto tako

da bi je usporedili s razinom ekspresije u svjetlostaničnom karcinom bubrega. U 80% makroskopski i mikroskopski zdravog tkiva naših bolesnika nađena je visoka razina Wnt-4 proteina. Ovako visoka razina ekspresije ukazuje da je Wnt-4 važan za funkcioniranje normalnog tkiva, odnosno, odraslog normalno bubrega, kao što je već ranije predložio Lancaster sa suradnicima (104).

Koja je poveznica između normalnog i karcinomskog tkiva? Karcinomi se razvijaju iz zdravog tkiva, samim time postoji jasna povezanost, pored toga pokazano je da karcinomi često koriste različite razvojne procese koji su doveli do nastanka normalnog tkiva. Svjetlostanični karcinom bubrega se razvija iz proksimalnih tubula, a upravo smo u njemu imali najvišu razinu ekspresije Wnt-4 (105).

185 bolesnika sa SSKB istraživanih u ovom radu smo podijelili u tri skupine, prva bez ekspresije, druga sa slabom i treća sa srednjom do visokom Wnt-4 ekspresijom. Kada smo usporedili ukupnu ekspresiju Wnt-4 u zdravom u odnosu na karcinomsko tkivo dobili smo statistički značajnu redukciju Wnt-4 u karcinomskom tkivu. U ranijim istraživanjima je pokazano da različiti supresori tumora kao što su p63 i p73 pozitivno djeluju na Wnt-4 ekspresiju ukazujući da je njegova prisutnost važna za normalnu homeostazu odraslog tkiva te prevenciju nastanka tumora (106, 107). Međutim, moguće je da se ova promijeni nakon što tumor nastane, odnosno napreduje prema agresivnijem obliku.

Značajan broj uzoraka karcinoma je imao visoku razinu Wnt-4 ekspresije. Kada smo usporedili Wnt-4 ekspresiju s dobro poznatim prognostičkim parametrima svjetlostaničnog karcinoma dobili smo različite rezultate. Budući da smo imali samo 9 bolesnika s Fuhrman gradusom 1 i 15 bolesnika s Fuhrman gradusom 4 oni su isključeni iz daljnjih analiza. Za ostale bolesnike nismo našli statistički značajne korelacije između Fuhrmanovog gradusa i Wnt-4 ekspresije, ali smo imali kontinuirano povećanje srednjeg intenziteta ekspresije s većim gradusom tumora, koje, iako nije bilo statistički značajno pokazuje da postoji održana ekspresija Wnt-4 te da se ista kontinuirano povećava s povećanim gradusom tumora.

Kada smo analizirali druge prognostičke faktore SSKB kao što su limfovaskularna invazija i sarkomatoidna komponenta nismo našli statistički značajnu razliku između ovih prognostičkih faktora i ekspresije Wnt-4. Međutim, našli smo statistički značajno veću ekspresiju Wnt-4 kod

tumora kod kojih je bila prisutna nekroza. Tumorska nekroza je prisutna u 20 - 60% slučajeva, ovisno o samom histološkom tipu karcinoma bubrega i povezana je s uznapredovalijim oblicima bolesti te se smatra nepovoljnim prognostičkim faktorom (108). Štoviše, zbog njezine prognostičke važnosti savjetuje se njezino rutinsko uključivanje u patohistološki nalaz (109). Budući da smo mi imali relativno kratak period praćenja bolesnika, o samoj prognostičkoj ulozi limfovaskularne invazije, sarkomatoidne komponente te tumorske nekroze kod naših bolesnika možemo samo pretpostavljati. Što se tiče povezanosti Wnt-4 i nekroze, već je ranije pokazano da Wnt put zajedno sa nekim drugim razvojnim putovima ima ključnu ulogu u oporavku i regeneraciji bubrega nakon ozljede. Moguće je da je povišena razina ekspresije reakcija na oštećenje, odnosno tumorsku ishemiju. Naime, na mišjim modelima ishemične ozljede bubrega je nađeno značajno povišenje nekoliko Wnt proteina koje je bilo u korelaciji s stupnjem ishemijske ozljede (110). Time više što je općenito prihvaćeno da tumorska nekroza nastaje kao rezultat kronične ishemijske ozljede nastale zbog brzog rasta tumora (111). Sve ovo ukazuje na povezanost tumorske nekroze i Wnt ekspresije.

Poznato je od ranije da Wnt-4 kojeg luče tumorske stanice pomaže njegovom daljnjem razvoju, odnosno njegovoj progresiji. Pokazano je također da se povišene razine Wnt-4 u serumu smanjuju nakon što se tumor resektira, odnosno odstrani (112).

Naši bolesnici sa suspektnim metastazama imali su povišenu razinu Wnt-4 ekspresije i mada nije bila statistički značajna ukazuje da svijetlostanični karcinom održava, odnosno na neki način da treba ovaj razvojni put za daljnji napredak. Također je pokazano da su promjene u Wnt signalnom putu važne za dvije osobine tumorskih stanice: otpornost prema terapiji i izbjegavanje imunološkom sustavu, što su zapravo osobine agresivnosti tumora (113).

Koja je točno uloga neke molekule i dali je moguće da je uvijek potpuno ista, odnosno jednoznačna, ili ona može biti različita, pa i oprečna ovisno o različitim varijacijama u njezinoj građi, pa samim time i funkciji, odnosno u interakciji s drugim molekulama, pa i naknadnim promjenama koje se dešavaju tijekom njezinog djelovanja i postojanja? Odgovor na ovo pitanje nije jednostavan. Naime, postoje brojne molekule koje imaju oprečne funkcije ovisno o brojnim okolnostima. Isto vrijedi i za Wnt signalni put za kojeg je pokazano da može imati nekoliko, ovisno o određenim okolnostima različitih, odnosno suprotnih uloga i da se njegova funkcija ne može svesti na

jednostavni, binarni “engl. on or off” prekidač, nego da se radi o sofisticiranom i visoko reguliranom mehanizmu koji ovisno o danim okolnostima ima brojne funkcije (114, 115).

Budući da je Wnt signalni put važan ne samo za nastanak i razvoj tumora nego i za imunološki sustav, istraživane su različite strategije i različite molekule, odnosno lijekovi koji bi djelovali na različite dijelove ovog puta (116). Neke od njih su pokazale protutumorsko djelovanje, uglavnom na karcinom dojke i kolorektalni karcinom. Neke su čak pokazale i sinergistički učinak u kombinaciji s kemoterapijom, ali niti jedna nije još odobrena za kliničku upotrebu. S druge strane postoje od ranije poznati i korišteni lijekovi koji su se koristili za neke druge bolesti kao što su niklozamid, nigericin ili psoralen koje djeluju i inhibiraju Wnt signalni put u karcinomima (117 - 119) Njihova upotreba bi mogla značajno smanjiti troškove i vrijeme potrebno za proces od razvoja lijeka do njegove upotrebe u kliničkoj praksi. Međutim, budući da je Wnt signalni put uključen u različite aktivnosti kako zdravih tako i bolesnih, odnosno karcinomskih stanica vjerojatno će specifičnije usmjeravanje terapije biti potrebno da bi se osigurala s jedne strane njezina djelotvornost, a s druge strane rizik nuspojava, odnosno neželjenih djelovanja sveo na minimum. Hoće li ovi ili neki drugi lijekovi imati mjesto u liječenju bolesnika s karcinomom bubrega te hoće li to liječenje biti vezano za Wnt-4 ekspresiju i dali će se koristiti sami ili u kombinaciji s drugim terapijskim opcijama za lokalizirani ili metastatski karcinom bubrega pokazati će budućnost (120, 121). Pretklinička, odnosno klinička istraživanja uloge, odnosno terapije Wnt puta u različitim bolestima će vjerojatno otvoriti i nove terapijske mogućnosti za bolesnike s karcinomom bubrega (122).

Kao što je već pokazano da je do značajnog napredak u razumijevanju karcinoma bubrega dovelo shvaćanje da se ne radi o jednom entitetu nego o skupu različitih tipova/podtipova tumora, od kojih svaki ima svoje različito porijeklo i predstavlja različiti genetički, histološki i klinički fenotip, isto tako je vjerojatno da se i unutar iste vrste tumora, pa i specifično za određenog bolesnika u usporedbi s drugim, čak i unutar istog tumora, oni bitno međusobno razlikuju u nekoliko važnih parametara koji određuju njihovo ponašanje (123 - 125) Naime, većinu bolesnika s karcinomom bubrega koji su po dosada dokazanim prognostičkim faktorima isti ili slični, liječimo istim ili sličnim metodama, a rezultati toga liječenja mogu se bitno razlikovati što ukazuje da su oni zapravo vrlo različiti. Ovime bi se mogle objasniti značajne razlike u ekspresije Wnt-4 koje smo imali kod naših bolesnika sa SSKB.

U ovom radu istražili smo relativno veliku grupu bolesnika sa svjetlostaničnim karcinomom bubrega različitog stadija i gradusa te je zbog izražene heterogenosti teško donijeti jasne i nedvosmislene zaključke. Ono što smo također ustanovili je postojanje heterogenosti u nekim uzorcima od istog bolesnika, što dodatno otežava analizu, odnosno interpretaciju rezultata. Usprkos tome uspjeli smo pokazati da se visoka razina ekspresije prisutna u zdravom tkivu bubrega smanjuje u tumorima niskog gradusa, da bi se zatim povećala u tumorima visokog gradusa ukazujući da je aktivacija, odnosno reaktivacija Wnt-4 puta važna za razvoj tumora. Budući da je većina naših bolesnika imala stadij 1 i 2 bolesti sa relativno kratkim periodom praćenja, možemo samo spekulirati o mogućoj ulozi Wnt-4 ekspresije kao predskazatelja preživljenja bolesnika sa SSKB. Ovaj relativno kratki period praćenja bolesnika, kao i korištenje samo imunohistokemije mogu se smatrati kao relativni nedostaci ovog istraživanja. Pored toga imali smo relativno mali broj bolesnika sa svjetlostaničnim karcinomom bubrega visokog gradusa kod kojeg bi se mogla očekivati drugačija razina Wnt-4 ekspresije, ali to se može objasniti značajnim smanjenjem stadija bolesti zbog široke upotrebe različitih slikovnih metoda koje su dovele do otkrivanja velikog broja karcinoma bubrega u ranom stadiju, kao što je i napisano u uvodu ovog rada.

Wnt-4 ekspresija u svjetlostaničnom karcinomu bubrega, kao u ostalom i u drugim bubrežnim, odnosno malignim bolestima je kompleksna i ne jednoznačna. Godine istraživanja su pokazale da ništa nije bazično i jednostavno u ovom putu. Wnt proteini su možda jedan od najstarijih signalnih putova u životinjskom carstvu i njihova biokemija te mehanizam djelovanja su fascinantna priča o multifunkcionalnosti i varijabilnosti razvojne biologije (15). Zbog svega navedenog njihova uloga u karcinomu bubrega vjerojatno je vrlo složena te su potrebna daljnja istraživanja da bi se razjasnila uloga pojedinih dijelova, ali i cijelog Wnt puta, odnosno Wnt-4 proteina kao molekularne mete za dijagnozu i terapiju SSKB.

9. ZAKLJUČCI

- visoka razina ekspresije Wnt-4 je nađena u zdravom tkivu bubrega, odnosno u zdravim proksimalnim tubulima.
- određena razina ekspresije je također nađena u uzorcima SSKB. Međutim ona je bila dosta heterogena u uzorcima SSKB naših bolesnika.
- kod SSKB koji su bili niskog gradusa prosječna razina ekspresije je bila niža, dok je kod karcinoma visokog gradusa prosječna razina ekspresije bila viša.
- kod bolesnika koji su imali klinički suspektne metastaze nađena je viša razina Wnt-4 proteina u odnosu na bolesnike bez metastaza.
- analizom ostalih prognostičkih faktora kao što su prisutnost sarkomatoidne komponente i limfovaskularne invazije nismo našli povezanost između ovih faktora i razine ekspresije, međutim našli smo statistički značajnu povezanost između nekroze tumora kao negativnog prognostičkog faktora i razine ekspresije Wnt-4.
- analizom preživljenja bolesnika potvrdili smo da do sada dokazani prognostički faktori kao što su TNM status i Furhmanov gradus tumora utječu na preživljenje bolesnika. Ovakvo djelovanje nismo dokazali za Wnt-4 ekspresiju moguće i zbog relativno kratkog perioda praćenja bolesnika, odnosno relativno malog broja bolesnika sa SSKB visokog gradusa i stadija bolesti.
- uloga Wnt puta, odnosno Wnt-4 proteina u SSKB vjerojatno je vrlo složena te su potrebna daljnja istraživanja da bi se ona razjasnila.

10. SAŽETAK

Uvod: Svjetlostanični karcinom bubrega je najčešća varijanta karcinoma bubrega koja usprkos širokoj upotrebi slikovnih dijagnostičkih metoda koje su dovele do njegovog ranijeg otkrivanja, uzrokuje značajan morbiditet i mortalitet.

Ciljevi istraživanja: Istražiti ekspresiju Wnt-4 u normalnom tkivu bubrega te je usporediti sa ekspresijom u svjetlostaničnom karcinomu bubrega. Usporediti ekspresiju Wnt-4 s parametrima koji su važni za prognozu i liječenje bolesnika. Pratiti bolesnike u vremenskom periodu od minimalno godinu dana te usporedit ekspresiju i eventualnu progresiju, povrat bolesti i preživljenje bolesnika.

Nacrt studije: Retrospektivno, kohortno istraživanje.

Materijal i metode: Istraživali smo ulogu Wnt-4 proteina kod 185 bolesnika sa SSKB koji su liječeni na Klinici za urologiju KBC Zagreb od 1. 1. 2016. do 31. 12. 2018. godine. Za ekspresiju Wnt-4 koristili smo imunohistokemijsku metodu. Prikupili smo i analizirali opće i kliničke podatke bolesnika uključujući i vrstu liječenja te patohistološke rezultate.

Rezultati: Našli smo visoku razinu ekspresije Wnt-4 u zdravom tkivu bubrega u proksimalnim tubulima, ali i u karcinomskom tkivu. Iako je razina ekspresije bila heterogena u uzorcima karcinoma od različitih bolesnika, pa i unutar karcinoma od istih bolesnika, u načelu smo našli nižu razinu u karcinomima nižeg gradusa te višu u karcinomima višeg gradusa što ukazuje da je Wnt-4 protein važan za nastanak i razvoj SSKB. Također smo višu razinu ekspresije našli kod bolesnika koji su imali klinički suspektne metastaze, u odnosu na bolesnike bez metastaza što ukazuje da Wnt-4 protein ima važnu ulogu u metastaziranju SSKB. Za ostale dokazane prognostičke faktore SSKB kao što su prisutnost sakromatoidne komponente i limfovaskularnu invaziju nismo našli povezanost, ali smo našli statistički značajnu povezanost između nekroze tumora kao negativnog prognostičkog markera SSKB i razine Wnt-4 ekspresije, što ukazuje na moguću prognostičku ulogu Wnt-4. Analizom preživljenje bolesnika nismo našli povezanost Wnt-4 ekspresije i preživljenja bolesnika moguće i zbog relativno kratkog perioda praćenja, odnosno relativno malog broja bolesnika sa SSKB visokog gradusa i stadija bolesti za koje se može očekivati lošije preživljenje u kraćem vremenskom periodu.

Zaključak: Wnt put je jedan od najstarijih razvojnih bioloških putova i njegova je uloga vrlo složena, višeznačna, a često i suprotna, u različitim okolnostima što ovisi o brojnim faktorima. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se uloga Wnt puta, odnosno Wnt-4 proteina do kraja razjasnila i da bi se mogli donijeti jasni i nedvosmisleni zaključci.

Ključne riječi: Svijetlostanični karcinom bubrega, Wnt-4 protein, Imunohistokemija, Ishod liječenja

11. SUMMARY

Introduction: The progress in medical research and the wide use of imaging methods led to an earlier diagnosis of the most common variant of renal carcinoma, the clear cell renal carcinoma (ccRCC). However, despite the mentioned progress in diagnostic tools, ccRCC still causes significant mortality.

Objectives: Investigate the expression of Wnt-4 in normal kidney tissue and to compare it with the expression in ccRCC. To compare the expression of Wnt-4 with parameters that are important for prognosis and treatment of patients. Monitor patients for a period of at least one year and compare the expression and possible progression, return of the disease and patient survival.

Study design: Retrospective cohort studies.

Material and methods: We investigated the role of Wnt-4 proteins in 185 patients with ccRCC, who were treated at the University Hospital Centre Zagreb Urology Clinic in the period from January 1, 2016 to December 31, 2018. We used the immunohistochemistry to prove the expression of Wnt-4. We collected and analyzed the patients' anamnestic and clinical data, including the type of treatment and histopathological results.

Results: High level of Wnt-4 expression was found in proximal tubules of healthy kidneys, as well as in ccRCC specimens. Even though the heterogeneity of Wnt-4 expression was found in ccRCC specimens from different patients, as well as in specimens from the same patient, in general, the lower levels of Wnt-4 expression were found in low-grade carcinomas and the higher levels in higher-grade carcinomas, indicating that the Wnt-4 protein might potentially be important for the formation and development of ccRCC. Also, the higher levels of expression were found in patients who had clinically suspected metastases, compared to patients without metastases, indicating that the Wnt-4 protein might play an important role in ccRCC metastases. In the cases of other proven prognostic factors of ccRCC, such as the presence of a sarcomatoid component and lymphovascular invasion, a correlation was not determined. However, a statistically significant connection between the tumor necrosis, as a negative prognostic marker of ccRCC, and the level of Wnt-4 expression was found, which indicates a possible prognostic role of Wnt-4. Furthermore, no significant correlation between patient survival and Wnt-4 expression was determined. Some of the potential

explanations might be a relatively short follow-up period, as well as a relatively small patients sample, considering the high mortality of the disease.

Conclusion: The Wnt pathway is one of the oldest developmental biological pathways. The role of Wnt-4 has already been proven to be very complex, and its role depends on biological context. It seems that the role of Wnt-4 in ccRCC might also be a complex one. Thus, there is a need for further research that will fully clarify the role of the Wnt pathway, that is, the Wnt-4 protein, and enable clear and unambiguous conclusions.

Keywords: Clear cell renal carcinoma, Wnt-4 protein, Immunohistochemistry

12. LITERATURA

1. Krmpotic-Nemanić J. Mokraćni organi i razvoj spolnih organa. U: Krmpotic-Nemanić J. Anatomija čovjeka. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 1993. str. 831-5.
2. Partin AW, Dmochowski RR, Kavoussi LR, Peters CA, Wein A, urednici. Campbell-Walsh Wein Urology. [internet]. 12th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020 [citirano 20. listopada 2022.].
3. Nyengaard JR, Bendtsen TF. (1992). Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec.* 1992 Feb;232(2):194-201. doi: 10.1002/ar.1092320205. PMID: 1546799.
4. Jungueira LC, Carneiro J. Basic histology: text and atlas. 10. izd. Bradamante Ž, Kostović-Knežević Lj, urednici hrvatskog izdanja. Osnove histologije: udžbenik i atlas prema desetome američkom izdanju. Zagreb, Školska knjiga, 2005.
5. Duančić V. Osnove embriologije čovjeka. Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, Vjesnik, Zagreb, 1983, str.130-4.
6. Clapp WL, Croker BP. Kidney, u *Histology for pathologists*, 3rd edition, Mills SE (ur), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007, str. 839-95.
7. Sadler, T.W. Langmanova medicinska embriologija, prijevod desetog izdanja. Školska knjiga; 2008.
8. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* 2012 Jun 13;31(12):2714-36. doi: 10.1038/emboj.2012.150. Epub 2012 May 22. PMID: 22617422; PMCID: PMC3380220.
9. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium.* 2005 Sep-Oct;38(3-4):439-46. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.022. PMID: 16099039.
10. Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S, i sur. Wnt signaling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development.* 2003 Aug;130(15):3503-14. doi: 10.1242/dev.00538. PMID: 12810597.
11. Colozza G, Koo BK. Wnt/ β -catenin signaling: Structure, assembly and endocytosis of the signalosome. *Dev Growth Differ.* 2021 Apr;63(3):199-218. doi: 10.1111/dgd.12718. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33619734; PMCID: PMC8251975.
12. Nusse R, Lim X. The Wnt home page. Dostupno na adresi: <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/node/269>. Datum pristupa: 20. 10. 2022.

13. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003 Jul 1;116(Pt 13):2627-34. doi: 10.1242/jcs.00623. PMID: 12775774.
14. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2002;3(1):REVIEWS3001. doi: 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001. Epub 2001 Dec 28. PMID: 11806834; PMCID: PMC150458.
15. Gilbert SF. Cell-cell communication in development. U: Gilbert SF. *Developmental Biology* Seventh Edition, urednik. Sunderland SAD: Sinauer Associates Inc.; 2003. str. 143-180.
16. Weinberg RA. Cytoplasmic signaling circuitry programs many of the traits of cancer. U: *The biology of cancer.* Garland Science. New York, SAD: Taylor & Francis; 2007. str. 159-208.
17. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell.* 2002 May;2(5):643-53. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00167-3. PMID: 12015971.
18. De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2004 Mar-Apr;10(3-4):393-401. doi: 10.1089/107632704323061753. PMID: 15165456.
19. Nostro MC, Cheng X, Keller GM, Gadue P. 2008. Wnt, Activin, and BMP Signaling Regulate Distinct Stages in the Developmental Pathway from Embryonic Stem Cells to Blood. *Cell Stem Cell.* 2(1):60-71.
20. van Schie EH, van Amerongen R. Aberrant WNT/CTNNB1 Signaling as a Therapeutic Target in Human Breast Cancer: Weighing the Evidence. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:25.
21. Runkle KB i Witze ES. Wnt-dependent Control of Cell Polarity in Cultured Cells. U *Wnt Signaling Methods and Protocols.* Urednici: Barrett Q i Lum L. Springer Science + Business Media New York 2016. Str. 61-69.
22. Feng Y, Wang Y, Guo K, Feng J, Shao C, Pan M i sur. The value of WNT5A as prognostic and immunological biomarker in pan-cancer. *Ann Transl Med* 2022 Apr;10(8):466.
23. Wei M, Zhang C, Tian Y, Du X, Wang Q, Zhao H. Expression and Function of WNT6: From Development to Disease. *Front Cell Dev Biol* 2020 Dec 9;8:558155.
24. Noda M, Vallon M, Kuo CJ. The Wnt7's Tale: A story of an orphan who finds her tie to a famous family. *Cancer Sci* 2016 May;107(5):576-82.
25. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P i sur. Up-Regulation of WNT-4 Signaling and Dosage-Sensitive Sex Reversal in Humans *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68:1102-1109.

26. Wang Y, Zhou CJ, Liu Y. Wnt Signaling in Kidney Development and Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;153:181-207. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.11.019.
27. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4 *Nature* 1994;372(6507):679-83
28. Kamei CN, Gallegos TF, Liu Y, Hukriede N, Drummond IA. Wnt signaling mediates new nephron formation during zebrafish kidney regeneration. *Development.* 2019;146(8):dev168294. doi: 10.1242/dev.168294.
29. Valerius TM, McMahon AP. Transcriptional profiling of Wnt4 mutant mouse kidneys identifies genes expressed during nephron formation. *Gene Expr Patterns* 2008;8(5):297-306. doi: 10.1016/j.gep.2008.02.001.
30. Price KL, Kolatsi-Joannou M, Mari C, Long DA, Winyard PJD. Lithium induces mesenchymal-epithelial differentiation during human kidney development by activation of the Wnt signaling system. *Cell Death Discov.* 2018;4:13. doi: 10.1038/s41420-017-0021-6.
31. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P i sur. Up-Regulation of WNT-4 Signaling and Dosage-Sensitive Sex Reversal in Humans *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68:1102–1109.
32. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 2004 Aug 19;351(8):792-8.
33. Brisken C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK i sur. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev.* 2000 Mar 15;14(6):650-4.
34. Huguet EL, McMahon AJ, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res* 1994 May 15;54(10):2615-21.
35. Grainger S, Traver D, Willert K. Wnt Signaling in Hematological Malignancies. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;153:321-341. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.11.002.
36. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa F. Genetic Causes of Functional Adrenocortical Adenomas. *Endocr Rev.* 2017;38:516-537. doi: 10.1210/er.2017-00189.

37. Peng C, Lu Y, Ren X, Wang Y, Zhang S, Chen M i sur. Comprehensive bioinformatic analysis of Wnt1 and Wnt1-associated diseases. *Intractable Rare Dis Res.* 2020;9:14-22. doi: 10.5582/irdr.2020.01018.
38. Tokar EJ, Person RJ, Sun Y, Perantoni AO, Waalkes MP. Chronic exposure of renal stem cells to inorganic arsenic induces a cancer phenotype. *Chem Res Toxicol.* 2013;26:96-105. doi: 10.1021/tx3004054.
39. Scelo G, Larose TL. Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(36):JCO2018791905. doi: 10.1200/JCO.2018.79.1905.
40. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H i sur. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49:1374-403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
41. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj. [pristupljeno 10.8.2020.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2017-final.pdf>
42. Ferlay J et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*, 2018. 103: 356.
43. Tahbaz R, Schmid M, Merseburger AS. Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: lifestyle, medication and nutrition. *Curr Opin Urol.* 2018;28:62-79. doi: 10.1097/MOU.0000000000000454.
44. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):372-7.
45. Makler HR, Malker BK, McLaughlin JK, Blot WJ. Kidney cancer among leather workers. *Lancet* 1984;1:56-57.
46. Maclure M. Asbestos and renal adenocarcinoma: a case-control study. *Environ Res* 1987;42:353-361.
47. Nicodemus KK, Sweeney C, Folsom AR. Evaluation of dietary, medical and lifestyle risk factors for incident kidney cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer.* 2004;108(1):115-21. Al-Bayati, O., et al. Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer. *Urol Oncol*, 2019. 37: 359.
48. Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 2003; 170: 2163-72. doi: 10.1097/01.ju.0000096060.92397.ed.

49. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Jarvholm B. Obesity, hypertension and the risk of Kidney cancer in men. *N Engl J Med* 2000;343:1305-11.
50. Capitanio, U., et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*, 2019. 75: 74.
51. Dos Santos Silva I. *Cancer Epidemiology: Principles and Methods*; Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1999. str. 355 - 384.
52. Novara, G., et al. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Eur Urol*, 2010. 58: 588.
53. Lieder A, Guenzel T, Lebentrau S, Schneider C and Franzen A. Diagnostic relevance of metastatic renal cell carcinoma in the head and neck: An evaluation of 22 cases in 671 patients. *Int Braz J Urol*. 2017;43:202-208.doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0665.
54. Patard, J.J., et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2003. 44: 226.
55. Sacco, E., et al. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol Int*, 2009. 83:
56. Kim, H.L., et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol*, 2003. 170: 1742. Park BJ, Seaman SC, Noeller JL, Smith MC, Hasan DM, Yasin H. Metastatic renal cell carcinoma to the spine: outcomes and morbidity: since-center experience. *World Neurosurg*. 2021;154:398-405. doi: 10.1016/j.wneu.2021.07.041.
57. European Association of Urology. EAU guidelines on Renal Cell Carcinoma. Dostupno na adresi: https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/#note_96. [Pristupljeno 7.3.2021.].
58. van Oostenbrugge TJ, Fütterer JJ, Mulders PFA. Diagnostic Imaging for Solid Renal Tumors: A Pictorial Review. *Kidney Cancer*. 2018 Aug 1;2(2):79-93. doi: 10.3233/KCA-180028. PMID: 30740580; PMCID: PMC6364093.
59. Siemer S, Uder M, Humke U, Lindenmeier T, Moll V, Rüdener E, i sur. Stellenwert der Sonographie in der Frühdiagnostik des Nierenzellkarzinoms [Value of ultrasound in early diagnosis of renal cell carcinoma]. *Urologe A*. 2000 Mar;39(2):149-53. German. doi: 10.1007/s001200050023. PMID: 10768225.
60. Jamis-Dow CA, Choyke PL, Jennings SB, Linehan WM, Thakore KN, Walther MM (1996) Small (≤ 3 cm) renal masses: detection with CT versus US and pathologic correlation. *Radiology* 198:758-788.

61. Forman HP, Middleton WD, Melson GL, McClennan BL. Hyperechoic renal cell carcinoma; increase in detection at US. *Radiology* 1993;188:431-4. doi: 10.1148/radiology.188.2.8327692.
62. Barr RG, Peterson C, Hindi A. Evaluation of indeterminate renal masses with contrast-enhanced US: a diagnostic performance study. *Radiology*. 2014;271:133-43. doi: 10.1148/radiol.13130161.
63. Zhang J, Lefkowitz RA, Ishill NM, Wang L, Moskowitz CS, Russo P i sur. *Radiology* 2007;244:494-504. doi: 10.1148/radiol.2442060927.
64. Ozkan U, Oguzkurt L, Tercan F, Kizilkilic O, Koc Z, Koca N. Renal artery origins and variations: angiographic evaluation of 855 consecutive patients. *Diagn Interv Radiol*. 2006;12:183-6.
65. European Association of Urology. EAU guidelines on Renal Cell Carcinoma. Dostupno na adresi: https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/#note_69[tps://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma](https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma). [Pristupljeno 7. 3. 2021.].
66. Perazella MA. Gadolinium-contrast toxicity in patients with kidney disease: nephrotoxicity and nephrogenic systemic fibrosis. *Curr Drug Saf*. 2008;3:67-75. doi: 10.2174/157488608783333989.
67. Defortescu, G., et al. Diagnostic performance of contrast-enhanced ultrasonography and magnetic resonance imaging for the assessment of complex renal cysts: A prospective study. *Int J Urol*, 2017. 24: 184.
68. Semelka RC, Hricak H, Stevens SK, Finegold R, Tomei E, Carroll PR. Combined gadolinium-enhanced and fat-saturation MR imaging of renal masses. *Radiology* 1991;178:803-9. doi: 10.1148/radiology.178.3.1994422.
69. Ljungberg, B. et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur. Urol*. 67(5), 913–924 (2015).
70. Larcher A, Muttin F, Fossati N, Dell'Oglio P, Di Trapani E, Stabile A i sur. When to perform preoperative bone scintigraphy for kidney cancer staging: indications for preoperative bone scintigraphy. *Urology* 2017;110:114-20. doi: 10.1016/j.urology.2017.08.043.
71. Divgi CR, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, Reuter VE, Gonen M, Ruan S i sur. Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric

- G250 (124I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial. *Lancet Oncol* 2007;8:304-10. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70044-X.
72. Lazaro M, Valderrama BP, Suarez C, de-Velasco G, Beato C, Chirivella I, i sur. SEOM clinical guidelines for treatment of kidney cancer (2019). *Clin Transl Oncol*. 2020;22:256-69. doi: 10.1007/s12094-019-02285-7.
73. Richard PO, Jewett MA, Bhatt JR, Kachura JR, Evans AJ, Zlotta AR, Hermanns T, Juvet T, Finelli A. Renal Tumor Biopsy for Small Renal Masses: A Single-center 13-year Experience. *Eur Urol*. 2015 Dec;68(6):1007-13. doi: 10.1016/j.eururo.2015.04.004. Epub 2015 Apr 18. PMID: 25900781.
74. Leibovitch I, Raviv G, Mor Y, Nativ O, Goldwasser B. Reconsidering the necessity of ipsilateral adrenalectomy during radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urology*. 1995;46:316-20. doi: 10.1016/S0090-4295(99)80213-1.
75. von Knobloch R, Schrader AJ, Walthers EM, Hofmann R. Simultaneous adrenalectomy during radical nephrectomy for renal cell carcinoma will not cure patients with adrenal metastasis. *Urology*. 2009 Feb;73(2):333-6. doi: 10.1016/j.urology.2008.09.037. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19038420.
76. Blom JHM, van Poppel H, Marechal JJ, Jacqmin D, Schroder 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. *Eur Urol*. 2009;55:28-34. doi: 10.1016/j.eururo.2008.09.052.
77. Brufau BP, Cerqueda CS, Villalba LB, Izquierdo RS, Gonzalez BM i Molina CN. Metastatic renal cell carcinoma: radiologic findings and assessment of response to targeted antiangiogenic therapy by using multidetector CT. *Radiographics*. 2013;33:1691-716. doi: 10.1148/rg.336125110.
78. Xia L, Wang X, Xu T Guzzo TJ. Systematic Review and Meta-Analysis of Comparative Studies Reporting Perioperative Outcomes of Robot-Assisted Partial Nephrectomy Versus Open Partial Nephrectomy. *J Endourol*. 2017;Sep;31(9):893-909. doi: 10.1089/end.2016.0351.
79. Gansler T, Fedewa S, Mahul BM, Lin CC, Jemal A. Trends in reporting histological subtyping of renal cell carcinoma: association with cancer center type. *Hum Pathol*. 2018;74:99-108. doi: 10.1016/j.humpath.2018.01.010.

-
80. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93-105. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029. Epub 2016 Feb 28. PMID: 26935559.
 81. Klatte T, Rossi SH, Stewart GD. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol*. 2018 Dec;36(12):1943-1952. doi: 10.1007/s00345-018-2309-4. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29713755.
 82. Keegan KA, Schupp CW, Chamie K, Hellenthal NJ, Evans CP, Koppie TM. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by subtype and stage. *J Urol*. 2012 Aug;188(2):391-7. doi: 10.1016/j.juro.2012.04.006. Epub 2012 Jun 13. PMID: 22698625; PMCID: PMC3714400.
 83. Chevillet JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:612-24. doi: 10.1097/00000478-200305000-00005.
 84. Ito K, Seguchi K, Shimazaki H, Takahashi E, Tasaki S, Kuroda K. Tumor necrosis is a strong predictor for recurrence in patients with pathological T1a renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2015;1:125-130. doi: 10.3892/ol.2014.2670.
 85. Belsante M, Darwish O, Youssef R, Bagrodia A, Kapur P, Sagalowsky A. Lymphovascular invasion in clear cell renal cell carcinoma--association with disease-free and cancer-specific survival. *Urol Oncol* 2014;32:30.e23-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2012.11.002.
 86. Bedke J, Heide J, Ribback S, Rausch S, de Martino M, Scharpf M i sur. Microvascular and lymphovascular tumour invasion are associated with poor prognosis and metastatic spread in renal cell carcinoma: a validation study in clinical practice. *BJU Int* 2018;121:84-92. doi: 10.1111/bju.13984.
 87. Winer AG, Motzer RJ, Hakimi AA. Prognostic biomarkers for response to vascular endothelial growth factor-targeted therapy for renal cell carcinoma. *Urol Clin N Am* 2016;95:104.
 88. Thiry A, Dogne JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27:566-73. doi: 10.1016/j.tips.2006.09.002.

89. Genega EM, Ghebremichael M, Najarian R, Fu Y, Wang Y, Argani P i sur. Carbonic Anhydrase IX Expression in Renal Neoplasms: Correlation with Tumor Type and Grade. *Am J Clin Pathol* 2010;134:873-9. doi: 10.1309/AJCPPPR57HNJMSLZ.
90. Malkin D, Lio FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim HD, i sur. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.
91. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology*. 2004;63(4):651-5. doi: 10.1016/j.urology.2003.11.011.
92. Weinberg RA. p53 and Apoptosis: Master Guardian and Executioner. U: Weinberg RA, urednik. *The biology of cancer*. New York, SAD: Garland Science Taylor & Francis. str. 307-56.
93. Ma MZ, Zhuang C, Yang XM, Zhang ZZ, Ma H, Zhang WM, You H, Qin W, Gu J, Yang S, Cao H, Zhang ZG. CTHRC1 acts as a prognostic factor and promotes invasiveness of gastrointestinal stromal tumors by activating Wnt/PCP-Rho signaling. *Neoplasia*. 2014 Mar;16(3):265-78, 278.e1-13. doi: 10.1016/j.neo.2014.03.001. Epub 2014 Apr 13. PMID: 24726140; PMCID: PMC4094796.
94. Zhang Q, Pan Y, Ji J, Xu Y, Zhang Q, Qin L. Roles and action mechanisms of WNT4 in cell differentiation and human diseases: a review. *Cell Death Discov*. 2021;7:287. doi: 10.1038/s41420-021-00668-w.
95. Rossi SH, Klatte T, Stewart GD. Quality of life outcomes in patients with localised renal cancer: a literature review. *World J Urol*. 2018;36:1961-72. doi: 10.1007/s00345-018-2415-3.
96. European Association of Urology. EAU guidelines on Renal Cell Carcinoma. Dostupno na adresi: <https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/#8>. [[Pristupljeno 7. 3.2021.].
97. Kolčić I, Vorko-Jović A. *Epidemiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
98. Ljungberg B, Albiges L, Bensalah K, Bex A, Giles RH, Hora M, i sur. Renal Cell Carcinoma. *EUA guidelines 2020*. [citirano 7.3.2021.]. Dostupno na URL: <https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/>.
99. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, i sur. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World J Oncol*. 2020 Jun;11(3):79-87. doi: 10.14740/wjon1279. Epub 2020 May 14. PMID: 32494314; PMCID: PMC7239575.

-
100. Khor LY, Tan PH. Diagnostic Biomarkers in Eosinophilic Renal Neoplasms. *Urol Clin North Am.* 2016 Feb;43(1):87-94. doi: 10.1016/j.ucl.2015.08.008. PMID: 26614031.
101. Winer AG, Motzer RJ, Hakimi AA. Prognostic Biomarkers for Response to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy for Renal Cell Carcinoma. *Urol Clin North Am.* 2016 Feb;43(1):95-104. doi: 10.1016/j.ucl.2015.08.009. Epub 2015 Oct 31. PMID: 26614032; PMCID: PMC4864362.
102. Safikhani Z, Smirnov P, Thu KL, Silvester J, El-Hachem N, Quevedo R, i sur. Gene isoforms as expression-based biomarkers predictive of drug response in vitro. *Nat Commun.* 2017;8:1126. doi: 10.1038/s41467-017-01153-8.
103. Vainio SJ. Nephrogenesis regulated by Wnt signaling. *J Nephrol.* 2003 Mar-Apr;16(2):279-85. PMID: 12768078.
104. Lancaster MA, Louie CM, Silhavy JL, Sintasath L, Decambre M, Nigam SK, Willert K, Gleeson JG. Impaired Wnt-beta-catenin signaling disrupts adult renal homeostasis and leads to cystic kidney ciliopathy. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1046-54. doi: 10.1038/nm.2010. Epub 2009 Aug 30. PMID: 19718039; PMCID: PMC2895985.
105. Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark.* 2010;9(1-6):461-73. doi: 10.3233/CBM-2011-0176. PMID: 22112490; PMCID: PMC3308682.
106. Osada M, Park HL, Nagakawa Y, Begum S, Yamashita K, Wu G i sur. A novel response element confers p63- and p73-specific activation of the WNT4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ;339:1120-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.11.118.
107. Wan X, Ji W, Mei X, Zhou J, Liu JX, Fang C i sur. Negative feedback regulation of Wnt4 signaling by EAF1 and EAF2/U19. *PLoS One.* 2010; 5:e9118. doi: 10.1371/journal.pone.0009118.
108. Klatter T, Said JW, de Martino M, Larochelle J, Shuch B, Rao JY, Thomas GV, Kabbinavar FF, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Presence of tumor necrosis is not a significant predictor of survival in clear cell renal cell carcinoma: higher prognostic accuracy of extent based rather than presence/absence classification. *J Urol.* 2009 Apr;181(4):1558-64; discussion 1563-4. doi: 10.1016/j.juro.2008.11.098. Epub 2009 Feb 23. PMID: 19230920.
109. Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS, i sur. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer* 2005;104:511-20. doi.org/10.1002/cncr.21206.

-
110. Xiao L, Zhou D, Tan RJ, Fu H, Zhou L, Hou FF. Sustained Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Drives AKI to CKD Progression. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:1727-40. Doi: 10.1681/ASN.2015040449.
111. Caruso RA, Branca G, Fedele F, Irato E, Finocchiaro G, Parisi A, Ieni A. Mechanisms of coagulative necrosis in malignant epithelial tumors (Review). *Oncol Lett*. 2014 Oct;8(4):1397-1402. doi: 10.3892/ol.2014.2345. Epub 2014 Jul 11. PMID: 25202341; PMCID: PMC4156238.
112. Yang D, Li Q, Shang R, Yao L, Wu L, Zhang M, Zhang L, Xu M, Lu Z, Zhou J, Huang L, Huang X, Cheng D, Yang Y, Yu H. WNT4 secreted by tumor tissues promotes tumor progression in colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020 Nov 23;39(1):251. doi: 10.1186/s13046-020-01774-w. PMID: 33222684; PMCID: PMC7682076.
113. Martin-Orozco E, Sanchez-Fernandez A, Ortiz-Parra I, Ayala-San Nicolas M. WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Front Immunol*. 2019 Dec 20;10:2854. doi: 10.3389/fimmu.2019.02854. PMID: 31921125; PMCID: PMC6934036.
114. Flanagan DJ, Vincan E, Pesse TJ. Wnt Signaling in Cancer: Not a Binary ON:OFF Switch. *Cancer Res*. 2019 Dec 1;79(23):5901-5906. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1362. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31431458.
115. Wiese KE, Nusse R, van Amerongen R. Wnt signalling: conquering complexity. *Development*. 2018; 145:dev165902. doi: 10.1242/dev.165902.
116. Wang Z, Zhao T, Zhang S, Wang J, Chen Y, Zhao H, Yang Y, Shi S, Chen Q, Liu K. The Wnt signaling pathway in tumorigenesis, pharmacological targets, and drug development for cancer therapy. *Biomark Res*. 2021 Sep 6;9(1):68. doi: 10.1186/s40364-021-00323-7. PMID: 34488905; PMCID: PMC8422786.
117. Liu F, Li W, Hua S, Han Y, Xu Z, Wan D, Wang Y, Chen W, Kuang Y, Shi J, Zhi Q. Nigericin Exerts Anticancer Effects on Human Colorectal Cancer Cells by Inhibiting Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. *Mol Cancer Ther*. 2018 May;17(5):952-965. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0906. Epub 2018 Feb 26. PMID: 29483216.
118. Lu W, Lin C, Roberts MJ, Waud WR, Piazza GA, Li Y. Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/ β -catenin

- pathway. *PLoS One*. 2011;6(12):e29290. doi: 10.1371/journal.pone.0029290. Epub 2011 Dec 16. PMID: 22195040; PMCID: PMC3241710.
119. Wang X, Xu C, Hua Y, Cheng K, Zhang Y, Liu J, Han Y, Liu S, Zhang G, Xu S, Yang Z. Psoralen induced cell cycle arrest by modulating Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2018 Sep 18;8(1):14001. doi: 10.1038/s41598-018-32438-7. PMID: 30228287; PMCID: PMC6143618.
120. Massari F, Rizzo A, Mollica V, Rosellini M, Marchetti A, Ardizzoni A, Santoni M. Immune-based combinations for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2021 Sep;154:120-127. doi: 10.1016/j.ejca.2021.06.015. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34265504.
121. Massari F, Mollica V, Rizzo A, Cosmai L, Rizzo M, Porta C. Safety evaluation of immune-based combinations in patients with advanced renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf*. 2020 Oct;19(10):1329-1338. doi: 10.1080/14740338.2020.1811226. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32799582.
122. Goswami VG, Patel BD. Recent updates on Wnt signaling modulators: a patent review (2014-2020). *Expert Opin Ther Pat*. 2021 Nov;31(11):1009-1043. doi: 10.1080/13543776.2021.1940138. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34128760.
123. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet*. 2009 Mar 28;373(9669):1119-32. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60229-4. Epub 2009 Mar 5. PMID: 19269025.
124. Renshaw AA. Subclassification of renal cell neoplasms: an update for the practising pathologist. *Histopathology*. 2002 Oct;41(4):283-300. doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01420.x. PMID: 12383210.
125. Zambrano NR, Lubensky IA, Merino MJ, Linehan WM, Walther MM. Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *J Urol*. 1999;162:1246-58.

13. ŽIVOTOPIS

Oliver Pavlović, dr. med, specijalist urologije, subspecijalist urolitijaze

Pročelnik Zavoda za urologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek

Adresa stanovanja: Ledine 12, 31000 Osijek, Hrvatska
obitelj.pavlovic@gmail.com
GSM: +385 (0) 98711221

Adresa zaposlenja: Zavod za urologiju
Klinički bolnički centar Osijek
J. Huttlera 4
31000 Osijek, Hrvatska

oliver.pavlovic@kbco.hr
telefon: +385 (0) 31511401

Datum i mjesto rođenja: 2. srpnja 1976.
Kakanj, Bosna i Hercegovina

Obrazovanje:

2009 . Specijalist urologije

2009. Stručni postdiplomski studij u sklopu specijalizacije urologije, Medicinski fakultet Zagreb

2015. Uža specijalizacija Urolitijaza

2019. Postdiplomski doktorski studij biomedicina i zdravstvo na MEFOS-u.

Funkcije: Pročelnik Zavoda za Urologiju KBC Osijek 2016. -
Rizničar HLZ podružnice Osijek 2016. - 2021.
Predsjednik Savjeta za zdravstvo Župana Osječko - baranjske - županije
2019.-2021.

Dopredsjednik Savjeta Župana za zdravstvo, socijalnu skrb i hrvatske branitelje 2021. -
Prvi dopredsjednik HLZ podružnice Osijek 2021.-

Zaposlenja:

- 2002 - 2003 liječnik sekundarac na Odjelu za patologiju, Opća bolnica Josip Benčević, Slavonski Brod, Hrvatska
- 2003 - 2004. liječnik sekundarac na Odjelu za radiologiju, Opća bolnica Josip Benčević, Slavonski Brod, Hrvatska
- 2004 -2009. specijalizant urologije
2009. - specijalist urologije
2015. - subspecijalist iz Urolitijaze
2016. - Asistent u naslovnom zvanju na Medicinskom fakultetu Osijek (MEFOS)
2019. - Asistent na MEFOS-u u kumulativnom radnom odnosu

Članstva:

Hrvatska liječnička komora (HLK) - član i zastupnik u skupštini
European Urological Association (EAU) - aktivno članstvo
Hrvatsko urološko društvo (HUD),
Hrvatski liječnički zbor (HLZ), član i prvi dopredsjednik u podružnici HLZ Osijek
Hrvatsko katoličko liječničko društvo (HKLD)
Udruga Pro Futuro Osijek - predsjednik

Računalne vještine:

Vladanje alatima Microsoft Office™, pretraživanje baza podataka i interneta

Strani jezici: Engleski jezik, Njemački jezik

**Tečajevi,
kongresi,**

- 7. osječki urološki dani, od 11. do 13. listopada 2007., organizacijski odbor
- 8. Osječki urološki dani, 2009.organizacijski odbor
- 9.osječki urološki dani, 2. osječki nefrološki dani, 22. do 24. rujan 2011.organizacijski odbor
- EAU 10th Central European Meeting, 26 – 27 October 2007, Zagreb, Hrvatska, aktivno sudjelovanje
- Dijagnostičke i terapijske dileme kod karcinoma prostate, tečaj 1. Kategorije, 17. i18. listopad 2008. Medicinski fakultet Osijek,
- Parkinsonova bolest i bolesti pokreta, 9. i 10. 2012, „, tečaj 1. kategorije, Medicinski fakultet Osijek.
- Prezentacijske vještine, Gentis trening, Fužine, 2012.
- Nove spoznaje u dijagnostici i liječenju vrtoglavica, 18. I 19. Listopada 2013. tečaj 1. Kategorije, 17. i18. listopad 2008. Medicinski fakultet Osijek.
- Laparoscopic training course in urology, 6. i 7. Svibanj 2010. KBC Zagreb, Zagreb
- 10. Osječki urološki i 3. osječki nefrološki dani, 26. do 18. Svibnja 2013.
- Rijetke bolesti u neurologiji, 17. i 18. travnja 2014., tečaj 1. kategorije, Medicinski fakultet Osijek
- Multipla skleroza juče, danas, sutra, 5. srpnja 2014. „, tečaj 1. kategorije, Medicinski fakultet
- „Urology Today 2014“ International Congress, Vodice, Croatia
- 11. Osječki urološki dani i 4. Osječki nefrološki dani, 21. – 23. Svibnja 2015.
- Urološki simpozij Split 2015.,
- Edukacijski boravak na Medizinisches Zentrum EICHHOF, Lauterbach, Deutschland, od 8.6. do 19. 6. 2015.
- Intensiv-Video-Teaching, Stein management, Universitatsklinikum Giesen und Marburg GMBH, Deutschland, 6. do 7. 11. 2015.
- 2nd South East European Urology days wich took place in Vienna, Austria on 10 - 11 November 2016.
- Primarna i sekundarna prevencija bolesti suvremenog, čovjeka, organizacijski odbor, tajnik simpozija u organizaciji Medicinskog fakulteta u Osijeku, 21. i 22. 10. 2016.
- 1. Hrvatski kongres o mentalnom zdravlju djece i mladih s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hotel Dubrovnik, 28.-29.10.2016, organizacijski odbor
- 12. Osječki urološki dani i 5. Osječki nefrološki dani uz 4. Sekciju medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije, Predsjednik

organizacijskog odbora simpozija s međunarodnm sudjelovanjem.
11. - 13. Svinja 2017.

- Tečaj na temu Psihološka potpora bolesnicima s malignim bolestima. 4. mj 2018. pod vodstvom psihologinje Latinke Basara iz KBC Zagreb, Klinika za plućne bolesti Jordanovac. Tečaj održan u Osijeku u organizaciji firme Glaxosmithkline Hrvatska.
- 8th International Conference *WATER FOR ALL 2019* Osijek, Croatia on March 21st and 22nd 2019. Scientific committee.
- 13. osječki urološki dani s 5. sekcijom medicinskih sestara tehničara. U organizaciji Zavoda za urologiju KBC Osijek, Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Hrvatskog liječničkog zbora, podružnice Osijek, Hrvatskog urološkog društva i Hrvatske komore medicinskih sestara od 9. do 11. svibnja 2019. godine. Predsjednik organizacijskog odbora.
- 3rd Adriatic Urology Forum, Budva, September 20. - 21. 2019. - član znanstvenog odbora.
- European Lower Urinary Tract Symptoms (ELUTS19) meeting, which is organised in collaboration with the International Continence Society (ICS)
- Telemedicina u Kliničkom bolničkom centru Osijek; 16. lipnja 2021. Poslijediplomski tečaj trajne izobrazbe liječnika 1. Kategorije; Organizatori Medicinski fakultet u Osijeku, Hrvatski Liječnički zbor. Aktivni sudionik - predavač
- 14. Osječki urološki dani i 6. sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije. Osijek od 12. – 14. svibnja 2022. godine. Predsjednik organizacijskog odbora.

Radovi:

1. Pavlović O, Šerić V, Galić, J. Urinary stone analysis of 2356 patients in eastern part of Croatia in last seventeen years // 7th EAU European Urology Meetings : abstracts / Kraus, Ognjen ; Marberger, Michael, editor(s).
Arnhem : Elsevier, 2007. 70-70 (poster,international peer-review,abstract,scientific)
2. Perković J, Sudarević B, Radoja I, Rakin I, Ćosić I, Pavlović O, et al. Penile cancer: Our experience over the last 13 years // European Urology Supplements.
(poster,international peer-review,abstract,scientific). Bratislava, 2010. str. 643-643 doi:10.1016/S1569-9056(10)61620-X (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. Šimunović D, Ćosić I, Sudarević B, Mandić S, Horvat V, Marzi, S, et al. Association of inflammation and IL-6 polymorphism with prostate hyperplasia and prostate cancer // European Urology, Supplements;Bratislava, 2010. str. 627-627 doi:10.1016/S1569-

- 9056(10)61554-0 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. Radoja I, Sudarević B, Perković J, Rakin I, Čosić, Pavlović O, et al. Experience with vesicovaginal fistula repair surgery at the Clinic for Urology of University Hospital Centre Osijek (poster, international peer-review, abstract, scientific). European Urology, Supplements; Bratislava: Elsevier, 2010. str. 637-637 doi:10.1016/S1569-9056(10)61597-7 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 5. Rakin I, Perković J, Sudarević B, Pavlović O, Čosić I, Šimunović D, Dalibor, et al. Our results in treatment of vesicoureteral reflux: comparison of methods and long-term follow-up // European Urology Supplements; European urology supplements, 9(6) (2010), 647-647 doi:10.1016/S1569-9056(10)61639-9 (međunarodna recenzija, kratko priopćenje, ostalo)
 6. Sudarević B, Radoja I, Perković J, Rakin I, Čosić I, Pavlović O, et al. Is prostate biopsy more painful when there is pathological evidence of inflammation? // European Urology Supplements. Bratislava: Elsevier, 2010. str. 653-654 doi:10.1016/S1569-9056(10)61665-X (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 7. Pavlović D, Pavlović O, Sladić Rimac D, Voloder V. Prikaz znanja pacijenata o hipertenziji i njihova motiviranost za učenje. 16. svibanj Zagreb, 2014. IX. Simpozij društva patronažnih sestara HUMS-a; Zdravstvena njega u zajednici, Kronične nezarazne bolesti.
 8. Pavoković D, Radoja I, Perić N, Pavlović O. Traumatske ozljede vanjskih spolnih organa u muškaraca; prikaz slučaja // Knjiga sažetaka, 11. Osječki urološki dani i 4. Osječki nefrološki dani / Kuveždić, Hrvoje (ur.). Osijek, 2015. str. 38-38 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, ostalo)
 9. C. D. M. Winkler, D. Prlić, O. Pavlović, A. Tucak Directions in diagnosis, health related quality of life and therapy of prostate cancer – controversies in uro-oncology Acta Med Croatica, 71 (2017) 3-16
 10. Radoja I, Pavlović O, Perić N, Degmečić D. Utjecaj urinarne inkontinencije tijekom spolnog odnosa na seksualno funkcioniranje u žena i mogućnosti liječenja. Simpozij "Seksualno zdravlje u 21. stoljeću", 2017, Karlovac, Knjiga sažetaka, p. 31

11. Sudarević B, Perković J, Ćosić I, Radoja, Cvitković M, Krajina V, et al. Dijagnostika i liječenje bolesnika s tumorom prostate u Kliničkom bolničkom centru Osijek, Zbornik radova 6. Znanstvenog sastanka Tumori prostate Hrvatska akademije znanosti i umjetnosti; Zagreb, 2018. str. 126-134 (predavanje, recenziran, cjeloviti rad (in extenso), stručni)
12. Radoja I, Pavlovic O, Peric N, Degmecic D. Coital urinary incontinence and female sexual function. Southeastern European Medical Journal, [S.l.], v. 1, n. 2, p.11-18, feb. 2018. ISSN 2459-9484.
13. Pavoković D, Prlić D, Radoja I, Pavlović O, Knjiga Neobičan slučaj hematoma skrotuma u novorođenčeta – prikaz slučaja. Knjiga sažetaka, 13.Osječki urološki dani i 4. Osječki nefrološki dani
14. Pavlović N, Vitale, K, Miškulin I, Pavlović O, Miškulin M. Foodstuff Storage and Phthalates: Effects on Human Health // ACS. Agriculturae conspectus scintificus, 83 (2018), 4; 277-284 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)
15. Samardžija G, Zibar L, Prlić D, Sudarević B, Ćosić I, Barbić J, et al. Transplantacijski program za bubreg u Kliničkom bolničkom centru Osijek Kidney transplantation program in University Hospital Centre Osijek Medicina Fluminensis 2020, Vol. 56, No. 4, p. 555-561 (stručni rad)
16. Kovačević J, Miškulin M, Palenkić H, Samardžija M, Mrčela M, Lončar B, et al. Factors Associated with Road Traffic Injuries and Their Severity: A Prospective Cohort Study. Coll. Antropol. 44 (2020) 4: 191–198
17. Hudolin T, Ferenčak V, Penezić L, Zekulić T, Kuliš T, Marić M, et al. Multydisciplinary surgical treatment of clear-cell renal carcinima with inferior vena cava tumor thrombosis level III and IV: Our expirience during the past decade.
18. Pogorelić Z, Milanović K, Veršić AB, Pasini M, Divković D, Pavlović O, et al. Is there an increased incidence of orchietomy in pediatric patients with acute testicular torsion during COVID-19 pandemic?-A retrospective multicenter study. J Pediatr Urol. 2021 May 1:S1477-5131(21)00225-4. doi: 10.1016/j.jpurol.2021.04.017. Epub ahead of print. PMID: 33994321; PMCID: PMC8087574.
19. Mihalj H, Zubčić Ž, Maleš J, Včeva A, Šestak, Bogović V, et al. Quality of life after FESS surgery combined with diode laser in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. 28TH Congress of European Rhinologic Society, 26 - 30 of September in Thessaloniki, Greece

20. Pavlovic O, Hudolin T, Miskulin I, Bulimbasic S, Coric M, Perkovic J, Zekulic T. Immunohistochemical Expression of Wnt-4 Protein in Clear Cell Renal Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10(24):5795. <https://doi.org/10.3390/jcm10245795>
21. Guljaš S, Benšić M, Krivdić Dupan Z, Pavlović O, Krajina V, et al. Dynamic Contrast Enhanced Study in Multiparametric Examination of the Prostate-Can We Make Better Use of It?. *Tomography*. 2022;8(3):1509-1521. Published 2022 Jun 9. doi:10.3390/tomography8030124

Recenzent:

1. 7 th International Scientific and Professional Conference WATER FOR ALL 9 th and 10th March 2017 Osijek, Croatia Knjiga sažetaka / Book of abstracts Posterska priopćenja / Poster presentations
2. *Acta Med Croatica*, (2018), Glasilo Akademije Medicinskih Znanosti Hrvatske
3. Dijagnostika i liječenje simptoma donjeg mokraćnog sustava (LUTS) u muškaraca, Hrvatsko urološko društvo 15. 2. 2020.

Urednik:

1. Knjiga sažetaka: Simpozij Primarna i sekundarna prevencija bolesti suvremenog čovjeka - Osijek: Medicinski fakultet Osijek, 2016.
2. Knjiga sažetaka: 12. Osječki urološki dani i 5. Osječki nefrološki dani uz 4. Sekciju medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije, 11. - 13. Svibnja 2017
3. Knjiga sažetaka: 13. osječki urološki dani s 5. sekcijom medicinskih sestara tehničara. Zavoda za urologiju KBC Osijek, Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Hrvatskog liječničkog zbora, podružnice Osijek, Hrvatskog urološkog društva i Hrvatske komore medicinskih sestara od 9. do 11. svibnja 2019. godine s međunarodnim sudjelovanjem
4. Knjiga sažetaka: 14. Osječki urološki dani i 6. sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije. U Osijeku od 12. – 14. svibnja 2022.

Poglavlja u knjizi

1. Pavlović O. Fokalno liječenje raka prostate. U: Gamulin M, Kaštelan Ž, urednici. *Rak prostate : knjižica za bolesnike : informacije, odgovori na pitanja, pomoć i perspektiva*. Zagreb: Astellas. Str. 35-7; 2021.

Projekti:

“Centar za edukacije, rano otkrivanje i prevenciju bolesti novotvorina Osječko – baranjske županije”. Rujan 2020. Projekt je prijavljen u sklopu poziva Održivo poboljšanje pristupa zdravstvenoj skrbi u nerazvijenim područjima i za ranjive skupine te promocija zdravlja u okviru Operativnog programa „Učinkoviti ljudski potencijali“, financiranog sredstvima iz Europskog socijalnog fonda koji je usmjeren na pružanje potpora za ulaganje u ljudski kapital i jačanje konkurentnosti te ima cilj povećanje znanja i svijesti građana o važnosti prevencije bolesti i promocije zdravlja na području RH - Voditelj projekta.