

Prognostičko značenje osteopontina u karcinomu bubrega

Matušan-Ilijaš, Koviljka

Doctoral thesis / Disertacija

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:167913>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI
Repository](#)



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Koviljka Matušan Ilijaš

PROGNOSTIČKO ZNAČENJE OSTEOPONTINA
U KARCINOMU BUBREGA

Doktorska disertacija

Rijeka, 2009.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ksenija Lučin

Doktorska disertacija obranjena je dana_____na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u

Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima_____listova.

UDK:_____

PREDGOVOR

Istraživanje na kojem se temelji ova doktorska disertacija dio je znanstvenog projekta „Uloga osteopontina u progresiji tumora“ (broj projekta: 062-0620095-0078) i provedeno je na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci te na Institutu za genetiku Sveučilišta u Udinama.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Kseniji Lučin koja je svoje znanje i iskustvo u znanstvenoistraživačkom radu prenijela na mene te pomogla pri izradi ovog rada. Hvala svima koji su na bilo koji način doprinijeli nastanku ovoga rada. I na kraju, hvala mojoj obitelji na razumijevanju i velikoj podršci.

SAŽETAK

Ciljevi: Osteopontin (OPN) je fosforilirani glikoprotein koji posjeduje različita djelovanja uključujući nastanak i metastaziranje tumora. Kočenje apoptoze jedan je od mehanizama kojim OPN doprinosi napredovanju tumora, a jezgreni čimbenik kappa B (NF- κ B) je uključen u signalne putove kočenja apoptoze. Cilj ovog istraživanja je proučavanje izražaja OPN-a u normalnom tkivu bubrega i svjetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica (SKBS) i određivanje njegovog prognostičkog značenja te ujedno određivanje odnosa između NF- κ B i izražaja OPN-a na proteinskoj i genskoj razini kao i njihovog odnosa prema apoptozi u uzorcima SKBS-a.

Materijali i postupci: Izražaj proteina OPN-a istražen je metodom imunohistokemije na standardnim tkivnim rezovima 171 SKBS-a i uspoređen s uobičajenim kliničkopatološkim čimbenicima. Korištenjem imunohistokemijske metode i tehnike tkivnih mikroareja (TMA) na 94 SKBS-a određen je izražaj proteina OPN-a te p50 i p65 podjedinice NF- κ B i međusobno uspoređen kao i s apoptotičkom aktivnosti. Korištenjem kvantitativne lančane reakcije polimerazom (QPCR) određena je količina OPN glasničke RNA (mRNA) iz svježe smrznutog tumorskog tkiva i uspoređena s izražajem proteina OPN-a i NF- κ B u 22 SKBS-a.

Rezultati: Izražaj OPN-a je u tumorskom tkivu bio veći u odnosu na normalno tkivo bubrega i primijećen je u 61 SKBS-u (35.7 %) kao citoplazmatsko bojanje različite jačine. Utvrđena je povezanost povećanog izražaja OPN-a s pokazateljima loše prognoze kao što su veličina tumora ($p < 0.001$), Fuhrmanov nuklearni gradus ($p < 0.001$), patološki stadij ($p = 0.011$) i Ki-67 indeks proliferacije ($p < 0.001$) te kraće preživljavanje bolesnika ($p = 0.004$). Citoplazmatsko NF- κ B bojanje primijećeno je u tumorskim stanicama kao i dobroćudnim strukturama dok je nuklearno bojanje primijećeno većinom u tumorskim stanicama. Utvrđena je korelacija pojačanog izražaja OPN-a na proteinskoj ($p < 0.001$) i genskoj razini ($p = 0.019$) s aktivacijom NF- κ B i smanjenjem

indeksa apoptoze u tumorskim stanicama ($p=0.009$). Aktivacija obje NF- κ B podjedinice također je obrnuto korelirala s indeksom apoptoze ($p=0.003$).

Zaključak: Pojačan izražaj OPN-a doprinosi napredovanju SKBS-a vjerojatno posredujući kočenje apoptoze putem aktivacije NF- κ B.

Ključne riječi: Analiza tkivnih areja; Apoptoza; Imunohistokemija; Jezgreni čimbenik kappa B; Karcinom, bubrežnih stanica; Osteopontin; Prognoza.

SUMMARY

Objectives: Osteopontin (OPN) is a phosphorylated glycoprotein with diverse functions including tumorigenesis and tumor cell metastasis. Apoptosis inhibition is one of the OPN's mechanisms that contribute cancer progression and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is involved in antiapoptotic signaling pathway. The aim of this study was to analyze the expression of OPN in normal renal tissue and clear cell renal cell carcinomas (CRCC), and to assess its prognostic significance together with determining relations between NF- κ B and OPN expression at protein and gene level as well as their relation to apoptosis in specimens of CCRCC.

Material and Methods: The expression of OPN protein was analyzed using immunohistochemistry in whole-tissue sections of 171 CRCC and compared to usual clinicopathological parameters. Using tissue microarray (TMA) and immunohistochemical technique the expression of OPN protein and p50 and p65 NF- κ B subunits was analyzed in 94 CCRCC and compared mutually and to apoptotic index. Using real-time PCR OPN mRNA was quantified from snap frozen tumor tissue and compared to OPN and NF- κ B protein expression in 22 CCRCC.

Results: Compared to normal renal parenchyma OPN was upregulated in tumor tissue and was observed in 61 CRCC (35.7%) in the form of cytoplasmic staining of various intensities. The association of OPN expression and poor prognostic indicators as tumor size ($p < 0.001$), Fuhrman nuclear grade ($p < 0.001$), pathological stage ($p = 0.011$) and Ki-67 proliferation index ($p < 0.001$) as well as shorter patients survival ($p = 0.004$) was found. Cytoplasmic NF- κ B staining was observed in tumor cells and benign elements, while nuclear staining was detected mainly in tumor cells. The correlation of high OPN expression at protein ($p < 0.001$) and gene level ($p = 0.019$) with NF-

κ B activation as well as decrease of apoptotic index in tumor cells ($p=0.009$) was found. Activation of both NF- κ B subunits also correlated with decreased apoptotic index ($p=0.003$).

Conclusion: Overexpression of OPN contributes the progression of CRCC probably by inhibition of apoptosis through NF- κ B activation.

Key words: Apoptosis; Carcinoma, Renal Cell; Immunohistochemistry; Nuclear Factor kappa B; Osteopontin; Prognosis; Tissue Array Analysis.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Karcinom bubrežnih stanica.....	1
1.1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma bubrežnih stanica.....	1
1.1.2. Kliničke značajke karcinoma bubrežnih stanica.....	3
1.1.3. Patohistološka obilježja i prognostički čimbenici karcinoma bubrežnih stanica.....	3
1.1.4. Liječenje karcinoma bubrežnih stanica.....	9
1.2. Osteopontin.....	11
1.2.1. Biološke funkcije osteopontina.....	11
1.2.2. Međudjelovanje osteopontina s površinskim staničnim receptorima.....	13
1.2.3. Građa osteopontina.....	14
1.2.4. Mehanizmi progresije i metastaziranja tumora.....	15
1.2.5. Uloga osteopontina u progresiji tumora.....	16
1.2.5.1. Povezanost osteopontina i zloćudne bolesti.....	16
1.2.5.2. Poticanje invazije izvanstaničnog matriksa.....	18
1.2.5.3. Poticanje stanične adhezije i migracije.....	18
1.2.5.4. Promjene u imunološkom sustavu.....	19
1.2.5.5. Poticanje neoangiogeneze.....	19
1.2.5.6. Poticanje proliferacije stanica.....	20
1.2.5.7. Kočenje apoptoze.....	20
1.2.6. Prognostičko značenje osteopontina u humanim tumorima.....	21
1.2.7. Prognostičko značenje osteopontina u serumu bolesnika.....	22

1.2.8.	Dosadašnje spoznaje o prognostičkom značenju osteopontina u karcinomu bubrežnih stanica.....	23
1.2.9.	Kočenje osteopontina kao nova strategija liječenja zloćudnih tumora.....	24
1.3.	Jezgreni čimbenik kappa B.....	28
1.3.1.	Aktivacija jezgrenog čimbenika kappa B i njegove biološke uloge.....	28
1.3.2.	Uloga jezgrenog čimbenika kappa B u nastanku i širenju tumora.....	31
1.3.2.1.	Abnormalna regulacija jezgrenog čimbenika kappa B u tumorskoj stanici.....	31
1.3.2.2.	Jezgreni čimbenik kappa B u mehanizmima napredovanja tumora.....	32
1.3.2.3.	Jezgreni čimbenik kappa B u humanim tumorima.....	33
1.3.3.	Jezgreni čimbenik kappa B u signalnom putu osteopontina.....	34
1.3.4.	Jezgreni čimbenik kappa B i liječenje raka.....	36
1.4.	Apoptoza.....	38
1.4.1.	Proces apoptoze.....	38
1.4.2.	Uloga apoptoze u nastanku i širenju tumora.....	40
1.4.3.	Jezgreni čimbenik kappa B u signalnim putovima apoptoze.....	41
1.4.4.	Jezgreni čimbenik kappa B i apoptoza u karcinomu bubrežnih stanica.....	42
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	44
3.	ISPITANICI I POSTUPCI.....	45
3.1.	Ispitanici.....	45
3.2.	Biopsijski materijal.....	45
3.2.1.	Standardni tkivni rezovi.....	46
3.2.2.	Tkivni rezovi dobiveni metodom tkivnih mikroareja.....	46

3.3. Svježe tkivo.....	47
3.4. Postupci.....	48
3.4.1. Određivanje prognostičkih čimbenika.....	48
3.4.2. Imunohistokemijsko bojanje.....	48
3.4.3. TUNEL metoda.....	50
3.4.4. Određivanje izražaja osteopontina i jezgrenog čimbenika kappa B.....	51
3.4.5. Određivanje proliferacijske i apoptotičke aktivnosti tumorskih stanica.....	51
3.4.6. Izolacija mRNA i reverzna transkripcija – lančana reakcija polimerazom (RT-PCR).....	52
3.4.7. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (QPCR).....	53
3.5. Statistička obradba podataka.....	54
4. REZULTATI.....	55
4.1. Standardni tkivni rezovi.....	55
4.1.1. Kliničkopatološki podaci.....	55
4.1.2. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin.....	56
4.1.3. Povezanost izražaja osteopontina s kliničkopatološkim parametrima.....	61
4.1.4. Povezanost izražaja osteopontina s preživljavanjem bolesnika.....	63
4.2. Tkivne mikroareje i svježe tkivo.....	65
4.2.1. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin i jezgreni čimbenik kappa B.....	66
4.2.2. Povezanost izražaja osteopontina i jezgrenog čimbenika kappa B.....	67
4.3. Povezanost indeksa apoptoze s izražajem osteopontina i jezgrenog čimbenika kappa B.....	70
5. RASPRAVA.....	75
6. ZAKLJUČCI.....	88

7. LITERATURA.....	89
8. POPIS SKRAĆENICA.....	102

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Karcinom bubrežnih stanica

Istraživanje je provedeno na svijetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica (SKBS) koji predstavlja najčešći histološki tip karcinoma bubrežnih stanica (KBS) (1,2,3). Karcinom bubrežnih stanica je zloćudna novotvorina koja nastaje iz epitelnih stanica bubrežnih tubula i čini oko 85 % svih zloćudnih tumora bubrega (4). Unatoč napretku dijagnostike u jedne trećine bolesnika su u trenutku postavljanja dijagnoze već prisutne metastaze, a u čak polovice bolesnika s lokaliziranom bolešću se razvijaju nakon operativnog zahvata (1). Postojeći su prognostički pokazatelji nedovoljni za predviđanje biološkog ponašanja ovog tipa tumora, a KBS pokazuje i otpornost prema uobičajenoj citotoksičnoj kemoterapiji i radioterapiji pa su one većinom neučinkovite u liječenju ovog karcinoma (1,3,4,5). Zbog navedenih razloga potrebno je istražiti molekularne mehanizme onkogeneze i progresije KBS-a kako bi se pronašli novi biljezi koji bi pripomogli boljoj dijagnostici, a time i liječenju ovog karcinoma.

1.1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma bubrežnih stanica

Karcinom bubrežnih stanica predstavlja oko 3% svih karcinoma u odrasloj dobi, s postepenim porastom stope incidencije i mortaliteta (1,2). U Hrvatskoj je stopa incidencije za 2005. godinu na 100 000 stanovnika iznosila 13.3 (6) što je iznad svjetskog prosjeka, a u skladu s podacima za 2002. godinu za Sjevernu Ameriku i Europu (7). Incidencija ovog karcinoma raste nakon 40-te godine i između 60 i 80 godine dostiže vrhunac (2,6). Dva do tri puta se češće javlja u muškaraca nego u žena (1,2), a u Hrvatskoj je taj omjer u razdoblju od 2001. do 2005. godine iznosio od 1:1.5 do 1:1.8 (6).

Smatra se da glavnu ulogu u nastanku KBS-a igraju različiti okolišni i genetski čimbenici. U prilog okolišnih čimbenika govore statistički podaci o većoj učestalosti ovog karcinoma u industrijaliziranim zemljama iako tim rezultatima doprinosi vjerojatno i naprednija dijagnostika razvijenih zemalja. Glavnim uzrokom nastanka KBS-a smatra se pušenje cigareta i izloženost spojevima arsena (2). Ostali mogući okolišni karcinogeni su različiti teški metali, organska otapala i pesticidi te estrogeni iako je njihova kancerogenost utvrđena samo u životinja (2). Pretilost i povišen krvni tlak su značajno povezani s ovim karcinomom dok za ostale rizične čimbenike, poput dugotrajnog unosa fenacetina i antidiuretika, multiparitet, obiteljska anamneza KBS-a te smanjen unos voća i povrća, povezanost s KBS-om nije jasna ili dovoljno istražena (2). Karcinom bubrežnih stanica javlja se i u sklopu nekoliko nasljednih genetskih sindroma koji su karakterizirani specifičnim kromosomskim aberacijama i pojavom multiplih tumora različitih sijela (2). Svjetlostanični karcinom bubrežnih stanica javlja se u sklopu von Hippel-Lindau-ovog (VHL) sindroma te u sklopu konstitucijske translokacije kromosoma 3 (2). Smatra se da je nekoliko lokusa upravo na 3. kromosomu uključeno u nastanak karcinoma bubrežnih stanica, prvenstveno svjetlostaničnog tipa, obzirom da se njihove mutacije mogu otkriti već kod vrlo malih tumora (2,8). Na kromosomu 3 se nalazi VHL tumor supresor gen čije se mutacije nalaze u istoimenom sindromu, ali su uobičajene i u sporadičnom SKBS-u, a smatra se i da je zahvaćen i u konstitucijskoj translokaciji kromosoma 3 (2). Nedostatak funkcionalnog VHL gena kao posljedica delecije, mutacije ili DNA metilacije smatra se da doprinosi nastanku SKBS-a induciranjem gena koji su uključeni u staničnu diobu, neovaskularizaciju te oblikovanje izvanstaničnog matriksa (ISM) (2,9). Progresija SKBS-a povezana je s razvojem aberacija na drugim kromosomima (5p, 6q, 8p, 9p, 14q i 10q) (2,4) te zahvaćanjem glavnog kompleksa histokompatibilnosti I (HLA I) koji zbog smanjenog izražaja u tumorskim stanicama ne dovodi do imunološke reakcije na ovaj karcinom (10).

1.1.2. Kliničke značajke karcinoma bubrežnih stanica

Glavni simptomi i znakovi uključuju hematuriju, bol i palpabilnu abdominalnu masu, ali se u gotovo 40 % bolesnika javljaju samo sistemski simptomi i znakovi poput mršavljenja, bolova u trbuhu, gubitka apetita, vrućice te ubrzane sedimentacije i anemije (2). Također je za karcinom bubrežnih stanica karakteristična pojava paraneoplastičnog sindroma poput hiperkalcemije, eritrocitoze, hipertenzije i ginekomastije, a isto tako nije rijetkost da se ovaj tumor prezentira kao metastatski karcinom nepoznatog primarnog sjela (2). KBS najčešće daje plućne metastaze s podjednako učestalim zahvaćanjem jetre te mekih tkiva i kostiju (2). Nakon što je ultrazvukom ili kompjuteriziranom tomografijom dokazano prisustvo tumorske mase u bubregu, konačna dijagnoza se postavlja na temelju patohistološke obrade postoperativno preuzetog tumorskog tkiva.

1.1.3. Patohistološka obilježja i prognostički čimbenici karcinoma bubrežnih stanica

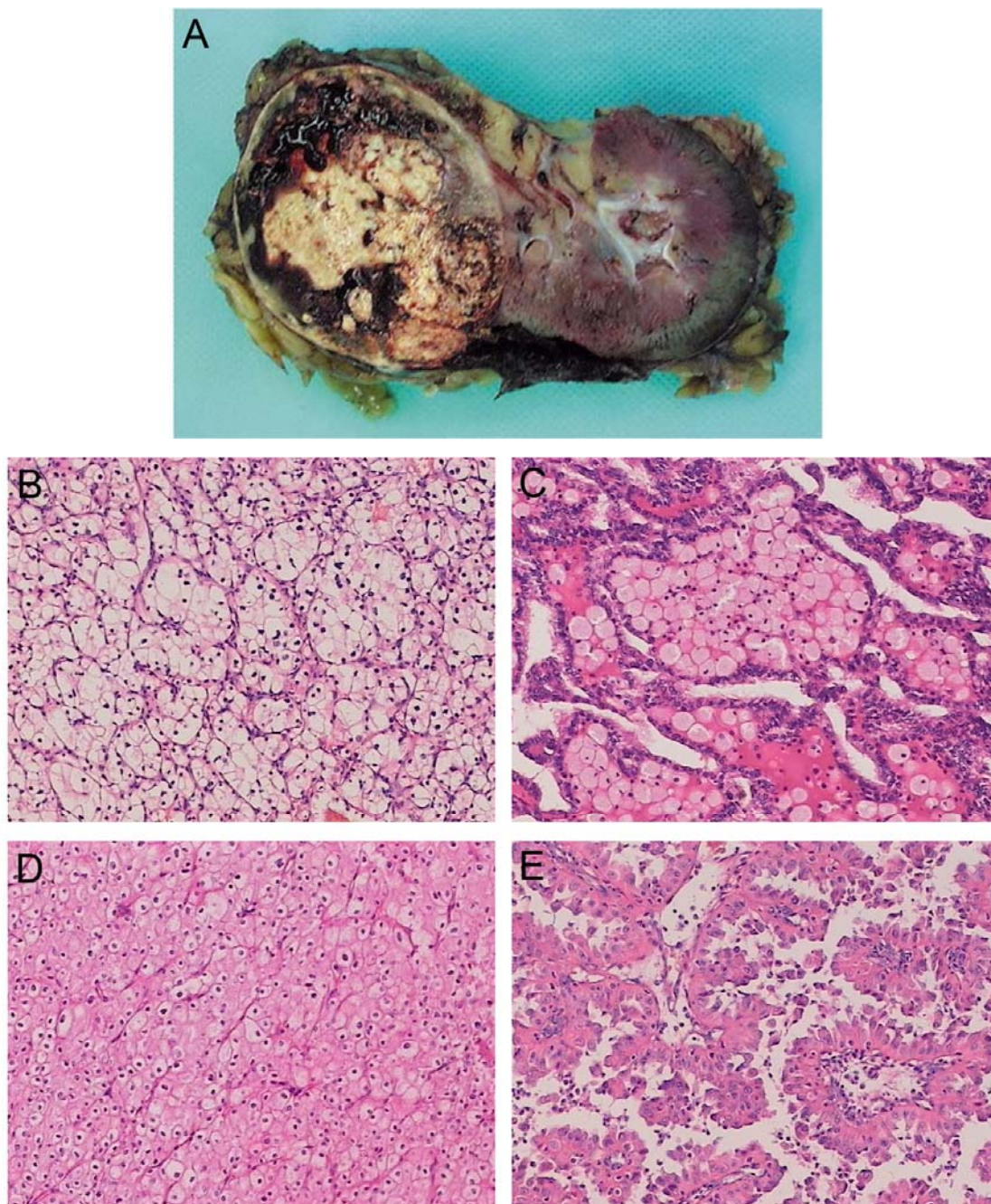
Karcinom bubrežnih stanica je skup morfološki i genotipski različitih tumora koji pokazuju i različito biološko ponašanje. Histološka klasifikacija tumora bubrežnih stanica prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji te njihova incidencija prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Histološka klasifikacija tumora bubrežnih stanica prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji. Izmijenjeno prema Kirkali i sur. (1) i WHO Classification of Tumors (2).

Histološki tip	incidencija (%)
Svjetlostanični karcinom bubrežnih stanica	60 – 62
Multilokularni karcinom bubrežnih stanica	–
Papilarni karcinom bubrežnih stanica	7 – 14
Kromofobni karcinom bubrežnih stanica	6 – 11
Karcinom sabirnih kanalića (karcinom Belinijevih kanalića)	< 1
Medularni karcinom bubrega	–
Krcinom povezan s Xp11 translokacijom	–
Karcinom povezan s neuroblastomom	–
Mucinozni tubularni karcinom s vretenastim stanicama	–
Neklasificirani karcinom bubrežnih stanica	6 – 7
Papilarni adenom	–
Onkocitom	7 – 10

– označava da točni podatci o incidenciji nisu pronađeni u spomenutim izvorima ili se radi o vrlo rijetkim tumorima

Određivanje histološkog tipa se pokazalo važnim, zbog utjecaja na preživljavanje bolesnika, ali jedino ukoliko se radi o tumoru koji se još nije proširio izvan bubrega (3). Prognostički najpovoljnijoj skupini pripada multilokularni, kromofobni KBS (Slika 1D) te mucinozni tubularni karcinom s vretenastim stanicama, zatim slijede papilarni KBS (Slika 1C) i SKBS, a najnepovoljnijim histološkim tipovima pripada medularni KBS i karcinom sabirnih kanalića (Bellini tumor) (Slika 1E) (2).



Slika 1. Makroskopski i mikroskopski izgled karcinoma bubrežnih stanica. Rezna ploha svijetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica, smještenog na jednom polu bubrega, ima karakterističnu šarenu reznju plohu; žućkasta područja predstavljaju očuvano tumorsko tkivo, dok su tamna područja mjesta nekroze i krvarenja (A). Svijetlostanični karcinom bubrežnih stanica pokazuje karakterističan alveolarni raspored stanica svijetlih citoplazmi, okružene gustom kapilarnom mrežom (B). Papilarni karcinom bubrežnih stanica s karakterističnim pjenušavim makrofagima unutar fibrovaskularne strome papila koje su prekrivene jednim slojem kubičnih tumorskih stanica (C). Kromofobni karcinom bubrežnih stanica s perinuklearnim haloima i izraženim staničnim membranama te ponekom binuklearnom tumorskom stanicom (D). Karcinom sabirnih kanalića pokazuje tubulopapilarnu arhitekturu i visoku atipiju tumorskih stanica s "hob-nailing" fenomenom (E). Bojenje hemalaun-eozin, povećanje x 100 (B-E).

Svijetlostanični karcinom bubrežnih stanica obično se javlja kao dobro ograničena žućkasta tumorska masa bilo gdje u području kore bubrega. Može sadržavati cistična područja ili područja nekroze, krvarenja i kalcifikata (Slika 1A). Histološki je građen od stanica svijetle citoplazme zbog lipidnog sastava (Slika 1B), u manjoj mjeri eozinofilne, koje stvaraju solidna područja ili stvaraju acinuse, rjeđe tubule, cistične ili papilarne oblike koji su uklopljeni u gustu kapilarnu mrežu.

Dobro je poznato da KBS i unutar iste histološke skupine pokazuju međusobno različito biološko ponašanje (3,4). Iz tog su razloga danas u upotrebi različiti prognostički čimbenici od kojih su se klinički najznačajnijima pokazali stadij, nuklearni gradus (NG) i proliferacijska aktivnost tumorskih stanica (1,3,4,11,12). Brojna su istraživanja potvrdila da navedeni čimbenici imaju utjecaja na prognozu i preživljavanje bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica, ali jedino je stadij nezavisni prognostički čimbenik koji utjecaj na prognozu zadržava i u multivarijatnim analizama (1,3,4). Određivanje stadija na temelju TNM klasifikacije daje najtočniju prognozu bez obzira na histološki tip KBS-a (1-3,12) i temelji se na kliničkim i patološkim podacima (Tablica 2). Patološki podatci uključuju veličinu tumora te zahvaćenost perirenalnih struktura tumorom iz čega se određuje stadij tumora ili patološki stadij (pT) (Tablica 3).

Tablica 2. Petogodišnje preživljavanje bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica u ovisnosti o stadiju određenom na temelju TNM klasifikacije. Izmijenjeno prema Kirkali i sur. (1) i TNM Classification of Malignant Tumors (12).

Stadij	stadij tumora (T)	zahvaćenost područnih limfnih čvorova (N)	prisustvo udaljenih metastaza (M)	petogodišnje preživljavanje bolesnika (%)
I	T1	N0	M0	91 – 100
II	T2	N0	M0	74 – 96
III	T3	N0	M0	59 – 70
	T1, T2, T3	N1	M0	
	T4	N0, N1	M0	
IV	bilo koji T	N2	M0	16 – 32
	bilo koji T	bilo koji N	M1	

N0 nema metastaza u područnim limfnim čvorovima

N1 metastaze u jednom područnom limfnom čvoru

N2 metastaze u više područnih limfnih čvorova

M0 nema udaljenih metastaza

M1 prisutne udaljene metastaze

Tablica 3. Patološki stadiji (pT) karcinoma bubrežnih stanica.

Preuzeto iz WHO Classification of Tumors (2).

pT	opis
T1	tumor $\leq$ od 7 cm u najvećem promjeru, ograničen na bubreg
T1a	tumor $\leq$ od 4 cm
T1b	tumor $>$ od 4 i $<$ od 7 cm
T2	tumor $>$ od 7 cm u najvećem promjeru, ograničen na bubreg
T3	tumor se širi u bubrežnu venu ili nadbubrežnu žlijezdu ili perirenalno masno tkivo, ali ne izvan Gerotove fascije
T3a	tumor se širi u nadbubrežnu žlijezdu ili perirenalno masno tkivo, ali ne izvan Gerotove fascije
T3b	tumor se širi u bubrežnu ili donju šuplju venu ispod ošita
T3c	tumor se širi u donju šuplju venu iznad ošita
T4	tumor se širi izvan Gerotove fascije

Određivanje NG-a temelji se na promatranju veličine i izgleda jezgri tumorskih stanica putem svjetlosnog mikroskopa i povećanja x100. Najčešće se koristi sustav gradiranja prema Fuhrmanu (11) (Tablica 4). Iako subjektivna, većina studija ovoj metodi pridaje prognostičku značajnost za skupinu SKBS-a i to odmah nakon određivanja stadija (2,3,4) dok neki autori ovaj sustav gradiranja za papilarni i kromofobni karcinom bubrežnih stanica smatraju neodgovarajućim (3).

Tablica 4. Određivanje nuklearnog gradusa u karcinomu bubrežnih stanica prema Fuhrmanu i petogodišnje preživljavanje bolesnika. Izmijenjeno prema Kirkali i sur. (1) i Fuhrman i sur. (11).

Gradus	opis	petogodišnje preživljavanje bolesnika (%)
NG 1	male hiperkromatske jezgre bez vidljivih jezgrica	65 – 76
NG 2	veće jezgre s rahlijim kromatinom, ali se jezgrice dobro ne uočavaju	30 – 72
NG 3	veće jezgre s jasno uočljivim jezgricama	21 – 51
NG 4	vrlo velike pleomorfne hiperkromatske jezgre, prisutnost većeg broja jezgri, orijaških ili vretenastih tumorskih stanica	10 – 35

Ostala histološka obilježja s nepovoljnim utjecajem na prognozu KBS-a su prisustvo vretenastih stanica (sarkomatoidni KBS), mikroskopsko zahvaćanje presudokapsule te invazija mikrovaskulature (1,2,4). Prisustvo tumorske nekroze te povećana gustoća malih krvnih žila uglavnom su povezani s lošim ishodom u SKBS-u (3).

Većina studija proliferacijsku aktivnost tumorskih stanica smatra značajnim prognostičkim čimbenikom SKBS-a (3). Postoji nekoliko metoda određivanja proliferacijske aktivnosti tumorskih stanica koje se temelje na bojenju određenih struktura, koje se pojavljuju u stanicama u diobi, korištenjem srebra (AgNOR) ili protutijela (PCNA i Ki-67 antigen), odnosno prikazivanjem molekula koje sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa ($p27^{Kip1}$ i $p21^{waf1/cip1}$) (3).

Ki-67 se često koristi kao biljeg stanične proliferacije različitih vrsta tumora, jer je prisutan tijekom svih faza stanične diobe, a nije prisutan u stanicama koje miruju. Smatra se da postotak stanica pozitivnih na Ki-67 biljeg odražava stupanj proliferacije tumora (1). Njegova funkcija nije u potpunosti poznata. Smatra se da sudjeluje u kontroli građe kromosoma i jezgrice gdje vjerojatno igra ulogu u obradi ribosomske RNA (rRNA) kao i samih ribosoma (13). Većina studija je utvrdila njegovu povezanost s tumorskim stadijem i gradusom kao i preživljavanjem te se smatra značajnim prognostičkim čimbenikom kojim se može predvidjeti progresija lokaliziranih tumora kao i produženo preživljavanje bolesnika s metastatskim KBS-om (1,3).

Pored navedenih prognostičkih čimbenika, istraživani su i brojni drugi biljezi, u tkivu ili serumu bolesnika s KBS-om s ciljem prepoznavanja skupine bolesnika s lošom prognozom. U tkivu KBS-a i SKBS-a su određivani p53, bcl-2, vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF), receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR), interleukin 8, matriks metaloproteinaze-2 i 9 (MMP-2 i 9), E-cadherin i CD44, a u serumu bolesnika proteini akutne upalne faze, sedimentacija eritrocita, eritropoetin i dr., a rezultati upućuju na njihovu povezanost s pokazateljima loše prognoze, iako njihov klinički značaj još uvijek nije u potpunosti utvrđen (1-4).

1.1.4. Liječenje karcinoma bubrežnih stanica

Napredak u dijagnostici i liječenju KBS-a u proteklih 20 godina doveo je do poboljšanja prognoze ove zloćudne bolesti (1). Operativno odstranjenje tumorskog tkiva predstavlja osnovni pristup liječenju ovog tipa tumora. Odabir vrste operacije ovisi o stadiju bolesti, ali i o čimbenicima vezanim uz samog bolesnika. Radikalna nefrektomija predstavlja osnovno liječenje lokaliziranog KBS-a osobito u prisustvu prognostičkih pokazatelja loše prognoze gdje radikalna nefrektomija smanjuje rizik pojave recidiva bolesti (4). U slučaju metastatke bolesti, radikalna se

nefrektomija poduzima jedino kada može dovesti do uklanjanja ili smanjenja sistemskih i lokalnih simptoma bolesti (4). Uz radikalnu nefrektomiju može se izvršiti i limfadenektomija koja ne predstavlja povećani rizik za morbiditet i mortalitet, no njen se utjecaj na prognozu treba tek utvrditi (4). Sve se češće poduzimaju poštodne operacije (parcijalna nefrektomija ili tumorektomija) uz očuvanje funkcionalnog bubrežnog tkiva što je osobito važno u slučajevima prisustva multiplih tumora, obostranog zahvaćanja bubrega, prisustva samo jednog bubrega ili bolesti kontralateralnog bubrega (4). Istovremeno, poštodne operacije ne predstavljaju povećan rizik za razvoj recidiva u odnosu na radikalnu nefrektomiju, a smanjuju rizik za razvoj bubrežnog zatajenja i pojavu postoperativnog morbiditeta (4,14).

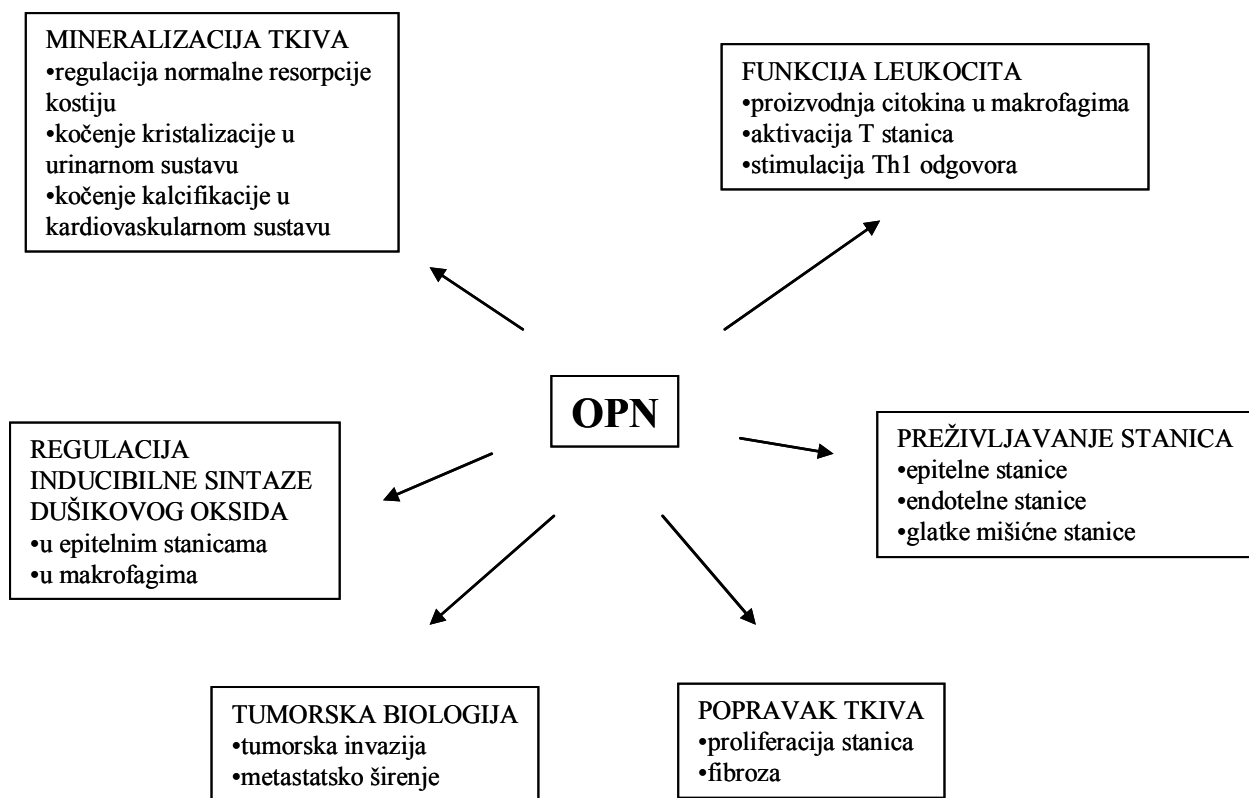
Osim kirurške, u liječenju KBS-a primjenjuje se i sistemsko liječenje, prvenstveno za metastatsku bolest. Postojeća citotoksična kemoterapija ima mali učinak u liječenju, a tek se u kombinaciji s imunoterapijom postiže nešto bolji uspjeh (5). Kombinirana imunoterapija interleukinom-2 i interferonom- α (IF- α) predstavlja osnovu sistemskog liječenja lokalizirane i metastatske bolesti, ali još uvijek s nedovoljnim uspjehom (14). Učinkovitost različitih cjepiva, koja se sastoje od senzibiliziranih imunoloških stanica usmjerenih protiv tumorskih stanica, talidomida, interleukina-12 i inhibitora i protutijela usmjerenih protiv receptora za faktore rasta poput VEGF-a, čimbenika rasta porijekla trombocita (PDGF, od engl. platelet derived growth factor) i EGFR-a nalaze se u fazi kliničkih ispitivanja (5,15).

Kombiniranjem različitih prognostičkih pokazatelja postiže se točnije i kvalitetnije liječenje KBS-a koje je prilagođeno svakom bolesniku zasebno. Utvrđivanje prognostičkog značenja novih biljega u KBS-u stoga predstavlja korak bliže prema učinkovitijem liječenju koristeći postojeće načine liječenja, no predstavlja i preduvjet za razvoj novih djelotvornijih mogućnosti liječenja.

1.2. Osteopontin

1.2.1. Biološke funkcije osteopontina

Osteopontin (OPN) je glikozilirani fosfoprotein otkriven u transformiranim zloćudnim epitelnim stanicama sisavaca (16). Pripada porodici malih glikoproteinskih molekula koje se vežu za integrine (SIBLING family, od engl. small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) koje pokazuju sličnu strukturu i funkciju (17). Obzirom da su navedene molekule najprije izolirane iz mineraliziranih tkiva, secernirajući fosfoprotein I (Spp1) imenovan je osteopontinom, jer stvara mostove između stanica i minerala matriksa u koštanom tkivu (18). Osteopontin stvara i izlučuje u ISM velik broj stanica poput osteoklasta, osteoblasta, epitelnih stanica bubrega, dojke, kože, zatim neurona, glatkih mišićnih stanica krvnih žila i endotelnih stanica, a može biti i u slobodnom obliku, kao citokin, u tjelesnim tekućinama kao što je plazma, urin, mlijeko i žuč (17). Sinteza OPN-a može biti potaknuta u različitim fiziološkim i patološkim stanjima, u kojima OPN ima važnu ulogu, poput upale, popravka i remodeliranja tkiva, ishemije i reperfuzije tkiva te resorpcije kostiju, te je tada prisutan u T limfocitima, makrofagima, stanicama epidermisa i koštanog tkiva (17,18). Isto tako, OPN je pronađen i u različitim vrstama tumorskih stanica te se smatra da ima i onkogenu ulogu (17). Pojednostavljeni prikaz različitih uloga OPN-a prikazuje Slika 2.



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz različitih važnih bioloških funkcija osteopontina (OPN). Preuzeto iz Mazzali i sur. (19).

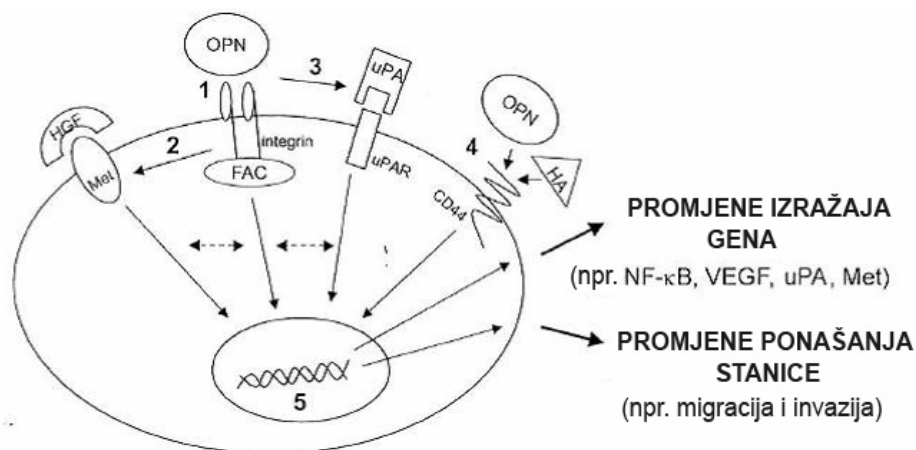
U različitim bolestima bubrega poput bubrežnih kamenaca, upalnih bolesti bubrežnog parenhima, akutne tubularne nekroze, hidronefroze, dijabetičke nefropatije i hipertenzije, OPN se pojačano stvara u bubrežnom tkivu te se smatra da posreduje u oštećenju tkiva, ali i da posjeduje prvenstveno zaštitnu ulogu u navedenim patološkim zbivanjima (20) (Tablica 5).

Tablica 5. Uloga osteopontina (OPN) u bubregu. Preuzeto iz Xie i sur (20).

Zbivanje	moguće uloge
Razvoj bubrega	nema značajniju ulogu
Normalni bubreg	nema značajniju ulogu
Stvaranje bubrežnih kamenaca	kočenje stvaranja kalcij oksalata? kočenje rasta, prijanjanja, agregacije i nukleacije kristala poticanje taloženja i adhezije kristala
Oštećenje bubrega	posredovanje ranog ulaska makrofaga u intersticij i intersticijske fibroze doprinos stvaranju glomerularnih polumjeseca ili ne
Zaštita bubrega	kočenje inducibilne sintaze dušikovog oksida i smanjenje sinteze dušikovog oksida smanjenje količine peroksida u stanici kočenje apoptoze tubularnih i intersticijskih stanica sudjelovanje u obnovi i popravku stanica tubula

1.2.2. Međudjelovanje osteopontina s površinskim staničnim receptorima

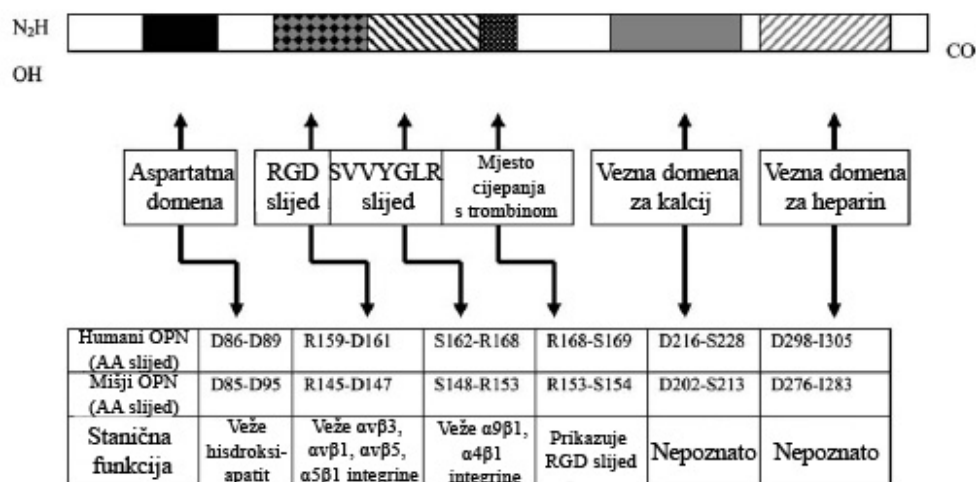
OPN ima sposobnost vezivanja za molekule na staničnoj površini koje su posrednici njegovih brojnih učinaka. Integrini su transmembranski proteinski dimeri koji se sastoje od različitih α i β podjedinica i mogu vezati brojne različite ligande kao što su proteini ISM-a te OPN (21). Smatra se da međudjelovanje OPN-a s integrinima stanične površine aktivira fokalni adhezijski kompleks (FAC) čime se mogu pokrenuti različiti signalni putovi (Slika 3). Osim integrina, OPN se može vezati za druge površinske stanične receptore poput molekule CD44. Ona predstavlja skupinu proteinskih izoformi koje su glavni receptor za hijaluronan (Slika 3) (21). Osim toga, CD44 može potaknuti izražaj integrinskih receptora na staničnoj površini (21). I integrini i molekula CD44 su pojačano izražene na površini tumorskih stanica što ima za posljedicu konstitutivnu aktivaciju signalnih putova koji dovode do napredovanja tumora (21).



Slika 3. Grafički prikaz signalnih putova osteopontina (OPN) koji u konačnici dovode do promjene izražaja gena i/ili ponašanja stanice. Predloženo je da međudjelovanje s integrinima stanične površine (1) potiče signalni put aktivirajući fokalni adhezijski kompleks (FAC). Vezivanje OPN-a za CD44 (4) može isto tako utjecati na isti ili neki drugi signalni put. Također postoje dokazi da OPN aktivira određene receptore čimbenika rasta (npr. faktor rasta hepatocita (HGF), Met) (2). OPN može također potaknuti proteolitičku aktivnost i invazivnost poticanjem izražaja urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA) (3). Navedena međudjelovanja mogu djelovati na izražaj gena (5) dovodeći do promjene razine proteina kao što su jezgri čimbenik kappa B (NF- κ B), vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF), uPA i Met i doprinijeti malignom fenotipu. Dokazi na temelju drugih sustava predlažu moguća ispreplitanja signalnih putova (iscrtkane strelice). Preuzeto iz Furger i sur. (21)

1.2.3. Građa osteopontina

Brojne i različite biološke uloge OPN-a odraz su njegove građe (Slika 4). RGD domena

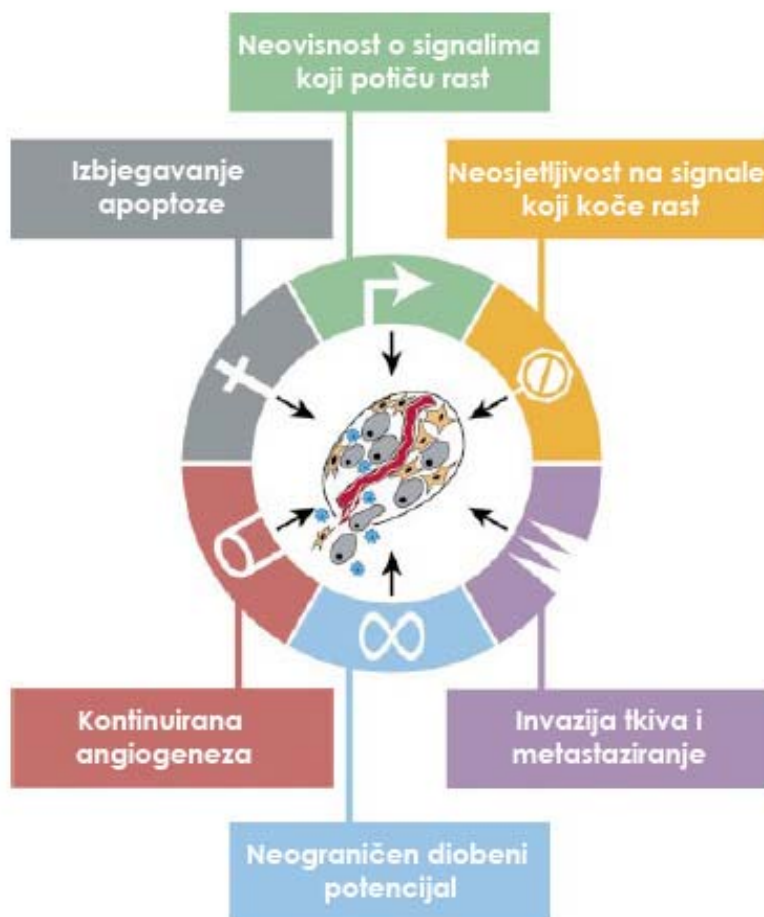


Slika 4. Građa osteopontina (OPN) prikazuje određene gradivne domene i njihov odgovarajući smještaj u slijedu aminokiselina humanog i mišjeg OPN-a. D aspartat, R arginin, S serin, V valin, Y tirozin, G glicin, L leucin, I izoleucin. Preuzeto iz Wai i sur. (17).

(od engl. arginine-glycine-aspartate rich domain) mjesto je vezivanja OPN-a s $\alpha\beta$ integrinima i molekulom CD44 na staničnoj površini (17). Međudjelovanje RGD domene s navedenim molekulama djelotvornije je nakon fosforilacije N-terminalne domene OPN-a i cijepanja s trombinom koji djelujući na specifičnu domenu OPN-a odvaja dva kratka fragmenta razotkrivajući RGD domenu (17). Smatra se da brojni signalni putevi, koji se aktiviraju u tumorskoj stanici, a posredovani su OPN-om, započinju upravo njegovim vezivanjem za $\alpha\beta$ integrine (prvenstveno $\alpha\beta_3$ integrine) ili CD44 (17). Međudjelovanje OPN-a i navedenih molekula dovodi prvenstveno do pojačane stanične adhezije i migracije, ali može dovesti i do produženog preživljavanja stanica te promjena u imunološkom sustavu (17,21). Međudjelovanje OPN-a smještenog u citosolu i molekule CD44 s unutrašnje strane stanične membrane s proteinima staničnog citoskeleta također može aktivirati staničnu migraciju (21). Naposljetku, vezivanje OPN-a za $\alpha\beta$ integrine može posredovati u nastanku koštanih metastaza putem aktivacije osteoklasta (17).

1.2.4. Mehanizmi progresije i metastaziranja tumora

Metastaziranje tumora je proces u kojem se zloćudne stanice odvajaju od primarnog sijela tumora i putuju uglavnom putem limfe ili krvi do udaljenih mjesta gdje stvaraju nove nakupine tumorskih stanica. Da bi tumorska stanica imala sposobnost metastaziranja, mora steći određena svojstva tijekom postepenog procesa tumorske progresije u kojem se događaju složene promjene genoma stanice s posljedičnim promjenama stanične funkcije. Svojstva tumorske stanice, koja omogućavaju progresiju i metastaziranje zloćudnog tumora, predstavljaju njegova osnovna obilježja kao što prikazuje Slika 5 i uključuju ubrzanu staničnu diobu, pojačanu sposobnost invazije ISM-a, pojačanu angiogenezu i produženo preživljavanje stanice (22).



Slika 5. Stečene sposobnosti zloćudnog tumora. Preuzeto iz Hanahan i sur. (22).

1.2.5. Uloga osteopontina u progresiji tumora

1.2.5.1. Povezanost osteopontina i zloćudne bolesti

Prvi dokaz o povezanosti OPN-a i tumora dao je Senger i sur. koji su otkrili da OPN luče različite transformirane stanice u kulturi (16). Nadalje je otkriveno da ne-tumorske NIH 3T3 ras-transformirane stanice, koje pokazuju sposobnost metastaziranja, pokazuju povećan izražaj gena za OPN (23). Funkcionalne su eksperimentalne studije uz to pokazale da OPN može imati utjecaj na ponašanje tumorskih stanica koje dovodi do tumorske progresije (21). Daljnjim su

istraživanjima utvrđene regulatorne sekvence promotora gena za OPN kao i složeni mehanizmi regulacije njegovog izražaja (17,24). Utvrđeno je da je transkripcija OPN gena povećana kao odgovor na različite podražaje, a većina pritom aktiviranih signalnih putova je kontrolirana putem Ras-a, onkoproteina čiji je gen mutiran u velikom broju humanih tumora (24). Jedan od rezultata genetskih promjena tumorske stanice s posljedičnim promjenama staničnog signaliranja je pojačano stvaranje OPN glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA, od engl. messenger ribonucleic acid) što dovodi do pojačanog stvaranja i lučenja ovog proteina u okoliš tumorske stanice gdje može djelovati parakrino, ali i autokrino (17,21,24).

Uloga OPN-a u karcinogenezi, invaziji i širenju tumorskih stanica proučavana je u eksperimentalnim uvjetima kao i analizom različitih vrsta humanog bioptičkog tumorskog tkiva (23,25-36). Nekolicina animalnih modela je pokazala da OPN nema utjecaja na tumorsku progresiju te da čak može imati u tom smislu i zaštitnu ulogu (37,38). Navedena se opažanja mogu objasniti različitim djelovanjima OPN-a kojeg u tumorski mikrookoliš luče tumorske te brojne ne-tumorske stanice, prvenstveno makrofagi. Isto tako je poznato da OPN ima važnu ulogu u regulaciji imunološkog sustava koji može kočiti nastanak i širenje tumora. Sve spomenuto ukazuje na složenost djelovanja OPN-a u in vivo uvjetima te na još uvijek nedovoljno poznate patofiziološke mehanizme djelovanja OPN-a u procesima tumorskog napredovanja. U tumorskoj stanici, koja pokazuje pojačan izražaj OPN-a, dokazana je pojačana sinteza OPN mRNA (26) što je posljedica poremećaja u njejoj regulaciji (17,24), a ne mutacijama OPN gena (24). Upravo zbog toga, a i zbog nepostojanja dokaza o tome da OPN može transformirati normalne stanice, OPN nema status onkogen (24). Rezultati brojnih eksperimentalnih in vitro i in vivo pokusa pokazuju da OPN različitim mehanizmima dovodi do promjene izražaja brojnih gena što ima za posljedicu ubrzan rast tumora zbog ubrzane stanične diobe i smanjene apoptoze te tumorsku invaziju i metastaziranje zbog pojačane razgradnje ISM-a, adhezije tumorskih

stanica za navedeni matriks, izražaj receptora za čimbenike rasta, stvaranja novih krvnih žila u tumorskom tkivu te promjena u imunološkom sustavu domaćina (17,24,25). Zbog navedenih razloga, OPN se smatra ključnim proteinom tumorske progresije. Signalni putovi kojima OPN posreduje u progresiji tumora prikazuje Slika 3.

1.2.5.2. Poticanje invazije izvanstaničnog matriksa

OPN regulira aktivnost enzima koji razgrađuju ISM olakšavajući time kretanje tumorskih stanica kroz navedeni matriks. U različitim su zloćudnim tumorima otkrivene povećane količine različitih proteaza za razgradnju ISM-a (39). Pokusi na staničnim linijama karcinoma dojke i melanoma su utvrdili da se proteaze poput urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA), MMP-2 i MMP-9 pojačano stvaraju i aktiviraju djelovanjem OPN-a putem različitih preklapajućih signalnih puteva koji uključuju različite molekule poput fosfatidilinozitol 3-kinaze/protein kinaze B (PI3K/Akt), nuklearnog čimbenika kappa B (NF- κ B), ciklooksigenaze -2 te prostaglandina E2 (PGE2) (17).

1.2.5.3. Poticanje stanične adhezije i migracije

Pokretljivost tumorskih stanica omogućava im da dopru do limfnih ili krvnih žila te da putem cirkulacije dospiju na udaljena mjesta u organizmu. Na animalnom modelu je pokazano da je povećana sposobnost tumorskih stanica karcinoma prostate za invaziju krvnih žila uzrokovana djelovanjem OPN-a, a metastatske lezije eksperimentalno izazvanog karcinoma prostate su pokazivale veći izražaj OPN-a u odnosu na primarni tumor (28). Pokusi na različitim tumorskim i ne-tumorskim staničnim linijama pokazali su da OPN može posjedovati kemotaktička svojstva te da zloćudne stanice u odnosu na odgovarajuće normalne stanice pokazuju pojačanu migraciju prema OPN-u (21,40). Smatra se da je pojačana adhezivnost tumorske stanice za ISM te pojačana

stanična migracija posredovana međudjelovanjem OPN-a i integrinskih molekula na staničnoj površini, koje su pojačano izražene u zloćudnim stanicama sa sposobnošću metastaziranja. U stanicama koje pokazuju pojačanu sposobnost migracije istraživači su otkrili aktivaciju signalnih putova receptora za epidermalni (EGFR) i hepatocitni čimbenik rasta (HGFR) što je posljedica poticanja njihove sinteze i aktivnosti djelovanjem OPN-a (41,42).

1.2.5.4. Promjene u imunološkom sustavu

Suprimiranjem obrambenih mehanizama imunološkog sustava OPN može doprinijeti tumorskoj progresiji. U različitim stanicama imunološkog sustava OPN koči aktivnost citokrom C oksidaze i inducibilne sintetaze dušikovog monoksida koje mogu izazvati oštećenje stanice spojevima kisika (17). In vitro pokusi su pokazali da smanjenje izražaja OPN-a dovodi do pojačanog stvaranja dušikovog monoksida (NO, od engl. nitric oxide) u makrofagima s posljedičnim smanjenjem stanične diobe i povećanjem apoptoze tumorskih stanica (43). Ovi rezultati upućuju na ulogu OPN u smanjivanju količine NO-a u tumorskom mikrookolišu što predstavlja mehanizam kojim se tumorske stanice štite od štetnog utjecaja NO-a.

1.2.5.5. Poticanje neoangiogeneze

Stvaranje novih krvnih žila predstavlja temeljni proces tumorskog metastaziranja. Neoangiogeneza je nužna za neprekidni tumorski rast, a povećana prokrvljenost tumorskog tkiva olakšava ulazak tumorskih stanica u cirkulaciju (22). Vezivanje OPN-a za $\alpha\beta$ integrine potiče neoangiogenezu zbog pojačane migracije, produženog preživljavanja endotelnih stanica te oblikovanja vaskularnog lumena (17). Najnovija istraživanja upućuju da SVVYGLR domena posreduje neoangiogene učinke OPN-a (17). Uočeno je da je proangiogeni učinak OPN-a zapravo potaknut djelovanjem VEGF-a na način da VEGF potiče njegovu sintezu, a pojačava i izražaj

$\alpha v\beta$ integrina na endotelnim stanicama (44). Shijubo i sur. su na modelu humanog adenokarcinoma pluća dokazali da istovremeni izražaj VEGF-a i OPN-a u tumorskom tkivu ima veći utjecaj na prognozu bolesnika nego svaki od njih zasebno, što upućuje na kooperativnu ulogu OPN-a u poticanju neoangiogeneze putem VEGF-a (45). S druge pak strane, Scatena i sur. su na modelu endotelnih stanica štakora ukazali na važnost aktivacije p50/p65 NF- κ B heterodimera za antiapoptotički učinak OPN-a (46).

1.2.5.6. Poticanje proliferacije stanica

Koristeći staničnu liniju karcinoma prostate LNCaP, Thalmann i sur. su ukazali na ulogu OPN-a u tumorskom rastu (35). U pokusu je rast tumorskih stanica potaknut endogenim OPN-om bio zaustavljen nakon tretiranja s protutijelom protiv OPN-a, ali dodatkom egzogenog OPN-a, tumorske su stanice nastavile svoj rast. U skladu s ovim in vitro pokusom su i kliničkopatološke studije koje su potvrdile povezanost povećanog izražaja OPN-a u tkivu tumora s povećanom proliferacijom tumorskih stanica, veličinom i stadijem tumora (27,32,35). S druge strane, poznato je da OPN ima zaštitnu ulogu u procesu apoptoze koja zajedno s proliferacijom određuje količinu stanica u tumorskoj masi, a time i samu veličinu tumora. Spomenut je mehanizam smanjivanja količine NO-a u mikrookolišu tumora djelovanjem OPN-a na makrofage koji ga luče (43), a neposredni anti-apoptotički utjecaj OPN-a na stanice objašnjava odjeljak koji slijedi.

1.2.5.7. Kočenje apoptoze

Apoptoza kao programirana stanična smrt, regulirana je putem različitih signalnih putova koji je potiču ili koče (47). Signalni putovi posredovani OPN-om koji sprovedu anti-apoptotičke signale započinju, kao što je već spomenuto, na staničnoj površini međudjelovanjem OPN-a s

$\alpha\beta$ integrina ili molekulom CD44. U in vitro i in vivo pokusima potvrđena je anti-apoptotička uloga OPN-a na modelima nekoliko različitih vrsta stanica kao što su tubularne epitelne stanice, glatke mišićne, endotelne, B stanice te stanice karcinoma dojke (19,20,40,46,48). Anti-apoptotički signalni putovi posredovani OPN-om razlikuju se ovisno o staničnom receptoru te vrsti stanice. Fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinazna B signalni put (PI3K/Akt) dokazan je na modelu Ba/F3 B stanične linije i vjerojatno uključuje CD44 molekul (48) dok su pokusi na kulturama endotelnih stanica štakora pokazali da signalni put, koji započinje međudjelovanjem OPN-a i $\alpha\beta_3$ integrina, uključuje aktivaciju jezgrenog čimbenika kappa B (NF- κ B) (46).

1.2.6. Prognostičko značenje osteopontina u humanim tumorima

Uloga OPN-a u napredovanju tumora dokazana je na eksperimentalnoj razini u različitim vrstama stanica. Učinci OPN-a vjerojatno se u nekoj mjeri razlikuju ovisno o vrsti stanice pa tako i vrsti tumora. Iz tog je razloga bilo potrebno istražiti prisustvo OPN-a u različitim vrstama tumora i ispitati povezanost s kliničkopatološkim pokazateljima kako bi se potvrdila njegova uloga u tumorskoj progresiji.

Prisustvo OPN-a u humanim tumorima prvi je pokazao Brown i sur. (26). Ispitujući biopsijske uzorke različitih karcinoma zaključili su da sadrže veće količine OPN mRNA u odnosu na normalna tkiva te da je ona većinom porijekla makrofaga združenih s tumorom, dok tumorske stanice u većini slučajeva nisu pokazivale mjerljive količine OPN mRNA metodom in situ hibridizacije. Daljnja su istraživanja potvrdila prisustvo OPN mRNA u tumorskim stanicama karcinomu pluća, dojke, jednjaka, želuca, usne šupljine, prostate i glioma, a metodom imunohistokemije dokazano je prisustvo OPN-a u tumorskim stanicama te s tumorom združenim makrofagima (19,21,28-36).

Različite kliničkopatološke studije su analizom velikog broja bioptičkih uzoraka različitih vrsta humanih tumora utvrdile povezanost pojačanog izražaja OPN-a u tumorskom tkivu s kliničkopatološkim pokazateljima loše prognoze. U studijama je opisan izražaj OPN-a i u normalnim strukturama, no samo je za OPN unutar tumorskih stanica utvrđena prognostička uloga. U karcinomu pluća (34) i dojke (29,31) pojačan izražaj OPN-a korelirao je s kraćim preživljavanjem bolesnika, u karcinomu prostate (35) i gliomima s gradusom (30), u karcinomu debelog crijeva (36) i želuca (33) s višim stadijem bolesti, a u posljednjem još i s limfovaskularnom invazijom i pojavom udaljenih metastaza.

OPN mRNA pronađena je u različitim humanim tumorima u povećanoj količini u odnosu na normalna tkiva upravo na račun OPN mRNA tumorskih stanica, a bez obzira na podrijetlo, utvrđena je njena korelacija s višim gradusom tumora i stadijem bolesti, recidivom bolesti i kraćim preživljavanjem (30-34,36).

1.2.7. Prognostičko značenje osteopontina u serumu bolesnika

U svom slobodnom obliku OPN se može dokazati u različitim tjelesnim tekućinama pa tako i u krvi. U povećanim je količinama prisutan u serumu u stanjima poput sepse, različitih bolesti bubrega i srca te u bolesnika sa zloćudnom bolesti u odnosu na zdrave individue (49).

U studijama na karcinomu dojke, pluća i prostate, glave i vrata te želuca povećana količina OPN-a u serumu bolesnika korelirala je s uznapredovanim stadijem bolesti, prisustvom metastaza te kraćim preživljavanjem (50-55). Navedene studije upućuju da određivanje količine OPN-a u serumu bolesnika s karcinomom može biti korisno u otkrivanju samog tumora, ali također i u predviđanju progresije maligne bolesti, imajući pritom u vidu da određena benigna stanja mogu imati utjecaja na koncentraciju OPN-a u serumu.

1.2.8. Dosadašnje spoznaje o prognostičkom značenju osteopontina u karcinomu bubrežnih stanica

Podatci o izražaju OPN-a u tumorskom tkivu KBS-a te njegovom odnosu prema prognostičkim pokazateljima vrlo su oskudni. Do sada su objavljene samo tri studije koje istražuju navedenu problematiku (26,27,56).

U već spomenutoj studiji Browna i sur. prvi puta se opisuje prisustvo OPN-a i njegove mRNA u tkivu karcinoma bubrega (26). Metodom *in situ* hibridizacije dokazana je OPN mRNA u tumorskim stanicama i makrofagima tumorske strome u svih 13 analiziranih SKBS-a, a jedini analizirani papilarni karcinom bubrežnih stanica nije pokazivao pozitivnu reakciju s OPN riboprobom. Metodom imunohistokemije dokazan je protein OPN u citoplazmama tumorskih stanica te u već spomenutim makrofagima u 7 uzoraka KBS-a. Osim karcinoma bubrega autori su ispitali prisustvo OPN-a i njegove mRNA i u tkivima različitih karcinoma probavnog sustava, dojke, pluća, mokraćnog mjehura, prostate, jajnika i dr. no jedino su tumorske stanice karcinoma bubrega i endometrija pokazivale mjerljive količine mRNA, dok je u ostalim spomenutim karcinomima OPN mRNA bila prisutna samo u makrofagima.

Coppola i sur. prvi su istražili povezanost OPN-a u KBS-u i prognostičkih pokazatelja (27). Korištenjem tkivnih mikroareja autori su istražili izražaj OPN-a metodom imunohistokemije u 24 različita humana tumora i rezultate usporedili s TNM stadijem bolesti. Većina je KBS-a (26 od 36) pokazivala citoplazmatski pozitivitet s anti-OPN protutijelom, a stupanj tog pozitiviteta pokazivao je korelaciju sa stadijem bolesti. Isti rezultat autori su dobili za manjinu ispitivanih karcinoma poput karcinom mokraćnog mjehura, debelog crijeva, grkljana, usne šupljine te žlijezda slinovnica.

U nedavno objavljenoj studiji koja je uključivala 80 bolesnika s KBS-om, određivana je količina OPN-a u serumu s ciljem utvrđivanja njene prognostičke vrijednosti (57). Visoke

serumske vrijednosti OPN-a korelirale su s pojavom metastaza i u odnosu na druge serumske biljege metastatske bolesti, OPN je pokazao najveću točnost u predviđanju njezine pojave. Bolesnici s visokim serumskim vrijednostima OPN-a imali su značajno kraće preživljavanje, a multivarijatna analiza je pokazala da je OPN nezavisni prediktivni čimbenik preživljavanja bolesnika s KBS-om.

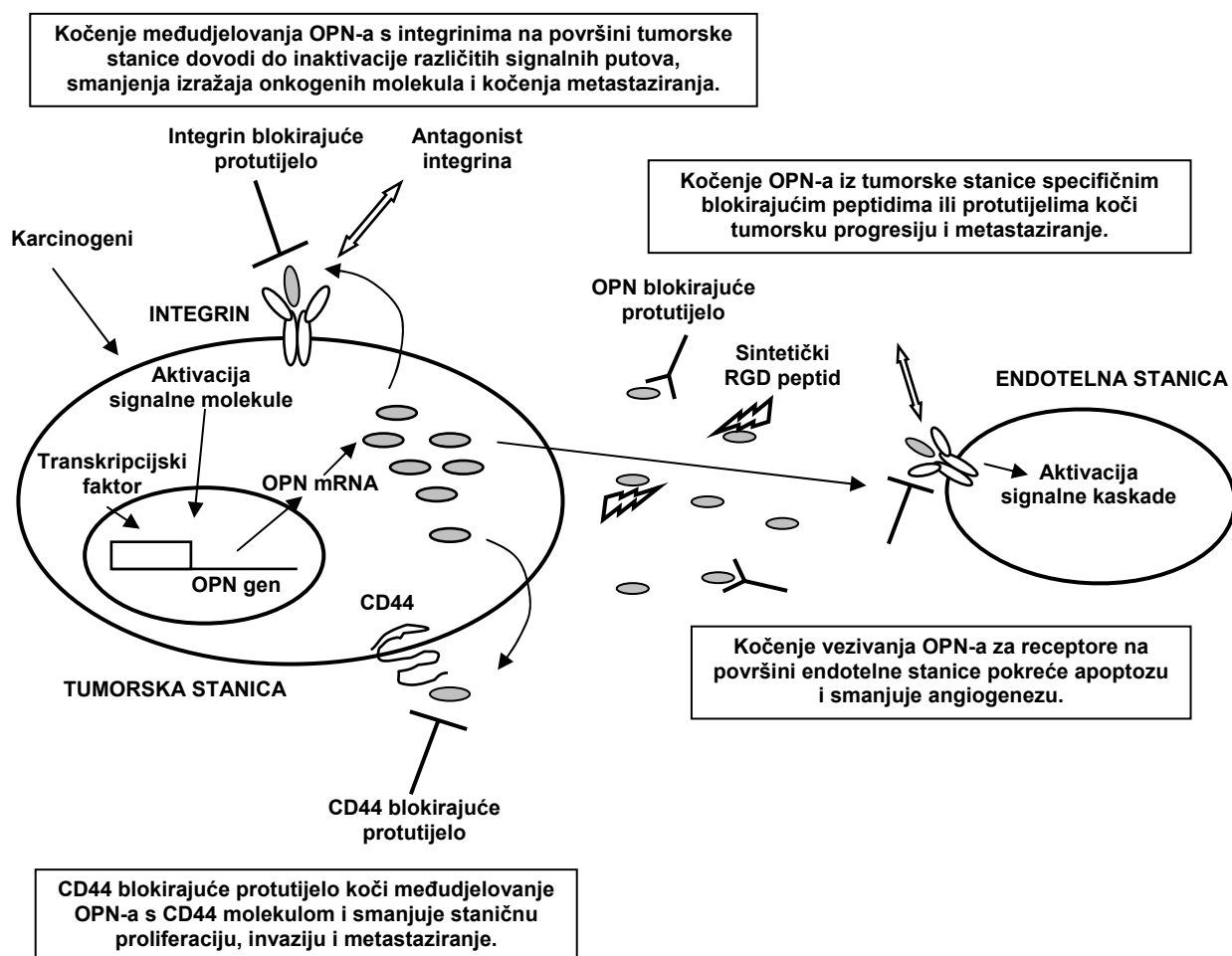
Iz izloženog se može zaključiti da je OPN mRNA kao i sam protein pojačano izražen u različitim humanim tumorskim tkivima pa tako i u KBS-u te je utvrđena njegova uloga u tumorskoj progresiji. Obzirom da OPN u tumorskom tkivu kao i u serumu bolesnika, koji boluju od karcinoma, pokazuje korelaciju s kliničkopatološkim pokazateljima loše prognoze i kraćim preživljavanjem, određivanje OPN-a i njegove mRNA u bioptičkom materijalu te serumu bolesnika sa zloćudnim tumorom može imati prognostičku vrijednost i pomoći u određivanju rizika pojave recidiva maligne bolesti.

1.2.9. Kočenje osteopontina kao nova strategija liječenja zloćudnih tumora

Iz dosadašnjeg se izlaganja može zaključiti da OPN može predstavljati univerzalni biljeg tumorske progresije i kao takav može biti korisna meta u liječenju zloćudne bolesti.

Eksperimentalne in vivo i in vitro studije su pokazale da tumorska stanica može steći invazivni fenotip kada se izloži djelovanju rekombinantnog OPN-a ili kada se transfecira s OPN cDNA plazmidom (58,59). S druge strane, tumori koji rastu u uvjetima bez OPN-a ili ukoliko je izražaj OPN-a na odgovarajući način zakočen, rastu sporije i rijetko metastaziraju (60,61). Experimentalni su dokazi o poticanju napredovanja i metastaziranja tumora djelovanjem OPN-a kao i povezanost pojačanog izražaja OPN-a s progresijom različitih humanih tumora naveli istraživače da molekulu OPN-a intenzivno istražuju kao potencijalnu metu liječenja metastatske bolesti (17,62). Na in vivo i in vitro modelima različitih tumora poput karcinoma dojke, pluća

prostate, gušterače, melanoma, jednjaka i debelog crijeva ispitivani su različiti mehanizmi kočenja djelovanja OPN-a (62). Korištenjem specifične antisense RNA i kratke interferirajuće RNA smanjen je izražaj OPN-a u tumorskoj stanici, a upotrebom specifičnih protutijela ili antagonista usmjerenih protiv samog OPN-a ili njegovih receptora spriječeno je djelovanje OPN-a na tumorsku stanicu čime je spriječena zloćudna transformacija stanica, smanjena adhezija, invazija i preživljavanje tumorskih stanica te usporen rast i napredovanje tumora kao i pojava metastaza (Slika 6).



Slika 6. Grafički prikaz različitih pristupa liječenju karcinoma djelovanjem na receptore osteopontina (OPN).
Preuzeto iz Jain i sur. (62).

Osim navedenih mehanizama liječenja, koja se temelje na kočenju OPN-a, djelovanje na signalne putove koji su posredovani OPN-om, može također predstavljati koristan terapijski pristup u liječenju zloćudne bolesti (Tablica 6).

Tablica 6. Kratki pregled mogućnosti liječenja djelovanjem na kinaze, transkripcijske čimbenike i efektorske onkogene molekule regulirane osteopontinom (OPN). Preuzeto iz Jain i sur. (62).

Ciljna molekula	Inhibitor	Učinak
PI3K	Wortmanin	Inhibira OPN-om potaknutu aktivaciju PI3K, Akt, IKK-a i NF-κB, izražaj uPA, pokretljivost i invazivnost stanica karcinoma dojke.
	LY294002	
EGFR	PD153035	Koči OPN-om potaknutu ERK1/2 fosforilaciju, AP-1 aktivaciju i rast karcinoma dojke.
	Trifostin	
c-Src	pp2	Koči nizvodne signalne putove u stanicama karcinoma dojke i prostate.
ERK1/2	PD98059	Inhibira OPN-om potaknutu aktivaciju AP-1 i NF-κB u stanicama karcinoma dojke i melanoma.
JNK1	SP600125	Inhibira OPN-om potaknutu aktivaciju AP-1 i izražaj MMP-9 u melanomu glodavaca.
PKCα	Staurosporin	Inhibira OPN-om potaknutu aktivaciju IKK-a i NF-κB, stvaranje MMP-2 i PGE2 i pokretljivost i invazivnost stanica karcinoma prostate.
NF-κB	SN50	Koči OPN-om potaknut izražaj uPA i pokretljivost i invazivnost stanica karcinoma dojke.
	Kurkumin	
MMP-2	Blokirajuće protutijelo i antisense oligonukleotid	Koči in vitro i in vivo napredovanje melanoma.
MMP-9	Blokirajuće protutijelo	Koči in vitro i in vivo napredovanje melanoma.
uPA	Blokirajuće protutijelo	Koči in vitro i in vivo napredovanje melanoma.
COX-2	Celekoksib	Koči OPN-om potaknuto napredovanje karcinoma prostate.
	NS398	
PGE/EP-2	EP-2 blokirajuće protutijelo	Koči napredovanje karcinoma prostate.

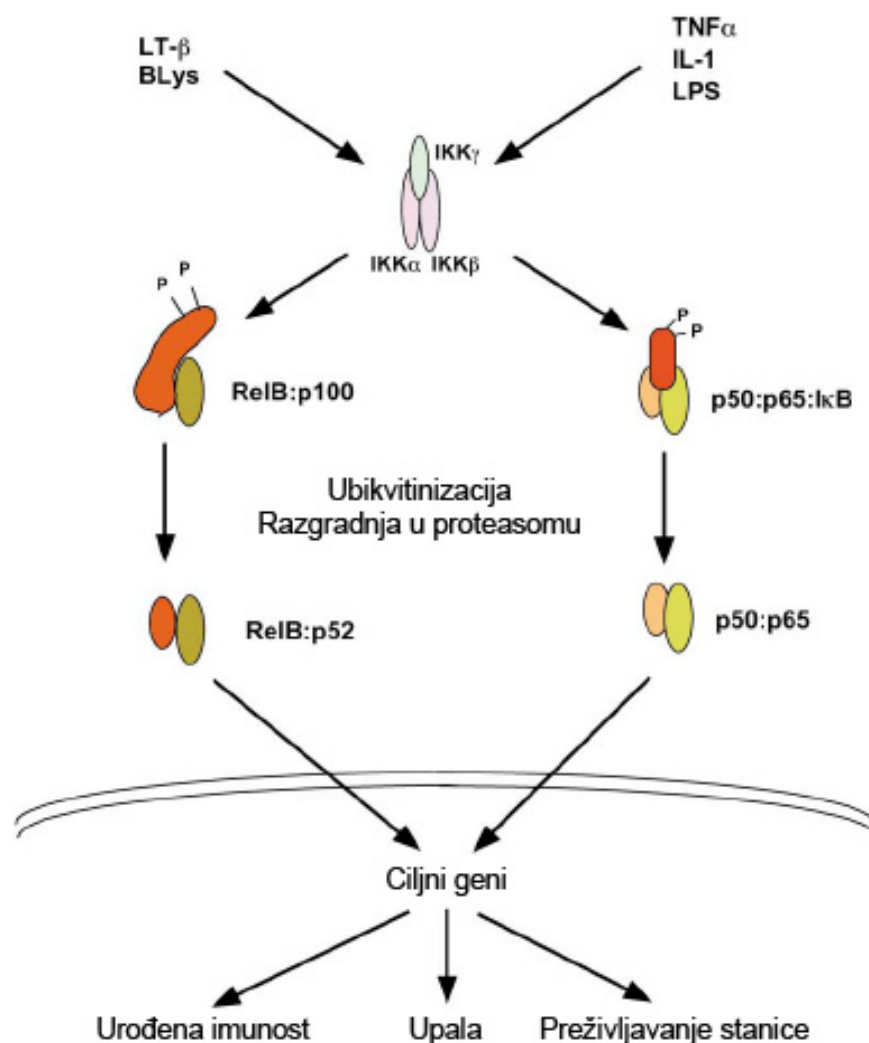
ERK: kinaza regulirana izvanstaničnim signalima; IKK: IκB kinaza; JNK: Jun-N-terminalna kinaza; MMP: matriks metaloproteinaza; OPN: osteopontin; PGE: prostaglandin E; PI3K: fosfatidilinozitol 3-kinaza; PKC: protein kinaza C; uPA: urokinazni aktivator plazminogena.

1.3. Jezgreni čimbenik kappa B

1.3.1. Aktivacija jezgrenog čimbenika kappa B i njegove biološke uloge

Jezgreni čimbenik kappa B (NF- κ B, od engl. nuclear factor kappa B) jedan je od najbolje proučenih eukariotskih transkripcijskih čimbenika (63). Pripada Rel/NF- κ B porodici transkripcijskih čimbenika koja uključuje 5 gena: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB i c-Rel (64). Iz navedenih 5 gena nastaje 7 proteinskih homo ili heterodimera koji sadrže zajedničku domenu u svojoj strukturi, RDH domenu (od engl. Rel Homology Domain). RDH domena im omogućava dimerizaciju, međudjelovanje sa specifičnim inhibitorima te vezivanje za DNA (64). NF- κ B proteini se javljaju u dva oblika: kao zreli oblici (RelA, RelB i c-Rel), koji sadrže transaktivacijsku domenu za međudjelovanje s transkripcijskim aparatom, te kao prekursorski oblici (p50/p105 i p52/p100), koji nakon proteolitičkog cijepanja C-terminalnog dijela postaju zreli oblici, no ne sadrže transaktivacijsku domenu te stoga, ukoliko formiraju homodimere, mogu djelovati kao transkripcijski represori (65). NF- κ B dimeri su u neaktivnom obliku vezani uz specifične inhibitore (I κ B) koji maskiraju njihov NLS (od engl. nuclear localisation signal) te su zbog toga NF- κ B dimeri u većini stanica smješteni u citoplazmi (65). I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ i Bcl-3 su NF- κ B specifični inhibitori koje I κ B kinaze (IKK) fosforiliraju nakon čega slijedi njihova razgradnja u proteasomu (64). IKK su građene od dvije katalitičke podjedinice (IKK α i β) te jedne regulatorne podjedinice IKK γ koja se još naziva i NF- κ B osnovni modulator (NEMO, od engl. NF- κ B essential modulator) (65). Aktivacija NF- κ B posljedica je stimulacije velikog broja signalnih putova citokinima, faktorima rasta, hormonima, ligandima receptora tirozin kinaze te bakterijama, virusima i njihovim produktima (64,65). Povećan izražaj nekih receptora za čimbenike rasta te aktivacija Ras/mitogen aktivirane protein kinaze i PI3K/Akt signalnih putova može također dovesti do NF- κ B aktivacije (64). Predložena su tri molekularna

mehanizma NF- κ B aktivacije: klasični put i alternativni koji ovise o IKK te IKK neovisni put (66). Klasični put NF- κ B aktivacije tipično pokreću pro-upalni citokini i virusne infekcije, a aktivirani dimeri uključuju RelA ili c-Rel zajedno s p50 (64). Osim toga, navedeni put aktivacije važan je za onkogenezu. Tijekom ovakvog načina aktivacije, ključno je djelovanje IKK β koja fosforilira I κ B. On se zatim razgrađuje u proteasomu, a oslobođeni NF- κ B se premješta u jezgru (Slika 7) (67).



Slika 7. Model prikazuje dva signalna puta jazgrenog čimbenika kappa B (NF- κ B). Jedan je klasični, posredovan IKK β -om koja dovodi do fosforilacije I κ B. Drugi put uključuje IKK α koja dovodi do fosforilacije i nastanka p100, stvarajući p52:RelB heterodimere. Preuzeto iz Ghosh i sur. (67).

Alternativni put aktivacije NF- κ B obično je posredovan članovima porodice čimbenika nekroze tumora (TNF, od engl. tumor necrosis factor). Ovim signalnim putem se pretežito aktivira IKK α koja fosforilira p100 pa nastaje zrela forma p52 vezana uz RelB, a dimer se premješta jezgri (Slika 7) (67). U jezgri većina NF- κ B dimera djeluje potičući gensku transkripciju, iako neki dimeri imaju sposobnost kočenja prepisivanja gena (65). NF- κ B djeluje na jako veliki broj različitih gena poput gena koji kodiraju citokine, čimbenike rasta, adhezijske molekule te pro i anti-apoptotičke proteine. U svakom slučaju, različitost građe NF- κ B dimera omogućava njegovo sudjelovanje u velikom broju staničnih zbivanja, a načini aktivacije omogućavaju brze promjene staničnih zbivanja koja su njime posredovana. U fiziološkim stanjima, aktivacija NF- κ B je prolazni i kratkotrajni događaj koji se zbiva na specifičan podražaj i važan je za normalan embrionalni razvoj, razvoj i funkcioniranje imunološkog sustava te odvijanje stanične proliferacije i preživljavanja stanica (66). Aktivacija NF- κ B prisutna je u različitim patološkim stanjima poput upalnih bolesti i novotvorina koja su karakterizirana konstitutivnom, odnosno trajnom aktivacijom NF- κ B (Tablica 7) (66).

Tablica 7. Uloga aktivacije jezgrenog čimbenika kappa B (NF- κ B) u humanim bolestima.
Preuzeto iz Escárcega i sur. (66).

Upalne bolesti	Infektivne bolesti
Astma	AIDS
Ateroskleroza	Gastritis povezan s <i>Helicobacter pylori</i>
Upalna bolest crijeva	Hepatitis B virus
Multipla skleroza	Hepatitis C virus
Reumatoidni artritis	Virus humane T-stanične leukemije
Sindrom sistemske upalne reakcije	
Rak	Metaboličke bolesti
Nekoliko vrsta raka pokazuje NF- κ B aktivaciju	Dijabetes
	Eutiroidni bolesni sindrom

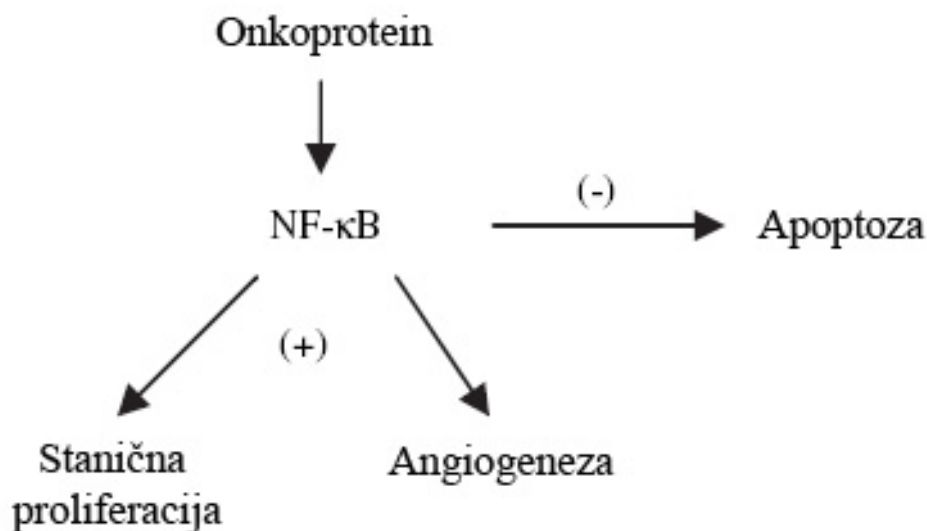
1.3.2. Uloga jezgrenog čimbenika kappa B u nastanku i širenju tumora

1.3.2.1. Abnormalna regulacija jezgrenog čimbenika kappa B u tumorskoj stanici

Eksperimentalni in vitro i in vivo modeli ukazali su na činjenicu da abnormalna regulacija NF- κ B može izazvati zloćudnu transformaciju stanice, a isto tako potaknuti tumorsku progresiju (64-66). Genetske alteracije poput točkastih mutacija, amplifikacija i translokacija NF- κ B gena ili gena NF- κ B inhibitora, zatim trajna stimulacija IKK-a ili drugih signalnih putova može uzrokovati konstitutivnu aktivaciju NF- κ B u tumorskoj stanici (64-66,68). Povezanost NF- κ B s onkogenezom utvrđena je u istraživanjima virusnih onkoproteina. Na primjer, v-Rel, koji pokazuje homologiju sa c-Rel proteinom, može izazvati limfome i leukemije u životinja, a virusni onkoproteini izolirani iz virusa 1 humane T-stanične leukemije (HTLV-1, od engl. human T-cell leukemia virus 1) i Epstein-Barrovog virusa (EBV) mogu djelovati na aktivaciju IKK kompleksa i uzrokovati NF- κ B aktivaciju (69,70). Nadalje, u neoplazmama hematopoetskog sustava uočene su genetske promjene koje zahvaćaju NF- κ B gene poput amplifikacija c-Rel-a, delecije NF- κ B2 lokusa što dovodi do konstitutivne aktivacije p52 te translokacije koje dovode do povećanog izražaja Bcl-3 (64). Osim toga, uočene su i genetske alteracije NF- κ B inhibitora, I κ B α , u vidu točkastih mutacija koje dovode do gubitka njegove funkcije te translokacije koje dovode do stvaranja fuzijskog proteina Bcr-Abl (71) ili povećanog izražaja Bcl-10 koji također mogu aktivirati NF- κ B (72). Genetske promjene u signalnim putovima koji reguliraju NF- κ B aktivaciju isto tako dovode do njegove konstitutivne aktivacije. Primjer su dva onkogeni često zahvaćeni u brojnim humanim zloćudnim tumorima: PTEN, tumor supresor gen i Ras, proto onkogen (64).

1.3.2.2. Jezgreni čimbenik kappa B u mehanizmima napredovanja tumora

Abnormalna NF- κ B regulacija dovodi do poremećaja transkripcije gena koji su pod njegovom kontrolom. Tu se prije svega ubrajaju geni uključeni u regulaciju apoptoze i stanične proliferacije te stanične adhezije i migracije. Obzirom da poremećaji u navedenim procesima doprinose razvoju i napredovanju tumora, može se zaključiti da NF- κ B ima važnu ulogu u nastanku i širenju zloćudne bolesti (Slika 8) (66).



Slika 8. Glavni načini djelovanja jezgrenog čimbenika kappa B (NF- κ B) u onkogenezi. Aktivacija NF- κ B koči apoptozu, potiče staničnu proliferaciju i angiogenezu. Preuzeto iz Escárcega i sur. (66).

U većini istraživanja koja ispituju utjecaj NF- κ B na programiranu staničnu smrt, ističe se prvenstveno njegova uloga u kočenju tog procesa putem različitih mehanizama koji djeluju na signalne putove apoptoze (64-66). Poticanje stanične proliferacije NF- κ B ostvaruje reguliranjem gena uključenih u kontrolu staničnog ciklusa, kao što su ciklin D1, D2 i D3 i ciklin E, zatim c-myc i c-mycb (64). No, sve je više dokaza o ulozi NF- κ B kao tumor supresora pa u tom smislu i njegovoj ulozi u poticanju procesa apoptoze i kočenju stanične diobe (64,68).

Osim toga, aktivacija NF- κ B dovodi do povećanog izražaja adhezijskih molekula i proteaza za razgradnju ISM-a kao što su MMP-i te pro-angiogenih molekula poput VEGF-a što zajednički doprinosi tumorskoj invaziji i metastaziranju (64).

Značajan broj istraživanja utvrdio je povezanost upalnih procesa i karcinogeneze, a NF- κ B predložio za posrednika između ta dva procesa. Koristeći eksperimentalne modele istraživači su utvrdili da stvaranje pro-upalnih citokina poput TNF- α , interleukina-1 i 6, od strane različitih upalnih stanica u tumorskom mikrookolišu može izazvati aktivaciju NF- κ B u stanicama prekanceroznih lezija potičući preživljavanje i daljnju diobu genetski promijenjenih stanica doprinoseći stvaranju dodatnih genetskih promjena što dovodi do progresije tumora (65). Uz to, pokusi na mijelomskim stanicama su pokazali da pro-upalni citokini mogu djelovati kao faktori rasta, a njihovo se stvaranje može zaustaviti blokiranjem NF- κ B (66).

Aktivacija NF- κ B signalnog puta važna je i u progresiji koštanih metastaza (65). Potaknute od strane tumorskih stanica, u stromalnim stanicama koštane srži dolazi do NF- κ B aktivacije i posljedičnog poticanja osteoklastogeneze. Osteoklasti zatim potiču rast koštanih metastaza lučenjem različitih čimbenika rasta.

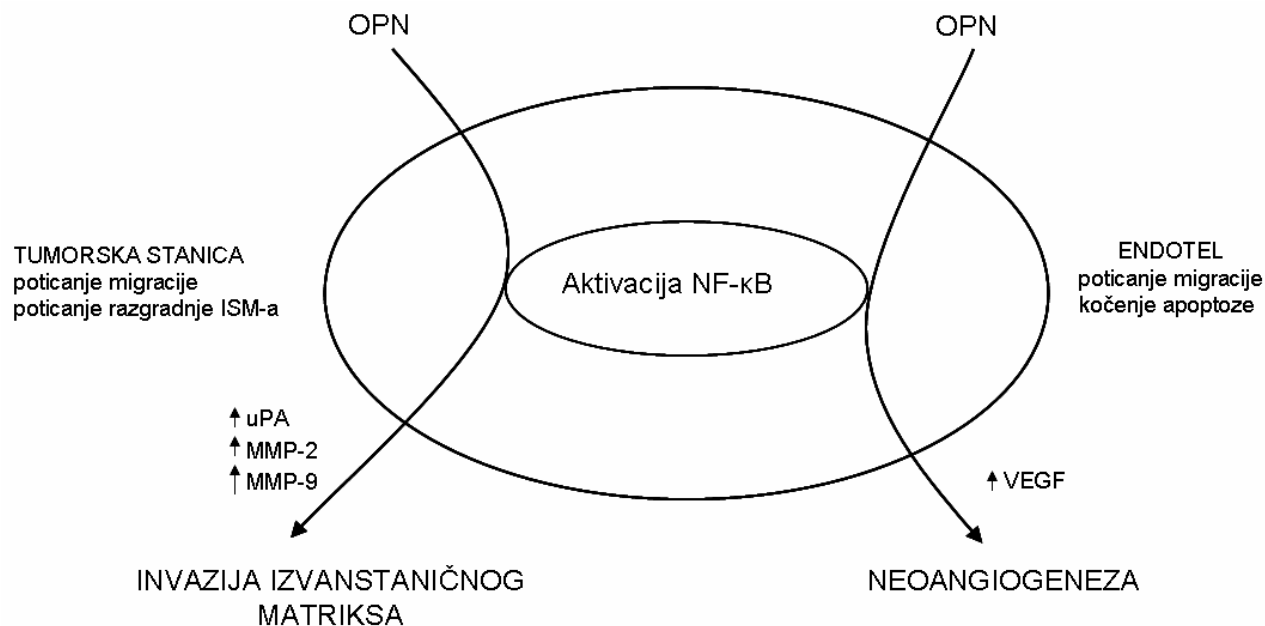
1.3.2.3. Jezgreni čimbenik kappa B u humanim tumorima

Osim u već spomenutim novotvorinama hematopoetskog sustava, uloga NF- κ B istraživana je i u različitim solidnim tumorima (73-80). U kliničkopatološkim studijama određivano je prisustvo NF- κ B u jezgrama tumorskih stanica korištenjem specifičnih protutijela, odnosno određivana je njegova aktivacija te je uspoređivana s parametrima tumorske progresije. U većini istraživanih karcinoma ispitan je izražaj p50-p65 heterodimera obzirom da se taj dimer u stanicama stvara u najvećoj količini. U tumorskom tkivu karcinoma debelog crijeva (76), gušterače (74), prostate (79,81), usne šupljine (75), želuca (77) i endometrija (78) bila je prisutna

NF- κ B aktivacija, dok normalno tkivo nije pokazivalo aktivaciju ili je ona bila vrlo mala. Rezultati su navedenih studija pokazali povezanost NF- κ B aktivacije s višim gradusom i stadijem tumora (77,81) te limfovaskularnom invazijom (77). Osim toga, spomenute su kliničkopatološke studije potvrdile eksperimentalno utvrđene mehanizme djelovanja NF- κ B na tumorsko napredovanje. Aktivacija je NF- κ B u tumorskim stanicama korelirala s izražajem različitih molekula koje imaju ključnu ulogu u procesima tumorske progresije, a čija je genska transkripcija regulirana putem NF- κ B, poput Bcl-2, ciklina D1, MMP-9 i VEGF-a (79) te Bcl-xL-a (78), Akt kinaze (75) i ciklooksigenaze -2 (76).

1.3.3. Jezgreni čimbenik kappa B u signalnom putu osteopontina

NF- κ B jedan je od važnih posrednika u signalnom putu OPN-a (17). Ovaj transkripcijski faktor sudjeluje u različitim procesima tumorske progresije poput invazije ISM-a, neoangiogeneze i izbjegavanja procesa apoptoze koji su, kao što je već rečeno, omogućeni povećanim stvaranjem OPN u tumorskom tkivu (Slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz signalnih putova osteopontina (OPN) koji dovode do aktivacije jezgrenog čimbenika kappa B (NF-κB) u tumorskoj stanici omogućavajući stjecanje zloćudnih karakteristika. Aktivacija NF-κB dovodi do pojačanog stvaranja enzima za razgradnju izvanstaničnog matriksa (ISM) poput urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA) i matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2, MMP-9) zbog čega se potiče stanična migracija i invazija ISM-a. Osim toga, aktivacija NF-κB dovodi do pojačanog stvaranja vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) koji djelovanjem na endotelne stanice potiče neoangiogenezu.

In vitro pokusi na staničnim linijama melanoma i karcinoma dojke otkrili su da OPN potiče migraciju tumorskih stanica i invaziju ISM-a tako što potiče stvaranje proteaza ISM-a (82-84). Djelovanjem OPN-a u tumorskoj stanici dolazi do aktivacije NF-κB što dovodi do pojačanog stvaranja i aktivacije uPA (83), MMP-2 (82) i MMP-9 (84). Djelovanjem aktiviranih proteaza dolazi do pojačane razgradnje ISM-a što omogućava invaziju tumorskih stanica prema krvnim i limfnim žilama. Osim toga, vezivanje MMP-2 za $\alpha\beta_3$ integrine na površini tumorske stanice potiče staničnu proliferaciju, a vezivanje OPN-a za spomenute integrine potiče staničnu adheziju za ISM, a time i njihovu migraciju. Aktivacija PI3K/Akt signalnog puta djelovanjem OPN-a na $\alpha\beta_3$ integrine, smatra se ključnim događajem koji vodi do aktivacije IKK-a, degradacije $I\kappa B\alpha$ i na kraju translokacije NF-κB u jezgru s posljedičnim povećanim stvaranjem

uPA u staničnim linijama karcinoma dojke (83), a aktivacija kinaze koja potiče jezgri čimbenik kappa B (NIK, od engl. nuclear kappa B inducing kinase) djelovanjem OPN-a na $\alpha\text{v}\beta_3$ integrine, se smatra ključnim događajem koji vodi do neposredne aktivacije IKK α/β ili posredne putem aktivacije signalnog puta protein kinaze aktivirane mitogenima, s posljedičnom degradacijom I κ B α , aktivacijom NF- κ B i povećanim stvaranjem uPA te aktivacijom MMP-9 u stanicama melanoma glodavaca (84).

Istraživanja na staničnim linijama endotela i karcinoma dojke pokazala su da se proangiogeni učinak OPN-a ostvaruje zajedničkim djelovanjem OPN-a, NF- κ B i VEGF-a (25,44,46). OPN potiče stvaranje VEGF-a u tumorskoj stanici vjerojatno posredovanjem aktivacije NF- κ B (25,64). Izlučeni VEGF zatim djeluje na endotelne stanice potičući ih da pojačano izražavaju $\alpha\text{v}\beta_3$ integrine i stvaraju OPN (44). VEGF osim toga potiče cijepanje OPN-a putem trombina što povećava djelotvornost OPN-a (44). U konačnici VEGF-om stimulirane endotelne stanice pokazuju pojačanu sposobnost migracije prema OPN-u što može utjecati na pojačano stvaranje novih krvnih žila u tumoru koji pojačano stvara OPN. NF- κ B aktivacija potaknuta OPN-om u endotelnim stanicama može imati utjecaja na njihovo produženo preživljavanje pa to također može doprinijeti pojačanoj neoangiogenezi (46). Pritom je dokazana aktivacija NIK-a djelovanjem OPN-a na $\alpha\text{v}\beta_3$ integrine endotelnih stanica štakora što dovodi do aktivacije IKK β , degradacije I κ B α i aktivacije NF- κ B (85).

1.3.4. Jezgri čimbenik kappa B i liječenje raka

Pojava otpornosti na kemo i radioterapiju predstavlja golem problem u liječenju velikog broja zloćudnih tumora. Uočeno je da tumori, koji su radio i kemorezistentni, istovremeno pokazuju i konstitutivnu aktivaciju NF- κ B koju mogu izazvati i sami kemoterapeutici poput irinotekana i doksorubicina (86). Smatra se da NF- κ B doprinosi otpornosti na kemo i

radioterapiju tako što potiče transkripciju gena za višestruku otpornost na lijekove, a dovodi i do kočenja apoptoze (64). Istraživanja su pokazala da NF- κ B inhibicija može spriječiti pojavu kemo i radiorezistencije i na taj način povećati učinkovitost antitumorskog liječenja (86). Kočenje NF- κ B aktivacije osobito može biti od koristi u liječenju novotvorina povezanih s kroničnom upalom (86).

Lijekovi dizajnirani za kočenje NF- κ B aktivacije mogu djelovati na nekoliko razina (86). NF- κ B inhibitori poput različitih prirodnih spojeva kao što su izoflavonidi koče međudjelovanje NF- κ B s DNA. Inhibitori IKK-a poput sulfasalazina i nesteroidnih protuupalnih lijekova koče razgradnju inhibitora NF- κ B. Kortikosteroidi sudjeluju u kočenju NF- κ B aktivacije direktnim međudjelovanjem s p65/ NF- κ B te aktivirajući i povećavajući izražaj I κ B. Naposljetku, inhibitori proteasoma poput bortezomiba, djeluju na povećanje količine inhibitora NF- κ B (I κ B), pro-apoptotičkih molekula i ciklina, a stabiliziraju i p53 što u konačnici potiče apoptozu i dovodi do zastoja staničnog ciklusa. Učinak bortezomiba ispitan je na staničnim linijama KBS-a (87). Autori su uočili da taj inhibitor proteasoma izaziva apoptozu tumorskih stanica, ali da je taj učinak samo dijelom posredovan kočenjem aktivacije NF- κ B što može biti važno za tumore koji ne pokazuju konstitutivnu aktivaciju NF- κ B. Koristeći in vitro i in vivo model KBS-a dokazan je učinak NF- κ B inhibitora sulfasalazina i BAY 11-7085 na smanjenje tumorskog rasta izazivanjem apoptoze tumorskih stanica (88). Spomenuta istraživanja ukazuju da inhibicija NF- κ B signalnog puta može biti korisna meta u liječenju KBS-a.

Nekolicina animalnih modela je ukazala na povezanost kočenja NF- κ B i nastanka tumora pa bi iz tog razloga neki NF- κ B inhibitori mogli potpomognuti progresiju nekih vrsta tumora (65). Stoga su potrebna daljnja funkcionalna istraživanja koja će odrediti svrsishodnost primjene NF- κ B inhibitora u pojedinim tipovima zloćudnih tumora. Isto tako, zbog daljnjeg razvoja lijekova koji koče NF- κ B signalni put i njihove šire primjene, biti će potrebno, prije

primjene specifične terapije, utvrditi konstitutivnu aktivaciju NF- κ B u bioptičkim uzorcima tumorskog tkiva korištenjem specifičnih protutijela.

1.4. Apoptoza

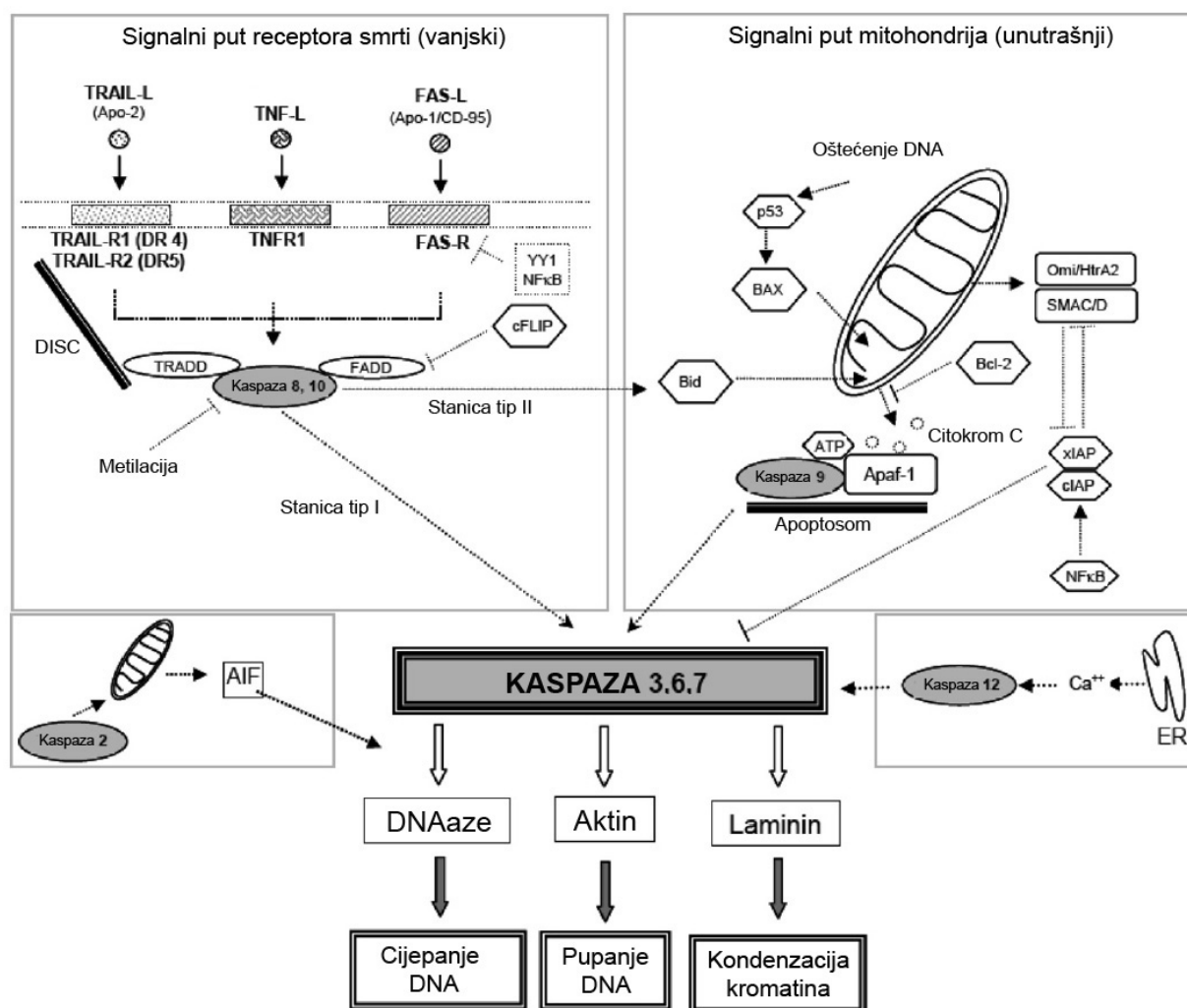
1.4.1. Proces apoptoze

Apoptoza ili programirana stanična smrt predstavlja aktivni i kontrolirani proces u kojem stanice na organiziran i učinkovit način sudjeluju u vlastitom samouništenju. Velik broj različitih izvanstaničnih ili unutarstaničnih podražaja može pokrenuti apoptozu koja je izrazito važna u razvojnim procesima kao i brojnim bolestima, uključujući tumore.

Apoptoza nastaje kao rezultat poremećaja ravnoteže čimbenika koji ju koče (anti-apoptotički čimbenici) i čimbenika koji ju potiču (pro-apoptotički čimbenici). Ovisno o vrsti stanice i podražaja, u proces apoptoze biti će uključene različite molekule. Uobičajeno je da se signalni putevi apoptoze dijele na vanjske, koji započinju s receptorima smrti na staničnoj površini i unutrašnje, koji započinju u unutrašnjosti stanice, u mitohondrijima. Oba signalna puta dovode do istovjetnog rezultata – aktivacije proteolitičkih enzima, kaspaza, koje su na neki način biokemijsko obilježje procesa apoptoze (89). Inicijatorske kaspaze aktiviraju signalni putevi, a one nadalje dovode do aktivacije egzekutorskih kaspaza, koje aktiviraju specifične enzime za razgradnju staničnih makromolekula, u prvome redu DNA. U odnosu na druga zbivanja, koja isto tako mogu dovesti do cijepanja molekule DNA, u apoptozi dolazi do cijepanja intranukleosomalne DNA, čime nastaju kratki odsječci DNA koji se koriste u različitim tehnikama detekcije apoptoze (89). Proces apoptoze završava stvaranjem apoptotičkih tjelešaca. To su dijelovi citoplazme okruženi membranom i obično sadrže pojedine stanične organele i

morfološki su dokaz apoptoze, obzirom da su vidljivi svjetlosnim mikroskopom. Apoptotička tjelešca bivaju naposljetku uklonjena od strane makrofaga.

Vanjski put apoptoze započinje na staničnoj membrani međudjelovanjem receptora smrti sa specifičnim ligandima što dovodi do regrutiranja adaptorskih molekula i aktivacije inicijatorskih kaspaza (Slika 10) (89). Unutrašnji put započinje izlaskom citokroma c iz mitohondrija u citosol. Slijedi stvaranje apoptosoma koji dovodi do aktivacije inicijatorske kaspaze (Slika 10) (89).



Slika 10. Mehanizmi apoptoze. Signalni putovi apoptoze: signalni put receptora smrti (vanjski) i signalni put mitohondrija (unutrašnji). AIF: čimbenik koji potiče apoptozu; ATP: adenzin trifosfat; ER: endoplazmatski retikulum; FAS-L: FAS ligand; FAS-R: FAS receptor; IAP: inhibitor apoptoze; NF-κB: jezgreni čimbenik kappa B; TNF-L: čimbenik nekroze tumora; TNFR: receptor čimbenika nekroze tumora; TRAIL-L: s TNF-om povezan ligand koji potiče apoptozu; TRAIL-R: TRAIL receptor. Prilagođeno prema Huerta i sur. (89).

Međusobni odnos pro-apoptotičkih i anti-apoptotičkih posrednika utječe na propusnost mitohondrijske membrane za citokrom c. Bax, Bak, Bid i Bim su pro-apoptotičke molekule za koje se pretpostavlja da mogu stvoriti kanale u mitohondrijskim membranama ili promijeniti njihov naboj i tako doprinijeti izlasku citokroma c (22,89). S druge strane, molekule poput Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1 svoje anti-apoptotičko djelovanje ostvaruju vezivanjem pro-apoptotičkih molekula (89). Osim navedenih molekula, SMAC/DIABLO i Omi/HTRA-2 igraju važnu ulogu u neutralizaciji inhibitora apoptoze (IAP) čime doprinose aktivaciji apoptoze (89).

1.4.2. Uloga apoptoze u nastanku i širenju tumora

Regulacija apoptoze uz regulaciju staničnog ciklusa predstavlja vrlo važan mehanizam za kontrolu pojave i opstanka neoplastičnih stanica (47). Apoptozom se uklanjaju stanice koje su pretrpile kritična oštećenja genoma koja mogu dovesti do poremećenog rasta stanice (47). Isto tako, rast tumora uvjetovan je povećavanjem broja tumorskih stanica, što ovisi o njihovoj diobi, ali isto tako i o gubicima tumorskih stanica apoptozom (22). Produženo preživljavanje će osim toga tumorskoj stanici omogućiti stjecanje novih mutacija koje će pokrenuti mehanizme potrebne za tumorsko širenje i metastaziranje (22). Eksperimentalni su modeli i studije na humanom biopsičkom tumorskom tkivu priskrbili dokaze da je otpornost prema apoptozi jedan od biljega većine, a možda i svih vrsta zloćudnih tumora (22).

Predloženo je nekoliko mehanizama koji tumorskoj stanici omogućavaju izbjegavanje programirane stanične smrti. Jedan od njih su promjene ravnoteže između pro i anti-apoptotičkih molekula unutrašnjeg i vanjskog puta apoptoze u korist anti-apoptotičkih što je često posredovano aktivacijom NF- κ B (22,47,64). Povećane količine anti-apoptotičkih molekula Bcl-2 i Bcl-xL pronađene su u različitim tumorima kao posljedica kromosomskih translokacija, npr. u limfomima, ili poremećaja određenih signalnih putova, npr. NF- κ B (22,47,64). Gubitak Apaf-1

koji sudjeluje u stvaranju apoptosoma čest je u melanoma (90). Isto tako, poremećaj nekih drugih signalnih putova može imati utjecaj na proces apoptoze. Primjer je PTEN, tumor supresor gen, čija je delecija, inaktivacija ili smanjena transkripcija otkrivena u brojnim tumorima (91). PTEN je negativni regulator PI3K/Akt signalnog puta koji sudjeluje u aktivaciji NF- κ B i time doprinosi kočenju apoptoze (64). Nadalje, čuvar genoma, p53, važan je u regulaciji staničnog ciklusa, ali i apoptoze. Aktiviraju ga različiti stresni signali poput nedostatka hranjivih tvari i kisika te osobito, oštećenje DNA što rezultira zastojem staničnog ciklusa u G1 fazi ili aktivacijom procesa apoptoze. Više od 50% različitih tumora pokazuje mutacije, koje inaktiviraju p53 ili je njegova funkcija onemogućena djelovanjem nekih drugih onkogeni, što unatoč prisustvu genetskih oštećenja, omogućava tumorskoj stanici preživljavanje, a tumoru daljnji rast i napredovanje (22,47).

1.4.3. Jezgreni čimbenik kappa B u signalnim putovima apoptoze

Općenito je prihvaćeno da je aktivacija NF- κ B odgovorna za otpornost stanice na pokretanje programirane stanične smrti, iako je nedavno otkriveno da NF- κ B može posjedovati i pro-apoptotičku funkciju (64,66). NF- κ B djeluje na transkripciju brojnih gena pa tako i onih uključenih u oba signalna puta apoptoze (Slika 10) (64,66,89). Aktivacijom NF- κ B povećava se količina molekula koje sudjeluju u signalnom putu receptora smrti poput inhibitora kaspaza, FLIP-a, i čimbenika povezanog s receptorom za TNF, TRAF 2 i 6 (64). Na unutrašnji signalni put NF- κ B djeluje povećavanjem količine inhibitora apoptoze (IAP), Bcl-xL-a i smanjenjem količine molekula koje su uključene u signalne putove poticanja apoptoze, poput PTEN-a i p53 (64,66). Isto tako, NF- κ B potiče transkripciju gena, koji štite stanicu od oksidativnog stresa, čime se uklanja podražaj koji može pokrenuti apoptozu (66).

1.4.4. Jezgreni čimbenik kappa B i apoptoza u karcinomu bubrežnih stanica

Istraživanja aktivacije NF- κ B i njegovog prognostičkog značaja u biopsijskim uzorcima KBS-a ograničena su na vrlo mali broj studija (73,88), ali su u skladu s rezultatima studija na drugim tipovima karcinoma. Na modelu KBS-a s paraneoplastičkim sindromom, aktivacija NF- κ B korelirala je s višim gradusom i stadijem tumora te serumskom razinom C-reaktivnog proteina (73). Autori su predložili da je aktivacija NF- κ B odgovorna za selekciju invazivnih tumorskih klonova zbog stvaranja pro-upalnih citokina kao što je C-reaktivni protein koji potiče rast i preživljavanje tumorskih stanica. Druga studija na tkivnim mikroarejama KBS-a pokazala je povezanost aktivacije NF- κ B s veličinom tumora (88). Iz navedenog se može zaključiti da aktivacija NF- κ B ima ulogu u progresiji KBS-a.

Podražaji koji koče apoptozu i potiču preživljavanje stanica smatraju se promotorima tumorske progresije (22). Kliničkopatološke studije na različitim vrstama humanih tumora pa tako i KBS-u nemaju ujednačene rezultate vezane uz prognostički značaj apoptoze bez obzira na metodu njene detekcije (56,59,92-94). Napredovanje tumora i proliferacija tumorskih stanica je ovisno o tipu tumora bila povezana sa smanjenom ili povećanom apoptozom tumorskih stanica što vjerojatno ovisi o mehanizmima koji reguliraju ravnotežu između proliferacije i apoptoze.

Uloga OPN-a u progresiji KBS-a kao i njegova anti-apoptotička uloga dobro su poznate, kao što je objašnjeno u prethodnim odlomcima. Isto tako spomenuto je da NF- κ B ima važnu ulogu u signalnim putovima kočenja apoptoze. Izražaj NF- κ B u KBS-u i njegova uloga u apoptozi istraživana je većinom kroz pokuse na staničnim linijama (87,88,95,96). Konstitutivna aktivacija NF- κ B u staničnim linijama KBS-a povezana je s pojavom otpornosti na indukciju apoptoze što objašnjava čestu pojavu kemo i radiorezistencije KBS-a (88,95). Također, funkcionalna inaktivacija VHL proteina, karakteristična za nasljedne i sporadične oblike CCRCC-a, povezana je s konstitutivnom NF- κ B aktivacijom u staničnim linijama KBS-a koja je

bila popraćena povećanim izražajem anti-apoptotičkih gena, smanjenom aktivnosti kaspaza i pojavom otpornosti na apoptozu izazvanu $\text{TNF-}\alpha$ (96). S druge strane, neke studije iznose rezultate o tome da produkti VHL gena nemaju utjecaja na kontrolu signalnog puta NF- κ B (88) što upućuje na složenost uloge VHL tumor supresor gena koju tek treba u potpunosti rasvijetliti.

Iz opisanih istraživanja može se zaključiti da je konstitutivna aktivacija NF- κ B prisutna u KBS-u i može biti uključena u njegovu onkogenezu, ali i progresiju, pri čemu izbjegavanje apoptoze tumorskih stanica aktivacijom NF- κ B vjerojatno predstavlja jedan od važnih mehanizama progresije KBS-a.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi izražaj OPN-a u svijetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica i okolnom normalnom tkivu bubrega na razini proteina i mRNA te utvrditi njihovu međusobnu povezanost.
2. Utvrditi prognostički značaj izražaja OPN-a na razini proteina i mRNA u tumorskim stanicama SKBS-a usporedbom s poznatim prognostičkim čimbenicima kao što su nuklearni gradus, veličina tumora, proliferacijska aktivnost tumorskih stanica te stadij proširenosti bolesti.
3. Ispitati utjecaj izražaja OPN-a na dužinu preživljavanja bolesnika.
4. Analizirati apoptotičku aktivnost tumorskih stanica te njezin odnos prema izražaju OPN-a.
5. Analizirati izražaj aktiviranih podjedinica p50 i p65 NF- κ B u tumorskim stanicama i okolnom normalnom tkivu bubrega te utvrditi povezanost izražaja podjedinice p50 i p65 NF- κ B u tumorskim stanicama.
6. Ispitati međuodnos izražaja aktiviranog NF- κ B s izražajem OPN-a i apoptotičkom aktivnosti tumorskih stanica.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

Ispitanici su bolesnici s karcinomom bubrega koji su operirani na Klinici za urologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka u razdoblju od 1989. do 1998. godine zbog tumora bubrega. U istraživanju je korišten bioptički materijal tumora bubrega te podatci iz medicinske dokumentacije bolesnika. Patohistološki podatci su očitani iz računalne baze podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, a klinički podatci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije bolesnika sa SKBS-om na Klinici za urologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Podatci o dužini preživljavanja bolesnika sa SKBS-om su prikupljeni iz dokumentacije Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

3.2. Bioptički materijal

Istraživanje je provedeno na arhivskom bioptičkom materijalu tumora bubrega koji je dijagnosticiran kao SKBS u razdoblju od 1989. do 1998. godine na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci te standardnim postupkom fiksiran i uklopljen u parafin (97). U istraživanje su uključeni svi tumori redom kod kojih su postojali svi potrebni patohistološki i klinički podatci te dovoljna količina očuvanog tumorskog tkiva. Cjelokupni materijal koji se odnosi na pojedinu biopsiju je pregledan i reklasificiran prema novoj klasifikaciji tumora bubrega Svjetske zdravstvene organizacije iz 2002. godine (2). U konačnici je u istraživanje uključen 171 uzorak SKBS-a za potrebe izrade standardnih tkivnih rezova te 94 uzorka SKBS-a od kojih su izgrađene tkivne mikroareje.

3.2.1. Standardni tkivni rezovi

Na temelju mikroskopskih preparata odabrana je parafinska kocka, s najviše očuvanog tumorskog tkiva najzloćudnijih značajki, iz koje su napravljeni tkivni standardni rezovi (97). Navedeni materijal je poslužio za utvrđivanje izražaja OPN-a na proteinskoj razini u normalnom tkivu bubrega i tumorskim stanicama SKBS-a te za usporedbu s nuklearnim gradusom, proliferacijskom aktivnosti tumorskih stanica, veličinom tumora i patološkim stadijem u cilju utvrđivanja prognostičkog značaja OPN-a u navedenom karcinomu.

3.2.2. Tkivni rezovi dobiveni metodom tkivnih mikroareja

Dio istraživanja koji se odnosi na usporedbu izražaja OPN-a, NF- κ B i apoptotičke aktivnosti u tumorskom tkivu proveden je na rezovima dobivenim metodom tkivnih mikroareja (TMA, od engl. tissue microarray). Pregledom mikroskopskih preparata označen je dio kojeg smo željeli istraživati kao i njemu odgovarajući dio u tzv. donorskoj parafinskoj kocki. U većini slučajeva su korištene po dvije donorske parafinske kocke. Korištenjem ručnog uređaja za izgradnju tkivnih mikroareja (Alphelys, Plaisir, France) oblikovane su tkivne mikroareje u kojima je svaka biopsija zastupljena s tri cilindra tumorskog tkiva promjera 1 mm s međusobnim razmacima od 0.5 mm u smjeru x i y koordinatnih osi (98) (Slika 11). Normalno jetreno tkivo služilo je za orijentaciju pri pregledavanju ovako dobivenih tkivnih rezova. Prednosti ovakvog načina istraživanja su standardizacija bojanja rezova, lakše i bolje tumačenje bojanja, štednja bioptičkog arhivskog materijala te smanjenje troškova istraživanja.



Slika 11. Parafinske kocke i pripadajući mikroskopski preparati obojani hemalaun-eozinom; standardni tkivni rez lijevo, rez dobiven metodom TMA desno.

3. Svježe tkivo

U razdoblju od 2003. do 2007. godine prikupljena su 22 uzorka svježeg tumorskog tkiva s patohistološkom dijagnozom SKBS-a i 11 uzoraka pripadajućeg normalnog tkiva bubrega. Svježe je tkivo nakon nefrektomije uronjeno u RNA later (TaKaRa Biotechnology, Shiga, Japan) i smrznuto na -30°C . Svi uzorci redom kod kojih su postojali svi potrebni patohistološki i klinički podatci te dovoljna količina i kvaliteta mRNA bili su uključeni u istraživanje. Opisani uzorak poslužio je za određivanje količine OPN mRNA u tumorskom i normalnom tkivu bubrega.

3.4. Postupci

3.4.1. Određivanje prognostičkih čimbenika

Prognostički čimbenici koji su uzeti u obzir su oni koji se određuju prilikom dijagnosticiranja SKBS -a, a to su Fuhrmanov nuklearni gradus (11) i patološki stadij (12) koji uključuje veličinu tumora te prisutnost tumora u okolnim organima i strukturama. Iz odgovarajuće dokumentacije utvrđeno je postojanje udaljenih metastaza u trenutku postavljanja dijagnoze te dužina preživljavanja bolesnika tijekom petogodišnjeg razdoblja.

3.4.2. Imunohistokemijsko bojanje

Parafinski rezovi debljine 5 μm sušeni su preko noći te deparafinizirani i dehidrirani na uobičajeni način (97). Za otkrivanje antigenskih epitopa molekula od interesa primijenjen je topline inducirani pretretman (99). Rezovi su uronjeni u Tris-EDTA pufer, pH 9 (10 mM Tris baze, 1 mM EDTA otopine) i zatim u vodenu kupelj tijekom 10 minuta na temperaturi od 95-100 °C. Nakon 45 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi rezovi su inkubirani s otopinom za blokiranje nespecifičnog vezivanja protutijela koja sadrži normalni serum magarca (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) ili koze (DakoCytomation, Glostrup, Danska) tijekom 30 minuta. Primarna protutijela koja su korištena u istraživanju prikazana su u Tablici 8.

Tablica 8. Primarna protutijela protiv humanih epitopa korištena u imunohistokemijskom bojanju

Protutijelo	porijeklo	klon, proizvođač	razrjeđenje i inkubacija	pozitivna kontrola
Protiv OPN-a	mišje monoklonalno IgG _{2B}	OP3N, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:50, 60 minuta za standardne tkivne rezove 1:100, 30 min. za tkivne mikroareje	bojanje tubularnih stanica distalnih kanalića bubrega i kalcifikata
Protiv Ki-67	mišje monoklonalno IgG ₁	MIB-1, DakoCytomation, Glostrup, Danska	1:50, 30 minuta	bojanje mitotskih figura
Protiv p50 NF-κB	kozje poliklonalno IgG	NLS, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD	1:100, prekonoćna inkubacija na +4°C	bojanje citoplazmi normalnih i tumorskih stanica
Protiv p65 NF-κB	mišje monoklonalno IgG ₁	F-6, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD	1:50, prekonoćna inkubacija na +4°C	bojanje citoplazmi normalnih i tumorskih stanica

Za određivanje izražaja aktivirane podjedinice p50 NF-κB na uzorcima tumorskog tkiva te za određivanje proliferacijske aktivnosti tumorskih stanica (Ki-67 indeks) korištena je LSAB imunohistokemijska metoda (100), a za određivanje izražaja OPN-a i aktivirane podjedinice p65 NF-κB envision imunohistokemijska metoda (100) u automatiziranom imunobojaču (DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, SAD) prema uputama proizvođača. Za vizualizaciju specifičnosti vezivanja primarnog protutijela korišten je ChemMate™ kit (K 5001 i K5007, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Za svaki uzorak ispitivanog tumorskog tkiva te za svaki biljeg zasebno napravljena je po jedna negativna kontrola koju je predstavljao tkivni rez na kojem se umjesto sekundarnog protutijela nalazio razrjeđivač protutijela (ChemMate antibody diluent, S 2022, DakoCytomation, Glostrup, Danska).

3.4.3. TUNEL metoda

Za određivanje apoptičke aktivnosti tumorskih stanica (indeks apoptoze) korištena je Terminal Deoxynucleotidyltransferase-Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) metoda koja čini vidljivim lomove DNA koji su nastali tijekom apoptoze (28). Parafinski rezovi debljine 5 µm sušeni su preko noći te deparafinizirani i dehidrirani na uobičajeni način (97). Za otkrivanje antigenskih epitopa molekula od interesa primijenjen je toplinom inducirani pretretman (99). Rezovi su uronjeni u Tris-EDTA pufer, pH 9 (10 mM Tris baze, 1 mM EDTA otopine) i zatim u vodenu kupelj tijekom 5 minuta na temperaturi od 95-100 °C. Nakon 20 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi rezovi su inkubirani s otopinom za blokiranje nespecifičnog vezivanja protutijela koja sadrži normalni 3 %-tni serum goveda (Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) tijekom 20 minuta. U daljnjem tijeku su korištene kemikalije iz In Situ Cell Death Detection Kit-a (11684809910, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, SAD) prema uputama proizvođača. Sve reakcije su se odvijale na 37°C u mraku, a na kraju svake, stakla su isprana u puferu za ispiranje (Dako Wash Buffer 10x, S3006, razrjeđenje 1:9, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Terminalna deoksinukleotidil transferaza je razrijeđena s puferom (TUNEL Dilution Buffer, 1966006, Roche, Mannheim, Njemačka) u omjeru 1:5. Rezovi su tijekom 60 minuta inkubirani s TUNEL reakcijskom smjesom i zatim s ovčjim protutijelom konjugiranim s alkalnom fosfatazom tijekom 30 minuta. Nakon toga je na rezove dodan kromogen (Fast Red Tablets, 1496549, Roche, Mannheim, Njemačka) tijekom 20 minuta. Rezovi su zatim kontrastirani Mayer-ovim hematoksilinom, dehidrirani i na kraju pokriveni pokrovnicom. Za svaki uzorak ispitivanog tumorskog tkiva napravljene su po dvije negativne kontrole koje su predstavljali tkivni rezovi na kojima se umjesto TUNEL reakcijske smjese nalazila smjesa nukleotida, odnosno pufer za ispiranje (Dako Wash Buffer 10x, S3006,

razrjeđenje 1:9, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Pozitivna kontrola su bile TUNEL pozitivne stanice koje su pokazivale morfološke karakteristike apoptoze.

3.4.4. Određivanje izražaja osteopontina i jezgrenog čimbenika kappa B

Korištenjem svjetlosnog mikroskopa određen je postotak i jačina obojanosti tumorskih stanica i izražen kao histološki skor (H-score, od engl. histological score) na način da je postotak obojanih tumorskih stanica pomnožen s jačinom njihove obojanosti (101) i to u slučaju standardnih tkivnih rezova pregledavanjem cijelog reza, a u slučaju tkivnih mikroareja pregledavanjem one areje u kojoj je brzim probirom utvrđen najveći postotak ili najjače bojanje jezgri s protutijelom protiv NF- κ B. Odabrana areja dalje je služila za određivanje izražaja OPN-a i apoptotičke aktivnosti.

Postotak tumorskih stanica čije su citoplazme bile pozitivne s protutijelom protiv OPN-a i NF- κ B određen je približno, dok je postotak pozitivnih jezgri s protutijelom protiv NF- κ B određen brojanjem 500 jezgri tumorskih stanica u području vruće točke korištenjem svjetlosnog mikroskopa (povećanje x 600) i kvadratne okularne mrežice (U-OCMSQ7/7, Olympus, Zagreb, Hrvatska). Jačina obojanosti tumorskih stanica izražena je u tri kategorije: 1-slaba, 2-umjerena i 3-jaka. Prilikom određivanja H-score-a za NF- κ B, uzeta je u obzir ona jačina obojanosti jezgri koja prevladava ili je korištena međukategorija. Za potrebe statističke obradbe podataka, dobiveni brojčani podatci su preoblikovani u kategoričke temeljem srednjih vrijednosti, odnosno medijana.

3.4.5. Određivanje proliferacijske i apoptotičke aktivnosti tumorskih stanica

Korištenjem svjetlosnog mikroskopa (povećanje x 400) i Issa 3.1 računalnog programa (Vams, Zagreb, Hrvatska), odnosno kvadratne okularne mrežice (U-OCMSQ7/7, Olympus, Zagreb, Hrvatska) te brojanjem 500 jezgri tumorskih stanica u području vruće točke izbjegavajući

područja nekroze, određena je proliferacijska aktivnost tumorskih stanica i izražena kao Ki-67 indeks, odnosno apoptotička aktivnost i izražena kao indeks apoptoze. Ki-67 indeks označava postotak pozitivno obojanih tumorskih jezgri s protutijelom protiv Ki-67 biljega koji prikazuje tumorske stanice u diobi. Indeks apoptoze označava postotak obojanih jezgri TUNEL metodom koja prikazuje tumorske stanice u apoptozi. Unutarstanično bojanje kao i bojanje apoptotičkih tjelešaca i izvanstaničnih dijelova kromatina smatrano je pozitivnim rezultatom.

3.4.6. Izolacija mRNA i reverzna transkripcija – lančana reakcija polimerazom (RT-PCR)

Svježe tkivo je homogenizirano korištenjem homogenizatora tkiva (MagNA Lyser, Roche Applied Science, 03358976001, Rothreuz, Švicarska) prema slijedećem protokolu: 2 ciklusa po 50 sek. na 6500 okretaja/min. s pauzom za hlađenje od po 90 sek. Ukupna RNA je izolirana iz svježeg tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva bubrega korištenjem kita za izolaciju RNA (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Jedan µg cjelokupne RNA je u reakciji reverzne transkripcije – lančane reakcije polimerazom (RT-PCR, od engl. reverse transcription polymerase chain reaction) prepisan u jednolančanu komplementarnu DNA (cDNA, od engl. complementary deoksiribonucleic acid) u konačnom volumenu od 20 µl u dva koraka prema uputama proizvođača. U prvom koraku je na 70 °C denaturirana smjesa RNA, nasumičnih početnica, deoksiribonukleotid trifosfata i vode tijekom 5 minuta. U slijedećem koraku je dodana reverzna transkriptaza (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, 18080-093, Invitrogen, Milano, Italija), pufer, ditiotritol (DTT) i inhibitor RNaza te je smjesa ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta nakon čega su uslijedila 3 ciklusa zagrijavanja: 60 min. na 55 °C, 15 min. na 70 °C i 5 min. na 95 °C. Sve potrebne kemikalije su nabavljene od Invitrogen-a (Milano, Italija). Negativnu kontrolu za RT-PCR predstavljao je uzorak u čijoj je reakcijskoj smjesi bila voda umjesto RNA.

3.4.7. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (QPCR)

Relativna količina cDNA za OPN određena je metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (QPCR, od engl. quantitative polymerase chain reaction) korištenjem na fluorescenciji temeljene detekcijske metode u realnom vremenu (ABI Prism 7300 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Sve potrebne kemikalije su nabavljene od Applied Biosystems-a (Foster City, CA, SAD). Oligonukleotidne početnice i probe za OPN su korištene kao gotovi proizvodi (Inventoried Gene Expression Assay, ID Hs00959010_m1). Oligonukleotidne početnice i probe za unutrašnju kontrolu, β -aktinski gen, nabavljene su kao TaqMan FAM/TAMRA proba kako slijedi: β -actin F 5' CGAGCGCGGCTACAGCTT 3', β -actin R 5' TCCTTAATGTCACGCACGATTT 3', β -actin probe 6Fam-ACCACCACGGCCGAGCGG-Tamra.

Dvanaest μ l reakcijske smjese koja sadrži 2.5 μ l cDNA, 6.25 μ l univerzalne PCR mješavine (TaqMan Universal PCR master mix, 4326708, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i 0.62 μ l smjese početnica i probe je umnožena prema protokolu: inkubacija na 50°C tijekom 2 min., denaturacija na 95°C tijekom 10 min. i 40 ciklusa umnožavanja (denaturacija na 95°C tijekom 15 sek. i sparivanje/produljivanje na 60°C tijekom 1 min.). Sve reakcije umnožavanja su učinjene u triplikatima. Negativnu kontrolu za QPCR predstavljao je uzorak u čijoj je reakcijskoj smjesi bila PCR mješavina i negativna kontrola RT-PCR-a. Za izračun količine OPN mRNA korištena je $\Delta\Delta C_T$ metoda i SDS računalni program 1.3.1. (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Glasnička RNA stanične linije MDA231 karcinoma dojke je korištena kao kalibrator, a β -aktinski gen je služio za unutrašnju kontrolu. Za normalizaciju podataka, za svaki uzorak zasebno izračunat je $\Delta\Delta C_T$ kao razlika srednje vrijednosti ΔC_T -a uzorka i srednje vrijednosti ΔC_T -a kalibratora, a relativna količina je izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Količina mRNA u tumorskom i normalnom tkivu bubrega predstavlja relativan broj koji

označava koliko je puta količina mRNA od interesa u ispitivanom tkivu veća u odnosu na kalibrator, odnosno MDA231 staničnu liniju karcinoma dojke čija je količina izražena kao 1.

3.5. Statistička obradba podataka

Podatci su uneseni u proračunsku tablicu i obrađeni pomoću računalnog programa Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD) uz razinu statističke značajnosti od $p < 0.05$. Za testiranje razlike u patohistološkim i kliničkim podacima, kao što su nuklearni gradus, Ki-67 indeks, veličina tumora i patološki stadij, između ispitivanih skupina za OPN, koristio se χ^2 i Studentov t- test. Postotak kumulativnog preživljavanja bolesnika za petogodišnje razdoblje za skupine SKBS-a s različitim izražajem OPN-a određen je Kaplan-Meier-ovom metodom, a razlika između krivulja preživljavanja utvrđena je pomoću log-rank testa. Multivarijatna analiza za utvrđivanje izražaja OPN-a kao nezavisnog prognostičkog čimbenika učinjena je koristeći Cox-ov regresijski model. Pearsonova korelacija je korištena za testiranje povezanost između brojčanih podataka, tj. izražaja OPN-a na tumorskim stanicama SKBS-a i aktivacije NF- κ B, odnosno količine OPN mRNA te za testiranje povezanosti između izražaja aktivacije NF- κ B i indeksa apoptoze. Mann Whitney U-test je korišten za utvrđivanje razlike u indeksu apoptoze između skupine s niskim i visokim izražajem OPN-a.

4. REZULTATI

4.1. Standardni tkivni rezovi

Standardni tkivni rezovi korišteni su za utvrđivanje povezanosti izražaja OPN-a u tumorskom tkivu SKBS-a s kliničkopatološkim čimbenicima te preživljavanjem bolesnika.

4.1.1. Kliničkopatološki podatci

Kliničkopatološka obilježja 171 bolesnika sa svijetlostaničnim karcinomom bubrežnih stanica u ispitivanom uzorku prikazuje Tablica 9.

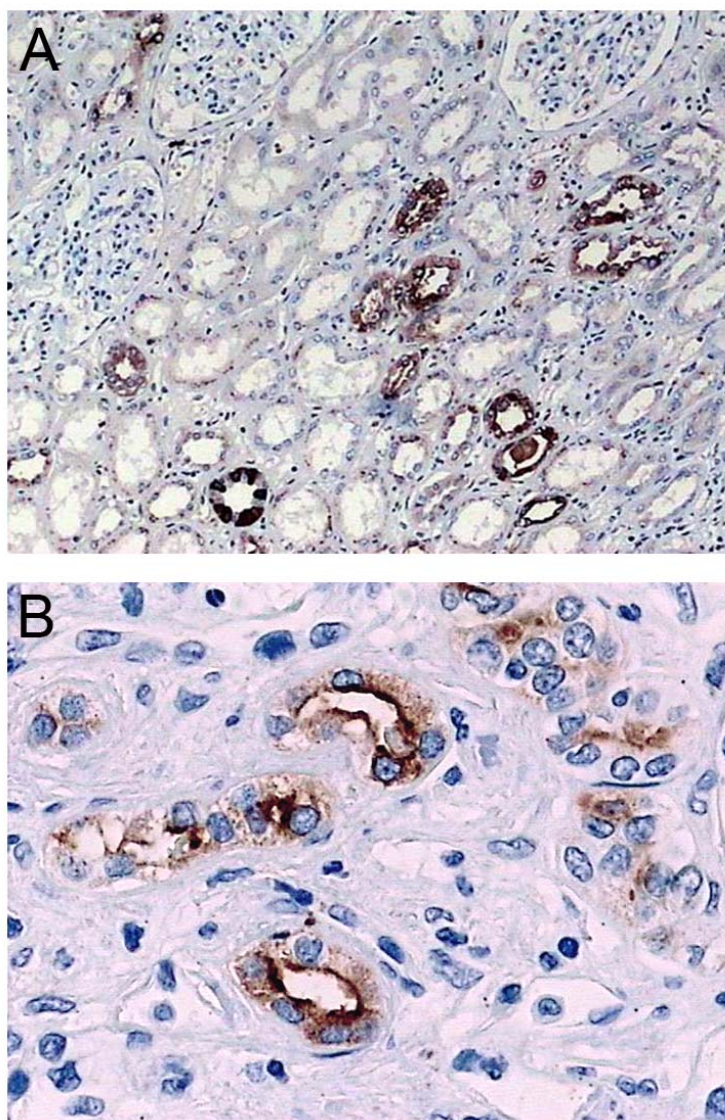
Tablica 9. Kliničkopatološka obilježja bolesnika sa svijetlostaničnim karcinomom bubrežnih stanica.

Obilježje	
Dob bolesnika (god.), medijan (raspon)	62 (27-82)
Spol bolesnika (M/Ž)	103/68
Veličina tumora (cm), medijan (raspon)	6.5 (1.8-18.8)
Fuhrmanov nuklearni gradus, br. (%)	
1	29 (17)
2	69 (40.4)
3	45 (26.3)
4	28 (16.3)
Patološki stadij, br. (%)	
1	77 (45)
2	40 (23.4)
3	53 (31)
4	1 (0.6)
Petogodišnje preživljavanje bolesnika (mj.), medijan (raspon)	81 (1-165)

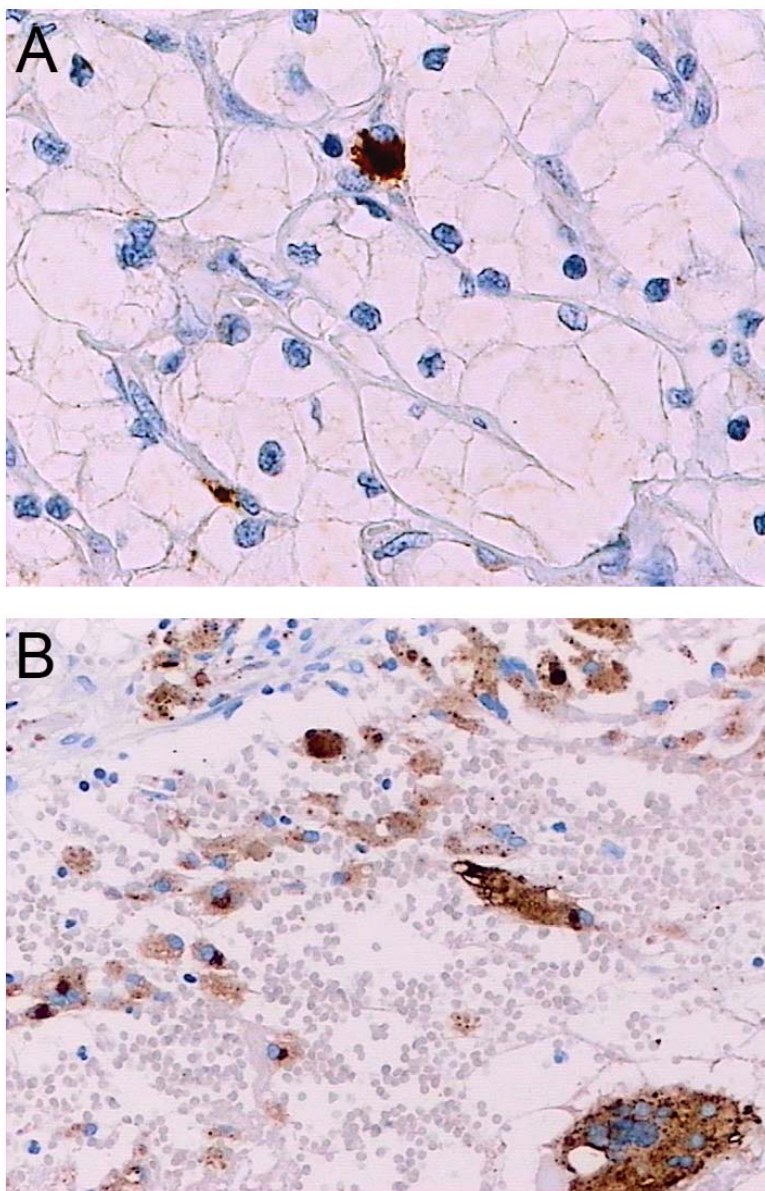
Navedena obilježja ispitivanog uzorka su u skladu s epidemiološkim obilježjima KBS-a u Republici Hrvatskoj te studijama koje se provode na SKBS-u. Podatci o petogodišnjem preživljavanju bili su dostupni za 120 bolesnika koji su bili praćeni od trenutka operacije do trenutka smrti ili prestanka praćenja bolesnika.

4.1.2. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin

U normalnom parenhimu bubrega OPN je bio prisutan u stanicama distalnih tubula u vidu citoplazmatskih zrnaca smještenih pretežito uz lumen kanalića (Slika 12A i B). Kalcifikati u tubulima ili intersticiju su također pokazivali bojanje na OPN (Slika 12A) kao i pojedine stromalne upalne stanice poput makrofaga ili plazma stanica (Slika 13A i B).

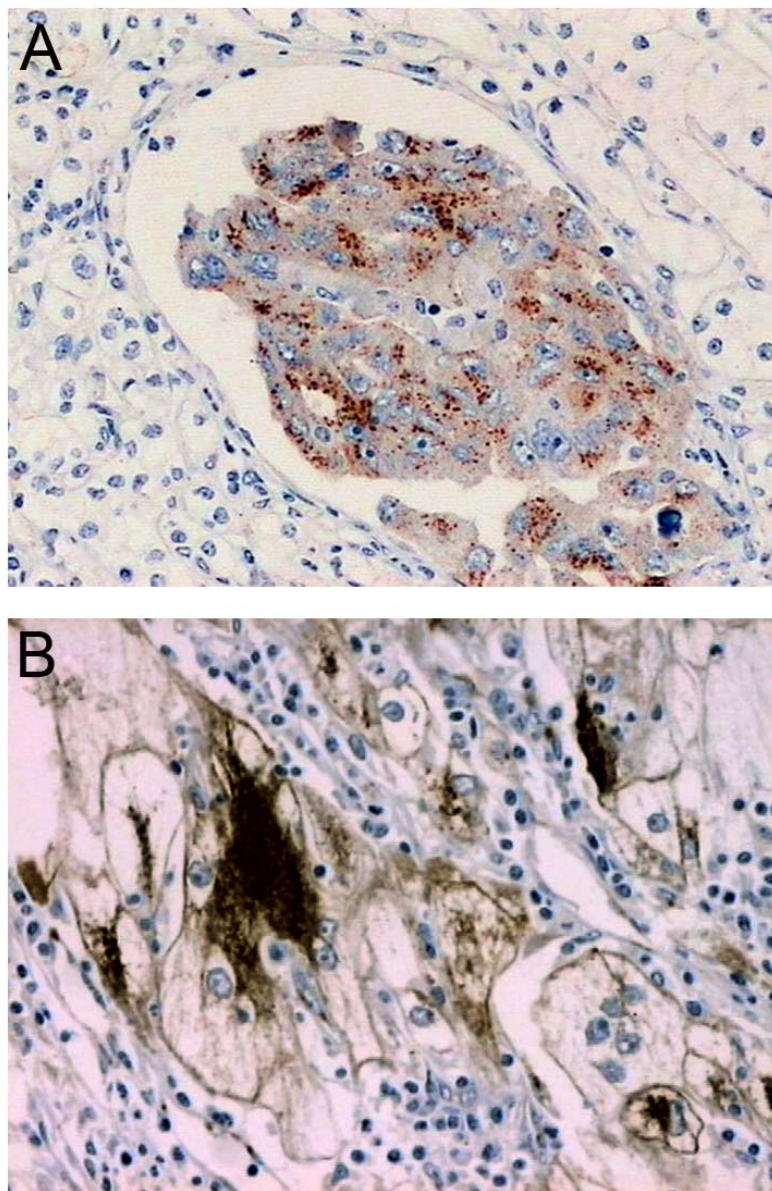


Slika 12. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin (OPN) u normalnom tkivu bubrega. Pozitivnu reakciju s protutijelom protiv OPN-a pokazuju epitelne stanice distalnih tubula (A i B) i intraluminalni kalcifikati (A). Povećanje x 100 (A), x 400 (B).



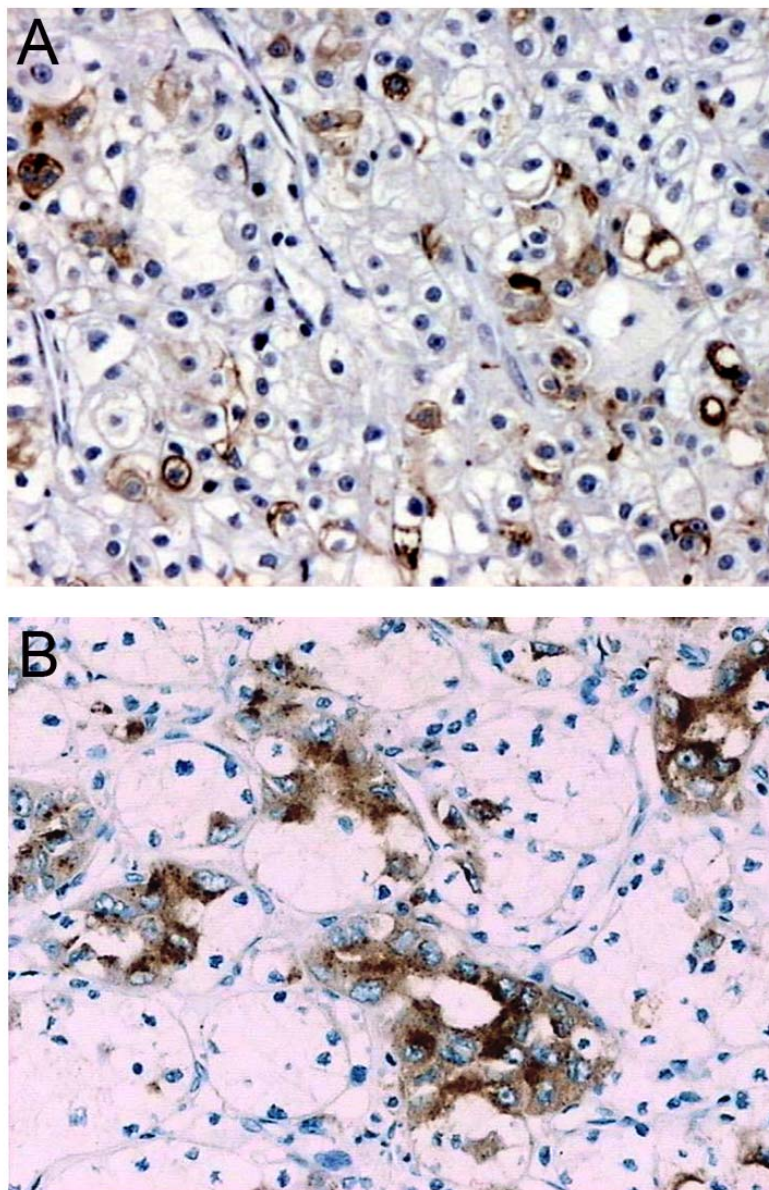
Slika 13. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin (OPN) u svjetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica. Tumorske stanice su negativne dok su neke stromalne stanice, vjerojatno makrofagi, pozitivne (A). U tumoru oko područja krvarenja nalaze se brojni OPN pozitivni histiociti te orijaške stanice (B). Povećanje x 400 (A), x 200 (B).

U tumorskim stanicama OPN je bio prisutan u obliku rjeđe (Slika 14A) ili gušće raspoređenih zrnaca (Slika 14B).

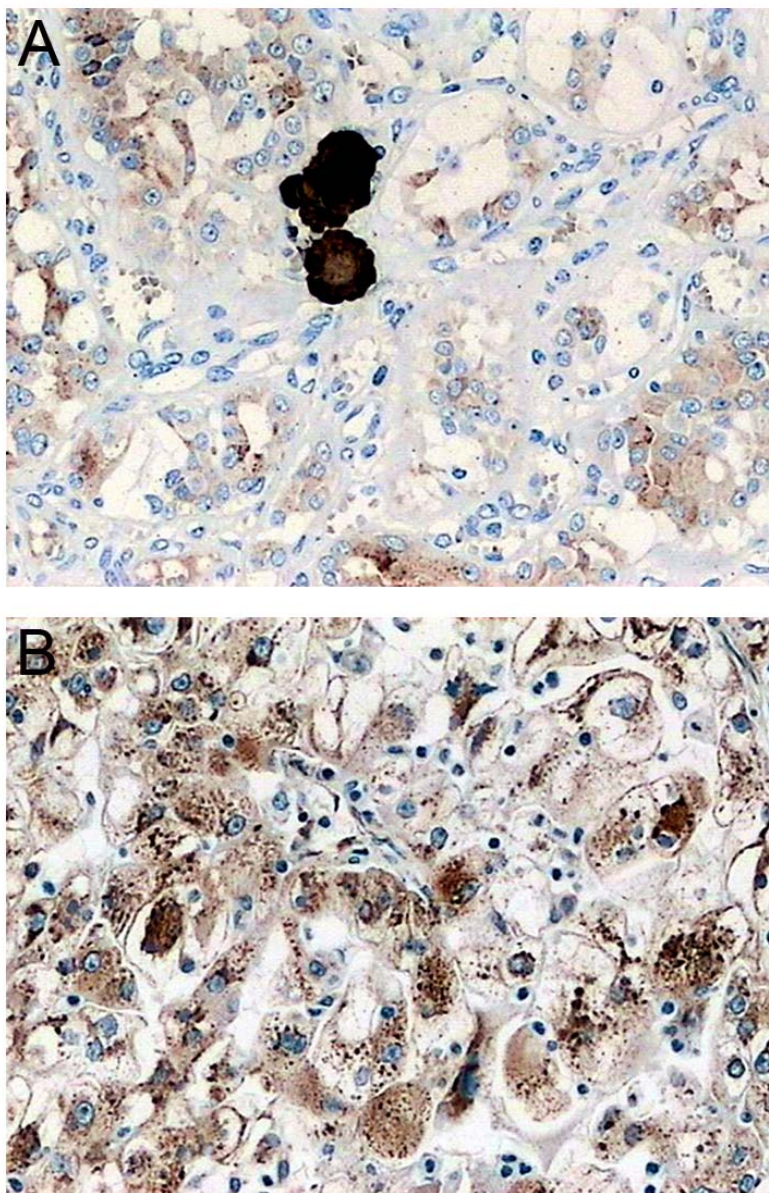


Slika 14. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin (OPN) u svjetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica. Tumorske stanice visokog nuklearnog gradusa unutar limfokapilarnog prostora su OPN pozitivne, dok su one niskog nuklearnog gradusa u okolini negativne (A). Snažno citoplazmatsko bojanje tumorskih stanica koje su okružene negativnim limfocitima (B). Povećanje x 200.

Karcinomi bubrežnih stanica su pokazivali heterogeno bojanje u rasponu od žarišnog blagog bojanja (Slika 15A i B) do jakog bojanja difuznog rasporeda (Slika 16A i B). U područjima tumora s tubularnom arhitekturom bojanje na OPN je bilo prisutno uz apikalnu površinu tumorskih žlijezda nalikujući na bojanje normalnih bubrežnih tubula (Slika 15A).



Slika 15. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin (OPN) u svjetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica. Uzorak tumora koji pokazuje žarišno bojanje umjerenog intenziteta (A). Tumorske stanice niskog nuklearnog gradusa su negativne, dok su one koje pokazuju transformaciju prema višem nuklearnom gradusu snažno pozitivne na OPN (B). Povećanje x 200.



Slika 16. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin (OPN) u svjetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica. Tumor pokazuje difuzno bojanje slabog intenziteta, dok stromalni kalcifikati pokazuju jako bojanje s protutijelom protiv OPN-a (A). Citoplazme tumorskih stanica su difuzno i jako pozitivne (B). Povećanje x 200.

Prilikom procjene bojanja u obzir su uzete samo tumorske stanice iako su pozitivitet pokazivali i stromalni makrofagi, obično uz područja nekroze, te plazma stanice. Ove su stanice uz kalcifikate te distalne tubule služile kao pozitivna kontrola (Slika 12A i B, Slika 13A i B,

Slika 16A). U najvećem broju slučajeva (64.3%) tumorske stanice nisu pokazivale imunoreaktivnost s protutijelom protiv OPN-a (Slika 13A), odnosno bilo je pozitivno manje od 5 % stanica, dok su pozitivni tumori bili podjednako raspoređeni među pojedinim kategorijama imunohistokemijskog bojanja obzirom na postotak pozitivnih stanica (Tablica 10) te jačinu bojanja. Srednja vrijednost H-score-a iznosila je 40.8 ± 76.8 .

Tablica 10. Raspored kategorija imunohistokemijskoj bojanja na osteopontin obzirom na postotak obojanih tumorskih stanica.

Postotak obojanih karcinomskih stanica	broj karcinoma	postotak karcinoma
0-5	110	64.3
6-25	21	12.3
26-50	16	9.4
51-75	9	5.3
76-100	15	8.7
Ukupno	171	100

4.1.3. Povezanost izražaja osteopontina s kliničkopatološkim parametrima

Izražaj OPN-a u tumorskim stanicama je uspoređen s obilježjima tumora koji predstavljaju prognostičke čimbenike SKBS-a kao što su veličina tumora, nuklearni gradus, patološki stadij i Ki-67 proliferacijski indeks. Statistička analiza je pokazala značajnu povezanost između stupnja izražaja OPN-a u tumorskom tkivu i prognostičkih čimbenika bez obzira je li u analizi korišten H-score ili je uzet u obzir samo postotak obojanih tumorskih stanica (Tablica 11).

Tablica 11. Povezanost prognostičkih čimbenika svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica s osteopontinom (OPN). Prikazane su samo p vrijednosti.

	Veličina tumora	Fuhrmanov nuklearni gradus	patološki stadij	Ki-67 indeks
OPN H-score	0.002 ¹	<0.001 ³	0.029 ³	0.006 ¹
OPN negativni/pozitivni tumori	<0.001 ²	<0.001 ⁴	0.011 ⁴	<0.001 ²

¹ Pearsonova korelacija

² Studentov t-test

³ Mann Whitney U-test

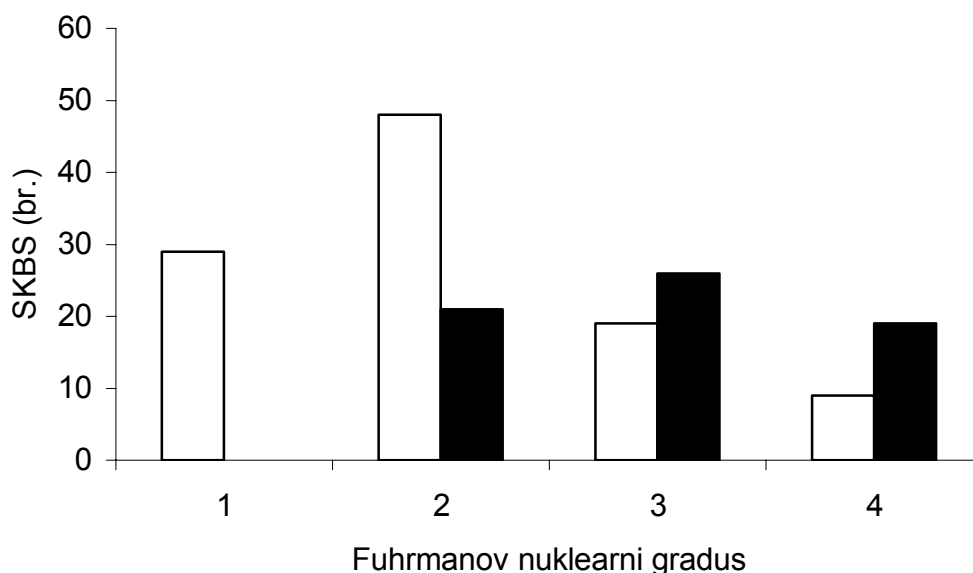
⁴ χ^2 -test

Ipak, najveća statistička značajnost rezultata postignuta je grupiranjem svih OPN pozitivnih tumora (>5% OPN pozitivnih tumorskih stanica) kao što pokazuje Tablica 12.

Tablica 12. Povezanost izražaja osteopontina (OPN) s prognostičkim čimbenicima svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica.

	Fuhrmanov nuklearni gradus, br. (%)		veličina tumora (cm) (srednja vrijednost $\pm$ SD)	patološki stadij (pT), br. (%)		Ki-67 indeks (%) (srednja vrijednost $\pm$ SD)
	gradus 1,2	gradus 3,4		pT 1,2	pT 3,4	
OPN-negativni tumori	79 (71.8)	31 (28.2)	6.3 $\pm$ 3.3	83 (75.5)	27 (24.5)	4.7 $\pm$ 4.5
OPN-pozitivni tumori	19 (31.1)	42 (68.9)	8.2 $\pm$ 3.5	34 (55.7)	27 (44.3)	9.8 $\pm$ 9
P vrijednost	<0.001		<0.001	0.011		<0.001

Srednja vrijednost veličine OPN pozitivnih tumora je bila 8.2 $\pm$ 3.5 cm, u odnosu na 6.3 $\pm$ 3.3 cm kod tumora bez prisustva OPN proteina (p<0.001). Svi SKBS-i nuklearnog gradusa 1 nisu pokazivali bojanje na OPN protein, ali porastom prema višem nuklearnom gradusu, rastao je i broj pozitivnih tumora (p<0.001) (Slika 17).



Slika 17. Raspored imunohistokemijskog bojanja za osteopontin u odnosu na Fuhrmanov nuklearni gradus u svijetlostaničnim karcinomima bubrežnih stanica (SKBS). Bijeli stupci predstavljaju broj OPN negativnih, a crni, broj OPN pozitivnih karcinoma. Svi karcinomi s nuklearnim gradusom I su negativni, dok se broj slučajeva povećava kako raste nuklearni gradus. $P < 0.001$ (χ^2 -test).

Podijelivši tumore, obzirom na patološki stadij, u dvije grupe: one ograničene na bubreg (pT1 or pT2) i na one koji se šire izvan njega (pT3 or pT4), izražaj OPN-a u skupini pT3 i 4 bio je značajno viši nego u skupini tumora patološkog stadija 1 i 2 ($p=0.011$). Isto tako, pronađena je povezanost izražaja OPN-a s tumorskim rastom izraženim kroz Ki-67 proliferacijski indeks ($p<0.001$). Naime, porast proliferacijske aktivnosti tumorskih stanica pratio je porast izražaja OPN u tumorskim stanicama. Srednja vrijednost Ki-67 indeksa u OPN negativnim tumorima iznosila je $4.7 \pm 4.5\%$, dok su OPN pozitivni tumori pokazivali značajno veću vrijednost koja je iznosila $9.8 \pm 9\%$.

4.1.4. Povezanost izražaja osteopontina s preživljavanjem bolesnika

U statističkoj su analizi preživljavanja uspoređivane dvije kategorije bolesnika dobivene temeljem različitog izražaja OPN-a u tumorskom tkivu. Kao i u slučaju usporedbe OPN-a s

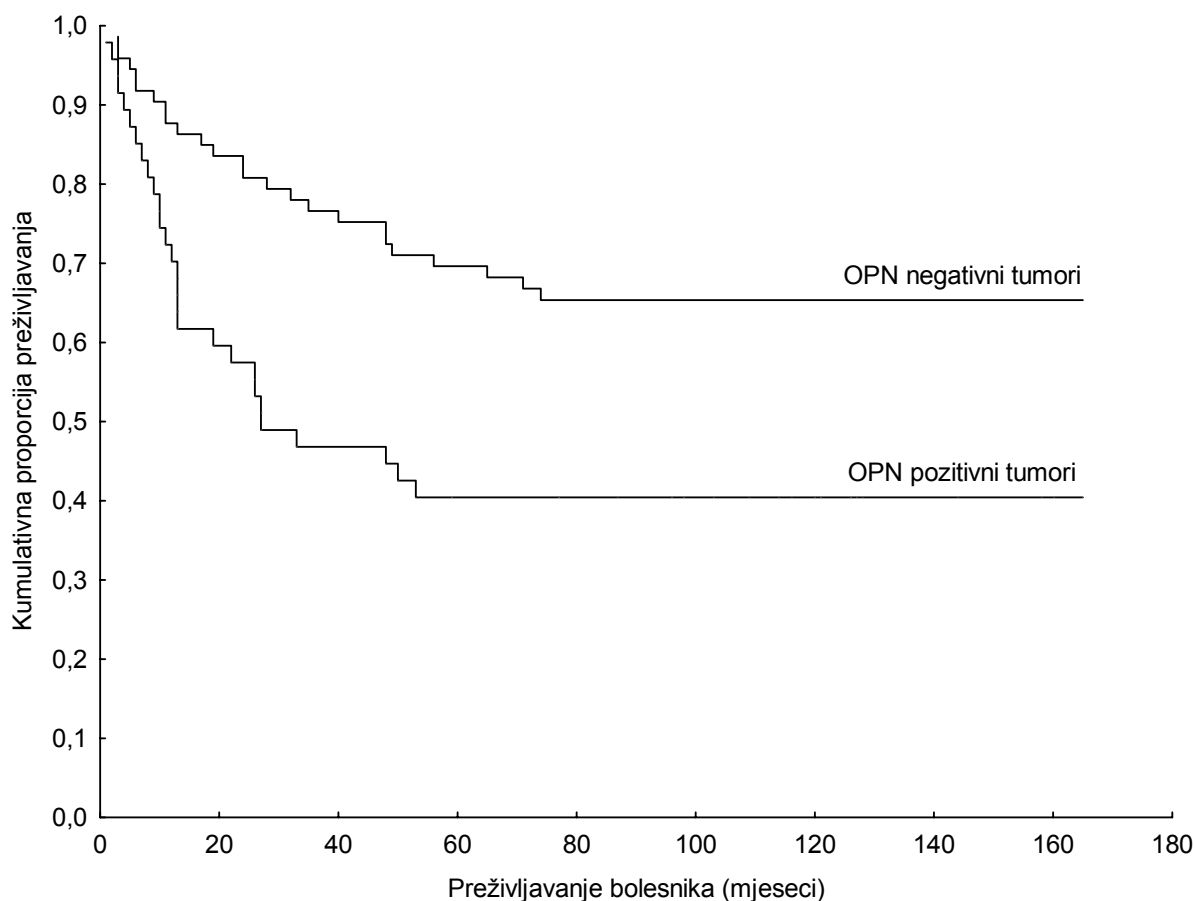
kliničkopatološkim parametrima, najveća statistička značajnost postignuta je grupiranjem svih OPN pozitivnih tumora temeljem samo postotka pozitivnih stanica (Tablica 13).

Tablica 13. Povezanost dužine preživljavanja bolesnika sa svjetlostaničnim karcinomom bubrežnih stanica u ovisnosti o osteopontinu (OPN). Prikazane su samo p vrijednosti (log-rank test).

	Preživljavanje bolesnika
OPN H-score	0.021
OPN negativni/pozitivni tumori	0.004

Povezanost izražaja OPN-a i kumulativne proporcije preživljavanja bolesnika prikazuje

Slika 18.



Slika 18. Kaplan-Meierova analiza preživljavanja u odnosu na izražaj osteopontina (OPN) pokazuje značajno skraćenje ukupnog preživljavanja bolesnika s OPN pozitivnim karcinomima ($p=0.004$, log-rank test).

Stopa petogodišnjeg preživljavanja za skupinu od 75 bolesnika s OPN negativnim tumorima iznosila je 71 %, a za 45 bolesnika čiji su tumori pokazivali izražaj OPN-a iznosila je 40 %. Tijekom razdoblja praćenja bolesnika, bolesnici s OPN pozitivnim tumorima pokazivali su značajno kraće preživljavanje u odnosu na bolesnike s OPN negativnim tumorima ($p=0.004$). Obzirom da se gradus i stadij tumora smatraju glavnim prognostičkim pokazateljima u SKBS-u, najprije je ispitan njihov utjecaj na postoperativno preživljavanje bolesnika. Pronađena je značajna obrnuta povezanost između preživljavanja i nuklearnog gradusa ($p<0.001$) i stadija ($p<0.001$). Iako je univarijatna analiza preživljavanja pokazala da su nuklearni gradus, patološki stadij i izražaj OPN-a u tumorskim stanicama značajni prognostički pokazatelji, jedino je patološki stadij ($p=0.013$) zadržao značajnost u multivarijatnoj statističkoj analizi, dok nuklearni gradus i OPN nisu zadržali status nezavisnih prognostičkih čimbenika SKBS-a (Tablica 14).

Tablica 14. Multivarijatna analiza prognostičkih čimbenika u bolesnika sa svijetlostaničnim karcinomom bubrežnih stanica.

Prognostički čimbenik	relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
Osteopontin	1.6	1.1 - 2.4	0.081
Patološki stadij	1.8	1.2 - 2.7	0.013
Fuhrmanov nuklearni gradus	1.7	1.2 - 2.5	0.108

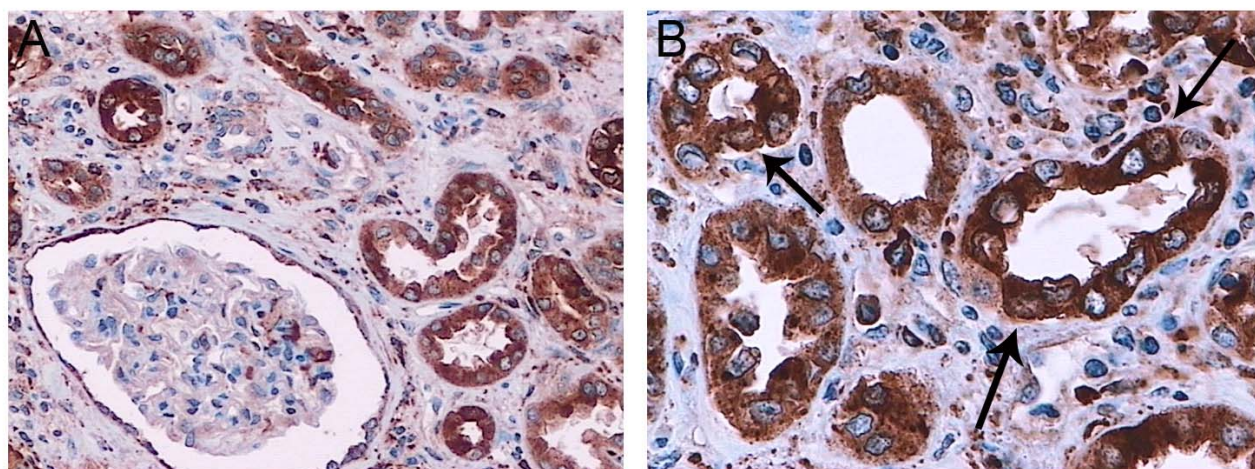
4.2. Tkivne mikroareje i svježe tkivo

Nakon što je utvrđena povezanost OPN-a s prognostičkim čimbenicima i preživljavanjem bolesnika sa SKBS-om, daljnji cilj je bio ispitivanje njegove uloge u apoptozi tumorskih stanica kao i jednog od signalnih putova apoptoze, kojeg posreduje OPN, a uključuje aktivaciju NF- κ B.

4.2.1. Imunohistokemijsko bojanje na osteopontin i jezgreni čimbenik kappa B

Izražaj OPN-a u normalnom je i tumorskom tkivu odgovarao kako je opisano za standardne tkivne rezove. U većini su slučajeva karcinomi pokazivali difuzno bojanje različite jačine, a medijan H-score-a je iznosio 175 s rasponom od 0.5 do 300.

U normalnom tkivu bubrega bojanje na p50 i p65 podjedinice NF- κ B većinom je bilo prisutno u citoplazmama stanica i to najizraženije u epitelu tubula, a manje u stanicama glomerula, strome i krvnih žila (Slika 19).



Slika 19. Imunohistokemijsko bojanje na jezgreni čimbenik kappa B (NF- κ B) u bubregu. Citoplazme parijetalnih stanica Bowmanove kapsule i tubula su pozitivne, kao i neke stromalne stanice, a jezgre su negativne (A). Citoplazme tubula pokazuju jako bojanje, dok samo neke jezgre tubularnih stanica pokazuju bojanje slabijeg intenziteta (strelice), a u intersticiju su intenzivno pozitivni neki makrofagi i plazma stanice (B). Povećanje x 200 (A), x 400 (B).

Citoplazmatski pozitivitet u tubulima bubrega bio je difuzno raspoređen ili u vidu zrnaca različite jakosti. Jezgreni pozitivitet, rijetko primijećen u epitelu tubula, bio je vrlo slabe jakosti (Slika 19B). Među benignim strukturama histiociti su pokazali najjači pozitivitet istovremeno u citoplazmi i jezgri (Slika 19B).

U tumorskom tkivu, obzirom na citoplazmatsko bojanje, obje NF- κ B podjedinice su bile prisutne u većini tumorskih stanica. Podjedinica p50 je većinom pokazivala snažno bojanje (H-

score medijan je iznosio 250, s rasponom od 1 do 300), dok je jakost bojanja na podjedinicu p65 pokazivala heterogeniji raspored između pojedinih tumorskih uzoraka (medijan H-score-a je iznosio 200, s rasponom od 5 do 300). U statističkoj su analizi obje NF- κ B podjedinice postigle značajnu međusobnu korelaciju u citoplazmatskom pozitivitetu ($p < 0.001$, $r_p = 0.489$).

Prisutnost bojanja jezgre s protutijelom protiv NF- κ B smatrala se njegovom aktivacijom. Kao i u slučaju citoplazmatskog bojanja, podjedinica p50 je u većini tumorskih uzoraka pokazivala visok postotak aktivacije uz istovremeno jako bojanje jezgre (medijan H-score-a je iznosio 249, s rasponom od 4 do 300), dok je p65 podjedinica pokazala različit postotak i jakost obojanosti jezgri između pojedinih tumora (srednja vrijednost H-score-a je iznosila 134 ± 79). Aktivacija obje NF- κ B podjedinice pokazala je značajnu međusobnu korelaciju ($p < 0.001$, $r_p = 0.447$) kao i citoplazmatski i jezgreni pozitivitet svake podjedinice (p50, $p = 0.001$, $r_p = 0.333$; p65, $p = 0.009$, $r_p = 0.273$).

4.2.2. Povezanost izražaja osteopontina i jezgrenog čimbenika kappa B

Aktivacija NF- κ B kao i prisutnost NF- κ B u citoplazmi uspoređeni su s izražajem OPN proteina u TMA (Tablica 15), na standardnim tkivnim rezovima i s OPN mRNA iz svježe smrznutog tumorskog tkiva (Tablica 16).

Tablica 15. Korelacija jezgrenog čimbenika kappa B (NF- κB) i osteopontina u TMA¹ svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica.

NF-κB		osteopontin	
		r_p^2	p vrijednost ²
NF-κB u jezgri	p50	0.288	0.006
	p65	0.389	<0.001
	p50-p65	0.406	<0.001
NF-κB u citoplazmi	p50	0.253	0.016
	p65	0.303	0.004
	p50-p65	0.337	0.001

¹ Tkivne mikroareje

² Pearsonova korelacija

U TMA korelacija s OPN-om učinjena je najprije sa svakom NF-κB podjedinicom zasebno, a zatim sa zbrojem H-score-a obje NF-κB podjedinice (p50-p65) dok je na standardnim rezovima u analizi korištena samo p65 podjedinica. Statistička analiza je pokazala korelaciju izražaja OPN-a s NF-κB i u jezgri i u citoplazmi u TMA i standardnim rezovima. Osim toga, p65 podjedinica je pokazala značajniju korelaciju s OPN-om, kao i obje NF-κB podjedinice u odnosu na svaku podjedinicu zasebno (Tablica 15).

Tablica 16. Korelacija jezgrenog čimbenika kappa B (NF- κB) i osteopontina proteina i mRNA u svjetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica.

NF-κB		osteopontin protein		osteopontin mRNA	
		r_p^1	p vrijednost ¹	r_p^1	p vrijednost ¹
NF-κB u jezgri	p65	0.480	0.024	0.493	0.019
NF-κB u citoplazmi	p65	0.570	0.006	0.029	0.898

¹ Pearsonova korelacija

Relativna količina (RQ) OPN mRNA određena je kako je opisano u odjeljku 3.4.7. iz 22 svježe smrznuta uzorka tumorskog i 11 uzoraka normalnog tkiva bubrega. Podatci o bolesnicima i izražaju OPN-a i NF- κ B u navedenim uzorcima su prikazani u Tablici 17.

Tablica 17. Osteopontin (OPN) i jezgri čimbenik kappa B (NF- κ B) u 22 uzorka tumorskog tkiva bolesnika sa svijetlostaničnim karcinomom bubrežnih stanica.

Bolesnik	dob	spol	osteopontin protein (H-score)	osteopontin mRNA (RQ ¹)	NF- κ B u jezgri (H-score)	NF- κ B u citoplazmi (H-score)
1	53	F	65	1286	23	200
2	74	F	110	4829	85	200
3	64	F	150	4967	75	150
4	58	F	240	1638	120	250
5	69	M	260	3767	110	300
6	67	M	110	10703	139	250
7	72	M	145	58	152	300
8	70	M	155	2668	146	200
9	59	M	210	3909	246	250
10	66	M	120	3336	65	200
11	54	M	260	5393	89	300
12	65	M	50	1645	27	120
13	43	M	140	1715	29	300
14	50	M	135	3496	48	150
15	76	M	130	7709	83	200
16	72	M	225	26435	135	250
17	80	M	165	1620	94	250
18	59	M	80	5235	93	100
19	79	F	170	2281	26	150
20	77	M	230	29386	247	200
21	72	M	180	3978	190	200
22	60	F	190	933	49	200

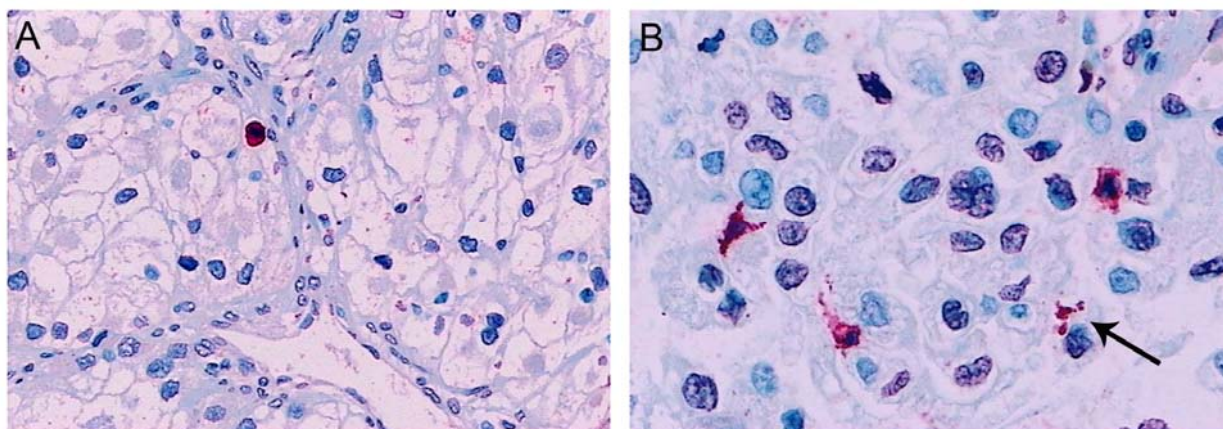
¹ Relativna količina

Medijan RQ za OPN mRNA normalnog tkiva bubrega iznosio je 2612 (105-12109), a za tumorsko tkivo 3631 (58-29386). Statistički značajna razlika između RQ OPN mRNA normalnog i tumorskog tkiva nije dobivena ($p=0.359$). Korelacija izražaja OPN proteina i mRNA je postojala, ali ne na statistički značajnoj razini ($r_p=0.325$, $p=0.139$). Značajna i jaka korelacija postojala je između RQ OPN mRNA i aktivacije NF- κ B ($r_p=0.493$, $p=0.019$) dok citoplazmatksi NF- κ B nije pokazivao korelaciju s količinom OPN mRNA (Tablica 16).

Može se zaključiti da je aktivacija obje NF- κ B podjedinice u tumorskoj stanici povezana s povećanom količinom OPN proteina i njegove mRNA.

4.3. Povezanost indeksa apoptoze s izražajem osteopontina i jezgrenog čimbenika kappa B

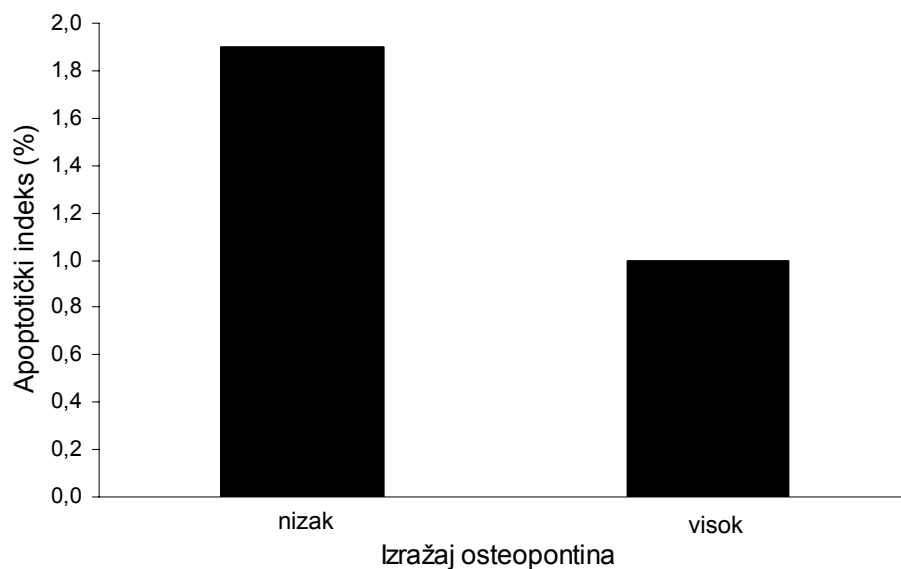
Medijan apoptotičkog indeksa u SKBS-u iznosio je 0.7 % (0-9.5). Tumorske stanice u apoptozi prikazuje Slika 20.



Slika 20. TUNEL metodom prikazane su tumorske stanice u apoptozi. Citoplazme pozitivnih stanica se boje crvenim kromogenom, a jezgra je piknotična (A, B). Vide se i izvanstanična zrnca kromatina (strelica) (B). Povećanje x 200 (A), x 400 (B).

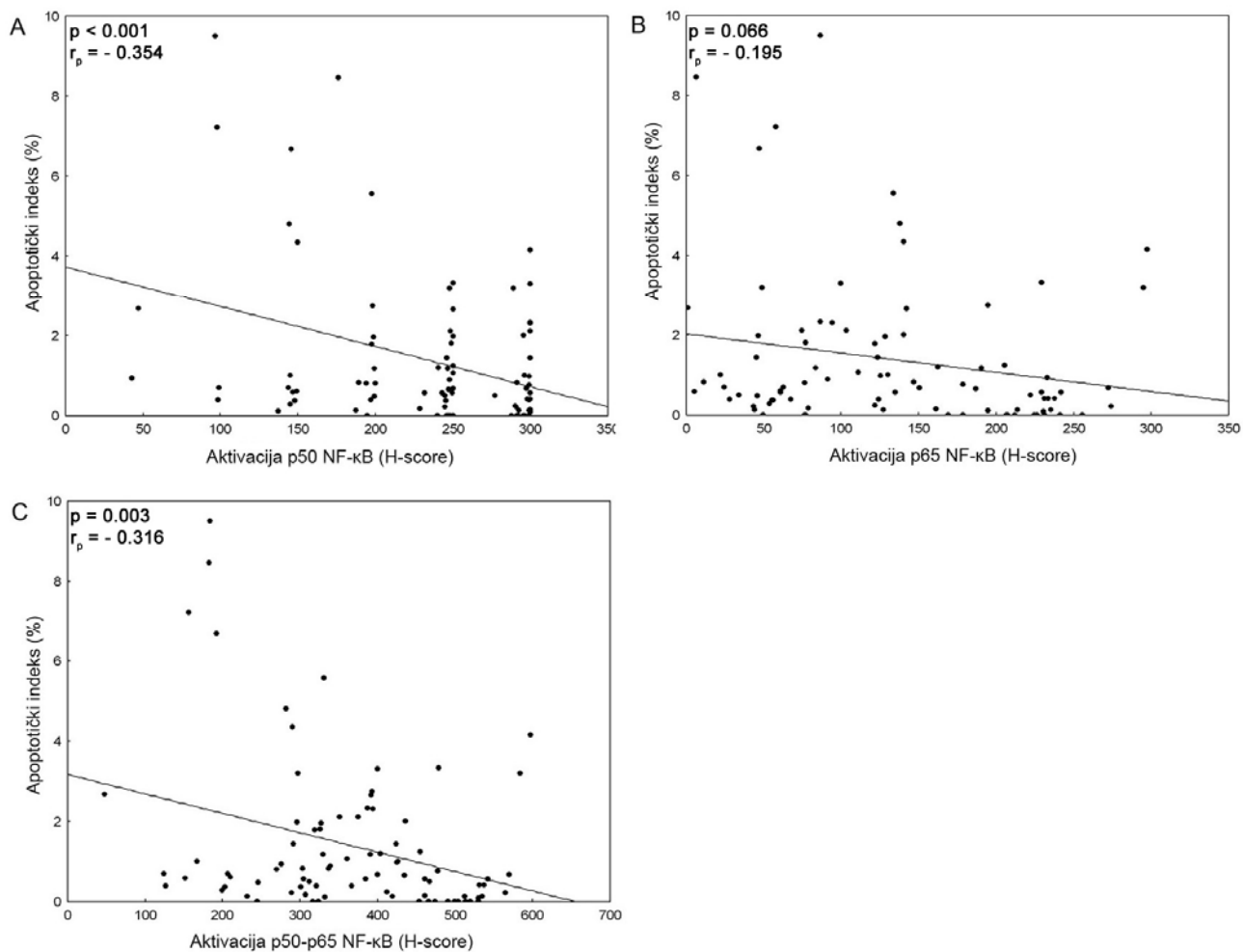
Postotak tumorskih stanica u apoptozi (apoptotički indeks) uspoređen je s izražajem OPN-a te izražajem NF- κ B u jezgri i citoplazmi u TMA.

Tumori s visokim izražajem OPN-a pokazivali su istovremeno i značajno manji apoptotički indeks u usporedbi s tumorima u kojima je izražaj OPN-a bio nizak ($p=0.009$) (Slika 21).



Slika 21. Histogram pokazuje vrijednosti apoptotičkog indeksa u dvije različite skupine svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica obzirom na izražaj osteopontina (OPN). Nizak i visok izražaj OPN-a određen je kao vrijednost ispod i iznad medijana OPN H-score-a. Tumori s visokim izražajem OPN-a obilježeni su malim brojem tumorskih stanica u apoptozi u odnosu na tumore s niskim izražajem OPN-a koji su karakterizirani visokim postotkom tumorskih stanica u apoptozi ($p=0.009$, Mann-Whitney U-test).

Slična statistički značajna obrnuta korelacija pronađena je i između apoptoze i aktivacije NF- κ B (Slika 22 i Tablica 18).



Slika 22. Dijagrami pokazuju korelacije između aktivacije jezgrenog čimbenika kappa B (NF-κB) i apoptotičkog indeksa u svijetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica. Aktivacija p50 podjedinice pokazuje obrnutu korelaciju s apoptotičkim indeksom (A) ($p < 0.001$, $r_p = -0.354$) kao i zajednička aktivacija p50-p65 podjedinica (C) ($p = 0.003$, $r_p = -0.316$) dok aktivacija p65 podjedinice ne pokazuje korelaciju s apoptotičkim indeksom (B) ($p = 0.066$, $r_p = -0.195$).

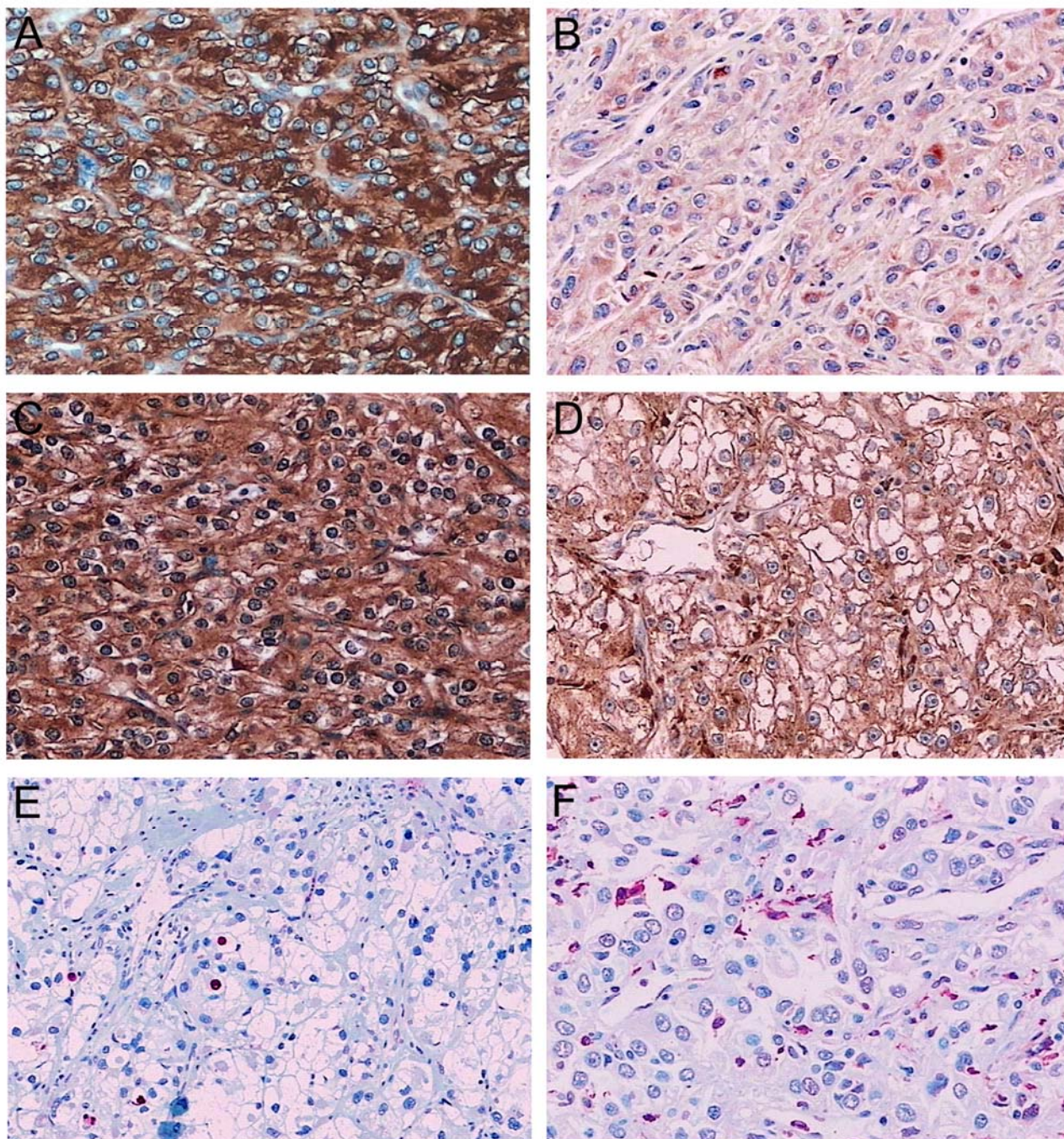
Aktivacija p50 podjedinice pokazala je jaču obrnutu povezanost s apoptotičkim indeksom nego obje podjedinice zajedno (p50-p65), za razliku od p65 podjedinice, koja sama za sebe nije pokazala značajnu povezanost s apoptozom ($p=0.066$), već samo kada je njena aktivacija pridružena aktivaciji podjedinice p50 ($p=0.003$). U Tablici 18 prikazana je korelacija jezgrenog i citoplazmatskog NF- κ B pozitiviteta s apoptotičkim indeksom. Za razliku od jezgrenog, citoplazmatski NF- κ B nije pokazao značajnu povezanost s apoptozom.

Tablica 18. Korelacija jezgrenog čimbenika kappa B (NF- κ B) i apoptotičkog indeksa u svijetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica.

NF- κ B (H-score)		apoptotički indeks (%)	
		r_p ¹	p vrijednost ¹
NF- κ B u jezgri	p50	-0.354	<0.001
	p65	-0.195	0.066
	p50-p65	-0.316	0.003
NF- κ B u citoplazmi	p50	0.072	0.506
	p65	0.167	0.125
	p50-p65	0.149	0.168

¹ Pearsonova korelacija

Imunohistokemijsko bojanje OPN-a i NF- κ B zajedno s TUNEL bojanjem apoptotičkih stanica na serijskim rezovima TMA SKBS-a prikazuje Slika 23.



Slika 23. Serijski rezovi tkivnih mikroareja svijetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica pokazuju imunohistokemijsko bojanje na OPN i jezgri čimbenik kappa B (NF-κB) (smeđe bojanje) zajedno s bojanjem apoptotičkih stanica TUNEL metodom (crveno bojanje). Tumori koji pokazuju jako i difuzno citoplazmatsko bojanje na OPN (A) pokazuju i NF-κB unutar jezgri većine tumorskih stanica (B) i svega nekoliko apoptotičkih stanica (C). Za razliku od toga, tumori sa slabim i žarišnim citoplazmatskim bojanjem na OPN (D) pokazuju NF-κB samo u citoplazmama tumorskih stanica (E), ali zato pokazuju mnoštvo tumorskih stanica u apoptozi (F). Povećanje x 200.

5. RASPRAVA

Od njegova otkrića pa sve do danas uloga OPN-a u nastanku i napredovanju tumora intenzivno se istraživala kroz brojne različite eksperimentalne in vivo i in vitro modele (16,23-25,28, 41-44,60,61,82-84,102). Protein OPN i njegova RNA pronađeni su u povećanim količinama u različitim humanim tumorima u odnosu na odgovarajuća zdrava tkiva, a rezultati kliničkopatoloških istraživanja poduprli su eksperimentalne hipoteze da utvrđivanje OPN-a u tumorskim stanicama može imati prognostičku vrijednost (27,29-36). Unatoč tome, vrlo je mali broj objavljenih studija koje ispituju izražaj OPN-a u tumorskom tkivu KBS-a (26,27). Osim toga, ispitivani su se uzorci u spomenutim studijama sastojali od različitih histoloških tipova KBS-a što onemogućava precizno određivanje prognostičke uloge OPN-a u KBS-u. Kako bi se bolje utvrdila uloga OPN-a u progresiji SKBS-a, najčešćeg tipa KBS-a, u prvom je dijelu istraživanja metodom imunohistokemije ispitan izražaj OPN-a na velikom uzorku SKBS-a s ciljem određivanja njegovog prognostičkog značenja.

Jedan od načina poticanja tumorskog napredovanja, posredovan je izbjegavanjem programirane smrti tumorskih stanica, a potaknut je upravo djelovanjem OPN-a. Mehanizmi kočenja apoptoze na modelu KBS-a ispitivani su većinom na staničnim linijama KBS-a i to istraživanjem uloge NF- κ B, transkripcijskog čimbenika uključenog u signalne putove OPN-a (87,88, 95,96). Upravo iz tih razloga, u drugom dijelu istraživanja koristeći TMA ispitan je međuodnos OPN-a i NF- κ B te njihova povezanost s apoptozom na istoj skupini tumorskih stanica u cilju potvrde hipoteze o utjecaju OPN-a na apoptozu putem aktivacije NF- κ B na modelu humanog SKBS-a.

Istraživanjem je utvrđeno da 36% SKBS-a pokazuje reakciju s protutijelom protiv OPN-a u citoplazmama tumorskih stanica što je u skladu s prijašnjim studijama Browna i Coppolae

(26,27). Također je OPN imunoreaktivnost pronađena u stanicama tumorske strome, većinom makrofagima i plazma stanicama. Imunoreaktivnost je bila jače izražena u tumorskim kao i ne-tumorskim elementima u području nekroze tumora i invazivne fronte, poput opažanja Browna i sur. za KBS, ali i ostale ispitivane karcinome, što upućuje na posredovanje OPN-a u staničnoj adheziji i invaziji (26).

U tumorskim stanicama povećane količine OPN-a nastaju kao posljedica povećanog stvaranja OPN mRNA zbog povećanog izražaja različitih onkogeni kao što su ras, src ili myc (24). Korelacija izražaja OPN-a na proteinskoj i genskoj razini pokazala je u ovom istraživanju njihovu međusobnu povezanost, ali bez postizanja statističke značajnosti, vjerojatno zbog malog broja svježih smrznutih uzoraka. Uz to, obzirom da je količina OPN mRNA određivana iz homogeniziranog svježeg smrznutog tkiva, vjerojatno su na ukupnu količinu OPN mRNA utjecali i ne-tumorski elementi, koji također predstavljaju izvor OPN-a (20,24,26).

Prisustvo OPN proteina i mRNA u normalnom tkivu bubrega opisano je uglavnom u epitelnim stanicama Henleove petlje i distalnih kanalića, ali uslijed različitih oštećenja bubrežnog tkiva poput bubrežnih kamenaca, upalnih bolesti bubrega, hidronefroze, dijabetičke nefropatije ili hipertenzije, stvaranje OPN-a može biti povećano i time prisutno u svim dijelovima tubula te glomerulima (20). U ispitivanom normalnom tkivu bubrega izražaj OPN-a pronađen je većinom u distalnim kanalićima te kalcifikatima, ali je u određenom broju bioptičkih uzoraka bio prisutan duž svih dijelova nefrona, vjerojatno zbog prisutne popratne bolesti bubrega. Spomenuti rezultati imunohistokemijskog bojanja upućuju na mogućnost povećane sinteze OPN mRNA u normalnom tkivu bubrega što može objasniti zašto u istraživanju nije postignuta značajna razlika između količine OPN mRNA u tumorskom i normalnom tkivu bubrega.

U dobro diferenciranim tumorima bojanje na OPN pokazivalo je luminalnu lokalizaciju te je nalikovalo bojanju benignih parenhimnih struktura – tubula, u skladu s opažanjima Browna i sur. u ispitivanim karcinomima bubrega, probavnog sustava, dojke, prostate, jajnika i štitne žlijezde (26). U ovom istraživanju izražaj OPN-a, određen prvenstveno kao postotak OPN pozitivnih tumorskih stanica u pojedinom bioptičkom uzorku, pokazao je značajnu povezanost s obilježjima tumora koja utječu na prognozu KBS-a: veličinom tumora, nuklearnim gradusom, patološkim stadijem te Ki-67 indeksom proliferacije. Tumori nuklearnog gradusa 1 nisu pokazivali izražaj OPN-a, ali transformacijom prema višem nuklearnom gradusu, povećavao se postotak OPN pozitivnih tumora. Navedeni rezultat u skladu je s istraživanjima na drugim humanim tumorima kao što su gliomi (30) te karcinomu prostate (35) i dojke gdje je od patohistoloških čimbenika jedino histološki gradus bio povezan s izražajem OPN-a u karcinomskim stanicama (29). Coppola i sur. su povezanost izražaja OPN-a sa stadijem utvrdili za KBS te za karcinom mokraćnog mjehura, debelog crijeva, grkljana, usne šupljine i žlijezda slinovnica (27). Povezanost OPN mRNA s progresijom tumora utvrđena je također za karcinom debelog crijeva (36) te karcinom jetre (32) i želuca (33). Kao i u radu Coppolae i sur. OPN je u našem istraživanju bio povezan sa stadijem KBS-a, što vjerojatno odražava učinak OPN-a na procese napredovanja tumora, kao što su poticanje migracije stanica, invazija izvanstaničnog matriksa te poticanje neoangiogeneze. Obzirom da OPN sadrži RGD domenu koja veže $\alpha\text{v}\beta$ integrine stanične površine, OPN tim putem može potaknuti različite signalne putove koji u konačnici dovode do promjena u staničnom ponašanju karakteristične za zloćudno transformirane stanice (17). Prisustvo $\alpha\text{v}\beta$ integrina pronađeno je na površini različitih vrsta tumorskih stanica pa tako i u KBS-u (103), a na modelu karcinoma dojke dokazano je da je povećan izražaj osobito $\alpha\text{v}\beta 3$ integrina povezan s progresijom tumora zahvaljujući međudjelovanju OPN-a s navedenim integrinima (104). Isto tako, poznato je da OPN svoje učinke može ostvariti i međudjelovanjem s

različitim članovima porodice molekule CD44 (17). U KBS-u je pronađen povećan izražaj molekule CD44s u odnosu na normalno tkivo bubrega te je utvrđena povezanost s lošim prognostičkim pokazateljima i kraćim preživljavanjem bolesnika (105). U karcinomu želuca zajednički izražaj OPN-a i CD44v9 bio je povezan s invazijom limfnih žila i limfogenim metastazama (33). Poticanje razgradnje ISM-a i poticanje neoangiogeneze predstavljaju također mehanizme napredovanja tumora posredovane OPN-om (17). Na modelu adenokarcinoma pluća utvrđena je korelacija izražaja OPN-a i MMP-9 (106) te zajednički izražaj OPN-a i VEGF-a s brojem krvnih žila i preživljavanjem bolesnika (45). Iz navedenog se može zaključiti da povećano stvaranje OPN-a od strane tumorskih stanica ima utjecaja na invaziju i metastaziranje, procese u kojima je presudno međudjelovanje između tumorskih stanica i izvanstaničnog matriksa, ali i ne-tumorskih stanica – endotelnih stanica, a naši rezultati upućuju da spomenuti mehanizmi mogu biti u podlozi progresije SKBS-a.

U ovom istraživanju povećan izražaj OPN-a bio je prisutan u većim tumorima, kao i onima koji su pokazivali veći rast, određen kroz Ki-67 indeks proliferacije. U nekoliko je eksperimentalnih studija pokazan utjecaj OPN-a na rast tumora poticanjem sinteze i aktivnosti receptora čimbenika rasta kao što su HGFR i EGFR (35,41,102). Osim toga, dokazan je utjecaj OPN-a na kočenje apoptoze u različitim vrstama tumorskih stanica (46,48,107-109). Isto tako, Sourbier i sur. su na animalnom modelu KBS-a uočili povezanost aktivacije NF- κ B i kočenja apoptoze uz istovremeno povećanje veličine tumora (88). U našem istraživanju utvrđena je korelacija OPN-a s NF- κ B te obrnuta korelacija s apoptozom u TMA SKBS-a. Obzirom da je veličina tumora određena odnosom broja stanica u proliferaciji i onih koje nestaju apoptozom, djelovanje OPN-a na proces apoptoze putem aktivacije NF- κ B može predstavljati još jedan mehanizam kojim OPN potiče rast tumora.

Značajna povezanost između izražaja OPN-a i preživljavanja bolesnika sa SKBS-om utvrđena je u istraživanju ove doktorske disertacije. Do sada je utjecaj OPN-a na preživljavanje utvrđen za nekolicinu humanih tumora. U karcinomu pluća OPN kao i njegova mRNA su pokazali povećan izražaj u odnosu na normalno tkivo pluća, ali je samo OPN protein bio značajno povezan s preživljavanjem (45). Povećana količina OPN mRNA pronađena je i u karcinomu jetre te je utvrđena povezanost sa gradusom, stadijem, recidivom bolesti te preživljavanjem bolesnika (32). U dvije studije na velikom uzorku karcinoma dojke pokazana je povezanost povećanog izražaja OPN-a u tumorskim stanicama sa značajno kraćim preživljavanjem bolesnika (29,31). Uz to su Tuck i sur. na uzorku karcinoma dojke bez limfogenih metastaza pokazali povezanost OPN-a s ukupnim preživljavanjem kao i s dužinom razdoblja do pojave recidiva bolesti (31). U spomenutoj je studiji povezanost OPN-a s preživljavanjem također testirana i u multivarijantnoj analizi te je utvrđeno da jedino OPN među poznatim prognostičkim čimbenicima karcinoma dojke posjeduje značenje nezavisnog prognostičkog čimbenika (31). U KBS-u povezanost OPN-a s preživljavanjem utvrđena je jedino za OPN u serumu bolesnika (57), ali ne i u tumorskom tkivu. Naše istraživanje u tom je smislu jedinstveno, jer po prvi puta prikazuje utjecaj OPN-a u tumorskom tkivu SKBS-a na klinički ishod bolesnika. Testirajući prognostičko značenje OPN-a u multivarijantnoj analizi, jedino je patološki stadij pokazao povezanost s preživljavanjem bolesnika što je i u skladu s istraživanjima prognostičkih čimbenika u KBS-u. Međutim, kada je izražaj OPN-a određen kao postotak OPN pozitivnih tumorskih stanica manji ili veći od 25%, multivarijantna analiza je pokazala da je OPN uz patološki stadij nezavisni prognostički čimbenik (podatci nisu prikazani). Izražaj OPN-a određen na opisani način pokazao je povezanost sa svim kliničkopatološkim pokazateljima KBS-a osim, nažalost s patološkim stadijem.

Mehanizmi putem kojih OPN potiče tumorsku progresiju, u ovom trenutku nisu u potpunosti poznati. Istraživanja tih mehanizama samo su dijelom rasvijetljena putem eksperimentalnih modela, dok njihovo utvrđivanje u složenim biološkim sustavima humanih tkiva tek slijedi.

Tkivne mikroareje su vrlo korisna metoda za vizualizaciju tumorskih biljega istovremeno na tkivnom rezu velikog broja tumorskih uzoraka (110-113). Ovisno o prirodi antigena koji se istražuje, metoda TMA zahtijeva pažljivo osmišljavanje plana istraživanja kao i provođenje pokusa. Tu posebno dolazi do izražaja problem uzorkovanja, odnosno određivanja broja tkivnih areja koje će predstavljati pojedini tumorski uzorak, kao i određivanje mjesta uzimanja tkivnih areja iz tumorskog tkiva donorske parafinske kocke. Hoos i sur. ističu da je pri izgradnji TMA ključan upravo odabir mjesta u standardnim tkivnim rezovima obojanim hemalaun-eozinom promatranjem morfologije tumora (112). Na taj način, ističu autori, osigurat će se da izabrane tkivne areje zaista sadrže informacije koje želimo analizirati. Osim toga, Gomaa i sur. navode kako je potrebno učiniti i određene prilagodbe same imunohistokemijske metode, koja se primjenjuje u istraživanju ovako stvorenih TMA, zbog smanjenja količine veznih mjesta protutijela u odnosu na standardne rezove te promjene oksidacije antigena uslijed rezanja parafinskih kocki s TMA (110). Zbog snažnijeg imunohistokemijskog bojanja TMA, u istraživanju je ove doktorske disertacije primijenjeno veće razrjeđenje primarnog protutijela te je skraćeno vrijeme njegove inkubacije s TMA.

Većina studija provedenih na TMA predlaže da pojedini uzorak tumora bude zastupljen s tri do četiri tkivne areje kako bi se precizno procijenila heterogenost tumora, izbjegao gubitak materijala pri izradi tkivnih rezova te postigao rezultat kao da se u istraživanju koriste standardni tkivni rezovi (110-113). Uobičajeno je da se za statističku analizu koristi rezultat one tkivne areje

s najvećim izražajem ispitivanog biljega ili da se koristi srednja vrijednost svih očitanih areja (110,111). U skladu s istraživanjima provedenim na TMA KBS-a, u istraživanju ove doktorske disertacije koristila su se tri tkivna cilindra iz najreprezentativnijeg područja tumora. Gomaa i sur. smatraju da je u istraživanju međudnosa tumorskih proteina tehnika TMA pouzdana, dok to nije uvijek slučaj kada se istražuje povezanost određenog tumorskog biljega s kliničkopatološkim parametrima (110). Isto tako, Gillett i sur. ne preporučuju korištenje TMA analize u testiranju novih protutijela, obzirom da nije poznat raspored ispitivanih biljega u tkivu (113). Obzirom da su u ovom istraživanju TMA služile upravo za određivanje međudnosa izražaja OPN-a, NF- κ B i apoptoze, korištena je samo jedna tkiva areja za procjenu njihovog međudnosa. Odabrana je bila ona areja koja je pokazivala najveći izražaj, odnosno aktivaciju NF- κ B, jer se očekivalo da će se to odraziti na izražaj preostalih molekula. U prilog te pretpostavke govori snažnija i značajnija korelacija između aktivacije NF- κ B i izražaja OPN-a u istoj tkivnoj areji, u usporedbi s korištenjem srednje vrijednosti izražaja OPN-a svih procijenjenih areja u korelaciji s aktivacijom NF- κ B (podatci nisu prikazani).

Glede reproducibiliteta rezultata TMA, nije izvršena usporedba odgovarajućih tumorskih uzoraka na TMA s onima na standardnim rezovima. Umjesto toga, koristeći zasebni manji uzorak SKBS-a, koji je poslužio prvenstveno za određivanje OPN mRNA, učinjena je korelacija izražaja OPN-a s aktivacijom NF- κ B na standardnim rezovima, kao što je učinjeno i na TMA rezovima, a postignuti rezultati su bili isti. To upućuje na dobar odabir načina izgradnje TMA kao i metode ocjene izražaja ispitivanih biljega u ovom istraživanju.

Koristeći TMA u ovom je istraživanju uspoređen izražaj OPN-a s aktivacijom NF- κ B u tumorskim stanicama kako bi se utvrdila njihova moguća povezanost na modelu SKBS-a. Nekoliko je eksperimentalnih studija na staničnim linijama melanoma, karcinoma dojke i endotelних stanica pokazalo da je NF- κ B transkripcijski čimbenik čijom aktivacijom OPN

posreduje različite učinke poput proliferacije stanica i invazije ISM-a (82-84) te izbjegavanja apoptoze (46). Isto tako, na in vivo i in vitro modelu karcinoma prostate dokazan je učinak OPN-a na aktivaciju NF- κ B čime se potiče rast tumora, migracija i invazija ISM-a zbog aktivacije MMP-2 te neoangiogeneza zbog povećanog stvaranja prostaglandina E2 (114). U spomenutoj je studiji eksperimentalni model potvrđen kroz korelaciju navedenih molekula u bioptičkim uzorcima karcinoma prostate (114). U istraživanju je ove doktorske disertacije pokazana korelacija OPN-a, ali i njegove mRNA s NF- κ B aktivacijom koja je bila izražena kao nuklearno bojanje tumorskih stanica. To se opažanje može objasniti parakrinom ili autokrinom stimulacijom tumorske stanice nakon vezivanja OPN-a za receptore stanične površine. Glavni receptori OPN-a su $\alpha\beta$ integrini te porodica molekula CD44 čiji je povećani izražaj dokazan u tkivu SKBS-a (103,105). Postoji mogućnost da vezivanje OPN-a porijekla tumorskih i/ili stromalnih stanica aktivira nizvodne signalne putove koji u konačnici dovode do aktivacije NF- κ B u tumorskim stanicama SKBS-a.

U ovom istraživanju izražaj OPN-a je korelirao s obje NF- κ B podjedinice u TMA i to u slučaju nuklearnog i citoplazmatskog imunohistokemijskog bojanja na NF- κ B. Unatoč intenzivnom i opsežnom istraživanju signalnih putova u koje je uključen ovaj transkripcijski čimbenik, i dalje ostaju otvorena brojna pitanja vezana uz djelovanje NF- κ B u složenim in vivo uvjetima kao npr. koji NF- κ B dimeri posreduju pojedine stanične reakcije, aktivacija kojih NF- κ B podjedinica je karakteristična za pojedine vrste tumora, ili koji su to specifični mehanizmi odgovorni za konstitutivnu NF- κ B aktivaciju u određenim tumorskim modelima. Uobičajeno je da se pod pojmom NF- κ B podrazumijeva p50-p65 heterodimer, koji se u stanicama i stvara u najvećim količinama te se stoga njegove podjedinice i istražuju u različitim tumorskim modelima. U većini je patohistoloških studija različitih humanih tumora ispitivan izražaj samo p65 podjedinice NF- κ B, a u rijetkima i p50 podjedinica. U nekim tumorskim modelima poput

karcinoma endometrija (78), usne šupljine (115) te karcinoma bubrega (73) dokazana je korelacija aktivacije obje NF- κ B podjedinice i njihov zajednički utjecaj na tumorigenezu ili progresiju tumora, dok je u drugim tumorskim modelima poput karcinoma prostate povezanost s progresijom tumora utvrđena samo za p65 podjedinicu što autori objašnjavaju malom transaktivacijskom aktivnosti p50 podjedinice kao i represorskim djelovanjem p50 homodimera na ciljne gene (114). U istraživanjima NF- κ B u tumorskim tkivima metodom imunohistokemije, aktivacija NF- κ B odgovarala je nuklearnom pozitivitetu, a metoda imunoblotinga sadržaja tumorskih jezgri u nekim je pak istraživanjima zatim potvrdila da se zaista radi o specifičnoj imunohistokemijskoj reakciji, odnosno da se radi o translokaciji NF- κ B proteina u jezgru tumorske stanice (73,74,76,77,79). U nekim su patohistološkim studijama istraživači koristili protutijela koja prepoznaju i aktivni oblik NF- κ B podjedinica te su uočili citoplazmatski pozitivitet tumorskih stanica što znači da se aktivni oblik NF- κ B zadržava u citoplazmi tumorskih stanica (74,81). Kao što je prethodno spomenuto, citoplazmatski je smještaj NF- κ B proteina korelirao s OPN-om što upućuje na mogućnost popratnog djelovanja OPN-a na transkripciju NF- κ B gena ili kao što je već spomenuto, na mogućnost aktivacije NF- κ B djelovanjem OPN-a s posljedičnim zadržavanjem aktivnog oblika NF- κ B u citoplazmama stanica SKBS-a.

Onkogeni uloga NF- κ B opisana je za niz hematopoetskih novotvorina i solidnih tumora gdje je njegova konstitutivna aktivacija povezana s tumorskim rastom zbog ubrzane stanične proliferacije i smanjene apoptoze te s invazijom tumora kao posljedicom povećane stanične adhezije i migracije te pojačane angiogeneze (64,79-82,114,115). Zanimljivo je da se opisani učinci pripisuju i djelovanju OPN-a. Općenito je prihvaćena činjenica da je nuklearna lokalizacija aktivnog oblika NF- κ B proteina češće prisutna u tumorskim stanicama kao posljedica trajne aktivacije u suprotnosti s kratkotrajnom NF- κ B aktivacijom u stanicama normalnih tkiva. U skladu s tom činjenicom, u ovom je istraživanju pronađena razlika u stupnju aktivacije između

tubularnih stanica bubrega i stanica SKBS-a, kao što je prethodno opisano za karcinom bubrega (73), prostate (79), želuca (77), gušterače (74), debelog crijeva (76) i usne šupljine (75). Međutim, u istraživanju nije pronađena razlika u citoplazmatskom NF- κ B bojanju između normalnog i tumorskog tkiva, suprotno od opažanja za kolorektalni karcinom (76), karcinom prostate (79) i usne šupljine (75), gdje je pronađen povećan izražaj NF- κ B u citoplazmi tumorskih stanica, vjerojatno kao posljedica povećanog izražaja NF- κ B gena.

U istraživanju je prikazana povezanost izražaja OPN-a s indeksom apoptoze na tkivnim rezovima SKBS-a dobivenim metodom TMA. Naime, tumori karakterizirani povećanim izražajem OPN-a pokazivali su mali apoptotički indeks, i obrnuto. Koristeći Pearsonovu korelaciju u statističkoj analizi, postignut je samo trend prema statističkoj značajnosti između indeksa apoptoze s jedne te OPN-a i p65 podjedinice s druge strane. Međutim, kada je u korelaciji s apoptotičkim indeksom korišten zbroj OPN-a i aktivirane p65 podjedinice, postignuta je značajna obrnuta korelacija što podupire hipotezu o utjecaju aktivacije NF- κ B u kontroli apoptoze djelovanjem OPN-a.

Za oba oblika OPN-a, topljivi, koji ima ulogu citokina, te netopljivi, koji je vezan uz ISM, dokazana je zaštitna uloga u apoptozi u nekoliko staničnih modela (46,48,107-109). OPN može pokrenuti anti-apoptotičke signale vezivanjem ili za integrine ili za neku od molekula CD44 porodice na staničnoj površini, ali pritom u nizvodnim signalnim putovima dolazi do aktivacije potpuno različitih molekula, što ovisi o vrsti aktiviranih receptora kao i tipu stanice u kojoj se ta zbivanja odvijaju. U tom smislu su Scatena i sur. dokazali uključenost NF- κ B u antiapoptotičke signalne putove OPN-a na modelu endotelnih stanica štakora (46), a nekoliko je istraživanja na staničnim linijama ukazalo na ulogu NF- κ B u apoptozi KBS-a (87,88,95,96).

Vrlo je malo podataka o izražaju NF- κ B u tkivu humanog KBS-a, ali ono što je poznato, u skladu je s rezultatima studija koje su provedene na drugim vrstama tumora o utjecaju NF- κ B na

tumorsku progresiju (73,88). Ovo istraživanje pokazalo je značajnu obrnutu korelaciju između aktivacije NF- κ B i indeksa apoptoze u tkivu SKBS-a, potvrdivši rezultate experimentalnih studija (87,88,95,96). Analizirajući pritom zasebni doprinos postotka i jakosti bojanja tumorskih jezgri na NF- κ B, pronađeno je da jakost bojanja ima veći utjecaj od postotka, odnosno, kada je u statističkoj analizi uzet u obzir samo postotak pozitivnih jezgri, korelacija s indeksom apoptoze nije postignuta (podatci nisu prikazani). Ovaj rezultat mogu objasniti opažanja experimentalnih istraživanja na Vinskoj mušici o tome da već vrlo male količine NF- κ B proteina u jezgri mogu imati značajne posljedice u organizmu (63). Moguće je stoga da jakost nuklearnog imunohistokemijskog bojanja odgovara količini aktiviranog NF- κ B proteina koji se translocirao u jezgru.

Kako bi se pronašao učinkovit lijek za liječenje određenog tipa tumora, potrebno je istražiti mehanizme njegovog nastanka i napredovanja, odnosno istražiti doprinos pojedinih molekula te odrediti njihove složene odnose specifične za pojedini tumorski model. U KBS-u dokazana je uloga OPN-a i NF- κ B prvenstveno u njegovoj progresiji u eksperimentalnim uvjetima i kliničkopatološkim istraživanjima. Kočenje procesa apoptoze aktiviranim NF- κ B-om dokazano je također na modelu KBS-a, čak su otkriveni i signalni putovi koji su odgovorni za tu aktivaciju. U nedavno objavljenoj studiji Sourbier i sur. su na animalnom modelu dokazali da u KBS-u dolazi do konstitutivne aktivacije PI3K/Akt signalnog puta čime autori objašnjavaju konstitutivnu aktivaciju NF- κ B u tom tumorskom modelu s posljedičnim produženim preživljavanjem tumorskih stanica (116). U nešto ranijem radu na Ba/F3 staničnim linijama Lin i sur. dokazuju da je spomenuti signalni put aktiviran međudjelovanjem OPN-a s molekulom CD44 dovodeći do istog ishoda – kočenja apoptoze (48). S druge pak strane, Scatena i sur. predlažu aktivaciju NIK-a, kao posljedicu djelovanja OPN-a na α v β 3 integrine, odgovornom za aktivaciju NF- κ B u endotelnim stanicama štakora (85). Rezultati našeg istraživanja ukazuju na

moćnost da je za koćenje apoptoze tumorskih stanica SKBS-a odgovorna konstitutivna aktivacija NF- κ B, koja je posljedica djelovanja OPN-a, a signalne putove koji su pritom uključeni, treba tek istražiti.

Koćenje apoptoze, kao posljedica onkogenog djelovanja NF- κ B, proučavana je u nekolicini studija na staničnim linijama karcinoma bubrega, potvrđujući koćenje NF- κ B signalnog puta novim učinkovitim načinom lijećenja KBS-a (87,88,95,96). Dobro je poznato da je metastatski proces, većinom odgovoran za mortalitet u malignoj bolesti, u suštini neučinkovit proces, u kojem vrlo mali broj tumorskih stanica koje napuštaju primarno sijelo tumora, u konačnici stvara nova tumorska sijela – metastaze. Tijekom tog procesa, tumorske su stanice izložene različitim impulsima koji potiču rast stanice, ali isto tako i potiču njezinu programiranu smrt – apoptozu. Impulsi koji koče apoptozu ne potpomažu samo metastatski proces, već omogućavaju tumorskim stanicama otpornost prema uobičajenim kemoterapeuticima. U tom smislu je aktivacija NF- κ B povezana s rezistencijom na radio i kemoterapiju u različitim tipovima tumora (86) kao i KBS-u (88), a koćenje tog signalnog puta povećava učinkovitost postojećih kemoterapeutika. Osim toga, na eksperimentalnim modelima karcinoma dojke, prostate i melanoma dokazana je učinkovitost nekolicine različitih lijekova djelujući na signalne putove regulirane OPN-om, u kojima je između ostalih molekula uključen i NF- κ B (62).

Ovo je istraživanje pokazalo da OPN ima ulogu u napredovanju SKBS-a, pri čemu koćenje apoptoze predstavlja jedan od mehanizama tog napredovanja vjerojatno uključujući signalni put NF- κ B. Rezultati ovog istraživanja doprinose razumijevanju molekularnih mehanizama kojima OPN potiče progresiju SKBS-a, što može doprinijeti boljem dijagnosticiranju ove maligne bolesti te pomoći u pronalaženju novih načina lijećenja ovog tipa tumora. Određivanje izražaja OPN-a i NF- κ B moglo bi postati dio rutinske patohistološke

pretrage SKBS-a i tako pomoći u prepoznavanju bolesnika s agresivnijim oblicima SKBS-a koji bi uz kirurško trebali primiti i dodatno liječenje.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati ovog istraživanja upućuju na slijedeće zaključke:

1. OPN protein je pojačano izražen u tumorskom tkivu SKBS-a u odnosu na normalno tkivo bubrega.
2. Između SKBS-a i normalnog tkiva bubrega ne postoji razlika u količini OPN mRNA.
3. Povećan izražaj OPN-a u tkivu SKBS-a povezan je s pokazateljima loše prognoze kao što su nuklearni gradus, proliferacija tumorskih stanica i veličina tumora te stadij proširenosti bolesti.
4. Povećan izražaj OPN-a združen je s kraćim preživljavanjem bolesnika sa SKBS-om.
5. U SKBS-u prisutna je konstitutivna aktivacija p50 i p65 podjedinice NF- κ B heterodimera.
6. Korelacija izražaja OPN proteina i OPN mRNA s p65 NF- κ B podjedinicom upućuje na aktivaciju NF- κ B signalnog puta djelovanjem OPN-a u SKBS-u.
7. Obrnuta povezanost NF- κ B i apoptotičkog indeksa ukazuje na uključenost ovog transkripcijskog čimbenika u signalne putove koćenja apoptoze u SKBS-u.
8. Povezanost povećanog izražaja OPN-a sa smanjenjem apoptotičkog indeksa te aktivacijom NF- κ B upućuje na ulogu OPN-a u koćenju apoptoze putem aktivacije NF- κ B na modelu SKBS-a.

7. LITERATURA

1. Kirkali Z, Tuzel E, Mungan MU. Prognostic factors for renal cell carcinoma. U: Bangma CH, Newling DWW, ur. Prostate and renal cancer, benign prostatic hyperplasia, erectile dysfunction and basic research: An update. New York: Parthenon Publishing; 2003. str. 291-303.
2. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, ur. WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2004.
3. Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN. Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype. Pathology 2007 Oct;39(5):459-65.
4. Kurth KH, Mickisch GH, Schröder FH, ur. Renal, bladder, prostate and testicular cancer: An update. New York: Parthenon Publishing; 2002.
5. Nathan PD, Eisen TG. The biological treatment of renal-cell carcinoma and melanoma. Lancet Oncol 2002;3(2):89-96.
6. Incidencija raka u Hrvatskoj 2001.-2005. Bilteni br. 26-30. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2003-2007.
7. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Lyon: IARC Press; 2004.
8. Van den Berg E, Buys CH. Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development Genes Chromosomes Cancer 1997;19:59-76.
9. Ohh M, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives. Mol Med Today 1999;5(6):257-63.

10. Pavone L, Andrulli S, Santi R, Majori M, Buzio C. Long-term treatment with low doses of interleukin-2 and interferon-alpha: immunological effects in advanced renal cell cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50(2):82-6.
11. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;6:655-63.
12. Sobin LH, Wittekind Ch, ur. *TNM Classification of Malignant Tumors*. New York: Wiley;2002.
13. Scholzen T, Endl E, Wohlenberg C i sur. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol* 2002;196(2):135-44.
14. Godley P, Kim SW. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2002;14(3):280-5.
15. Rathmell WK, Godley PA, Rini BI. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2005;17(3):261-7.
16. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 1979;16(4):885-93.
17. Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27(1):103-18.
18. Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(23):8819-23.
19. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin- a molecule for all seasons. *QJM* 2002;95(1):3-13.
20. Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001;60(5):1645-57.

21. Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* 2001;1(5):621-32.
22. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
23. Wu Y, Denhardt DT, Rittling SR. Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene. *Br J Cancer* 2000;83(2):156-63.
24. Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF i sur. Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:77-84.
25. Cook AC, Tuck AB, McCarthy S i sur. Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six hallmarks of cancer in model of breast cancer progression. *Mol Carcinog* 2005;43:225-36.
26. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B i sur. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol* 1994;145:610-23.
27. Coppola D, Szabo M, Boulware D i sur. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10:184-90.
28. Khodavirdi AC, Song Z, Yang S i sur. Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(2):883-8.
29. Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M i sur. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(12):3417-27.
30. Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y. Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest* 1995;72(1):55-63.
31. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H i sur. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;79(5):502-8.

32. Pan HW, Ou YH, Peng SY i sur. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;98(1):119-27.
33. Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y i sur. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79(2):127-32.
34. Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer* 1996;15(3):311-23.
35. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE i sur. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999;5(8):2271-7.
36. Agrawal D, Chen T, Irby R i sur. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(7):513-21.
37. Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. *Cancer Res* 1998;58(22):5206-15.
38. Feng F, Rittling SR. Mammary tumor development in MMTV-c-myc/MMTV-v-Ha-ras transgenic mice is unaffected by osteopontin deficiency. *Breast Cancer Res Treat* 2000;63(1):71-9.
39. Liaw L, Crawford HC. Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(7):805-12.
40. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol* 2004;26(3):179-84.

41. Tuck AB, Hota C, Wilson SM, Chambers AF. Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene* 2003;22(8):1198-205.
42. Tuck AB, Elliott BE, Hota C, Tremblay E, Chambers AF. Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor (Met). *J Cell Biochem* 2000;78(3):465-75.
43. Wai PY, Guo L, Gao C, Mi Z, Guo H, Kuo PC. Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation. *Surgery* 2006;140(2):132-40.
44. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 1996;149(1):293-305.
45. Shijubo N, Uede T, Kon S i sur. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(4):1269-73.
46. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF- κ B mediates α v β 3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998;141:1083-93.
47. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411(6835):342-8.
48. Lin YH, Yang-Yen HF. The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* 2001;276(49):46024-30.
49. Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 2004;90(10):1877-81.

50. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(12):4060-6.
51. Wu CY, Wu MS, Chiang EP i sur. Elevated plasma osteopontin associated with gastric cancer development, invasion and survival. *Gut* 2007;56(6):782-9.
52. Chang YS, Kim HJ, Chang J, Ahn CM, Kim SK, Kim SK. Elevated circulating level of osteopontin is associated with advanced disease state of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;57(3):373-80.
53. Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB i sur. Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:3337-43.
54. Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S sur. Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):59-67.
55. Hotte SJ, Winkquist EW, Stitt L, Wilson SM, Chambers AF. Plasma osteopontin: associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer* 2002;95(3):506-12.
56. Koivisto P, Visakorpi T, Rantala I, Isola J. Increased cell proliferation activity and decreased cell death are associated with the emergence of hormone-refractory recurrent prostate cancer. *J Pathol* 1997;183(1):51-6.
57. Ramankulov A, Lein M, Kristiansen G, Meyer HA, Loening SA, Jung K. Elevated plasma osteopontin as marker for distant metastases and poor survival in patients with renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133(9):643-52.
58. Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H i sur. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int J Cancer* 2002;98(5):707-12.

59. Arai T, Kino I. Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J Pathol* 1995;176(1):37-44.
60. Nemoto H, Rittling SR, Yoshitake H i sur. Osteopontin deficiency reduces experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues. *J Bone Miner Res* 2001;16(4):652-9.
61. Mukhopadhyay R, Price JE. Stable expression of antisense osteopontin inhibits the growth of human breast cancer cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999;40:448.
62. Jain S, Chakraborty G, Bulbule A, Kaur R, Kundu GC. Osteopontin: an emerging therapeutic target for anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:81-90.
63. Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999;18(49):6842-4.
64. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005;446:475-82.
65. Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K. NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 2007;98(3):268-74.
66. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19(2):154-61.
67. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109:81-96.
68. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-κB. *Cell Death Differ* 2006;13(5):759-72.
69. Mosialos G. The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol* 1997;8(2):121-9.

70. Xiao G, Cvijic ME, Fong A i sur. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J* 2001;20(23):6805-15.
71. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 1998;12(7):968-81.
72. Willis TG, Jadayel DM, Du MQ i sur. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 1999;96(1):35-45.
73. Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A i sur. Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003;24:377-84.
74. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5(1):119-27.
75. Nakayama H, Ikebe T, Beppu M, Shirasuna K. High expression levels of nuclear factor kappaB, IkappaB kinase alpha and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2001;92(12):3037-44.
76. Maihöfner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Group. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2003;24(4):665-71.
77. Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K i sur. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001;7(12):4136-42.
78. Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X i sur. Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004;204(5):569-77.

79. Shukla S, MacLennan GT, Fu P i sur. Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia* 2004;6(4):390-400.
80. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 1997;17(7):3629-39.
81. Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE i sur. Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res* 2004;10(7):2466-72.
82. Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* 2001;276(48):44926-35.
83. Das R, Mahabeleshwar GH, Kundu GC. Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278(31):28593-606.
84. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem* 2004;279(37):38921-35.
85. Rice J, Courter DL, Giachelli CM, Scatena M. Molecular mediators of alphavbeta3-induced endothelial cell survival. *J Vasc Res* 2006;43(5):422-36.
86. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005;5(4):297-309.

87. An J, Sun Y, Fisher M, Rettig MB. Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor-kappaB dependent. *Mol Cancer Ther* 2004;3(6):727-36.
88. Sourbier C, Danilin S, Lindner V i sur. Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2007;67(24):11668-76.
89. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007;139(1):143-56.
90. Soengas MS, Capodici P, Polsky D i sur. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001;409(6817):207-11.
91. Bonneau D, Longy M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* 2000;16(2):109-22.
92. Todd D, Yang G, Brown RW, Cao J, D'Agati V, Thompson TS, Truong LD. Apoptosis in renal cell carcinoma: detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other prognostic factors. *Hum Pathol* 1996;27(10):1012-7.
93. Zhang X, Takenaka I. Cell proliferation and apoptosis with BCL-2 expression in renal cell carcinoma. *Urology* 2000;56(3):510-5.
94. Ito Y, Matsuura N, Sakon M i sur. Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999;81(4):747-51.
95. Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M. Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 2001;20:3888-96.

96. Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res* 2003;63(21):7076-80.
97. Lillie RD. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 3rd ed. New York: McGraw Hill;1965.
98. Wang H, Zhang W, Fuller GN. Tissue microarrays: applications in neuropathology research, diagnosis, and education. *Brain Pathol* 2002;12:95-107.
99. Cattoretti G, Suurmeijer AJH. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: a review. *Adv Anatomic Pathol* 1994;2:2-9.
100. Boenisch T. *Staining methods*. U: Boenisch T, urednik. *Immunochemical staining methods*. Carpinteria (CA): DAKO Corporation; 2001.
101. Demir R, Kayisli UA, Seval Y i sur. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004;25:560-72.
102. Medico E, Gentile A, Lo Celso C i sur. Osteopontin is an autocrine mediator of hepatocyte growth factor-induced invasive growth. *Cancer Res* 2001;61(15):5861-8.
103. Rabb H, Barroso-Vicens E, Adams R, Pow-Sang J, Ramirez G. Alpha-V/beta-3 and alpha-V/beta-5 integrin distribution in neoplastic kidney. *Am J Nephrol* 1996;16(5):402-8.
104. Furger KA, Allan AL, Wilson SM i sur. Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. *Mol Cancer Res* 2003;1(11):810-9.
105. Lučin K, Matušan K, Đorđević G, Stipić D. Prognostic significance of CD44 molecule in renal cell carcinoma. *Croat Med J* 2004;45(6):703-8.

106. Frey AB, Wali A, Pass H, Lonardo F. Osteopontin is linked to p65 and MMP-9 expression in pulmonary adenocarcinoma but not in malignant pleural mesothelioma. *Histopathology* 2007;50(6):720-6.
107. Yoo KH, Thornhill BA, Forbes MS i sur. Osteopontin regulates renal apoptosis and interstitial fibrosis in neonatal chronic unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2006;70(10):1735-41.
108. Hsieh YH, Juliana MM, Hicks PH i sur. Papilloma development is delayed in osteopontin-null mice: implicating an antiapoptosis role for osteopontin. *Cancer Res* 2006;66(14):7119-27.
109. Burdo TH, Wood MR, Fox HS. Osteopontin prevents monocyte recirculation and apoptosis. *J Leukoc Biol* 2007;81(6):1504-11.
110. Gomaa W, Ke Y, Fujii H, Helliwell T. Tissue microarray of head and neck squamous carcinoma: validation of the methodology for the study of cutaneous fatty acid-binding protein, vascular endothelial growth factor, involucrin and Ki-67. *Virchows Arch* 2005;447(4):701-9.
111. Hager M, Kolbitsch C, Tiefenthaler W, Haufe H, Kemmerling R, Moser PL. Tissue microarrays from renal cell tumors: Exclusion criteria and rate of exclusion. *Scand J Urol Nephrol* 2007;1-5
112. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A i sur. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158(4):1245-51.
113. Gillett CE, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM. Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol* 2000;192(4):549-53.

114. Jain S, Chakraborty G, Kundu GC. The crucial role of cyclooxygenase-2 in osteopontin-induced protein kinase C α /c-Src/I κ B kinase α /beta-dependent prostate tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2006;66(13):6638-48.
115. Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear factor κ B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006;28(10):916-25.
116. Sourbier C, Lindner V, Lang H i sur. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2006;66(10):5130-42.

8. POPIS SKRAĆENICA

cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (od engl. complementary deoksiribonucleic acid)
EGFR	receptor za epidermalni čimbenik rasta (od engl. epidermal growth factor receptor)
HGFR	receptor za čimbenik rasta hepatocita (od engl. hepatocyte growth factor receptor)
H-score	histološki skor (od engl. histological score)
IKK	I κ B kinaza
ISM	izvanstanični matriks
KBS	karcinom bubrežnih stanica
MMP	matriks metaloproteinaza
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. messenger ribonucleic acid)
NF- κ B	jezgreni čimbenik kappa B (od engl. nuclear factor kappa B)
NG	nuklearni gradus
NIK	kinaza koja potiče jezgreni čimbenik kappa B (od engl. nuclear kappa B inducing kinase)
NO	dušikov monoksid
OPN	osteopontin
PI3K/Akt	fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinaza B
pT	patološki stadij
QPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom (od engl. quantitative polymerase chain reaction)
RGD	argininom, glicinom i aspartatom bogata domena (od engl. arginine-glycine-aspartate rich domain)

RQ	relativna količina (od engl. relative quantity)
RT-PCR	reverzna transkripcija – lančana reakcija polimerazom (od engl. reverse transcription polymerase chain reaction)
SKBS	svijetlostanični karcinom bubrežnih stanica
TMA	tkivne mikroareje (od engl. tissue microarray)
TNF	čimbenik nekroze tumora (od engl. tumor necrosis factor)
TUNEL	terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling
uPA	urokinazni aktivator plazminogena
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (od engl. vascular endothelial growth factor)
VHL	von Hippel-Lindau

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Datum rođenja	15. listopada 1975. godine
Osobna adresa	Laginjina 8A, 51 000 Rijeka
Telefon	051 22 64 59, 095 81 18 788
Elektronička pošta	kmatusan@yahoo.com

Školovanje

2007. – danas	Specijalizacija iz patologije, Zavod za Patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci
2004.	Položen državni ispit
2002. – 2004.	Poslijediplomski znanstveni studij «Biomedicina», Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
1994. – 2001.	Studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
1991. – 1994.	Glazbena škola „Ivan Matetić Ronjgov“, Rijeka
1990. – 1994.	Prva riječka hrvatska gimnazija
1982. – 1990.	Osnovna škola „Josip Brusić“, Rijeka

Radna mjesta i zvanja

2002. – danas	Znanstveni novak, asistent, Zavod za Patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci
2001. – 2002.	Pripravnički staž, Dom zdravlja Rab

Nastavna djelatnost

2003. - danas	Asistent, dodiplomski kolegij "Patologija", stručni studij medicinske radiologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
2002. - danas	Asistent, dodiplomski kolegij "Patologija", sveučilišni studij medicine i stomatologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1997. – 2000. Demonstrator, Zavod za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci
1996. – 1997. Demonstrator, Zavod za Histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci
1995. – 1996. Demonstrator, Zavod za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Sudjelovanje na skupovima, radionicama i tečajevima

2007. XXI europski kongres iz patologije, 8.-13. rujna, Istambul, Turska
2007. Tečaj DNA i RNA, 5.-9. ožujka, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska
2006. XXIV Memorijalni sastanak prof. Sergeja Saltykova, 11. studenog, Zagreb, Hrvatska
2006. Upravljanje projektnim ciklusom u europskim projektima, radionica. 6. i 7. listopada, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska
2006. XXI međunarodni skup „Adriatic Society of Pathology“, 24.-25. lipnja, Trst, Italija
2005. III hrvatski kongres patologije i sudske medicine, 8.-11. svibnja, Opatija, Hrvatska
2004. II interkontinentalni kongres iz patologije, 9.-13. lipnja, Iguassu Falls, Brazil
2004. Poslijediplomski tečaj medicinskog usavršavanja I. kategorije „Statistička metodologija znanstvenog istraživanja“, 29. svibnja, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska
2003. XIX europski kongres iz patologije, 6.-11. rujna, Ljubljana, Slovenija

Nagrade

2006. Nagrada Zaklade profesora Sergeja Saltykova za najbolji rad iz područja patologije u 2005-toj godini, XXIV Memorijalni sastanak prof. Sergeja Saltykova, Zagreb, 11. studenog 2006. (rad: Matušan K, Đorđević G, Stipić D, Mozetić V, Lučin K. Osteopontin Expression Correlates With Prognostic Variables and Survival in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. J Surg Oncol. 2006 Sep;94(4):325-31.)

Stipendije

2007. Alpe-Adria Research Grant, 16. svibnja -16. srpnja, Institut za genetiku, Zavod za biomedicinske znanosti i tehnologiju Sveučilišta u Udinama, Udine, Italija

Popis radova

Izvorni znanstveni radovi

1. Đorđević G, Matušan Ilijaš K, Sinožić E, Damante G, Fabbro D, Grahovac B, Lučin K, Jonjić N. Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor-kappaB in renal cell tumors. Croat Med J. 2008 Oct;49(5):608-17.
2. Matušan Ilijaš K, Behrem S, Jonjić N, Žarković K, Lučin K. Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma. Pathol Oncol Res. 2008;14(3):293-8.
3. Đorđević G, Mozetić V, Vrdoljak Mozetić D, Licul V, Matušan Ilijaš K, Mustać E, Oguić R, Fučkar Ž, Jonjić N. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma. Pathol Res Pract. 2007;203(2):99-106.
4. Matušan K, Đorđević G, Stipić D, Mozetić V, Lučin K. Osteopontin Expression Correlates With Prognostic Variables and Survival in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. J Surg Oncol. 2006 Sep;94(4):325-31.
5. Matušan K, Đorđević G, Mozetić V, Lučin K. Expression of osteopontin and CD44 molecule in papillary renal cell tumors. Pathol Oncol Res. 2005;11(2):108-13.
6. Valković T, Fučkar D, Štifter S, Matušan K, Hasan M, Dobrila F, Jonjić N. Macrophage level is not affected by monocyte chemotactic protein-1 in invasive ductal breast carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2005 Jul;131(7):453-8.
7. Lučin K, Matušan K, Đorđević G, Stipić D. Prognostic significance of CD44 molecule in renal cell carcinoma. Croat Med J. 2004 Dec;45(6):703-8.

Radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

Lučin K, Matušan K, Đorđević G, Stipić D. The expression of osteopontin in renal-cell carcinoma. In: Soares F, Vassallo J, Bleggi-Torres LF, editors. Proceedings of the II Intercontinental Congress of Pathology; 2004 Jun 9-13; Iguasu Falls, Brasil. Bologna: Medimond; 2004. p. 151-4.

Sažeci u zbornicima međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova

1. Đorđević G, Sinožić E, Matušan Ilijaš K, Jonjić N. Expression of VEGF-A, VEGF-C and Hif-1 α in renal cell carcinoma. 4th Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine with international participation; 2008 September 25-28; Osijek, Croatia
2. Štifter S, Valković T, Načinović-Duletić A, Marijić B, Seili-Bekafigo I, Lučin K, Matušan K, Jonjić N. Identifikacija aktivacije NF- κ B i utvrđivanje njegova značaja u progresiji multiplog mijeloma. 4. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa s međunarodnim sudjelovanjem; 16.-20. 5. 2007; Opatija, Hrvatska
3. Matušan Ilijaš K, Behrem S, Žarković K, Jonjić N, Lučin K. The expression of osteopontin in human astrocytomas: interstitial expression correlates with malignancy grade and angiogenesis. 21st European Congress of Pathology, Istanbul, Turkey, September 8-13, 2007. Virchows Arch. 2007;451(2):560-1.
4. Matušan Ilijaš K, Đorđević G, Mozetić V, Jonjić N. Vascular endothelial growth factor in relation to nuclear factor-kappa B in renal cell carcinoma. 21st European Congress of Pathology, Istanbul, Turkey, September 8-13, 2007. Virchows Arch. 2007;451(2):520.
5. Matušan Ilijaš K, Behrem S, Žarković K, Jonjić N, Lučin K. Increased osteopontin expression correlates with proliferation and survival in glioblastoma. 24th Saltykow Memorial Meeting; 2006 November 11; Zagreb, Croatia
6. Matušan K, Mustać E, Marijić B, Kolić I, Jonjić N. Predicting the probability of additional nodal metastases in breast cancer patients with positive sentinel node biopsy. 21st International Meeting of Adriatic Society of Pathology; 2006 June 24-25; Trieste, Italy.
7. Matušan K, Đorđević G, Mozetić V, Jonjić N, Lučin. Strong coexpression of osteopontin and vascular endothelial growth factor correlates with survival in clear cell renal-cell carcinoma.

- 20th European Congress of Pathology, Paris, France, September 3-8, 2005. Virchows Arch. 2005;447(2):508.
8. Matušan K, Đorđević G, Mozetič V, Lučin K. Expression of osteopontin and CD44 molecule in papillary renal cell tumors. In: Jonjić N, Kardum-Skelin I, editors. Proceedings of the 3rd Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine; 2005 May 8-11; Opatija, Croatia. Karlovac: MB tisak d.o.o.; 2005. p. 87.
 9. Đorđević G, Mozetič V, Vrdoljak-Mozetič D, Jonjić N, Licul V, Matušan K, Mustać E, Oguić R, Fučkar Ž. Correlation between vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in renal cell carcinoma. In: Jonjić N, Kardum-Skelin I, editors. Proceedings of the 3rd Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine; 2005 May 8-11; Opatija, Croatia. Karlovac: MB tisak d.o.o.; 2005. p. 88.
 10. Lučin K, Matušan K, Đorđević G and Stipić D. The expression of osteopontin in renal-cell carcinomas. In: Bleggi Torres LF, Soares FA, Vassallo J, editors. Proceedings of II Intercontinental Congress of Pathology; 2004 June 9-13; Iguassu Falls, Brazil. Curitiba: Revista Médica Paraná; 2004. p. 117.
 11. Lučin K, Matušan K, Đorđević G. The expression of CD44 molecule in renal cell carcinoma. 19th European Congress of Pathology, Ljubljana, Slovenia, September 6-11, 2003. Virchows Arch. 2003;443(3):443.
 12. Fučkar D, Valković T, Hasan M, Štifter S, Matušan K, Jonjić N. Expression of MCP-1 mRNA and macrophage infiltrates in invasive breast carcinoma. 19th European Congress of Pathology, Ljubljana, Slovenia, September 6-11, 2003. Virchows Arch. 2003;443(3):304.