



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



MILENA S. POTIĆ FLORANOVIĆ

**EKSPRESIJA HEMOKINSKE OSOVINE  
CXCL12/CXCR4/CXCR7, MARKERA  
HIPOKSIJE I ANGIOGENEZE U  
KARCINOMIMA BUBREŽNOG PARENHIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,  
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању  
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010, 93/2012,  
89/2013 и 99/2014)

**НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:**

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским  
сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у каквесврхе, осим за упознавање  
са њеним садржајем пре одбранедисертације.**

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



MILENA S. POTIĆ FLORANOVIĆ

**EXPRESSION OF THE CXCL12/CXCR4/CXCR7  
CHEMOKINE AXIS, MARKERS OF HYPOXIA  
AND ANGIOGENESIS IN RENAL CELL  
CARCINOMAS**

DOCTORAL DISERTATION

Niš 2021.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Ljubinka Janković Veličković, Redovni profesor za užu naučnu oblast Patologija, Katedra za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu
Naslov:	Ekspresija hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7, markera hipoksije i angiogeneze u karcinomima bubrežnog parenhima
Rezime:	<p>Karcinom bubrežnih ćelija (Renal cell carcinoma-RCC) je najčešći tumor bubrega. Iako predstavlja oko 5% svih onkoloških dijagnoza, spada u najletalnije urološke malignitete. Od postojećih tipova najzastupljeniji je svetloćelijski (clear cell) karcinom bubrega (ccRCC), dok je drugi po učestalosti papilarni karcinom (pRCC). U trenutku dijagnoze 23% pacijenata već ima metastatsku bolest a 25% će dobiti metastaze u prvih 5 godina nakon nefrektomije. Svi faktori koji dovode do razvoja, ili mogu uticati na prognozu ovih tumora nisu u potpunosti razjašnjeni. Poslednjih decenija proučavani su i predlagani različiti biohemijski markeri koji bi mogli objasniti i predivditi ponašanje RCC-a ali konsenzus nije postignut.</p> <p>U ovoj studiji imunohistohemijski je ispitivana ekspresija hemokina CXCL12 i njegovih receptora CXCR4 i CXCR7 na parafinskim uzorcima 98 karcinoma bubrežnih ćelija dobijenih nakon radikalne nefrektomije. Analizirana je ekspresija i Hipoksija inducibilnog faktora HIF1<math>\alpha</math>, transkripcionog faktora koji reguliše preživljavanje u uslovima hipoksije, i komponente konzervativnog Notch signalnog puta, receptora Notch1. Upotrebom histoskora, ispitivani su lokalizacija procenat i intenzitet ekspresije ovih biomarkera. Analiziran je njihov međusobni odnos kao i povezanost sa kliničko-patološkim parametrima i preživljavanjem pacijenata.</p> <p>Pozitivna membranska i citoplazmatska ekspresija CXCL12 i CXCR7 prisutna je u više od 90% uzoraka, dok je oko 60% uzoraka eksprimiralo CXCR4. Nađena je povezanost veličine tumora i većecitoplazmatske ekspresije CXCL12 i CXCR7. Preko 70% uzoraka ispoljilo je HIF1<math>\alpha</math> pozitivnost a veće vrednosti citoplazmatskog HIF1<math>\alpha</math> histoskora povezane su sa većim histološkim gradusom. Nađena je povezanost nekroze i citoplazmatskog CXCR7, HIF1<math>\alpha</math> i Notch1 histoskora.</p>

U poređenju sa ccRCC, u pRCC se mogu očekivati značajno veće vrednosti membranskog CXCL12, kao i citoplazmatskog CXCL12 CXCR4, CXCR7 i HIF1 $\alpha$  histoskora. Svetloćelijski tip ima 4 puta veću verovatnoću pozitivne membranske CXCR4 ekspresije i 20 puta veću verovatnoću da ispolji membransku Notch1 pozitivnost. Kod ccRCC-a se očekuju i veće vrednosti membranskog Notch1 histoskora.

Snažna pozitivna korelacija, nađena između citoplazmatskog HIF1 $\alpha$  histoskora i citoplazmatskog CXCL12 i CXCR7 histoskora, sugeriše njihovu koekspresiju i potencijalnu interakciju.

Kraće preživljavanje pacijenata se može predvideti većim kliničkim stadijumom, vrednošću CXCL12 citoplazmatskog histoskora iznad 73 i većim vrednostima membranskog CXCR7 histoskora. Proučavanje uloga ovih biomarkera može u budućnosti imati implikacije u dijagnostici, prognozi, prevenciji recidiva i razvoju ciljane terapije jednog od najletalnijih uroloških maligniteta.

Naučna oblast:

Medicinske nauke

Naučna  
disciplina:

Patologija

Ključne reči:

Karcinom bubrežnih ćelija, hipoksija inducibilni faktor 1 $\alpha$ , hemokinska osovina CXCL12/CXCR4/CXCR7, receptor Notch 1, imunohistohemija, preživljavanje

UDK:

616.61-006.6-076(043.3)

CERIF  
Klasifikacija:

B520 Opšta patologija, patološka anatomija

B200 Citologija, onkologija, kancerologija

Tip licence  
kreativne  
zajednice:

CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Professor Ljubinka Janković Veličković, MD, PhD  
Professor, scientific discipline Pathology,  
Department of Pathology, Faculty of medicine, University of Niš

Expression of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis, markers  
of hypoxia and angiogenesis in renal cell carcinomas

Abstract:

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common kidney cancer. Even though it represents 5% of all cancer diagnosis, it is considered one of the most lethal urologic malignancies. The most common subtype is clear cell RCC and the second in frequency is papillary RCC. At diagnosis 23% of patients already have metastatic disease and 25% will develop metastases within five years from nephrectomy. Up to date, all the factors that affect the development and prognosis of these tumors are still not fully clarified. Over the last decade, various biomarkers have been studied in order to elucidate the behavior of RCC but no consensus has been achieved.

In this study we immunohistochemically examined the expression of chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 on 98 paraffin embedded RCC samples obtained after radical nephrectomy. We have also studied the expression of Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , which regulates cell survival in hypoxic conditions, and Notch1 receptor, which is the component of the conservative Notch signaling pathway. The localization, percentage and the intensity of the expression of these biomarkers were studied with the application of histoscore. We analyzed their co-expression and their association with clinical and pathological parameters and survival of the patients.

Positive membranous and cytoplasmatic CXCL12 and CXCR7 expression was present in over 90% of the samples, while about 60% expressed positive CXCR4 staining. We found association between tumor size and higher cytoplasmatic CXCL12 and CXCR7 expression. Over 70% of the samples were HIF1 $\alpha$  positive, and higher values of cytoplasmatic HIF1 $\alpha$  histoscore were associated with higher tumor grade. We also found the association between necrosis and cytoplasmatic CXCR7, HIF1 $\alpha$  and Notch1 histoscore.

Compared to ccRCC in pRCC significantly higher values of membranous CXCL12 as well as cytoplasmatic CXCL12, CXCR4, CXCR7 and HIF1 $\alpha$  histoscore can be expected. CCRCC has 4 times higher probability of positive membranous CXCR4 expression and 20

times higher probability of positive membranous Notch1 expression. Higher membranous Notch1 histoscore is expected in cccRCC as well.

Strong positive correlation was found between cytoplasmatic HIF1 $\alpha$  histoscore and cytoplasmatic CXCL12 and CXCR7 histoscores, suggesting their co expression and potential interaction.

Shorter survival can be predicted by higher clinical stage, the value of CXCL12 cytoplasmatic histoscore above 73 and by higher values of membranous CXCR7 histoscore.

Examining the roles of these biomarkers in RCC could in the future bring useful implications in diagnosis, prognosis, prevention of the recidives and the development of target therapy in the most lethal urologic malignancy.

Scientific Field:	Medical sciences
Scientific Discipline:	Pathology
Key words:	Renal cell carcinoma, CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis, Hipoxia inducible factor 1 $\alpha$ , Notch1 receptor, Immunohistochemistry, survival
UDC:	616.61-006.6-076(043.3)
CERIF Classification:	B520 General pathology, pathological anatomy B 200 Citology, oncology, cancerology
Creative Commons Licence Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>

# Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br.175092, čiji je rukovodilac Prof. dr Ljubinka Janković Veličković.*

*Mentoru, Prof. dr Ljubinki Janković Veličković, dugujem veliku zahvalnost za ukazano poverenje i pruženu priliku da se razvijam na profesionalnom planu. Hvala joj na strpljenju, podršci i neizmernoj pomoći tokom svih faza izrade ove disertacije, kao i na svemu što sam od nje naučila od početka naše saradnje.*

*Srdačno se zahvaljujem Prof. dr Sanji Radojević Škodrić na izdvojenom vremenu i profesionalnoj pomoći.*

*Zahvaljujem se Šefu Katedre za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu, Prof. dr Maji Jovičić Milentijević na dostupnosti, saradnji i pruženoj podršci.*

*Zahvaljujem se na ukazanom poverenju, Prof. dr Miljanu Krstiću, koji mi je omogućio rad u Centru za patologiju i patološku anatomiju, Kliničkog centra Niš.*

*Zahvaljujem se kolegama iz Centra za patologiju i patološku anatomiju KC Niš, na pruženoj podršci, savetima i svim vrstama pomoći, kako u izradi ove disertacije, tako i u profesionalnom radu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem kolegama iz Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu, Medicinskog fakulteta u Nišu, na čelu sa Prof. dr Stevom Najmanom, na profesionalnoj pomoći i dugogodišnjoj saradnji i prijateljstvu.*

*Iskrenu zahvalnost dugujem pokojnom Prof. dr Vojinu Saviću, koji me je uveo u svet patologije i nauke i od koga sam imala čast i privilegiju da učim.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, čiji su ljubav, strpljenje i nesebična podrška bili izvor energije tokom svih godina rada i usavršavanja.*

*Ovu tezu posvećujem deci Iliji i Pavlu, kao i uspomeni na moju majku Oliveru čiji su život i karijera bili inspiracija i pokretačka snaga tokom celog mog školovanja.*

*Milena Potić Floranović Niš, 2021.*

# Sadržaj

<b>1. <u>Uvod</u></b>	<b>12</b>
<b>2. <u>Pregled literature</u></b>	<b>15</b>
2.1. <u>Klasifikacija tumora bubrega</u>	15
2.2. <u>Epidemiologija karcinoma bubrežnih ćelija</u>	15
2.3. <u>Etiologija i patogeneza</u>	17
2.3.1 <u>Hereditarni tumori bubrega</u>	20
2.3.1.1. <u>Uloga VHL tumor supresornog gena u patogenezi RCC-a</u>	20
2.4. <u>Karakteristike karcinoma bubrežnih ćelija</u>	22
2.4.1. <u>Klinička slika i dijagnoza</u>	22
2.5. <u>Patohistološke karakteristike podtipova karcinoma bubrežnih ćelija</u>	23
2.5.1. <u>Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija</u>	23
2.5.2. <u>Papilarni karcinom bubrežnih ćelija</u>	26
2.5.3. <u>Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija</u>	28
2.5.4. <u>Svetloćelijski papilarni karcinom bubrežnih ćelija</u>	29
2.5.5. <u>TNM sistem klasifikacije RCC-a</u>	29
2.5.6. <u>Terapija RCC-a</u>	31
2.6. <u>CXCL12/CXCR4/CXCR7 Hemokinska osovina</u>	31
2.6.1. <u>Građa i funkcija hemokina</u>	31
2.6.2. <u>Hemokin CXCL12 i njegovi receptori</u>	33
2.6.3. <u>Uloga CXCL12/CXCR4/CXCR7 hemokinske osovine u patogenezi tumora</u>	36
2.7. <u>Hipoksija inducibilni faktori</u>	39
2.7.1. <u>Uloga HIF-a u patogenezi RCC-a</u>	40
2.8. <u>NOTCH signalni put</u>	41
<b>3. <u>Hipoteza icilijistraživanja</u></b>	<b>44</b>
<b>4. <u>Materjali i metode</u></b>	<b>46</b>
4.1. <u>Pacijenti i biološki materijal</u>	46
4.2. <u>Histopatološka analiza</u>	47
4.3. <u>Imunohistohemijska analiza</u>	47
4.3.1. <u>Imunohistohemijsko bojenje</u>	47

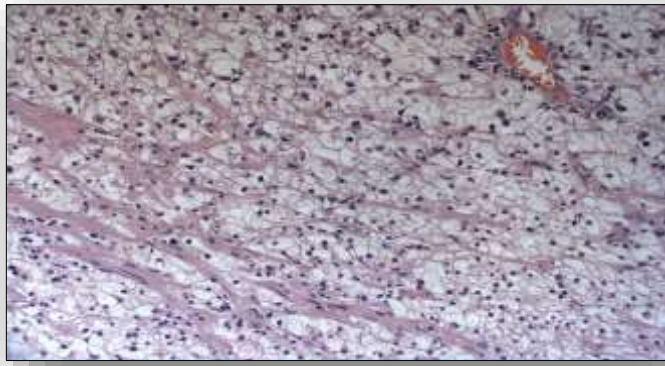


4.3.2. <u>Interpretacija imunohistohemijskog bojenja</u>	48
4.4. <u>Statistička analiza</u>	49
<b>5. <u>Rezultati</u></b>	<b>51</b>
5.1. <u>Kliničko-patološke karakteristike pacijenata</u>	51
5.2. <u>Analiza pozitivne ekspresije biomarkera</u>	52
5.3. <u>Analiza histoskora</u>	64
5.4. <u>Povezanost Histoskora sa kliničko-patološkim parametrima</u>	66
5.5. <u>Povezanost ekspresije biomarkera sa mortalitetom</u>	68
<b>6. <u>Diskusija</u></b>	<b>75</b>
<b>7. <u>Zaključak</u></b>	<b>93</b>
<b>8. <u>Literatura</u></b>	<b>96</b>
<b>9. <u>Biografija autora</u></b>	<b>113</b>

## Lista skraćenica

AJCC	Američki udruženi komitet za rak (engl. American Joint Committee on Cancer)
AE1/AE3	Citokeratinski koktel (pancitokeratin)
CAMP	Ciklični adenzin monofosfat
CK	Citokeratin
CXCL12/ SDF-1	Hemokinski ligand 12 (Faktor izveden iz stromalnih ćelija, engl. stromal cell-derived factor-1)
CXCR4	Hemokinski receptor 4
CXCR7/ACKR3	Hemokinski receptor 7 (Atipični hemokinski receptor 3)
CTLA4	Citotoksični T-limfocitno asocirani protein 4
DLL	Ligand za Notch receptor (engl. Delta like ligand)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EMA	Epitelni membranski marker
GAG	Glikozaminoglikan
GTP	Guanozin trifosfat
GRK	G proteinska receptor kinaza
H&E	Hematoksilin–eozin, standardno histopatološko bojenje
HIF1 $\alpha$	Hipoksija inducibilni faktor alfa (engl. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )
HSC	Hematopoetska stem ćelija
LDH	Laktat dehidrogenaza
MAPK	Mitogenom aktivirana protein kinaza
mTOR	Serin/treonin protein kinaza (engl. Mechanistic target of rapamycin)
NICD	Notch intraćelijski domen (engl. Notch intracellular domain NICD)
NF-kB	Nuklearni faktor kapa B (engl. Nuclear Factor - Kappa-B)

NTM	Notch transmembranska subjedinica (engl. Notch transmembrane subunit)
OS	Ukupno preživljavanje (engl. overall survival)
PFS	Preživljavanje bez progresije bolesti (engl. Progression free survival)
PBS	Fosfatni pufer (engl. Phosphate buffer solution)
PI3K	Fosfatidil-inozitol-3 kinaza
PD-1	Protein programirane smrti (engl. Programmed cell death protein 1)
PDGF	Trombocitni faktor rasta (Platelet derived growth factor)
PLC	Fosfolipaza C
RCC	Karcinom bubrežnih ćelija (Renal cell carcinoma)
ccRCC	Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija (Clear cell Renal cell carcinoma)
pRCC	Papilarni karcinom bubrežnih ćelija (Papillary Renal cell carcinoma)
iRNK	Informaciona ribonukleinska kiselina
TNM	Tumor nodus metastaza sistem klasifikacije
TGF- $\beta$	Transformišući faktor rasta beta
VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. vascular endothelial growth factor)
VHL	Von Hippel–Lindau tumor supresorni gen
WHO	Svetska Zdravstvena Organizacija (engl. World Health Organization)



## **1. UVOD**

Karcinom bubrežnih ćelija (Renal cell carcinoma-RCC) je najčešći tumor bubrega. Iako predstavlja oko 5% svih onkoloških dijagnoza, spada u najletalnije urološke malignitete. To je bolest starijih odraslih sa najvećom incidencom oko 60. godine, skoro 2 puta češća kod muškaraca. Na osnovu genetskih, anatomskih i patohistoloških karakteristika postoje različiti tipovi RCC-a, koji mogu biti hereditarni i sporadični. Najzastupljeniji je svetloćelijski (clear cell) karcinom bubrega (ccRCC) na koji otpada oko 70% svih tumora, dok je drugi po učestalosti papilarni karcinom (pRCC) sa incidencom od oko 18%. Uprkos primeni savremenih dijagnostičkih metoda, u trenutku dijagnoze 23% pacijenata već ima metastatsku bolest a 25% će dobiti metastaze u prvih 5 godina nakon nefrektomije. Usled postojanja brojnih genetskih abnormalnosti, u karcinomima bubrežnog parenhima postoji kompleksna heterogenost, zbog koje čak i pacijenti sa sličnim kliničkim i patohistološkim karakteristikama mogu imati različiti tok i ishod bolesti. Svi faktori koji dovode do razvoja, ili mogu uticati na prognozu ovih tumora nisu u potpunosti razjašnjeni. Poslednjih decenija proučavani su i predlagani različiti biohemijski markeri koji bi mogli objasniti i predvideti ponašanje RCC-a. Budući da konsenzus nije postignut, i dalje se traga za univerzalnim prognostičkim markerima.

HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) je heterodimerni transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju gena za preživljavanje u uslovima hipoksije. Sastavljen je iz  $\alpha$  subjedinice, koja je senzor hipoksije (podtipovi HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$ ), i  $\beta$  subjedinice. Aktivira preko 100 gena, među kojima su i gen za trombocitni faktor rasta (PDGF), gen za vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), kao i geni za enzime koji omogućavaju sintezu ATP nezavisnu od kiseonika. Brojne studije dokazale su povezanost HIF 1 $\alpha$  sa agresivnim ponašanjem različitih tumora. Jedna od najvažnijih genetskih karakteristika tumora bubrežnog parenhima je gubitak funkcije VHL (Von Hippel–Lindau) tumor supresornog gena. VHL, zajedno sa hipoksijom reguliše aktivaciju HIF1 $\alpha$ .

Literaturni podaci su često kontradiktorni, kada je u pitanju uloga HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$  u karcinogenezi tumora bubrega. Pojedine studije sugeriraju da HIF1 $\alpha$  ima ulogu tumor supresora u ccRCC, povezujući njegovu visoku ekspresiju sa dužim preživljavanjem pacijenata, dok druge ukazuju na lošu prognozu kod pacijenata sa visokom ekspresijom HIF1 $\alpha$  i niskom ekspresijom HIF2 $\alpha$ .

CXCL12 ili faktor izveden iz stromalnih ćelija (stromal cell-derived factor-1 SDF-1) je hemokin koga sekretuju brojne stromalne ćelije: fibroblasti, makrofagi i endotelne ćelije. Vezuje se za dva receptora: CXC receptor 4 (CXCR4, CD184) i CXCR7 ili atipični hemokinski receptor 3 (ACKR3). Aktivacija CXCR4 pokreće brojne G-protein zavisne signalne puteve koji kontrolišu različite ćelijske funkcije: progresiju ćelijskog ciklusa, reorganizaciju citoskeleta, migraciju ili ćelijsku adheziju. CXCL12/CXCR4 osovina je važna za hematopoezu u kostnoj srži, za hemotaksu i migraciju T i B limfocita kao i za embriogenezu nervnog, genitalnog i kardiovaskularnog sistema. Pored fizioloških uloga CXCL12/CXCR4 signalizacija učestvuje u procesima inflamacije, imunološkog nadzora i u patogenezi brojnih tumora. Oštećenja tkiva hipoksijom, toksinima ili iradijacijom povećavaju sekreciju CXCL12 u stromi i dovode do hemotakse CXCR4 pozitivnih ćelija na mesto oštećenja. CXCR7 je nedavno otkriven alternativni (orphan-siroče) receptor za CXCL12. Eksprimira se na aktiviranom endotelu, na površini različitih tumorskih ćelija i u tumorskim krvnim sudovima, ali ne na zdravim ćelijama. Pretpostavlja se da receptori CXCR4 i CXCR7 komuniciraju međusobno, modifikujući funkciju jedan drugom. CXCR4 gen se može aktivirati hipoksijom i poseduje domen za vezivanje HIF-1 $\alpha$ . Hemokin CXCL12 i njegovi receptori, zbog svojih brojnih fizioloških ali i patoloških uloga, proučavani su različitim malignitetima. CcRCC sa VHL mutacijom, pokazuje produženu aktivnost HIF-1 $\alpha$ , i povećanu ekspresiju gena aktiviranih hipoksijom. Među njima su i CXCR4 i njegov ligand CXCL12. Mnogi aspekti o ulozi CXCL12 i njegovih receptora u patogenezi tumora, još uvek nisu poznati i zahtevaju dalja istraživanja. Ispitivanja ekspresije hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7 u tumorima bubrega nisu postigla konsenzus ni po pitanju lokalizacije ekspresije (membranska, jedarna ili citoplazmatska), ni po pitanju njihovog prognostičkog značaja. Većina studija je pokazala povezanost ekspresije CXCR4 sa većim gradusom tumora, češćim metastazama i kraćim preživljavanjem pacijenata.

Notch signalni put je uključen u brojne ćelijske funkcije poput proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Sastoji se iz 3 dela: liganda, Notch receptora i DNK vezujuće sekvence

CSL. Kod sisara postoje 4 izoforme Notch receptora (Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4) i 5 liganda (Dll-1, Dll-3, Dll-4, Jagged-1, Jagged-2). Poremećaji Notch signalizacije uključeni su u nastanak i razvoj tumora, ali komponente ovog puta mogu funkcionisati i kao onkogeni i kao tumor supresorni geni, zavisno od vrste ćelija koje maligno alterišu. Postoji povezanost ovog signalnog puta sa hipoksija indukovanom signalizacijom. Notch signalni put smanjuje transkripciju VEGF receptora i time kontroliše stvaranje novih krvnih sudova. Publikovani podaci ukazuju na pozitivnu asocijaciju između ekspresije Notch 1 i razvoja i progresije ccRCC. Visoka ekspresija Notch-1 povezana je i sa lošom prognozom.

Još uvek nisu otkrivene sve uloge koje molekuli hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7 i njima pridruženi transkripcioni faktor HIF1 $\alpha$  i receptor Notch1 imaju u nastanku, evoluciji i kliničkom ishodu RCC-a. Cilj ovog istraživanja je pokušaj širenja saznanja o značaju ekspresije, svojstvima i međusobnom odnosu ovih molekula u karcinomu bubrežnog epitela.

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2.1. KLASIFIKACIJA TUMORA BUBREGA**

Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organisation, WHO) je 2016. godine izdala poslednju klasifikaciju tumora bubrega, zasnovanu na patohistološkim, anatomskim i genetskim karakteristikama[1]. Bubrežni tumori mogu biti benigni, maligni ili metastatski, adultni i pedijatrijski, hereditarni i sporadični a prema poreklu mogu biti tumori bubrežnih ćelija, mezenhimni, metanefrički, neuroendokrini, nefroblastički, hematopoetski, mešoviti i drugi (tabela 1.)

### **2.2. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA BUBREŽNIH ĆELIJA**

Karcinom bubrežnih ćelija (renal cell carcinoma-RCC) je najučestaliji tumor bubrega. Uprkos sve češćoj ranoj detekciji i razvoju novih terapijskih modaliteta u poslednjih dvadeset godina, karcinomi bubrežnih ćelija i dalje predstavljaju najletalnije urološke malignitete. U svetu ovi tumori predstavljaju između 3% i 5% svih onkoloških dijagnoza. Po učestalosti dijagnostikovanja, nalaze se na šestom mestu kod muškaraca i na desetom mestu kod žena. To je pretežno bolest starijih odraslih, gde incidenca raste nakon 40. godine i dostiže pik između 60 i 70. godine starosti[2-4].

Incidenca oboljevanja od RCC-a značajno varira među zemljama širom sveta. Najveću incidencu na svetu (12 na 100 000) ima Severna Amerika. U Sjedinjenim Američkim Državama 2018. godine procenjeno je 65 340 novih slučajeva, od toga 42 680 muškaraca, što predstavlja 5% svih dijagnostifikovanih tumora, i 22 680 žena što predstavlja 3% svih dijagnoza. U istoj godini procenjeno je 14 970 smrtnih slučajeva usled tumora bubrega, što ove tumore stavlja na deseto mesto onkoloških uzročnika smrti u SAD-u [2]. U Evropi je 2018. procenjeno 136 500 novih slučajeva, što predstavlja 3,5% svih kancerskih dijagnoza. Najveća incidenca je u Češkoj sa preko 3300 novih slučajeva u 2018. (oko 10/100 000), dok nešto manju incidencu imaju ostale zemlje zapadne Evrope. Mogući razlozi porasta incidence u razvijenim zemljama su: duži životni vek, porast faktora rizika, kao i razvoj i rutinska primena novih dijagnostičkih i imidžing metoda kojima se često incidentalno detektuju tumorske promene na bubrezima.

Tabela 1. WHO Klasifikacija tumora bubrega (preuzeto iz reference 1.)

<p><b>I Tumori bubrežnih ćelija</b></p> <p>Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija, Multilokularna neoplazma niskog malignog potencijala, Papilarni karcinom bubrežnih ćelija, Renalni karcinom asociran sa hereditarnom lejomiomatozom, Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija, Karcinom Belinijevih sabirnih kanalića, Medularni renalni karcinom, Karcinom bubrežnih ćelija sa MIT familijarnom translokacijom, Sukcinat dehidrogenaza-deficijentni renalni karcinom, Tubulocistični karcinom bubrežnih ćelija, Renalni karcinom udružen sa stečenom cističnom bolešću, Mucinozni karcinom tubularnih i vretenastih ćelija, Svetloćelijski papilarni karcinom bubrežnih ćelija, Neklasifikovani karcinom bubrežnih ćelija,</p> <p><b>Benigni tumori bubrežnih ćelija</b></p> <p>Papilarni adenom Onkocitom</p> <p><b>II Metanefrički tumori</b></p> <p>Metanefrički adenom Metanefrički adenofibrom Metanefrički stromalni tumor</p> <p><b>III Nefroblastični tumori kod dece</b></p> <p>Nefrogeni ostaci Nefroblastom Cistični delimično diferentovani nefroblastom</p> <p><b>IV Mezenhimalni tumori</b></p> <p><b>Tumori koji se uglavnom javljaju kod dece</b></p> <p>Svetloćelijski sarkom Rabdoidni tumor Kongenitalni mezoblastični nefrom Osificirajući bubrežni tumor novorođencadi</p>	<p><b>Tumori koji se uglavnom javljaju kod odraslih</b></p> <p>Lejomiosarkom (invadira u bubrežnu venu) Angiosarkom Rabdomiosarkom Maligni fibrozni histiocitom Hemangiopericitom Osteosarkom Angiomolipom Lejomiom Hemangiom Limfangiom Jukstaglomerularni ćelijski tumor Renomedularni intersticijalni ćelijski tumor Švanom Solitarni fibrozni tumor</p> <p><b>V Mešoviti epitelni stromalni tumori</b></p> <p>Cistični nefrom Mešoviti epitelni i stromalni tumori</p> <p><b>VI Neuroendokrini tumori</b></p> <p>Dobro diferentovani neuroendokrini tumor Krupnoćelijski neuroendokrini tumor Sitnoćelijski neuroendokrini tumor Feohromocitom</p> <p><b>VII Hematopoezni i limfoidni tumori</b></p> <p>Limfom Leukemija Plazmocitom</p> <p><b>VIII Tumori germinativnih ćelija</b></p> <p>Teratom Horiokarcinom</p> <p><b>IX Metastatski tumori</b></p>
---	--



Zahvaljujući ranoj i često slučajnoj detekciji, 65% pacijenata ima lokalizovanu bolest u trenutku postavljanja dijagnoze [3]. Unutar Evrope postoje značajne razlike u smrtnosti od ovih tumora. Mortalitet je u opadanju u Skandinavskim zemljama, Francuskoj, Nemačkoj i Austriji, dok je u porastu u Slovačkoj, Letoniji, Estoniji, Grčkoj, Hrvatskoj i drugim zemljama Balkana[4]. Prema podacima kojima raspolaže Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u našoj zemlji je takođe prisutan trend porasta broja obolelih od karcinoma bubrega [5].

### **2.3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA**

Razvoj citogenetike i molekularne biologije omogućio je detekciju brojnih genetskih i hromozomskih anomalija u karcinomima bubrežnih ćelija, tako da se oni mogu podeliti na hereditarne, sa pozitivnom porodičnom anamnezom, i sporadične koji se javljaju de novo, ali kod kojih se takođe mogu sresti identične genske mutacije. Faktori rizika povezani sa sporadičnim slučajevima su: pušenje, gojaznost i ishrana, hipertenzija, izloženost hemijskim karcinogenima i postojanje komorbiditeta.

**1. Pušenje:** Brojne epidemiološke studije dokazale su povezanost pušenja sa razvojem karcinoma bubrežnih ćelija. Takođe je dokazana i dozna zavisnost koja proporcionalno raste sa brojem paklica godišnje. Zanimljiva je jača asocijacija u određenim podtipovim RCC kao što su svetloćelijski i papilarnim karcinom i odsustvo povezanosti pušenja i hromofobnog karcinoma bubrežnih ćelija[6]. Neki od mogućih mehanizama kojima duvan utiče na kancerogenezu su oksidativni stres i stimulacija angiogeneze. Studije na animalnim modelima su pokazale da duvan najviše oštećuje renalne proksimalne tubule, za koje se smatra da su mesto nastanka svetloćelijskog RCC-a [7]. Oksidativni stres takođe dovodi do oštećenja endotela i vaskularne mreže, dok nikotin stimuliše umnožavanje endotelnih ćelija i angiogenezu posredovanu vaskularnim endotelnim faktorom rasta (VEGF), koji je često povišen u svetloćelijskom karcinomu bubrežnih ćelija[8]. Osim uloge u nastanku, pušenje doprinosi progresiji i napredovanju karcinoma bubrega [9].

**2. Gojaznost i ishrana:** Epidemiološke studije sprovedene na različitim populacijama dokazale su povezanost između indeksa telesne mase (Body mass Index BMI) i rizika za nastanak RCC [10-12]. Procenjeno je da porast od 5 kg telesne mase povećava rizik za nastanak RCC za 25% kod muškaraca i 35% kod žena [11]. Jedan od načina na koji gojaznost povećava

rizik za nastanak karcinoma, je podizanje nivoa insulina i insulinu sličnih faktora rasta (IGF). Kod gojaznih osoba takođe postoje veće koncentracije estrogena, koje podstiču karcinogeni efekat IGF [12]. Velika evropska studija pokazala je postojanje veze između razvoja RCC i unosa hlebai testenina, što se dovodi u vezu sa visokim glikemijskim indeksom ovih namirnica. Studija je takođe pokazala da protektivni efekat ima i sveže i kuvano povrće, dok asocijacija između unosa različitog voća i RCC-a nije nađena. Rezultati studija koje povezuju ishranu bogatu mesom sa rizikom od nastanka RCC-a, su kontraverzni. Neke studije povezuju ishranu bogatu crvenim mesom sa RCC-om, dok druge nalaze vezu samo sa mesnim prerađevinama i živinom [13]. Nedavno je potvrđeno da umereno konzumiranje alkohola, pre svega piva i vina ima izvestan protektivni efekat na razvoj RCC [2].

**3. Hipertenzija:** Kohortne studije koje su uključile veliki broj pacijenata, dokazale su da je hipertenzija nezavistan faktor rizika za nastanak RCC, i da je povezana sa većom smrtnošću od ovih tumora [14 -16]. Procenjeno je da porast krvnog pritiska od 10mmHg povećava rizik od RCC-a između 10-22% [14]. Mehanizmi kojima hipertenzija učestvuje u kancerogenezi, još uvek nisu potpuno razjašnjeni. Kod hipertenzivnih osoba dolazi do hronične renalne hipoksije, koja indukuje transkripciju hipoksija inducibilnih faktora (HIF) i posledičnu neoangiogenezu i ćelijsku proliferaciju [2]. Pretpostavlja se da hipertenzija i gojaznost imaju u izvesnoj meri zajedničke patogenetske mehanizme. Gojaznost je asociirana sa povećanom glomerularnom filtracijom i povećanim protokom plazme, što čini bubrege podložnijim oštećenju i kancerogenezi. Gojaznost i hipertenzijasu takođe povezani sa oksidativnim stresom i lipidnom peroksidacijom sa formiranjem reaktivnih metabolita kiseonika, koji učestvuju u kancerogenezi [15, 16]. Jedna studija je pokazala da pacijenti oba pola, sa nekontrolisanom hipertenzijom imaju značajno veći rizik od nastanka RCC u odnosu na one koji primaju antihipertenzivnu terapiju [17].

**4. Hemijski karcinogeni:** Budući da filtriraju plazmu, izloženost ćelija bubrega karcinogenima je velika u odnosu na druga tkiva. Ljudi mogu biti izloženi profesionalno u industriji kože, gume, boja, dok se neka jedinjenja mogu naći u hrani vodi ili lekovima, pre svega nesteroidnim, antiinflamatornim medikamentima ne računajući acetilsalicilnu kiselinu. Hemijske supstance mogu se podeliti na dokazane krcinogene bubrega, verovatne karcinogene i moguće karcinogene koji izazivaju tumore kod eksperimentalnih životinja (*tabela 2.*) [18]. Među najviše proučavanim karcinogenima su ohratoksin, kalijum bromat, aristolohična kiselina i trihloretilen. Ohratoksin je metabolit gljiva *Aspergillus* i *Penicillium genera*, koji kontaminira različite

prehrambene namirnice, vino i pivo. Pored nefrotoksičnog efekta, na pacovima dokazano izaziva rast tumora. Aristoholična kiselina je alkaloidno jedinjenje prisutno u biljci *Aristolochia*, koja se često upotrebljava u kineskoj tradicionalnoj medicini. Ova supstanca se smatra jednim od najjačih humanih karcinogena [19]. Pacijenti profesionalno izloženi trihloretilenu, koji je ranije masovno upotrebljavan kao industrijski rastvarač, su dobijali RCC u ranijem životnom dobu u poređenju sa neekspoziranim pacijentima i kod njih su bile brojnije mutacije VHL gena, što ukazuje na genotoksičan efekat ove supstance [20].

*Tabela 2. Hemijska jedinjenja povezana sa karcinomom bubrega (modifikovano iz reference 18)*

<b>Hemijsko jedinjenje</b>	<b>Mogući izvor izloženosti</b>	<b>karcinogenost</b>
Fenacetin	Nesteroidni antiinflamatorni lekovi	Verovatni karcinogen
2-Nitrofluoren	Proizvod sagorevanja	Mogući karcinogen
Ohratoksin-A	Metabolit gljiva	Mogući karcinogen
Arsen	Voda za piće, industrijska proizvodnja	Verovatni karcinogen
Benzpiren	Izduvni gasovi motora	Verovatni karcinogen
Bromdihlormetan	Hlorinacija vode za piće	Mogući karcinogen
Kadmijum	Cigarete, industrijsko zagađenje	Verovatni karcinogen
Hlorotalonil	fungicid	Verovatni karcinogen
Kalijum bromat (E924)	Oksidativno sredstvo, dodaje se brašnu za bolji rast testa	Mogući kancerogen
Aristolohična kiselina	Alkaloid	Dokazani karcinogen
Tetrahlortilen	Sredstvo za hemijsko čišćenje	Mogući karcinogen
Trihloretilen	Industrijski rastvarač	Verovatni karcinogen
N-Nitrosomorpholin	Proizvodnja gume	Mogući karcinogen

**5. Komorbiditeti:** Postoji povezanost između bubrežnih kalkulusa i razvoja RCC-a. Ostale bolesti koje se dovode u vezu sa nastankom RCC-a su dijabetes tip 2, stečena policistična bolest bubrega, terminalna bubrežna insuficijencija i virusni hepatitis C [2].

### 2.3.1 Hereditarni tumori bubrega

Hereditarni tumori bubrega obuhvataju oko 4% svih bubrežnih tumora. Kod pacijenata sa hereditarnim sindromima tumori se javljaju u mlađem uzrastu, češće su multifokalni, bilateralni i heterogeni. Postojiveći broj gena čije su mutacije povezane sa rizikom za razvoj nekog tipa RCC [21]. Otkriveno je da geni identifikovani ispitivanjem porodica sa renalnim karcinomima istovremeno učestvuju i u patogenezi sporadičnih slučajeva. To je u velikoj meri unapredilo razumevanje molekularne osnove ovih tumora.

Najčešći i najbolje proučen autozomno dominantni sindrom sa predispozicijom za razvoj različitih tumoraje **Von Hippel Lindau**. Javlja se sa incidencom 1 u 35000 ljudi. Kod pacijenata se mogu razviti hemangioblastomi u mozgu, kičmenoj moždini ili retini, neuroendokrini tumori, feohromocitom, tumor endoplazmatske kese unutrašnjeg uha, brojne ciste pankreasa i bubrega i svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija. Za ovaj sindrom odgovorne su mutacije *VHL* gena lociranog na 3p25-26 [22]. Fenotipske varijacije unutar ovog sindroma uzrokovane su različitim mutacijama koje mogu biti point-missense ili delecije, usled kojih najčešće nastaje inaktivni protein.

#### Uloga *VHL* tumor supresornog gena u patogenezi RCC-a

*VHL* je tumor supresorni gen i njegov gubitak je jedan od inicijalnih događaja u tumorigenezi ne samo naslednih već i sporadičnih svetloćelijskih tumora bubrega. U odnosu na status gena *VHL*, možemo razlikovati tri grupe RCC-a: tumore sa neizmenjenim genom *wtVHL* i funkcionalnim proteinom p*VHL*, tumore sa monoalelskom inaktivacijom gena *VHL* i redukovanom dozom funkcionalnog proteina i tumore sa bialelskom inaktivacijom *VHL* i potpunim odsustvom funkcionalnog p*VHL* [23]. Protein p*VHL* ulazi u sastav E3 ubikvitin ligaznog kompleksa, koji se u uslovima normoksije, vezuje za  $\alpha$  subjedinicu Hipoksija inducibilnog faktora 1 (HIF1 $\alpha$ ), dovodeći do njegove ubikvitinacije i degradacije. HIF1 $\alpha$  je transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju gena za preživljavanje u uslovima hipoksije, među kojima su gen za Trombocitni faktor rasta (PDGF), gen za Vaskularni endoteleni faktor rasta (VEGF), koji učestvuje u angiogenezi i enzimi koji omogućavaju sintezu ATP nezavisnu od kiseonika. Inaktivacija p*VHL* usled mutacije, dovodi do povećane sinteze i akumulacije HIF molekula i posledične angiogeneze, proliferaciji promena metabolizma ćelija, čime je omogućen rast tumora (videti poglavlje 2.7. sliku 9.) [24]. Vezivanjem za fibronektin i kolagen IV p*VHL*

utiče na organizaciju ekstracelularnog matriksa. Zbog toga su u VHL<sup>-/-</sup> tumorima usled narušene arhitekture ekstracelularnog matriksa, olakšane neoangiogeneza i migracija kancerskih ćelija. pVHL ima sposobnost vezivanja za mikrotubule citoskeleta, čime posredno osredno utiče na održavanje oblika i polariteta ćelije i formiranje cilija i mitotskog vretena. Gubitak ovog gena uzrokuju hromozomsku nestabilnost, a doprinosi i gubitku cilija na bubrežnim ćelijama, što jedna od prvih morfoloških promena koja prethodi formiranju renalnih cista koje predstavljaju prekancerozno stanje. Protein ovog gena uključen je i u ćelijski odgovor na DNK oštećenja i aktivnosti regulatora apoptoze [22].

**Hereditarni papilarni karcinom tip 1** je redak autozomno dominantni sindrom koji se karakteriše pojavom multiplih bilateralnih papilarnih karcinoma tip 1. Uzrokovan je mutacijama *MET* gena na 7q31. MET kodira receptor tirozin kinaze, a njegov ligand je faktor rasta hepatocita (HGFR). Mutacije uzrokuju konstitutivnu aktivaciju nezavisnu od liganda [25].

**Hereditarna lejomiomatoza sa papilarnim karcinomom tip 2** se karakteriše razvojem kutanih i uterinih lejomiona i renalnog papilarnog karcinoma tip 2 kod mlađih pacijenata. U ovom sindromu mutiran je gen za fumarat hidratazu *FH*, lociranom na 1q42.3-q43, koji kodira enzime uključene u Krebsov ciklus. Pacijenti sa bialelnom mutacijom razvijaju fumarat hidrataznu deficijenciju koja se karakteriše fumarat acidurijom, hipotonijom, encefalopatijom i smrtnim ishodom u prvim mesecima života. Jednostrana mutacija dovodi do razvoja benignih lejomiona uterusa, oko 10 godina ranije u odnosu na sporadične slučajeve i papilarnog renalnog karcinoma tip 2 većeg histološkog gradusa i agresivnijeg toka [26].

**Birt-Hogg-Dubé sindrom** se nasleđuje autozomno dominantno i uzrokovan je mutacijama BHD gena na 17p11.2. Dovodi do razvoja displastičnih folikula dlake-fibrofolikuloma, cisti u plućima sa razvojem spontanog pneumotoraksa i različitih renalnih tumora: onkocitoma, svetloćelijskog, hromofobnog ili papilarnog karcinoma koji se mogu sresti unutar jednog bubrega, pri čemu je za ovoj sindrom karakteristična pojava hibridnog onkocitičnog tumora (mešanog onkocitoma i hromofobnog karcinoma) [27].

Ostali sindromi sa povećanim rizikom od razvoja renalnih karcinoma su: **familijarni renalni kanceri asocirani sa BAP1 mutacijom, Tuberozna skleroza, PTEN hamartoma tumor sindrom, SDH- asocirani paragangliom/feohromocitom i balansirane translokacije na hromozomu 3** [21].

## **2.4. KARAKTERISTIKE KARCINOMA BUBREŽNIH ĆELIJA**

Karcinomi bubrežnog prenhima vode poreklo iz ćelija nefrona. Smatra se da svetloćelijski i papilarni RCC potiču iz epitela proksimalnih tubula, dok hromofobni, onkocitomi i Belinijev tumor vode poreklo iz distalnih delova nefrona, verovatno iz epitela sabirnih kanalića [28].

Budući da se u podtipovima RCC nalaze različite genetske abnormalnosti, oni imaju i različite fenotipske karakteristike: makroskopski i mikroskopski izgled, imunohistohemijski profil, biološko ponašanje, prognozu i terapijske mogućnosti.

### **2.4.1. Klinička slika i dijagnoza**

Najčešći trijas simptoma je bezbolna hematurija, povišena temperatura, i tup bol u slabinama. Bitno kliničko svojstvo svih RCC je da dugo ostaju nemi, a simptomi se javljaju tek kada je tumor dostigao značajnu veličinu. Hematurija, sa kojom se preko 50% bolesnika javlja, je najpre mikroskopska koja prelazi u makroskopsku. Kostovertebralni ili lumbalni bol udruženi sa palpabilnom masom ukazuju na to da je tumor već dostigao znatne razmere. Ekstrarenalni simptomi su, gubitak telesne težine, iscrpljenost, anoreksija, povišena temperatura i tupi abdominalni bolovi. Budući da bubreg fiziološki poseduje i endokrinu funkciju, kod ovih tumora u oko 30% bolesnika može doći do polimorfnog paraneoplastičnog sindroma u vidu policitemije, usled stvaranja eritropoetina, hiperkalcemije, hipertenzije feminizacije ili maskulinizacije, ili Kušingovog sindroma [29-31]. U oko 3% pacijenata može se javiti AA amiloidoza [32].

Sve rasprostranjenija upotreba ultrazvuka i drugih imidžing metoda tokom ispitivanja nespecifičnih abdominalnih tegoba ili sistematskih pregleda, dovela je do porasta incidentalnog otkrivanja renalnih tumora. Ultrazvuk je pokazao oko 79% senzitivnosti u detekciji renalnih parenhimatoznih masa većih od 5mm. Kompjuterizovana tomografija (CT) predstavlja zlatni standard u dijagnostici RCC jer ima senzitivnost i specifičnost veću od 85%. Svaka promena u renalnom parenhimu veća od 3cm se tretira kao maligna i zahteva hiruršku resekciju [30, 33, 34].

Za dijagnozu RCC sve češće se koristi perkutana biopsija tumorske lezije kako bi se odredio patohistološki tip tumora i stepen maligniteta. Ona se takođe koristi i za histološku verifikaciju tumora u cilju utvrđivanja najprikladnije farmakološke terapije kod bolesnika koji su kandidati za nehirurški tretman, kao i kod prisutnih metastaza [35].

Uprkos primeni savremenih dijagnostičkih metoda, u trenutku dijagnoze 23% pacijenata već ima metastatsku bolest, 25% će dobiti metastaze nakon nefrektomije, od kojih će se većina razviti u prvih pet godina. Najčešća mesta metastaza su pluća (45%), kosti (30%), limfni nodusi (22%), jetra (20%), i mozak (9%) [31,36].

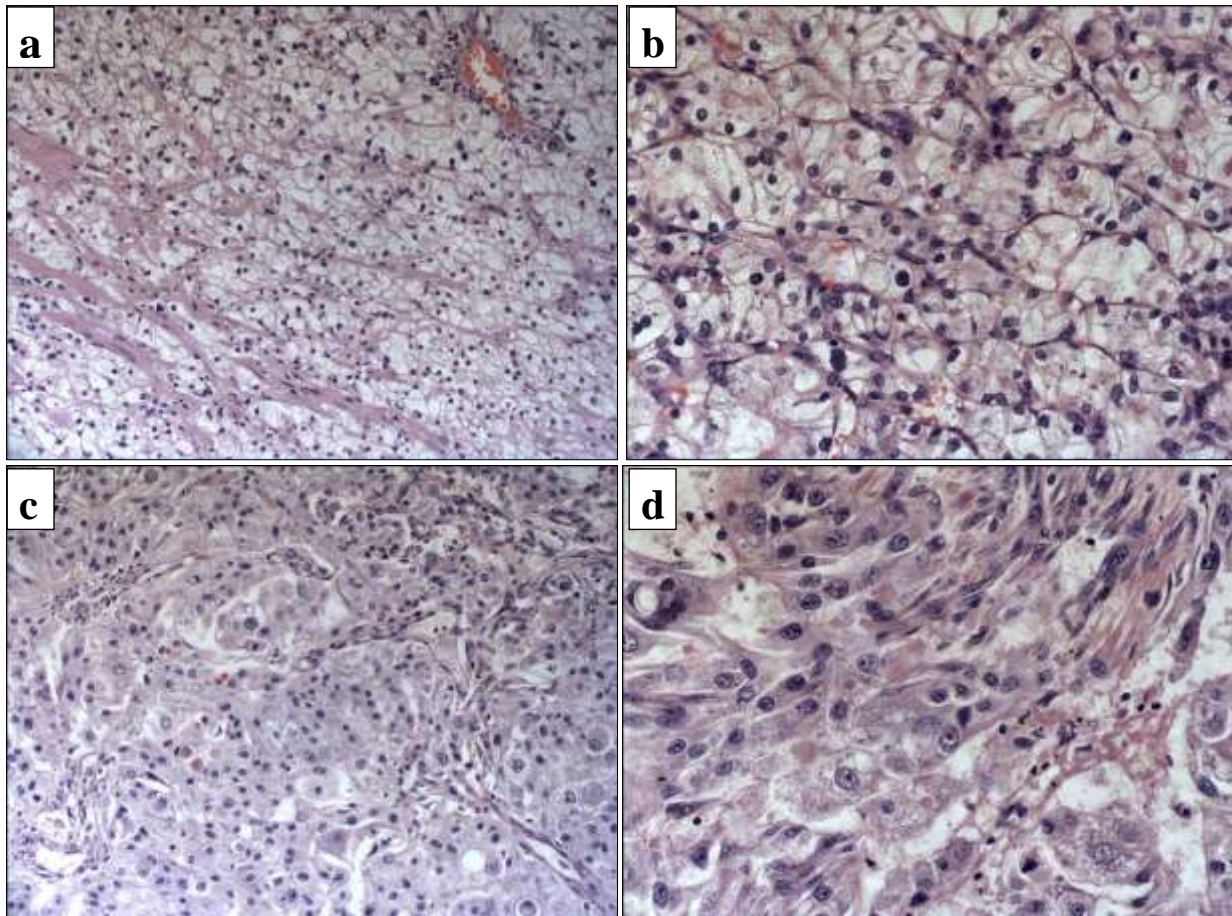
## 2.5. PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE PODTIPOVA RCC-a

### 2.5.1. SVETLOĆELIJSKI KARCINOM BUBREŽNIH ĆELIJA

Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija (*clear cell Renal cell carcinoma, ccRCC*) je najčešći tip karcinoma bubrežnih ćelija, koji obuhvata između 65 i 70% svih tumora bubrega kod odraslih[28]. U prošlosti je bio poznat pod različitim imenima: Grawitz-ov tumor, Carcinoma renocellulare lucidocellulare, i konvencionalni/klasični tip RCC-a [40].

**Makroskopski izgled:** Iako može nastati u bilo kom delu korteksa bubrega najčešće se javlja na gornjem polu, kao okrugla dobro ograničena, naizgled inkapsulirana masa veličine 3 do 15 cm. Na preseku je žućkaste do sive boje, često sa poljima mrke boje usled hemoragije i sa zonama cističnog razmekšanja usled nekroze. Tokom rasta, tumor može dati satelitske noduse, može probiti kroz zidove sabirnog sistema, deformisati bubrežnu karlicu, raširiti se sve do uretera ili infiltrirati perinfrično tkivo. U odmaklim slučajevima dolazi do urastanja tumorske mase u renalnu venu u vidu stuba unutar lumena krvnog suda, koji se može proširiti do donje šuplje vene i desnog srca. Proces se naziva *permeacija* tumora i specifična je karakteristika ccRCC [31, 40].

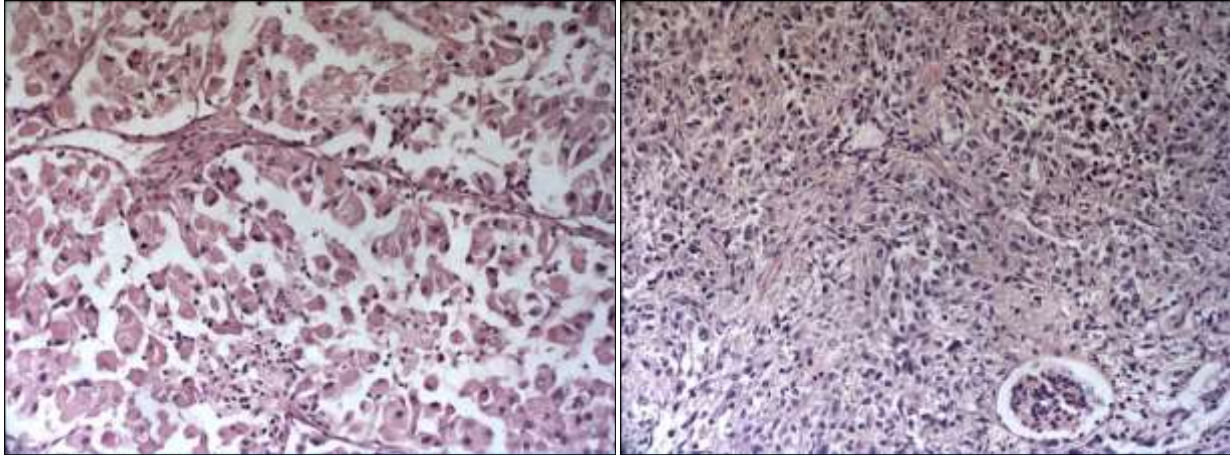
**Mikroskopski izgled:** Ovaj tumor je dobio naziv zbog upadljivog mikroskopskog izgleda ćelija. One su svetle, naizgled prazne, ograničene ćelijskom membranom, dok su jedra mala i potisnuta bazalno (*slika 1.*). Prozračnost citoplazme potiče od visokog sadržaja lipida, holesterola i glikogena koji se gube prilikom histološke obrade tkiva. Ćelije su oko 2 puta veće od normalnih epitelnih ćelija tubula bubrega. Između njih je oskudna stroma sa karakterističnom mrežom malih, tankih krvnih sudova. Često se u stromi detektuju mešoviti zapaljenski infiltrat, nekroza i hemoragija. Histološki tip rasta ovog tumora može biti papilarni, trabekularni, solidni, tubularni i cistični, pri čemu se različiti tipovi mogu sresti unutar istog tumora [31, 40].



Slika 1. Prikaz svetloćelijskom karcinoma bubrega različitog stepena diferencijacije: **a.** ccRCC G:1 (HE x200); **b.** ccRCC G:1 (HE x400); **c.** ccRCC G:3 (HE x200); **d.** ccRCC G:4 (HE x400).

U zavisnosti od stepena diferencijacije, ćelije mogu, imati i drugačiji izgled. One mogu biti sitnije, okrugle sa eozinofilnom citoplazmom i centralno posatvljenim jedrom, fuziformnog, rabdoidnog ili anaplastičnog izgleda. Rabdoidna morfologija može se sresti u oko 5% RCC-a. Iako ove ćelije morfološki nalikuju rabdomioblastima, krupne su, sa eozinofilnom citoplazmom, krupnim ekscentričnim nukleusom i prominentnim nukleolusom, poseduju drugačiji imunofenotip i ultrastrukturne karakteristike (slika 2.) [41]. Sarkomatoidna morfologija viđa se u 5-10% RCC (slika 3.). Karakteriše se zgusnutim vretenastim ćelijama, sa izraženom atipijom, nalik fibrosarkomu, džinovskim pleomorfim ćelijama i brojnim patološkim mitozama. Smatra se da su ove promene posledica divergentne diferencijacije, gdetumorske ćelije gube fenotipske karakteristike epitelnih, zadobijaju mezenhimske karakteristike a samim tim i veću sposobnost migracije i metastaziranja. Pojava sarkomatoidne diferencijacije u RCC niskog Fuhrmanovog gradusa, osporava tvrdnju da je ovo kontinuirani proces dediferencijacije klasičnog RCC-a, već može biti posledica aktivacije sarkomatoidne stem ćelije unutar tumora [42-44].





*Slika 2. ccRCC sa rabdoidnom sarkomatoidnom diferencijacijom (HE x 200).*

*Slika 3. ccRCC sa diferencijacijom (HE x 200).*

**Imunohistohemijske karakteristike:** Preko 90% ccRCC reaguje pozitivno sa Renal cell carcinoma (RCC) markerom, a 75-100% pozitivnosti ima i karbon anhidraza IX (CAIX). Ovi tumori su takođe pozitivni na: vimentin, PAX8 i PAX2, CD 10, a od epitelnih markera na niskomolekulske citokeratine AE1/AE3, citokeratin CAM 5.2 i epitelni membranski marker (EMA). Negativni markeri za ccRCC su: citokeratini 7 i 20 (CK7 i CK20), CD117, Cathepsin K, HMB45, MelanA, Inhibin i drugi [45].

**Citogenetske karakteristike:** Gubitak funkcije VHL gena na 3p25-26 je najčešća mutacija sporadičnih ccRCC, pri čemu je jedna kopija mutirana ili utišana, dok je druga izgubljena kroz 3p deleciju. Na 3p hromozomu postoji još ccRCC asociranih tumor supresor gena: KD-M6A, KDM5C, SETD2 and PBRM1, koji su deo SWI / SNF kompleksa za remodelovanje hromatina [1].

Za utvrđivanje terapije i prognoze RCC važno je odrediti gradus maligniteta na osnovu stepena diferencijacije, gde gradus I označava dobro diferentvani tumor a gradus IV visoko agresivni nediferentovani tumor. U praksi je najčešće upotrebljavan Furhmanov gradusni sistem, zasnovan na veličini i obliku jedra i uočljivosti jedarceta [46].

- Furhmanov gradus I: Jedra su mala (10 mikrona), hiperhromatična i uniformna, jedarce se ne uočava na uvećanju 10x;
- Furhmanov gradus II: Jedra su uvećana, (15 mikrona) blago nepravilna, a jedarca se uočavaju na uvećanju 40x;

- Furhmanov gradus III: Jedra su velika (20 mikrona), izuzetno nepravilnog oblika, jedarca se vide na uvećanju 10x;
- Furhmanov gradus IV: Makronukelusi kao u u gradusu III, udruženi sa bizarnim pleomorfnim ćelijama.

Internacionalno udruženje uropatologa (The International Society of Urological Pathology - ISUP) je 2012. dalo preporuku da se umesto Fuhrmanovog gradacijskog sistema koristi gradacija na osnovu izgleda jedarceta:

- Gradus 1: Jedarce se ne uočava na uvećanju 40x;
- Gradus 2: Jedarce se ne uočava na uvećanju 10x ali je vidljivo i eozinofilno na uvećanju 40X (40% tumora);
- Gradus 3: Jedarce vidljivo i eozinofilno na uvećanju 10x (30% tumora);
- Gradus 4: Izražen nuklearni pleomorfizam, multinuklearne bizarne ćelije (15% tumora).

Prema ovoj gradaciji prisustvo rabdoidne ili sarkomatoidne diferencijacije se tretira kao gradus IV i kao nezavisni prediktor loše prognoze. Prognoza takođe zavisi i od vrste tumora. Usvojen je konsenzus pri kom svi stadijumi pRCC i hromofobnog RCC imaju bolju prognozu u odnosu na ccRCC [47].Preporuka je da se prisustvo i procenat tumorske nekroze evidentiraju budući da imaju uticaja na prognozu [31, 48].

### 2.5.2. PAPILARNI KARCINOM BUBREŽNIH ĆELIJA

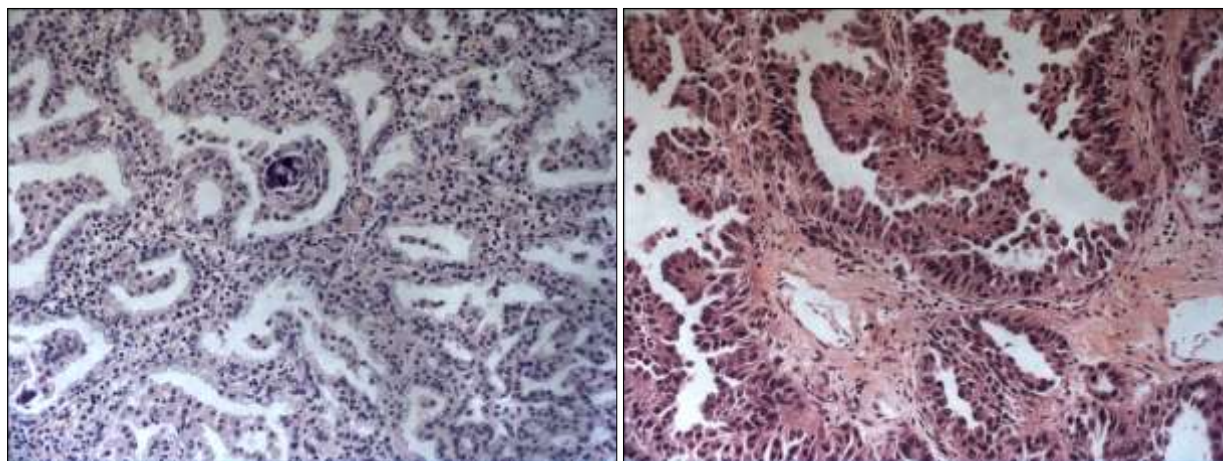
Predstavlja malignu neoplazmu tubularnog epitela bubrega sa papilarnom ili tubulopapilarnom građom. On je drugi po učestalosti RCC sa incidencom od oko 18% [1].Češće je bilateralan i multifokalan u odnosu na ostale tipove RCC.

**Makroskopski izgled:** Najčešće je lokalizovan u renalnom korteksu, svetlo žute do crveno braoin boje. Često je dobro ograničen sa izraženom pseudokapsulom, na preseku mekekonzistencije, pa može da “ističe iz bubrega”.Kod većih tumora mogu sevideti polja cistične degeneracije hemoragije i nekroze.

**Mikroskopski izgled:** Papile imaju fibrovaskularnu osnovu u kojoj mogu biti prisutni penušavi makrofagi, psamomna telašca i hemosiderin. Moguće je prisustvo polja solidne građe,

svetlih ćelija, rabdoidne ili sarkomatoidne morfologije. Na osnovu histomorfološkog izgleda, molekularnog profila i biološkog ponašanja podeljen je u 2 podtipa. Iako u nekim tumorima može biti morfološkog preklapanja ova dva tipa potrebno ih je razdvojiti zbog različite prognoze i terapijskog pristupa [49].

- Tip 1 pRCC: papile su obložene jednim redom malih bledih ćelija, niskog nuklearnog gradusa, sa oskudnom bazofilnom citoplazmom i jedrima u kojima se ne uočavaju jedarca. Psamomna telašca i penušavi makrofagi su čest nalaz (*slika 4.*). Može imati trozomiju +7, +17, +12 ili +16, deleciju Y ili X hromozoma, a u 80% slučajeva mutaciju *MET* gena na hromozomu 7q31, što ih čini osetljivim na terapiju inhibitorima *MET* signalnog puta. Klinički ima bolju prognozu u odnosu na tip 2 [25].
- Tip 2 pRCC: papile su obložene pseudostratifikovanim slojevima ćelija, izraženijeg citološkog pleomorfizma, većeg nuklearnog gradusa, sa oblinom eozinofilnom citoplazmom i krupnim sferičnim jedrima sa prominentnim jedarcima. Moguće je i prisustvo ćelija svetle citoplazme (*slika 5.*). Češći kod mlađih pacijenata. Citogenetski je polimorfan sa mogućim promenama na različitim hromozomima, ima goru prognozu i veću sklonost ka metastaziranju.



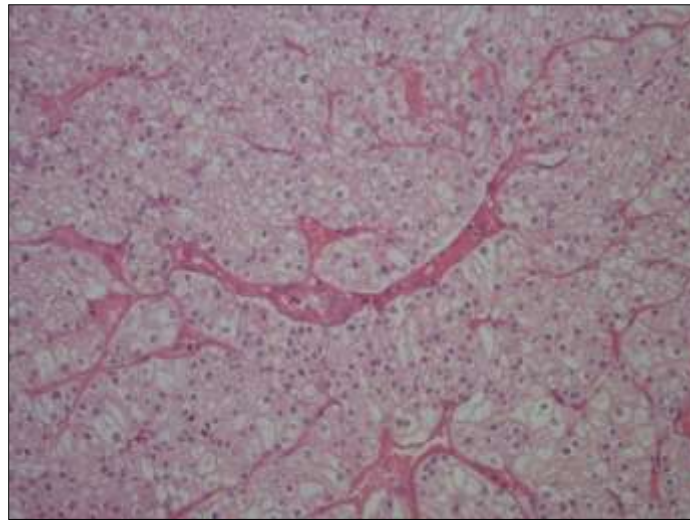
*Slika 4. pRCC tip 1 (HEx200.) Slika 5. pRCC tip 2 (HEx200)*

**Imunohistohemijske karakteristike:** Tumorske ćelije su pozitivne na Alfa metil acil koenzim A racemazu (AMACR), CD10, Vimentin, S-100, RCC, CAM 5.2, EMA, CK7 (pozitivan u preko 80% tumora tip 1, a 20% tumora tip 2) CK8, CK18 i CK19 [50].

### 2.5.3. HROMOFOBNI KARCINOM BUBREŽNIH ČELIJA (chRCC)

Ovaj tumor je treći po učestalosti i čini 5% svih hirurški odstranjenih epitelnih tumora bubrega. Jednako je zastupljen kod oba pola sa najčešćom pojavom u šestoj deceniji života [1]. Može biti hereditaran, u sklopu Birt-Hogg-Dubé sindroma [27]. Ima sporiju progresiju, manji metastatski potencijal i duže preživljavanje u odnosu na ccRCC [51].

**Makroskopski izgled:** Ovaj tumor je dobro ograničen, bez kaspule, sive do svetlo braon boje. Nekroza i cistične promene su prisutni u oko 30% slučajeva.



*Slika 6. Hromofobni karcinom (HEx200)*

**Mikroskopski izgled:** Postoje dve histološke varijante chRCC: tipična i eozinofilna. U tipičnoj varijanti prisutna su 3 tipa ćelija: male ćelije sa blago granuliranom citoplazmom i smežuranim jedrom, ćelije sa zamućenom citoplazmom i perinuklearnim haloom i velike poligonalne ćelije, sa naglašenom ćelijskom membranom (*slika 6.*). Eozinofilna varijanta je u potpunosti sastavljena od eozinofilnih ćelija sa perinuklearnim haloom i prominentnom ćelijskom membranom [52]. Fuhrmanov gradusni sistem nije od prognostičkog značaja [53].

#### **Imunohistohemijske karakteristike:**

Karakteristično za ovaj tumor je citoplazmatsko bojenje na Haleovo koloidno gvožđe. Tumor je takođe pozitivan na CK7, CK8/18, CD117, CD10, EMA, E-cadherin, citohrom-C oksidazu, dok je negativan na Vimentin, Cyclin D1 i ima nizak ki67 proliferativni indeks [54].

#### 2.5.4. SVETLOĆELIJSKI PAPILARNI KARCINOM BUBREŽNIH ĆELIJA

Predstavlja redak tip tumora koji je odnedavno uključen u klasifikaciju. Posедуje histološke karakteristike i papilarnog i svetloćelijskog karcinoma ali se takođe od njih morfološki, imunohistohemijski i genetički razlikuje [55].

**Makroskopski izgled:** Najčešće dobro ograničen, unilateralan, može biti solidan ili multilokularan i cističan, žute do braon boje.

**Mikroskopski izgled:** U ovim neoplazmama nalazi se mešavina cističnih, solidnih, glandularnih i papilarnih komponenti koje su obložene ćelijama svetle citoplazme, niskog nuklearnog gradusa. U pojedinim ćelijama jedra su apikalno postavljena tako da liče na ćelije endometrijuma u sekretornoj fazi.

##### **Imunohistohemijske karakteristike:**

Ovi tumori pokazuju jaku difuznu pozitivnost na CK7, pozitivni su još i na CAIX, AE1/AE3, CAM 5.2, Vimentin i EMA, a negativni na AMACR, CD10 i RCC [56].

#### 2.5.5. TNM SISTEM KLASIFIKACIJE RCC-a

Određivanje stadijuma karcinoma je proces kojim se utvrđuje veličina primarnog tumora i raspon njegovog širenja. Pomoću njega donose se odluke o načinu lečenja, moguća je prognoza i razmena informacija među lekarima i istraživačima. Internacionalna Unija za borbu protiv raka (IUCC) i The American Joint Committee on Cancer (AJCC) su sedamdesetih godina prošlog veka uveli stadiranje preko Tumor Nodus Metastaze (TNM) sistema, i njegova poslednja revizija –osmo izdanje iz 2018. godine je danas opšteprihvaćena širom sveta [37]. Polazna tačka ovog sistema je veličina tumora i njegov odnos sa okolnim strukturama (*tabela 3*), zatim stanje perirenalnih i retroperitonealnih limfnih žlezda, prisustvo tumora u renalnoj i donjoj šupljoj veni, ili nadbubrezima i prisustvo metastaza u jetri plućima ili kostima [38].

Tabela 3. TNM klasifikacija RCC

<b>Primarni tumor</b>	
<b>Tx</b>	Primarni tumor se ne može proceniti;
<b>T0</b>	Nema znakova primarnog tumora;
<b>T1</b>	Tumor do veličine 7cm ograničen na bubreg;
<b>T1a</b>	Tumor $\leq$ 4cm ograničen na bubreg
<b>T1b</b>	Tumor $>$ 4 cm and $\leq$ 7 cm ograničen na bubreg;
<b>T2</b>	Tumor veći od 7cm ograničen na bubreg;
<b>T2a</b>	Tumor $>$ 7 cm and $\leq$ 10 cm, ograničen na bubreg;
<b>T2b</b>	Tumor $>$ 10cm, ograničen na bubreg;
<b>T3</b>	Tumor zahvata velike vene ili perinefrično tkivo ali ne i istostranu nadbubrežnu žlezdu i ne probija Gerota fasciju;
<b>T3a</b>	Tumor se širi u renalnu venu ili njene grane ili invadira perirenalno i/ili peripelvično masno tkivo, ali ne probija gerota fasciju;
<b>T3b</b>	Tumor zahvata venu kavu ispod dijafragme;
<b>T3c</b>	Tumor zahvata venu kavu iznad dijafragme ili probija njen zid;
<b>T4</b>	Tumor probija Gerota fasciju i istostranu nadbubrežnu žlezdu
<b>Regionalni limfni nodusi- N</b>	
<b>Nx</b>	Regionalni limfni nodusi se ne mogu proceniti;
<b>N0</b>	Metastaze u regionalne limfne noduse nisu prisutne (hilarne, kavalne ili aortne);
<b>N1</b>	Metastaze prisutne u regionalnoim limfnim nodusima/nodusu
<b>Udaljene metastaze- M</b>	
<b>M0</b>	Metastaze u udaljenim organima nisu prisutne;
<b>M1</b>	Prisutne udaljene metastaze

Na osnovu TNM klasifikacije mogu se utvrditi i prognostički stadijumi, pri čemu je za stadijum I procenjeno petogodišnje preživljavanje nakon nefrektomije oko 97%, za stadijum II oko 89%, za stadijum III - 78% a za stadijum IV oko 26% [39].

Tabela 4. Stadijumi tumora

<b>stadijum</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>I</b>	<b>T1</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>II</b>	<b>T2</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>III</b>	<b>T1/T2</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
	<b>T3</b>	<b>Nx/N0/N1</b>	<b>M0</b>
<b>IV</b>	<b>T4</b>	<b>Bilo koji N</b>	<b>M0</b>
	<b>Bilo koji T</b>	<b>Bilo koji N</b>	<b>M1</b>

## 2.5.6 TERAPIJA RCC-a

Izbor terapijske procedure RCC-a zavisi najpre od stadijuma bolesti, zatim od veličine i lokalizacije tumorske mase, starosti, pridruženih bolesti i opšteg stanja pacijenta. Radikalna nefrektomija se godinama smatrala “zlatnim standardom” u tretmanu lokalizovanog RCC-a kod pacijenata sa zdravim kontralateralnim bubregom. Zahvaljujući novim dijagnostičkim metodama i ranijem otkrivanju, sve su češće poštudne operacije (*nephron sparing surgery*) i minimalno invazivne ablative tehnike uz aktivno praćenje pacijenata. Rizik za razvoj udaljenih metastaza nakon radikalne nefrektomije kreće se od 20 do 50%. Nefrektomija u metastatskoj bolesti smatra se svrsishodnom ako tumor dovodi do kompresije okolnih struktura i samo u kombinaciji sa hemioterapeuticima. Smatra se da se citoredukcijom tumorske mase stvara preduslov za efikasnije delovanje adjuvantne terapije [38, 39].

Terapeutici koji se koriste kao prva linija terapije RCC-a su sunitinib, sorafenib, pazopanib i bevacizumab plus interferon. Kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću, odobrena je kombinacija pembrolizumab i axitinib [57]. Rapamycin (sirolimus) i njegovi analozi (temsirolimus, ridaforolimus) se koriste kod pacijenata sa lošom prognozom metastatskog RCC-a, i kao druga linija terapije kod pacijenata koji su razvili rezistenciju. Bez obzira na terapijski pristup petogodišnje preživljavanje sreće se kod samo 8-11,7% pacijanata sa metastazama [58].

## 2.6. CXCL12/CXCR4/CXCR7 HEMOKINSKA OSOVINA

### 2.6.1. Građa i funkcija hemokina

Hemokini su grupa proteina sa zajedničkim strukturnim i funkcionalnim karakteristikama koja pripada familiji citokina. To su mali proteini, molekulske težine od 8-10KDa, najčešće kodirani klasterima gena na 4 i 7 hromozomu koji na N-terminalnom kraju sekvence amino kiselina poseduju 4 konzervativne cisteinske rezidue, odgovorne za formiranje tercijarne strukture[59]. Cisteinske rezidue se uparuju, formirajući disulfidne mostove, neophodne za održavanje strukturnog integriteta i vezivanje sa receptorom. Podeljeni su u 4 subfamilije (CXC, CX3C, CC and C) na osnovu položaja tih konzervativnih cisteinskih rezidua. C hemokinska subfamilija poseduje samo jednu N-terminalnu cisteinsku reziduu. Kod CC subfamilije, kojoj pripada većina hemokina, dve cisteinske rezidue se nalaze jedna pored druge. Kod CXC

subfamilije cisteinske rezidue su razdvojene jednom varijabilnom amino kiselinom, dok CX3C subfamilija ima 3 amino kiseline između dve cisteinske rezidue [60,61].

Do sada je otkriveno 48 hemokina. Predstavljaju posrednike ćelijske komunikacije fiziološkim i patološkim uslovima. Oni stimulišu ćelijsku aktivaciju, migraciju, hemotaksu, adheziju i degranulaciju limfocita. Imaju presudnu ulogu u hematopoezi, morfogenezi, vaskularizaciji, preživljavanju, proliferaciji, imunološkom nadzoru i zapaljenskoj reakciji. Značajni su i u patološkim stanjima: autoimunim bolestima, kancerogenezi i metastaziranju [40, 60, 61].

Hemokini ostvaruju svoju funkciju vezivanjem za svoje receptore na površini različitih ćelija. Do sada je identifikovano 23 receptora i oni su podeljeni u dve grupe: G protein- spregnute hemotaktične hemokinske receptore, kojih ima 19 i drugu grupu od 4 atipična hemokinska receptora (ACKR). G protein-spregnuti hemokinski receptor se sastoji od pojedinačnog polipeptidnog lanca sastavljenog od oko 350 amino kiselina. Ima kratak N-terminalni ekstracelularni domen, prolazi kroz ćelijsku membranu 7 puta pa ima 7 transmembranskih domena koji formiraju 3 ekstracelularne i 3 intracelularne petlje. Unutar ćelije se nalazi C-terminalni domen polipeptidnog lanca, koji sadrži serinske i treoninske aminokiselinske rezidue koje služe za vezivanje G-proteinskog heterotrimeričnog neophodnog za receptorski prenos signala nakon vezivanja liganda. Na osnovu subfamilije hemokina koju vezuju G-protein spregnuti receptori se dele na CR, CCR, CXCR i CX3CR. Svaki hemokin se može vezati za nekoliko specifičnih receptora i receptor može prenositi signal dobijen od različitih hemokina unutar jedne subfamilije. To objašnjava sposobnost hemokina da utiču na različite ćelijske populacije u kompleksnim mehanizmima hronične inflamacije, hematopoeze ili tumorigeneze. Prilikom vezivanja za svoje receptore, hemokini takođe interaguju sa glikozaminoglikanima (GAG), koji mogu biti u ekstracelularnom matriksu, ili zakačene za proteine na površini ćelije. GAG izazivaju zadržavanje hemokina na površini endotela venula, što je od značaja za hemokinima posredovano navođenje leukocita iz krvi u limfna tkiva [60-63].

Nasuprot klasičnim hemokinskim receptorima, atipični hemokinski receptori nisu povezani sa G proteinom i svoju funkciju ostvaruju aktivacijom drugačijih signalnih puteva. Dok su G protein-spregnuti receptori eksprimirani na hematopoetskim, i brojnim drugim ćelijama, atipične receptore poseduju eritrociti, ćelije trofoblasta, keratinociti i endotelne ćelije limfnih i krvnih sudova. Njihova aktivacija ne pokreće migraciju i hemotaksu, već oni uvlače hemokine u



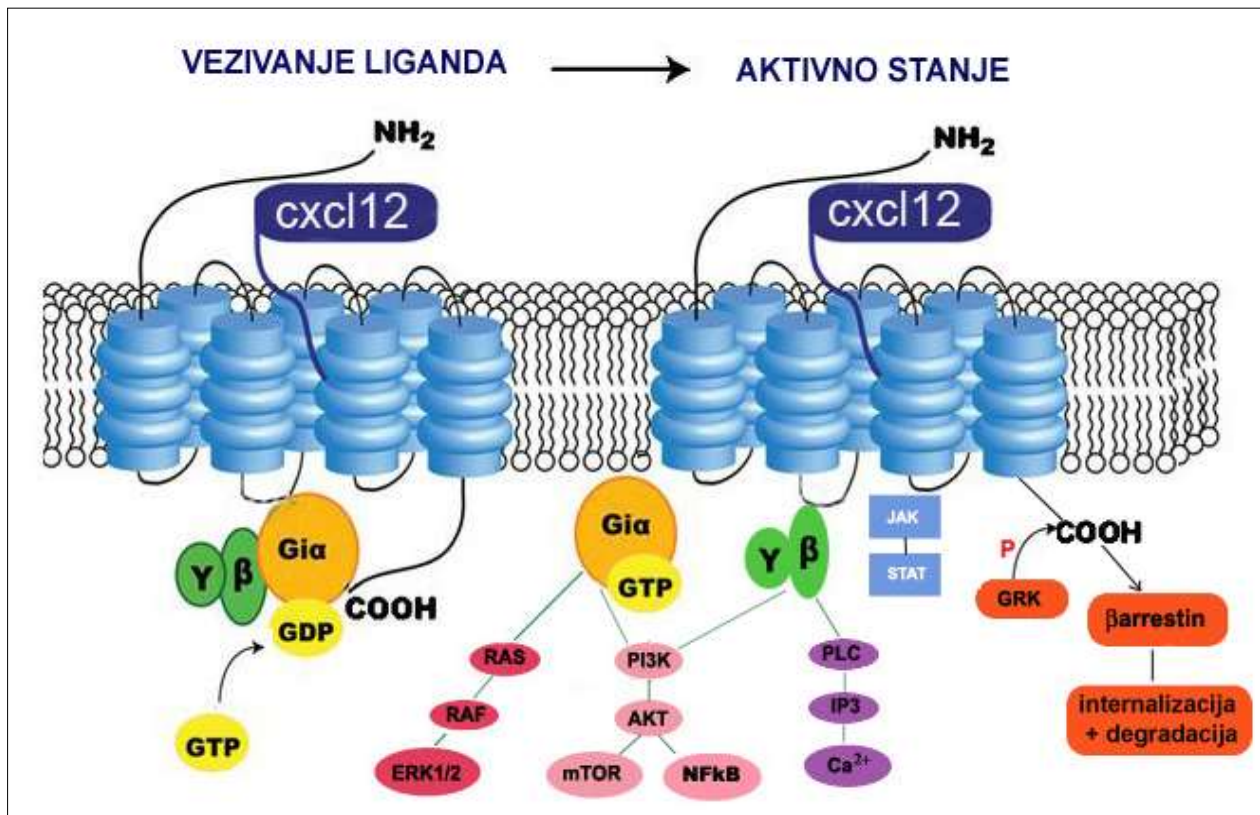
ćeliju pripremajući ih za razgradnju i modifikuju funkciju klasičnih receptora. Zvanično za sada postoje 4 atipična receptora: ACKR 1, drugi naziv “duffy antigen receptor for chemokines” (DARC), ACKR 2 drugi naziv D6, ACKR3 poznatiji kao CXCR7 (receptor “siročće” engl. “orphan receptor”) i ACKR4 ranije nazvan “CC chemokine receptor- like 1 (CCRL1) [64].

### 2.6.2. HEMOKIN CXCL12 I NJEGOVI RECEPTORI

CXCL12 ili faktor izveden iz stromalnih ćelija, eng. *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) je hemokin koga sekretuju brojne stromalne ćelije: fibroblasti, makrofagi i endotelne ćelije. Jedan *Cxcl12* gen, kodiran na hromozomu 10q11 posredstvom modifikacije tj. splajsovanja informacione RNK, daje šest različitih varijanti  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\phi$ . Ove varijante imaju 3 ista egzona i četvrti različiti egzon vezan za C terminalni kraj. Imaju različitu aktivnost i distribuciju u tkivima. Najzastupljenija varijanta je CXCL12 $\alpha$ , koja je uključena u hematopoezu, embriogenezu, neuromodulaciju u CNS-u itd.[65, 66].CXCL12 se vezuje za dva receptora: CXC receptor 4 koji se još zove i fuzin (CXCR4, CD184) i receptor CXC 7 ili atipični hemokinski receptor 3 (CXCR7, ACKR3).

CXCR4 je evolucijski veoma konzervativan G protein spregnuti receptor sastavljen od 352 aminokiseline.Eksprimiran je na različitim tipovima ćelija: limfocitima, hematopoetskim stem ćelijama (HSC), endotelnim, epitelnim i nekim tumorskim ćelijama. To im omogućava kretanje u pravcu koncentracijskog gradijenta CXCL12 [67].Vezivanje liganda za CXCR4 ostvaruje se preko ekstracelularnog N-terminalnog domena i tri ekstracelularne hidrofilne petlje. Intracelularne petlje i C-terminalni domen, bogat aminokiselinama serin i treonin, su posredstvom konzervativnog DRY motiva vezani za heterotrimerni G protein, koji je neophodan za pokretanje signalne kaskade u ćeliji [61, 68].Heterotrimerni G protein sastoji se od  $\alpha$  subjedinice, za koju je vezan GDP i kompleksa u kom su spojene  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinice. (slika7.)Nakon vezivanja hemokina, dolazi do fosforilacije GDP u GTP i odvajanja GTP-G $\alpha$  subjedinice od G $\beta\gamma$ -dimera. Ova dva dela vezuju efektorne proteine i pokreću brojne G protein-zavisne signalne puteve kao što su fosfatidil-inozitol-3 kinaza (PI3K), fosfolipaza A2 i D, fosfolipaza C (PLC), ras-mitogen-aktivirana-protein kinaza (MAPK), NF- $\kappa$ B i JNK/p38. Svi oni dovode do različitih promena poput, aktivacije transkripcije, reorganizacije citoskeleta, migracije ili adhezije ćelije. Aktivirana G $\alpha$  može da aktivira Src familiju tirozin kinaza ili da inhibira adenil

ciklazu i time spreči stvaranje cikličnog adenozin monofosfata (cAMP). G $\beta\gamma$  aktivira PI3K a preko PLC pokreće intracelularnu akumulaciju Ca<sup>2+</sup> jona, koji takođe aktiviraju neke protein kinaze (slika 7.) [68, 69]. PI3K reguliše atipičnu serin/treonin kinazu mTOR koja kao odgovor na stres, kiseonik ili faktore rasta, utiče na progresiju ćelijskog ciklusa, citoskeltenu reorganizaciju i ćelijsko preživljavanje. mTOR je meta antikancerskih lekova Rapamicina i njegovog analoga Temesirolimusa [70]. CXCL12/CXCR4 osovina aktivira JAK/STAT signalni put bez učešća G proteina. CXCL12 dovodi do prolazne asocijacije JAK2 i JAK3 sa CXCR4, posledične aktivacije i nuklearne translokacije brojnih STAT proteina [71].



Slika 7. (Modifikovano iz reference 66.)

Nakon produženog vezivanja CXCL12, CXCR4 se desenzitiše i endozitom uvlači u ćeliju. Endocitoza receptora dovodi do njegove lizosomalne degradacije ili ponovnog vraćanja na površinu ćelije i reaktivacije. Desenzitizacija je posredovana vezivanjem proteina  $\beta$ -arestina. Serinske i treoninske rezidue na C terminalnom domenu, nakon fosforilacije od strane G proteinskih receptor kinaza (GRK), vezuju citoskeletne proteine  $\beta$ -arestine. Jednom vezan,  $\beta$ -arestin sprečava formiranje G-protein sprege, blokira prenos signala i posreduje u internalizaciji (endocitozi) receptora.  $\beta$ -Arestini takođe mogu aktivirati brojne signalne puteve poput Akt, PI3K,

MAPK ili NF- $\kappa$ B, što dovodi do različitih odgovora ćelija [68]. GTP-azna aktivnost G $\alpha$  subjedinice ograničava aktivaciju proteina i dalji prenos signala, budući da hidroliza GTP u GDP dovodi do ponovnog spajanja G $\alpha$  i G $\beta\gamma$  i inaktivacije proteina. G protein - zavisna signalizacija se takođe može prekinuti i proteinima koji ubrzavaju GTP-aznu aktivnost i time promovišu hidrolizu G $\alpha$  subjedinice [72].

CXCL12 i CXCR4 su eksprimirani u: kostnoj srži, limfnom tkivu, mozgu, srcu, plućima, timusu, bubrezima, jetri, slezini i tankom crevu [73]. CXCL12/CXCR4 osovina je važna za održavanje i kretanje HSC u kostnoj srži, za stvaranje i razvoj B i T limfocita, plazmocitoidnih i NK ćelija kao i za kardiogenezu i neurogenezu. CXCL12/CXCR4 signalizacija reguliše kretanje timocita u timusu i doprinosi migraciji limfocita u i iz limfnih nodusa [74]. CXCL12/CXCR4 su se pokazali kao neophodni i u usmeravanju primordijalnih germinativnih ćelija u gonade, formiranju kardijalnih ventrikularnih septi, vaskularizaciji gastrointestinalnog trakta i migraciji granularnih ćelija u mali mozak tokom neurogeneze [75]. Eksperimenti na genetski modifikovanim ("knock out") miševima kod kojih su isključeni geni za CXCR4 ili CXCL12, su pokazali defektnu hematopoezu usled neadekvatnog navođenja HSC iz fetalne jetre ka kostnoj srži. Takođe su ispoljili letalne defekte u razvoju srca mozga i krvnih sudova [76].

Pored fizioloških uloga CXCL12/CXCR4 signalizacija učestvuje i u inflamaciji i imunološkom nadzoru. Oštećenja tkiva izazvana hipoksijom, toksinima, iradijacijom povećavaju ekspresiju CXCL12 i regrutuju CXCR4 pozitivne ćelije na mesto oštećenja [77]. Pošto ima ulogu u neurogenezi i razvoju korteksa velikog mozga i malog mozga CXCL12/CXCR4 osovina je uključena u patogenezu neurodegenerativnih i autoimunih bolesti centralnog nervnog sistema poput Alchajmerove bolesti, multiple skleroze i amiotrofične lateralne skleroze [65].

Otkriveno je da je CXCR4 esencijalni koreceptor za T-limfocito-tropni soj virusa humane imunodeficijencije tip-1 (HIV-1). HIV-1 gp120 protein se vezuje za CXCR4 i posreduje ulasku virusa u ćeliju. CXCL12 funkcionise kao prirodni antagonist HIV-1, budući da blokira infekciju T limfocita [75]. CXCL12 $\gamma$  splajsing varijanta je među svim ostalim varijantama pokazala veliki afinitet za vezivanje za površinu ćelije i najveću sposobnost blokade ulaska HIV virusa [66].

CXCR7 je nedavno otkriven receptor za CXCL12, koji ima 10 puta veći afinitet vezivanja za u odnosu na CXCR4. Najpre se zvao "receptor siročić", budući da nisu bili poznati njegovi

ligandi [78]. Ovaj alternativni receptor se takođe velikim afinitetom vezuje za interferon-indukujući T-ćelijski  $\alpha$  hemo atraktant (I-TAC ili CXCL11). CXCR7 je eksprimiran na aktiviranom endotelu, fetalnim ćelijama jetre i na površini različitih malignih ćelija i krvnih sudova unutar tumora, ali ne na normalnoj vaskulaturi i ostalim ćelijama. Ekspresija CXCR7 omogućava ćeliji rast, preživljavanje, kao i povećana adheziona svojstva [79]. CXCR7 nema funkcionalne domene za vezivanje sa G proteinom i posledičnu signalizaciju. Njegova aktivacija ne izaziva porast  $Ca^{2+}$ , mobilizaciju ili ćelijsku migraciju. Međutim, eksperimenti na ćelijskim kulturama su pokazali njegovo učešće u CXCR4 posredovanoj aktivaciji G proteina. CXCL12 indukuje formiranje heterodimera CXCR4/CXCR7, koji pokreće  $\beta$ -arestinsku signalizaciju, i menja sposobnost interakcije CXCR4 sa G proteinima. Ova dva receptora komuniciraju međusobno unutar heterodimera, tako što jedan modifikuje funkciju drugog kroz transkonformacionalne promene [70, 79-81]. Pretpostavlja se da CXCR7 funkcioniše kao receptor čistač (*engl. scavenger*) za CXCL12. On uklanja ovaj hemokin iz ekstraćelijskog prostora, i olakšava njegovu razgradnju u lizozimima. Na taj način CXCR7 smanjuje količinu raspoloživog liganda za aktivaciju CXCR4 [82].

Iako se dosta naučilo o ulozi CXCL12 i njegovih receptora u fiziološkim i patološkim aktivnostima ćelija, mnogi aspekti još uvek nisu poznati i zahtevaju dalja istraživanja.

### **2.6.3. ULOGA HEMOKINSKE OSOVINE CXCR12/CXCR4/CXCR7 UPATOGENEZITUMORA**

Zbog uloge u hemotaksi, angiogenezi, ćelijskoj proliferaciji i preživljavanju, ekspresija hemokina i njihovih receptora proučavana je u preko 20 različitih maligniteta. CXCL12/CXCR4/CXCR7 osovina igra bitnu ulogu u metastaziranju tumora u udaljene organe, budući da kontroliše migraciju tumorskih ćelija kroz endotel krvnih sudova i ekstracelularni matriks. Slično kao kod hemotakse, ciljni organi eksprimiraju hemoatraktante, koji posreduju u ekstravazaciji tumorskih ćelija. Nivoi CXCL12 su najviši na čestim mestima metastaza, kao što su kosti, mozak, kičmena moždina limfni nodusi i jetra [83, 84].

Intratumorska sekrecija CXCL12 privlači CXCR4-pozitivne inflamatorne, vaskularne i stromalne ćelije u tumor. Sve te ćelije, sekretujući faktore rasta, citokine, hemokine i

proangiogene faktore podstiču dalji rast tumora [78]. Hemotaksa neoplastičnih ćelija u pravcu CXCL12 gradijenta nije jedino objašnjenje njihovog metastatskog potencijala. Da bi metastazirale, tumorske ćelije moraju da se izdvoje iz osnovne tumorske mase, interaguju sa ekstracelularnim matriksom i zidom krvnog suda, prodru u krvotok i stignu do ciljnog organa. CXCL12/CXCR4 osovina je važna za adheziju tumorskih ćelija za endotel i interakcijusa proteinima ekstracelularnog matriksa: lamininom, kolagenom i fibronektinom. CXCR4 ne reguliše direktno adheziju, već signalnim putevima modifikuje ekspresiju integrinskih adhezionih receptora [85].

CXCR4 se ekspirira na tumorskim ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Nalazi se u jedru i/ili citoplazmi malignih ćelija, ali se ne ekspirira u zdravom plućnom tkivu. Jaka nuklearna pozitivnost korelira sa boljim preživljavanjem, u odnosu na negativno nuklearno bojenje. To je bio prvi prikaz da lokacija ekspresije hemokinskog receptora može biti povezana sa ishodom bolesti [86].

Velika studija koja je uključila preko 600 pacijenata sa karcinomom prostate pokazuje da prekomerna ekspresija CXCR4 korelira sa povećanom agresivnošću tumora. Ćelije karcinoma prostate su takođe pokazale i povećanu CXCL12 ekspresiju. Taj rezultat je bio neobičan, budući da tumorske ćelije mogu da metastaziraju u organe sa visokom ekspresijom CXCL12, kao što su pluća, kosti, jetra ili limfni nodusi. Visoki nivoi i liganda i receptora unutar tumora autokrino stimulišu proliferaciju ćelija i čine CXCL12/CXCR4 osovinu još jednim mehanizmom preživljavanja i metastaziranja tumorskih ćelija [87]. CXCR7 takođe ima svoju ulogu u razvoju, progresiji i metastaziranju tumora. In vitro i in vivo studije su pokazale da ekspresija CXCR7 ćelijama karcinoma prostate olakšava njihove adhezivne i invazivne mogućnosti i da je u korelaciji sa agresivnošću tumora [88].

Ekspresija CXCR4 je otkrivena u karcinomu dojke ali ne u zdravom tkivu. CXCL12/CXCR4 osovina ne samo da podstiče metastaziranje u udaljene organe, već podstiče rast i primarnog karcinoma dojke. Opsežna meta-analiza je pokazala da je ukupno preživljavanje (overall survival –OS) pacijenata sa karcinomom dojke značajno sniženo kod tumora sa visokom ekspresijom CXCR4 u poređenju sa onim kod kojih je ekspresija mala [89]. Receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER 2/neu), koji se često sreće u karcinomu dojke, podiže ekspresiju CXCR4 tako što inhibira njegovu degradaciju [90]. U jednoj studiji CXCR7+ ćelije karcinoma

dojke su pojačale metastaziranje CXCR4+ ćelija, što pokazuje da je CXCR7 potreban za normalni hemotaktički odgovor CXCR4+ ćelija na ligand[82].

Više studija demonstriralo je vezu ekspresije CXCR4 i CXCR7 sa kratkim periodom preživljavanja kod pacijenata sa sarkomima kostiju i Ewingovim sarkomom. CXCR4 ekspresija je takođe u korelaciji sa hondrosarkomom [91].

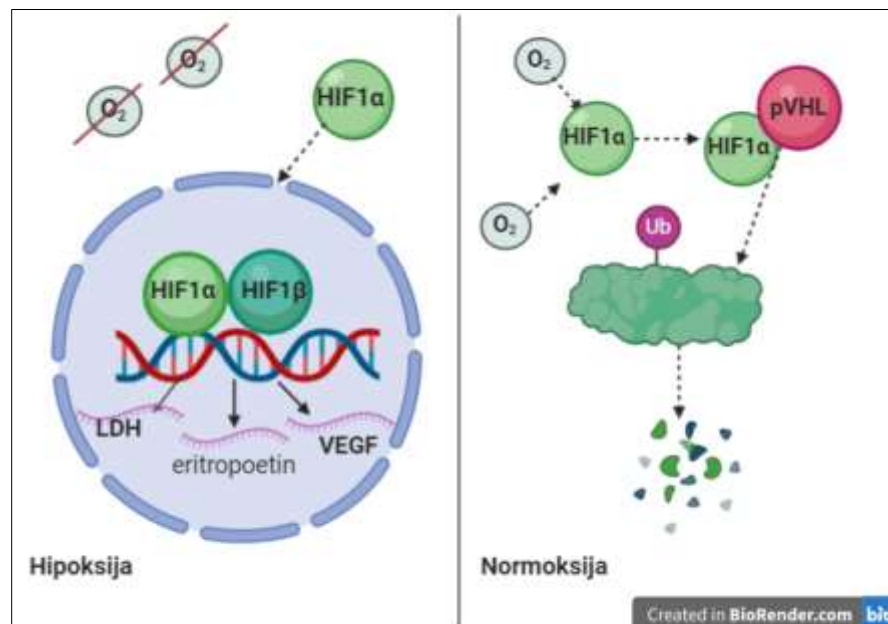
CXCR4 ekspresija je nezavisni prognostički prediktor relapsa bolesti kod pacijenata sa hematološkim malignitetima poput hronične i akutne mijeloidne leukemije i multiplog mijeloma. U hroničnoj limfocitnoj leukemiji, CXCR4-pozitivne B-ćelije se privlače u kostnu srž koja proizvodi visoke nivoe CXCL12, taj proces je sličan homingu normalnih HSC u kostnu srž. CXCR4/CXCL12 interakcija unutar kostne srži štiti kancerske ćelije od apoptoze indukovane hemoterapijom [75].

CXCL12/CXCR4 je kroz mehanizme proliferacije, migracije i angiogeneze uključena u razvoj i metastaziranje brojnih gastrointestinalnih kancera: kolorektalnog, gastričnog, hepatocelularnog, kao i karcinomima pankreasa i jednjaka [92, 93].

CXCR12/CXCR4/CXCR7 hemokinska osovina je ispitivana i u karcinomima bubrežnog parenhima. U istraživanjima su korišćene ćelijske kulture, animalni modeli kao i humani materijal. Klinički značaj CXCL12 i njegovih receptora u RCC-u još uvek nije do detalja razjašnjen. Iako su brojne studije dokazale povećanu ekspresiju ovih markera u tumorskom tkivu u odnosu na tkivo zdravog bubrega i povezale ih sa agresivnim biološkim ponašanjem tumora i kraćim preživljavanjem, konsenzus još uvek nije postignut [61, 94]. Istraživanja pokazuju heterogenost u pogledu metodologije, broja ispitivanih uzoraka, kliničkih karakteristika pacijenata, uključivanja svih raspoloživih histoloških tipova, različitih histoloških gradusa i stadijuma bolesti.

## 2.7. HIPOKSIJA INDUCIBILNI FAKTORI

Sve ćelije sisara moraju da održavaju adekvatnu koncentraciju kiseonika za funkcionisanje aerobnog metabolizma i stvaranje energije. Hipoksija inducibilni faktori (HIF) su transkripcioni faktori zaduženi za održavanje homeostaze kiseonika u ćelijama. Ovi faktori su heterodimerni proteini koji poseduju  $\alpha$ -subjednicu (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  i HIF3 $\alpha$ ) i konstitutivnu  $\beta$ -subjednicu (HIF1 $\beta$ ). U uslovima normoksije pVHL formira E3 ubikvitin ligazni kompleks i vezuje se za hidroksilisane HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$  koji zatim podležu proteozomalnoj razgradnji u roku od nekoliko minuta. U uslovima ćelijske hipoksije pVHL ne može da veže HIF-ove i degradira ih, budući da je njihova hidroksilacija proces zavisian od kiseonika (slika 8.). To dovodi do njihove akumulacije, premeštanja u jedro, formiranja heterodimernog kompleksa sa konstitutivno eksprimiranim HIF1 $\beta$  i indukcije ciljanih gena u jedru [95]. Iako su HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$ , dva različita proteina, poseduju 48% sličnosti sekvence aminokiselina idelimično se preklapaju u aktivaciji ciljnih gena poput gena za sintezu CXCR4 [96]. Aktivirani kompleks pokreće transkripciju preko stogena među kojima su i geni za faktore rasta: transformišući faktor rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), koji je uključen u angiogenezu. Takođe indukuje sintezu eritropoetina, zaduženog za metabolizam i transport kiseonika, laktat dehidrogenaze (LDH), neophodne za glikolizu, enzima koji omogućavaju sintezu ATP nezavisnu od O<sub>2</sub> i mnogih drugih proteina koji učestvuju u ćelijskoj proliferaciji i migraciji.



Slika 8. Aktivnost HIF1 $\alpha$  u zavisnosti od prisustva kiseonika

Brojne studije dokazale su povezanost HIF1 $\alpha$  sa razvojem različitih tumora, njihovom agresivnim ponašanjem, rezistencijom na terapiju i lošom prognozom.[94-98]. U brzorastućim tumorima uvek je prisutna hipoksija, koja posredstvom HIF1 $\alpha$  omogućava kancerskim ćelijama da promene metabolizam glukoze i umesto oksidativne fosforilacije, zavisne od kiseonika, pređu na glikolizui time obezbede dovoljno energije. To je takozvani “Warburg efekat”, čime tumorske ćelije troše više glukoze. Istovremeno HIF1 $\alpha$  podstiče neoangiogenezu i metastaziranje u udaljena bolje oksigenisana tkiva transkripcionom aktivacijom onkogenih faktora poput VEGF, TGF- $\beta$ 3 i drugih. Osim hipoksije, postoje i drugi načini onkogene kiseonik-nezavisne aktivacije HIF1  $\alpha$ . Aktivacija Fosfatidil-inozitol-3 kinaze (PI3K) preko atipične serin/treonin kinaze mTOR povećava translaciju HIF1 $\alpha$ . Na nju takođe može uticati i mitogenima aktivirani RAS/RAF/MEK/ERK signalni put. Takođe je uočena povećana ekspresija HIF1 $\alpha$  u tumorima sa gubitkom p53 gena [99].

### **2.7.1. ULOGA HIF-a U PATOGENEZI RCC-a**

Jedna od čestih genetskih abnormalnosti, prisutna kod većine ccRCC je mutacija VHL gena čiji proteinski produkt posreduje ubikvitinizaciji i degradaciji HIF molekula. Zato nivo ovih transkripcionih faktora ostaje visok indukujući sintezu faktora rasta i proangiogenih proteina. HIF-1 $\alpha$  istovremeno povećava translaciju, a samim tim i ekspresiju CXCR4 i CXCL12 [98]. Svi oni dovode do proliferacije ćelija, angiogeneze i razvoja metastatskog potencijala.

Familija faktora indukovanih hipoksijom, ima izuzetno značajnu ulogu u procesu tumorigeneze bubrežnog tkiva. Brojne studije su ispitivale ulogu HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$  u kancerogenezi tumora bubrega i ponekad objavljivale kontradiktorne rezultate. U nekim studijama ccRCC-a, HIF2 $\alpha$  se pokazao kao veći stimulator tumorigeneze u odnosu na HIF1 $\alpha$  koji se sa druge strane pokazao kao tumor supresor [95]. Eksperimenti na transgenim miševima su pokazali nastanak ccRCC-a kod miševa kod kojih je HIF1 $\alpha$  bio konstitutivno eksprimiran ali ne i kod miševa sa ekspresijom HIF2 $\alpha$  [98, 100]. Literaturni podaci su različiti i kad je u pitanju uloga HIF 1 $\alpha$  i HIF 2 $\alpha$  u prognozi i preživljavanju pacijenata sa RCC-om. U nekima je ekspresija HIF1 $\alpha$  bila povezana sa dužim ukupnim preživljavanjem (*overall survival-OS*) i preživljavanjem bez recidiva bolesti (*progression free survival- PFS*). Druge su pokazale lošu prognozu kod pacijenata sa visokom ekspresijom HIF1 $\alpha$  a niskom ekspresijom HIF 2 [101]. Bez obzira na



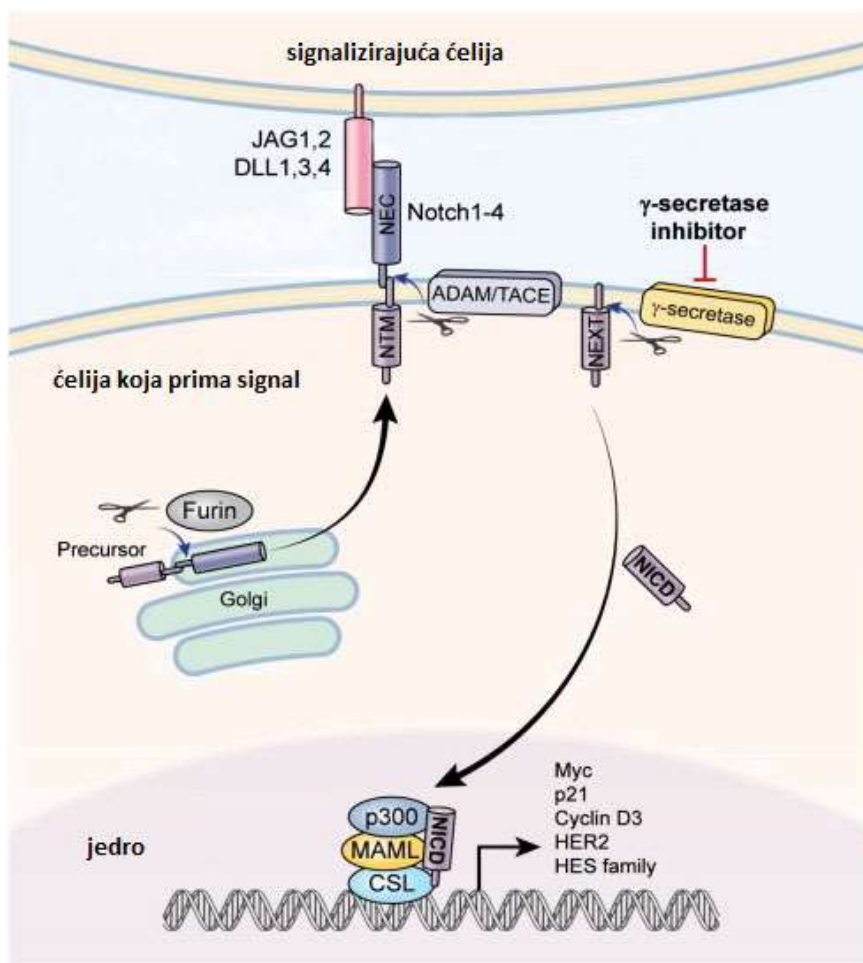
prognostički potencijal HIF1 molekula, njihova uloga u kancerogenezi RCC-a posredstvom VEGF je neosporna. Trenutni terapijski protokoli uznapredovalog RCC-a uključuju VEGF antagoniste kao što su: bevacizumab, sunitinib, sorafenib, pazopanib i axitinib. Oni svojim delovanjem smanjuju neoangiogenezu, koja je jedan od najznačajnijih mehanizama u razvoju RCC-a [95].

## 2.8. NOTCH SIGNALNI PUT

Notch signalni put je veoma konzervativan među sisarima. Učestvuje u različitim ćelijskim funkcijama, poput diferencijacije, proliferacije i apoptoze i ima važne uloge u embrionalnom razvoju, postnatalnoj hematopoezi, imunom odgovoru, angiogenezi, obnovi epitela i drugim fiziološkim i patološkim procesima. Do danas je identifikovano 4 Notch receptora (Notch1–4) i pet Notch liganda (Delta like ligand, DLL-1, DLL-3, DLL-4; Jagged1 i Jagged 2) [102]. Svi oni su transmembranski polipeptidi čiji se ekstracelularni domen aktiviradirektnim međućelijskim kontaktom. Signalni put ne uključuje amplifikaciju signala, niti postoje sekundarni glasnici. Za funkcionisanje receptora neophodna je post-translacijska obrada, isecanje pomoću furin-konvertaze u goldžijevom aparatu. Interakcija receptora jedne ćelije i liganda na površini signalizirajuće ćelije, dovodi do konformacijske promene i dva proteolitička cepanja Notch transmembranske subjedinice (*Notch transmembrane subunit NTM*). Prvo cepanje vrši se pomoću tumor nekrosis faktor- $\alpha$  konvertujućeg enzima (*TACE*), a drugo kompleksom  $\gamma$ -sekretaze. Na taj način dolazi do oslobađanja intraćelijskog domena (*Notch intracellular domain NICD*), koji se prenosi do jedra i modifikuje gensku ekspresiju. NICD se, kod ljudi, veže za proteinski kompleks na DNK (CSL, MAML, p300), čime nastaje kompleks za aktivaciju transkripcije. Ukoliko se aktiviran NCID ne veže, kompleks deluje kao transkripcijski represor [103]. Notch signalizacija utiče na brojne gene među kojima su: cyclin D1 i 3, Her2, p21, NF- $\kappa$ B, MYC, survivin, IGF1-R i drugi (*slika 9.*) [104]. To pokazuje uticaj ovog signalnog puta na diferencijaciju i dalju sudbinu različitih tipova ćelija.

Devedesetih godina prošlog veka dokazani su Notch 1 i Notch 4 receptori i njihovi ligandi na endotelnim ćelijama, a u skorije vreme pokazano je i da ovaj signalni put učestvuje u angiogenezi posredovanoj VEGF, i da mu je jedna od najranijih uloga u embriogenezi usmeravanje ćelija ka arterijskoj ili venskoj diferencijaciji. Eksperimenti na životinjama su

pokazali da gubitak Notch 1 dovodi do rane smrti embriona usled poremećene angiogeneze placente i ostalih organa [105]. Notch se pokazao i kao značajan faktor u embriogenezi bubrega. Ovaj signalni put učestvuje u odluci da li će ćelije bubrega proliferisati ili diferencirati [106]. Neki od gena na koje utiču komponente Notch signalnog puta su poznati po značajnoj ulozi u karcinogenezi [104].



Slika 9. Osnova Notch signalnog puta preuzeto i modifikovano iz reference br. 104

Notch signalizacija je povezana i sa onkogenim i sa tumor supresornim funkcijama u različitim tumorima. Nenormalna Notch signalizacija je prvi put otkrivena 1991. u akutnoj T-ćelijskoj limfoblastnoj leukemiji, gde je postojala nenormalna aktivacija Notch 1. Hromozomska translokacija izazvala je nastanak proteina kom nedostaje veći deo ekstracelularnog domena. Kasnije je otkriveno da Notch 1 deluje na gen koji kodira proto-onkogen MYC, koji dovodi do diferencijacije i smanjenja apoptoze [97, 107]. Ovaj isti mehanizam Notch 1-MYC posredovane kancerogeneze nađen je i u karcinomu dojke [108]. Eksperimenti na ćelijskim kulturama su

pokazali da Notch1 podstiče invazivnost i proliferaciju tumorskih ćelija preko PI3k/AKT/mTOR signalnog puta. Budući da hemokin CXCL12 i njegov receptor CXCR4 takođe ostvaruju svoje funkcije preko ovih mitogenom aktiviranih kinaza, dokazan je dvojni uticaj ovih molekula na agresivno ponašanje tumora [109]. Notch signalni put se pokazao značajnim za epitelno mezenhimsku tranziciju, proces pri kome epitelne ćelije dobijaju fenotipske karakteristike mezenhimnih ćelija, gube međucelijsku adhezivnost a dobijaju sposobnost migracije, što je jedan od preduslova metastaziranja kancerskih ćelija [103].

U zavisnosti od vrste tumora Notch1 može da podstiče ili suprimira rast tumora. Različite kliničke studije su povezale Notch 1 ekspresiju sa kraćim preživljavanjem pacijenata sa adenokarcinomom pluća, kolorektalnim karcinomom, gliomom i melanomom. Međutim, Notch signalni put je pokazao inhibitorni potencijal u ispitivanjima karcinoma prostate, pankreasa i jetre [110]. Literaturni podaci ukazuju na pozitivnu asocijaciju između Notch 1 ekspresije i kancerogeneze i progresije ccRCC. Eksperiment na kulturi RCC ćelijapokazao je da inhibicija Notch 1 inhibira i mTOR signalni put, dovodi do inhibicije ćelijske proliferacije i indukuje apoptozu [111].

### **3. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA**

U karcinomima bubrežnog parenhima postoji kompleksna, još uvek nedovoljno ispitana, heterogenost zbog koje čak i pacijenti sa sličnim kliničkim i patohistološkim karakteristikama mogu imati različiti tok i prognozu bolesti. Poslednjih decenija proučavani su i predlagani različiti biohemijski markeri koji bi mogli objasniti patogenezu, predvideti prognozu ili biti od koristi u ciljnoj terapiji RCC-a. Molekuli hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7, kao i njima pridruženi transkripcioni faktor HIF1 $\alpha$  i receptor Notch1 imaju važne funkcije u kancerogenezi i privlače sve veću pažnju kao potencijalne mete antikancerske terapije.

**H<sub>0</sub>- Nulta hipoteza istraživanja:** Ne postoji povezanost ekspresije ispitivanih markera sa kliničko-patološkim parametrima ccRCC i pRCC. Visoka ekspresija biomarkera nije povezana sa parametrima agresivnosti tumora niti sa kraćim periodom preživljavanja. Ako se i utvrdi postojanje određene zavisnosti, ona nije nastala pod dejstvom sistemskog faktora, već je slučajnog karaktera i nije statistički značajna;

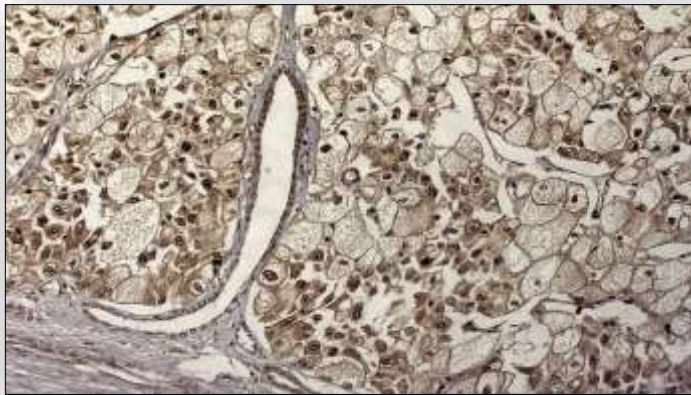
#### **Radne hipoteze istraživanja su:**

- Postoji značajna povezanost između visoke ekspresije ispitivanih markera i kliničko-patoloških parametara agresivnosti (visok histološki gradus, uznapredovali patološki stadijum, prisustvo nekroze ili sarkomatoidne diferencijacije);
- Visoka ekspresija ispitivanih markera značajno je povezana sa kraćim periodom preživljavanja pacijenata sa ccRCC i pRCC;
- Postoji značajna povezanost markera hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7 sa transkripcionim faktorom HIF1 $\alpha$  i Notch1 receptorom, budući da postoje preklapanja u signalnim putevima preko kojih oni ostvaruju svoje funkcije.

Cilj ovog istraživanja je analiza ekspresije markera hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7, transkripcionog faktora HIF1 $\alpha$  i receptora Notch1 u svetloćelijskom i papilarnom karcinomu bubrežnog parenhima.

Konkretni ciljevi predstavljenog naučnog istraživanja su:

1. Ispitati procenat ekspresije i ćelijsku lokalizaciju CXCL12 u karcinomima bubrežnih ćelija (ccRCC i pRCC) i povezanost sa kliničko-patološkim parametrima: polom, starošću pacijenata, histološkim gradusom, i pTNM i kliničkim stadijumom karcinoma;
2. Analizirati rasprostranjenost i ćelijsku lokalizaciju receptora CXCR4 i CXCR7 u ccRCC i pRCC i njihovu povezanost sa kliničko-patološkim parametrima: polom, starošću pacijenata, histološkim gradusom, Furmanovim patološkim i kliničkim stadijumom karcinoma;
3. Analizirati procenat ekspresije i ćelijsku lokalizaciju transkripcionog faktora HIF 1 $\alpha$ , koji ima ulogu u sintezi CXCR4 i čija prekomerna ekspresija može igrati kritičnu ulogu u tumorskoj progresiji posredovanoj angiogenezom;
4. Analizirati ekspresiju transmembranskog proteinskog receptora Notch1 u karcinomima bubrežnih ćelija i njegovu povezanost sa kliničko-patološkim parametrima: polom, starošću pacijenata, histološkim gradusom, patološkim i kliničkim stadijumom karcinoma;
5. Analizirati povezanost ispitivanih markera sa poznatim makro i mikromorfološkim parametrima agresivnosti (veličina tumora, vaskularna invazija, nekroza, hemoragija, sarkomatoidna diferencijacija);
6. Analizirati međusobnu povezanost ekspresije receptora CXCR4 i CXCR7 sa njihovim ligandom CXCL12 u ccRCC i pRCC;
7. Ispitati međusobni odnos ekspresije HIF 1 $\alpha$  i Notch 1, i receptora CXCR4 i CXCR7 u ccRCC i pRCC ;
8. Budući da ccRCC i pRCC vode zajedničko poreklo od ćelija proksimalnih tubula, analizirati razliku u ekspresiji i lokalizaciji ispitivanih markera u ova dva tipa tumora.
9. Utvrditi povezanost imunohistohemijske ekspresije CXCL12 i njegovih receptora CXCR4 i CXCR7, kao i sa njima udruženih molekula HIF1 $\alpha$  i Notch1, sa dužinom preživljavanja pacijenata nakon postavljanja dijagnoze bolesti.



## **4. MATERJALI I METODE**

U ovom istraživanju korišćeni su tkivni uzorci bubrega 98 pacijenata ukalupljeni u parafinske blokove. Uzorci su dobijeni nakon radikalne nefrektomije, sprovedene na Klinici za urologiju Kliničkog centra u Nišu u periodu od 2014 do 2018 godine. Operativni materijal je obrađen, fiksiran u formalinu, kalupljen u parafinu i bojenhematoksilin-eozinom (H&E). Patohistološka dijagnoza postavljena je u Centru za patologiju i patološku anatomiju Kliničkog centra u Nišu. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Istraživanje je dobilo odobrenje Etičkog odbora Kliničkog centra u Nišu (br. 21013/5), kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (br.12-8818-2/1).

### **4.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL**

Studija je obuhvatila 98 pacijenata, od toga 64 muškog i 34 ženskog pola 85 ispitanika (86.7%) imalo je dijagnozu ccRCC i 13 (13.3%) dijagnozu pRCC. Srednja starost pacijenata bila je 63.16 godina, sa brojčanom dominacijom pacijenata muškog pola. 52 slučaja svetloćelijskog RCC-a (61.2%) i 12 slučajeva papilarnog (92.3%) bili su muškog pola. Za svakog pacijenta su prikupljeni sledeći kliničko-morfološki podaci: pol, godine starostii, stadijum tumora, histološki gradus tumora, histopatološki tip tumoraveličina (dimenzije u cm) tumora, preživljavanje (u mesecima) i datum smrti, ukoliko je došlo do fatalnog ishoda tokom perioda praćenja. U istraživanje su uključeni samo pacijenti kod kojih su podaci bili dostupni. Srednje vreme praćenja pacijenata bilo je  $35.2 \pm 19.3$  meseca (srednja vrednost 32 meseca).

## **4.2 HISTOPATOLOŠKA ANALIZA**

Iz arhive Centra za patologiju Kliničkog centra u Nišu izdvojeni su parafinski kalupi na kojima je postavljena dijagnoza slučajeva od interesa u periodu od 2014. do 2019. godine. Od dostupnog ukalupljenog materijala svakog pacijenta, napravljeni su histološki preseći, koji su zatim bojani standardnom hematoksilin-eozin (HE) metodom i histopatološki analizirani. Patološka klasifikacija tumora bubrega izvršena je u skladu sa Klasifikacijom Svetske Zdravstvene organizacije iz 2016. godine [1], a za određivanje patološkog stadijuma bolesti korišćeno je osmo izdanje TNM Klasifikacije malignih tumora [38]. Od ukupnog broja uzoraka 85 je imalo dijagnozu svetloćelijskog karcinoma ccRCC a 13 papilarnog RCC, od toga 10 papilarnog tipa 2, a tri papilarnog tipa 1. HE preseći korišćeni su za detaljnu analizu patohistoloških parametara: histološkog tipa tumora, histološkog gradusa tumora, prisustva vaskularne invazije, zapaljenja, nekroze i sarkomatoidne diferencijacije. Za svaki slučaj odabran je reprezentativni kalup koji je u sebi sadržao tumorsko tkivo kao i susedno zdravo tkivo bubrega u cilju unutrašnje pozitivne kontrole.

## **4.3. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA**

### **4.3.1 IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE**

Sa svakog izabranog kalupa, na mikrotomu su isečeni preseći debljine 4 $\mu$ m. Uzorci su zatim deparafinirani u ksilolu i rehidratirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (100%, 95% i 70% etanol). Proteolitička digestija tj. demaskiranje antigena za sva bojenja izvedeno je potapanjem histoloških pločica u rastvor citratnog pufera (pH 6.0) i njihovim zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 20 minuta. Nakon hlađenja, blokadaaktivnosti endogene peroksidaze postignuta je imerzijom histoloških pločica u 3% rastvor vodonik peroksida u metanolu. Za ručno imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (Mouse and Rabbit Specific HRP Plus (ABC) Detection IHC Kit – Ready to use; Abcam ab93697). Nakon detaljnog ispiranja 0.01M fosfatnim puferom (PBS), na preseke su naneta primarna antitela, koja su, po preporuci proizvođača, inkubirana preko noći na temperaturi od 4°C. Antitela, proizvođača Abcam, korišćena za imunohistohemijska bojenja prikazana su u Tabeli 5.

Tabela 5. Antitela korišćena za imunohistohemijsku analizu

Ciljni antigen	Klon	tip	razblaženje	Celularna lokalizacija
<b>CXCL12</b>	ab9797	zečje poliklonalno	<b>1:500</b>	Citoplazmatska/ membranska
<b>CXCR4</b>	ab124824	zečje monoklonalno	<b>1:250</b>	Citoplazmatska/ membranska
<b>CXCR7</b>	ab72100	zečje poliklonalno	<b>1:300</b>	Citoplazmatska/ membranska
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	ab2185	zečje poliklonalno	<b>1:250</b>	Citoplazmatska/ membranska/jedarna
<b>Notch1</b>	ab52627	zečje monoklonalno	<b>1:150</b>	Citoplazmatska/ membranska

Za detekciju reakcije antitela sa odgovarajućim antigenom, korišćen je standardni avidin-biotin imunoperoksidazni kompleks. Nakon inkubacije i ispiranja PBS-om, na pločice se nanosi sekundarno biotinizirano antitelo, a zatim i streptavidin-peroksidaza. Vizuelizacija reakcije postignuta je korišćenjem hromogenog supstrata 3,3 diaminobenzidina (DAB). Na kraju je izvršeno kontrastiranje preseka bojenjem histoloških detalja pozadine Majerovim hematoksilinom. Za sva antitela okolno zdravo tkivo na histološkoj pločici služilo je kao pozitivna kontrola (*slika 10.*).

#### 4.3.2. INTERPRETACIJA IMUNOHISTOHEMIJSKOG BOJENJA

Analiza i interpretacija imunohistohemijski obojenih pločica izvedena je na svetlosnom mikroskopu (Leica). Budući da je u većini slučajeva bila prisutna izražena intratumorska heterogenost u pogledu intenziteta i lokalizacije ekspresije (membranska ili citoplazmatska) kao i procenta pozitivnih ćelija, za analizu je korišćen u literaturi opisan Histoskor koji je u obzir uzimao intenzitet, procenat ekspresije i sva vidna polja uzorka [106, 112-114]. Za svaki od ispitivanih markera nezavisno je ispitivana citoplazmatska i membranska ekspresija. Za procenu intenziteta kao pozitivna kontrola, korišćena je ekspresija markera na zdravim tubulima (*slika 10*). Intenzitet precipitiranog braon pigmenta gradiran je skalom od 0 do 3, gde je 0 odsustvo bojenja, 1 – slabo prebojavanje, 2 – bojenje umerenog intenziteta i 3 – bojenje jakog intenziteta, za citoplazmatsko bojenje dok je za membransko bojenje 1 označavala diskretnu necirkumferentnu membransku ekspresiju, 2 – cirkumferentno linearno bojenje umerenog intenziteta i 3 – intenzivno cirkumferentno bojenje. Za svako vidno polje određivan je procenat ćelija sa pozitivnom ekspresijom. Histoskor u opsegu od 0-300 izračunavan je za membransku i citoplazmatsku ekspresiju svakog uzorka po formuli:

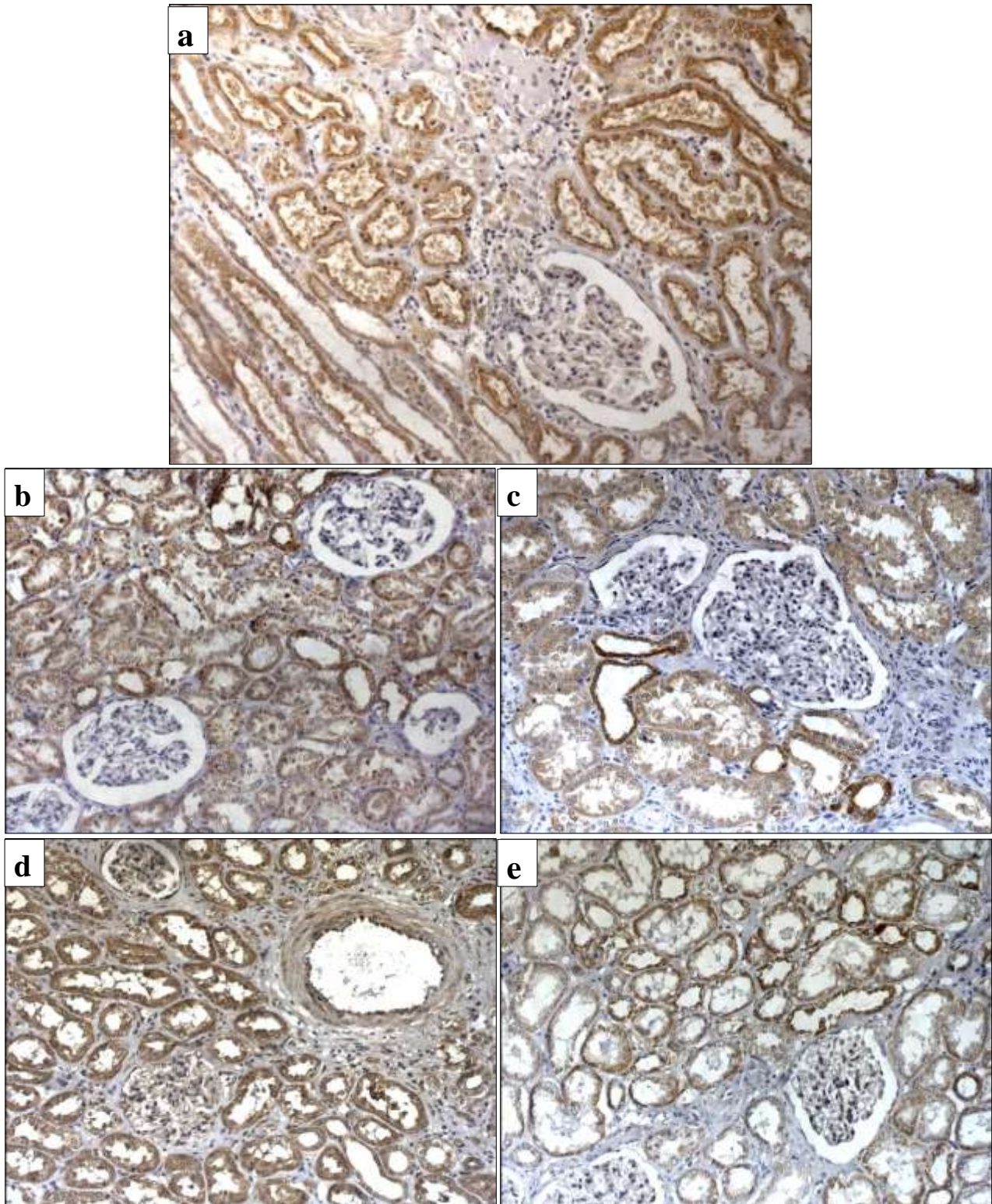


**Histoskor** = ((1×% ćelija sa ekspresijom slabog intenziteta) +(2× %ćelija sa ekspresijom umerenog intenziteta) +(3× % intenzivno prebojenih ćelija)/ broj ispitivanih polja.

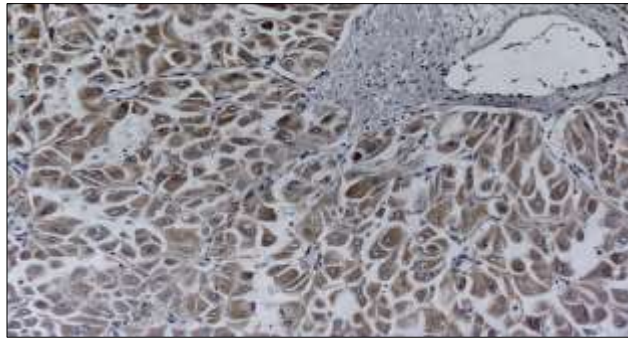
#### 4.4. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza podataka izvršena je upotrebom programskog paketa SPSS (Statistical Package for Social Sciences -SPSS 21.0; Chicago, IL, USA). Povezanost ekspresije markera i kliničkopatoloških karakteristika ispitivana je  $\chi^2$ -testom. Korelacija između kontinuiranih varijabli je procenjivana na osnovu Pearson-ovog ili Spearman-ovog koeficijenta korelacije, u zavisnosti od normalnosti distribucije varijabli. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom ili medijanom sa interkvartilnim opsegom (u zavisnosti od normalnosti raspodele), za kontinuirane promenjive, ili kao apsolutni broj sa frekvencijom za kvalitativne promenjive. Normalnost distribucije određivana je na osnovu skupa osobina raspodele (asimetrija, spljoštenost, prisustvo ekstremnih vrednosti, Shapiro-Wilk test). Nezavisni prediktori zavisnih varijabli su identifikovani pomoću modela linearne regresije. Na osnovu analize ROC krive (receiver operating characteristic-ROC) utvrđene su optimalne cut-off vrednosti i diskriminatorska sposobnost histoskora. Roc krive za multiple varijable su konstruisane na osnovu verovatnoće, dobijene modelom binarne logističke regresije. Upotrebom MedCalc programa (v. 19.0; MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) urađen je DeLong test u cilju komparacije dobijenih ROC-kriva.

Ukupno vreme preživljavanja pacijenata (OS – overall survival) izraženo je u mesecima i definisano kao vremenski interval od terapijsko-dijagnostičke nefrektomije do poslednje kontrole ili smrti. Analiza preživljavanja vršena je upotrebom Kaplan-Majerovih kriva (sa Log-rank testom) i Cox-regresionim modelima. Prag značajnosti  $p < 0,05$  smatran je statistički značajnim.



Slika 10. Pozitivna ekspresija tubula zdravog bubrega korišćena kao interna kontrola **a**. CXCR7x200; **b**. CXCR4x 200; **c**. CXCL12 x200; **d**. HIF1 $\alpha$  x 200 **e**. Notch 1 x 200.



## 5. REZULTATI

### 5.1. Kliničko-patološke karakteristike pacijenata

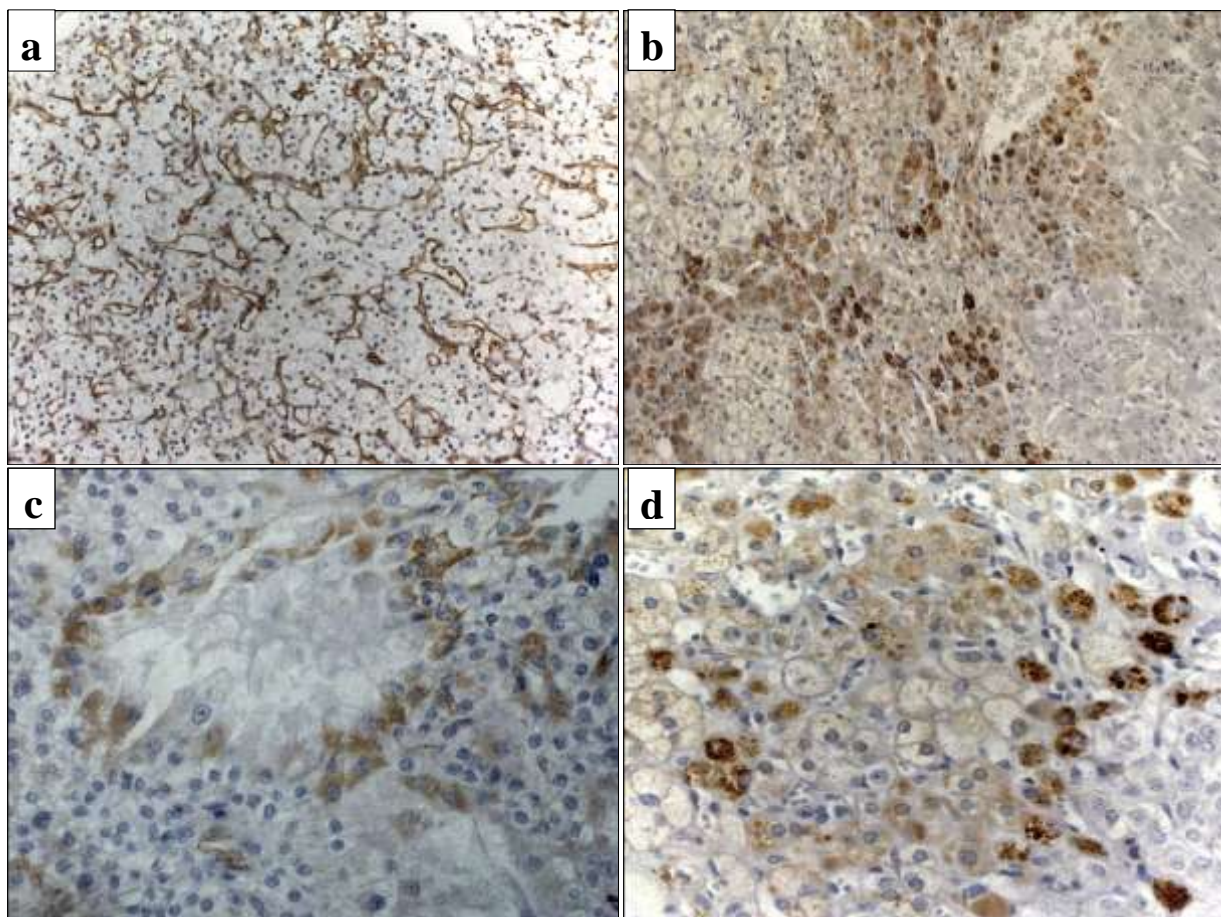
Ova studija je obuhvatila 98 tkivnih uzoraka RCC-a. Od toga 85 (86.7%) ccRCC i 13 (13.3%) pRCC. Osnovne karakteristike tumora i pacijenata prikazane su u tabeli 6. U vreme postavljanja dijagnoze, najmlađi pacijent imao je 31 godinu a najstariji 82. Pacijenti muškog pola su bili brojniji sa 52 slučaja svetloćelijskog RCC-a (61.2%) i 12 slučajeva papilarnog (92.3%). 33 slučaja cRCC je bilo ženskog pola (38,8%), a samo 1 slučaj pRCC (7,7%). Papilarni tumori su bili većeg gradusa ( $p < 0.001$ ), pTNM stadijuma ( $p < 0.05$ ) i kliničkog stadijuma ( $p < 0.01$ ).

Tabela 6. Osnovne karakteristike pacijenata i tumora u zavisnosti od tipa tumora.

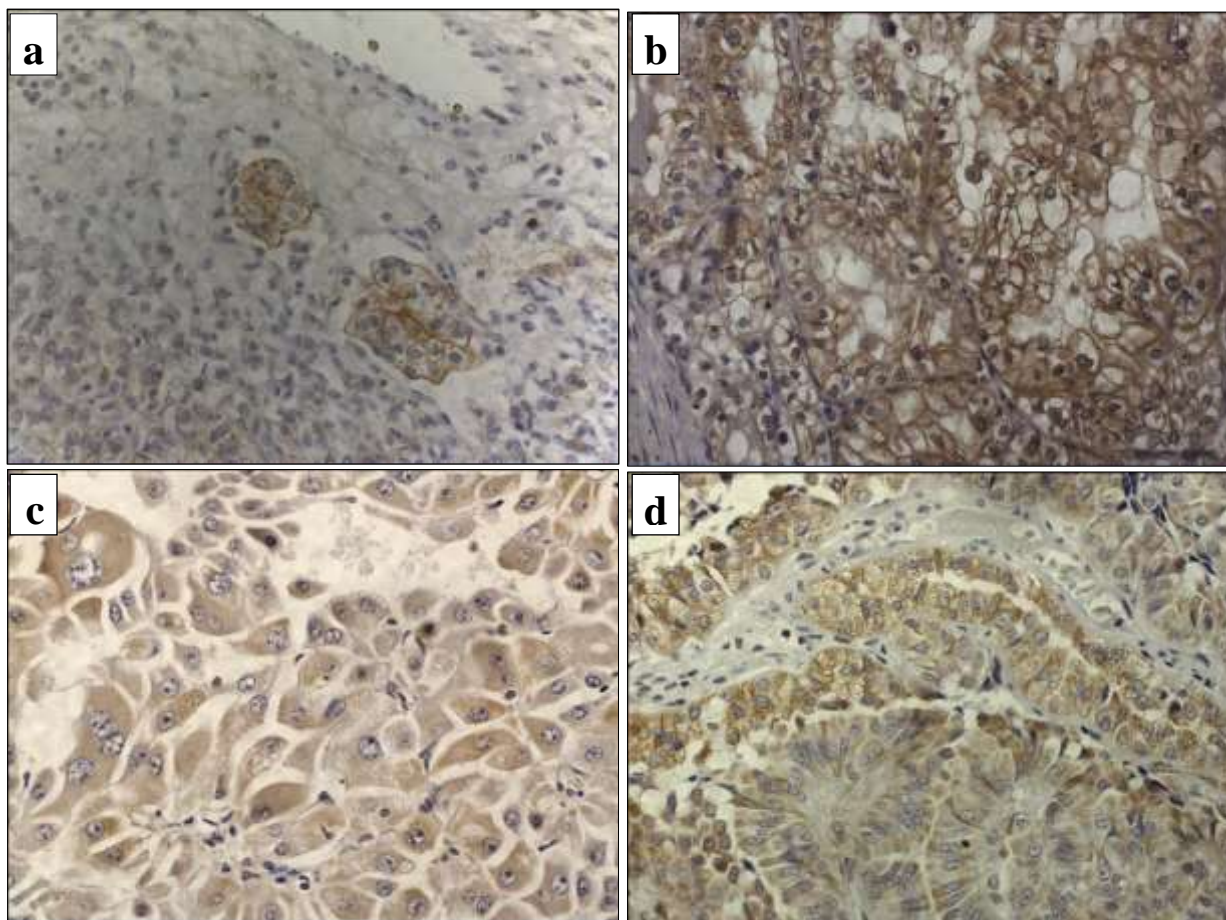
	Papillary tumours (mean±SD* or M(IQ)** or N(%)***)	ccRCC (mean±SD* or M(IQ)** or N(%)***)	t* or Z** or $\chi^2$ *** (p)
starost (godine)	62.77±14.06	63.22±10.95	0.134 (0.894)*
pol (muški)	12 (92.3%)	52 (61.2%)	<b>3.547 (0.031)***</b>
Veličina tumora (cm)	6.82±2.46	6.03±2.44	1.095 (0.276)*
Histološki gradus	I	2 (15.4%)	6.553 (0.088)* <b>23.235</b> <b>(0.000)***</b>
	II	5 (38.5%)	
	III	4 (30.8%)	
	IV	2 (15.4%)	
pTNM klasifikacija	T1a	2 (15.4%)	2.271 (0.025)* <b>13.229</b> <b>(0.010)***</b>
	T1b	2 (15.4%)	
	T2a	1 (7.7%)	
	T2b	4 (30.8%)	
	T3	4 (30.8%)	
Klinički stadijum	I	4 (30.8%)	3.040 (0.002)** <b>15.875</b> <b>(0.001)***</b>
	II	2 (15.4%)	
	III	6 (46.2%)	
	IV	1 (7.7%)	
Nekroza(da)	8 (61.5%)	44 (52.4%)	0.101 (0.568)***
Sarkomatoidna diferencijacija (da)	4 (30.8%)	12 (14.1%)	1.232 (0.218)***

## 5.2. Analiza pozitivne ekspresije biomarkera

Pozitivna i negativna ekspresija analiziranih markera prikazana je u *tabeli 7.* CXCR4 ekspresija detektovana je ne samo u tumorskom parenhimu, već i u okolnoj tumorskoj stromi, gde je reakcija bila fokalno pozitivna u endotelnim ćelijama i fibrilarnim komponentama ekstracelularnog matriksa slika. Citoplazmatska CXCR4 ekspresijam prisutna u 61 uzorku, dominantno je bila fokalna u vidu grubogranuliranog mrkog prebojavanja (*slika 14.*). Veći intenzitet kao i veći procenat pozitivnosti viđen je u tomorima većeg histološkog gradusa. Pozitivna membranska ekspresija CXCR4, uočena je u 66 slučajeva i povezana sa svetloćelijskim tipom ( $\chi^2=4.237$ ,  $p<0.05$ ) (tabela 7.) i većim kliničkim stadijumom ( $Z=2.234$ ,  $p<0.05$ ). CcRCC ima 4 puta veću verovatnoću pozitivne membranske CXCR4 ekspresije ( $p<0.05$ ,  $R^2=5.3-7.4\%$ ). Interesantan nalaz bila je membranska pozitivnost u metastatskim deponitima (*slika 15.*).



*Slika 14. Ekspresija CXCR4 biomarkera a. Pozitivna tumorska stroma (x200); b. Fokus citoplazmatske pozitivnosti različitog intenziteta; c. i d. pojedinačne pozitivne ćelije (x400)*

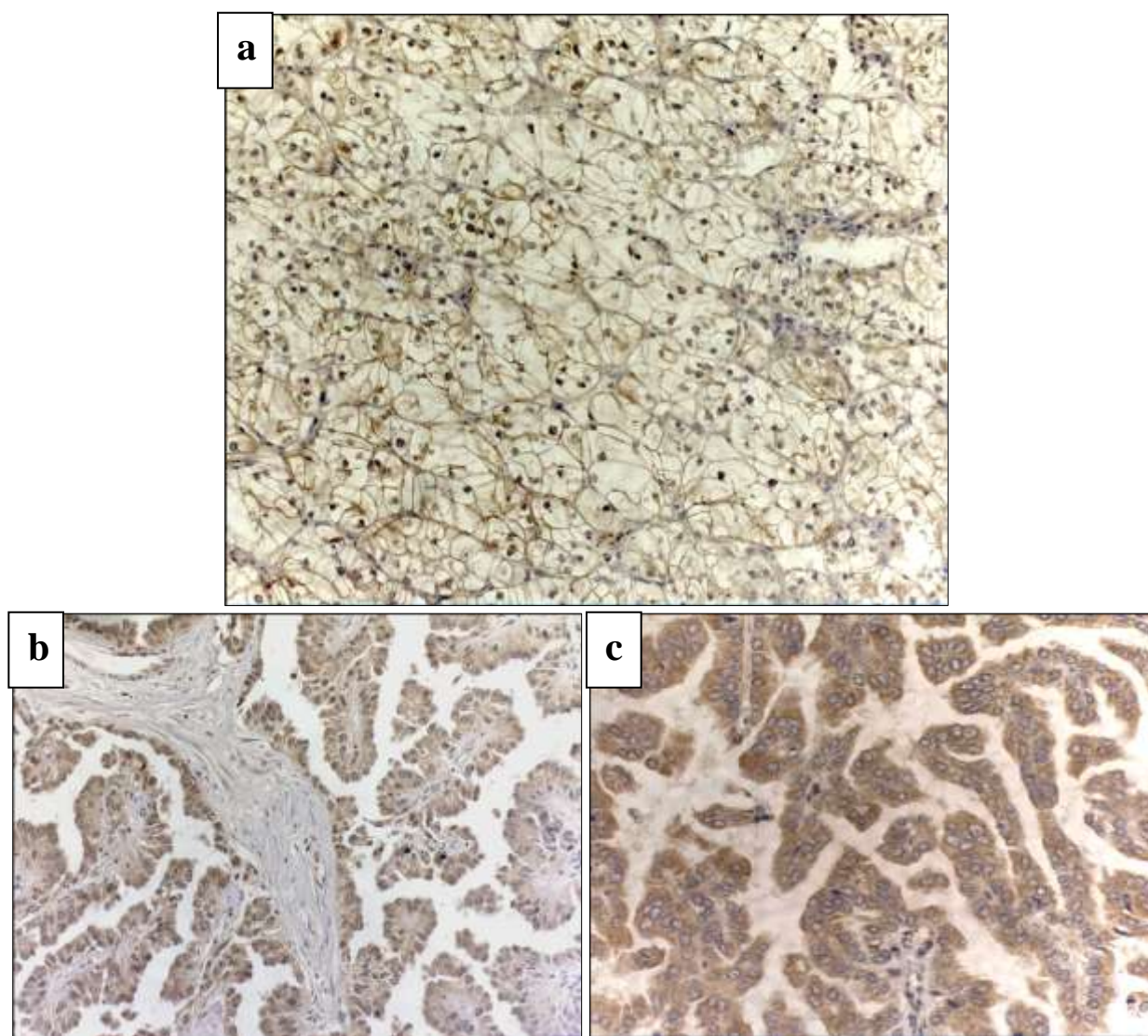


Slika 15. **a.** Pozitivno CXCR4 membransko bojenje metastatskih depozita (x400); **b.** Dominantna membranska CXCR4 pozitivnost (x400); **c.** Intenzivna citoplazmatska CXCR4 ekspresija u tumoru visokog gradusa (x400); **d.** Zrnasta citoplazmatska ekspresija u pRCC-u (x200).

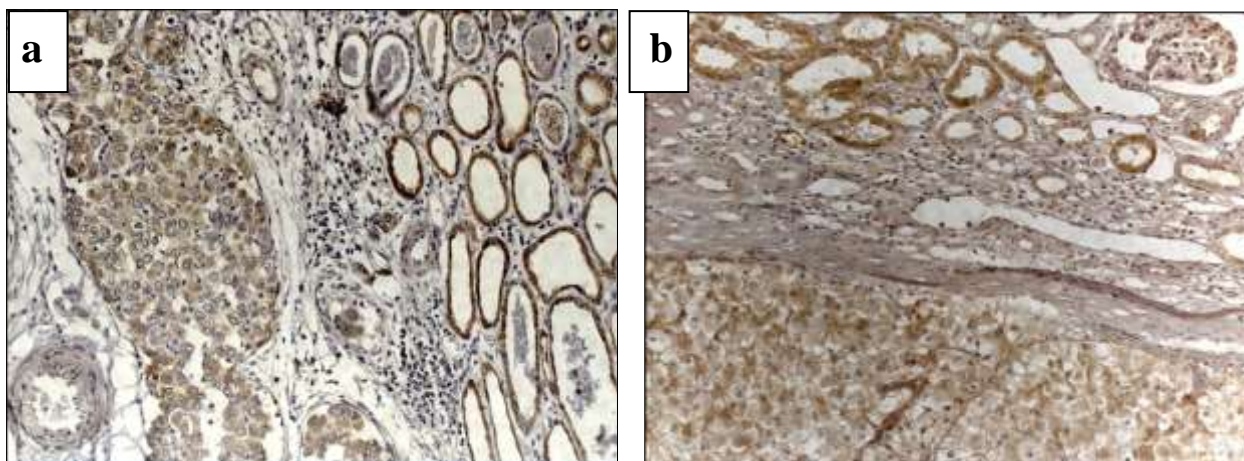
Tabela 7. Pozitivna i negativna ekspresija biomarkera

	Negativna (N (%))	Pozitivna (N (%))
CXCL12M	4 (4.1%)	94 (95.9%)
CXCL12C	8 (8.2%)	90 (91.8%)
CXCR4M	32 (32.7%)	66 (67.3%)
CXCR4C	37 (37.8%)	61 (62.2%)
CXCR7M	7 (7.1%)	91 (92.9%)
CXCR7C	13 (13.3%)	85 (86.7%)
Notch1M	38 (38.8%)	60 (61.2%)
Notch1C	41 (41.8%)	57 (58.2%)
HIF1 $\alpha$ M	21 (21.4%)	77 (78.6%)
HIF1 $\alpha$ C	25 (25.5%)	73 (74.5%)

CXCL12 je imao pozitivnu membransku ekspresiju u 94 uzorka. Pozitivna citoplazmatska CXCL12C ekspresija uočena je u 90 uzoraka i povezana sa većim gradusom tumora ( $t=2.355$ ,  $p<0.05$ ), pretežno u vidu homogenog, ređe fino granuliranog prebojavanja braon ili zlatno smeđe boje. Intenzivna, difuzna, homogena prebojenost visokog intenziteta, uočena je u svim slučajevima tumora papilarnog tipa (*slike 16. i 17.*) (tabela 7.).

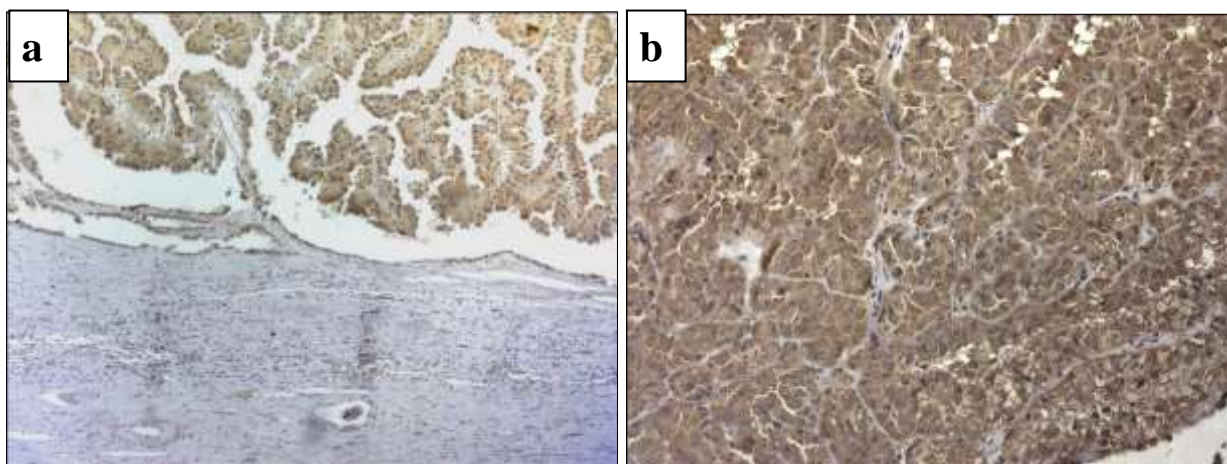


*Slika 16. Ekspresija CXCL12 a. Slaba membranska pozitivnost u ccRCC (x200) b. i c. Citoplazmatska pozitivnost u pRCC (x 200 i x 400).*

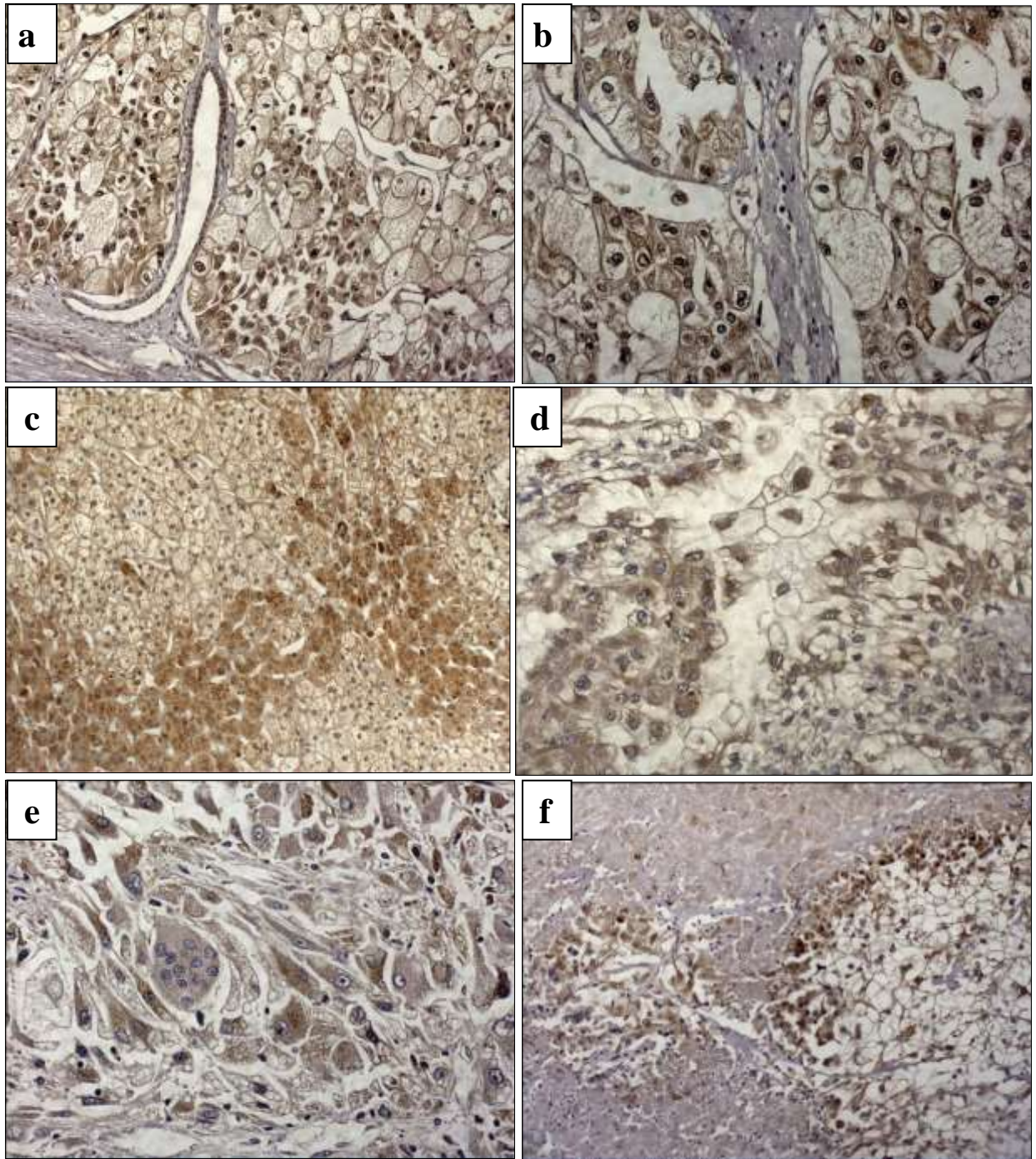


Slika 17. **a.** i **b.** Komparacija pozitivne tumorske ekspresije sa zdravim tkivom koje predstavlja pozitivnu kontrolu (x 200).

Pozitivna membranska CXCR7 ekspresija detektovana je u 91 slučaju, dok je 85 imalo citoplazmatsku pozitivnost dominantno u vidu fino granuliranog prebojavanja braon boje u tumorima ccRCC tipa, i u vidu intenzivnog homogenog bojenja u tumorima pRCC tipa (slika 18.). Pozitivna CXCR7M ekspresija je povezana sa ccRCC tipom ( $\chi^2=3.302$ ,  $p<0.05$ ), (tabela 7.) a pozitivna CXCR7C sa većim TNM stadijumom ( $t=2.944$ ,  $p<0.01$ ). CcRCC tip ima 6 puta veću verovatnoću pozitivne membranske CXCR7 ekspresije ( $p<0.05$ ,  $R^2=4.1-10.3\%$ ). Uočena je intenzivna prebojenost ćelija koje okružuju područja tumorske nekroze (slika 19.).



Slika 18. Ekspresija CXCR7 **a.** Ekspresija u pRCC (x100); **b.** Pozitivnost u pRCC visokog intenziteta 3+ (x200 );



Slika 19. **a, b, c, d.** Heterogena membranska i citoplazmatska CXCR7 pozitivnost u ccRCC (**a** i **e** x 200, **b** i **d** x400), **e.** Pozitivna CXCR7 ekspresija u ccRCC visokog gradusa (x 400), **f.** CXCR7 pozitivne ćelije okružuju polja nekroze (x200).



Tabela 8. Pozitivna ekspresija biomarkera u odnosu na tip tumora

	pRCC (mean±SD* or M(IQ)**)	ccRCC (mean±SD* or M(IQ)**)	$\chi^2$ (p)
CXCL12M	11 (84.6%)	83 (97.6%)	2.129 (0.084)
CXCL12C	13 (100.0%)	77 (90.6%)	0.373 (0.592)
CXCR4M	5 (38.5%)	61 (71.8%)	<b>4.273 (0.026)</b>
CXCR4C	9 (69.2%)	52 (61.2%)	0.063 (0.761)
CXCR7M	10 (76.9%)	81 (95.3%)	<b>3.302 (0.047)</b>
CXCR7C	13 (100.0%)	72 (84.7%)	1.156 (0.206)
Notch1M	1 (7.7%)	59 (69.4%)	<b>15.586 (0.000)</b>
Notch1C	9 (69.2%)	48 (56.5%)	0.321 (0.548)
HIF1 $\alpha$ M	4 (30.8%)	73 (85.9%)	<b>17.200 (0.000)</b>
HIF1 $\alpha$ C	13 (100.0%)	60 (70.6%)	<b>3.702 (0.035)</b>

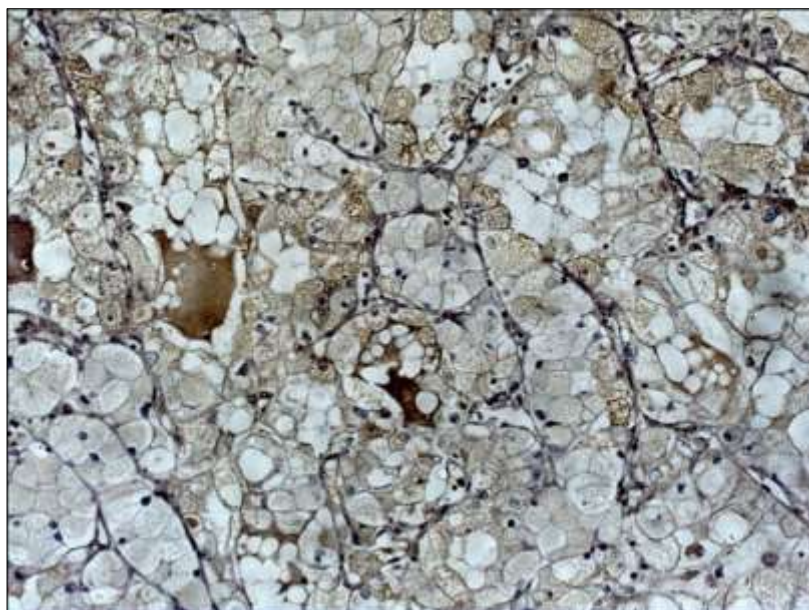
Upoređujući prisustvo pozitivne ekspresije biomarkera između dva tipa tumora (*tabela 8.*), nađeno je da su ccRCC tumori asocirani sa većom učestalošću pozitivne ekspresije: CXCR4M ( $p<0.05$ ), CXCR7M ( $p<0.05$ ), Notch1M ( $p<0.001$ ) i HIF1 $\alpha$ M ( $p<0.001$ ). Većaučestalost pozitivne HIF1 $\alpha$ C ( $p<0.05$ ) ekspresije nađena je kod tumora pRCC tipa.

I citoplazmatska i membranska ekspresija Notch1 receptora bila je zastupljena u manjem broju slučajeva (*tabela 7.*) Bez membranske Notch1 ekspresije bilo je 38 uzoraka, od toga 12 (93.3%) tumora pRCC tipa (*tabela 8.*). Bez citoplazmatske ekspresije bio je 41 uzorak (*slike 20.-22.*). Dominirala je fokalna prebojenost slabijeg intenziteta. Membranska Notch1M pozitivnost bila je povezana sa svetloćelijskim tipom ( $p<0.001$ ), manjim TNM stadijumom ( $p<0.05$ ) i manjim kliničkim stadijumom ( $p<0.01$ ), dok je citoplazmatska NOTCH1 pozitivnost bila povezana sa većim histološkim gradusom ( $p<0.05$ ).

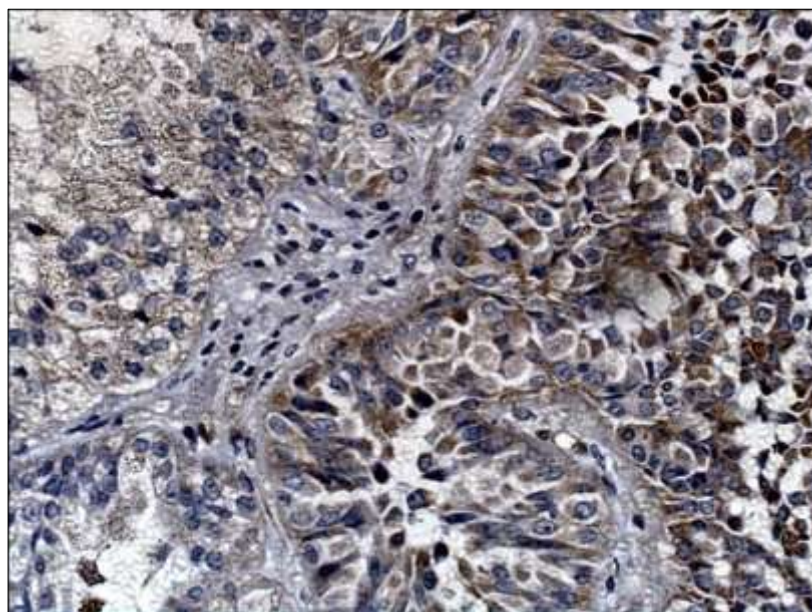
Iako je model univarijantne binarne logističke regresije identifikovao 3 potencijalna prediktora pozitivne membranske NOTCH1 ekspresije, u multivarijantnom modelu ( $\chi^2=23.511$ ,  $p<0.001$ ,  $R^2=21.3-28.9\%$ ), uključene su samo 2 promenjive usled visoke kolinearnosti pTNM i kliničkog stadijuma, koje su se zatim pokazale i kao nezavisni prediktori. CcRCC tumori imaju 20 puta veću verovatnoću pozitivne membranske ekspresije Notch1 receptora ( $p<0.01$ ), dok se sa svakim stadijumom verovatnoća pozitivne ekspresije smanjuje 1.8 puta ( $p<0.05$ ) (*tabela 9.*).

*Tabela 9. Binarna logistička regresija membranske pozitivnosti Notch1M*

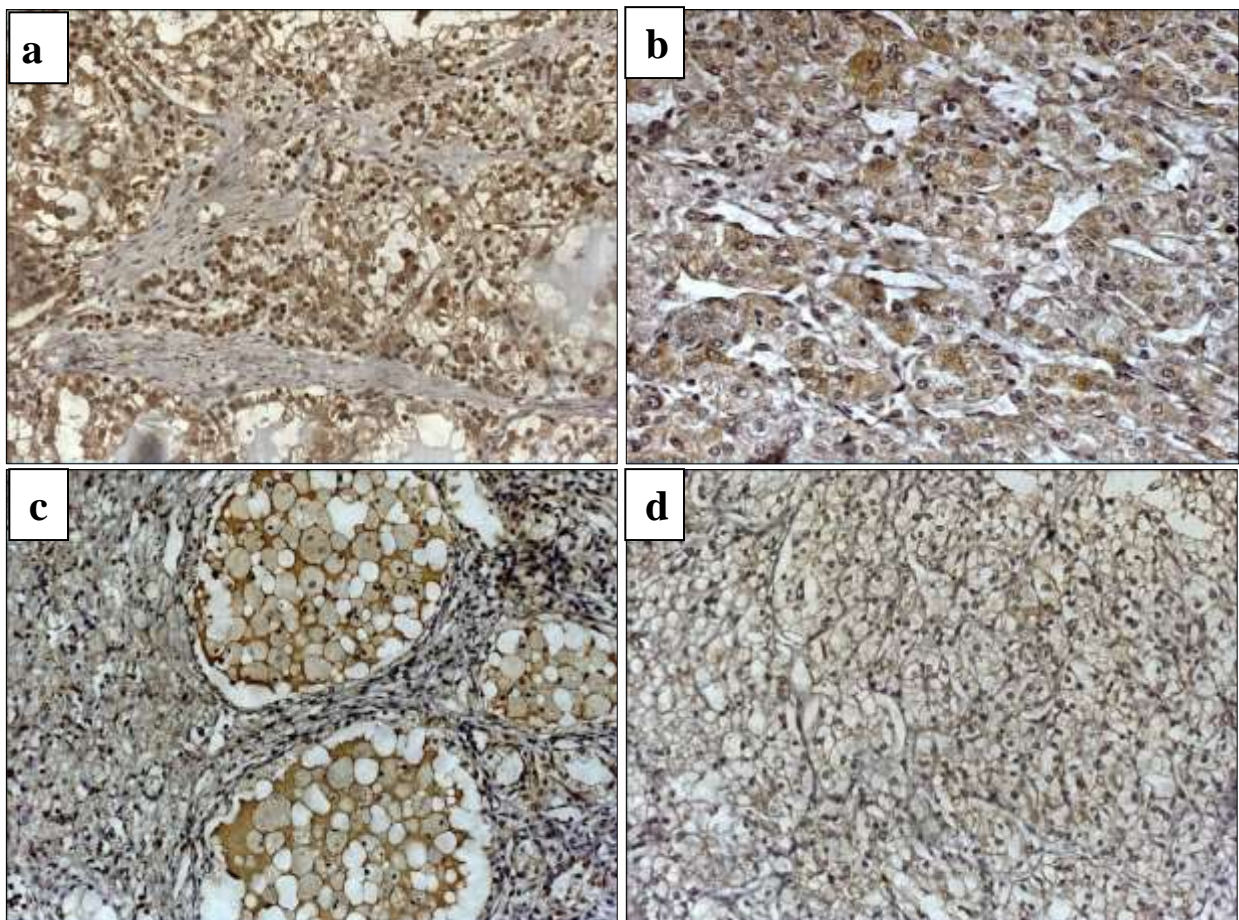
	Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI of OR)	p	OR (95% CI of OR)	p
Tip tumora (pRCC vs. ccRCC)	0.037 (0.005-0.297)	0.002	<b>0.051 (0.006-0.427)</b>	<b>0.006</b>
TNM stadijum	0.731 (0.544-0.984)	0.039		
Stadium (I-IV)	0.437 (0.256-0.746)	0.002	<b>0.541 (0.301-0.971)</b>	<b>0.040</b>



*Slika 20. slaba membranska i slaba granularana citoplazmaska Notch1 pozitivnost u ccRCC-u (x 200).*



*Slika 21. Notch1 ekspresija većeg intenziteta u pRCC-u (x400)*



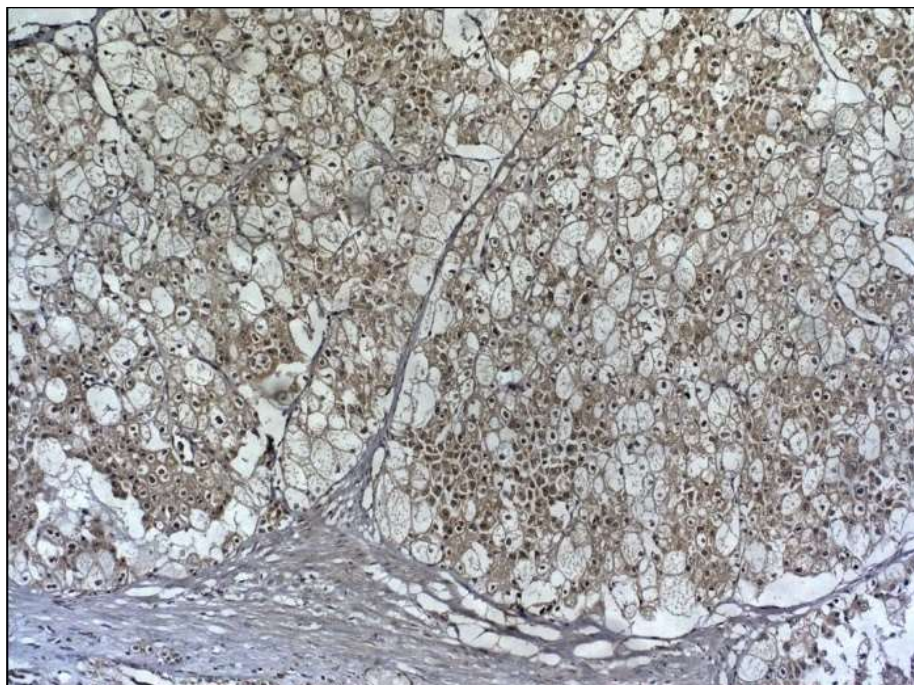
Slika 22. Heterogenost Notch1 ekspresije u ccRCC-ua. **i b.** Sporadična citoplazmatska pozitivnost (x200 i x400) **c.** tumorski depoziti pokazuju membransku i slabu citoplazmatsku pozitivnost (x 200) **d.** slaba membranska pozitivnost (x 200).

77 (78.6%) uzoraka ispoljilo je pozitivnu membransku (HIF1 $\alpha$ M) a 73 (74.5%), pozitivnu citoplazmatsku (HIF1 $\alpha$ C) ekspresiju (tabela 7.). Membranski obrazac imunohistohemijske reaktivnosti HIF1 $\alpha$ M povezan je sa svetloćelijskim tipom tumora ( $\chi^2=17.200$ ,  $p<0.001$ ) (tabela 8.), odsustvom sarkomatoidne diferencijacije ( $\chi^2=4.185$ ,  $p<0.05$ ) i nižim kliničkim stadijumom ( $Z=2.398$ ,  $p<0.05$ ). Nasuprot tome, pozitivna citoplazmatska ekspresija HIF1 $\alpha$ C je povezana sa većim pTNM stadijumom ( $t=2.629$ ,  $p<0.05$ ), većim tumorskim gradusom ( $t=2.022$ ,  $p<0.05$ ) i papilarnim tipom tumora ( $\chi^2=3.702$ ,  $p<0.05$ ). Svi uzorci pRCC eksprimirali su homogenu braon prebojenost visokog intenziteta. Uočena je pozitivna prebojenost metastatskih depozita u krvnim sudovima ili masnom tkivu. Izražena citoplazmatska ekspresija uočena je i džinovskim bizarnim ćelijama tumora visokog gradusa (slike 23-26.).

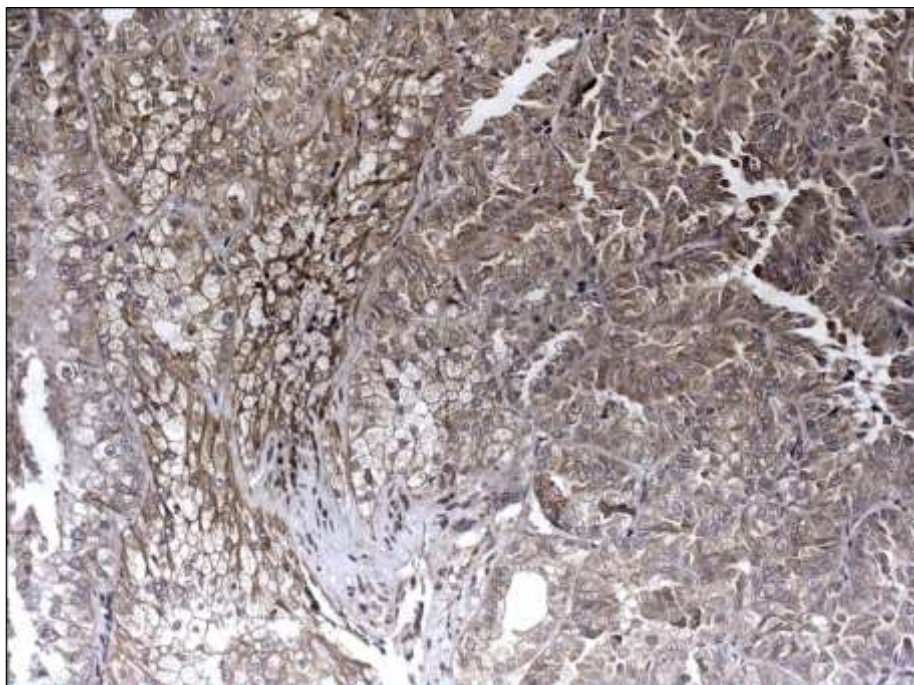
Upotrebom univarijantne binarne logističke regresije izdvojena su 4 potencijalna prediktora pozitivne membranske HIF1 $\alpha$  ekspresije: ccRCC tip tumora, ( $0 < 0.001$ ), niži pTNM stadijum ( $p < 0.05$ ), odsustvo sarkomatoidne diferencijacije ( $p < 0.05$ ) i niži klinički stadijum ( $p < 0.05$ ). Multivarijantni model ( $\chi^2 = 20.325$ ,  $p < 0.001$ ), koji predviđa 18.7-29.0% varijanse HIF1 $\alpha$ M pozitivnosti, identifikovao je tip tumora kao jedini nezavisni prediktor: ccRCC tumori, u odnosu na papilarne, imaju 11.6 puta veću verovatnoću da ekspimiraju HIF1 $\alpha$  membransku pozitivnost ( $p < 0.001$ ). Jedini statistički značajan prediktor pozitivne citoplazmatske ekspresije ovog markera bio je veći pTNM stadijum ( $\chi^2 = 5.232$ ,  $p < 0.05$ ), uključen sa 5.2-7.7% u varijansu zavisne promenjive: Sa svakim narednim pTNM stadijumom verovatnoća da tumor ispolji citoplazmatsku HIF1 $\alpha$  pozitivnosti je 1.513 (1.035-2.212) puta veća ( $p < 0.05$ ) (tabela 10.)

Tabela 10. Binarna logistička regresija membranske pozitivnosti HIF1 $\alpha$ M

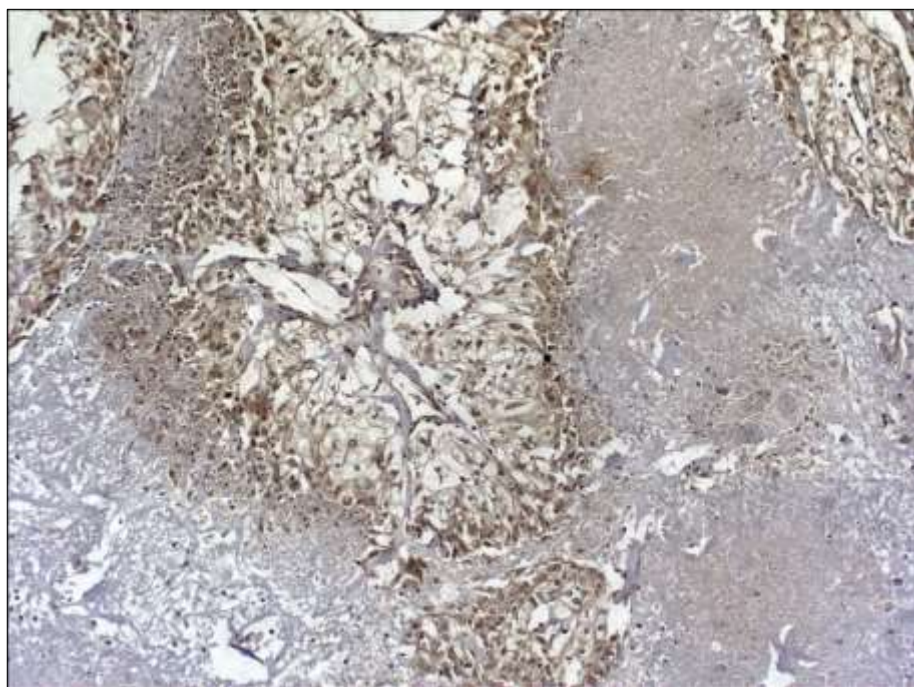
	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI of OR)	p	OR (95% CI of OR)	p
Tumour type (papillary vs. ccRCC)	0.073 (0.019-0.275)	0.000	<b>0.086 (0.020-0.363)</b>	<b>0.001</b>
TNM stage	0.692 (0.491-0.974)	0.035	0.844 (0.434-1.641)	0.617
Sarcomatoid differentiation	0.265 (0.084-0.830)	0.023	0.357 (0.088-1.449)	0.149
Stadium (I-IV)	0.502 (0.291-0.866)	0.013	1.026 (0.336-3.129)	0.964



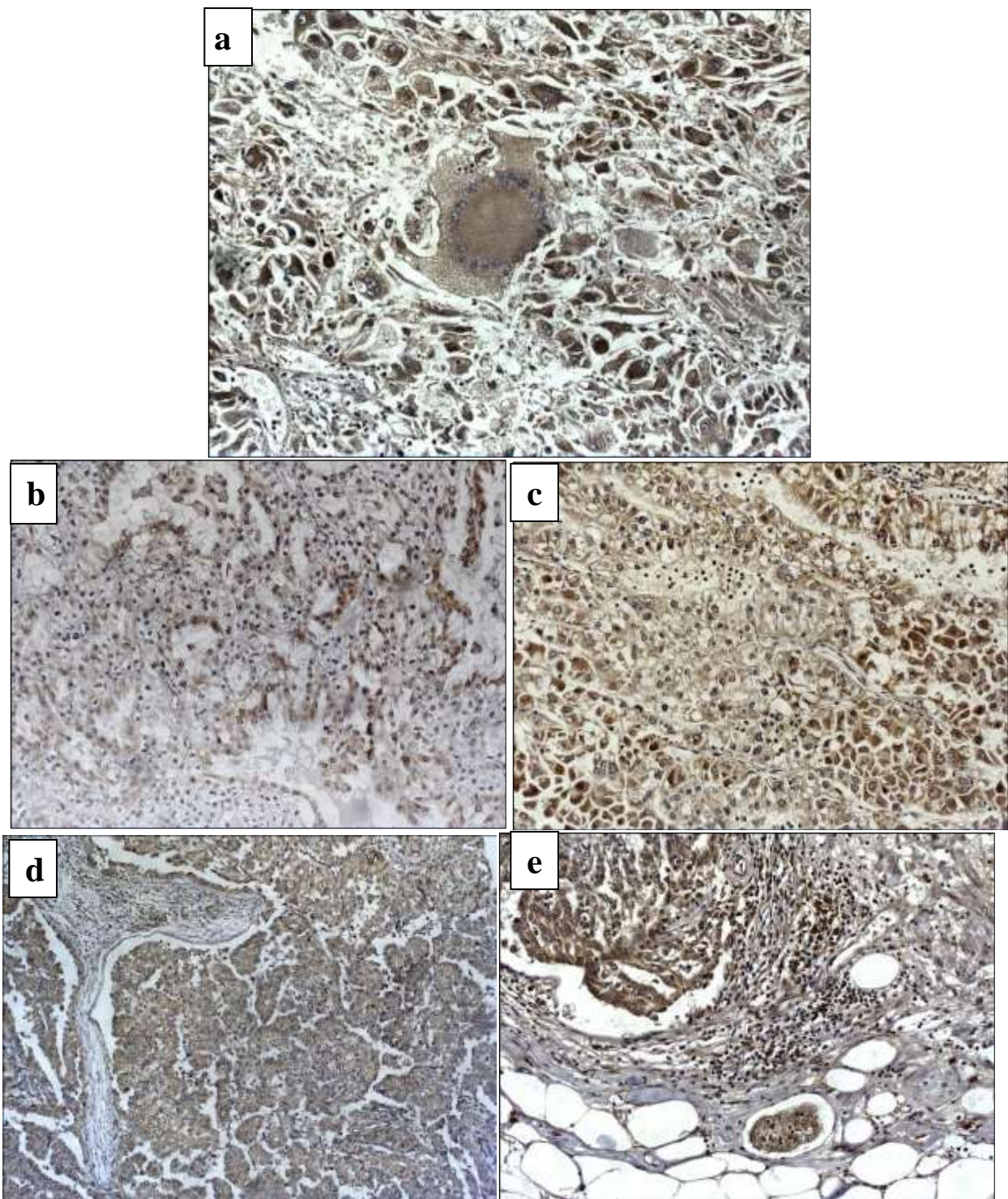
Slika 23. Membranska i citoplazmatska ekspresija HIF1 $\alpha$  u ccRCC x 200.



*Slika 24. Ekspresija HIF1 $\alpha$  u pRCC intenziteta 3+ (x200)*



*Slika 25. HIF1 $\alpha$  pozitivne ćelije okružuju područja tumorske nekroze (x 200).*



Slika 26. Ekspresija HIF1  $\alpha$ . *a.* Izražena HIF1 $\alpha$  pozitivnost, bizarnih ćelija u tumoru gradusa IV (x 200); *b.* Sporadična citoplazmatska pozitivnost (x200); *c.* Heterogena pozitivnost (x 200); *d.* Snažna pozitivna ekspresija u tumoru visokog gradusa (x 100); *e.* Pozitivna ekspresija metastatskog depozita (x200).

Statistički značajna povezanost između pozitivne ekspresije različitih markera prikazana je u tabeli 11. Prisutna je značajna asocijacija u membranskoj i citoplazmatskoj ekspresiji CXCR4 i CXCR7 receptora kao i njihova povezanost sa pozitivnom ekspresijom HIF1 $\alpha$  i Notch1 markera. Pozitivnost nijednog markera, nije prediktor preživljavanja, zato se pristupilo analizi intenziteta i procentualne zastupljenosti uz pomoć utvrđenog histoskora.

*Tabela 11. Međusobna povezanost pozitivne ekspresije ispitivanih markera (vrednosti predstavljaju  $\chi^2$  (p))*

	CXCL1 2C	CXCR4 M	CXCR4 C	CXCR7 M	CXCR7 C	Notch1 M	Notch1 C	HIF1 $\alpha$ M	HIF1 $\alpha$ C
CXCL 12M	<b>4.787</b> <b>(0.032)</b>	0.045 (0.595)	0.000 (1.000)	0.180 (0.260)	0.002 (1.000)	<b>4.170</b> <b>(0.020)</b>	0.732 (0.306)	<b>4.178</b> <b>(0.030)</b>	0.371 (0.570)
CXCL 12C		0.000 (0.714)	0.133 (0.471)	0.000 (0.460)	<b>7.036</b> <b>(0.010)</b>	0.091 (0.707)	<b>9.648</b> <b>(0.001)</b>	2.578 (0.062)	1.525 (0.197)
CXCR 4M			<b>8.134</b> <b>(0.004)</b>	<b>7.228</b> <b>(0.005)</b>	0.026 (0.752)	<b>3.273</b> <b>(0.049)</b>	0.002 (0.829)	1.925 (0.119)	0.107 (0.629)
CXCR 4C				0.481 (0.421)	<b>4.869</b> <b>(0.028)</b>	1.482 (0.200)	<b>8.795</b> <b>(0.003)</b>	0.637 (0.319)	<b>3.769</b> <b>(0.034)</b>
CXCR 7M					0.437 (0.232)	<b>5.029</b> <b>(0.013)</b>	0.000 (1.000)	0.000 (0.640)	0.000 (1.000)
CXCR 7C						0.079 (0.558)	<b>6.011</b> <b>(0.013)</b>	0.269 (0.467)	<b>8.169</b> <b>(0.003)</b>
Notch 1M							0.064 (0.678)	2.877 (0.076)	0.322 (0.482)
Notch 1C								0.732 (0.322)	<b>14.268</b> <b>(0.000)</b>
HIF1 $\alpha$ M									1.100 (0.261)

### 5.3. Analiza Histoskora

Prikaz srednjih vrednosti Histoskora za sve biomarkere (srednja vrednost sa standardnom devijacijom) zavisno od tipa tumora, dat je u tabeli 12. U poređenju sa ccRCC, pRCC tumori su imali više vrednosti histoskora za CXCL12M ( $p < 0.05$ ), CXCL12C ( $p < 0.001$ ), CXCR4C ( $p < 0.05$ ), CXCR7C ( $p < 0.001$ ) i HIF1 $\alpha$ C ( $p < 0.001$ ). Nasuprot tome papilarni tumori su bili povezani sa nižim vrednostima membranskog histoskora za Notch1M ( $p < 0.001$ ) i HIF1 $\alpha$ M ( $p < 0.01$ ).

Tabela 12. Vrednosti Histoskorova ispitivanih markera u pRCC i ccRCC

	pRCC (mean $\pm$ SD* or M(IQ)**)	ccRCC (mean $\pm$ SD* or M(IQ)**)	t* or Z** (p)
CXCL12M	153.58 $\pm$ 79.46	118.62 $\pm$ 62.67	<b>2.302 (0.024)*</b>
CXCL12C	113.68 $\pm$ 80.19	60.16 $\pm$ 66.96	<b>5.697 (0.000)*</b>
CXCR4M	0.0 (0.0-85.0)	20.0 (0.0-65.0)	0.907 (0.364)**
CXCR4C	50.0 (0.0-85.0)	5.0 (0.0-21.0)	<b>2.080 (0.038)**</b>
CXCR7M	122.88 $\pm$ 69.64	103.60 $\pm$ 53.64	1.533 (0.149)*
CXCR7C	200.0 (100.0-250.0)	30.0 (15.5-72.5)	<b>4.765 (0.000)**</b>
Notch1M	7.69 $\pm$ 27.74	58.49 $\pm$ 59.43	<b>5.062 (0.000)*</b>
Notch1C	50.0 (0.0-100.0)	20.0 (0.0-90.0)	0.910 (0.363)**
HIF1 $\alpha$ M	35.77 $\pm$ 63.57	85.71 $\pm$ 58.83	<b>2.821 (0.006)*</b>
HIF1 $\alpha$ C	128.46 $\pm$ 42.00	60.25 $\pm$ 60.28	<b>6.106 (0.000)*</b>

Za utvrđivanje odnosa između različitih Histoskorova, zavisno od normalnosti distribucije varijabli, korišćeni su Pearson-ov ili Spearman-ov koeficijent korelacije (tabela 13). Jaka pozitivna korelacija nađena je između CXCL12M i CXCL12C ( $r=0.647$ ,  $p < 0.001$ ), kao i između CXCL12C i CXCR7C ( $\rho=0.765$ ,  $p < 0.001$ ), CXCL12C i HIF1 $\alpha$ C ( $r=0.671$ ,  $p < 0.001$ ), i CXCR7C i HIF1 $\alpha$ C ( $\rho=0.607$ ,  $p < 0.001$ ).

Umerena pozitivna korelacija observirana je između sledećih parova: CXCL12M i CXCR7C ( $\rho=0.380$ ,  $p < 0.001$ ), CXCL12M i Notch1C ( $\rho=0.495$ ,  $p < 0.001$ ), CXCL12C i CXCR4C ( $\rho=0.402$ ,  $p < 0.001$ ), CXCL12C i Notch1C ( $\rho=0.577$ ,  $p < 0.001$ ), CXCR4M i CXCR4C ( $\rho=0.429$ ,  $p < 0.001$ ), CXCR4C i CXCR7C ( $\rho=0.442$ ,  $p < 0.001$ ), CXCR4C i Notch1C ( $\rho=0.445$ ,  $p < 0.001$ ), CXCR7M i CXCR7C ( $\rho=0.346$ ,  $p < 0.001$ ), CXCR7C i Notch1C ( $\rho=0.404$ ,  $p < 0.001$ ), CXCL12M i HIF1 $\alpha$ C ( $r=0.305$ ,  $p < 0.01$ ), CXCR4C i HIF1 $\alpha$ C ( $\rho=0.392$ ,  $p < 0.001$ ), Notch1C i HIF1 $\alpha$ C ( $\rho=0.431$ ,  $p < 0.001$ ).



Tabela 13. Korelacija Histoskora ispitivanih markera

	CXCL12C	CXCR4M	CXCR4C	CXCR7M	CXCR7C	Notch1M	Notch1C	HIF1αM	HIF1αC
CXCL12M	<b>0.647*</b> <b>(0.000)</b>	0.190** (0.061)	<b>0.213**</b> <b>(0.035)</b>	0.167* (0.099)	<b>0.380**</b> <b>(0.000)</b>	0.172 (0.091)*	<b>0.495</b> <b>(0.000)**</b>	<b>0.258</b> <b>(0.010)*</b>	<b>0.305</b> <b>(0.002)*</b>
CXCL12C		0.092** (0.368)	<b>0.489**</b> <b>(0.000)</b>	<b>0.215*</b> <b>(0.033)</b>	<b>0.765**</b> <b>(0.000)</b>	<b>-0.200</b> <b>(0.049)*</b>	<b>0.577</b> <b>(0.000)**</b>	-0.042 (0.678)*	<b>0.671</b> <b>(0.000)*</b>
CXCR4M			<b>0.402**</b> <b>(0.000)</b>	0.152** (0.136)	0.077** (0.452)	<b>0.216</b> <b>(0.032)**</b>	0.160 (0.116)**	0.155 (0.127)* *	0.037 (0.717)**
CXCR4C				<b>0.264**</b> <b>(0.009)</b>	<b>0.442**</b> <b>(0.000)</b>	<b>-0.209</b> <b>(0.039)**</b>	<b>0.445</b> <b>(0.000)**</b>	0.018 (0.861)* *	<b>0.392</b> <b>(0.000)**</b>
CXCR7M					<b>0.346**</b> <b>(0.000)</b>	0.079 (0.441)**	0.163 (0.108)**	0.063 (0.538)*	<b>0.200</b> <b>(0.048)*</b>
CXCR7C						<b>-0.247</b> <b>(0.014)**</b>	<b>0.404</b> <b>(0.000)**</b>	-0.046 (0.654)* *	<b>0.607</b> <b>(0.000)**</b>
Notch1M							0.020 (0.848)**	0.165 (0.105)*	<b>-0.208</b> <b>(0.040)*</b>
Notch1C								0.148 (0.146)* *	<b>0.431</b> <b>(0.000)**</b>
HIF1αM									-0.022 (0.829)*

\*r or \*\*p (p)

## 5.4. Povezanost Histoskora sa kliničko-patološkim parametrima

Upotrebom modela linearne regresije, pokušana je identifikacija prediktora vrednosti histoskora za ispitivane markere. Papilarni tip je bio jedini statistički značajan prediktor za **CXCL12M** ( $F=5.297$ ,  $p<0.05$ , prilagođen  $R^2=4.2\%$ ,  $B(95\%CI)=48.1$  (6.6-89.6)), **CXCR4C** ( $F=16.237$ ,  $p<0.001$ , prilagođen  $R^2=13.6\%$ ,  $B(95\%CI)=37.1$  (18.8-55.3)) i **CXCR7M** ( $F=5.543$ ,  $p<0.05$ , prilagođen  $R^2=4.5\%$ ,  $B(95\%CI)=41.8$  (6.6-77.0)).

Nijedna ispitivana varijabla se nije pokazala kao prediktor **CXCR4M** Histoskora.

Potencijalni prediktori **CXCL12C** histoskora su bili: Tip tumora, pTNM stadijum, gradus, veličina i klinički stadijum. Usled visoke kolinearnosti, pTNM stadijum kao i klinički stadijum su isključeni iz multivarijantnog modela. Novoformirani model sa 3 varijable ( $F=14.625$ ,  $p<0.001$ ) učestvuje sa 29,6% u varijansi CXCL12C histoskora. Nezavisni prediktori većeg CXCL12C histoskora su papilarni tip tumora( $p<0.001$ ) i veličina tumora ( $p<0.05$ ) (tabela 14.).

Tabela 14. Model linearne regresije za **CXCL12C** histoskor

	Univariate		Multivariate	
	B (95% CI of B)	p	B (95% CI of B)	p
Tip tumora (pRCC vs. ccRCC)	113.432 (73.909-152.954)	0.000	<b>103.618 (64.793-142.444)</b>	<b>0.000.</b>
pTNM (T1a-T3)	17.585 (7.101-28.070)	0.001		
Gradus tumora (I-IV)	26.353 (7.227-45.480)	0.007	12.653 (-5.011-30.317)	0.158
Veličina tumora (cm)	8.802 (2.688-14.916)	0.005	<b>5.918 (0.305-11.530)</b>	<b>0.039</b>
Klinički stadijum (I-IV)	27.356 (9.561-45.150)	0.003		

Potencijalni prediktori **CXCR7C** histoskora su bili: Tip tumora, pTNM stadijum, gradus, veličina, klinički stadijum kao i nekroza. Formirani multivarijantni model( $F=12.173$ ,  $p<0.001$ ) C objašnjava 36,8% varijanse CXCR7C histoskora. Papilarni tip tumora( $p<0.001$ ) i veličina( $p<0.05$ ), su se pokazali kao nezavisni prediktori CXCR7C histoskora (tabela 15.).

Korišćenjem univarijantnog modela linearne regresije, kao jedini prediktor većeg **HIF1 $\alpha$ M** histoskora, pokazao se svetloćelijski tip tumora ( $F=7.957$ ,  $p<0.01$ , prilagođen  $R^2=6.7\%$ ,  $B(95\%CI)=49.937$  (85.078-14.796)).

Tabela 15. Model linearne regresije za *CXCR7C* histoskor

	Univariate		Multivariate	
	B (95% CI of B)	p	B (95% CI of B)	p
Tip tumora (pRCC vs. ccRCC)	126.537 (88.689-164.384)	0.000	<b>130.240 (91.124-169.357)</b>	<b>0.000</b>
pTNM stadijum (T1a-T3)	14.783 (4.124-25.442)	0.007		
Gradus tumora (I-IV)	25.428 (6.253-44.603)	0.010	14.686 (-4.146-33.519)	0.125
Veličina tumora (cm)	8.458 (2.325-14.591)	0.007	<b>8.487 (1.13-15.852)</b>	<b>0.024</b>
Prisustvo nekroze (da)	36.570 (6.196-66.945)	0.019	16.563 (-13.196-46.323)	0.272
Klinički stadijum (I-IV)	23.931 (5.938-41.925)	0.010	-22.371 (-45.660-0.918)	0.060

Potencijalni prediktori **HIF1 $\alpha$ C** histoskora, dobijeni univarijantnim modelom dati su u tabeli 16. Multivarijantni model linearne regresije ( $F=8.671$ ,  $p<0.001$ ), je objasnio 24,3% varijanse HIF1 $\alpha$ C histoskora, nakon isključivanja nekoliko nezavisnih varijabli usled kolinearnosti. Nezavisni prediktori veće vrednosti histoskora su papilarni tip tumora ( $p<0.001$ ) i veći gradus ( $p<0.05$ ).

Tabela 16. Model linearne regresije za *HIF1 $\alpha$ C* histoskor

	Univariate		Multivariate	
	B (95% CI of B)	p	B (95% CI of B)	p
Tip tumora (pRCC vs. ccRCC)	68.214 (33.745-102.684)	0.000	<b>58.253 (25.583-90.923)</b>	<b>0.001</b>
TNM stadijum	14.703 (6.216-23.191)	0.001		
Gradus tumora	29.193 (14.186-44.200)	0.000	<b>18.462 (2.926-33.999)</b>	<b>0.020</b>
Veličina tumora(cm)	7.121 (2.153-12.088)	0.005	2.828 (-2.375-8.032)	0.283
Prisustvo nekroze	35.479 (11.230-59.728)	0.005	14.601 (-11.957-40.957)	0.274
Sarkomatoidna diferencijacija	40.878 (7.819-73.938)	0.016		
Klinički stadijum (I-IV)	23.658 (9.298-38.019)	0.001		

Linearni model regresije je identifikovao dva nezavisna prediktora **Notch1M** histoskora ( $F=6.750$ ,  $p<0.01$ , prilagođen  $R^2=10.6\%$ ): viši Notch1M histoskor povezan je sa ccRCC tipom tumora ( $p<0.05$ ) i nižim kliničkim stadijumom ( $p<0.05$ ) (tabela17.).

Tabela 17. Model linearne regresije za **Notch1M** histoskor

	Univarijantna		Multivarijantna	
	B (95% CI of B)	p	B (95% CI of B)	p
Tip tumora(pRCC vs. ccRCC)	-50.802 (-84.171—17.433)	0.003	<b>-38.673 (-73.623—3.724)</b>	<b>0.030</b>
Klinički stadijum (I-IV)	-19.869 (-33.524—6.214)	0.005	<b>-14.489 (-28.736—0.241)</b>	<b>0.046</b>

Jedini statistički značajan prediktor višeg**Notch1C** Histoskora je prisustvo tumorske nekroze( $F=5.611$ ,  $p<0.05$ , adjusted  $R^2=4.6\%$ ,  $B(95\%CI)=25.833$  (1.183-47.484)).

### 5.5. Povezanost ekspresije biomarkera sa mortalitetom

Praćenje pacijenata je trajalo  $35.2\pm 19.3$  meseci (medijana 32 meseca). U trenutku preseka praćenja od 98 pacijenata, smrtni ishod se dogodio kod 40 (40,8%) (tabela 18.).Mortalitet je povezan sa papilarnim tipom tumora ( $p<0.05$ ), većim dimenzijama tumora ( $p<0.001$ ), prisustvom nekroze( $p<0.001$ ), sarkomatoidne diferencijacije( $p<0.01$ ), većim gradusom ( $p<0.001$ ), pTNM stadijumom( $p<0.001$ ) i kliničkim stadijumom ( $p<0.001$ ). Osim toga, veća smrtnost je uočena kod pacijenata sa višim vrednostima histoskora za: CXCL12M ( $p<0.05$ ), CXCL12C ( $p<0.001$ ), CXCR7C ( $p<0.05$ ), Notch1C ( $p<0.05$ ) i HIF1 $\alpha$ C ( $p<0.001$ ). Mortalitet je takođe povezan sa negativnom membranskom ekspresijom HIF1 $\alpha$  ( $p<0.05$ ) (tabela 19.)

U cilju određivanja sposobnosti histoskorova da diskriminišu mortalitet u ispitivanoj grupi pacijenata, izvršena je analiza ROC krive. Statistički značajnu diskriminatornu sposobnost su pokazali CXCL12M, CXCL12C, CXCR7C, Notch1C i HIF1 $\alpha$ C histoskor (Tabela 20.). CXCL12C je imao dobru moć diskriminacije sa  $AUC>0.7$ . Histoskorovi iznad granične vrednosti (Cut-off) za svih 5 markera su bili značajno povezani sa većim mortalitetom. ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.05$  i  $p<0.001$ ,). Kombinovanje nekoliko histoskora nije značajno promenilo diskriminatornu snagu u poređenju sa pojedinačnim histoskorovima (Grafikon 1.).

Tabela 18. Povezanost ispitivanih parametara sa mortalitetom pacijenata

		Mortality (yes) (mean±SD* or M(IQ)** or N(%))***)	Mortality (no) (mean±SD* or M(IQ)** or N(%))***)	t* or Z* or $\chi^2$ *** (p)
Godine starosti		64.93±11.84	61.95±10.90	1.282 (0.203)*
Pol (muški)		29 (72.5%)	35 (60.3%)	1.054 (0.281)***
Tip tumora (ccRCC pRCC)		31 (77.5%) 9 (22,5%)	54 (93.1%) 4 (6,9%)	<b>3.745 (0.034)***</b>
Tumour size (cm)		7.66±1.99	5.08±2.17	<b>5.998 (0.000)*</b>
Histološki gradus tumora	I	1 (2.5%)	16 (27.6%)	<b>4.435 (0.000)*</b> <b>23.235</b> <b>(0.000)***</b>
	II	23 (57.5%)	38 (65.5%)	
	III	11 (27.5%)	1 (1.7%)	
	IV	5 (12.5%)	3 (5.2%)	
pTNM stadijum	T1a	1 (2.5%)	22 (37.9%)	<b>5.812 (0.000)*</b> <b>27.894</b> <b>(0.000)***</b>
	T1b	10 (25.0%)	22 (37.9%)	
	T2a	10 (25.0%)	7 (12.1%)	
	T2b	5 (12.5%)	3 (5.2%)	
	T3	14 (3.5%)	4 (6.9%)	
Klinički stadijum	I	12 (30.0%)	48 (82.8%)	<b>5.459 (0.000)**</b> <b>30.179</b> <b>(0.000)***</b>
	II	14 (35.0%)	8 (13.8%)	
	III	11 (27.5%)	2 (3.4%)	
	IV	3 (7.5%)	0 (0.0%)	
Nekroza (da)		29 (74.4%)	23 (39.7%)	<b>9.941 (0.001)***</b>
Sarkomatoidna diferencijacija (da)		12 (30.0%)	4 (6.9%)	<b>7.636 (0.004)***</b>

Tabela 19. Povezanost vrednosti histoskora sa mortalitetom pacijenata

	Mortality (yes) (mean±SD* or M(IQ)** or N(%))***)	Mortality (no) (mean±SD* or M(IQ)** or N(%))***)	t* or Z* or $\chi^2$ *** (p)
CXCL12M	153.58±79.46	118.62±62.67	<b>2.327 (0.023)*</b>
CXCL12C	113.68±80.19	60.16±66.96	<b>3.585 (0.001)*</b>
CXCR4M	10.0 (0.0-76.0)	20.0 (0.0-52.5)	0.085 (0.932)**
CXCR4C	10.0 (0.0-40.0)	5.0 (0.0-12.8)	1.842 (0.066)**
CXCR7M	122.88±69.64	103.60±53.64	1.479 (0.144)*
CXCR7C	79.5 (20.0-140.8)	30.0 (19.2-70.0)	<b>2.128 (0.033)**</b>
Notch1M	46.00±59.43	55.72±58.49	0.804 (0.424)*
Notch1C	50.0 (0.0-100.0)	5.0 (0.0-55.0)	<b>2.106 (0.035)**</b>
HIF1 $\alpha$ M	71.00±68.38	84.66±56.29	1.043 (0.301)*
HIF1 $\alpha$ C	96.53±57.44	50.52±59.25	<b>3.825 (0.000)*</b>

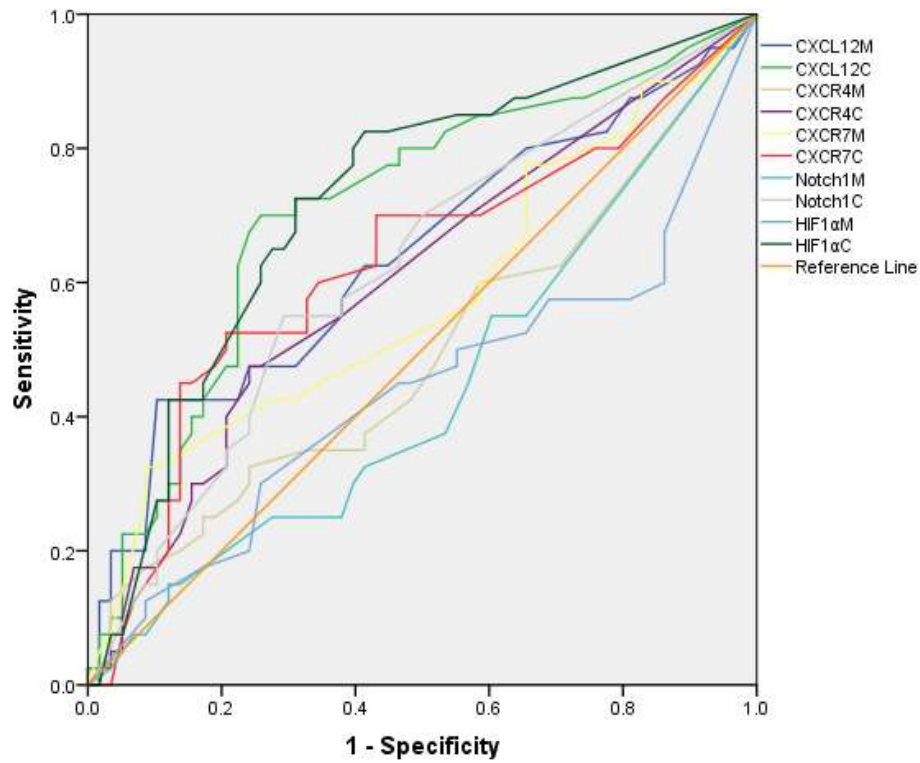
Tabela 20. Diskriminatorska sposobnost za mortalitet različitih histoskorova

	AUC (95% CI of AUC)	p	Cut-off	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)
CXCL12M	0.638 (0.523-0.753)	<b>0.021</b>	<b>200</b>	42.5	87.1
CXCL12C	0.711 (0.604-0.818)	<b>0.000</b>	<b>73</b>	70.0	69.4
CXCR4M	0.495 (0.375-0.615)	0.934	110	12.5	95.2
CXCR4C	0.606 (0.491-0.722)	0.074	13	47.5	72.6
CXCR7M	0.575 (0.456-0.695)	0.207	170	32.5	91.9
CXCR7C	0.627 (0.509-0.744)	<b>0.034</b>	<b>100</b>	45.0	85.5
Notch1M	0.442 (0.325-0.560)	0.335	130	15.0	87.9
Notch1C	0.621 (0.507-0.734)	<b>0.043</b>	<b>50</b>	55.0	70.7
HIF1 $\alpha$ M	0.439 (0.317-0.561)	0.306	110	30.0	74.1
HIF1 $\alpha$ C	0.722 (0.618-0.825)	<b>0.000</b>	<b>70</b>	72.5	69.0
CXCL12M+ HIF1 $\alpha$ C	0.730 (0.626-0.834)	<b>0.000</b>		82.5	63.8
CXCL12M+ HIF1 $\alpha$ C +CXCL12C	0.741 (0.640-0.842)	<b>0.000</b>		70.0	74.1
CXCL12M+ HIF1 $\alpha$ C +CXCR7C	0.737 (0.635-0.840)	<b>0.000</b>		67.5	75.9
CXCL12M+ HIF1 $\alpha$ C +Notch1C	0.730 (0.627-0.834)	<b>0.000</b>		82.5	63.8

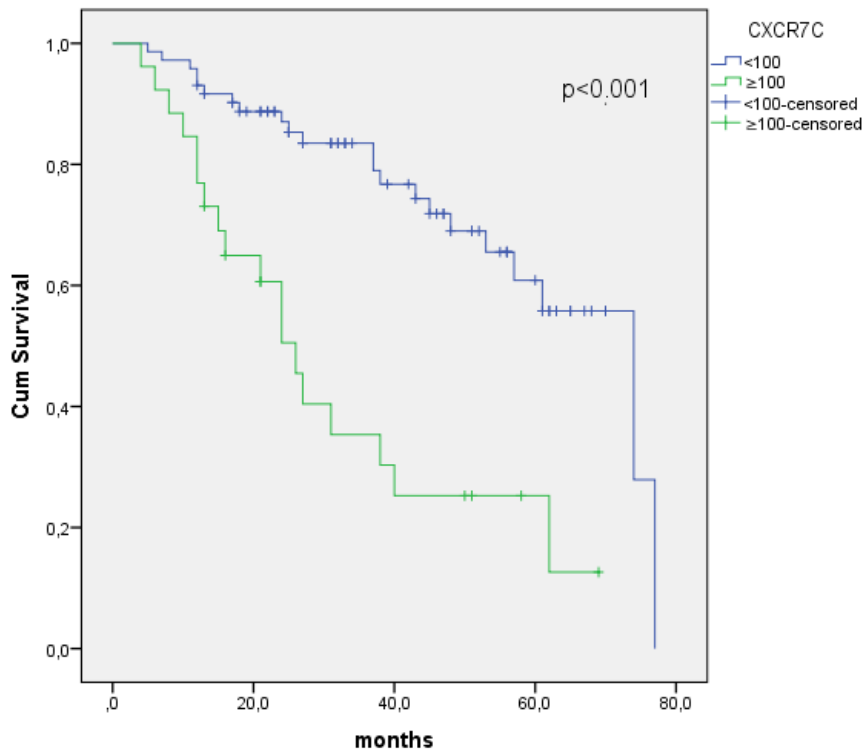
Nakon izvođenja univarijantne Cox-regresione analize, identifikovani su potencijalni prediktori mortaliteta (tabela 21.). Četiri od pet prethodno definisanih graničnih vrednosti histoskora (CXCL12M, CXCL12C, CXCR7C i HIF1 $\alpha$ C) su imale veću prediktivnu vrednost nego sam histoskor (Kaplan Majerovi grafikoni). Upotrebom Forward stepwise (Wald) metode za unos promenljivih, dobijen je multivarijantni model ( $\chi^2=39.626$ ,  $p<0.001$ ) sa tri nezavisna prediktora preživljavanja. Kraće preživljavanje se može predvideti većim kliničkim stadijumom ( $p<0.001$ ), vrednošću CXCL12C histoskora iznad 73 ( $p<0.05$ ) i većim membranskim CXCR7 histoskorom ( $p<0.05$ ).

Tabela 21. Cox-regresiona analiza prediktora mortaliteta

	Univarijantna		Multivarijantna	
	HR (95% CI of HR)	p	HR (95% CI of HR)	p
Tip tumora (ccRCC vs. papillary)	0.275 (0.128-0.593)	0.001		
pTNM stadijum (T1a-T3)	1.546 (1.248-1.915)	0.000		
Histološki gradus (I-IV)	1.927 (1.339-2.774)	0.000		
Veličina tumora (cm)	1.375 (1.199-1.577)	0.000		
Nekroza (da)	2.778 (1.314-5.873)	0.007		
Sarkomatiodna diferencijacija (da)	2.740 (1.347-5.574)	0.005		
Prognostički stadijum (I-IV)	2.027 (1.508-2.724)	0.000	<b>1.933 (1.373-2.720)</b>	<b>0.000</b>
CXCL12M ( $\geq 200$ )	2.191 (1.139-4.212)	0.019		
CXCL12C	1.005 (1.001-1.008)	0.010		
CXCL12C ( $\geq 73$ )	3.735 (1.857-7.513)	0.000	<b>2.455 (1.136-5.305)</b>	<b>0.022</b>
CXCR4C (pozitivnost)	2.020 (1.002-4.074)	0.049		
CXCR7M	1.008 (1.002-1.014)	0.005	<b>1.006 (1.136-5.305)</b>	<b>0.023</b>
CXCR7C	1.004 (1.000-1.007)	0.033		
CXCR7C ( $\geq 100$ )	3.745 (1.970-7.117)	0.000		
Notch1M	0.993 (0.987-0.999)	0.015		
HIF1 $\alpha$ M (pozitivnost)	0.463 (0.237-0.906)	0.025		
HIF1 $\alpha$ M	0.994 (0.989-1.000)	0.042		
HIF1 $\alpha$ C (pozitivnost)	2.579 (1.006-6.609)	0.049		
HIF1 $\alpha$ C	1.008 (1.003-1.012)	0.002		
HIF1 $\alpha$ C ( $\geq 70$ )	3.469 (1.689-7.124)	0.001		

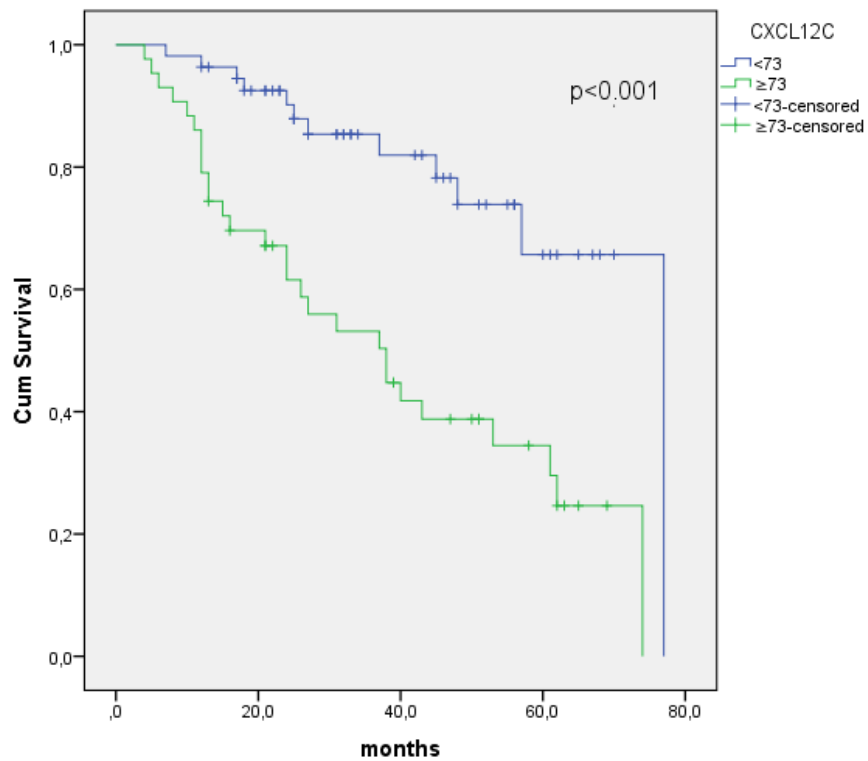


Grafikon 1. ROC krive različitih histoskorova u diferencijaciji mortaliteta

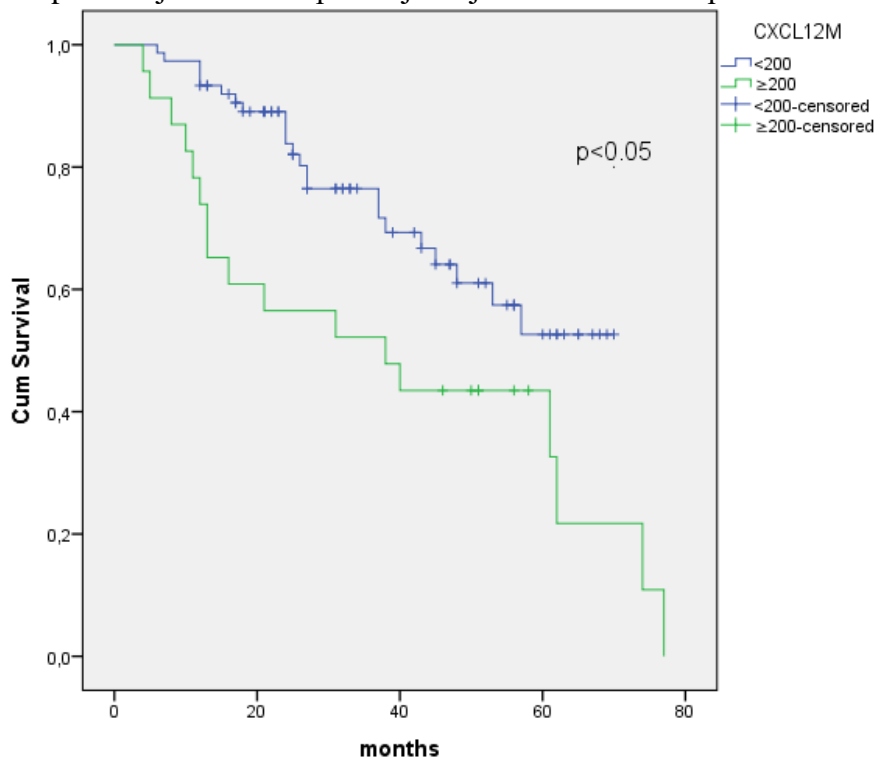


Grafikon 2. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja u odnosu na citoplazmatski CXCR7 histoskor

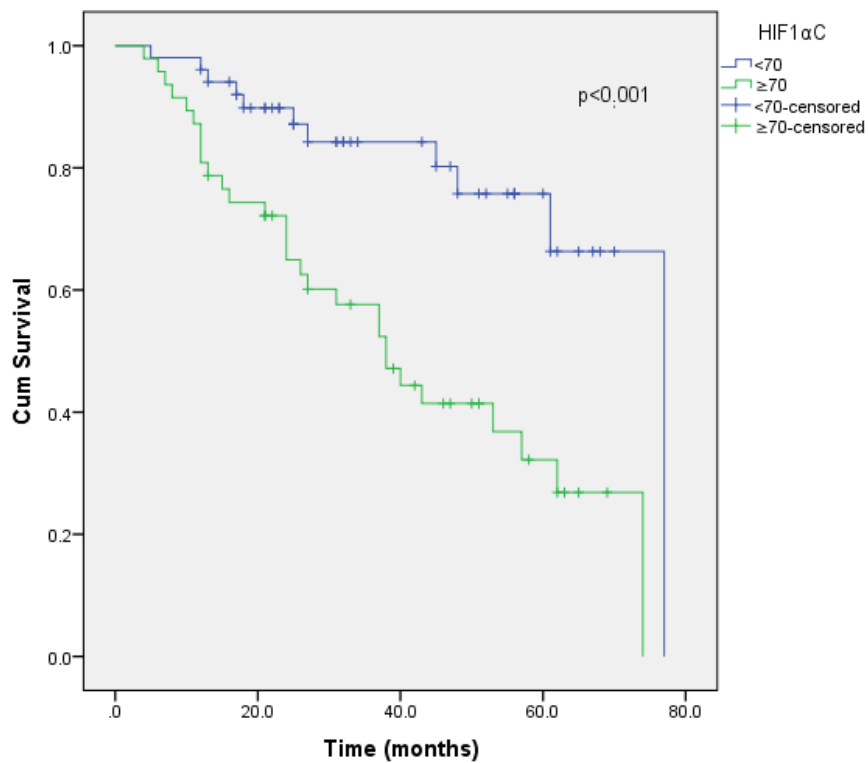




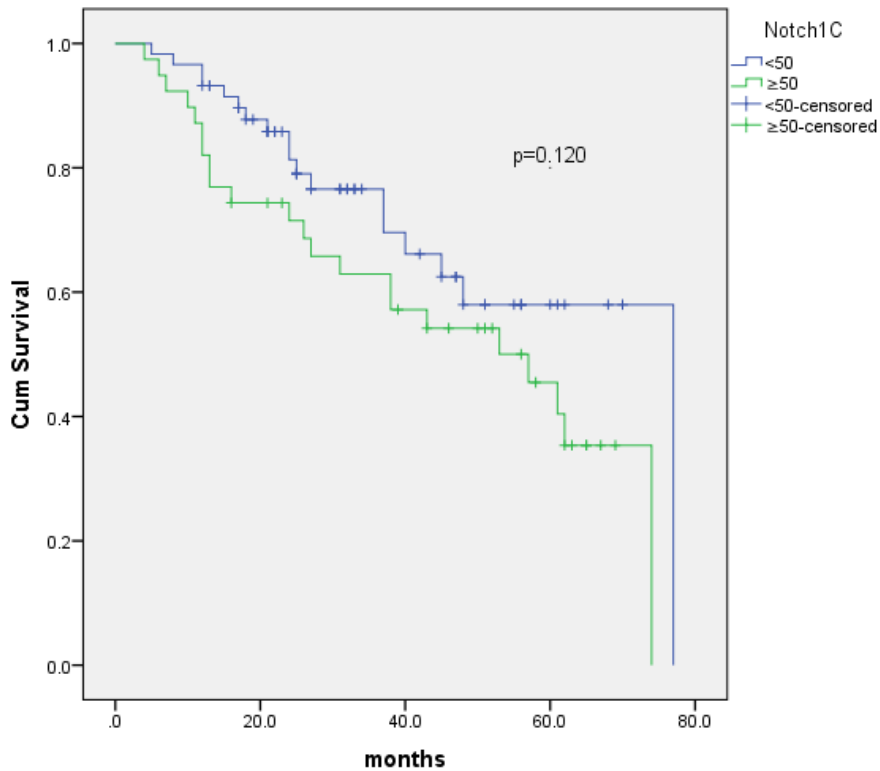
Grafikon 3. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja u odnosu na citoplazmatski CXCL12 histoskor



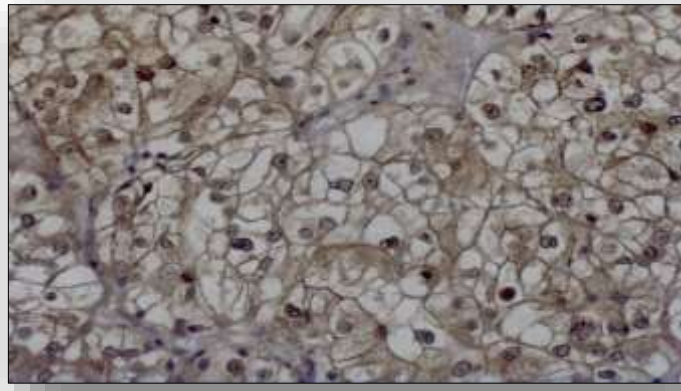
Grafikon 4. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja u odnosu na membranski CXCL12 histoskor



Grafikon 5. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja u odnosu na citoplazmatski HIF1 $\alpha$  histoskor



Grafikon 6. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja u odnosu na citoplazmatski Notch1 histoskor



## **6. DISKUSIJA**

Svake godine od karcinoma bubrega oboli više od 300 000 ljudi. Iako on čini manje od 5% ukupnih onkoloških dijagnoza, i dalje je najletalniji urološki malignitet sa preko 140 000 smrtnih slučajeva godišnje širom sveta [1-4]. Svetloćelijski karcinom je najčešći podtip RCC-a (70-80%), sa najvećom stopom smrtnosti, rizikom za razvoj metastaza od 50% isrednjim petogodišnjim preživljavanjem od 40% čak i uz primenu modrnih terapeutika[95].Iako se u poslednjih dvadeset godina proširilo razumevanje biologije ovog tumora, i dalje se traga za kombinacijom adekvatnih prognostičkih markera.

Ovo istraživanje uključilo je 98 slučajeva RCC-a obuhvativši dva najčešća podtipa, svetlo ćelijski i papilarni tip. Analizom epidemioloških i kliničkih karakteristika iz naše baze zaključili smo da se tumor bubrežnog parenhima prema polnoj distribuciji javljao češće kod muškaraca nego kod žena, u odnosu 2:1,što se takođe pokazalo u referentnim epidemiološkim studijama[115].Mortalitet je u ovoj studiji, takođe povezan sa većim dimenzijama tumora, prisustvom nekroze, sarkomatoidne diferencijacije, većim gradusom, pTNM stadijumom i kliničkim stadijumom. Svi ovi parametri su osvedočeni kriterijumi smrtnosti [1-4]. U našem istraživanju, pronađena je i značajna povezanost papilarnog tipa tumora i mortaliteta, iako je pRCC, prema podacima iz literature povezan sa boljom prognozom [2-4, 25]. Mogući razlozi ovakvog rezultata su limitacija studije na prikupljanje podataka iz samo jednog centra, kao i sama priroda uzorka. Značajan broj pRCC pacijenata, uključenih u studiju, imao je veći histološki gradus tumora, veći pTNM i veći klinički stadijum, a svi ti faktori doprinose većoj smrtnosti. Usled indolentnog kliničnog toka i kasne pojave simptoma pacijenti se često prvi put javljaju sa već uznapredovalim tumorom ili se on otkriva slučajno na sistematskim pregledima.

Veća smrtnost uočena je i kod pacijenata sa većim vrednostima citoplazmatskog histostoskora za: CXCL12, CXCR7, Notch1 i HIF1 $\alpha$ C, kao i savećim vrednostima membranskog CXCL12 histoskora. Mortalitet je takođe povezan sa negativnom membranskom ekspresijom HIF1 $\alpha$ .

Pozitivna ekspresija svih ispitivanih biomarkera bila je prisutna u velikom procentu uzoraka pacijenata sa pRCC-om, svih 13 slućajeva ispoljilo je snažnu citoplazmatsku ekspresiju CXCL12. Međutim, za ovaj podtip, nađena je samo statistićki znaćajna pozitivna citoplazmatska ekspresija HIF1 $\alpha$ . Kada se pristupilo analizi histoskora rezultati su pokazali da pRCC u odnosu na ccRCC ima veću vrednost citoplazmatskog histoskora za CXCL12, CXCR4 CXCR7 i HIF1 $\alpha$ , kao i veću vrednost membranskog CXCL12 histoskora, a manji membranski histoskor markera Notch 1 i HIF1 $\alpha$ .

Interakcija hemokina CXCL12 sa njegovim receptorima CXCR4 i CXCR7 je prilićno kompleksna i zavisi od fizioloških i patoloških stanja, kao i od tipa ćelija. CXCL12/CXCR4 osovina je ukljućena u hemotksu, ćelijsku komunikaciju, preživljavanje i proliferaciju. U tumorima podstiće metastaziranje stimulišući migraciju tumorskih ćelija kroz ekstracelularni matriks i krvne sudove. Ciljni organi eksprimiraju veći nivo CXCL12 ĉime privlaće CXCR4 pozitivne ćelije u skladu sa hemotaktićkim gradijentom [83].

Tokom godina komponente hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7 su stekle prilićnu slavu kao vaćni elementi u nastanku i evoluciji RCC-a. Brojne studije su razlićitim metodama ispitivale njihov uticaj. Eksperimenti na ćelijskim kulturama su pokazali da razlićite ćelijske linije eksprimiraju CXCR4 iRNK i CXCR4 protein. Međutim, znaćajne kolićine CXCR4 su nađene samo na površini A948 ćelija i one su bile sposobne da odgovore na stimulaciju CXCL12 ligandom [116, 117]. Adhezioni potencijal RCC ćelija ne određuju ni prisustvo CXCR4 gena, niti njegova intracelularna koncentracija, već nivo površinskih CXCR4 molekula. Ovaj receptor je povećao sposobnost vezivanja A498 ćelija za proteine ekstracelularnog matriksa, a menjao je i ekspresiju i aktivnost integrina [117]. Gasenmajer i saradnici su pokazali da je CXCR4 takođe i marker kancerskih stem ćelija u RCC-u i da doprinosi rezistenciji na lekove. Tumorske ćelije, dobijene iz metastaza bile su bogate CXCR4+ ćelijama, koje su istovremeno pokazivale visok kapacitet samoobnavljanja. Prema njihovim rezultatima, CXCR4 je i potencijalni marker kancerskih stem ćelija, koji moće predvideti preživljavanja kod pacijenata

bez metastaza. Veći nivo iRNK za CXCR4 u primarnom ccRCC-u pacijenata sa lokalizovanom bolešću, predviđao je kraće preživljavanje [118].

Molekularna karakterizacija kancerskog tkiva je pokazala da su nivoi iRNK za CXCR4 i za CXCR7 2 do 10 puta povećani u ccRCC i pRCC u poređenju sa normalnim tkivom i da su takođe povezani sa metastazama[119]. Najnovije istraživanje genske ekspresije svih hemokinskih receptora u RCC-u ukazalo je na povećanu ekspresiju CXCR4/6/7 u tumorskoj mikrosredini, kao i njihovu povezanost sa kraćim OS [120].

Studija na životinjskom modelu je pokazala uključenost CXCL12/CXCR4/CXCR7 osovine u embriogenezu bubrega. Tokom različitih faza razvoja bubrega više struktura eksprimira CXCR7 a manje CXCR4, sugerišući da diferencijacija bubrega zahteva aktivaciju gena za CXCR7 a inaktivaciju gena za CXCR4. Povećana CXCR7 ekspresija u nefronu koji se formira karakteristika je mezenhimno-epitelne diferencijacije, što je podržano nalazom visoke CXCR4 ekspresije u dediferentovanim tumorima[121].

Ekspresija i uloga CXCL12, CXCR4 i CXCR7 u RCC-u je imunohistohemijski analizirana u brojnim studijama [61, 122]. Iako je većina demonstrirala pozitivnost ovih markera, intenzitet i lokalizacija bojenja (citoplazmatsko, nuklearno ili membransko) su značajno varirali. Trenutno ne postoje jasne smernice o interpretaciji heterogene ekspresije ovih markera. Veći broj publikacija se primarno fokusirao na ulogu CXCR4 receptora u RCC-u, budući da je njegovo prisustvo dokazano u preko 20 različitih maligniteta [83].Rasti i saradnici su demonstrirali pozitivnu CXCR4 ekspresiju na svih 173 RCC uzoraka, pri čemu jedominiralo citoplazmatsko bojenje srednjeg intenziteta. Upoređivanjem CXCR4 ekspresije između podtipova nađena je značajnu razlika. Ekspresija u ccRCC-u bila je povezana sa veličniom tumora, gradusom i mikrovaskularnom invazijom, u pRCC takođe sa gradusom, mikrovaskularnom invazijom ali i sa pTNM stadijumom. Oba ova podtipa pokazala su povezanost sa kraćim preživljavanjem, ali ova studija nije našla nikakvu povezanost između hromofobnog karcinoma i ekspresije CXCR4.[114].U drugoj studiji, Wehler i saradnici su našli pozitivnu citoplazmatsku ekspresiju CXCR4 markera u normalnim bubrežnim tubulima, kao i u 100% uzoraka RCC-a, dok je membransku ekspresiju imalo svega nekoliko slučajeva tumorskog tkiva. U kancerskim ćelijama intenzitet bojenja je varirao od slabog preko intermedijarnog do izraženog.Takođe su pronašli korelaciju između CXCR4 ekspresije i progresije RCC-a [123]. I u našem istraživanju,je takođe,

kao pozitivna kontrola, korišćena ekspresija velikog intenziteta, svih ispitivanih biomarkera na tubulima zdravog parenhima.

U studiji starijeg datuma, Zagzag i saradnici su istovremeno analizirali uzorke RCC-a i hemangioblastoma na ekspresiju CXCL12 i CXCR4. Svih 15 uzoraka RCC-a imalo je nuklearnu CXCL12 pozitivnost, dok su 4 uzorka imala i citoplazmatsku ekspresiju. 14 od 15 uzoraka eksprimiralo je CXCR4 pozitivnost visokog intenziteta, od toga je 6 uzoraka ispoljilo nuklearno, citoplazmatsko i membransko bojenje, 6 uzoraka nuklearno i citoplazmatsko a 2 uzorka samo membransko bojenje [124]. Nasuprot ovim rezultatima, Wang i saradnici su dokazali dominantno nuklearnu distribuciju CXCR4 bojenja na 48 od 97 uzoraka RCC-a, dok je citoplazmatsku distribuciju, visokog intenziteta, imalo 24 uzoraka, a membransku 25 [77]. Analiza ekspresije CXCR4 u primarnim tumorima, ali i metastazama, u jednoj studiji, pokazala je veći intenzitet bojenja u svim vrstama tumorskog tkiva u odnosu na zdrav bubreg. Međutim, nađena je i razlika u distribuciji ekspresije pri čemu su primarni tumori ispoljili pretežno membransku a metastatski pretežno citoplazmatsku lokalizaciju [125]. Druge studije povezuju nuklearnu ekspresiju CXCR4 sa metastatskim potencijalom. Njegovo prisustvo u nukleusu sugerise delovanje posredstvom još nekog signalnog puta nezavisnog od G-protein signalizacije. [77, 126]

Veći broj istraživanja se bavio prognostičkim potencijalom elemenata hemokinske osovine CXCL12/CXCR4/CXCR7 ali za sada konsenzus nije postignut [61, 83, 121]. U prethodno opisanoj studiji, nađena je korelacija visoke ekspresije CXCL12, CXCR4 i CXCR7 sa lošim OS i RFS, nezavisna od pola, starosti, kliničkog stadijuma i statusa limfnih nodusa [77]. Na uzorku od 100 pacijenata Bao i saradnici su dokazali da je nuklearna lokalizacija CXCR4 markera predviđala lošu prognozu i kroz aktivaciju HIF-1 $\alpha$ , bila povezana sa metastatskim potencijalom tumora. Analizirajući preživljavanje došli su do zaključka da je period bez nastanka metastaza najkraći kod pacijenata sa potpunom nuklearnom CXCR4 ekspresijom, dok se relaps nije desio ni kod jednog pacijenta sa citoplazmatskom lokalizacijom CXCR4 bojenja [127].

Meta-analiza, koja je uključila 7 značajnih publikacija u periodu između 2010. i 2014. sa 1069 pacijenata, pokazala je da CXCR4 ekspresija može predvideti loše ukupno preživljavanje [61]. Još jedna meta-analiza, sprovedena 2015. Obuhvatila je 994 pacijenata iz 11 studija. Analizom podataka nađena je veća CXCR4 ekspresija u RCC-u u odnosu na zdravo tkivo. CXCR4 je takođe korelirao sa metastatskim statusom i prognozom ovih pacijenata.

CXCR4pozitivni pacijenti imali su kraće preživljavanje u odnosu na negativne. Ekspresija je takođe bila veća kod pacijenata sa nižim Fuhrmanovim gradusom, kao i kod metastatske bolesti. Nije nađena veza između CXCR4 ekspresije i kliničkog stadijuma [122]. Međutim, obe meta-analize imaju brojna ograničenja. Postoji značajna heterogenost između studija. Kliničke karakteristike pacijenata kao što su pol, starost, performans status, nisu uzimane u razmatranje. Broj uključenih pacijenata, vreme praćenja kao i različite imunohistohemijske metode (da li su analizirani celi tkivni isecci ili su konstruisani tkivni mikronizovi), mogli su da utiču na rezultate. Ekspresija različitog intenziteta i lokalizacije upoređivana je sa vremenom preživljavanja. U istraživanjima su takođe uključivani različiti histološki tipovi RCC, iako je svetloćelijski tip najčešći i najagresivniji [122]. Samo je u jednoj studiji na 173 uzoraka upoređivana ekspresija CXCR4 među RCC tipovima. Svetloćelijski i papilarni tip su imali veću CXCR4 ekspresiju, kao i goru prognozu. Nije nađena značajna korelacija ni asocijacija između ekspresije CXCR4 i kliničkopatoloških parametara u hromofobnom RCC-u [114]. Ispitujući ekspresiju CXCR4 i markera stem kancerskih ćelija, CD133, D'Alterio i saradnicu su našli povezanost loše prognoze i visoke ekspresije CXCR4, dok CD133 nije pokazao prognostičke mogućnosti [128].

U našem istraživanju, pozitivno bojenje citoplazme na CXCR4, uočeno je u 61 slučaju. Iako je veći intenzitet citoplazmatskog bojenja kao i veći procenat pozitivnosti uočen u tumorima većeg histološkog gradusa, vrednost histoskora za citoplazmatsku CXCR4 ekspresiju povezana je samo sa papilarnim tipom tumora. Pozitivna membranska ekspresija CXCR4, uočena je u 66 slučajeva i povezana sa svetloćelijskim tipom i većim kliničkim stadijumom. Premda je pozitivna membranska ekspresija CXCR4 češće bila prisutna u tumorima ccRCC tipa, prilikom analize histoskora, nije nađena statistički značajna povezanost između nje i bilo kog ispitivanog parametra. U analizi preživljavanja ni citoplazmatska ni membranska ekspresija CXCR4 markera nije pokazala prognostički potencijal. Mogući razlozi razlike između dobijenih rezultata i literaturnih podataka su veličina i priroda uzorka, kao i period praćenja. U dostupnim i proučavanim studijama korišćena su primarna antitela različitih proizvođača, a takođe su pozitivne vrednosti definisane na različite načine. U našem istraživanju, analizirajući histoskor, ceo uzorak je uziman u razmatranje, tako da su obuhvaćene i raštrkane pojedinačne ćelije sa pozitivnom ekspresijom. Iako je ekspresija bila prisutna u većem broju tumora, uprkos analizi celog uzorka, slab intenzitet bojenja i mali procenat pozitivnih ćelija, mogli su doprineti ovim rezultatima. Interesantan nalaz bila je membranska pozitivnost u metastatskim depositima unutar

krvnih sudova i perirealnog masnog tkiva. Osim tumorskog parenhima, CXCR4 ekspresija je takođe detektovana i u okolnoj tumorskoj stromi, na endotelnim ćelijama i fibrilarnim komponentama ekstracelularnog matriksa.

U poređenju sa CXCR4, manje literaturnih podataka se može naći o ekspresiji CXCR7 u RCC-u. Ispitujući ovaj receptor, Wang i saradnici supronašli pozitivnost u 100% slučajeva pretežno citoplazmatske lokalizacije dok je membransku pozitivnost imalo samo 8 od 97 pacijenata. Intenzitet ekspresije je bio visok u 72 od 97 slučajeva. Pronađena je takođe i značajna povezanost visoke ekspresije CXCR7 sa lošim OS i RFS ali nije dokazana povezanost ovog markera sa kliničko-patološkim parametrima. [77]. U studiji D'Alteriai saradnika nađena je dominantno membranska ekspresija CXCR7, u 50% slučajeva visokog intenziteta, kao i pozitivna korelacija ovog receptora sa stadijumom tumora, statusom limfnih nodusa i simptomima. U njihovom istraživanju, CXCR4 i CXCR7 su pojedinačno i zajedno mogli da predvide preiod bez bolesti (disease-free survival). Iako su kancerske ćelije kao i normalni proksimalni tubuli ekspresirali CXCR4 i CXCR7, ekspresija na renalnim glomerulima i mezenhimnim ćelijama nije uočena, što je u skladu sa našim nalazima [129].

Rezultati ove studije pokazali su da je u 91 slučaju bila prisutna pozitivna membranska CXCR7 ekspresija, dok je 85 slučajeva imalo citoplazmatsku pozitivnost. Pozitivna membranska CXCR7 ekspresija je povezana sa ccRCC tipom a pozitivna citoplazmatska ekspresija CXCR7 sa većim TNM stadijumom. Veći intenzitet ekspresije primećen je u tumorima pRCC tipa. Zbog toga su pRCC tumori, u odnosu na ccRCC imali veće vrednosti citoplazmatskog CXCR7 histokora. Papilarni tip se pokazao i kao nezavisni prediktor i citoplazmatskog i membranskog CXCR7 histokora. Ostali potencijalni prediktori citoplazmatskog histokora bili su, pTNM stadijum, gradus, veličina, klinički stadijum kao i nekroza. Sa porastom veličine tumora očekuju se veće vrednosti citoplazmatskog CXCR7 histokora, budući da se statističkom analizom veličina pokazala kao nezavisni prediktor. Zanimljiv fenomen koji je uočen predstavlja intenzivna prebojenost ćelija koje okružuju područja tumorske nekroze.

Među osnovnim ciljevima ovog istraživanja bilo je određivanje prognostičkog značaja imunohistoemijske ekspresije CXCR7. Jedan od najznačajnijih rezultata ove studije je prediktivni potencijal CXCR7 biomarkera. Pri porastu vrednosti membranskog CXCR7 histokora, može se očekivati značajno kraće preživljavanje.



Prema dosadašnjim saznanjima, CXCR7 doprinosi CXCL12/CXCR4 hemokinskoj osovini na dva načina. Najpre, CXCR7 funkcioniše kao specifični receptor čistač (engl. scavenger) za CXCL11 i CXCL12, za koji se vezuje sa deset puta većim afinitetom u odnosu na CXCR4. On internalizuje ligande i transportuje ih unutar ćelije, do lizozoma gde se vrši njihova degradacija. Na taj način smanjuje njihovu koncentraciju u ekstracelularnom prostoru. Manjak CXCL12 posledično dovodi i do regulacije signalne aktivnosti CXCR4 receptora. [130-132]. Drugi način kojim CXCR7 utiče na ćelijski odgovor na CXCL12 je formiranjem heterodimera sa CXCR4. Ispitujući aktivaciju G proteina i intraćelijsku mobilizaciju kalcijuma, Levoy i saradnici su analizirali funkcionalne karakteristike ova dva receptora. Našli su da CXCL12 indukuje brzi skok nivoa kalcijuma u CXCR4+ ćelijama ali ne i u ćelijama koje ekspimiraju samo CXCR7. Izmena odgovora ćelije na CXCL12 u prisustvu CXCR7 a pri zadržanoj ekspresiji CXCR4 dovela je do otrića da ova dva receptora formiraju heterodimere. U prisustvu CXCR7 dolazi do konformacionih promena unutar CXCR4 proteina. Zbog toga CXCR4 menja svoju interakciju sa G proteinom, čime se menja i nishodna G-protein zavisna ćelijska signlizacija [133]. Analiza ćelija karcinoma dojke je pokazala da, iako postoji CXCR4 i CXCR7 koekspresija na tumorskim ćelijama, ova dva receptora su češće samostalno ekspimirana na odvojenim ćelijskim populacijama unutar istog tumora [82]. U našem istraživanju nađena je značajna međusobna povezanost pozitivne i membranske i citoplazmatske ekspresije CXCR4 i CXCR7. Jaka pozitivna korelacija nađena je između CXCL12 i CXCR7 citoplazmatskog histoskora, aumerena pozitivna korelacija observirana je između CXCL12M i CXCR7C kao i između CXCR4 i CXCR7 citoplazmatskog histoskora. Rezultati prikazani u ovoj studiji idu u prilog teorijama njihovog uzajamnog dejstva.

U zavisnosti od tipa tumora koekspresija CXCR7 sa CXCR4 može i ne mora biti prisutna na tumorskim ćelijama. Na primer, naćelijskoj kulturi glioblastoma ekspimiram je CXCR7 a ne CXCR4, dok je na ćelijama sitnoćelijskog karcinoma pluća obrnut slučaj [134]. In vitro eksperimenti na ćelijama karcinoma dojke su pokazali da bi ova dva receptora mogla imati različite uloge u metastaziranju. CXCR7 je podsticao rast primarnog tumora posredstvom angiogeneze ali je njegova prekomerna ekspresija smanjivala efekte izazvane CXCR4, i to motilitet unutar primarnog tumora, invazivnost i formiranje metastaza u plućima [135]. Studija na pacijentima sa karcinomom dojke je pokazala da ekspresija CXCR4 i CXCR7 nezavisno predviđa preživljavanje i da korelira sa metastatskim statusom limfnih nodusa [136]. Uloga

kojuovi receptori imaju u nastanku metastaza, mogla bi objasniti naše rezultate vezane za pRCC. Budući da je 7 od 13 pacijenata sa pRCC-a imalo metastaze u trenutku dijagnoze ne iznenađuje prekomerna ekspresija ovih receptora.

Rast tumora i metastaziranje se u znatnoj meri oslanjaju na neoangiogenezu. CXCR7 je eksprimiran na endotelnim progenitornim ćelijama, čija migracija i distribucija predstavljaju ključne elemente za formaciju novih krvnih sudova [130, 133]. Yamada i saradnici su demonstrirali, in vitro i in vivo, povećanu ekspresiju CXCR7 na krvnim sudovima različitih tumora Tumorske endotelne ćelije sekretuju i CXCR7 i CXCL12, čime autokrinim putem podstiču angiogenezu. [137]. U ovoj studiji nađena je jaka pozitivna korelacija između citoplazmatske ekspresije CXCL12 i CXCR7. Možda postoji interakcija CXCL12-sekretujućih endotelnih ćelija i CXCR7+ ili CXCR4+ tumorskih ćelija i ovaj odnos može biti predmet budućih istraživanja.

U prezentovanoj studiji, pozitivna membranska i citoplazmatska ekspresija CXCL12 bile su prisutne u velikom procentu tumora. 77 od 85 ccRCC eksprimiralo je citoplazmatsku a 83 membransku CXCL12 pozitivnost. Svi pRCC tumori ispoljili su snažnu citoplazmatsku pozitivnost ovog markera. Visok intenzitet ekspresije odrazio se i na visoke vrednosti histoskora koje su bile značajno više u tumorima papilarnog tipa, koji se pokazao kao nezavisni prediktor citoplazmatskog CXCL12 histoskora. Povećana citoplazmatska ekspresija bila je povezana i sa veličinom tumora. Granične vrednosti citoplazmatskog (73) i membranskog (200) histoskora su bile značajno povezane sa većim mortalitetom, a citoplazmatski CXCL12 histoskor iznad 73 nezavisno predviđa kraći period preživljavanja.

U istraživanju Wanga i saradnika, nađena je pozitivna CXCL12 ekspresija u većini uzoraka, dominantno membranske lokalizacije. Imunohistohemijska ekspresija CXCL12 u RCC-u je upoređivana sa okolnim zdravim tkivom. Tumorsko tkivo je pokazivalo ekspresiju slabijeg intenziteta u poređenju sa zdravim tkivom. Veće koncentracije CXCL12 u okolnom tkivu sugerišu nastanak koncentracijskog gradijenta koji bi podstakao metastaziranje CXCR4+ tumorskih ćelija. Pacijenti sa snažnom ekspresijom CXCL12 su takođe imali kraći period preživljavanja što bi moglo ukazati na veću sklonost ka metastaziranju primarnog tumora [77]. U našoj studiji, nađena je membranska i citoplazmatska CXCL12 pozitivnost u preko 90% slučajeva tumorskog tkiva. Dobijene visoke srednje vrednosti membranskog i citoplazmatskog

histoskora za oba ispitivana tipa tumora govore o visokom intenzitetu bojenja, kao i o visokom procentu pozitivnih ćelija.

U meta-analizi, koja je obuhvatila 38 studija na različitim tumorima, visoka ekspresija CXCL12 povezana je sa kraćim preživljavanjem pacijenata sa karcinomom pankreasa, ezofagusa ili pluća, ali ne i pacijenata sa karcinomom dojke. Iako je dokazana povezanost CXCL12 ekspresije i kraćeg preživljavanja u različitim karcinomima, nije standardizovan jedinstveni metod kvantifikacije CXCL12. Zbog toga se, za sada, CXCL12 tretira kao potencijalni biomarker, vredan pažnje [138]. Wehler i saradnici su analizirajući ekspresiju CXCL12 $\alpha$  i CXCL12 $\beta$  izoformi u RCC-unašli da većina tumora ispoljava pozitivno bojenje. CXCL12 $\beta$  je korelirao sa gradusom tumora, ali ni CXCL12 $\alpha$  ni CXCL12 $\beta$  ekspresija nije imala uticaj na prognozu i OS [139]. U prezentovanoj studiji korišćeno antitelo predstavlja  $\alpha$  izoformu i pokazalo je značajan prediktivni potencijal, budući da se kod većih vrednosti citoplazmatskog histoskora može očekivati veća smrtnost.

Istraživanja ekspresije CXCL12 su se prvenstveno koncentrisala na metastatski potencijal ovog hemokina. CXCL12 indukuje sintezu matriks metaloproteinaza, koje, vršeći degradaciju ekstraćelijskog matriksa, doprinose invaziji kacerskih ćelija. Ovo je dokazano brojnim ćelijskim linijama različitih tumora: pankreasa, prostate, jajnika, glioma, skvamoznog karcinoma vrata, i sitnoćelijskom karcinomu pluća. CXCL12 može stimulisati proliferaciju i preživljavanje tumorskih ćelija. On takođe štiti tumorske ćelije od lekovima indukovane apoptoze, direktno, pomoću aktivacije antiapoptotskih puteva, ili indirektno modifikacijom adhezivnosti kancerskih ćelija. [140,141]. Korišćenjem životinjskih modela, Pan i saradnici su demonstrirali povećanu pojavu metastaza humanih RCC ćelija u organe koji eksprimiraju povećan nivo CXCL12. Našli su i pozitivnu korelaciju između CXCR4 ekspresije na ćelijama RCC i njihove sposobnosti metastaziranja. Pored toga, primena neutrališućeg anti-CXCL12 antitela je smanjila metastatski potencijal RCC ćelija na mišjim modelima. Istovremeno su otkrili i povećanu ekspresiju CXCR4 na cirkulišućim citokeratin+ RCC ćelijama, dobijenim od pacijenata sa dijagnostikovanim metastazama. Time su pokazali da je CXCR4 potencijalni biomarker za procenu sposobnosti ćelija RCC-a da metastaziraju [142]. Budući da je u ovoj studiji za svega nekoliko slučajeva bilo dokazano prisustvo udaljenih metastaza, ova pojava se nije mogla analizirati.

Funkcija CXCL12 može biti modifikovana ekspresijom njegovih receptora. CXCR7 funkcioniše kao receptor čistač (engl. scavenger). On uklanja ligand iz ekstraćelijskog prostora, smanjujući time njegovu koncentraciju koja bi mogla aktivirati CXCR4 signalni put. Na taj način CXCR7 može smanjiti CXCL12/CXCR4 posredovan tumorski rast. Ali uklanjanje CXCL12 pomoću CXCR7 može i održavati responsivnost CXCR4 signalizacije. U prethodno opisanoj studiji na ćelijama karcinoma dojke, kultivacija CXCR4+ ćelija u medijumu bogatom CXCL12 dovela je do pada nivoa površinske ekspresije CXCR4. Međutim kada su kulturi dodate CXCR7+ ćelije, izostao je pad CXCR4 ekspresije. Time je dokazano da CXCR7 smanjuje desenzitizaciju CXCR4+ tumorskih ćelija izazvanu velikim koncentracijama CXCL12. CXCR7 na taj način održava ovu hemokinsku osovinu i podstiče rast i metastaziranje karcinoma dojke [82].

Tumorska stroma i tumorske ćelije su dve osnovne komponente tumora. Tumorska stroma svojim funkcijama modifikuje tumorsku mikrosredinu i utiče na sudbinu tumorskih ćelija. Hipoksija u tumorskoj mikrosredini može biti jedan od načina indukcije ekspresije CXCL12, što je i dokazano na humanom karcinomu ovarijuma [143]. U karcinomu dojke fibroblasti unutar tumorske strome proizvode CXCL12, time privlače endotelne stem ćelije i podstiču vaskularizaciju tumora. [144]. U promotornom regionu gena za CXCL12, pronađena su 2 moguća mesta za vezivanje HIF1 transkripcionih faktora, HBS1 i HBS2. Smatra se da je HBS1 region odgovoran za HIF-1-zavisnu indukciju sinteze CXCL12 u endotelnim ćelijama. Hipoksija takođe indukuje ekspresiju CXCL12 u fibroblastima i HSC [140, 145].

Prema dosadašnjim saznanjima, većina ccRCC tumora nosi u sebi mutaciju koja inaktivira VHL tumor supresorni gen. Njegov protein ostvaruje brojne funkcije među kojima su metabolizam glukoze, angiogeneza, ćelijska proliferacija, preživljavanje, epitelno-mezehimna transmisija, apoptoza i proteozomalna razgradnja HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$  transkripcionih faktora u uslovima normoksije. Inaktivacija pVHL-a dovodi do akumulacije i produžene aktivnosti HIF-a. [95]. HIF1 $\alpha$  utiče na ekspresiju gena za eritropoetin i enzime glikolize, dok HIF2 $\alpha$  indukuje c-myc, TGF $\alpha$ , lysyl oxidase, Oct4, i Cyclin D1. Na nekim genima, poput c-myc HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$  ostvaruju suprotne efekte, dok je kod nekih gena poput VEGF ekspresija stimulisan i sa HIF1 $\alpha$  i sa HIF2 $\alpha$  [146].

Tokom godina brojne studije su ispitivale ulogu HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$  u kancerogenezi tumora bubrega i ponekad objavljivale kontradiktorne rezultate. U nekim istraživanjima ccRCC-a, HIF2 $\alpha$

se pokazao kao veći stimulator tumorogeneze u odnosu na HIF1 $\alpha$  koji se sa druge strane pokazao kao tumor supresor [98,100]. Neke studije na humanom tkivu pokazale su da ekspresija HIF1 $\alpha$  korelira sa boljim ukupnim preživljavanjem (OS), specifičnim preživljavanjem (disease-specific survival rate- DSS) i preživljavanjem bez progresije bolesti (progression-free survival- PFS) [98]. Ispitivanje novijeg datuma je pokazalo da visoka ekspresija HIF1 $\alpha$  korelira sa dužim OS i PFS [147]. Ovi rezultati se poklapaju sa nalazima koje su dobili Lidgren i saradnici, koji su osim toga, našli značajno veću ekspresiju HIF1 $\alpha$  u ccRCC u odnosu na hromofobni i papilarni tip [148]. Ispitujući preživljavanje, ali i reakciju RCC pacijenata na inhibitor tirozin kinaze, Sunitinib, Dornbusch i saradnici su pokazali povezanost visoke ekspresije HIF1 $\alpha$  i dužih PFS i OS, kao i bolji odgovor na terapiju [149]. Nasuprot tome, druge studije su prezentovale suprotne podatke i istakle razliku u prognostičkom potencijalu između HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$ . U njima se gora prognoza vezivala za visoku HIF1 $\alpha$  a nisku HIF2 $\alpha$  ekspresiju. Imunohistohemijska analiza 83 uzorka RCC je pokazala povezanost HIF1 $\alpha$  sa većim Fuhrmanovim gradusom, invazijom renalne vene i kliničkim stadijumom [150]. Shultz i saradnici su dokazali veću imunohistohemijsku ekspresiju HIF1 $\alpha$  u primarnom i metastatskom ccRCC-u u poređenju sa zdravim tkivom i njenu povezanost sa kraćim periodom preživljavanja [151]. U još jednoj publikaciji najveći nivo HIF1 $\alpha$  ekspresije bio je povezan sa najgorom prognozom [152]. Ebru i saradnici su našli kraći period preživljavanja kod pozitivne ekspresije i HIF1 $\alpha$  i HIF 2 $\alpha$  [153]. Nedavno objavljena studija je ispitujući 380 pacijenata sa RCC-om našla povezanost visoke HIF1 $\alpha$  ekspresije na tumorskim makrofagimasa većim gradusom, pTNM stadijumom, kao i sa kraćim PFS i OS. [154]. Rezultati sprovedene meta-analize su pokazali da, iako postoji negativna asocijacija između HIF2 $\alpha$  i preživljavanja u brojnim solidnim tumorima, kod tumora bubrega to nije slučaj, već je HIF2 $\alpha$  pozitivan prognostički biomarker preživljavanja bez metastaza [155]. Kontradiktorni rezultati, dobijeni u različitim laboratorijama mogli bi se objasniti raznovrsnim dizajnom eksperimenata, tipovima animalnih modela ili humanih ćelijskih linija. Bez obzira na okolnosti HIF2 $\alpha$  se smatra validnom metom u terapiji ccRCC-a [96]. HIF2 $\alpha$  inhibitori su trenutno u fazi I/II testiranja za ccRCC. Inhibicija HIF2 $\alpha$  dovodi do nishodne regulacije njegovih ciljnih gena i smanjenja cirkulišućih nivoa VEGF koje proizvodi tumor. I faza kliničkog ispitivanja HIF2 $\alpha$  antagonista prve generacije (PT2385), je pokazala njegovu bezbednost i potencijalnu korist za pacijente sa lokalno uznapredovalim ili metastatskim ccRCC-om, ali uz moguć razvoj rezistencije [156].

Inhibitor druge generacije (PT2799) ima veći potencijal i ispituje se na pacijentima sa prethodno tretiranim uznapredovalim ccRCC-om [157].

Rezultati našeg istraživanja su pokazali razliku između pozitivne membranske i citoplazmatske ekspresije HIF1 $\alpha$ . Membransku pozitivnost imalo je 77(78.6%) uzoraka a citoplazmatsku 73 (74.5%). Pozitivna membranska ekspresija je povezana sa ccRCC tipom, nižim kliničkim stadijumom i odsustvom sarkomatoidne diferencijacije. Nasuprot tome pozitivna citoplazmatska ekspresija HIF1 $\alpha$  povezana je sa papilarnim tipom, većim pTNM stadijumom i većim tumorskim gradusom. Analiza histoskora je pokazala da se veće vrednosti membranskog HIF1 $\alpha$  histoskora mogu očekivati kod tumora ccRCC tipa, što je dokazano modelom univarijantne linearne regresije. Nasuprot tome, nađeno je više mogućih prediktora većih vrednosti citoplazmatskog HIF1 $\alpha$  histoskora: tip tumora, gradus, pTNM stadijum, klinički stadijum, veličina tumora, prisustvo nekroze i sarkomatodina diferencijacija. Kao nezavisni preiktor, pokazao se papilarni tip, a veće vrednosti HIF1 $\alpha$  citoplazmatskog histoskora mogu se očekivati i kod tumora većeg gradusa.

U našoj studiji, nađena je jaka pozitivna korelacija između citoplazmatskog HIF1 $\alpha$  histoskora i vrednosti citoplazmatskog histoskora za CXCL12 i CXCR7. Umerena pozitivna korelacija postoji između sledećih vrednosti histoskora: CXCL12M i HIF1 $\alpha$ C, CXCR4C i HIF1 $\alpha$ C, Notch1C i HIF1 $\alpha$ C.

Povezanost HIF-1 $\alpha$ /VHL osovine sa promenom ekspresije CXCR4 u ćelijskoj kulturi RCC-a demonstrirali su Pan i saradnici. Takođe su, na mišjim modelima, pokazali uključenost CXCL12/CXCR4 osovine u organ-specifično metastaziranje humanih RCC ćelija. U njihovim eksperimentima na imunodeficientnim (SCID) miševima došlo je do metastaza humanih RCC ćelija u organe sa povećanom ekspresijom CXCL12: u kostnu srž, mozak, jetru i nadbubreg [142]. Studija novijeg datuma istakla je važnost hipoksije, HIF-1 $\alpha$  i CXCR4 u mehanizmima angiogeneze i metastaziranja. Brza proliferacija tumorskih ćelija povećava veličinu tumora, što dovodi do deficita kiseonika u tumorskoj mikrosredini, to za posledicu ima porast nivoa HIF-1 $\alpha$  kojipovećava transkripciju CXCR4. Ova studija je takođe pokazala interakciju između HIF1 $\alpha$  i CXCR4 u RCC-u, pri čemu je CXCR4 olakšao translokaciju HIF-1 $\alpha$  u jedro i pojačao transkripciju njegovih ciljnih gena, stvarajući povratnu spregu [127].

U značajnoj studiji, starijeg datuma, Staller i saradnicisu dokazali da se gen za CXCR4 može indukovati hipoksijom i da poseduje domen za vezivanje HIF-1 $\alpha$  [158]. U ccRCC-u, gde je VHL mutacija poznata, gubitak funkcije VHL-a dovodi do produžene aktivnosti HIF-1 $\alpha$ , i posledične povećane ekspresije gena koji se aktiviraju u odgovoru na hipoksiju, među kojima su VEGF, CXCR4 i njegov ligand CXCL12 [159, 160]. Ovim se može objasniti povećana ekspresija CXCR4 u regionima angiogeneze degeneracije i nekroze, koja se često sreće u tumorskom tkivu [140]. Neka od prvih imunohistochemijskih ispitivanja CXCL12 i CXCR4 u humanom glioblastomu, pokazala su njihovu povezanost sa regionima nekroze i angiogeneze [161]. Studija novijeg datuma ispitala je fenomen tumorske nekroze uzrokovane dezorganizacijom vaskulature u oralnom skvamoznom karcinomu. Upotrebom CXCR4 inhibitora (AMD3100) na eksperimentalnim životinjama, došlo je do širenja HIF1 $\alpha$  pozitivnih ćelija po celom tumoru, dok su u grupi bez inhibicije CXCR4, HIF1 $\alpha$  pozitivne ćelije bile lokalizovane u centralnom delu tumorske mase, koji trpi najveću ishemiju i gde najpre nastaje nekroza. Ovo sugeriše da je intratumorska hipoksija koja je stimulus za ekspresiju HIF1 $\alpha$ , pre svega lokalizovana u centralnim zonama tumora a da upotreba antagonista CXCR4 dovodi do širenja hipoksije kroz ceo tumor. Mehanizam kojim antagonist CXCR4 dovodi do hipoksije i posledične nekroze tumora je posredstvom defektne angiogeneze. Upotreba AMD3100 na eksperimentalnom modelu, dovela je do nastanka manjeg broja krvnih sudova unutar tumora koji su bili tanji, kraći i nerazgranati. Time je pokazan uticaj hemokinske osovine na tumorsku angiogenezu [162].

U našem istraživanju detektovana je CXCR7, HIF1 $\alpha$  i Notch1 ekspresija, visokog intenziteta na ćelijama koje okružuju područja nekroze. Međutim, prilikom statističke analize, nekroza se pokazala kao potencijalni ali ne i nezavisni prediktor citoplazmatskog HIF1 $\alpha$  i CXCR7 histoskora, dok je značajna povezanost nađena samo sa citoplazmatskom Notch1 ekspresijom. U tumorima sa prisutnom nekrozom, mogu se očekivati veće vrednosti citoplazmatskog Notch1 histoskora.

Notch receptori su evolucijski konzervativni transmembranski proteini neophodni za brojne ćelijske funkcije. Uključeni su u odluke o sudbini ćelija tokom embriogeneze, naročito nefrogeneze, određujući da li će se ćelije deliti ili diferencirati. Oni takođe imaju različite, nekad i kontradiktorne uloge u nastanku i razvoju tumora. Ishod koji će izazvati promena Notch signalizacije zavisi od funkcije koju ovi receptori imaju u određenom organu. Ako su u nekom tkivu uključeni u obnavljanje stem ćelija, ponašaće se kao onkogeni. Nasuprot tome, ako u tkivu

promovišu terminalnu diferencijaciju, ponašaće sa kao tumor supresori. Notch1 može da promoviše ili ograničava rast i razvoj tumora delujući načelijski metabolizam progresiju ćelijskog ciklusa, angiogenezu ili imune funkcije. Notch receptori igraju važnu ulogu i u tumorskoj neoangiogenezi i njihova aktivacija je neophodna za funkcionisanje VEGF-a [103, 105].

U ovom istraživanju, i citoplazmatska i membranska ekspresija Notch1 receptora bila je zastupljena u manjem broju slučajeva. Bez membranske Notch1 ekspresije bilo je 38 uzoraka, od toga 12 tumora pRCC tipa. Istovremeno je nađena povezanost pRCC tumora sa nižim vrednostima membranskog Notch1 histoskora, dok je svetloćelijski tip bio prediktor viših vrednosti ovog histoskora. Bez citoplazmatske Notch1 ekspresije bio je 41 uzorak. Citoplazmatska Notch1 pozitivnost bila je povezana sa većim histološkim gradusom, dok je jedina statistički značajna povezanost nađena između višeg citoplazmatskog Notch1 Histoskora i prisustva tumorske nekroze.

Ispitujući ekspresiju sva 4 Notch receptora, Aparicio i saradnici su našli da je ekspresija Notch 1 receptora povezana sa stepenom diferencijacije tumora i izraženija u tumorima nižeg histološkog gradusa [106]. Imunohistohemijska istraživanja starijeg datuma našla su značajno veću ekspresiju Notch1 receptora na zdravim proksimalnim i distalnim tubulima u odnosu na ćelije RCC-a koje su ispoljile često negativno ili bojenje slabog intenziteta [102]. Nasuprot tome, analiza Notch1 ekspresije na uzorcima ccRCC iz 2017. je pokazala povezanost visoke ekspresije Notch1 sa pTNM stadijumom, Fhurmanovim gradusom i veličinom tumora. Inhibicija Notch1 u ccRCC ćelijskoj kulturi, dovela je do inhibicije proliferacije i apoptoze tumorskih ćelija [163]. Slične rezultate dobilo je još jedno istraživanje na ccRCC kulturi, gde je blokada Notch signalnog puta dovela do smanjene proliferacije i smanjenog migratornog potencijala kancerskih ćelija [164].

Nedavno sprovedena analiza ekspresije CXCR4 i Notch1 u adenokarcinomu pluća, pokazala je pozitivnu korelaciju između njih. Uz to, koekspresija ova dva markera povezana je sa limfovaskularnom invazijom, uznapredovalim stadijumom i kraćim preživljavanjem, sugerišući da simultana inhibicija oba faktora može pokazati bolje terapijske rezultate [165]. Povezanost između Notch signalnog puta i CXCL12/CXCR4 hemokinske osovine nađena je i ispitivanjem ćelijskih kultura i humanih uzoraka glioma. Dokazana je ne samo korelacija ekspresije već i povezanostovih signalnih puteva. Notch1 posredstvom CXCL12/CXCR4 deluje na AKT/mTOR signalni put i time podstiče invazivnost i samo-obnavljanje tzv. gliom inicirajućih ćelija ili stem ćelija glioma, koje



su u velikoj meri odgovorne za progresiju i agresivnost glioblastoma multiforme [166]. U našem istraživanju obserirana je umerena pozitivna korelacija između citoplazmatskog Notch1 histoskora i membranskog i citoplazmatskog CXCL12 histoskora kao i između citoplazmatskog CXCR4 i Notch1 i HIF1 $\alpha$  histoskora. Povezanost i međusobni uticaj (engl. cross-talk) Notch signalnog puta i hipoksija inducibilnih faktora počeo je da se ispituje pre skoro dvadeset godina, kada je dokazana povećana ekspresija Notch gena u uslovima hipoksije. Kasnija istraživanja različitih patoloških stanja poput ishemijskih bolesti, reumatoidnog artritisa, i tumora, su dokazala da se i HIF1 $\alpha$  i HIF2 $\alpha$  vezuju za ICD Notch receptora, modifikujući njihove funkcije. Tumorska angiogeneza počiva na istim principima kao i fiziološka, u uslovima hipoksije HIF indukuje sintezu VEGF i ostalih proangiogenih faktora. Preživljavanje i prilagođavanje tumorskih ćelija na hipoksiju posredstvom HIF-Notch signalizacije nađeno je u karcinomu dojke, pluća, melanomu, neuroblastomu i ccRCC-u [146].

Sposobnost Notch receptora i njihovih liganda da predviđaju mortalitet proučavana je različitim metodama. U jednoj studiji, sekvenciranjem DNK ispitivana je genska ekspresija Notch receptora na preko 900 RCC uzoraka koja je zatim korelirana sa preživljavanjem. Niža ekspresija gena za JAG2, NOTCH1, NOTCH3 i NOTCH4, povezana je sa povoljnijim ishodom ccRCC i pRCC-a [167]. Imunohistohemijsko ispitivanje 3 markera Notch signalnog puta: Jagged1, intracellular Notch1 (ICN1) i Hes1, pokazalo je da njihovo kombinovanje u jedinstveni skor može biti nezavisni prediktor preživljavanja (OS i RFS) [168]. Rezultati naše studije su pokazali da granična vrednost citoplazmatskog Notch1 histoskora od 50 može da odredi pojavu mortaliteta sa senzitivnoscu od 55% i specifičnoscu od 70,7%. Međutim, on nije identifikovan kao nezavisan prediktor mortaliteta.

Zbog uloge Notch receptora u angiogenezi i ekspresije na endotelnim ćelijama tumora, njihova blokada u terapijske svrhe je postala predmet brojnih istraživanja. Razvijeni su blokatori DLL4 liganda koji sprečavaju njegovo vezivanje za Notch receptore. Time se smanjuje vaskularizacija tumora, a posledično i njegov rast. Međutim, nespecifična blokada DLL4 dovela je do oštećenja i normalnih krvnih sudova sa ozbiljnim posledicama. Zbog toga su se istraživanja usmerila na otkrivanje specifičnih blokatora. Notch1 i Notch 3 specifična antitela su pokazala značajnu redukciju tumorske mase, na životinjskim modelima, bez razvoja toksičnosti [105]. Bez obzira na to koji će molekuli biti meta, blokada angiogeneze ostaje atraktivna strategija u istraživanjima antikancerskih terapeutika.

Pacijenti sa ccRCC-om ispoljavaju različito kliničko ponašanje koje može biti indolentno, sporo progresivno ili agresivno sa brzim propadanjem. Istovremeno postoji i različiti odgovor na trenutno dostupne terapijske opcije. Jedan od izazova adjuvantne terapije je precizno odrediti pacijente kod kojih postoji visok rizik za recidiv bolesti. Samim tim može se postići značajan napredak razvojem prediktivnih prognostičkih markera. Još uvek postoje nedostaci u saznanjima koje sve genetske i biohemijske karakteristike vode do tumorske heterogenosti.

Za pacijente sa RCC-om intermedijarnog rizika, tj. bez teške kliničke slike i pridruženih komorbiditeta, na raspolaganju je prva linija terapije koju čine anti-VEGF inhibitori tirozin kinaze: sorafenib, sunitinib (Sutent), pazopanib i axitinib, kao i rekombinantno anti-VEGF monoklonsko antitelo - bevacizumab plus interferon alfa [169, 170]. Na ove terapeutike pacijenti reaguju određeni period, a nakon toga, dolazi do zasićenosti organizma, tumor postaje otporan na lečenje i bolest počinje ponovo da se širi. Zbog tog se primenjuju kombinacije lekova i uporno se traga za novim terapijskim modalitetima. Rapamycin (sirolimus) i njegovi analozi (Temsirolimus, Ridaforolimus) su inhibitori mTOR signalnog puta i koriste se kod pacijenata sa metastatskim RCC-om sa lošom prognozom [171]. Temsirolimus je takođe indikovano kao druga terapijska linija nakon neuspeha terapije Sunitinib-om ili Sorafenib-om. Inhibitori mTOR puta produžuju preživljavanje bez progresije (Progression free survival - PFS) kod pacijenata sa metastatskim RCC-om. Međutim, većina pacijenata razvije rezistenciju i na ove agense [172]. Iako je ciljna terapija poboljšala prognozu pacijenata sa ccRCC-om, petogodišnje preživljavanje imaće samo 8% do 11,7% pacijenata sa metastatskim RCC-om [58].

Kada je razvoj novih antikancerskih terapeutika u pitanju, ciljana blokada CXCL12/CXCR4/CXCR7 osovine predstavlja mehanizam koji obećava. Trenutno se istražuju različiti CXCR4 antagonisti poput: AMD3100, T22, TN14003, CTCE-9908, ALX40-4C. Oni mogu biti peptidi analogni amino-terminalnom regionu hemokina CXCL12. [141]. Studije na različitim kancerskim modelima su pokazale da kombinacija CXCR4 inhibitora (AMD3100) sa imunoterapeutikama inhibira tumorski rast i produžava period preživljavanja. [173, 174]. Inhibicija CXCR7 molekula na ćelijama kancera vršena je antitelima ili malom interferirajućom RNK (small interfering RNA siRNA). SiRNA je in vitro pokazala zadovoljavajuće rezultate na različitim ćelijskim linijama poput karcinoma prostate, ezofagusa, endometrijuma i u kulturi ćelija oralnog skvamoznog karcinoma, [175]. Kada su RCC ćelije in vitro tretirane microRNA-218, došlo je do smanjenja vijabilnosti kao i sposobnosti migracije i invazije. [176]. Kombinacija

inhibitora ove hemokinske osovine sa poznatim terapeutcima bi mogla u budućnosti povećati terapijsku efikasnost.

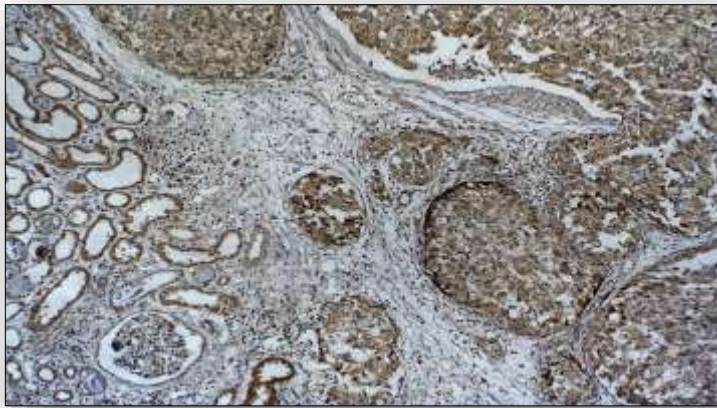
U cilju otkrivanja novih terapijskih mogućnosti ispitivana je povezanost CXCL12/CXCR4/CXCR7 hemokinske osovine sa mTOR signalnim putem na ćelijskim linijama RCC-a. Rezultati su pokazali da ciljana blokada ovih hemokinskih receptora antagonistima (CXCR4 inhibitor-AMD3100 ili Peptide R-specific CXCR4 antagonist, kao i anti-CXCR7) indukuje osteljivost na Temsirolimus u inače rezistentnim RCC ćelijskim linijama [70]. Ovo ukazuje na mogućnost kombinacije mTOR inhibitora sa inhibitorima CXCL12/CXCR4/CXCR7 hemokinske osovine u cilju sprečavanja razvoja rezistencije.

Guo i saradnici su ispitivali ekspresiju CXCR4 kod pacijenata sa metastatskim RCC-om koji su primili terapeutike prve linije: sorafenib, sunitinib, pazopanib i axitinib. Njihovi rezultati pokazuju sposobnost CXCR4 markera da predvidi efikasnost terapije sorafenibom. Pacijenti sa negativnom ili niskom CXCR4 ekspresijom su imali duži PFS u odnosu na one sa intermedijarnom ili visokom CXCR4 ekspresijom [177].

Imunoterapija predstavlja još jednu terapijsku mogućnost za pacijente sa RCC-om. Najvažnije terapijske mete su T regulatorni limfociti (T reg), koji suprimiraju različite ćelije imunog sistema i inhibitorni i molekuli na površini T-ćelija. Inhibitorni molekuli su površinski receptori koji nakon vezivanja liganda produkuju inhibitorni signal koji blokira inflamatornu aktivnost T-limfocita, čime se ostvaruje tolerancija na sopstvene ćelije. [178] Međutim, to je i mehanizam pomoću koga tumor izbegava imuni odgovor [170]. Važni površinski inhibitorni receptori su citotoksični T-limfocitno asocirani protein 4 (CTLA4) na površini CD4+T-limfocita i protein programirane smrti (Programmed cell death 1 protein 1 PD-1) na površini CD8+ T-limfocita. Kombinacija lekova pembrolizumab-a, blokatora PD-1 receptora i antiangiogenog axitinib-a se koristi kod pacijenata sa uznapredovalim RCC-om [179]. Nedavno odobreni terapeutici sa inhibitornom aktivnošću su Ipilimumab, monoklonsko antitela za CTLA4 i PD-1 inhibitor, Nivolumab [170]. Istraživanja na različitim animalnim modelima kancera su demonstrirala da kombinacija inhibitora CXCR4 (AMD3100) i anti-PD1 inhibiše rast tumora i produžava vreme preživljavanja [180,174]. U svom istraživanju, Santagata i saradnici sugerišu da inhibicija CXCR4 može da preokrene supresivnu funkciju T-reg limfocita u tumorskoj

mikrosredini, i time poboljša odgovor na anti-PD1 [173]. Iako ovi podaci imaju ograničenja, ističu neophodnost kombinacije imunoterapeutika u cilju postizanja maksimalne efikasnosti.

Sa svakim novim istraživanjem postaje jasno da veliki signalni putevi ne funkcionišu samostalno niti izolovano. Čelije prikupljaju informacije sa različitih strana da bi adekvatno odgovorile na kompleksna ekstracelularna događanja. Ovim istraživanjem pokušali smo da pronađemo povezanost faktora hipoksije i angiogeneze HIF1 $\alpha$  i Notch 1 sa hemokinom CXCL12 i njegovim receptorima. Dešifrovanje uzajamnih veza dovešće do boljeg razumevanja adaptacije i preživljavanja tumorskih ćelija, a samim tim i do efikasnijih terapijskih modaliteta. Proučavanje uloga ovih biomarkera može u budućnosti imati implikacije u dijagnostici, prognozi, prevenciji recidiva i razvoju ciljane terapije jednog od najletalnijih uroloških maligniteta.



## 7. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja doveli su do sledećih zaključaka:

1. Pozitivna membranska i citoplazmatska ekspresija hemokina CXCL12 prisutna je u više od 90% uzoraka. Citoplazmatska ekspresija prisutna je u svim uzorcima papilarnog tipa. Takođe postoji značajna povezanost između pozitivne citoplazmatske CXCL12 ekspresije i većeg gradusa tumora. Veći intenzitet i procenat i citoplazmatske i membranske ekspresije CXCL12, izračunati upotrebom histoskora, mogu se očekivati u tumorima papilarnog tipa. Porast veličine tumora predviđa veću vrednost citoplazmatskog CXCL12 histoskora.
2. Pozitivna membranska ekspresija CXCR7 nađena je u preko 90% ispitivanih uzoraka, a citoplazmatska pozitivnost u 86,7% uzoraka. Postoji značajna povezanost pozitivne membranske ekspresije CXCR7 i ccRCC tipa, dok je pozitivna citoplazmatska ekspresija CXCR7 povezana sa većim pTNM stadijumom. Svetloćelijski tip takođe ima 4 puta veću verovatnoću pozitivne membranske CXCR4 ekspresije. Međutim, u pRCC tumorima mogu se očekivati veće vrednosti membranog CXCR7a citoplazmatskog CXCR4 histoskora. Papilarni tip tumora i veličina su se pokazali kao nezavisni prediktori citoplazmatskog CXCR7 histoskora. Nije nađena statistički značajna povezanost ispitivanih parametara membranog CXCR4 histoskora.
3. Preko 70% uzoraka ispoljilo je pozitivnu HIF1 $\alpha$  imunohistohemijsku reaktivnost i membranske i citoplazmatske lokalizacije. Pozitivna membranska ekspresija HIF1 $\alpha$  povezana je sa ccRCC tipom tumora i nižim kliničkim stadijumom. Nasuprot tome, pozitivna citoplazmatska ekspresija HIF1 $\alpha$  je povezana sa većim pTNM stadijumom,

većim tumorskim gradusom i papilarnim tipom tumora. Jedini prediktor većeg membranskog HIF1 $\alpha$  histoskora, je svetloćelijski tip tumora. Iako je dosta parametara (tip tumora, pTNM, klinički stadijum gradus, veličina tumora, prisustvo nekroze i srakomatoidne diferencijacije) pokazalo izvesnu povezanost sa porastom citoplazmatskog HIF1 $\alpha$  histoskora, nezavisni prediktori većih vrednosti su papilarni tip tumora i veći histološki gradus.

4. Membranska Notch1 ekspresija bila je negativna kod 38 uzoraka, od toga 12 (93.3%) tumora pRCC tipa. Membranska Notch1M pozitivnost je povezana sa svetloćelijskim tipom, manjim pTNM stadijumom i manjim kliničkim stadijumom. Bez citoplazmatske ekspresije bio je 41 uzorak, a citoplazmatska Notch1 pozitivnost je povezana sa većim histološkim gradusom. Jedina statistički značajna veza nađena je između većeg citoplazmatskog Notch1 histoskora i tumorske nekroze, dok veće vrednosti membranskog histoskora predviđaju ccRCC tip i niži klinički stadijum.
5. Iako je uočena CXCR7 i HIF1 $\alpha$  pozitivnost visokog intenziteta na ćelijama koja okružuju zone nekroze, nekroza se pokazala kao potencijalni prediktor citoplazmatskog CXCR7 i HIF1 $\alpha$  histoskora, dok je nađena statistički značajna povezanost između prisustva nekroze i većih vrednosti citoplazmatskog Notch1 histoskora. Sa porastom veličine tumora očukuju se veće vrednosti citoplazmatskog CXCL12 histoskora. Sarkomatoidna diferencijacija je bila prisutna kod 30% uzoraka pRCC-a i kod 14% uzoraka ccRCC i pokazala se kao nezavisni prediktor mortaliteta. Međutim pozitivna membranska HIF1 $\alpha$  ekspresija može se očekivati kod tumora bez sarkomatoidne diferencijacije.
6. Jaka pozitivna korelacija nađena je između membranskog i citoplazmatskog CXCL12 histoskora, kao i između citoplazmatskog CXCL12 i CXCR7 histoskora. Umerena pozitivna korelacija je nađena između citoplazmatskog CXCL12 i CXCR4 kao i između citoplazmatskog CXCR4 i CXCR7 histoskora, što ide u prilog njihovoj koekspresiji i uzajamnom delovanju.
7. Snažna pozitivna korelacija, nađena između citoplazmatskog HIF1 $\alpha$  histoskora i citoplazmatskog CXCL12 i CXCR7 histoskora, sugerise njihovu koekspresiju i potencijalnu interakciju. Pronađena je umerena pozitivna korelacija između citoplazmatskog Notch1 histoskora i membranskog i citoplazmatskog CXCL12

histoskora, kao i između citoplazmatskog Notch1 histoskora i oba hemokinska receptora. Na moguću koekspresiju i interakciju Notch1 i HIF1 $\alpha$  sugeriše i umerena pozitivna korelacija njihovog citoplazmatskog histoskora.

8. U poređenju sa ccRCC, pRCC tumori su imali značajno veće vrednosti membranskog CXCL12, kao i citoplazmatskog CXCL12 i CXCR4 histoskora. U pRCC se mogu očekivati i veće vrednosti citoplazmatskog CXCR7 histoskora. Papilarni tip je takođe nezavisni prediktor većih vrednosti citoplazmatskog HIF1 $\alpha$  histoskora. Svetloćelijski tip ima 20puta veću verovatnoću da ispolji membransku Notch1 pozitivnost i kod ccRCC-a se očekuju i veće vrednosti membranskog Notch1 histoskora.
9. Mortalitet je u ovoj studiji povezan sa papilarnim tipom tumora, većim histološkim gradusom, veličinom, pTNM i kliničkim stadijumom kao i sa prisustvom nekroze i sarkomatioidne diferencijacije. Kao potencijalni prediktori mortaliteta identifikovane su vrednosti citoplazmatskog histoskora sledećih markera: CXCL12, CXCR7, Notch1 i HIF1 $\alpha$ , i veće vrednosti membranskog CXCL12 histoskora. Međutim kao nezavisni prediktori izdvojena su tri parametra. Kraće preživljavanje se može predvideti većim kliničkim stadijumom, vrednošću CXCL12 citoplazmatskog histoskora iznad 73 i većim vrednostima membranskog CXCR7 histoskora.

## 8. LITERATURA

1. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 2016; 70(1): 93 – 105.
2. Capitanio U, Bensalah K, Bex A et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma, *EurUrol*. 2019;75(1):74-84. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.036>.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018;68:7-30.
4. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer* 2018.
5. Cancer Registry of Central Serbia. Institute of Public Health of the Republic of Serbia 2015; Available from: <http://www.batut.org.rs/>
6. Patel NH, Attwood KM, Hanzly M, et al. Comparative Analysis of Smoking as a Risk Factor among Renal Cell Carcinoma Histological Subtypes. *The Journal of urology* 2015;194:640-6.
7. Pekmez H, Ogeturk M, Ozyurt H et al: Ameliorative effect of caffeic acid phenethyl ester on histopathological and biochemical changes induced by cigarette smoke in rat kidney. *Toxicol Ind Health* 2010; 26: 175.
8. Heeschen C, Jang JJ, Weis M et al: Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7: 833.
9. Parker AS, Cerhan JR, Janney CA, Lynch CF, Cantor KP. Smoking cessation and renal cell carcinoma. *Ann Epidemiol*. 2003;13:245-51.
10. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Moore SC, Schatzkin A, Chow WH. Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *Am J Epidemiol*. 2008;168(3):268-77. doi: 10.1093/aje/kwn122.



11. Liao LM, Hofmann JN, Cho E, et al. Circulating levels of obesity-related markers and risk of renal cell carcinoma in the PLCO cancer screening trial. *Cancer Causes Control* 2017;28:801–7.
12. Liu X, Sun Q, Hou H, et al. The association between BMI and kidney cancer risk: An updated dose-response meta-analysis in accordance with PRISMA guideline. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(44):e12860.
13. Bravi F, Bosetti C, Scotti L, Talamini R, Montella M, Ramazzotti V, Negri E, Franceschi S, La Vecchia C. Food groups and renal cell carcinoma: a case-control study from Italy. *Int J Cancer*. 2007;120(3):681-5.
14. Hidayat K, Du X, Zou S-Y, Shi B-M. Blood pressure and kidney cancer risk. *J Hypertens* 2017;35:1333–44.
15. Sanfilippo KM, McTigue KM, Fidler CJ, et al. Hypertension and obesity and the risk of kidney cancer in 2 large cohorts of US men and women. *Hypertension*. 2014;63(5):934–941
16. Colt JS, Schwartz K, Graubard BI, et al. Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans. *Epidemiology*. 2011;22(6):797-804.
17. Weikert S, Boeing H, Pischon T, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* 2008;167:438-446.
18. Radford R, Frain H, Ryan MP, et al. Mechanisms of Chemical Carcinogenesis in the Kidneys. *Int. J Mol Sci*. 2013;14:19416-19433.
19. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis*. 2002;17(4):265-77.
20. Brauch H, Weirich G, Klein B et al. VHL mutations in renal cell cancer: does occupational exposure to trichloroethylene make a difference? *Toxicology Letters* 2004; 151(1): 301-310.
21. Haas NB, Nathanson KL. Hereditary Renal Cancer Syndromes *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014;21(1):81-90. doi:10.1053/j.ackd.2013.10.001
22. Richards FM, Crossey PA, Phipps ME, et al. Detailed mapping of germline deletions of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene. *Hum Molec Genet*. 1994;3(4):595–598.

23. Van Houwelingen KP, Van Dijk BA, Hulsbergen-van de Kaa CA, et al. Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands cohort study. *BMC Cancer*. 2005;5:57.
24. Rechsteiner MP, von Teichman A, Nowicka A, Sulser T, Schraml P, Moch H. VHL gene mutations and their effects on hypoxia inducible factor HIF $\alpha$ : identification of potential driver and passenger mutations. *Cancer Res*. 2011 Aug 15;71(16):5500-11.
25. Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, et al. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene*. 1999;18(14):2343–2350.
26. Merino MJ, Torres-Cabala C, Pinto P, Linehan WM. The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(10):1578–1585.
27. Pavlovich CP, Grubb RL 3rd, Hurley K, et al. Evaluation and management of renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *J Urol*. 2005;173(5):1482–1486.
28. Cairns P. Renal Cell Carcinoma, *Cancer Biomark*. 2011;9(1-6):461–473. doi:10.3233/CBM-2011-0176.
29. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol*. 1996;14:216-22.
30. Ng CS, Wood CG, Silverman PM, Tannir NM, Tamboli P, Sandler CM. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging and Surveillance. *AJR*. 2008;191:1220-32.
31. Robins V, Kumar V, Abbas AB, Fausto N, Mitchell RN, Robinsove osnove patologije. Osmo izdanje. Beograd: Data Status; 2010. Poglavlje 14. Bubrege sabirni sitem bubrege, 541
32. Babu A, Lachmann H, Pickett T et al. Renal cell carcinoma presenting as AA amyloidosis: a case report and review of the literature. *CEN Case Rep*. 2014; **3**: 68–74.
33. Johnson JR, Feehally J, *Comprehensive Clinical Nephrology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Mosby, Elsevier Limited;2003. Poglavlje 2.
34. Heidenreich A, Ravery V; European Society of Oncological Urology. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World J Urol*. 2004;22:307-15.

35. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *Eur Urol.* 2016;69:660-73.
36. Gong J, Maia MC, Dizman N, Govindarajan A, Pal SK. Metastasis in renal cell carcinoma: Biology and implications for therapy. *Asian J Urol.* 2016;3(4):286-292.
37. Swami U, Nussenzveig RH, Haaland B, Agarwal N. Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 1):S18.
38. Williamson SR, Taneja K, Cheng L. Renal cell carcinoma staging: pitfalls, challenges, and updates. *Histopathology* 2019;74: 18–30.
39. Cheaib JG, Patel HD, Johnson MH et al. Stage-specific conditional survival in renal cell carcinoma after nephrectomy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 38 2020;6.e1–6.e76.e2
40. Atanacković M, Cvetković-Dožoc D, Laban A et al. *Patologija.* Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu;2009.
41. Potić Floranović M, Ristić Petrović A, Veličković F, Potić M, Džopalić T, Janković Veličković Lj. Rhabdoid Differentiation in Different Types of Renal Cell Carcinoma: A Report of Two Cases and Literature Review. *Acta Fac. Medicae Naissensis.* 2020;37(1):79-86
42. Shuch B, Bratslavsky G, Linehan WM et al. Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma: A Comprehensive Review of the Biology and Current Treatment Strategies. *Oncologist.* 2012; 17(1): 46–54.
43. Wang Z, Kim TB, Peng B et al. Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma Has a Distinct Molecular Pathogenesis, Driver Mutation Profile and Transcriptional Landscape *Clin Cancer Res.* 2017; 23(21): 6686–6696.
44. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H et al. Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(4):435-41.
45. Reuter VE, Argani P, Zhou M, Delahunt B; Members of the ISUP Immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group. Best practices recommendations in the application of

- immunohistochemistry in the kidney tumors: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(8):e35-49.
46. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982; **6**: 655–663.).
47. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(10):1490-504. doi: 10.1097/PAS.0b013e318299f0fb.
48. Renshaw AA, Cheville JC. Quantitative tumour necrosis is an independent predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma. *Pathology.* 2015;47(1):34-7.
49. Chevarie-Davis M, Riazalhosseini Y, Arseneault M, et al. The morphologic and immunohistochemical spectrum of papillary renal cell carcinoma: study including 132 cases with pure type 1 and type 2 morphology as well as tumors with overlapping features. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(7):887-94.
50. Perret AG, Clemencon A, Li G, et al. Differential expression of prognostic markers in histological subtypes of papillary renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2008;102(2):183-7.
51. Volpe A, Novara G, Antonelli A. Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU Int.* 2012;110(1):76-83.
52. Kuroda N, Toi M, Hiroi M, Enzan H. Review of chromophobe renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol* 2003;18(1): 165-71.
53. Steffens S, Janssen M, Roos FC, et al. The Fuhrman grading system has no prognostic value in patients with nonsarcomatoid chromophobe renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2014;45(12):2411-6. doi: 10.1016/j.humpath.2014.08.002.
54. Din NU, Fatima S, Ahmad Z. Chromophobe renal cell carcinoma: a morphologic and immunohistochemical study of 45 cases. *Ann Diagn Pathol* 2013;17(6): 508-13.
55. Dhakal HP, McKenney JK, Khor LY, et al. Renal Neoplasms With Overlapping Features of Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Clear Cell Papillary Renal Cell Carcinoma: A Clinicopathologic Study of 37 Cases From a Single Institution. *Am J Surg Pathol.* 2016 ;40(2):141-54. doi: 10.1097/PAS.0000000000000583.

56. Williamson SR, Eble JN, Cheng L, Grignon DJ. Clear cell papillary renal cell carcinoma: differential diagnosis and extended immunohistochemical profile. *Modern Pathology* 2013; 26:697–708.
57. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl 5):58-68.
58. Choueiri TK, Motzer RJ: Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2017;376:354-366
59. Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2 Suppl):S460-S475. doi:10.1067/mai.2003.108
60. Miller MC, Mayo KH Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10): 2088. doi:10.3390/ijms18102088
61. Du Y, Long Q, Guan B, Mu L: Prognostic Value of High CXCR4 Expression in Renal Cell Carcinoma: A System Review and Meta-Analysis. *Disease Markers.* 2015;2015:1–7.
62. Susek KH, Karvouni M, Alici E, Lundqvist A. The Role of CXC Chemokine Receptors 1–4 on Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology.* 2018;9: 2159.
63. Kufareva, I, Salanga, CL, Handel, TM. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(4):372–383.
64. Bonecchi R and Graham GJ. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2016;7:224
65. Janssens R, Struyf S, Proost P. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;44:51-68.
66. Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr.* 2009;3(3): 243-249
67. Kehrl, JH. The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Gα<sub>i</sub>-mediated signaling in immunity. *Biochem. Pharmacol.* 2014;114: 40–52.
68. Teixidó J, Martínez-Moreno M, Díaz-Martínez M, Sevilla-Movilla S. The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2018;95: 121–31.

69. O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J.* 2008;409: 635-649
70. Ieranò C, Santagata S, Napolitano M, Guardia F, Grimaldi A, Antignani E, et al. CXCR4 and CXCR7 transduce through mTOR in human renal cancer cells. *Cell Death Dis.* 2014; 5(7): 1310–1310.
71. Busilloa J, Benovic J. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(4):952-963.
72. Meng W, Xue S, Chen Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene.* 2018;641:105-110. doi:10.1016/j.gene.2017.10.01
73. Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KEJ, Machtens S, Mengel M, et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer.* 2002;86(8): 1250–6.
74. Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Forster R. Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:203–242.
75. Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front in Immunol.* 2015; 6: 301.
76. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11): 2927- 2931.
77. Wang L, Chen W, Gao L, Yang Q, Liu B, Wu Z, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *WORLD J SURG ONCOL.* 2012;10(1): 212.
78. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006; 203(9):2201–13
79. Maishi N, Ohga N, Hida Y, et al. CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int.* 2012;62(5):309-17. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02792.x.
80. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, et al. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood.* 2009;113 (24): 6085-6093.

81. Wang C, Weilin Chen, Jianzhong She. CXCR7 Targeting and Its Major Disease Relevance. *Front. Pharmacol.* 2018;9:641.
82. Luker, K., Lewin, S., Mihalko, L. *et al.* Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene* 2012;**31**:4750–4758 <https://doi.org/10.1038/onc.2011.633>
83. Floranović MP, Veličković LJ. Effect of CXCL12 and Its Receptors on Unpredictable Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer.* 2020;18(4):e337-e342.
84. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Adv Cancer Res.* 2014;124: 31–82.
85. Jones J, Marian D, Weich E, et al. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2007;313(19):4051–65.
86. Spano J-P. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol.* 2004;15(4): 613–7.
87. Sun Y-X, Wang J, Shelburne CE, et al. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem.* 2003;89(3):462–73.
88. Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, et al. The Role of CXCR7/RDC1 as a Chemokine Receptor for CXCL12/SDF-1 in Prostate Cancer. *J Biol Chem.* 2008;283(7):4283–94.
89. Yao Q, Xu C, Zhao H, Chen H. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4953-63.
90. Li YM, Pan Y, Wei Y, et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell.* 2004;6: 459-469.
91. Liao Y-X, Zhou C-H, Zeng H, et al. The role of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in the progression and metastasis of bone sarcomas (Review). *Int J Mol Med.* 2013;32(6):1239–46.
92. Camaj P, Jackel C, Krebs S, et al. Hypoxia-independent gene expression mediated by SOX9 promotes aggressive pancreatic tumor biology. *Molecul Cancer Res.* 2014;12(3): 421–432.
93. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol.* 2005;23(12): 2744–2753.

94. Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, et al. CXC Chemokine Receptor 4 is Essential for Maintenance of Renal cell Carcinoma-Initiating Cells and Predicts Metastasis: Cancer Stem Cell Marker CXCR4 in Kidney Cancer. *STEM CELLS*. 2013;31(8):1467–76.
95. Wierzbicki PM, Klacz J, Kotulak-Chrzaszcz A, et al. Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGFA and p53 expression in patients with clear-cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first-line treatment. *Int J Oncol*. 2019;55(2):371-390.
96. Garje R, An JJ, Sanchez K, et al.. Current Landscape and the Potential Role of Hypoxia-Inducible Factors and Selenium in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treatment. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):E3834. doi: 10.3390/ijms19123834.
97. "How cells sense and adapt to oxygen availability". The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019. NobelPrize.org. Nobel Media AB. 7 October 2019.
98. Gudas LJ, Fu L, Minton DR, Mongan NP, Nanus DM. The role of HIF1 $\alpha$  in renal cell carcinoma tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(8):825-836.
99. Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):378-389. doi:10.1016/j.apsb.2015.05.007
100. Martínez-Sáez O, Gajate Borau P, Alonso-Gordoa T, Molina-Cerrillo J, Grande E. Targeting HIF-2 in clear cell renal cell carcinoma: A promising therapeutic strategy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;111:117-123
101. Biswas S, Charlesworth PJ, Turner GD, et al. CD31 angiogenesis and combined expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  are prognostic in primary clear-cell renal cell carcinoma (CC-RCC), but HIF $\alpha$  transcriptional products are not: implications for antiangiogenic trials and HIF $\alpha$  biomarker studies in primary CC-RCC. *Carcinogenesis*. 2012;33:1717-25.
102. Sun S, Du R, Gao J, et al. Expression and clinical significance of Notch receptors in human renal cell carcinoma. *Pathology*. 2009;41(4):335-341.
103. Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*. 2013;34(7):1420-1430.
104. Takebe N, Nguyen D, Yang SX. Targeting Notch signaling pathway in cancer: Clinical development advances and challenges. *Pharmacology & Therapeutics* 2014;141:140-149.



105. Kofler NM, Shawber CJ, Kangsamaksin T, Reed HO, Galatioto J, Kitajewski J. Notch signaling in developmental and tumor angiogenesis. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1106-1116.
106. Aparicio AL, Medina Villamil V, Aparicio Gallego G. Expression of Notch1 to -4 and their Ligands in Renal Cell Carcinoma: A Tissue Microarray Study. *CANCER GENOMICS & PROTEOMICS* 2011;8:93-102.
107. Miyamoto S., Nakanishi M., Rosenberg D.W. 2013 Supression od colon carcinogenesis by targeting Notch signaling. *Carcinogenesis* 34, 2415-2423.
108. Klinakis A, Szabolcs M, Politi K, et al. Myc is a Notch1 transcriptional target and a requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9262-9267.
109. Yi L, Zhou X, Li T, et al. Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):339. Published 2019 Aug 5.
110. Liu Z, Fu Q, Fu H, et al. A three-molecule score based on Notch pathway predicts poor prognosis in non-metastasis clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(42):68559-68570. doi:10.18632/oncotarget.11849
111. Zhuang Z, Lin J, Huang Y, Lin T, Zheng Z, Ma X. Notch 1 is a valuable therapeutic target against cell survival and proliferation in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2017;14(3):3437-3444. doi:10.3892/ol.2017.6587
112. Went P, Dirnhofer S, Salvisberg T, et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jan;29(1):83-8.
113. Jensen K, Krusenstjerna-Hafstrøm R, Lohse J, Petersen KH, Derand H. A novel quantitative immunohistochemistry method for precise protein measurements directly in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: analytical performance measuring HER2. *Mod Pathol*. 2017;30(2):180-193.
114. Rasti A, Abolhasani M, Zanjani LS, et al. Reduced expression of CXCR4, a novel renal cancer stem cell marker, is associated with high-grade renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 143(1): 95–104, 2017.

115. Ricketts CJ, Linehan WM. Gender Specific Mutation Incidence and Survival Associations in Clear Cell Renal Cell Carcinoma (CCRCC). *PLoS One* 2015;10:e0140257.
116. Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KEJ, Machtens S, Mengel M, et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer*. 2002;86(8): 1250–6.
117. Jones J, Marian D, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2007;313(19): 4051–65.
118. Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, Henkel L, Schiemann M, Mack B, et al. CXC Chemokine Receptor 4 is Essential for Maintenance of Renal cell Carcinoma-Initiating Cells and Predicts Metastasis: Cancer Stem Cell Marker CXCR4 in Kidney Cancer. *STEM CELLS*. 2013;31(8):1467–76.
119. Gahan JC, Gosalbez M, Yates T, Young EE, Escudero DO, Chi A, et al. Chemokine and Chemokine Receptor Expression in Kidney Tumors: Molecular Profiling of Histological Subtypes and Association with Metastasis. *J Urol*. 2012;187(3): 827–33.
120. Wu Z, Zhang Y, Chen X, Tan W, He L, Peng L. Characterization of the Prognostic Values of the CXCR1-7 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC) Microenvironment. *Front Mol Biosci*. 2020;7:601206. doi:10.3389/fmolb.2020.601206
121. Haege S, Einer C, Thiele S, et al. CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) regulates CXCR4 protein expression and capillary tuft development in mouse kidney. *PLoS One*. 2012;7(8):e42814.
122. Tang B, Tang F, Li Y, Yuan S, Li B, Wang Z, et al. Clinicopathological Significance of CXCR4 Expression in Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015; 22(3): 1026–31.
123. Wehler TC, Graf C, Biesterfeld S, Brenner W, Schadt J, Gockel I, et al. Strong Expression of Chemokine Receptor CXCR 4 by Renal Cell Carcinoma Correlates with Advanced Disease. *J Oncol*. 2008;2008: 1–6.
124. Zagzag D, Krishnamachary B, Yee H, Okuyama H, Chiriboga L, Ali MA, et al. Stromal

- Cell-Derived Factor-1A and CXCR4 Expression in Hemangioblastoma and Clear Cell-Renal Cell Carcinoma: von Hippel-Lindau Loss-of-Function Induces Expression of a Ligand and Its Receptor. *Cancer Res.* 2005;65(14): 6178-88.
125. Wang L, Wang L, Yang B, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(8):1049-1054.
126. Xu Z, Li P, Wei D, et al. NMMHC-IIA-dependent nuclear location of CXCR4 promotes migration and invasion in renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2016;36(5):2681-2688.
127. Bao Y, Wang Z, Liu B. et al. A feed-forward loop between nuclear translocation of CXCR4 and HIF-1 $\alpha$  promotes renal cell carcinoma metastasis. *Oncogene* 2019;38(6): 881–895.
128. D'Alterio C, Cindolo L, Portella L, Polimeno M, Consales C, Riccio A, et al. Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma. *Cell Cycle.* 2010;9(22): 4492–500
129. D'Alterio C, Consales C, Polimeno M, et al. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(7):772-81.
130. Wang Chuan, Chen Weilin, Shen Jianzhong. CXCR7 Targeting and Its Major Disease Relevance. *Front Pharmacol.* 2018;21;9:641. doi: 10.3389/fphar.2018.00641.
131. Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell.* 2008;8;132(3):463-73.
132. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, et al. 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE* 5, e9175.
133. Levoye A, Balbanian K, Baleux F et al. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood.* 2009;113(24):6085-93.
- 
134. Hattermann K, Mentlein R. An infernal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology. *Ann Anat.* 2013;195(2):103-110.
135. Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, Condeelis JS, Seqall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R128
136. Wu W, Qian L, Chen X, Ding B. Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and

- CXCR7 in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(10):13217-13224.
137. Yamada K, Maishi N, Akiyama K, et al. CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. *Int J Cancer.* 2015;137(12):2825-2836.
138. Samarendra H, Jones K, Petrinic T, et al. A meta-analysis of CXCL12 expression for cancer prognosis. *Br J Cancer.* 2017;117(1):124-135. doi:10.1038/bjc.2017.134
139. Wehler TC, Graf C, Altherr K, et al. SDF1 $\beta$  expression in renal cell carcinoma correlates with grading and infiltration by CD8+ T-cells. *Anticancer Res.* 2011;31(9):2797-2803.
140. Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(3):C987-C995. doi:10.1152/ajpcell.00406.2006.
141. Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression [published correction appears in *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Jun;30(2):269-70.] *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):709-722. doi:10.1007/s10555-010-9256-x
142. Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, et al. Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Molecular Cancer.* 2006;5:56.
143. Kryczek I, Lange A, Mottram P, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.* 2005;65:465–472.
144. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121: 335–348.
145. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10: 858–864, 2004.
146. Landor SK, Lendahl U. The interplay between the cellular hypoxic response and Notch signaling. *Exp Cell Res.* 2017;356(2):146-151.

147. Salinas-Sánchez AS, Serrano-Oviedo L, Nam-Cha SY, Roche-Losada O, Sánchez-Prieto R, Giménez-Bachs JM. Prognostic Value of the VHL, HIF-1 $\alpha$ , and VEGF Signaling Pathway and Associated MAPK (ERK1/2 and ERK5) Pathways in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. A Long-Term Study. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(6):e923-e933.
148. Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1129-1135.
149. Dornbusch J, Zacharis A, Meinhardt M, et al. Analyses of potential predictive markers and survival data for a response to sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(9):e76386.
150. Bürgesser MV, Riva V, Ojeda SM, et al. Expression of VEGF-A, HIF-1 A, CD34 and Ki67 in clear cell renal cell carcinomas and their relationship with conventional prognostic markers. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2014;71(1):7-15.
151. Schultz L, Chaux A, Albadine R, et al. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(10):1549-1556.
152. Medina Villaamil V, Aparicio Gallego G, Santamarina Caínzos I, et al. Searching for Hif1- $\alpha$  interacting proteins in renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(9):698-708.
153. Ebru T, Fulya OP, Hakan A, et al. Analysis of various potential prognostic markers and survival data in clear cell renal cell carcinoma. *Int Braz J Urol*. 2017;43(3):440-454.
154. Cowman S, Fuja DG, Liu X.-D, Tidwell RS et al. Macrophage HIF-1 $\alpha$  is an independent prognostic indicator in kidney cancer. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(18): 4970-4982.
155. Moreno Roig E, Yaromina A, Houben R, Groot AJ, Dubois L, Vooijs M. Prognostic Role of HypoxiaInducible Factor-2alpha Tumor Cell Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2018;8:224.

156. Courtney KD, Infante JR, Lam ET, Figlin RA, Rini BI, Brugarolas J et al. Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$  Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. J Clin Oncol. 2018;36(9):867-874.
157. Papadopoulos KP, Jonasch E, Zojwalla NJ, Wang K, Bauer TM. A first-in-human phase 1 dose-escalation trial of the oral HIF-2 $\alpha$  inhibitor PT2977 in patients with advanced solid tumors. Journal of Clinical Oncology. 2018;36:15\_suppl, 2508-2508.
158. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature. 2003;425(6955): 307–311.
159. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med. 2006; 203(9):2201–13.
160. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. Adv Cancer Res. 2014;124: 31–82.
161. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. Clin Cancer Res. 2000;6(1):102-111.
162. Yoshida S, Kawai H, Eguchi T, Sukegawa S, Oo MW, Anqi C, Takabatake K, Nakano K, Okamoto K, Nagatsuka H. Tumor Angiogenic Inhibition Triggered Necrosis (TAITN) in Oral Cancer. Cells. 2019; 8(7):761.
163. Zhuang Z, Lin J, Huang Y, Lin T, Zheng Z, Ma X. Notch 1 is a valuable therapeutic target against cell survival and proliferation in clear cell renal cell carcinoma. Oncol Lett. 2017;14(3):3437-3444.
164. Sjölund J, Johansson M, Manna S, et al. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. J Clin Invest. 2008;118(1):217-228.
165. Cong Z, Wu H, Guo Z, et al. High expression of C-X-C chemokine receptor 4 and Notch1 is predictive of lymphovascular invasion and poor prognosis in lung adenocarcinoma. Tumour Biol. 2017;39(6):1010428317708698.

166. Yi L, Zhou X, Li T, et al. Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):339.
167. Jędraszka D, Orzechowska M, Bednarek AK. Predictive values of Notch signalling in renal carcinoma. *Arch Med Sci.* 2017;13(6):1249-1254.
168. Liu Z, Fu Q, Fu H, et al. A three-molecule score based on Notch pathway predicts poor prognosis in non-metastasis clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(42):68559-68570.
169. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia Brasileira.* 2015;48(3): 166–74.
170. Greef B, Eisen T. Medical treatment of renal cancer: new horizons. *Br J Cancer.* 2016;115(5):505-516. doi:10.1038/bjc.2016.230
171. Rini BI, Plimack ER, Stus V, et al.; KEYNOTE-426 Investigators. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019 21;380(12):1116-1127.
172. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149:274–293.
173. Santagata S, Napolitano M, D'Alterio C, et al. Targeting CXCR4 reverts the suppressive activity of T-regulatory cells in renal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(44):77110–77120.
174. Zeng Y, Li B, Liang Y, Reeves PM, Qu X, Ran C, Liu Q, Callahan MV, et al. Dual blockade of CXCL12-CXCR4 and PD-1-PD-L1 pathways prolongs survival of ovarian tumor-bearing mice by prevention of immunosuppression in the tumor microenvironment. *FASEB J.* 2019;33(5):6596-6608.
175. Lounsbury N. Advances in CXCR7 Modulators. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(2):33. doi:10.3390/ph13020033
176. Zhang S, Hong Z, Li Q, et al. Effect of MicroRNA-218 on the viability, apoptosis and invasion of renal cell carcinoma cells under hypoxia by targeted downregulation of CXCR7 expression. *Biomed Pharmacother.* 2016;80:213-219.
177. Guo J, Tang B, Sheng XN, Cui CL. Use of CXCR4 expression to predict the efficacy of

sorafenib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.*2011;29(7):359-359.

178. Farashi-bonab S, Khansari N. Regulatory T cells in cancer patients and their roles in cancer development/progression. *MOJ Immunol.* 2014; 1:00024.
179. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27(5):58-68.
180. Chen Y, Ramjiawan RR, Reiberger T, et al. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology.* 2015;61(5):1591–1602.



## **9. Biografija autora**

**Milena Potić S. Floranović** rođena je 13.09.1981. u Nišu. U Nišu je završila osnovnu školu “Ćele-kula” i gimnaziju “Svetozar Marković” društveno jezički smer gde je maturirala 2000. godine. Medicinski fakultet u Nišu je upisala 2000. Dobila je nagradu banke Eurobank EFG za studente završnih godina državnih fakulteta za ostvarene izvanredne rezultate tokom studija u okviru projekta „Investiramo u evropske vrednosti“ 2005. godine. Diplomirala 02.07. 2007. Godine sa prosečnom ocenom 9,7. Nakon obavljenog lekarskog staža, položila je državni ispit. Specijalistički ispit iz Patologije i patološke anatomije položila je 04.05.2018. godine sa odličnom ocenom.

Upisala je Akademske doktorske studije, smer molekularna medicina na Medicinskom fakultetu u Nišu januara 2008. Stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj od 2008. godine i angažovana na projektu ministarstva: “Modulatori target mesta genomiksa i proteomiksa redoks ćelijske signalizacije, proliferacije i inflamacije: nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti” (evidencion br. 145081). Od decembra 2008. volonterski angažovana kao saradnik u izvođenju nastave na predmetu osnovi imunologije.

Od 01.12.2010. zaposlena u Naučno istraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu kao samostalni stručni saradnik za elektronsku mikroskopiju i eksperimentalnu patologiju. 2015. godine prešla na program Doktorskih akademskih studija iz oblasti medicinskih nauka i položila sve programom predviđene ispite.

Na Medicinskom Fakultetu Univerzitetu u Nišu je prijavila temu za izradu doktorske disertacije pod nazivom: Datum i broj odluke o dobijanju saglasnosti za temu doktorske disertacije je:

Član je Srpskog Lekarskog Društva i Lekarske Komore Srbije.

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Експресија хемокинске осовине CXCL12/CXCR4/CXCR7, маркера хипоксије и ангиогенезе у карциномима бубрежног паренхима.

која је одбрањена на Медицинском факултету, Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

Потпис аутора дисертације:  
  
Др Милена С. Потих Флорановић

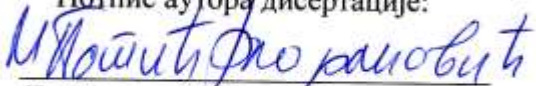
**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ  
ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

Експресија хемокинске осовине CXCL12/CXCR4/CXCR7,  
маркера хипоксије и ангиогенезе у карциномима бубрежног  
паренхима

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

Потпис аутора дисертације:

  
Др Милена С. Потих Флорановић

## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

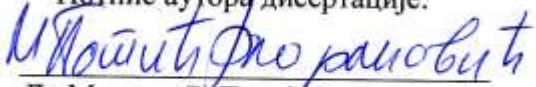
Овлашћујем Универзитетску библиотеку „НиколаТесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Експресија хемокинске осовине CXCL12/CXCR4/CXCR7, маркера хипоксије и ангиогенезе у карциномима бубрежног паренхима.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном затрајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CCBY)
2. Ауторство—некомерцијално (CCBY-NC)
3. Ауторство—некомерцијално—без прераде (CCBY-NC-ND)
4. Ауторство—некомерцијално— делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство—без прераде (CCBY-ND)
6. Ауторство—делити под истим условима (CCBY-SA)

Потпис аутора дисертације:  
  
Др Милена С. Потић Флорановић