

Medicine is not only a science; it is also an art. It does not consist of compounding pills and plasters; it deals with the very processes of life, which must be understood before they may be guided.

Medicina nije samo znanost: ona je i umjetnost. Ne sastoji se od pravljenja pilula i zavoja; bavi se procesima samog života, kojeg najprije treba razumjeti, a tek onda voditi.

## Posveta

Posvećeno mojoj djeci, Chiari i Davidu, koji su bili neumorni u podršci i pitanjima „tata, koliko još? Tata, kad ćeš doktorirat? Koliko si stranica danas napisao?“ Završili smo. ♥

Sad ćemo se posvetiti nama.

Mojoj Aldi, koja je bila nevjerojatno podrška na mom znanstvenom putu, na mojim odustajanjima, novim počecima i cijelim novim stazama. #ilybte



Zahvale...

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ante Strikić**

**Izražaj mRNA *HIF1A* i proteina GLUT1, HIF-1 $\alpha$  i VEGF-A  
u karcinomima bubrega**

**Doktorski rad**

**Mentor:**

**doc.dr.sc. Sandra Zekić Tomaš**

**U Splitu, lipanj 2024.g.**





## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Osnove anatomije, embriologije i histologije bubrega .....	1
1.2. Rak bubrega .....	6
1.2.1. Epidemiologija raka bubrega .....	6
1.2.2. Dijagnostika raka bubrega .....	8
1.2.3. Patohistološka obilježja i genetska osnova raka bubrega .....	9
1.2.4. Određivanje stadija raka bubrega .....	12
1.2.5. Uloga multidisciplinarnog tima u liječenju raka bubrega.....	14
1.2.6. Liječenje lokaliziranog raka bubrega.....	15
1.2.7. Liječenje lokoregionalnog raka bubrega.....	18
1.2.8. Liječenje metastatskog raka bubrega.....	20
1.2.9. <i>HIF-1A</i> gen i HIF-1 $\alpha$ .....	25
1.2.10. SLC2A1 gen i GLUT-1 .....	27
1.2.11. VEGF .....	29
1.2.12. Klinički značaj HIF-1 $\alpha$ , GLUT1 ,VEGF.....	30
2. HIPOTEZA .....	34
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	36
4. ISPITANICI I METODE .....	38
4.1. RNA izolacija i reverzna transkriptaza.....	38
4.2. qPCR.....	39
4.3. Imunohistokemijske analize.....	39
4.4. Protokol istraživanja.....	40
4.5. Statistički postupci .....	41
4.6. Etičko odobrenje .....	42
5. REZULTATI RADA .....	45
6. RASPRAVA .....	52
7. SAŽETAK .....	57
8. SUMMARY .....	60
9. ŽIVOTOPIS.....	64
10. POPIS LITERATURE.....	69

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ADH	<i>engl. antidiuretic hormone</i>
AE	<i>engl. adverse event</i>
AJCC	<i>engl. The American Joint Committee on Cancer</i>
Akt	<i>Akt signalni put</i>
ALT	<i>Alanin aminotransferaza</i>
ARNT	<i>engl. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
AST	<i>Aspartat aminotranferaza</i>
AXL	<i>AXL signalni put</i>
BHD	<i>Birt Hogg Dube</i>
BMP7	<i>engl. Bone morphogenetic protein</i>
ccRCC	<i>engl. clear-cell Renal cell cancer</i>
CD80/CD86	<i>engl. cluster of differentiation 80/86</i>
Cdc42	<i>engl. Cell division control protein 42</i>
cDNA	<i>engl. complementary DNA</i>
chRCC	<i>engl. chromophobe Renal cell cancer</i>
c-KIT	<i>engl. tyrosine-protein kinase Kit, CD117</i>
CR	<i>engl. complete response</i>
CT	<i>engl. computerized tomography</i>
CTLA-4	<i>engl. cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DAG	<i>engl. diacylglycerol</i>
DFS	<i>engl. disease-free survival</i>
DNK	<i>Deoksiribonukleinska kiselina</i>
ECOG PS	<i>engl. Eastern cooperative oncology group performance status</i>
ELISA	<i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	<i>engl. Endothelial nitric oxide synthase</i>
EPAS1	<i>engl. Endothelial PAS domain-containing protein 1</i>
ERK	<i>engl. extracellular signal-regulated kinases</i>
ESC	<i>engl. Eosinophilic solid and cystic renal cell carcinoma</i>
EVT	<i>engl. eosinophilic vacuolated tumors</i>



FDA	<i>engl. Food and Drug Administration</i>
FDG	<i>engl. fluorodeoxyglucose</i>
FGF2	<i>engl. Fibroblast growth factor 2</i>
FGFR-1	<i>engl. Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FGFR-2	<i>engl. Fibroblast growth factor receptor 2</i>
FGFR-3	<i>engl. Fibroblast growth factor receptor 2</i>
FISH	<i>engl. Fluorescence in situ hybridization</i>
GAPDH	<i>engl. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDNF	<i>engl. glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GLUT1	<i>engl. glucose transporter 1</i>
Hgb	<i>Hemoglobin</i>
HGF	<i>engl. hepatocyte growth factor</i>
HIF-1A	<i>engl. Hypoxia-inducible factor 1A (gene)</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>engl. Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HIF-1 $\beta$	<i>engl. Hypoxia-inducible factor 1-beta</i>
hnRNPA2B1	<i>engl. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>
HR	<i>engl. hazard ratio</i>
HRE	<i>engl. Hypoxia-Response Element</i>
ICI	<i>engl. immune checkpoint inhibitors</i>
IHC	<i>engl. Immunohistochemistry</i>
IMDC	<i>engl. International Metastatic RCC Database Consortium</i>
IO-TKI	<i>engl. immunotherapy/tyrosine kinase inhibitor</i>
IP3	<i>engl. Inositol 1,4,5-triphosphate</i>
ISUP	<i>engl. International Society of Urological Pathology</i>
JAK	<i>engl. Janus kinase</i>
LOT	<i>engl. low-grade oncocytic tumor</i>
MAPK	<i>engl. Mitogen-activated protein kinases</i>
MAPK/ERK	<i>engl. mitogen-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinases</i>
MDT	<i>engl. Multidisciplinary team</i>
Mek	<i>engl. mitogen-activated protein kinases</i>
MET	<i>engl. tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor (HGF)</i>

MFS	<i>engl. metastasis-free survival</i>
MKB	<i>Međunarodna klasifikacija bolesti</i>
MRI	<i>engl. Magnetic Resonance Imaging</i>
mRNA	<i>engl. Messenger RNA</i>
MSKCC	<i>engl. Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
mTOR	<i>engl. mammalian target of rapamycin</i>
ne-ccRCC	<i>ne-svijetlostanični rak bubrega</i>
NGS	<i>engl. next generation sequencing</i>
NO	<i>engl. nitric oxide</i>
NSS	<i>engl. Nephron-sparing surgery</i>
ORR	<i>engl. overall response rate</i>
OS	<i>engl. overall survival</i>
PAX2	<i>engl. paired box gene 2</i>
PCR	<i>engl. Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>engl. programmed cell death protein 1</i>
PDGFR- $\alpha$	<i>engl. platelet derived growth factor receptor alpha</i>
PD-L1	<i>engl. Programmed Cell Death Ligand 1</i>
PD-L2	<i>engl. Programmed Cell Death Ligand 2</i>
PET	<i>engl. Positron emission tomography</i>
PHD	<i>engl. Prolyl Hydroxylase Domain Proteins</i>
PI3K	<i>engl. Phosphoinositide 3-kinases</i>
PI3K-Akt	<i>engl. phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)</i>
PIGF	<i>engl. Placenta growth factor</i>
PIP2	<i>engl. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKC	<i>engl. Protein kinase C</i>
PLC $\gamma$	<i>engl. phospholipase C (PLC) gamma</i>
PN	<i>engl. partial nephrectomy</i>
pRCC	<i>engl. Papillary renal cell carcinoma</i>
PSMA	<i>engl. Prostate-specific membrane antigen</i>
pVHL	<i>engl. von Hippel–Lindau protein</i>

qPCR	<i>engl. quantitative polymerase chain reaction</i>
Rac	<i>engl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Raf	<i>engl. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
Ras	<i>engl. Rat sarcoma virus</i>
RDG	<i>Roendgen</i>
RET	<i>engl. rearranged during transfection</i>
Rho	<i>engl. Rho guanosine</i>
RhoGTPaza	<i>engl. Rho guanosine triphosphatases</i>
RN	<i>engl. radical nephrectomy</i>
RNA	<i>engl. Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>engl. Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RTqPCR	<i>engl. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,</i>
SLC2A1	<i>engl. solute carrier family 2 member 1</i>
Src	<i>engl. Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
STAT	<i>engl. signal transducers and activators of transcription</i>
TKI	<i>engl. Tyrosine kinase inhibitors</i>
TNM	<i>engl. Tumour, Node, Metastasis</i>
Tr	<i>Trombociti</i>
TSC1/2	<i>engl. tuberous sclerosis complex 1/2</i>
UCLA	<i>engl. University of California, Los Angeles</i>
VEGF	<i>engl. vascular endothelial growth factor</i>
VEGFA	<i>engl. vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFB	<i>engl. vascular endothelial growth factor B</i>
VEGFC	<i>engl. vascular endothelial growth factor C</i>
VEGFD	<i>engl. vascular endothelial growth factor D</i>
VEGF-R	<i>engl. vascular endothelial growth factor receptor</i>
VEGFR-1	<i>engl. vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
VEGFR-2	<i>engl. vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
VEGFR-3	<i>engl. vascular endothelial growth factor receptor 3</i>
VEGF-TKI	<i>engl. vascular endothelial growth factor - tyrosine kinase inhibitors</i>
VHL	<i>engl. Von Hippel-Lindau disease</i>

WHO *engl. World Health Organization.*  
WNT4 *engl. Wnt family member 4.*  
WNT6 *engl. Wnt family member 6*  
WNT9B *engl. Wnt Family Member 9B*  
WoS *engl. Web of Science*  
WT1 *engl. Wilms' tumor protein 1*



# 1. UVOD

## 1.1. Osnove anatomije, embriologije i histologije bubrega

Bubrezi, mokraćovodi, mokraćni mjehur, mokraćne cijevi čine funkcionalno-anatomsku cjelinu koju nazivamo mokraćni sustav. Dok ostali organi mokraćnog sustava imaju samo ulogu u izlučivanju tekućina i tvari iz tijela, funkcija bubrega znatno je složenija, od održavanja acidobaznog statusa, filtracije krvi, održavanje volumena i elektrolita te posljedične kontrole krvnog tlaka, do sinteze eritropoetina. Iako je bubreg retroperitonealni parni organ, smješten između 12. prsnog i 3. slabinskog kralješka postoje razlike između lijevog i desnog. (1) Desni bubreg položen je otprilike 2,5 centimetara niže od lijevog bubrega, nešto lateralnije od središnje linije i veličinom je nešto manji. Na kranijalnim polovima obaju bubrega nalaze se nadbubrežne žlijezde, koje od bubrega dijeli tanki sloj vezivnog tkiva. Prednju gornju stranu desnog bubrega prekriva jetra koja je od bubrega odvojena peritoneumom. Središnji dio desnog bubrega u dodiru je sa silaznim dijelom dvanaesnika. Uz donji pol desnog bubrega s lateralne strane nalazi se desni prijevod debelog crijeva, a prema medijalno, posredno preko peritoneuma, dio tankog crijeva. Želudac i slezena peritonejem su odvojeni od prednje strane lijevog bubrega, a gušterača izravno dodiruje središnji dio lijevog bubrega. U području donjeg pola, lijevi bubreg je u dodiru s lijevim pregibom i silaznim dijelom debelog crijeva izravno, dok je medijalno, odvojen peritonejem od jejunuma. Stražnje strane oba bubrega s gornje strane su u dodiru s ošitom, a mišići - m. psoas major, m. quadratus lumborum i m. transversus abdominis dodiruju sredinu i donji pol. Uz vezivne čahure bubrega nalazi se masno tkivo koje ulazi u bubrežni zaton. Bubrežna fascija obuhvaća masno tkivo oko bubrega i nadbubrežne žlijezde. Prednji i stražnji slojevi bubrežne fascije spajaju se na lateralnom rubu bubrega i nastavljaju u transverzalnu fasciju. Slojevi bubrežne fascije kranijalno od nadbubrežne žlijezde se sljubljuju i prelaze na fasciju ošita, a kaudalno obuhvaćaju ureter i nastavljaju se na fasciju uretera. Stražnji sloj fascije prekriva m. psoas major, a prednji sloj prelazi preko krvnih žila smještenih u hilusu oba bubrega. Masno tkivo naglašenije je stražnjoj o stražnjepostraničnom rubu bubrega. Kolagena vlakna koja tvore bubrežnu fasciju protežu se kroz masno tkivo oko bubrega i tvore vezivnožilni sklop koji uklapa i krvne žile hilusa i uretere te drže bubrege u relativno nepomičnom položaju. No, čak i unatoč takvom anatomskom položaju i

stabilizacije okolnim tkivima i organima, bubreg se prilikom promjene položaja može pomaknuti i do 3 cm (2).

Izvana, bubrezi su crvenkastosmeđe boje obavijeni vezivnom čahuricom s prednje i stražnje strane. Lateralni rub bubrega je izbočen, dok je medijalni izbočen na polovima, a udubljen u središnjem dijelu. U udubljenoj sredini medijalnog ruba nalazi se bubrežni hilus - kroz kojeg u bubreg ulaze i izlaze bubrežni živci, krvne žile: sprijeda bubrežna vena, iza koje se nalazi bubrežna arterija te limfne žile, uz bubrežnu zdjelicu (3). Struktura bubrega uočljiva je na prerezu: vanjski dio čini bubrežna kora, a i unutarnji dio bubrežna srž. Kora bubrega je tračak tkiva koji okružuje bubrežnu srž potpuno. Iz kore se prema unutrašnjosti bubrega pružaju izdanci koji odvajaju srž u nakupine piramidalnog tkiva, bubrežne piramide vrhova orijentiranih prema bubrežnom zatonu, a baza piramida okrenutih prema vanjskoj površini bubrega. Piramidalni vrhovi otvaraju se u male bubrežne vrčeve koji konfluiraju u dva do tri velika bubrežna vrča. Ovi se pak nastavljaju u bubrežnu zdjelicu.

Bubrezi su krvlju opskrbljeni krvnim žilama - arterije potječu iz aorte, a polaze neposredno ispod gornje mezenterične arterije (u visini drugog i trećeg slabinskog kralješka). Prateći razliku u anatomske položaju lijevog i desnog bubrega, lijeva bubrežna arterija iz aorte kranijalnije od desne, dok desna ima duži tok, koji ide iza donje šuplje vene. Obje bubrežne arterije dijele se na prednju i stražnju granu. Svaki bubreg drenira nekoliko bubrežnih vena koje se također ulijevaju na varijabilan način, tvoreći lijevu i desnu bubrežnu venu, koje su pritoci donje šuplje vene. Uz bubrežne vene, nalaze se i bubrežne limfne žile koje se dreniraju najčešće u postranične aortalne, ili u druge slabinske limfne čvorove. Živčana opskrba bubrega je simpatička i parasimpatička i dolazi iz renalnog spleta sastavljenog od živčanih niti celijačnog spleta, aortorenalnog i aortalnog ganglija te niti malog i najmanjeg splahnhičnog živca. Glavna eferentna inervacija bubrega je vazomotorna, a utječe na aferentnu i eferentnu arteriolu regulirajući glomerularnu filtraciju, reapsorpciju natrija, i otpuštanje renina (2–4).

Stvaranje bubrega počinje u trećem tjednu embrionalnog razdoblja formiranjem pronefrosaprebubrega, rudimentarne strukture koja služi kao prvi oblik bubrežnog razvoja. Iako je pronefros privremen (nestaje u 4. tjednu) i nefunkcionalan kod ljudi, ključan je u ranom razvoju bubrega (5) Pronefronski kanal tubularna je struktura koja je temelj strukture funkcionalnog bubrega. Nakon

faze pronefrosa, nastaje mezonefros - prabubreg, koji doprinosi nastanku funkcionalnih tubula, spajanjem s mesonefritičkim kanalom. Ovaj vod, poznat i kao Wollfov kanal, perzistira tijekom razvoja i ključan je za razvoj muškog reproduktivnog sustava. Vrhunac embrionalnog razvoja događa se stvaranjem metanefrosa – definitivnog funkcionalnog bubrega u ljudi. Porijekla mokraćnog pupoljka, urastanjem Wollfovog kanala i metanefritičkog mezenhima pojačava se nefrogeneza i kreće diferencijacija i proliferacija nefrona. Međusobna sprega i mikrokoliš mokraćnog pupoljka i metanefritičkog mezenhima vode razvoj nefrona u glomerule, proksimalne i distalne tubule. Kako nefrogeneza napreduje, stvara se otprilike milijun nefrona po bubregu, a molekularno signaliziranje vodi preciznom i ispravnom formiranju bubrega (6). Razvoj pupoljka uvjetovan je izražajem transkripcijskog čimbenika PAX2 (engl. Paired box gene 2) koji unutar epitela potiče izražaj RET (receptor tirozin kinaze za GDNF) te stimulira stvaranje neurotrofnog čimbenika glije (GDNF) u mezenhimskim stanicama, liganda za RET (7). Pupoljak luči fibroblastni čimbenik rasta 2 (FGF2) i koštani morfogenetski protein 7 (BMP7) čija kombinacija potiče rast mezenhima metanefrosa i izražaj čimbenika transkripcije WT1 (engl. Wilms tumor 1). WT1 potiče mezenhimalne stanice na izlučivanje GDNF i čimbenika rasta hepatocita (HGF) koji potiču rast mokraćovodnog pupoljka i njegovo grananje. Ovakvom interakcijom pupoljak i mezenhim međusobno potiču rast (8). Mokraćni pupoljak vodi i proces transformacije mezenhima metanefrosa u stanice epitela kanalića nefrona. Pupoljak proizvodi WNT9B i WNT6 (engl. Wingless and Int-1) potičući izražaj čimbenika transkripcije PAX2 i WNT4 u mezenhimskim stanicama. PAX2 povećava sintezu adhezijskih molekula sindekana i e-cadherina i omogućuje kondenzaciju mezenhima, a WNT4 započinje proces epitelizacije i stvaranja kanalića (9,10). Uz to, pupoljak zamjenjuje fibronektin i kolagen tipa I i III sastavnicama bazalne lamine epitela - lamininom i kolagenom tipa IV, time mijenjajući izvanstanični matriks. Urastanjem mokraćovodnog pupoljka u metanefrogeno tkivo, distalni kraj se širi u primitivnu nakapnicu, a dalje i u velike bubrežne vrčeve. Svaki vrč se, kroz 12 dioba dijeli u kanaliće, na način da kanalići druge generacije apsorbiraju kanaliće treće i četvrte generacije i tvore male vrčeve, a kanalići pete i narednih generacija (koji će kasnije tvoriti sabirne kanaliće) se znatno izdužuju, i naposljetku tvore bubrežnu piramidu. Na distalnom kraju svakog odvodnog kanalića nastaje kapa metanefrogenog tkiva u kojoj se, prema ranije opisanim molekularnim mehanizmima mezenhimalne stanice oblikuju u bubrežne mjehuriće, koji se izdužuju tvoreći kanaliće oblike slova S. Proksimalni kraj kanalića obuhvaća kapilarno klupko (glomerul) time tvoreći



Bowmanovu čahuru, dok se distalni kraj spoja s jednim od izvodnih kanalića, a nadalje se oblikuju proksimalni i distalni zavijeni kanalić i Henleova petlja čime okončava razvoj nefrona. Za vrijeme fetalnog razvoja bubreg nastaje u području zdjelice, a rastom se povlači kranijalno u gornji dio trbušne šupljine. To je posljedica smanjene zakrivljenosti embrija i povećanog rasta slabinskog i sakralnog područja. U 10. tjednu razvoja definitivni bubreg preuzima funkciju prabubrega oko i sudjeluje u recirkulaciji amnijske tekućine. U toj fazi razvoja funkciju izlučivanja otpadnih tvari vrši posteljica. Nefroni se stvaraju sve do rođenja, a potom nefroni dalje rastu, ali nema stvaranja novih nefrona (11)

Bubrežna kora, vanjski sloj bubrežnog parenhima, predominantno se sastoji od Bowmanove čahure i glomerula. Bubrežnu srž čine renalni tubuli i sabirni kanalići koji se spajaju tvoreći bubrežnu zdjelice, središnji izvod filtrata bubrega.

Svaki bubreg sadrži oko milijun funkcionalnih jedinica – nefrona, koje čini bubrežno tjelešće, proksimalni kanalić, Henleova petlja, distalni i spojni kanalić. Ovisno o smještaju, razlikujemo tri vrste nefrona: subkapsularne, intermedijarne i jukstamedularne, od kojih su intermedijarni najbrojniji (12)

Svaki nefron sadrži klupko kapilara – glomerul, okruženo dvostrukom Bowmanovom čahuricom čiji unutrašnji sloj oblaže krvne žile, vanjski sloj oblaže površinu kapsule. Unutar dvaju slojeva čahure nalazi se mokraćni prostor, koji zaprima tekućinu koja se filtrira iz glomerula. Svako bubrežno tjelešće ima vaskularni (žilni) pol kroz koje prolaze dovodne i odvodne krvne žile i mokraćni pol, iz kojeg izlazi mokraćni kanalić. Jednoslojni epitel čine stanice nazvane podociti koje oblažu vanjsku stijenu (13). Od tijela podocita pružaju se primarni nastavci, iz kojih se šire nožice - više sekundarnih nastavaka koji okružuju glomerularne kapilare. Između susjednih sekundarnih izdanaka nalazi se filtracijska pukotina, premoštena pukotinskom dijafragmom. Glomerularne kapilare fenestrirane su velikim porama, koje nemaju dijafragmu. Stapanje bazalnih lamina kapilara i podocita tvori glomerularnu bazalnu membranu, a spoj fenestracija endotelne stanice kapilara, bazalne membrane glomerula i pukotinskih dijafragma podocita čini filtracijsku barijeru. Između glomerula nalaze se mezangijske stanice, koje održavaju i strukturu nefrona, sintetiziraju izvanstanični matriks, omogućuju endocitozu te sintetiziraju prostaglandine i citokine. Proksimalni kanalić oblaže jednoredni kubični epitel, a sastavljen je od zavijenog i ravnog kanalića (silazni debeli kraj Henleove petlje). Do 80% vode, natrija, klora, svih proteina,

aminokiselina i glukoze iz ultrafiltrata plazme se reapsorbira u proksimalnom kanaliću. Pošto se u jednakim udjelima reapsorbiraju i voda i sol, osmolarnost ultrafiltrata u ovom segmentu ostaje nepromijenjena. Uz to, proksimalni kanalići mjesto je u kojem stanice luče organske baze i kiseline u filtriranu tekućinu. Henleovu petlju čine silazni i uzlazni kraj, obloženi jednoslojnim pločastim epitelom. Obzirom da je silazni krak permeabilan za vodu i djelomično permeabilan za sol u njemu se koncentira ultrafiltrat. Razrjeđivanje ultrafiltrata započinje u uzlaznom kraku Henleove petlje, pošto je nepermeabilan za vodu, a permeabilan za sol. Distalni kanalić analogno proksimalnom, sastoji se od distalnog zavijenog kanalića i ravnog dijela, a tvori ih jednoslojni kubični epitel. Uzlazni debeli krak Henleove petlje ulazi u koru bubrega neposredno uz aferentnu i eferentnu arteriolu svog bubrežnog tjelešca. Stanice koje oblažu kanaliće uz arteriole morfološki se izdužuju, približavaju jezgre i zbijaju se jedna uz drugu tvoreći područje nazvano gusta pjega. Stanice guste pjege s prilagođenim glatkomišićnim stanicama koje nazivamo jukstaglomerulame stanice, stanicama ekstraglomerularnog mezangija tvore jukstaglomerularni aparat koji ima ulogu glavnog regulatora osmolarnosti ultrafiltrane tekućine. Distalni kanalić potpuno je vodonepropustan, a obiluje raznim crpkama koje uklanjaju sol iz lumena kanalića što dovodi do razrjeđivanja ultrafiltrata u ovom dijelu. Distalni zavijeni kanalić i spojni kanalić sadržavaju stanice koje aldosteronskim receptorima reguliraju izražaj ionskih crpki čija je glavna uloga reapsorpcija natrijevih, a izlučivanje vodikovih i kalijevih iona u ultrafiltrat.

Spojni kanalići spajaju se u sabirne cjevčice, a više cjevčica tvori sabirne cijevi, koje se spuštaju niz sržne tračke kore u vidu kortikalnih sabirnih cijevi, odnosno medularnih sabirnih cijevi u bubrežnoj srži. Papilarna (Bellinijeva) cijev koja završava na vrhu piramide i izliva se u male čašice bubrega nastaje spajanjem više medularnih cijevi. Sabirne cijevi obložene su jednoslojnim kubičnim epitelom sastavljenog od 2 vrste stanica, glavnih, s ADH-ovisnim kanalićima, i interkaliranih stanica dva tipa – tipa A koje luče  $H^+$  ione u lumen i tipa B koje reapsorbiraju  $H^+$  ione, a luče  $HCO_3^-$  ione. Propusnost stanica sabirnih cijevi kontrolira hipofizni ADH, pod čijim utjecajem postaju propusne za vodu i omogućuju koncentriranje mokraćue. Bez ADH, stanice sabirnih kanalića su vodonepropusne i urin ostaje razrijeđen. Stanice sabirnih cijevi u meduli bubrega propusne su za ureu što omogućava stvaranje koncentracijskog gradijenta (14). Bubrežni intersticij naziv je za prostor između mokraćnih kanalića i krvnih žila građen od vezivnog tkiva s obiljem fibroblasta, kolagenih vlakana i proteoglikana. Bubrežni intersticij oskudan je u kori, a obilan je u srži bubrega. U intersticiju bubrega nalaze se i stanice koje luče prostaglandine.

Kompleksno obilje krvnih žila osnova je za održavanje funkcije bubrega u filtriranju krvi. Bubrežnom arterijom koja se u hilusu bubrega dijeli na manje, segmentalne arterije i dalje na interlobarne arterije, u bubreg dolazi oko 20% srčanog minutnog volumena, što odgovara volumenu u 1200 ml/min pri urednim vrijednostima krvnog tlaka (15). Interlobarne arterije se na granici kore i srži bubrega dodatno dijele i tvore arkuatne arterije, koje se protežu lučno uz granicu baze bubrežnih piramida. Iz njih se odvajaju manje interlobularne arterije koje nose krv duboko u bubrežnu koru. Iz interlobularnih arterija nastaju aferentne arteriole koje se u Bowmanovoj čahuri dijeli formirajući glomerul. Eferentne arteriole izvode krv iz glomerula i tvore splet peritubularne kapilarne mreže koja je difuzno raspoređena kroz bubrežnu koru. U jukstaklomerularnim nefronima, eferentne arteriole ne oblikuju peritubularne kapilare nego tzv. vasa recta - duge tanke kapilare koje odlazu u srž bubrega i u petlji se vraćaju prema granici kore i srži, a sadržavaju krv filtriranu kroz glomerule i donose hranjive tvari i kisik u srž bubrega. One ne uklanjaju osmotski gradijent uspostavljen u intersticiju srži, pošto su oblika poput petlje. Usporedno s tijekom bubrežnih arterija, prolaze i vene bubrega. Kapilare kapsule bubrega i subkapsularnih nefrona skupljaju se tvoreći stelatne vene, koje se ulijevaju u interlobularne vene. Kapilare drugih nefrona i vasa recta izlijevaju se u interlobularne vene, koje se potom ulijevaju u arkuatne vene, a iz njih u intralobarne vene. Spajanjem interlobatnih vena nastaju bubrežne vene, koje izvode krv iz bubrega i ulijevaju se u donju šuplju venu (2).

## **1.2. Rak bubrega**

### **1.2.1. Epidemiologija raka bubrega**

Rak bubrega značajan je klinički izazov u onkologiji, u čijoj su podlozi kombinacije epidemioloških i etioloških čimbenika. Rak bubrega deveti je najčešći rak u muškoj populaciji, a 14. kod žena(16). Incidencija varira, a češći je u razvijenim zemljama (17). Prema statističkim podacima, u svijetu se godišnje dijagnosticira u više od 430 000 ljudi. Razlike u incidenciji pripisuju se različitim socioekonomskim čimbenicima, promjenama životnih navika i pristupu zdravstvenoj skrbi. U Hrvatskoj je 2020.g. dijagnosticiran kod 793 bolesnika, točnije kod 459 muškaraca i 264 žene. Prema podacima hrvatskog Registra za rak, rak bubrega u gotovo 40% slučajeva dijagnosticira se u lokalnom stadiju, 10% kao lokoregionalna bolest, a kod 10% bolesnika kao početno metastatska bolest. U 40% slučajeva prijavljenih u Registar stadij bolesti nije bio poznat (18).

Omjer smrtnosti i incidencije kod muškaraca dijagnosticiranih s rakom bubrega bio je 0,51, dok je u ženskoj populaciji bio 0,48.

Dob je najznačajniji čimbenik rizika, obzirom da se većina slučajeva dijagnosticira osobama starijim od 45 godina, s najvećom učestalošću u populaciji bolesnika iznad 70 godina. Etiološki čimbenici su brojni, a mogu se podijeliti na promjenjive i nepromjenjive. Nepromjenjivi su:

- genetski čimbenici: rak bubrega se često pojavljuje u obiteljima sugerirajući nasljednu komponentu. Osobe s pozitivnom obiteljskom anamnezom su izloženi povećanom riziku. Određeni genetski sindromi poput von Hippel-Lindau (VHL) bolesti i nasljednog papilarnog raka bubrega povisuju rizik za razvoj raka bubrega.
- dob
- spol
- rasa; dok su promjenjivi čimbenici:
- okolišni čimbenici: izloženost karcinogenima, poput azbesta, teškim metalima, organskim otapalima, povezana je s većim rizikom razvoja raka bubrega
- pušenje je dobro definiran rizični čimbenik, a pušači češće obolijevaju od raka bubrega nego nepušači
- konzumacija alkohola
- arterijska hipertenzija i kronična bubrežna bolest identificirani su kao neovisni čimbenici rizika. Mehanizmi kojima oni doprinose razvoju raka uključuju promjene u opskrbi krvlju, oksidativni stres i upalu
- bubrežne ciste i dijaliza: bolesnici sa stečenim bubrežnim cistama i bolesnici na kroničnoj dijalizi imaju viši rizik obolijevanja od raka bubrega. Kronično i opetovano oštećenje bubrega tijekom dijalize i postojanje cisti bubrega doprinose nastanku raka bubrega
- prehrana i pretilost: pretilost je značajan promjenjivi čimbenik i prehrambene navike igraju ulogu u razvoju bolesti (19,20).

Programi prevencije raka bubrega u svijetu uključuju promjene prehrambenih navika, unošenje većih količina hrane biljnog porijekla, smanjenje unosa crvenog mesa i punomasnih mliječnih proizvoda, a dovode do smanjenja tjelesne težine, manjeg rizika za razvoj hipertenzije, hiperlipidemije šećerne bolesti, koji su čimbenici rizika za razvoj raka bubrega. Redovita

tjelovježba smanjuje rizik od razvoja raka bubrega, a prestanak pušenja smanjuje 10-godišnji rizik za razvoj raka bubrega za 50% (21).

Rana dijagnostika populacije s povećanim rizikom za razvoj raka bubrega, u vidu ultrazvuka, kompjutorizirane tomografije ili magnetne rezonancije bubrega, iako ne postoje randomizirane kliničke studije koje bi opravdale takav pristup, mogući je budući pomak smanjenju mortaliteta raka bubrega (22).

### **1.2.2. Dijagnostika raka bubrega**

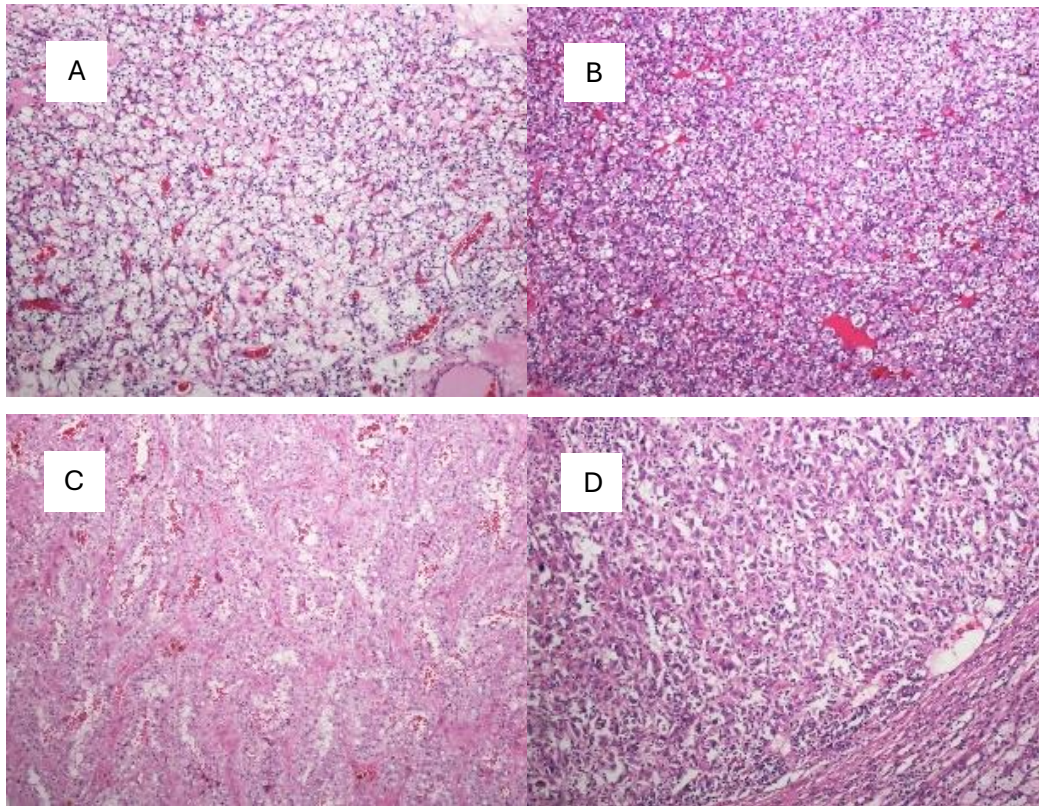
Dijagnostička obrada bolesnika s rakom bubrega započinje anamnezom i kliničkim pregledom, određivanjem laboratorijskih pretraga: kompletna krvna slika uz biokemijske pretrage krvi (kalcij, AST, ALT, bilirubin, laktat dehidrogenaza, serumski kreatinin, ureja, alkalna fosfataza), analizu urina, kompjutoriziranu tomografiju trbuha i zdjelice s primjenom kontrasta, magnetnu rezonanciju trbuha (kod sumnje na infiltraciju donje šuplje vene), RDG srca i pluća / kompjutoriziranu tomografiju prsišta, biopsiju promjena sumnjivih na malignu alteraciju primarne ili sekundarne prirode ili citološku punkciju (za potvrdu dijagnoze), citologiju urina i ureteroskopiju (pri sumnji na urotelni tumor) (23,24). Sukladno kliničkim indikacijama (postojanju simptoma koštanih presadnica, povišene vrijednosti alkalne fosfataze, neurološkim simptomima), savjetuje se učiniti i scintigrafiju skeleta, CT ili MRI mozga (ili drugu radiomorfološku obradu pri sumnji na postojanje presadnica u mozgu) (25). CT trbuha smatra se zlatnim standardom u dijagnostici raka bubrega, određivanju stadija bolesti, procjene odgovora na liječenje i dijagnoze povrata bolesti (26). Najnovije smjernice za dijagnozu raka bubrega ne podržavaju uporabu pozitronske emisijske tomografije (PET) u dijagnozi raka bubrega (27,28). Ipak, važno je spomenuti kako neovaskulatura raka bubrega pokazuje izražaj prostata-specifičnog membranskog antigena (PSMA) u čak 82% svijetlostaničnog raka bubrega, 71% kromofobnih karcinoma bubrega i 14% papilarnih karcinoma raka bubrega, stoga noviji radovi ukazuju na mogućnost primjene PSMA-temeljenog PET-a u dijagnostici raka bubrega (29).

Kod bolesnika mlađih od 46 godina, s obostranim ili multifokalnim tumorima bubrega, bolesnika s jednim bliskim srodnikom koji ima dokazanu genetsku sklonost raku bubrega ili kod bolesnika s multifokalnim papilarnim tumorima, nedostatkom fumarat hidraze, BHD sindromom, angiomiolipomima bubrega ili rakom bubrega s deficitom sukcinat dehidrogenaze genetsko testiranje za procjenu rizika raka bubrega je indicirano (30,31)

### **1.2.3. Patohistološka obilježja i genetska osnova raka bubrega**

Veliku većinu, čak 90% svih karcinoma bubrega čine svijetlostanični, papilarni i kromofobni rak bubrega, među kojima je svijetlostanični najučestaliji i najagresivniji (32). Ova podjela ima veliki prognostički i prediktivni značaj. Svijetlostanični rak bubrega potječe od stanica proksimalnih tubula i ima najveću sklonost hematogenoj diseminaciji u pluća, jetru, i kosti (33). Gensku podlogu ovog tipa tumora obilježavaju inaktivirajuće somatske mutacije ili delecije von Hippel-Lindau (VHL) tumor-supresorskog gena smještenog na p-kraku kromosoma 3) koje se javljaju kod 45% svih slučajeva svijetlostaničnog raka bubrega (34). Osobe koje su naslijedile zametne mutacije VHL gena (VHL bolest) i gena za tuberoznu sklerozu, koji su odgovorni su za 5% svih svijetlostaničnih karcinoma bubrega nose veći rizik razvoja raka bubrega u ranijoj dobi ili obostranog raka bubrega (35). Otprilike svaki deseti rak bubrega je papilarnog podtipa, a, točna prognoza je varijabilna, iako bolja od prognoze svijetlostaničnog raka bubrega. Papilarni rak bubrega i arhitekturom i genetskom osnovom slični adenomukore bubrega, iako je prosječno većeg promjera (36). Kromofobni rak bubrega javlja se u 5% slučajeva i ima najbolju prognozu, obzirom da se metastaze javljaju u samo 7% slučajeva (37). Velikim dijelom, i histološki i genetski slični onkocitomu - oba entiteta su dobro ograničena, u podlozi je delecija kromosoma Y i 1, nastaju iz stanica sabirnih kanalića ili interkaliranih stanica i vezani su uz Birt-Hogg-Dube sindrom (38). Kromofobni rak bubrega razlikuje se od onkocitoma po odsutnosti centralnog ožiljka i specifičnog perinuklearnog haloa (39). Medularni rak bubrega je rijedak oblik raka bubrega koji se tipično pojavljuje kod bolesnika s anemijom srpastih stanica ili beta-talasemijom (40,41).

Histološki, rak bubrega se stupnjevao prema klasifikaciji koju je 1982.g. opisala Fuhrman sa suradnicima (42). Stupnjevanje koje je donedavno bilo univerzalno prihvaćeno, procjenjivalo je gradus tumora na osnovu veličine i oblika jezgre te izraženosti nukleola, prikazano je na slici 1 (37).



**Slika 1: Histološki gradusi raka bubrega** - A -gradus 1: Korištenjem 10× objektivu, jezgre tumorskih stanica su male (< 10 μm), hiperkromatične i okrugle (nalikuju zrelim limfocitima), bez vidljivih jezgrica i malo detalja u kromatinu, B-Korištenjem 10× objektivu, jezgre tumorskih stanica su malo veće (15 μm) s fino granuliranim razvijenim kromatinom, ali malim, neupadljivim jezgricama. Jezgrice su često prisutne, a mnoge se pojavljuju kao mali kromocentri na 10x objektivu. C - 10× objektivu, jezgre tumorskih stanica su veće (veličine 20 μm) i mogu biti ovalnog oblika, s grubo granuliranim kromatinom. Jezgrice se lako nedvosmisleno prepoznaju. D – jezgre su pleomorfne, razvijenog ili hiperkromatskog kromatina, s jednom ili više jezgrica

Izvor: (<https://emedicine.medscape.com/article/1612022-overview#a2>)

Međunarodno udruženje uroloških patologa (engl. International Society of Urological Pathology, ISUP) 2012.godine predložilo je novi, validizirani način određivanja histološkog gradusa, primjenjivo na svjetlostanične i papilarne karcinome bubrega koje je potom usvojila i Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization, WHO). Stupnjevanje se temelji na procjeni jezgrice tumorskih stanica na slijedeći način:

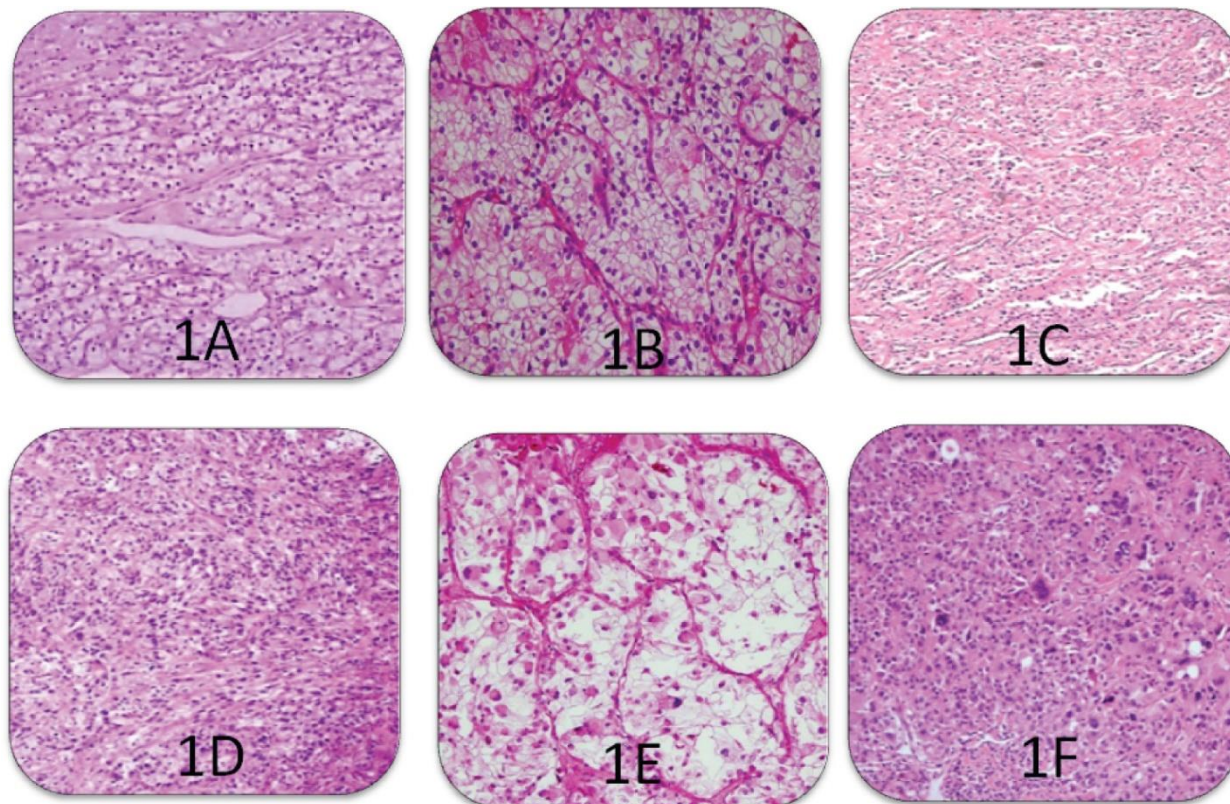
Gradus 1: Neuočljive jezgrice pri povećanju od ×400 i bazofilne

Gradus 2: jasno vidljive jezgrice pri povećanju ×400 i eozinofilne



Gradus 3: jasno vidljivi nukleoli pri povećanju  $\times 100$

Gradus 4: Ekstreman pleomorfizam uz prisutnost rabdoidnih i/ili sarkomatoidnih komponenti (43,44)



**Slika 2: ISUP stupnjevanje raka bubrega** (A) WHO/ISUP ,gradus 1 (H&E, x200), (B) WHO/ISUP gradus 2 (H&E, x200) (C) WHO/ISUP gradus 3 (H&E, x100) (D) WHO/ISUP gradus 4, sarkomatoidna diferencijacija (E) WHO/ISUP gradus 4, rabdoidna diferencijacija (H&E, 200); (F) WHO/ISUP gradus 4, tumorske divovske stanice (H&E, 200)  
Izvor: (Seker NS, Bozkurt O, Aslan G, Devecioglu EG, Tuna EB (2020) A New Grading for Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Combined WHO/ISUP Grading System. Int J Pediatr Res 6:116. doi.org/10.23937/24695807/1510116)

Svjetska zdravstvena organizacija nedavno je objavila Peto izdanje Klasifikacije mokraćnih i tumora muškog spolnog sustava. Glavna osobina ove klasifikacije je naglasak na molekularnoj karakterizaciji bubrežnih tumora koja je omogućila razlikovanje tumora slične histologije, ali različitih genetskih profila. Napretci u novim dijagnostičkim metodama pogotovo sekvencioniranju iduće generacije (engl. next generation sequencing, NGS) i ciljanom sekvencioniranju omogućile su identifikaciju genetskih alteracija u tumorima bubrega (45). Ipak,



i uz takav napredak, temelj patohistološke dijagnoze i dalje je klasično bojenje hematoksilinom i eozinom. Ta, bazična, metoda koja se, zbog svoje jednostavnosti, primjenjuje preko 40 godina i temelji se isključivo na izgledu tumorskih stanica i dalje je prvi korak u patohistološkoj dijagnostici raka bubrega (46). Ograničenja metode su manjak specifičnosti u razlikovanju određenih podtipova raka bubrega (47). Ranija izdanja Klasifikacije, iz 2004. i 2016. godine, razlikovala su histološke podtipove temeljem histološke slike i imunohistokemijskog bojanja. Potonja klasifikacija naglasila je potrebu za uvođenjem molekularnih metoda za opisivanje tumora bubrega (48). Nova klasifikacija ujedinjuje originalnu nomenklaturu koja se temelji na bojenju hematoksilinom i eozinom, imunohistokemijskim bojanjima, s novim histološkim entitetima koji su nedavno opisani. Ipak, obzirom na šestogodišnji period između dvije zadnje klasifikacije, klinički značaj nove klasifikacije nije moguće procijeniti. Nova klasifikacija donijela je neke nove, zbunjujuće kategorije, poput kategorije onkocitnih tumora koji su ranije bili podijeljeni na onkocitome, hibridne onkocitne tumore i kromofobne karcinome, a sad uključuje i tri nova entiteta: LOT, EVT i ESC. Zahvaljujući NGS-u, danas znamo da ovi „novi“ entiteti imaju mutaciju TSC1/2 i mTOR signalnog puta, ali i dalje ne možemo povezati histološke osobine s kliničkim ponašanjem i ishodom (49). Kako bi nova klasifikacija bila primjenjiva i značajna u kliničkoj praksi, sekvencioniranje bi se trebalo provoditi na svim uzorcima, čime bi se troškovi dijagnostike znatno povisili, a bez odgovarajućeg kliničkog benefita. Uz to, entiteti u kojima bi nova dijagnostika bila značajna predstavljaju svega 1-5% karcinoma bubrega. Smatra se da će veći klinički doprinos imati bolje metode imunohistokemijskih bojenja uz korelaciju s kliničko-radiološkim osobinama. Zadnjih godina, novi obećavajući pristup predstavlja radiomika – metoda koja koristi kvantitativne podatke iz radioloških serija u razlikovanju ne samo benignih od malignih karcinoma bubrega, nego i razlikovanje histoloških podtipova (50,51). Također, objavljen je i značajan broj studija „radiomike“ u kojima se korelira radiološke fenotipove i njima podležeće molekularne promjene - genetske mutacije, izražaj gena i epigenetske promjene (52). Usprkos obećavajućim rezultatima, klinička primjenjivost ovih modela ostaje limitirana mahom radi loše kvalitete studija (male kohorte, metodološka heterogenost, slaba reproducibilnost i manjak vanjske validacije) (49).

#### **1.2.4. Određivanje stadija raka bubrega**

Nakon postavljanja dijagnoze, potrebno je odrediti stadij raka bubrega kako bi se definirala strategija liječenja. Stadij raka bubrega definira se prema klasifikaciji American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM sistemu, koji uzima u obzir tri glavne osobine:

T – veličinu i lokalno širenje raka bubrega

N – zahvaćenost bliskih limfnih čvorova

M – Ne/postojanje udaljenih presadnica (53).

Zadnja verzija TNM klasifikacije za određivanje raka bubrega prikazana je u Tablici 1.

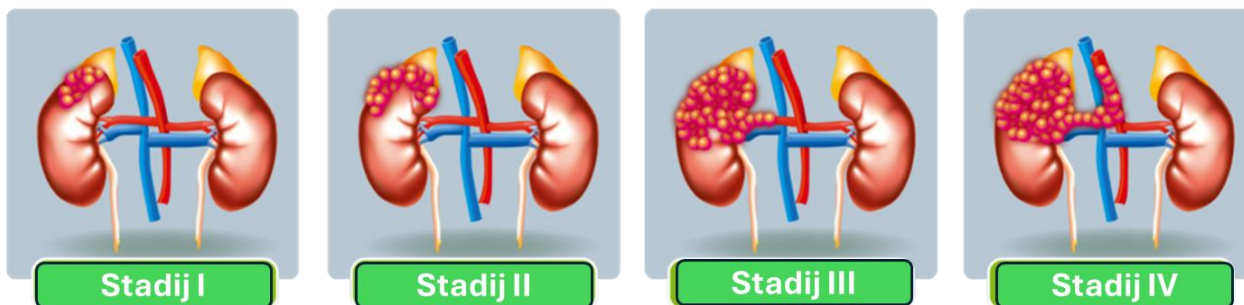
**Tablica 1: „Tumor-node-metastasis“ sustav za definiranje stadija raka bubrega**

<b>T</b>	<b>Primarni tumor</b>
Tx	Primarni tumor se ne može procijeniti
T0	Ne postoji primarni tumor
T1	Tumor $\leq 7$ cm, ograničen na bubreg
T1a	Tumor $\leq 4$ cm, ograničen na bubreg
T1b	Tumor $> 4$ cm i $\leq 7$ cm, ograničen na bubreg
T2	Tumor $> 7$ cm, ograničen na bubreg
T2a	Tumor $> 7$ cm i $\leq 10$ cm, ograničen na bubreg
T2b	Tumor $> 10$ cm, ograničen na bubreg
T3	Tumor zahvaća velike vene ili perirenalno tkivo, ali ne i nadbubrežnu žlijezdu i ne širi se izvan Gerotine fascije
T3a	Tumor se širi u renalnu venu ili njene pritoke, ili invadira bubrežnu zdjelicu ili invadira perirenalnu i/ili mast renalnog sinusa, ali ne izvan Gerotine fascije
T3b	Tumor zahvaća v. cavu, ispod dijafragme
T3c	Tumor zahvaća v. cavu iznad dijafragme ili invadira stijenku v.cave
T4	Tumor se širi izvan Gerotine fascije (uključuje širenje i u nadbubrežnu žlijezdu)
<b>N</b>	<b>Regionalni limfni čvorovi</b>
Nx	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0	Nema zahvaćenosti limfnih čvorova
N1	Metastaze u regionalni limfni čvor/regionalne limfne čvorove
<b>M</b>	<b>Udaljene presadnice</b>
M0	Nema udaljenih presadnica
M1	Udaljene presadnice

U Tablici 2 prikazani su stadiji raka bubrega prema TNM klasifikaciji.

**Tablica 2: Stadiji raka bubrega prema TNM klasifikaciji**

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



**Slika 3: Shematski prikaz stadija raka bubrega;** Stadij I: rak ograničen na bubreg i manji od 7 centimetara. Ukoliko je operabilan, 90% bolesnika će biti bez znakova povrata bolesti 5 godina nakon operacije; Stadij II: rak veći od 7 cm, ali i dalje ograničen na bubreg, 5-godišnje preživljenje nakon operacije je visoko; Stadij III: rak nije ograničen na bubreg, širi se na okolne organe, ali bez udaljenih presadnica - može zahvaćati masno tkivo bubrega, bubrežne krvne žile, okolne limfne čvorove; osim kirurškog, savjetuje se i adjuvantno onkološko liječenje; Stadij IV: rak proširen izvan bubrega, u trbušnu šupljinu, nadbubrežnu žlijezdu, udaljene limfne čvorove ili organe poput pluća, jetre, mozga ili kostiju.

Izvor i prilagođeno: (<https://ikcc.org/infohubpost/what-are-the-different-kidney-cancer-stages/>)

### 1.2.5. Uloga multidisciplinarnog tima u liječenju raka bubrega

Izbor terapijskog modaliteta ključan je korak u liječenju svakog bolesnika s rakom bubrega. Nakon završetka dijagnostičke obrade, i definiranja stadija bolesti, prikaz slučaja na multidisciplinarnom timu je uvjet kojeg treba poštovati prije početka liječenja. Kako bi se razvio prikladniji plan terapije za pacijenta, potrebno je procijeniti stanje bolesnika od strane stručnjaka iz više disciplina. Karcinom bubrežnih stanica je heterogena bolest s različitim podtipovima i molekulama

fenotipovima, uključujući svjetlostanični, papilarni, kromofobni i druge rijetke podtipove karcinoma bubrežnih stanica (54). U prethodna dva desetljeća, inhibitori mete rapamicina (mTOR), inhibitora tirozin kinaze (TKI) i inhibitora receptora vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF-R) kod sisavaca ponudile su nove, kvalitetne opcije liječenja mRCC i produljile preživljenje pacijenata s mRCC-om, s nekadašnjih godinu na više od četiri godine (55–57). Nekoliko velikih kliničkih ispitivanja pokazalo je da su inhibitori imunoloških kontrolnih točaka (ICI) dodatno revolucionirali terapiju mRCC. ICI uz TKI, pa i kombinacija nivolumab - ipilimumab preporučeni su kao prva linija liječenja karcinoma bubrežnih stanica sa svijetlim stanicama (ccRCC) (58–60). Iako trenutne smjernice preporučuju lijekove prve linije, još uvijek postoje kontroverze oko izbora naknadnog liječenja bolesnika kada bolest napreduje. Štoviše, trenutno ne postoji standardni tretman za metastatski ne-ccRCC. Zbog raznolikosti liječenja RCC-a za različite podtipove, potrebni su multidisciplinarni pristupi za razvoj odgovarajućih kliničkih protokola koji pacijentima pružaju individualizirano i precizno liječenje. Multidisciplinarni tim (MDT) okuplja stručnjake iz različitih struka koji se redovito sastaju i pregledavaju relevantne informacije o slučajevima raka kako bi se zajamčio individualizirani i precizan plan liječenja za svakog pacijenta (61,62). Ovaj model upravljanja bolešću implementiran je u mnogim medicinskim centrima diljem svijeta i koristi se u različitim vrstama raka (63). U nekim studijama istraživači su izvijestili da bi MDT mogao pružiti preciznije liječenje i bolju suradnju s pacijentima (64,65). Međutim, donedavno nije bilo izravnih dokaza koji bi poduprli učinak MDT-a na kliničke ishode bolesnika s mRCC-om, a Zeng i suradnici lani su objavili rad u kojem su zaključili kako prikaz bolesnika na MDT-u produljuje ukupno preživljenje bolesnika s mRCC neovisno o histologiji, osiguravajući pacijentima bolje upravljanje i preciznije liječenje (66,67).

#### **1.2.6. Liječenje lokaliziranog raka bubrega**

Lokalizirani rak bubrega skupni je naziv za rak bubrega koji je ograničen na bubregu, i prema TNM klasifikaciji odgovara T1 ili T2, N0 tumorima. Zahvaljujući češćoj upotrebi i dostupnosti kompjutorizirane tomografije (CT) i magnetske rezonancije (MRI), ranijoj dijagnozi bubrežnih masa i popratne migracije stadija, danas se promjene u bubrezima identificiraju u mnogo ranijim, asimptomatskim stadijima (68,69). Slučajno otkrivene bubrežne mase trenutno čine 48 do 66% tumora, u usporedbi sa samo 3 do 13% u 1970-ima (70). Ipak, približno 20 do 30% pacijenata ima metastaze pri dijagnozi. Čak i nakon kirurške resekcije za klinički lokaliziranu bolest, 20 do 40% pacijenata će recidivirati i imati lošu prognozu u pogledu dugotrajnog preživljavanja (71,72).

Mogućnost dugoročnog izlječenja i preživljavanja RCC-a uključuje kirurške intervencije: radikalnu nefrektomiju (RN), parcijalnu nefrektomiju (PN), ablativne tehnike i, u odabranim slučajevima, metastazektomiju u kombinaciji s multimodalnim pristupima liječenju (73). Radikalna nefrektomija uključuje „en bloc“ resekciju cijelog bubrega, kao i okolnog perinefričnog masnog tkiva, ipsilateralne nadbubrežne žlijezde i regionalnih limfnih čvorova (74). Ovim zahvatom značajno se poboljšalo sveukupno preživljenje (OS), na oko 65% za lokalizirani RCC.

Radikalna nefrektomija je tretman izbora kod tumora proširenih u donju šuplju venu. Otvorene, laparoskopske ili robotske kirurške tehnike mogu se koristiti za izvođenje radikalne nefrektomije. Podaci o dugoročnim ishodima ukazuju da laparoskopske i otvorene radikalne nefrektomije imaju ekvivalentne stope preživljenja bez povrata raka (75).

Djelomična nefrektomija prema onkološkim ishodima usporediva je s radikalnom nefrektomijom (76). Radikalna nefrektomija može dovesti do povećanog rizika od kronične bubrežne bolesti i povezana je s višim rizicima kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (77,78).

U usporedbi s radikalnom nefrektomijom, djelomičnom nefrektomijom može se postići očuvanje bubrežne funkcije, smanjene ukupnog mortaliteta, te smanjena učestalost kardiovaskularnih događaja (79,80).

Bolesnici s nasljednim oblikom RCC-a, kao što je VHL bolest, također bi trebali biti kandidati za pošteno kirurško liječenje. Poštedne operacije se koriste kod bolesnika s tumorima bubrega stadija T1a i T1b (tj.  $\leq 7$  cm u najvećoj dimenziji) i uz zdravi normalni kontralateralni bubreg, bez kompromitiranja ishoda u odnosu na radikalnu nefrektomiju (81). Stoga, radikalnu nefrektomiju ne treba koristiti kada se može postići očuvanje nefrona (82).

Nekoliko je studija pokazalo nisku učestalost nadbubrežnih metastaza u konačnim patološkim uzorcima otvorenih radikalnih nefrektomija, sa stopama otkrivanja oko 4 do 6% prvenstveno u tumoru gornjeg pola ili s uznapredovalim T stadijima (40, 7,8 i 0,6% vjerojatnosti širenja u nadbubrežne žlijezde u T4, T3 i T1-2 tumorima, respektivno) (83–85). Zbog toga se rutinsko uklanjanje nadbubrežne žlijezde više ne preporučuje za tumore niskog stadija bez ikakvih radioloških ili kliničkih znakova zahvaćenosti nadbubrežne žlijezde (84). Uloga i opseg regionalne limfadenektomije tek trebaju biti razjašnjeni, iako limfadenektomija pruža najtočniju metodu određivanja stadija i otkrivanja metastaza u limfnim čvorovima. Ako ne postoji klinička i

radiografska sumnja, incidencija zahvaćenosti limfnih čvorova je samo 4 do 14%. Nadalje, limfadenektomija ne poboljšava dosljedno sveukupno preživljenje specifično za rak u lokaliziranom RCC (T1-2) (86,87). Budući da rizik od zahvaćenosti limfnih čvorova raste s povećanjem T stadija (1,1, 4,5 i 12,3% za T1, T2 i T3, respektivno), uglavnom pacijenti s lokalno uznapredovalim stadijem (T3-T4) imaju koristi od proširene limfadenektomije (što rezultira duljim preživljavanjem specifičnim za bolest) (88). Anatomija bubrežne limfne drenaže prilično je varijabilna. Kod samo 7% pacijenata drenira se primarno u ipsilateralnom hilarnom području, dok se češće drenira u paraaortalne čvorove (približno 27%), što definiciju limfadenektomije čini teškom za standardizaciju (89).

Jedna od specifičnosti raka bubrega, i u lokalnom, i lokoregionalnom stadiju bolesti je često intraluminalno širenje u vene, najčešće bubrežnu venu ili, do 10% svih karcinoma bubrega, u donju šuplju venu koje može sezati sve do desnog atrija (90). Venski trombi najčešće ipak nisu pričvršćeni za stijenku vena i daju se lako mobilizirati (91,92). Radikalna nefrektomija s tumorskim trombima povezana je s visokom stopom morbiditeta i mortaliteta, a perioperativnim mortalitetom od 2 -4%, stopom ranih komplikacija od 15% i 25% kasnih komplikacija. Radi ovakvog operativnog rizika selekcija bolesnika je nužna (92,93). Ipak, kirurško liječenje raka bubrega s tumorskim trombima predstavlja jedino dugoročno liječenje ovakvih bolesnika uz 5-godišnje ukupno preživljenje od 40 do 65% kod lokalizirane ili lokoregionalne bolesti i loše preživljenje od svega 5 do 25% kod bolesnika s metastatskom bolesti (94).

Stadij IB (veličina tumora od 4-7cm, ograničen na bubreg) zahtijeva liječenje parcijalnom nefrektomijom ili radikalnom nefrektomijom, dok su ablativne metode ili aktivno praćenje iznimna mogućnost u limitiranoj populaciji. Ablativne metode uključuju radiofrekventnu ablaciju, krioablaciju, mikrovalnu ablaciju, primjenjuju se u odabranoj populaciji bolesnika s tumorima T1a (onih s izraženim pratećim bolestima, solitarnim bubregom, s narušenom funkcijom bubrega/smanjenom bubrežnom filtracijom, multiplim malim tumorima bubrega). Kirurški pristup može biti radikalna nefrektomija ili pošteđni kirurški zahvat – parcijalna nefrektomija (engl. Nephron-sparing surgery – NSS). Pri izboru pristupa treba uzeti u obzir prednosti i rizike te omočiti dugotrajnu bubrežnu funkciju ostatnog bubrega i bez kompromitirana očekivango preživljenja bolesnika. Za sve bolesnike stadija I nakon završetka kirurškog liječenja daljnje onkološko liječenje nije potrebno, stoga se savjetuje pažljivo kliničko praćenje.

### 1.2.7. Liječenje lokoregionalnog raka bubrega

Prema definiciji AJCC-a, lokoregionalni rak bubrega podrazumijeva tumore veličine T1-T4, uz zahvaćanje regionalnih limfnih čvorova, a bez postojanja udaljenih metastaza. Uz prethodno opisane kirurške metode, u liječenju lokoregionalnog raka bubrega se primjenjuje i adjuvantna, odnosno zaštitna sistemna terapija u obliku ciljane terapije inhibitorima tirozin-kinaza ili PD-L1 inhibitorima (95,96). Tijekom godina, inhibitori čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGF) i inhibitori receptorskih tirozin-kinaza (TKI) ispitivani su u adjuvantnom liječenju i polučili su kontrastne rezultate.

Stratifikacijski alat za procjenu rizika povrata bolesti definirao je rizične čimbenike: veličina tumora ( $\geq 10$ cm); visoki patološki stadij tumora (vs. tumorski stadij pT1a), nuklearni gradus 3 ili 4 (vs. 1 ili 2), histološka prisutna tumorska nekroza, visoki vs niski. UCLA Integrated Staging System predstavlja algoritam ishoda koji stratificira bolesnike s radikalno operiranim rakom bubrega prema TNM stadiju, ECOG PS i gradusu tumora u tri rizične skupine za povrat bolesti: niski, srednji i visoki – tzv. “Leibovichev sustav za procjenu rizika“ (97,98).

U Tablici 3 prikazan je Leibovichev zbirni sustav za procjenu rizika povrata raka bubrega.

**Tablica 3: Leibovichev zbirni sustav za procjenu rizika povrata raka bubrega**

<b>Primarni tumor</b>	<b>Rezultat</b>
pT1a	0
pT1b	2
pT2	3
pT3a	4
pT3b	4
pT3c	4
pT4	4
<b>Regionalni limfni čvorovi</b>	<b>Rezultat</b>
pNx	0
pN0	0
pN1	2
pN2	2
<b>Veličina tumora</b>	<b>Rezultat</b>
<10cm	0
>10cm	1
<b>Nuklearni gradus</b>	<b>Rezultat</b>
1	0
2	0
3	1
4	3
<b>Prisutna tumorska nekroza</b>	<b>Rezultat</b>

Da	0		
Ne	1		
Skupine rizika			
<b>Skupina</b>	<b>Zbroj</b>		
Niski rizik	0-2		
Srednji rizik	3-5		
Visoki rizik	> 6		
<b>Procijenjeno preživljenje bez pojave presadnica (%)</b>			
<b>Skupina rizika</b>	<b>1 godina</b>	<b>5 godina</b>	<b>10 godina</b>
Niski rizik	99.5	97.1	92.5
Srednji rizik	90.4	73.8	64.3
Visoki rizik	57.7	31.2	23.6

Algoritam dijeli pacijente u tri rizične skupine, a to su; nizak rizik (rezultat 0 – 2); srednji rizik (ocjena 3 – 5); visok rizik (rezultat iznad 6). Procijenjena stopa 5-godišnjeg preživljenja prema ovim skupinama iznosi: 92%, 67% i 44%, respektivno(98)

Ispitivanje faza III ASSURE usporedilo je primjenu adjuvantnih TKI (sorafenib ili sunitinib) tijekom jedne godine s placebom u lokalno uznapredovalih nemetastatskih RCC bolesnika sa svijetlostaničnom ili ne-svijetlostaničnom histologijom, nakon provedene nefrektomije. Ispitivanje je pokazalo poboljšanje preživljenja bez povrata bolesti (DFS) i OS u bolesnika liječenih TKI naspram placeba, s visokim stopama prijavljenih nuspojava (AE) (99). Ispitivanje PROTECT proučavalo je primjenu pazopaniba u odnosu na placebo kao adjuvantnog liječenja visokorizičnih bolesnika s ccRCC i nije uspjelo pokazati dobiti u DFS-a ili OS-a, uz prijavljenu visoku toksičnost (100). Aksitinib u adjuvantnom okruženju ispitan je u istraživanju ATLAS i niti u njemu nije dokazana DFS dobit (101). Prvo ispitivanje faze III koje je pokazalo dobit u DFS-u kod bolesnika sa svijetlostaničnim RCC liječenih adjuvantnim sunitinibom nakon nefrektomije bilo je S-TRAC, koje je provedeno na 615 bolesnika s lokoregionalnim, visokorizičnim ccRCC. Bolesnici liječeni sunitinibom imali su produljenje DFS-a u usporedbi s onima liječenim placebom (6,8 godina naspram 5,6 godina; P = 0,03). Nuspojave stupnja 3 ili više pojavile su se u 63,4% slučajeva pacijenata liječenih sunitinibom u usporedbi s 21,7% onih na placebo (95,102) Medijan OS-a nije postignut ni u skupini liječenoj sunitinibom, niti kontrolnoj skupini (95) Dvije meta-analize pet RCT-ova ocjenjujući adjuvantne TKI monoterapije zaključile su da adjuvantna primjena TKI ne donosi koristi u OS-u niti DFS-u, ali ima značajno veće rizike AE (103,104).



Nedostatak dobiti OS-a, rizik toksičnosti i neusporedivi rezultati ispitivanja S-TRAC i ASSURE/ATLAS/PROTECT dovela do preporuke kategorije 3 u smjernicama za liječenje raka bubrega, za korištenje adjuvantnog sunitiniba u pacijenata sa stadijem III bolesti, svijetlostaničnim rakom bubrega visokog rizika (82).

Inhibitori kontrolnih točaka (engl. immune checkpoint inhibitors, ICI) koji ciljaju na receptor za programiranu smrt -1 (PD-1) na T stanicama također su ispitani u adjuvantnom liječenju raka bubrega visokog rizika. Ispitivanje KEYNOTE-564 istraživalo je upotrebu pembrolizumaba naspram placeba u 994 bolesnika s lokoregionalnim RCC-om svijetlostaničnog podtipa s srednjim do visokim ili visokim rizikom od recidiva (tj. tumora stadija 2, nuklearnog gradusa 4 ili sarkomatoidnom diferencijacijom, stadija 3 ili više, s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima) nakon nefrektomije ili stadija M1 bez dokaza bolesti (eng. NED – no evidence of disease) nakon nefrektomije i resekcije metastatskih lezija (96). Preživljenje bez povrata bolesti nakon 24 mjeseca zabilježeno je u 77,3% bolesnika liječenih pembrolizumabom u usporedbi sa 68,1% pacijenata koji su primali placebo (HR za recidiv ili smrt, 0,68; 95% CI, 0,53–0,87; P = 0,002). Ukupno preživljenje nakon 24 mjeseca procijenjen je na 96,6% u bolesnika liječenih pembrolizumabom naspram 93,5% u placebo skupini. Nuspojave stupnja 3 ili višeg pojavile su se u 32,4% bolesnika liječenih pembrolizumabom naspram 17,7% onih koji su primali placebo (96).

Na temelju rezultata ispitivanja KEYNOTE-564, smjernice preporučuju primjenu pembrolizumaba kao adjuvantnog liječenja bolesnika s karcinomom bubrega stadija 2, gradusa 4 ili sarkomatoidnim značajkama, svijetlostanične histologije, kao i za bolesnike sa stadijem 3 ccRCC. Pembrolizumab se preporučuje za liječenje stadija 4 ccRCC nakon metastazektomije provedene unutar godinu dana nakon nefrektomije, za bolesnike bez znakova ostatne ili metastatske bolesti. Adjuvantno liječenje raka bubrega pembrolizumabom zbog nedostatka dokaza se ne preporuča kod bolesnika s ne-svijetlostaničnim tumorima.

### **1.2.8. Liječenje metastatskog raka bubrega**

Znatnu ulogu u definiranju rizika bolesti i izbora liječenja bolesnika s metastatskim rakom bubrega imaju i prognostički alati. Prvi model, MSKCC model, definirao je Motzer sa suradnicima 2004.g. a drugi Heng sa suradnicima (105,106). Prema tim, MSKCC i IMDC, kriterijima bolesnici se svrstavaju u prognostičke skupine prema kojima se definira daljnje liječenje, prognoza i očekivano preživljenje bolesnika s metastatskim rakom bubrega. Ovi prognostički alati razvrstavaju

bolesnike prema broju zastupljenih čimbenika rizika u 3 skupine: povoljnu skupinu (bez čimbenika rizika), srednju (intermedijarnu) skupina (1 – 2 čimbenika rizika), nepovoljnu (lošu) skupina (3 ili više čimbenika rizika). Usporedba kriterija te očekivano preživljenje prema rizičnim skupinama prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4: Prognostički kriteriji za metastatski rak bubrega prema Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC, tzv „Motzerovi kriteriji“) i International Metastatic RCC Database Consortium (IMDC, tzv „Hengovi kriteriji“)**

Prognostički sustav	Čimbenik rizika						
	Karnofsky PS <80%	Hgb <donje granice	LDH >1.5 gornje granice	Kalcij >10 mg/dL	Vrijeme od dijagnoze <1 godine	Neutrofili >gornje granice	Tr >gornje granice
<b>MSKCC</b>							
<b>IMDC</b>							
PS= performance status, Hgb= hemoglobin, LDH= laktat dehidrogenaza, Tr=trombociti, MSKCC= „Motzerovi kriteriji“, IMDC = „Hengovi kriteriji“							
	Motzerov zbroj				Hengov zbroj		
Rizična skupina	Povoljna (0)	Srednja (1-2)	Nepovoljna (3-5)		Povoljna (0)	Srednja (1-2)	Nepovoljna (3-6)
Medijan preživljenja	30 mj	14 mj	5 mj		43 mj	23 mj	8 mj
2-god. preživljenje					75%	53%	7%
3-god. preživljenje	45%	17%	2%				

Pacijenti sa stadijem IV bolesti također mogu imati koristi od operacije. Primjerice, limfni čvorovi sumnjivi na metastatsku bolest na CT-u mogu biti hiperplastični bez postojanja tumorskih stanica, stoga, prisutnost minimalne regionalne limfadenopatije ne isključuje operaciju. Preporuča se citoreduktivna nefrektomija prije sistemske terapije kod odabranih bolesnika s kirurški resektabilnom primarnom tumorskom masom. Retrospektivna analiza koja potječe još iz ere citokina pokazala je da će najveću korist od citoreduktivne nefrektomije prije početka sistemske terapije imati bolesnici s metastazama ograničenima na plućima, povoljne prognostičke skupine i

dobrog općeg stanja(107). Retrospektivni podaci ukazuju kako citoreduktivna nefrektomija i dalje igra ulogu u bolesnika liječenih lijekovima usmjerenim na VEGF (108). Učinkovitost novije sustavne terapije dovodi u pitanje standard kirurškog liječenja kod nekih bolesnika s metastatskom bolesti. Rezultati ispitivanja CARMENA faze III na pacijentima s metastatskim RCC-om koji su bili podobni za citoreduktivnu nefrektomiju otkrili da sam sunitinib nije bio inferioran sunitinibu nakon nefrektomije (109) Medijan OS bio je 18,4 mjeseca u skupini liječenoj sunitinibom i 13,9 mjeseci kod bolesnika koji su nakon nefrektomije primali sunitinib (HR, 0,89; 95% CI, 0,71–1,10), koji nije premašio fiksnu granicu neinferiornosti (1.20). Međutim, mnogi pacijenti u ovom ispitivanju imali su nizak rizik, što samo naglašava važnost odabira pacijenata koji će imati najviše koristi od nefrektomije ili ciljane terapije (110). Post-hoc analiza ispitivanja CARMENA pokazala je da za pacijente sa samo jednim rizikom čimbenikom rizika prema IMDC kriterijima, OS duži nakon nefrektomije (31,4 mjeseca naspram 25,2 mjeseci) (111)

Za bolesnike kod kojih kirurško liječenje nije opcija, sada postoje brojne mogućnosti sistemnog onkološkog liječenja, kod kojih je dokazana dobit na ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti. Uvođenje inhibitora receptorskih tirozin-kinaza 2006.g. i imunoterapije 2018.g promijenilo je paradigmu liječenja mRCC-a. Trenutne smjernice savjetuju liječenje IO-IO kombinacijom, IO-TKI kombinacijom ili monoterapijom TKI (60,112–117).

Kombinacije IO-TKI: aksitinib-pembrolizumab, kabozantinib-nivolumab, lenvatinib-pembrolizumab s najvišom razinom preporuka su u smjernicama za liječenje svih skupina bolesnika s mRCC. Aksitinib je selektivni TKI VEGFR, druge generacije TKI vaskulamog endotela, a pembrolizumab monoklonsko protutijelo koje se selektivno veže na PD-1 (izražen na aktiviranim T stanicama) i blokira interakciju između PD-1 receptora i liganda (PD-L1 i PD-L2) izraženih na antigen-prezentirajućim stanicama. Podaci iz randomizirane studije faze III KEYNOTE-426, koja je uključivalo bolesnike s povoljne, srednje ili loše prognoze, podržaju primjenu kombinirane terapije u ovoj indikaciji. Kombinacija aksitinib/pembrolizumab pruža značajno veću stopu ukupnog odgovora (ORR) i dulji PFS od monoterapije sunitinibom. Iako ukupno preživljenje nije postignuto, HR daje prednost kombinaciji aksitiniba/pembrolizumaba (118).

Kabozantinib je VEGFR, MET i AXL TKI, a nivolumab je anti-PD-1 antitijelo. U siječnju 2021. FDA je odobrila kabozantinib u kombinaciji s inhibitorom PD-1 receptora nivolumabom u prvoj

liniji liječenja bolesnika s uznapredovalim i/ili metastatskim RCC (119). Podaci iz randomizirane studije faze III CheckMate 9ER, koje je uključivalo pacijente iz sve tri rizične skupine karcinoma bubrega, podržavaju kombiniranu terapiju- pacijenti koji su primali kabozantinib/nivolumab imali su znatno duži ORR i PFS od pacijenata koji su primali sunitinib. Medijan OS opet nije postignut ni za jednu grupu, ali HR je favorizirao kabozantinib/nivolumab (119). U naknadnoj analizi, kombinacija je pokazala poboljšani PFS, OS i ORR u bolesnika sa sarkomatoidnim obilježjima u usporedbi sa sunitinibom (58). Pacijenti liječeni kombinacijom imali su i duže vrijeme do pogoršanje općeg stanja.

Lenvatinib je tirozin kinazni inhibitor šireg spektra, VEGFR-1, -2 i -3; FGFR-1, -2, -3 i 4; PDGFR- $\alpha$ ; c-KIT; i RET. Ispitan je u randomiziranom ispitivanju faze III CLEAR ispitivanje provedenom na bolesnicima s rakom bubrega svih rizičnih skupina, gdje su bolesnici randomizirani bilo na liječenje lenvatinibom/pembrolizumabom, lenvatinibom/everolimusom ili sunitinibom. Bolesnici prve skupine imali su značajno dulji PFS i značajno bolji ORR (120).

Prema dostupnim dokazima, za bolesnike iz skupine s niskim/srednjim rizikom optimalna terapijska opcija bila bi kombinacija liječenja ipilimumabom i nivolumabom. Ipilimumab je monoklonsko protutijelo koje selektivno blokira interakciju između negativnog regulatora citotoksičnog T-limfocitnog antigena 4 (CTLA-4; rano izražen na aktiviranim T stanicama) i njegovog liganda CD80/CD86 (izraženog na stanicama koje prezentiraju antigen). Podaci iz randomiziranog ispitivanja faze III, CheckMate 214, koje je usporedilo kombinaciju ipilimumab/nivolumab praćenu monoterapijom nivolumabom naspram monoterapije sunitinibom u bolesnika s uznapredovalim RCC-om, pokazali su veću stopu ORR i CR u odnosu na monoterapiju sunitinibom. Medijan PFS-a nije dosegnut (121). Nuspojave povezane s liječenjem javile su se u 93% bolesnika u skupini liječenoj ipilimumabom/nivolumabom i 97% bolesnika u skupini sunitiniba; a one visokog stupnja u 46% odnosno 63% bolesnika. Nuspojave su dovele do prekida liječenja u 22% i 12% pacijenata koji su primali ipilimumab/nivolumab odnosno sunitinib (121). Iako je studija ispitivala učinak kombinacije na liječenje bolesnika srednjeg i nepovoljnog rizika, uključila je i bolesnike povoljne prognostičke skupine. Rezultati ukupnog preživljenja na 18 mjeseci su bili bolji u grani liječenoj sunitinibom nego u grani liječenoj kombinacijom, a stope kompletnog odgovora (CR) su bile veće u grani liječenoj kombinacijom (121).

I inhibitor tirozin kinaze, kabozantinib je pokazao učinkovitost u skupini bolesnika srednjeg/visokog rizika. U otvorenom, randomiziranom ispitivanju faze II CABOSUN, pacijenti s uznapredovalim RCC srednjeg ili visokog rizika primali su kabozantinib ili sunitinib. Bolesnici liječeni kabozantinibom pokazali su značajno produljen medijan PFS-a i viši ORR u usporedbi onima liječenim sunitinibom (122). Ekstrapolirajući podatke ove studije, na bolesnike loše prognoze, smjernice preporučuju upotrebu kabozantiniba i u ovoj skupini bolesnika.

Kombinacija aksitiniba i avelumaba, monoklonskog protutijela koje se selektivno veže na PD-L1 odobrena je za liječenje bolesnika s uznapredovalim ili metastatskim RCC u prvoj liniji. Randomizirano ispitivanje faze III, JAVELIN Renal 101 uključivalo je bolesnike sve iz sve tri rizične skupine randomizirane na liječenje kombinacijom avelumabom/aksitinibom naspram sunitiniba. Bolesnici liječeni kombinacijom imali su znatno dulji PFS od onih koji su primali sunitinib. Benefit je uočen kod bolesnika svih skupina, neovisno o izražaju PD-1, PD-L1. Post-hoc analiza 108 pacijenata sa sarkomatoidnom histologijom u istoj studiji pokazala je poboljšani PFS (stratificirani HR, 0,57; 95% CI, 0,325–1,003) i veću stopu objektivnog odgovora (46,8% naspram 21,3%; kompletan odgovor [CR] u 4,3% naspram 0%) kod bolesnika liječenih kombinacijom u odnosu na one liječene sunitinibom (123).

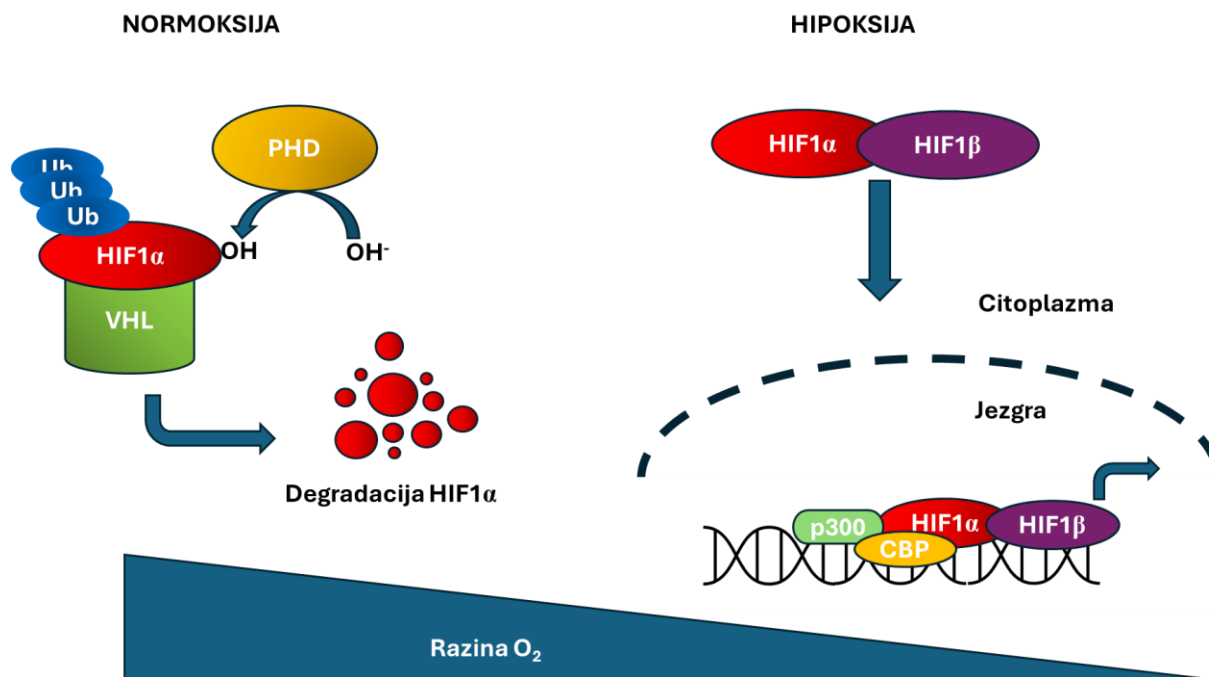
Među lijekovima koji nalaze mjesto u smjernicama, izdvajaju se i monoterapije sunitinibom i pazopanibom. Oba lijeka su pokazala učinkovitost i povoljan profil toksičnosti, a međusobno su uspoređeni u studiji neinferiornosti COMPARZ (124,125).

Nakon progresije bolesti na prvu liniju liječenja, terapijske opcije za bolesnike su kabozantinib, lenvatinib/everolimus, nivolumab, aksitinib, aksitinib/pembrolizumab, kabozantinib/nivolumab, ipilimumab/nivolumab, lenvatinib/pembrolizumab, pazopanib, sunitinib, tivozanib, everolimus, bevacizumab, sorafenib, temsirolimus, te belzutifan. Ne postoji jasan konsenzus oko druge linije liječenja, nego on ovisi o primijenjenoj prvoj liniji, trajanju odgovora, podnošenju terapije ili prisutnosti biomarkera (82).

Za nesvijetlostanične tumore, terapijske opcije su kabozantinib, sunitinib, lenvatinib/everolimus, nivolumab, nivolumab/kabozantinib, pembrolizumab (82).

### 1.2.9. *HIF-1A* gen i HIF-1 $\alpha$

Gen *HIF-1A* glavni je regulator staničnog odgovora na hipoksiju, upravljajući širokim rasponom adaptivnih mehanizama bitnih za preživljavanje stanice (126). Njegova sposobnost moduliranja angiogeneze, eritropoeze, metabolizma glukoze i preživljavanja stanica naglašava njegovu važnost u održavanju stanične homeostaze pod niskim razinama kisika. Gen *HIF-1A*, također poznat kao EPAS1 (protein 1 koji sadrži endotelnu PAS domenu), nalazi se na kratkom kraku kromosoma 14 (14q21-q24) ljudskog genoma, a sadrži sekvencu DNK koja kodira protein HIF-1 $\alpha$  (127). Transkripcija gena *HIF-1A* visoko je reguliran proces na koji utječu razine kisika unutar stanične okoline. Pri normalnoj razini kisika u stanici (normoksija), gen *HIF-1A* se aktivno prepisuje, ali se njegov proteinski produkt, HIF-1 $\alpha$ , brzo razgrađuje. Enzim prolil hidroksilaza (PHD) igra ključnu ulogu u ovom procesu. Ovi enzimi hidroksiliraju specifične prolinske ostatke na HIF-1 $\alpha$ , označavajući ga za prepoznavanje od strane von Hippel-Lindau (VHL) proteina, komponente puta razgradnje ubikvitin-proteosoma (128). U normoksičnim uvjetima, PHD-i koriste kisik i druge kočimbenike za hidroksilaciju HIF-1 $\alpha$ . Ova modifikacija omogućuje vezanje VHL-a, što dovodi do ubikvitinacije HIF-1 $\alpha$ . Ubikvitinirani HIF-1 $\alpha$  zatim se usmjerava na razgradnju pomoću proteosoma, čime se sprječava njegovo nakupljanje unutar stanice (128).



Slika 4: Uloga HIF1 $\alpha$  unutar stanice u uvjetima normoksije i hipoksije

Izvor: (129).

Pri hipoksiji (uvjetima niske razine kisika), inhibira se hidroksilacija HIF-1 $\alpha$  pomoću PHD -ova. Stabilizirani HIF-1 $\alpha$  izbjegava razgradnju posredovanu ubikvitinom i nakuplja se unutar citoplazme. Stabilni HIF-1 $\alpha$  se translocira u staničnu jezgru, gdje tvori heterodimer s HIF-1 $\beta$  (poznat kao ARNT - nuklearni translokator receptora arilnih ugljikovodika). Heterodimer HIF-1 $\alpha$ -HIF-1 $\beta$  veže se na specifične sekvence DNK poznate kao elementi odgovora na hipoksiju (HRE) koji su prisutni u promotorskim regijama ciljnih gena. Vežanje kompleksa HIF-1 na HRE inicira transkripciju ciljnih gena uključenih u različite stanične procese, uključujući angiogenezu, eritropoezu, metabolizam glukoze i preživljavanje stanica. Transkripcijska aktivacija ovih ciljnih gena omogućuje stanicama da se prilagode hipoksičnom okruženju promicanjem sinteze čimbenika koji poboljšavaju dostavu kisika, proizvodnju energije i preživljavanje stanica (129).

Ova dinamička regulacija transkripcije gena HIF-1A služi kao kritični molekularni mehanizam koji omogućuje stanicama da brzo reagiraju i prilagode se promjenama u razinama kisika, osiguravajući njihov opstanak i funkcionalnost u različitim fiziološkim uvjetima.

Patološki nalaz gena *HIF-1A* obično uključuje različite molekularne i genetske promjene, mutacije ili disregulacije gena. Abnormalnosti u genu *HIF-1A* mogu pridonijeti razvoju raznih bolesti, uključujući raka (126)

Otkriće pVHL; tumor supresor proteina omogućilo je opisivanje važnih puteva povezanih s ccRCC. pVHL cilja  $\alpha$ -podjedinice čimbenika transkripcije induciranih hipoksijom (HIF) za proteasomalnu razgradnju (130). Dvije glavne izoforme HIF- $\alpha$  imaju suprotne učinke na biologiju RCC-a, vjerojatno kroz različite interakcije s drugim onkogenima. HIF-1 $\alpha$  djeluje kao supresor tumora, a HIF-2 $\alpha$  kao onkogen. Cjelokupni učinak deaktivacije VHL-a ovisit će o finom podešavanju odgovora HIF-a. U podlozi smanjene aktivnosti HIF-1 $\alpha$  u ccRCC-u obično je kromosomska delecija, dok povećana aktivnost HIF-1 dokazano smanjuje opterećenje tumorom u modelima tumora. Polimorfizmi na lokusu gena HIF-2 $\alpha$  predisponiraju razvoj ccRCC, a HIF-2 $\alpha$  potiče rast tumora (131). Genetske studije otkrile su istaknutu ulogu enzimskih gena koji modificiraju kromatin u ccRCC, a oni mogu dodatno modulirati specifične aspekte HIF odgovora. Ovo sugerira da su, umjesto globalne aktivacije HIF-a, specifične komponente odgovora važne za rast raka bubrega. Visoke razine transkripcijskih čimbenika induciranih hipoksijom (HIF) posebno su važne u tipu svijetlostaničnog karcinoma bubrega, u kojem više nisu regulirani von Hippel-Lindau proteinom.

Za analizu gena *HIF-1A* koristimo DNK sekvencioniranje (Sangerovo ili sekvenciranje sljedeće generacije (NGS)) koje omogućuju analizu velikih količina DNK. NGS može identificirati širi raspon genetskih promjena, uključujući točkaste mutacije, umetanja, brisanja i strukturne varijacije (127,132,133)

Lančanu reakciju polimerazom (PCR) koristimo za umnožavanje specifičnih regija gena *HIF-1A*, što olakšava otkrivanje mutacija ili promjena u tim regijama.

Fluorescencijska in situ hibridizacija (FISH) je citogenetička tehnika koja koristi fluorescentne sonde za vezanje na specifične sekvence DNK. Može se koristiti za otkrivanje strukturnih promjena, kao što je amplifikacija gena ili translokacije koje uključuju gen *HIF-1A* (134).

Imunohistokemija (IHC) podrazumijeva korištenje protutijela za otkrivanje prisutnosti i lokalizacije proteina u uzorcima tkiva. U kontekstu  $HIF1\alpha$ , IHC se može koristiti za procjenu razine izražaja proteina u dijelovima tkiva, pružajući informacije o aktivnosti gena.

Proučavanje izražaja *HIF1A* na razini RNA može se provesti tehnikama poput lančane reakcije polimeraze reverzne transkripcije (RT-PCR) ili sekvenciranja RNA. Abnormalne razine RNA mogu ukazivati na disregulaciju gena.

Funkcionalni testovi koriste se za procjenu funkcionalne posljedice mutacija ili promjena *HIF1A*. Oni mogu uključivati stanične testove za mjerenje transkripcijske aktivnosti *HIF1A* ili njegovih nizvodnih ciljeva.

Određivanje izražaja i razine proteina  $HIF1\alpha$  može se obaviti različitim laboratorijskim tehnikama od imunohistokemije, ELISA (koncentracija određenog proteina), imunofluorescencije, masene spektroskopije i drugih.

#### **1.2.10. SLC2A1 gen i GLUT-1**

Gen *SLC2A1*, ključni je gen koji kodira protein uključen u transport glukoze kroz stanične membrane GLUT1. Gen *SLC2A1* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 1 (1p34.2) (135–137). Unutarstanični transport glukoze neophodan je za preživljavanje, rast, proliferaciju i funkciju stanica. U ovom procesu posreduje obitelj od 13 srodnih molekula koje se zajednički nazivaju proteini prijenosnici glukoze (GLUT). Klasificiraju se u 3 klase: klasa I, GLUT1 do GLUT4; klasa



II, GLUT7, GLUT9 i GLUT11; i klasa III, GLUT6, GLUT8, GLUT10 i GLUT12, te H<sup>+</sup>/mioinozitol transporter (138,139). Obitelj također uključuje GLUT5 (fruktozni transporter), koji ne pripada niti jednoj klasi. Među tim molekulama najpoznatiji je GLUT1. GLUT se obično izražava na tkivno specifičan način. Njihov izražaj je pojačano reguliran u mnogim patološkim stanjima poput hipoksije i djelovanjem različitih čimbenika, uključujući čimbenik induciran hipoksijom 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) i čimbenike rasta kao što su epidermalni čimbenik rasta, hormoni štitnjače, estrogen, inzulin i kalcij ionofori (139–142). Značajno povećanje i deregulacija izražaja GLUT-a opisani su u malignim stanicama (143–147). Brza proliferacija u odnosu na vaskulamu potporu izlaže tumorske stanice stalnom hipoksijskom stanju s potencijalnim nekrotičnim ili apoptotskim učincima (148,149). Maligne stanice prolaze genetske i adaptivne promjene koje im omogućuju da izbjegnu smrt izazvanu nedostatkom kisika. Jedna od tih promjena je povećani unos glukoze i drugih šećera u usporedbi s normalnim stanicama. Povećani unos glukoze može se vizualizirati u mnogim tumorima skeniranjem pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) uz korištenje obilježenog analoga glukoze, FDG (2-fluoro-2deoksi-D-glukoza obilježena fluoridom 18), što je povezano s povećanim izražajem GLUT1, koji dovodi do prigušenja apoptoze i pojačane stanične proliferacije (150,151). Poznato je da tumori s ovim značajkama imaju lošu prognozu. Povećani izražaj GLUT1 opisan je u mnogim vrstama raka, uključujući rak pluća, dojke, mozga, kože, probave, maternice i jajnika. Ovo povećanje je često povezano sa slabo diferenciranim tumorima i smanjenim preživljavanjem (152,153).

GLUT1 posebno je važan za unos glukoze u tkivima koja ne ovise o inzulinu za transport glukoze. Široko je rasprostranjen u različitim tkivima, uključujući mozak, crvene krvne stanice i posteljicu. Njegova prisutnost u krvno-moždanoj barijeri ključna je za održavanje opskrbe mozga glukozom (154).

Ispravno funkcioniranje gena *SLC2A1* ključno je za normalan razvoj mozga. Mutacije u ovom genu mogu dovesti do sindroma nedostatka GLUT1, rijetkog neurološkog poremećaja karakteriziranog napadajima i kašnjenjem u razvoju (155). Za razliku od nekih drugih prijenosnika glukoze, GLUT1 je neovisan o inzulinu. Omogućuje stanicama da preuzmu glukozu čak i u nedostatku ili niskim razinama inzulina (156). Izražaj *SLC2A1* može se regulirati HIF-1 $\alpha$ . U uvjetima hipoksije, HIF-1 $\alpha$  može povećati izražaj GLUT1, olakšavajući povećani unos glukoze.

Aberantni izražaj GLUT1, regulirana genom *SLC2A1*, opažena je u različitim vrstama raka. Povećani unos glukoze u stanice raka povezan je s njihovim energetske potrebama i brzim rastom.

Genetsko testiranje na mutacije u genu *SLC2A1* ključno je za dijagnosticiranje sindroma nedostatka GLUT1. Dodatno, razumijevanje uloge GLUT1 u bolestima, uključujući i raku, pruža potencijalne ciljeve za terapijske intervencije usmjerene na modulaciju metabolizma glukoze. Analiza izražaja gena *SLC2A1*, koji kodira protein prijenosnika glukoze GLUT1, može se provesti pomoću različitih tehnika molekularne biologije. Kako bi se analizirao protein GLUT1 mogu se koristiti različite laboratorijske tehnike za proučavanje njegovog izražaja, lokalizacije i funkcije koje se provode jednako kao i prethodno opisane metode za analizu HIF-1 $\alpha$  proteina.

### 1.2.11. VEGF

Čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGF) kodiran je s nekoliko gena, a glavni su *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD* i *PIGF* (engl. placental growth factor) Među njima, *VEGFA* je najopsežnije proučavan i obično se naziva *VEGF*. Obitelj *VEGF* gena igra ključnu ulogu u angiogenezi, stvaranju novih krvnih žila, te je neophodna za razne fiziološke i patološke procese, uključujući embrionalni razvoj, zacjeljivanje rana i rast tumora. Smješten na kromosomu 6p21.1, *VEGFA* proizvodi višenamjenski protein ključan za vaskularni razvoj, propusnost i preživljavanje endotelnih stanica (157). Njegov izražaj je strogo reguliran, moduliran različitim podražajima, kao što je hipoksija. *VEGFA* je ključan za fiziološke procese kao što su embrionalni razvoj i popravak tkiva, a aberantni izražaj *VEGFA* povezan je s rakom, gdje prekomjerna angiogeneza potiče rast tumora (158). Kod karcinoma, *VEGFA* gen igra ključnu ulogu u poticanju rasta i napredovanja tumora putem stimulacije angiogeneze. Tumorske stanice često imaju nisku razinu kisika (hipoksiju) zbog brzog rasta i neadekvatne opskrbe krvlju. Kao odgovor, aktivira se *VEGFA* gen, primarno preko čimbenika inducibilnog hipoksijom 1 (HIF-1) regulatora transkripcije, što dovodi do povećanog izražaja *VEGFA* (159). Tumorske stanice, kao i okolne stromalne stanice, izlučuju protein *VEGFA* u tumorski mikrookoliš. *VEGFA* se veže na svoje receptore, prvenstveno na VEGFR-2 (receptor čimbenika rasta vaskularnog endotela 2), koji se nalazi na površini endotelnih stanica krvnih žila. Nakon vezanja, *VEGFA* aktivira unutarstanične signalne putove endotelnih stanica. To uključuje MAPK (mitogenom-aktivirana protein kinaza) i PI3K-Akt puteve, pokrećući kaskadu događaja koji potiču preživljavanje stanica, proliferaciju i migraciju (160).

Aktivacija MAPK signalnog puta uključuje aktivaciju proteina kao što su Ras, Raf, MEK (MAPK/ERK kinaza) i ERK (kinaza regulirana izvanstaničnim signalom). Aktivacija MAPK puta potiče proliferaciju, preživljavanje i migraciju endotelnih stanica (160).

Vežanje VEGF dovodi do aktivacije PI3K, koji zauzvrat aktivira Akt (protein kinazu B). Akt regulira različite stanične procese, uključujući stanično preživljavanje, proliferaciju i migraciju. Aktivacija puta PI3K-Akt kritična je za preživljavanje endotelnih stanica tijekom angiogeneze (161).

Aktiviranje signalnog puta posredovanog eNOS (endotelna sintaza dušikovog oksida) dovodi do proizvodnje dušikovog oksida (NO) u endotelnim stanicama. NO služi kao vazodilatator i pridonosi opuštanju krvnih žila, potičući povećani protok krvi i propusnost krvnih žila (162).

Vežanje VEGF-a za receptor VEGFR-2 također pokreće PLC $\gamma$  put, što dovodi do hidrolize fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (PIP2) u inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). Ova kaskada rezultira mobilizacijom unutarstaničnog kalcija i aktivacijom protein kinaze C (PKC), pridonoseći migraciji i propusnosti endotelnih stanica (163).

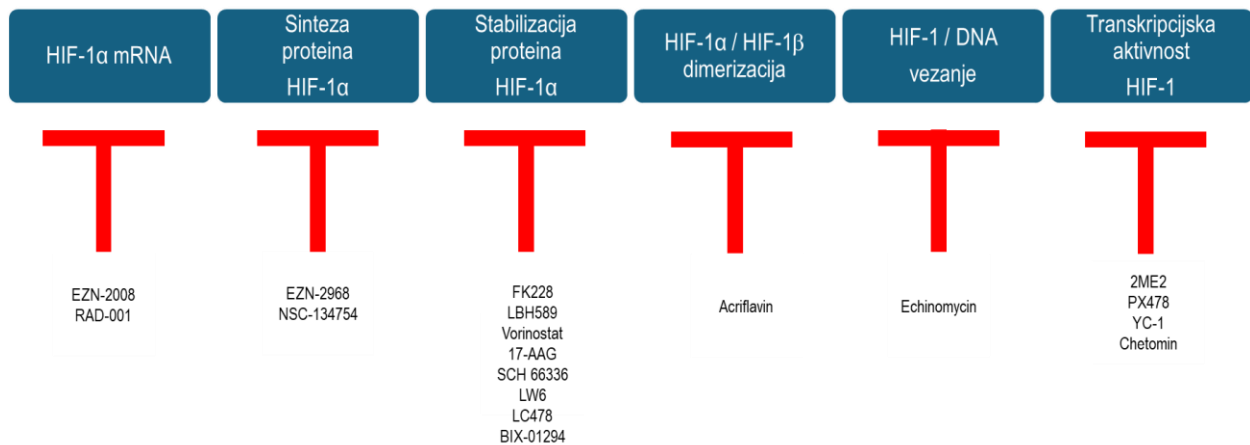
Uz navedene, VEGF inducira aktivaciju Janus kinaza (JAK) i naknadnu aktivaciju STAT proteina koji reguliraju izražaj gena povezanih s preživljavanjem stanica, proliferacijom i angiogenezom.

VEGF može aktivirati Rho GTPaze, uključujući Rho, Rac i Cdc42, koje su uključene u preuređenje citoskeleta i migraciju endotelnih stanica te Src kinazu, koja igra ulogu u preživljavanju endotelnih stanica, migraciji i angiogenezi (164).

#### **1.2.12. Klinički značaj HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, VEGF**

Kombinirani učinci HIF-1 $\alpha$ , VEGF-a i GLUT1 i njihovih proteina ključni su u odgovoru tumorskih stanica na hipoksiju i ograničenu dostupnost nutrijenata u tumorskom mikrookolišu.

Iako u ovom trenutku u Hrvatskoj ne postoje registrirani HIF-1 $\alpha$  inhibitori, brojni su lijekovi za koje se zna da imaju učinak na inhibiciju sinteze HIF-1 $\alpha$ , različitim mehanizmima, od inhibiciju HIF-1 mRNA, sinteze proteina HIF-1, stabilizacije HIF-1, dimerizacije HIF-1 $\alpha$  /HIF-1 $\beta$ , HIF-1/DNA vežanje i transkripcijske aktivnosti HIF-1 (165,166). Za MO-460, analog prirodnog proizvoda na bazi benzofurana (R)-(-)-moracin-O, opisana je inhibicija nakupljanja HIF-1 prethodno neidentificiranim mehanizmom - ulazi u interakciju s heterogenim nukleamim ribonukleoproteinom A2/B1 (hnRNPA2B1), i inhibira početak translacije HIF-1 (167).



**Slika 5: HIF1 inhibitori koji se istražuju u kliničkim studijama i njihove mete**

Izvor: (168)

Na slici 5 prikazane su klinička ispitivanja pojedinih HIF1 inhibitori i njihovih zahvatnih točaka.

Najbliže kliničkoj primjeni došao je belzutifan, lijek koji inhibira čimbenik transkripcije čimbenik inducibilan hipoksijom  $2\alpha$  (HIF- $2\alpha$ ) i blokira heterodimerizaciju HIF- $2\alpha$  s HIF- $2\beta$ , čime dovodi do regresije tumora. Praćenje proširene kohorte pacijenata s ccRCCu fazi I/II ispitivanja belzutifana, koji su prethodno primili minimalno 1 ili više linija liječenja pokazalo je stopu kontrole bolesti od 80% među 55 pacijenata. Medijan PFS-a bio je 14,5 mjeseci, a 51% je prijavilo preživljenje bez progresije od 12 mjeseci. Najčešće prijavljene nuspojave bili su anemija, umor i dispneja, među ostalim. Krajem 2023. godine FDA je temeljem rezultata ispitivanja faze III, LITESPARK -006 u kojem je uspoređen belzutifan s everolimusom u bolesnika s uznapredovalim RCC-om koji su prethodno liječeni TKI i anti-PD-1/PD-L1 terapijom. Dok su rezultati PFS bili bolji uz belzutifan, nego uz everolimus, rezultati OS-a još nisu zreli, iako do sada, nisu pokazali lošiji učinak belzutifana (169). Uz to, belzutifan je registriran za liječenje raka bubrega povezan s von Hippel-Lindau bolesti.

Dok je klinička primjena HIF-1 inhibitora i nadalje limitirana, inhibitori VEGF-a postigli su golem uspjeh u RCC-u. Uz njih, učinkovitost mTOR inhibitora objašnjava se činjenicom da izražaj HIF- $\alpha$  ovisi o mTOR-u. Ti putevi, uključujući njihove različite zamršene nizvodne puteve i klinički značaj, obrađeni su u mnogim radovima (170–175).

Inhibitori VEGF puta pripadaju bilo kojoj od 2 glavne klase; bevacizumab je monoklonsko antitijelo, a svi ostali su inhibitori tirozin kinaze (TKI). IFN- $\alpha$  služio kao kontrola u ranim ispitivanjima TKI. No, u kasnijim studijama IFN- $\alpha$  kao kontrola brzo je zamijenjen TKI inhibitorima VEGF puta poput sunitiniba ili sorafeniba u prvoj liniji, ili mTOR inhibitora everolimusa u drugoj liniji.

Bevacizumab je monoklonsko protutijelo koje inhibira VEGF, signalni protein koji ima ključnu ulogu u angiogenezi (176). U liječenju raka bubrega bevacizumab se često koristi u kombinaciji s drugim lijekovima (s interferonom-alfa ili drugim ciljanim terapijama). Bevacizumab se koristi i u prvoj liniji i u kasnijim linijama liječenja uznapredovalog karcinoma bubrežnih stanica (177). U kliničkim ispitivanjima pokazao je poboljšano preživljenje bez progresije bolesti. Uobičajene nuspojave povezane s bevacizumabom uključuju hipertenziju, proteinuriju, krvarenje, komplikacije zacjeljivanja rana i gastrointestinalne perforacije. Povezan je s povećanim rizikom od arterijskih i venskih tromboembolijskih događaja, uključujući moždani udar, infarkt miokarda i duboku vensku trombozu. Proteinurija, uključujući nefrotski sindrom, može se pojaviti tijekom liječenja bevacizumabom (177,178).

Inhibitori VEGF-TKI klasa je lijekova koji se koriste u liječenju karcinoma bubrega. Djeluju tako da ciljaju i inhibiraju aktivnost tirozin kinaze receptora za čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGFR), čime suzbijaju angiogenezu i smanjuju dotok krvi u tumore. VEGF-TKI koji se koriste kod karcinoma bubrega uključuju sunitinib, sorafenib, pazopanib, aksitinib, kabozantinib i lenvatinib (179). Primjenjuju se u prvoj liniji i narednim linijama liječenja metastatskog raka bubrega, a pojedini se mogu primijeniti i u adjuvatnom liječenju raka bubrega od bolesnika sa srednjim ili visokim rizikom.

Među neželjene posljedice VEGF-TKI inhibitora spadaju umor, hipertenzija, proljev, sindrom šaka-stopalo, stomatitis i povećan rizik od krvarenja, kardiovaskularnih događaja, uključujući infarkt miokarda i tromboemboliju (180). Osim receptora za VEGF, inhibitori VEGF-TKI mogu ciljati i na druge receptore tirozin kinaze, kao što su receptorski čimbenik rasta koji potiče iz trombocita (PDGFR) i c-Kit (181). VEGF-TKI često se koriste u kombinaciji s drugim ciljanim terapijama ili imunoterapijama (nivolumab/pembrolizumab) kako bi se poboljšala učinkovitost liječenja (182).

2.HIPOTEZA

## 2. HIPOTEZA

1. Izražaj mRNA *HIF1A* je značajno veći u svijetlostaničnim karcinomima bubrega u odnosu na ostale ispitivane histološke tipove karcinoma bubrega
2. Izražaj mRNA *HIF1A* je u pozitivnoj korelaciji s izražajem HIF-1 $\alpha$  proteina u svim histološkim tipovima karcinoma bubrega
3. Izražaj proteina HIF-1 $\alpha$ , GLUT1 i VEGF-A je značajno veći u svijetlostaničnim karcinomima bubrega u odnosu na ostale ispitivane histološke tipove karcinoma bubrega

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA



### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

#### **Osnovni cilj istraživanja**

- Utvrditi izražaj mRNA *HIF1A* i proteina HIF-1 $\alpha$ , GLUT1 i VEGF-A u ispitivanim histološkim tipovima karcinoma bubrega

#### **Sporedni ciljevi istraživanja**

- Dobivene rezultate uskladiti prema novoj WHO klasifikaciji raka bubrega, te usporediti s ranije objavljenim radovima.



## 4. ISPITANICI I METODE

U studiju je uključeno 39 uzoraka karcinoma bubrega pacijenata operiranih u Kliničkom bolničkom centru Split od 1. siječnja 2010. godine do 31. prosinca 2018. godine. Uzorci su dobiveni pretraživanjem baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju unošenjem MKB šifre C64 koja označava zloćudnu novotvorinu bubrega osim bubrežne zdjelice. Odabrani su uzorci svijetlostaničnog karcinoma bubrega, kromofobnog karcinoma bubrega i papilarnog karcinoma bubrega. Nakon pretraživanja odabrano je 39 konsektivnih uzoraka pacijenata koji su imali dostupan patohistološki nalaz, kliničke podatke, te parafinski blok tumora potreban za daljnje analize. Bolesnici koji nisu imali potpune kliničke podatke, parafinski blok tumora, ili se radilo o karcinomu koji nije bio podrijetla bubrega, ili nije bio primarni karcinom bubrega isključeni su iz istraživanja. Uzorci su raspoređeni u tri skupine, prema histološkom tipu tumora: 14 ccRCC uzoraka, 13 pRCC i 12 chRCC.

*Real-time quantitative polymerase chain reaction* (RTqPCR) analiza izražaja mRNA *HIF1A* učinjena je na 20 uzoraka karcinoma bubrega, a imunohistokemijska analiza izražaja proteina HIF-1  $\alpha$ , GLUT1 i VEGF-A na svih 39 uzoraka.

Iako određivanje histološkog gradusa za sve tipove RCC nije sukladno smjernicama, za potrebe istraživanja, svim karcinomima je određen histološki gradus.

### 4.1. RNA izolacija i reverzna transkriptaza

RNA je izolirana iz 20 uzoraka humanih karcinoma bubrega (7 uzoraka svijetlostaničnih karcinoma, 7 uzoraka papilarnog karcinoma te 6 uzoraka kromofobnog karcinoma), fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin. Izdvojeno je 5mm<sup>2</sup> tkiva karcinoma bez normalnog tkiva bubrega i bez nekroze. Nekoliko rezova tkiva debljine 6  $\mu$ m pohranjeno je u sterilne mikroeprovete. Izolacija RNA provedena je *High Pure RNA Paraffin kit* (Cat. No. 03270289001; Roche, Basel, Švicarska) prema uputama proizvođača. Protokol je započeo deparafinizacijom tkiva uklopljenog u parafin, ispiranjem u čistom etanolu i centrifugiranjem 2 minute na maksimalnoj brzini. Proteinaza K i pufer za lizu tkiva (*Tissue Lysis Buffer*) su potom dodani osušenom talogu u svrhu razgradnje proteina. Otopina je inkubirana preko noći. Slijedećeg dana, u lizat su dodani vezujući pufer i

etanol i otopina je prebačena u spin-kolonu. Vezana RNA je potom odgovarajućim puferom isprana sa spin-kolona. Digestija DNA provedena je prema uputama proizvođača. Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD) korišten je za mjerenje ukupne koncentracije RNA u svakom uzorku. Uzorci su razrijeđeni do najniže izmjerene koncentracije RNA (1,34 ng/μL). Reverzna transkripcija provedena je s 1,34 ng/μL ukupne RNA korištenjem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a u skladu s uputama proizvođača (kat. br. 4368814, Applied Biosystems, Waltham, SAD). cDNA konačnog volumena 20 μL je potom pohranjena na -80 °C za naknadnu kvantifikaciju izražaja gena od interesa.

## 4.2. qPCR

qPCR analiza provedena je na Real-Time PCR instrumentu (Applied Biosystems Fast 7500, Waltham, SAD) uporabom Taqman® Fast Advanced Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Waltham, SAD) koji sadrži AmpErase™ Uracil N-Glikozilazu (UNG) i inertnu referentnu boju ROX. Taqman® Applied Biosystems je proizveo probe za analizu izražaja ljudskog *HIF-1A* gena (Hs00153153\_m1). Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) će biti analizirana kao endogeni kontrolni gen (Hs99999905\_m1). Real-time PCR proveden je korištenjem 2 μL cDNA predloška, 1 μL Taqman® probe (Applied Biosystems, Waltham, SAD) i 10 μL Taqman® univerzalnog master mix-a (Applied Biosystems, Waltham, SAD). Svi uzorci cDNA su napravljeni u duplikatima. Kontrolni uzorak (engl. *non-template control*, NTC) sadržava sve komponente mastermiksa te vodu bez nukleaza umjesto cDNA uzorka. PCR protokol uključuje zagrijavanje uzorka 2 minute na 50 °C za aktivaciju uracil-N-glikozilaze, potom 2 minute na 95 °C za aktivaciju polimeraze praćen s 40 amplifikacijskih ciklusa (3 sekunde na 95 °C i 30 sekundi na 60 °C). Komparativna Ct metoda ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta\Delta Ct$ ) korištena je pri relativnoj kvantifikaciji qPCR-a čime su izračunate relativne promjene izražaja ciljnog gena.

## 4.3. Imunohistokemijske analize

Imunohistokemijska analiza ispitivanih čimbenika provedena je slijedećom metodom: rezovi parafinskih blokova karcinoma bubrega nanešeni su na *super frost* stakla (Thermoscientific, Njemačka) i obrađeni u automatskom bojaču (Ventana Bench mark

Ultra Autostainer, Ventana Roche, Tucson, SAD). Za određivanje imunohistokemijskih izražaja ispitivnih čimbenika korištena su sljedeća protutijela:

- Za HIF-1 $\alpha$  korišteno je primarno kuničje poliklonalno IgG protutijelo klon H-206, (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, SAD).
- Za određivanje izražaja GLUT1 korišteno je primarno monoklonalno mišje protutijelo klon SPM498, (Novus Biologicals, Abingdon, UK).
- Za VEGF korišteno je primarno poliklonalno kuničje protutijelo klon ab46154 (Abcam, UK).

Sekundarno protutijelo će biti *Ultra view Universal DAB detection kit* (Ventana, Tucson, SAD).

Pozitivnom obojenosti sva tri čimbenika smatrana je smeđa obojanost citoplazme i/ili membrane, a za HIF-1  $\alpha$  i nuklearno obojenje. Kao pozitivna kontrola za izražaj svih ispitivanih čimbenika korišteno je tkivo posteljice. Imunohistokemijski izražaj svih ispitivanih čimbenika određen uporabom Hscore metode prema sljedećoj formuli  $Hscore = \sum P_i (i + 1)$ , gdje je  $i$  = intenzitet obojenja određen kao 1 (slab), 2 (umjeren), ili 3 (jak), a  $P_i$  je postotak obojenja stanica bubrežnih karcinoma za svaki intenzitet. Svaki uzorak karcinoma bubrega pregledan je i analiziran je u 10 vidnih polja velikog povećanja (VPVP). Hscore je određen za svako vidno polje uzorka. Konačni Hscore za svaki uzorak određen je kao aritmetička sredina svih 10 VPVP.

#### **4.4. Protokol istraživanja**

Istraživanje je provedeno u nekoliko faza.

Prva faza uključivala je pretraživanje literature. Više puta tijekom trajanja studije pretraživane su baze *PubMed* i *Web of Science* (WoS). Nisu korištena ograničenja za vrstu publikacije, a jezik je bio ograničen na engleski. Pretraživane su publikacije koje bilo gdje u tekstu sadrže bilo koji od pojmova ili složenica „HIF1A“, „HIF-1 $\alpha$ “, „renal cancer“, „GLUT1“, „VEGF“. Takvo pretraživanje pokazalo se nespecifično, stoga je precizirano na daljnje kombiniranje pojma „renal cancer“ s ostalim navedenim pojmovima. Kombinacijom s „GLUT1“ dobiveno je 125 radova, kombinacijom s „HIF-1 $\alpha$ “ 447 radova, kombinacijom s „VEGF“ 2686 radova. Kombinacija pojmova „GLUT1“, „HIF-1 $\alpha$ “ i „VEGF“ dala je 95 rezultata.

Kombinacija sva 4 pojma u jednom pretraživanju dala je samo 7 rezultata.

Naknadnim iščitavanjem naslova i sažetaka, izabrao sam 87 publikacije koje sam koristio u pisanju znanstvenog rada te pisanju disertacije, izbacivši publikacije koje se ne odnose na temu ove doktorske disertacije i koje nisu bile originalni znanstveni članci i/ili pregledni znanstveni radovi. Najvažnije reference navodim u popisu literature.

Druga faza istraživanja provedena je u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split, gdje su prikupljeni patohistološki brojevi pacijenata dobiveni pretraživanjem baze podataka te prikupljanje mikroskopskih histoloških stakalca obojenih hemalaunom i eozinom i odgovarajućih parafinskih tkivnih blokova.

Mikroskopski pregled odabranih uzoraka karcinoma bubrega, odabir protutijela i njihova standardizacija, imunohistokemijska bojenja, analiza imunohistokemijski obojenih preparata svjetlosnim mikroskopom te priprema tkiva i izrada RTqPCR analize mRNA *HIF1A*. Ova faza u cijelosti je provedena Kliničkom Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC Split, te u Laboratoriju poslijediplomskog znanstvenog studija Biologija novotvorina Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Posljednja faza uključivala je statističku obradu, analizu i interpretaciju rezultata te objavu rezultata rada.

#### **4.5. Statistički postupci**

Distribucija uzoraka testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Kao mjere središnje tendencije i raspršenja korištene su srednja vrijednost i standardna devijacija. Postojanje statistički značajnih razlika između promatranih skupina određeno je Kruskal-Wallisovim testom s Dunnovim post-hoc testom. Pearsonova analiza korelacije korištena je za korelaciju veličine tumora i izražaja GLUT1 i HIF-1 $\alpha$ . Rezultati su analizirani pomoću MedCalc Statistical Software 19.1.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgija; medcalc.org; 2019) i *GraphPad Prism 9.0.0* (GraphPad Software, San Diego, SAD). Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2>. Za izračun smo koristili podatke iz prvog provedenog istraživanja na 19 uzoraka karcinoma bubrega i izračunom Hscore-a za GLUT1 protein, sa sljedećim parametrima:  $\mu_1 = 2,40$ ,  $\mu_2 = 2,03$ ,  $\sigma = 0,30$ ,  $\text{power} = 80\%$ ,  $p = 0.05$ , za što je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka po skupini  $n = 11(183)$  U tu svrhu istraživanju za disertaciju povećan je broj uzoraka za svaku skupinu kako bi se dobila odgovarajuća veličinu uzoraka. Statistička značajnost postavljena je na  $p < 0,05$ .

#### **4.6. Etičko odobrenje**

Znanstveno istraživanje na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split, te Laboratoriju poslijediplomskog znanstvenog studija Biologija novotvorina pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu provedeno je u skladu sa svim važećim i primjenjivim svjetskim smjericama i preporukama. Istraživački tim odgovoran za provođenje istraživanja jamči za sigurnost i tajnost podataka koji su korišteni isključivo u istraživačke svrhe te bez navođenja osobnih podataka o bolesnicima, a prikazani podaci, uneseni kroz računalni sustav su na raspolaganju isključivo članovima istraživačkog tima. Istraživanje se provodilo u skladu s načelima Helsinške deklaracije. Istraživanje je dobilo odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Split br. 500-03/23-01/234.





## 5. REZULTATI RADA

## 5. REZULTATI RADA

Studija je obuhvatila ukupno 39 bolesnika s dijagnozom RCC; 26 muškaraca (66,66%) i 13 žena (33,33%). Prosječna dob bolesnika je bila 66, a bolesnika 55 godina. ccRCC dijagnosticiran je u 14 slučajeva (35,89%), pRCC u 13 slučajeva (33,33%) i chRCC u 12 slučajeva (30,76%) (Tablica 5). Većina bolesnika (74,4%) je operirana radikalno, dok je parcijalnu nefrektomiju prošlo 20,5% bolesnika. Kod dva ispitanika (5,1%) provedena je tumorektomija. Nije bilo značajne razlike u lateralnosti raka bubrega. Većina bolesnika operirana je u stadiju I bolesti (69,2%). Tumorska nekroza, sarkomatoidne osobine te limfovaskularna invazija bile su prisutne kod 30,8%, 10,3%, 10,3%, respektivno.

**Tablica 5: Kliničko-patološke karakteristike ispitanika**

Karakteristike	Vrijednost, ukupno N = 39
Dob, godine (IQR)	66 (52,5 - 75,5)
Spol, N (%)	
Muški	26 (66,7)
Ženski	13 (33,3)
Postupak, N (%)	
Radikalna nefrektomija	29 (74,4)
Parcijalna nefrektomija	8 (20,5)
Tumorektomija	2 (5,1)
Smještaj uzorka, N (%)	
Lijevi bubreg	17 (43,6)
Desni bubreg	19 (48,7)
Nije poznato	3 (7,7)
Stadij bolesti, N (%)	
I	27 (69,2)
II	3 (7,7)
III	9 (23,1)
Histološki tip, N (%)	
Svijetlostanični	14 (35,9)
Papilarni	13 (33,3)
Kromofobni	12 (30,8)
Najveći promjer tumora, cm (SD)	5,7 (3,4)
Makroskopska proširenost tumora, N (%)	
Ograničen na bubreg	30 (76,9)
Širi se izvan bubrežnog tkiva	9 (23,1)
Mikroskopska proširenost tumora, N (%)	
Ograničen na bubreg	28 (71,8)
Širi se izvan bubrežnog tkiva	11 (28,2)

Nuklearni gradus tumora, N (%)	
nizak (1 i 2)	16 (41)
visok (3 i 4)	18 (46,2)
Nije određen	5 (12,8)
Tumorska nekroza, N (%)	
Prisutna	12 (30,8)
Nije prisutna	24 (61,5)
Nije određeno	3 (7,7)
Sakromatoidne karakteristike, N (%)	
Prisutne	4 (10,3)
Nisu prisutne	32 (82)
Nije određeno	3 (7,7)
Limfovaskularna invazija, N (%)	
Prisutna	4 (10,3)
Nije prisutna	32 (82)
Nije određeno	3 (7,7)

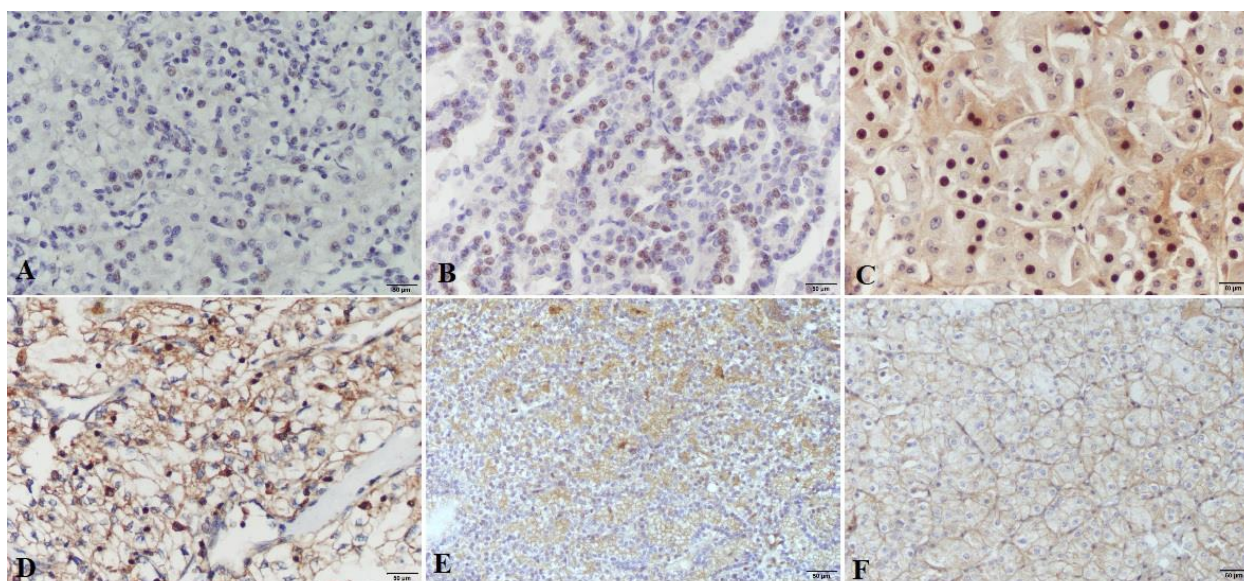
Nije bilo statistički značajnih razlika između proučavanih histoloških tipova RCC-a prema spolu pacijenta. Pacijenti s chRCC dijagnosticirani su u ranijoj dobi u usporedbi s pacijentima s ccRCC i pRCC što je statistički značajno ( $p=0,037$ ). Statistički značajna razlika nije uočena u veličini tumora, patološkom stadiju bolesti prema veličini primarnog tumora (pT), prisutnosti sarkomatoidnih značajki i limfovaskularnoj invaziji. pRCC je imao značajno više tumorske nekroze u usporedbi s ccRCC i pRCC ( $p=0,026$ ). Nuklearno bojenje tumorskih stanica na HIF-1a smatralo se pozitivnim. Intenzitet bojenja jezgre kretao se od umjerenog do jakog (slika 1). Izražaj proteina HIF-1a, određen kao postotak tumorskih stanica koje pokazuju nuklearnu pozitivnost, nije bio statistički bitno različit s obzirom na spol bolesnika, vrstu operacije, makroskopsko ili mikroskopsko proširenje tumora, klinički stadij, nuklearni stupanj ili prisutnost tumorske nekroze (Tablica 6). Postojala je, međutim, značajna razlika između histoloških podtipova, jer su pacijenti s pRCC-om imali viši izražaj HIF-1a proteina nego pacijenti ccRCC. Nije bilo značajne korelacije između izražaja proteina HIF-1a prema dobi bolesnika ili veličini tumora (Tablica 6).

**Tablica 6: Imunohistokemijski izražaj HIF-1 $\alpha$  i VEGF-A u RCC prema kliničkopatološkim osobinama bolesnika**

Karakteristike	HIF-1 $\alpha$	P	VEGF-A	P	GLUT1	P
Spol						
Muški (N=26)	18,18 $\pm$ 13,48	0,228*	1,89 $\pm$ 1,23	0,012*	2,55 $\pm$ 0,69	0,197*
Ženski (N=13)	23,87 $\pm$ 14,21		3,02 $\pm$ 1,19		2,16 $\pm$ 0,29	
Histološki tip						
ccRCC (N=14)	14,72 $\pm$ 12,07	0,022 $\dagger$	1,78 $\pm$ 1,21	0,274 $\dagger$	2,77 $\pm$ 0,68	0,008 $\dagger$
pRCC (N=13)	28,52 $\pm$ 14,78		2,61 $\pm$ 1,31		2,26 $\pm$ 0,55	
chRCC (N=12)	17,16 $\pm$ 10,88		2,45 $\pm$ 1,38		2,12 $\pm$ 0,26	
Nuklearni gradus						
Niski (N=16)	17,74 $\pm$ 16,14	0,545*	1,98 $\pm$ 1,32	0,200*	2,56 $\pm$ 0,70	0,731*
Visok (N=18)	19,52 $\pm$ 11,93		2,53 $\pm$ 1,31		2,35 $\pm$ 0,58	
Tumorska nekroza						
Prisutna (N=12)	23,29 $\pm$ 16,24	0,242*	2,11 $\pm$ 1,34	0,690*	2,40 $\pm$ 0,66	0,669*
Nije prisutna (N=24)	18,65 $\pm$ 12,66		2,33 $\pm$ 1,32		2,43 $\pm$ 0,60	

Sve vrijednosti su navedene kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. \* Mann-Whitney U test  $\dagger$  Kruskal-Wallis test

Izražaj VEGF-A određen je Hscore metodom. Većina tumora pokazivala je heterogeni uzorak bojenja (Slika 6).

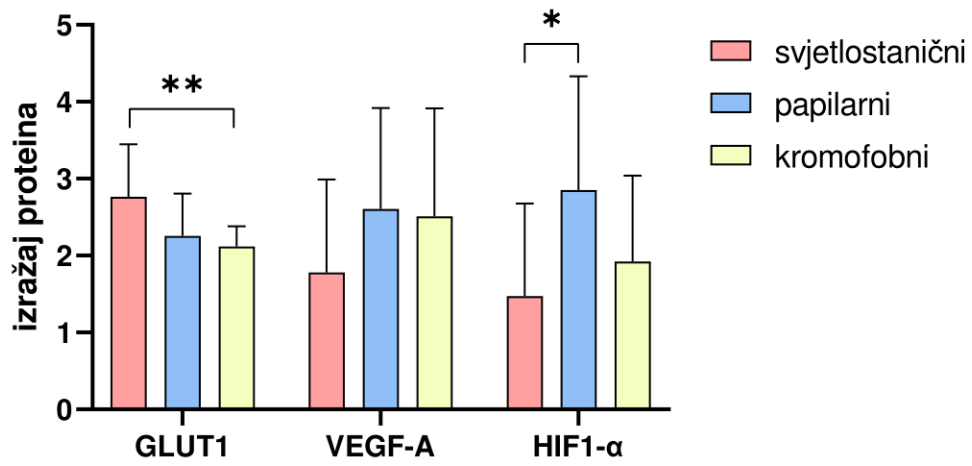
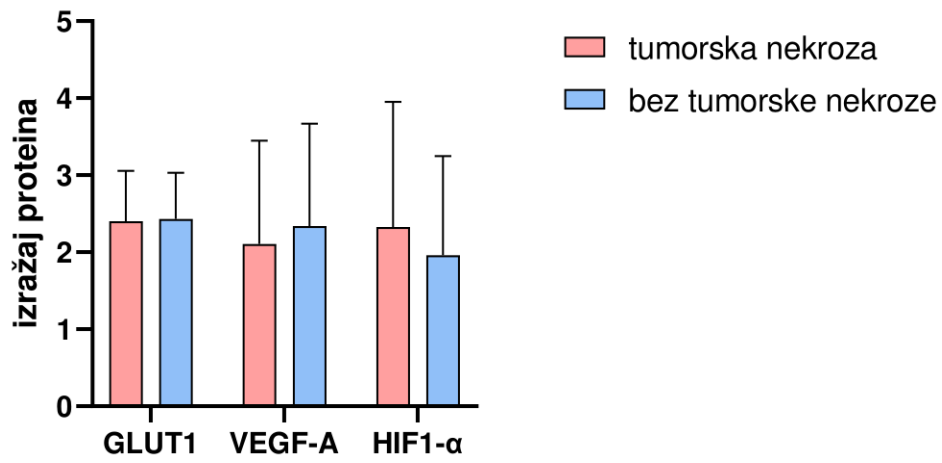


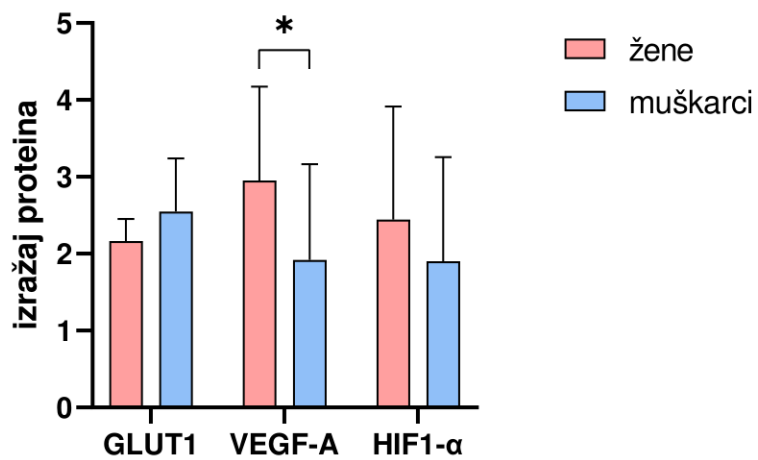
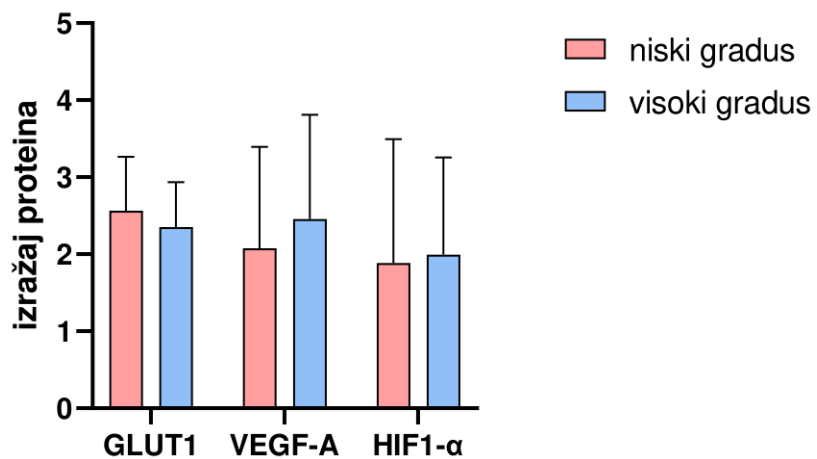
**Slika 6: Izražaj HIF-1 $\alpha$  i VEGF-A u karcinomima bubrežnih stanica.** Nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  u svijetlostaničnim karcinomima bubrega (A), papilarnim karcinomima bubrega (B) i kromofobnim karcinomima bubrega (C), slike A-C snimljene su pri povećanju  $\times 200$ ; mjere predstavljaju 50  $\mu\text{m}$ . VEGF-A jaka do umjerena ekspresija u svijetlostaničnim karcinomima bubrega (D), papilarnim karcinomima bubrega (E) i kromofobnim karcinomima bubrega (F), slike D-F snimljene su pri povećanju  $\times 100$ ; mjere predstavljaju 50  $\mu\text{m}$ .

Dok je izražaj VEGF-A protein mjeren Hscore-om bio značajno viši u žena u usporedbi s muškarcima, nije bilo značajnih razlika u vrsti operacije, makroskopskom ili mikroskopskom širenju tumora, kliničkom stadiju, histološkom podtipu, nuklearnom gradusu ili prisutnosti nekroze. Također nije bilo značajne korelacije između izražaja VEGF-A proteina u odnosu na dob bolesnika ili veličinu tumora.

RT-qPCR analiza uzoraka karcinoma bubrega provedena je korištenjem početnica za *HIF-1A*. Prisutnost mRNA gena *HIF1A* nije bila značajno različita među histološkim podtipovima karcinoma bubrežnih stanica. Prema medijanu GAPDH ciklusa za ccRCC (32,94), chRCC (31,67) i PRCC (34,88) skupine su bile usporedive.

Stanice svijetlostaničnog karcinoma bubrega pokazivake su znatno viši izražaj GLUT1 prijenosnika (HSCORE  $2,77 \pm 0,68$ ) u usporedbi s papilarnim (HSCORE  $2,26 \pm 0,55$ ) i kromofobnim karcinomima (HSCORE  $2,12 \pm 0,26$ ). Opisana razlika ne ovisi o dobi ni spolu bolesnika, niti nuklearnom gradusu, ni prisutnosti tumorske nekroze (Slika 7.). Nije bilo značajne korelacije GLUT1 s dobi bolesnika, veličinom tumora, izražajem HIF1 $\alpha$  i VEGF-a.





Slika 7: Izražaj GLUT1, VEGF i HIF-1 $\alpha$  čimbenika u ovisnosti o histološkom tipu, spolu, gradusu i tumorskoj nekrozi (\* označava  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; stupci su aritmetičke sredine a error bars označavaju standardnu devijaciju)

## 6. RASPRAVA



## 6. RASPRAVA

Vrijednost GLUT1 u našem istraživanju određena je Hscore metodom. Pojačana izraženost GLUT1 kod uzoraka svjetlostaničnog karcinoma bubrega u skladu je s podacima prema kojima se kod većine ovih tumora nalazi homozigotni gubitak *VHL* gena, koji, kako je ranije opisano dovodi do stabilizacije HIF, koji povratno potiču stvaranje mRNA GLUT1 dovode do povećanog izražaja GLUT1 proteina unutar i na stanicama svjetlostaničnog raka bubrega(184,185). Ranije objavljena istraživanja opisala su pojačan izražaj GLUT1 u stanicama svjetlostaničnog raka bubrega, no, kako u literaturi i akademskoj zajednici ne postoji konsenzus za kvantificiranje imunohistokemijskog izražaja GLUT1, korištene su različite metode za semikvantificiranje od Njemačkog imunoreaktivnog skora nadalje(144,186,187). Dok u velikom broju objavljenih istraživanja nije opisana značajna povezanost izražaja GLUT1 i gradusa ili prognoze, značajna pozitivna korelacija pojačanog izražaja GLUT1 i visokog gradusa tumora te sveukupne lošije prognoze u skupini svjetlostaničnih karcinoma opisana je u radu Ambrosetti i suradnika (187). U bolesnika s papilarnim karcinomi, opisana je pozitivna korelacija pojačanog izražaja GLUT1 i višeg stadija tumora u trenutku dijagnoze (188). Sukladno većini provedenih istraživanja, naše istraživanje ne prikazuje značajnu povezanost izražaja GLUT1 i hitološkog gradusa tumora (186,188,189).

Pojačan izražaj GLUT1 jedan je od ključnih prognostičkih čimbenika za većinu solidnih tumora jer korelira s lošijom prognozom bolesnika dijagnosticiranih s takvim tumorima(190). Kod bolesnika s rakom bubrega takva povezanost nije jasno opisana iako je posredno prisutna. Povećan izražaj GLUT 1 uočen je kod većine svjetlostaničnih karcinoma bubrega (144,191,192). Lošija prognoza bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega svjetlostaničnog tipa u usporedbi s drugim histološkim tipovima, u skladu je s istraživanjima koja su pokazala kako unos glukoze u stanicu, odnosno ograničavanje istog djeluje kao ograničavajući čimbenik za rast tumora (193,194). povišen izražaj GLUT1 omogućava aerobnu glikolizu čime se podržava metabolička aktivnost tumorskih stanica, niža infiltracija tumorskog tkiva CD8+ T-limfocitima, koja pak omogućuje daljnji rast tumora(193). Većina istraživanja usmjerenih na vezu izražaja GLUT1 i prognoze raka bubrega ograničeni su ili isključivo na skupinu bolesnika sa svjetlostaničnim karcinomima ili na sve bubrega među kojima incidencijom dominiraju svjetlostanični (186–189). Stoga će većina karcinoma bubrega pokazivati povišen izražaj GLUT1, čime će se razlike u prognozi među

pojedinin bolesnicima pripisati drugim čimbenicima, odnosno korelacija između GLUT1 i prognoze se neće uočiti.

U novijim istraživanjima GLUT1 nije proučavan samo kao prognostički čimbenik, već i prediktivni čimbenik. Klinička istraživanja koja ispituju djelovanje GLUT1 inhibitora u drugim tumorima su već ranije objavljena (195–201). Klinička istraživanja koja koriste izražaj GLUT1 kao terapijske mete specifične za karcinom bubrega su također u tijeku (202,203). Iako neuspješni kao monoterapija, nova generacija lijekova usmjerenih protiv GLUT1 pokazuju obećavajuće rezultata kada se kombiniraju s konvencionalnom terapijom, uz manje neželjenih i više terapijskih učinaka (195). Kombinacije GLUT1 inhibitora i već postojećih terapija mogle bi se koristiti kao terapija spasa, kod bolesnika s prethodno dokazanim povišenim izražajem GLUT1 u tumoru imunohistokemijskim ili drugim metodama (npr. lančanom reakcijom polimeraze, PCR).

Rezultati istraživanja pokazuje kako je kod pRCC prisutan viši izražaj proteina HIF-1a nego kod ccRCC. Prethodne studije u ccRCC pokazale su da je izražaj HIF-1a često pojačan zbog mutacije ili inaktivacije VHL gena, što je uobičajena osobina ovog podtipa (184,204). Gubitak funkcije pVHL rezultira stabilizacijom i nakupljanjem HIF-1a, čak i pod normoksijom, što dovodi do povećanog izražaja proteina HIF-1a i aktivacije njegovih nizvodnih, ciljnih gena (185). Za razliku od ccRCC, pRCC i chRCC obično imaju intaktne VHL gene i niži izražaj HIF-1a u usporedbi s ccRCC (205). Naši uzorci su imali više tumorske nekroze, koja predstavlja snažan induktor hipoksije, što je objašnjava veći imunohistokemijski izražaj HIF-1a. Nadalje, pRCC može pokazivati povećani izražaj HIF-1a zbog čimbenika koji nisu posljedica VHL mutacije (206).

Nije bilo značajne korelacije između izražaja proteina HIF-1a i dobi bolesnika ili veličine tumora. Niti u drugim ispitivanjima nije pronađena značajna korelacija između izražaja HIF-1a i dobi kod ccRCC (207,208). S druge strane, neke studije su pokazale korelaciju između izražaja HIF-1a i dobi u ccRCC, što sugerira da bi izražaj HIF-1a mogao biti veći u starijih osoba s ccRCC u usporedbi s mlađim bolesnicima (209). Ovu korelaciju moguće je objasniti starenjem, odnosno postojanjem kumulativnih staničnih oštećenja i promjene u tumorskom mikrookolišu, uključujući hipoksiju, što bi moglo dovesti do povećanog izražaja HIF-1a. Na odnos HIF-1 $\alpha$  i dobi mogu utjecati različiti čimbenici, uključujući gradus tumora. Svakako, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se uspostavila jasan i dosljedna veza. Što se tiče veličine tumora, prethodne

studije su pokazale korelaciju izražaja HIF-1a i veličine tumora, osobito kod svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica (210).

Studije su pokazale kako izražaj HIF-1a ima tendenciju porasta u većim tumorima budući da HIF-1a igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog odgovora na hipoksiju (211). Kako tumor raste, prerasta i opskrbu krvlju, što dovodi do područja hipoksije unutar tumorske mase. Kao odgovor na hipoksiju, HIF-1a se stabilizira i nakuplja, što dovodi do povećanog izražaja HIF-1a kod većih tumora. Važno je napomenuti da je korelacija između HIF-1a i veličina tumora nije jednaka za sve karcinome bubrega ili karcinome drugih sjela (212,213).

Korelacija može varirati ovisno o specifičnim genetskim i molekularnim karakteristikama tumora, odnosno, u našem slučaju, prisutnosti nekroza tumora.

Naša studija nije otkrila značajnu razliku među histološkim podtipovima tumora u vezi s RT-qPCR analizom *HIF1A* mRNA. Ovo bi moglo biti pripisano veličini uzorka, s obzirom na to da su prethodni radovi opisali veću količinu *HIF1A* mRNA u ccRCC, nego u pRCC ili chRCC (214–216).

U ccRCC, *HIF1A* se opsežno proučava i igra središnju ulogu u razvoju i progresiji tumora (131,217,218). Disregulacija *HIF1A* u ccRCC doprinosi hipervaskularnosti tumora i njegovom agresivnom ponašanju. Za razliku od ccRCC, uloga *HIF1A* u pRCC je manje dobro definirana i može varirati među različitim podtipovima. Studije su pokazale da je izražaj *HIF1A* u pRCC općenito niži nego u ccRCC(219). Molekularne karakteristike pRCC, uključujući izražaj *HIF1A* i njegove nizvodne mete mogu se razlikovati ovisno o specifičnom podtipu pRCC (219,220). Izražaj *HIF1A* u chRCC je obično niži u usporedbi s ccRCC budući da je obično povezan s netaknutom funkcijom VHL gena (221,222).

Hscore metodu koristili smo za tumačenje imunohistokemijskog izražaja VEGF i GLUT1 -a u tumorskom stanicama. Hscore uzima određeni udio pozitivnih stanica s određenim intenzitetom bojenja i koristi tu točnu kontinuiranu vrijednost za izračun konačne rezultat (189). U našoj studiji, mjereni izražaj proteina VEGF-A prema Hscore-u bila značajno je viši kod žena u usporedbi s muškarcima, dok nije bilo značajnih razlika u pogledu nuklearnog gradusa ili prisutnosti nekroze. Prilikom analiziranja histoloških podtipova, pRCC je imao najviši VEGF-A Hscore, ali rezultati nisu bili bitno drugačiji. Također nije bilo značajne korelacije između izražaja proteina VEGF-A,

dobi bolesnika ili veličine tumora. Studija koju su proveli Song i sur. pokazala je kako pRCC ima veći izražaj VEGF-A (223). U našoj objavljenoj studiji pokazan je značajno veći izražaj VEGFA u ccRCC u usporedbi s pRCC i chRCC (224) Dodatno, pRCC je imao značajno niži izražaj od chRCC. Iste rezultate dobili su Situ i sur. kada su analizirali baze podataka (225).

Za razliku od ccRCC, gdje je prekomjerni izražaj VEGFA češći i dosljedno povezan s lošijom prognozom odnos između VEGF izražaja i ishoda pRCC čini se složenijim (226).

Prema studijama, viši izražaj VEGF u pRCC tumorima povezan je s nepovoljnim kliničko-patološkim značajkama, kao što je veća veličina tumora, viši stadij, zahvaćenost limfnih čvorova, što ukazuje na vjerojatnu povezanost povećanog izražaja VEGF-a s agresivnim ponašanjem tumora (223).

Naša retrospektivna studija uključivala je uzorke iz samo jedne institucije, i, iako je broj uzoraka bio ograničen, važno je napomenuti da Odjel patologije u Kliničkom bolničkom centru u Splitu referentni centar za regiju Dalmacije (Hrvatske) i dijelova susjedne Republike Bosne i Hercegovine. Također, s obzirom na nedavno ažuriranje klasifikacije raka bubrežnih stanica klasifikaciji raka, naša je studija prva provedena prema novoj klasifikaciji odvajajući ccRCC od drugih tipova, posebno eozinofilnog ccRCC koji su prethodno pogrešno klasificirani kao chRCC, dok se sada kao chRCC klasificiraju samo oni tumori, koji nakon opsežnog imunohistokemijskog profiliranja ispunjavaju kriterije za chRCC, osiguravajući isključivanje drugih onkocitnih neoplazmi niskog malignog potencijala (227).



## 7. SAŽETAK

Unutar relativno rijetkog kliničkog entiteta raka bubrega, izdvaja se više patoloških dijagnoza, među kojima po učestalosti dominiraju svjetlostanični, papilarni, i kromofobni karcinom. Nova klasifikacija raka bubrega poseban naglasak stavila na razlikovanje rijetkih podtipova raka bubrega na osnovu molekularnog profiliranja.

Molekularni mehanizam najčešćeg podtipa raka bubrega, svjetlostaničnog, počiva na disregulaciji VHL gena i njegovog ciljnog proteina pVHL, čija je uloga razradnja HIF-1 $\alpha$ . U stanju hipoksije, HIF1 $\alpha$  se stabilizira, inhibira se njegova degradacija što dovodi do njegovog nakupljanja unutar stanica i njegove aktivacije. Stabilizirani i akumulirani HIF-1 $\alpha$  dovodi do aktiviranja transkripcije VEGF gena, ključnog gena za angiogenezu te GLUT1, proteina za transport glukoze. Okoliš brzorastućeg tumora u stanju je relativne hipoksije, stoga je neoangiogeneza uvjet za podržavanje tumorskog rasta, prilagodbu tumora i metaboličku promjenu u aerobnu glikolizu.

Klinički prognostički alati ne uzimaju u obzir niti histološki tip, niti patomorfološke osobine tumora, a terapijske mogućnosti u liječenju raka bubrega donedavno su bile ograničene na peroralnu terapiju usmjerenu na tirozin -kinaze receptora za čimbenik rasta vaskularnog endotela ili na bevacuzimab, monoklonalno protutijelo usmjereno na čimbenik rasta vaskularnog endotela, obzirom da je VEGF bio jedina prepoznata terapijska meta, a specifično onkološko liječenje rezervirano samo za metastatske stadije. Nove imunoterapijske opcije temelje se na PD-1 ili PD-L1 izražaju unutar tumora ili tumorskog mikrookoliša.

U ovom istraživanju prikazan je izražaj HIF-1A gena i njegovog ciljnog proteina HIF-1 $\alpha$ , te njegovih nizvodnih meta - VEGF-a i GLUT1 u tri najčešća tipa karcinoma bubrega. Značajno veća nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  uočena je u pRCC u usporedbi s ccRCC, dok nije bilo značajne razlike u izražaju proteina VEGF-A između analiziranih histoloških podtipova RCC. GLUT1 je više izražen kod ccRCC nego kod pRCC i chRCC, ali nije bilo razlike u izražaju GLUT1 ovisno o gradusu tumora RCC-a, niti veličine tumora.

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze reverzne transkripcije za HIF1A nije pokazala statističku razliku između histoloških tipova.

Većina do sada objavljenih studija u obzir je uzimala samo svjetlostanični tip raka bubrega, u ovoj studiji obuhvaćeni su papilarni i kromofobni rak bubrega. Različiti rezultati analiziranih parametara dokazuju razlike onkogeneze među različitim tipovima raka bubrega. Prospektivna studija koja bi kombinirala i onkološke ishode u rezultatima, dodatno može pojasniti značaj analiziranih biljega u kliničkoj praksi među različitim tipovima raka bubrega.

## 8. SUMMARY



## 8. SUMMARY

TITLE: The Expression of mRNA *HIF1A* and GLUT1, HIF-1 $\alpha$  i VEGF-A proteins in renal cancers

Within the relatively rare clinical entity of kidney cancer, several pathological diagnoses can be distinguished, among which clear cell, papillary, and chromophobe carcinoma dominate in terms of frequency. The new classification of kidney cancer places special emphasis on distinguishing rare subtypes of kidney cancer based on molecular profiling.

The molecular mechanism of the most common subtype of kidney cancer, clear cell, rests on the dysregulation of the VHL gene and its target protein pVHL, whose role is the production of HIF-1 $\alpha$ . In hypoxic conditions, HIF1 $\alpha$  is stabilized, its degradation is inhibited, which leads to its accumulation inside cells and its activation. Stabilized and accumulated HIF-1 $\alpha$  leads to the activation of transcription of the VEGF gene, a key gene for angiogenesis, and GLUT1, a protein for glucose transport. The environment of a fast-growing tumor is in a state of relative hypoxia, therefore neoangiogenesis is a condition for supporting tumor growth, tumor adaptation and metabolic change to aerobic glycolysis.

Clinical prognostic tools do not take into account either the histological type or the pathomorphological features of the tumor, and therapeutic options in the treatment of kidney cancer were until recently limited to oral therapy directed at vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases or at bevacuzimab, a monoclonal antibody directed at the factor growth of the vascular endothelium, given that VEGF was the only recognized therapeutic target, and specific oncological treatment was reserved only for metastatic stages. New immunotherapy options are based on the expression of PD-1 receptor or PD-L1 expression within the tumor or tumor microenvironment.

In this study, the expression of the HIF-1A gene and its target protein HIF-1 $\alpha$ , as well as its downstream targets - VEGF and GLUT1, in the three most common types of kidney cancer was shown. A significantly higher nuclear expression of HIF-1 $\alpha$  was observed in pRCC compared to ccRCC, while there was no significant difference in VEGF-A protein expression between the analyzed histological subtypes of RCC. GLUT1 is more expressed in ccRCC than in pRCC and

chRCC, but there was no difference in GLUT1 expression depending on the grade of the RCC tumor, nor the size of the tumor.

No statistical difference in HIF1A expression between histological types using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was shown. The different results of the analyzed parameters prove the differences of oncogenesis among different subtypes of kidney cancer.

Most of the studies published so far considered only the clear cell type of kidney cancer, this study included papillary and chromophobe kidney cancer. The different results of the analyzed parameters prove the differences of oncogenesis among different types of kidney cancer. A prospective study that would combine oncological outcomes in the results can additionally clarify the significance of the analyzed markers in clinical practice among different types of kidney cancer.



## 9. ŽIVOTOPIS

## 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci:

**Ime i prezime:** Ante Strikić, doktor medicine, specijalist radioterapije i onkologije

**mail:** astrikic@gmail.com

**Datum i mjesto rođenja:** 5. travnja 1983. godine, Split, Republika Hrvatska

**Radna adresa:** Klinički bolnički centar Split

Klinika za onkologiju i radioterapiju

Spinčićeva ulica 1, 21000 Split, Republika Hrvatska

### Obrazovanje, akademski stupnjevi i radno iskustvo:

- 2015. – danas, Klinika za onkologiju i radioterapiju, KBC Split, specijalist radioterapije i onkologije
- 2015. – danas, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Katedra za kliničku onkologiju, asistent
- 2012. – danas, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Doktorski studij „Biologija novotvorina“
- 2011. – 2015. KBC Split, Klinika za onkologiju i radioterapiju, specijalizant radioterapije i onkologije
- 2010. Krka-farma d.o.o. Zagreb, stručni suradnik u marketingu
- 2008. – 2009. KBC Split, pripravnički staž
- 2001. – 2008. Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, doktor medicine

### Područja užeg interesa:

- Tumori dojke
- Tumori urogenitalnog sustava
- Limfomi i leukemije
- Tumori središnjeg živčanog sustava

### Članstva i funkcije u znanstvenim i strukovnim organizacijama:

- Hrvatsko onkološko društvo, član
- Hrvatska liječnička komora, član

- Hrvatski liječnički zbor, član

### **Radovi citirani u indeksnim publikacijama:**

1. Jelavić TB, Miše BP, **Strikic A**, Ban M, Vrdoljak E. Adjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Cervical Cancer After Treatment with Concomitant Chemoradiotherapy–Room for Improvement? *Anticancer Research*. 2015 Jul 1;35(7):4161-5.
2. Miše BP, Jelavic TB, **Strikic A**, Hrepic D, Tomic K, Hamm W, Tomic S, Prskalo T, Vrdoljak E. Long follow-up of patients with locally advanced cervical cancer treated with concomitant chemobrachyradiotherapy with cisplatin and ifosfamide followed by consolidation chemotherapy. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2015 Feb 1;25(2).
3. Ogorevc M, **Strikic A**, Zekic Tomas S. Determining the immunohistochemical expression of GLUT1 in renal cell carcinoma using the HSCORE method. *Biomedical Reports*. 2021 Oct 1;15(4):1-6.
4. Vrdoljak E, Miše BP, Jelavić TB, Tomić S, Šundov D, **Strikić A**. Optimal follow-up of ovarian cancer patients. *memo-Magazine of European Medical Oncology*. 2015 Apr;8(1):57-61.
5. Ban M, Viculin J, Tomic S, Capkun V, **Strikic A**, Mise BP, Utrobicic I, Vrdoljak E. Retrospective analysis of efficacy of trastuzumab in adjuvant treatment of HER 2 positive early breast cancer - single institution experience. *Neoplasma*. 2016;63(5):761-7. doi: 10.4149/neo\_2016\_513. PMID: 27468880.
6. Kokeza J, **Strikic A**, Ogorevc M, Kelam N, Vukoja M, Dilber I, Zekic Tomas S. The Effect of GLUT1 and HIF-1 $\alpha$  Expressions on Glucose Uptake and Patient Survival in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(13):10575. <https://doi.org/10.3390/ijms241310575>

7. **Strikić A**, Kokeza J, Ogorevc M, Kelam N, Vukoja M, Dolonga P and Tomas SZ (2023) Differential expression of HIF1A and its downstream target VEGFA in the main subtypes of renal cell carcinoma and their impact on patient survival. *Front. Oncol.* 13:1287239. doi: 10.3389/fonc.2023.1287239

#### **Ostali radovi:**

1. Ban M, **Strikić A**, Petrić Miše B, Vrdoljak E. Role of CDK4/6 inhibitors in metastatic hormon positive HER2 negative breast cancer treatment. *Liječnički vjesnik.* 2019 Apr 15;141(1-2):33-9.
2. Vrdoljak E, Bošković L, Petrić Miše B, Boraska Jelavić T, Viculin J, **Strikić A**, Ban M. Novosti u onkološkom liječenju. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik.* 2012 Jul 15;18(100).
3. Ban M, Dražić I, Buljubašić M, Bajić Ž, Petrić Miše B, **Strikić A**, Božić M, Ledina D, Vrdoljak E. Differences in the overall survival (OS) of primary and secondary metastatic breast cancer (MBC) patients: A retrospective study // 14th CEOC Opatija, Hrvatska, 2018. str. 50-52 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo)
4. Ban M, Bajić Ž, Buljubašić M, Dražić I, Petrić Miše B, **Strikić A**, Božić M, Ledina D, Vrdoljak E. Correlation of the progression free survival after 1st treatment line (PFS1) with overall survival (OS) changes in metastatic breast cancer (MBC): Retrospective cohort study // 14th CEOC Opatija, Hrvatska, 2018. str. 53-57 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo)
5. Saratlija Novaković Ž; Boban T; Boraska Jelavić T; Omrčen T; Šitum M; Ledina D; **Strikić A**; Rakuljić Z; Vilović K; Librenjak D; Vrdoljak E. Results of treatment of muscle-invasive bladder cancer in University Hospital of Split: 2014-2021 // *Libri Oncologici - Vol.49 No. Supplement 1* Zagreb: Klinika za tumore, 2021. str. 125-125 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
6. Omrčen T, Ledina D, Boraska Jelavić T, Boban M, Petrić Miše B, Mikuš S, Bošković L, Ban M, Prskalo T, Božić M, Viculin J, **Strikić A**, Vrdoljak E. Combination of adjuvant radiotherapy and androgen deprivation therapy after radical prostatectomy on high risk

prostate cancer patients - retrospective analysis in single institution. 10th CEOC Opatija, Hrvatska, 2014. str. 14-14 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo)

### **Suradnja u pisanju medicinskih udžbenika:**

1. Vrdoljak, Eduard; Šamija, Mirko; Kusić, Zvonko; Petković, Marija; Gugić, Damir; Krajina, Zdenko; Ban, Marija; Beketić Orešković, Lidiya; Boban, Marijo; Boraska Jelavić, Tihana et al. Klinička onkologija / Vrdoljak, Eduard ; Šamija, Mirko ; Kusić, Zvonko ; Petković, Marija ; Gugić, Damir ; Krajina, Zdenko (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2013.
2. Vrdoljak, Eduard; Belac Lovasić, Ingrid; Kusić, Zvonko; Gugić, Damir; Juretić, Antonio; Ban, Marija; Bezić, Joško; Boban, Marijo; Boraska Jelavić, Tihana; Bošković, Lidiya et al. Klinička onkologija, 3. obnovljeno i dopunjeno izdanje / Vrdoljak, Eduard ; Belac Lovasić, Ingrid ; Kusić, Zvonko ; Gugić, Damir ; Juretić, Antonio (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2018

### **Kongresni sažeci i sudjelovanja na kongresima kao pozvani predavač:**

1. **Ante Strikić:** Adjuvantno i neoadjuvantno liječenje raka mjehura / Adjuvant and neoadjuvant treatment of bladder cancer, Hrvatski onkološki kongres 2020 / Croatian oncology conference 2020.
2. **Ante Strikić:** Nadolazeće mogućnosti sustavnog liječenja proširenog raka mokraćnog mjehura / Upcoming possibilities of systemic treatment of locally advanced urothelial cancer, Hrvatski onkološki kongres 2021. / Croatian oncology conference 2021.
3. **Ante Strikić:** Jesmo li napredovali u liječenju metastatskog urotelnog karcinoma? / Have we made any progress in treating metastatic urothelial cancer? Hrvatski onkološki kongres 2022. / Croatian oncology conference 2022.
4. **Ante Strikić:** Novosti u liječenju glioma / Glioma treatment novelties, Hrvatski onkološki kongres 2023. / Croatian oncology conference 2023.
5. **Ante Strikić:** MONARCH-3. Final overall survival results of abemaciclib plus AI as first line therapy for HR+ HER2- advanced breast cancer, Best of San Antonio Breast Cancer Symposium Croatia, February 2024.





## 10. POPIS LITERATURE

1. Drake R, Vogl A, Mitchel A. Gray's Anatomy for students third edition. Elsevier [Internet]. 2015 [cited 2024 Apr 15];705–834. Available from: <https://search.worldcat.org/title/881508489>
2. Moore K, Dalley A, Agur A. Clinically oriented anatomy. 7. izdanje. 2014. 290–297 p.
3. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. 2007. 353–359 p.
4. Osborn JW, Tyshynsky R, Vulchanova L. Function of Renal Nerves in Kidney Physiology and Pathophysiology. *Annu Rev Physiol*. 2021 Feb 10;83:429–50.
5. de Bakker BS, van den Hoff MJB, Vize PD, Oostra RJ. The Pronephros; a Fresh Perspective. *Integr Comp Biol*. 2019 Jul 1;59(1):29–47.
6. Seely JC. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. *J Toxicol Pathol* [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 4];30:125–33. Available from: <https://creativecommons.org/>
7. Grote D, Souabni A, Busslinger M, Bouchard M. Pax2/8-regulated Gata3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. *Development*. 2006 Jan;133(1):53–61.
8. Hanner F, Lam L, X Nguyen MT, Yu A, Peti-Peterdi J, Dahl G. Intrarenal localization of the plasma membrane ATP channel pannexin1. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2012 [cited 2024 Apr 4];303:1454–9. Available from: <http://www.ajprenal.org/F1454>
9. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* [Internet]. 1994;372(6507):679–83. Available from: <https://doi.org/10.1038/372679a0>
10. Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development*. 1998 Nov;125(21):4225–34.
11. Sadler TW, Langman J. Langman's medical embryology. 12th edition. 2012. 232–240 p.
12. Gartner L, Hiatt J. Color Atlas and Tekst of Histology. Sixth Ed. 2014 Gartner LP and Hiatt JL [Internet]. Wolters-Kluwers - Lippincot Williams & Wilkins; 2014 [cited 2024 Apr 18]. 512 p. Available from: [https://books.google.com/books/about/Color\\_Atlas\\_and\\_Text\\_of\\_Histology.html?hl=hr&id=5v2MX\\_g37u4C](https://books.google.com/books/about/Color_Atlas_and_Text_of_Histology.html?hl=hr&id=5v2MX_g37u4C)
13. Mescher AL. The Urinary System. In: Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 15e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018. Available from: [accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1160663250](https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1160663250)

14. Cuzzo B, Padala SA, Lappin SL. Physiology, Vasopressin. 2024.
15. Dalal R, Bruss ZS, Sehdev JS. Physiology, Renal Blood Flow and Filtration. 2024.
16. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018;103:356–87. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804918309559>
17. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2019 Jan;75(1):74–84.
18. Šekerija M, Bubanović L, Lončar J, Čukelj P, Veltruski J, Mikolaj L, et al. Osoblje Registra za rak Hrvatske i suradnici u izradi biltena: Croatian National Cancer Registry staff and technical associates. [cited 2024 Apr 17]; Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/odjel-za-maligne-bolesti/>
19. Tahbaz R, Schmid M, Merseburger AS. Prevention of kidney cancer incidence and recurrence. *Curr Opin Urol*. 2018 Jan;28(1):62–79.
20. Huang J, Leung DKW, Chan EOT, Lok V, Leung S, Wong I, et al. A Global Trend Analysis of Kidney Cancer Incidence and Mortality and Their Associations with Smoking, Alcohol Consumption, and Metabolic Syndrome. *Eur Urol Focus*. 2022 Jan;8(1):200–9.
21. Al-Bayati O, Hasan A, Pruthi D, Kaushik D, Liss MA. Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2019 Jun;37(6):359–71.
22. Usher-Smith J, Simmons RK, Rossi SH, Stewart GD. Current evidence on screening for renal cancer. *Nat Rev Urol*. 2020 Nov;17(11):637–42.
23. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2002 Jul;7(4):135–40.
24. Magera JS, Leibovich BC, Lohse CM, Sengupta S, Cheville JC, Kwon ED, et al. Association of Abnormal Preoperative Laboratory Values with Survival After Radical Nephrectomy for Clinically Confined Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Urology*. 2008 Feb;71(2):278–82.
25. Rosenkrantz AB, Hindman N, Fitzgerald EF, Niver BE, Melamed J, Babb JS. MRI Features of Renal Oncocytoma and Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *American Journal of Roentgenology*. 2010 Dec;195(6):W421–7.
26. Israel GM, Bosniak MA. How I Do It: Evaluating Renal Masses. *Radiology*. 2005 Aug;236(2):441–50.
27. Vogel C, Ziegel Müller B, Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Canfield S, et al. Imaging in Suspected Renal-Cell Carcinoma: Systematic Review. *Clin Genitourin Cancer*. 2019 Apr;17(2):e345–55.

28. Park JW, Jo MK, Lee HM. Significance of <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography for the postoperative surveillance of advanced renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2009 Mar 16;103(5):615–9.
29. Muselaers S, Erdem S, Bertolo R, Ingels A, Kara Ö, Pavan N, et al. PSMA PET/CT in Renal Cell Carcinoma: An Overview of Current Literature. *J Clin Med*. 2022 Mar 25;11(7).
30. Lui ST, Shuch B. Genetic Testing in Kidney Cancer Patients: Who, When, and How? *Eur Urol Focus*. 2019 Nov;5(6):973–6.
31. Bratslavsky G, Mendhiratta N, Daneshvar M, Brugarolas J, Ball MW, Metwalli A, et al. Genetic risk assessment for hereditary renal cell carcinoma: Clinical consensus statement. *Cancer*. 2021 Nov 1;127(21):3957–66.
32. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. 2015 Jun;48(3):166–74.
33. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, et al. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell*. 2017 May;169(4):736–749.e18.
34. Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rödl H, Eichinger M, et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1942–8.
35. Al-Saleem T, Wessner LL, Scheithauer BW, Patterson K, Roach ES, Dreyer SJ, et al. Malignant tumors of the kidney, brain, and soft tissues in children and young adults with the tuberous sclerosis complex. *Cancer*. 1998 Nov 15;83(10):2208–16.
36. Saleeb R. Pathology Outlines - Papillary adenoma [Internet]. [cited 2024 Apr 4]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumorrenalcortadenoma.html>
37. Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Samaratunga H. Grading of renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2019 Jan;74(1):4–17.
38. Meyer PN, Cao Y, Jacobson K, Krausz T, Flanigan RC, Picken MM. Chromosome 1 analysis in chromophobe renal cell carcinomas with tissue microarray (TMA)-facilitated fluorescence in situ hybridization (FISH) demonstrates loss of 1p/1 which is also present in renal oncocytomas. *Diagn Mol Pathol*. 2008 Sep;17(3):141–4.
39. Li X, Nie P, Zhang J, Hou F, Ma Q, Cui J. Differential diagnosis of renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma using CT features: a central scar-matched retrospective study. *Acta Radiol*. 2022 Feb;63(2):253–60.
40. Beckermann KE, Sharma D, Chaturvedi S, Msaouel P, Abboud MR, Allory Y, et al. Renal Medullary Carcinoma: Establishing Standards in Practice. *J Oncol Pract*. 2017 Jul;13(7):414–21.
41. Holland P, Merrimen J, Pringle C, Wood LA. Renal Medullary Carcinoma and Its Association with Sick Cell Trait: A Case Report and Literature Review. *Current Oncology*. 2020 Feb 1;27(1):53–6.

42. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982 Oct;6(7):655–63.
43. Moch H. [The WHO/ISUP grading system for renal carcinoma]. *Pathologe.* 2016 Jul;37(4):355–60.
44. Nazlı Sena S, Ozan B, Güven A, Elif Gokce D, Emine Burçin T. A New Grading for Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Combined WHO/ISUP Grading System. *International Journal of Pathology and Clinical Research.* 2020 Oct 22;6(2).
45. Zhang X, Bolck HA, Rupp NJ, Moch H. Genomic alterations and diagnosis of renal cancer. *Virchows Archiv.* 2024 Feb 24;484(2):323–37.
46. King DF, King LA. A brief historical note on staining by hematoxylin and eosin. *Am J Dermatopathol.* 1986 Apr;8(2):168.
47. Rekha PR, Rajendiran S, Rao S, Shroff S, Joseph LD, Prathiba D. Histological reclassification, histochemical characterization and c-kit immunoexpression in renal cell carcinoma. *Indian J Urol.* 2008 Jul;24(3):343–7.
48. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016 Jul;70(1):93–105.
49. Piazza P, Bianchi L, Fiorentino M, Gaudiano C, Giunchi F, Brunocilla E, et al. The new classification of renal cell carcinoma: what is the clinical issue? *Minerva urology and nephrology.* 2023 Jun;75(3):269–71.
50. Gaudiano C, Mottola M, Bianchi L, Corcioni B, Cattabriga A, Coccozza MA, et al. Beyond Multiparametric MRI and towards Radiomics to Detect Prostate Cancer: A Machine Learning Model to Predict Clinically Significant Lesions. *Cancers (Basel).* 2022 Dec 1;14(24).
51. Cheng D, Abudikeranmu Y, Tuerdi B. Differentiation of Clear Cell and Non-clear-cell Renal Cell Carcinoma through CT-based Radiomics Models and Nomogram. *Curr Med Imaging.* 2023;19(9):1005–17.
52. Posada Calderon L, Eismann L, Reese SW, Reznik E, Hakimi AA. Advances in Imaging-Based Biomarkers in Renal Cell Carcinoma: A Critical Analysis of the Current Literature. *Cancers (Basel).* 2023 Jan 5;15(2).
53. AJCC. AJCC Cancer Staging manual 8th edition - Breast Cancer Chapter. American Joint Committee on Cancer. 2017;489–539.
54. Williamson SR, Gill AJ, Argani P, Chen YB, Egevad L, Kristiansen G, et al. Report From the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers. *American Journal of Surgical Pathology.* 2020 Jul;44(7):e47–65.
55. Tran J, Ornstein MC. Clinical Review on the Management of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *JCO Oncol Pract.* 2022 Mar;18(3):187–96.

56. Bedke J, Gauler T, Grünwald V, Hegele A, Herrmann E, Hinz S, et al. Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2017 Feb 9;35(2):179–88.
57. Zerdes I, Tolia M, Tsoukalas N, Mitsis M, Kardamakis D, Pistevou-Gombaki K, et al. Systemic therapy of metastatic renal cell carcinoma: Review of the current literature. *Urologia Journal.* 2019 Feb 1;86(1):3–8.
58. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine.* 2019 Mar 21;380(12):1116–27.
59. Hahn AW, Klaassen Z, Agarwal N, Haaland B, Esther J, Ye XY, et al. First-line Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Eur Urol Oncol.* 2019 Nov;2(6):708–15.
60. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine.* 2018 Apr 5;378(14):1277–90.
61. Sooriakumaran P, Dick JA, Thompson AC, Morley R. The Central Urology Multidisciplinary Team – Is it Time to Change the Referral Criteria? An Audit of Practice in a District General Hospital in London. *The Annals of The Royal College of Surgeons of Engl and.* 2009 Nov;91(8):700–2.
62. Croke JM, El-Sayed S. Multidisciplinary Management of Cancer Patients: Chasing a Shadow or Real Value? An Overview of the Literature. *Current Oncology.* 2012 Aug 1;19(4):232–8.
63. Kočo L, Weekenstroo HHA, Lambregts DMJ, Sedelaar JPM, Prokop M, Fütterer JJ, et al. The Effects of Multidisciplinary Team Meetings on Clinical Practice for Colorectal, Lung, Prostate and Breast Cancer: A Systematic Review. *Cancers (Basel).* 2021 Aug 18;13(16):4159.
64. Betschart P, Babst C, Schmid S, Rothermundt C, Abt D, Schwab C, et al. Shared Decision-Making for Patients with Advanced Urological Malignancies: Evaluation of a Joint Urological-Oncological Clinic Model. *Oncol Res Treat.* 2019;42(7–8):366–74.
65. Rao K, Manya K, Azad A, Lawrentschuk N, Bolton D, Davis ID, et al. Uro-oncology multidisciplinary meetings at an Australian tertiary referral centre – impact on clinical decision-making and implications for patient inclusion. *BJU Int.* 2014 Nov 29;114(S1):50–4.
66. Pillay B, Wootten AC, Crowe H, Corcoran N, Tran B, Bowden P, et al. The impact of multidisciplinary team meetings on patient assessment, management and outcomes in oncology settings: A systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2016 Jan;42:56–72.
67. Zeng Y, Zhu S, Wang Z, Chen J, Dai J, Liu Z, et al. Multidisciplinary Team (MDT) Discussion Improves Overall Survival Outcomes for Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients. *J Multidiscip Healthc.* 2023;16:503–13.

68. Gill IS, Aron M, Gervais DA, Jewett MAS. Clinical practice. Small renal mass. *N Engl J Med*. 2010 Feb 18;362(7):624–34.
69. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2477–90.
70. Volpe A, Panzarella T, Rendon RA, Haider MA, Kondylis FI, Jewett MAS. The natural history of incidentally detected small renal masses. *Cancer*. 2004 Feb 15;100(4):738–45.
71. Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat Rev*. 2008 May;34(3):193–205.
72. Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol*. 2005 Jun;173(6):1853–62.
73. Escudier B. Emerging immunotherapies for renal cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2012 Sep;23 Suppl 8:viii35-40.
74. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol*. 1969 Mar;101(3):297–301.
75. Berger A, Brandina R, Atalla MA, Herati AS, Kamoi K, Aron M, et al. Laparoscopic radical nephrectomy for renal cell carcinoma: oncological outcomes at 10 years or more. *J Urol*. 2009 Nov;182(5):2172–6.
76. Dash A, Vickers AJ, Schachter LR, Bach AM, Snyder ME, Russo P. Comparison of outcomes in elective partial vs radical nephrectomy for clear cell renal cell carcinoma of 4-7 cm. *BJU Int*. 2006 May;97(5):939–45.
77. Lee HJ, Liss MA, Derweesh IH. Outcomes of partial nephrectomy for clinical T1b and T2 renal tumors. *Curr Opin Urol*. 2014 Sep;24(5):448–52.
78. Huang WC, Levey AS, Serio AM, Snyder M, Vickers AJ, Raj G V, et al. Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2006 Sep;7(9):735–40.
79. Thompson RH, Boorjian SA, Lohse CM, Leibovich BC, Kwon ED, Cheville JC, et al. Radical nephrectomy for pT1a renal masses may be associated with decreased overall survival compared with partial nephrectomy. *J Urol*. 2008 Feb;179(2):468–71; discussion 472-3.
80. Kim SP, Thompson RH, Boorjian SA, Weight CJ, Han LC, Murad MH, et al. Comparative effectiveness for survival and renal function of partial and radical nephrectomy for localized renal tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Urol*. 2012 Jul;188(1):51–7.
81. Chen DYT, Uzzo RG. Optimal management of localized renal cell carcinoma: surgery, ablation, or active surveillance. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009 Jun;7(6):635–42; quiz 643.
82. Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, Alva A, Bagshaw H, Baine M, et al. NCCN Guidelines® Insights: Kidney Cancer, Version 2.2024. *J Natl Compr Canc Netw*. 2024 Feb;22(1):4–16.

83. Sagalowsky AI, Kadesky KT, Ewalt DM, Kennedy TJ. Factors influencing adrenal metastasis in renal cell carcinoma. *J Urol*. 1994 May;151(5):1181–4.
84. Tsui KH, Shvarts O, Barbaric Z, Figlin R, de Kernion JB, Beldegrun A. Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511 radical nephrectomies. *J Urol*. 2000 Feb;163(2):437–41.
85. Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI. Adrenal metastases from renal cell carcinoma: role of ipsilateral adrenalectomy and definition of stage. *Urology*. 1997 Jan;49(1):28–31.
86. Blom JHM, van Poppel H, Maréchal JM, Jacqmin D, Schröder FH, de Prijck L, et al. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881. *Eur Urol*. 2009 Jan;55(1):28–34.
87. Shi X, Feng D, Li D, Zhang F, Wei W. The Role of Lymph Node Dissection for Non-Metastatic Renal Cell Carcinoma: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2022 Jan 12;11.
88. Giuliani L, Giberti C, Martorana G, Rovida S. Radical extensive surgery for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors. *J Urol*. 1990 Mar;143(3):468–73; discussion 473-4.
89. Saitoh H, Nakayama M, Nakamura K, Satoh T. Distant metastasis of renal adenocarcinoma in nephrectomized cases. *J Urol*. 1982 Jun;127(6):1092–5.
90. Lawindy SM, Kurian T, Kim T, Mangar D, Armstrong PA, Alsina AE, et al. Important surgical considerations in the management of renal cell carcinoma (RCC) with inferior vena cava (IVC) tumour thrombus. *BJU Int*. 2012 Oct;110(7):926–39.
91. Kwon TW, Kim H, Moon KM, Cho YP, Song C, Kim CS, et al. Surgical treatment of inferior vena cava tumor thrombus in patients with renal cell carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2010 Jan;25(1):104–9.
92. Blute ML, Leibovich BC, Lohse CM, Cheville JC, Zincke H. The Mayo Clinic experience with surgical management, complications and outcome for patients with renal cell carcinoma and venous tumour thrombus. *BJU Int*. 2004 Jul;94(1):33–41.
93. Gettman MT, Boelter CW, Cheville JC, Zincke H, Bryant SC, Blute ML. Charlson co-morbidity index as a predictor of outcome after surgery for renal cell carcinoma with renal vein, vena cava or right atrium extension. *J Urol*. 2003 Apr;169(4):1282–6.
94. Haferkamp A, Bastian PJ, Jakobi H, Pritsch M, Pfitzenmaier J, Albers P, et al. Renal cell carcinoma with tumor thrombus extension into the vena cava: prospective long-term followup. *J Urol*. 2007 May;177(5):1703–8.
95. Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, George DJ, Pantuck AJ, Patel A, et al. Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *N Engl J Med*. 2016 Dec 8;375(23):2246–54.



96. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang YH, et al. Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021 Aug 19;385(8):683–94.
97. UCLA Integrated Staging System (UISS) for Renal Cell Carcinoma (RCC) [Internet]. [cited 2024 Apr 17]. Available from: <https://www.mdcalc.com/calc/3009/ucla-integrated-staging-system-uiss-renal-cell-carcinoma-rcc>
98. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, et al. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer*. 2003 Apr 1;97(7):1663–71.
99. Haas NB, Manola J, Uzzo RG, Flaherty KT, Wood CG, Kane C, et al. Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2016 May 14;387(10032):2008–16.
100. Motzer RJ, Haas NB, Donskov F, Gross-Goupil M, Varlamov S, Kopyltsov E, et al. Randomized Phase III Trial of Adjuvant Pazopanib Versus Placebo After Nephrectomy in Patients With Localized or Locally Advanced Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2017 Dec 10;35(35):3916–23.
101. Gross-Goupil M, Kwon TG, Eto M, Ye D, Miyake H, Seo SI, et al. Axitinib versus placebo as an adjuvant treatment of renal cell carcinoma: results from the phase III, randomized ATLAS trial. *Ann Oncol*. 2018 Dec 1;29(12):2371–8.
102. Motzer RJ, Ravaud A, Patard JJ, Pandha HS, George DJ, Patel A, et al. Adjuvant Sunitinib for High-risk Renal Cell Carcinoma After Nephrectomy: Subgroup Analyses and Updated Overall Survival Results. *Eur Urol*. 2018 Jan;73(1):62–8.
103. Riaz I Bin, Siddiqi R, Islam M, He H, Riaz A, Asghar N, et al. Adjuvant Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Carcinoma: A Concluded Living Systematic Review and Meta-Analysis. *JCO Clin Cancer Inform*. 2021 May;5:588–99.
104. Laukhtina E, Quhal F, Mori K, Motlagh RS, Pradere B, Schuettfort VM, et al. Adjuvant therapy with tyrosine kinase inhibitors for localized and locally advanced renal cell carcinoma: an updated systematic review and meta-analysis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 17];39:764–73. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
105. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999 Aug;17(8):2530–40.
106. Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5794–9.

107. Culp SH, Tannir NM, Abel EJ, Margulis V, Tamboli P, Matin SF, et al. Can we better select patients with metastatic renal cell carcinoma for cytoreductive nephrectomy? *Cancer*. 2010 Jul 15;116(14):3378–88.
108. Choueiri TK, Xie W, Kollmannsberger C, North S, Knox JJ, Lampard JG, et al. The impact of cytoreductive nephrectomy on survival of patients with metastatic renal cell carcinoma receiving vascular endothelial growth factor targeted therapy. *J Urol*. 2011 Jan;185(1):60–6.
109. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval JB, Bensalah K, et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Aug 2;379(5):417–27.
110. Motzer RJ, Russo P. Cytoreductive Nephrectomy - Patient Selection Is Key. *N Engl J Med*. 2018 Aug 2;379(5):481–2.
111. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Chevreau C, Bensalah K, Geoffrois L, et al. Sunitinib Alone or After Nephrectomy for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Is There Still a Role for Cytoreductive Nephrectomy? *Eur Urol*. 2021 Oct;80(4):417–24.
112. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 Jan 11;356(2):115–24.
113. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):1061–8.
114. Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczylik C, Hutson TE, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011 Dec 3;378(9807):1931–9.
115. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Mainwaring PN, Rini BI, Donskov F, et al. Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1814–23.
116. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019 Mar 21;380(12):1116–27.
117. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019 Mar 21;380(12):1103–15.
118. Powles T, Plimack ER, Soulières D, Waddell T, Stus V, Gafanov R, et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Dec;21(12):1563–73.

119. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Bourlon MT, Zurawski B, et al. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021 Mar 4;384(9):829–41.
120. Motzer R, Alekseev B, Rha SY, Porta C, Eto M, Powles T, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021 Apr 8;384(14):1289–300.
121. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Apr 5;378(14):1277–90.
122. Choueiri TK, Halabi S, Sanford BL, Hahn O, Michaelson MD, Walsh MK, et al. Cabozantinib Versus Sunitinib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma of Poor or Intermediate Risk: The Alliance A031203 CABOSUN Trial. *J Clin Oncol*. 2017 Feb 20;35(6):591–7.
123. Choueiri TK, Larkin J, Pal S, Motzer RJ, Rini BI, Venugopal B, et al. Efficacy and correlative analyses of avelumab plus axitinib versus sunitinib in sarcomatoid renal cell carcinoma: post hoc analysis of a randomized clinical trial. *ESMO Open*. 2021 Jun;6(3):100101.
124. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2013 Aug 22;369(8):722–31.
125. Motzer RJ, Hutson TE, McCann L, Deen K, Choueiri TK. Overall survival in renal-cell carcinoma with pazopanib versus sunitinib. *N Engl J Med*. 2014 May 1;370(18):1769–70.
126. Hofer T, Desbaillets I, Höpfl G, Gassmann M, Wenger RH. Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 $\alpha$  activation cascade: implications for HIF-1 $\alpha$  gene therapy. *FASEB J* [Internet]. 2001 Dec 15 [cited 2024 Apr 17];15(14):1–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11606485/>
127. Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* [Internet]. 1997 [cited 2024 Apr 17];51(2):553–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9027737/>
128. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Apr;13(2):167–71.
129. Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. HIF-1-Independent Mechanisms Regulating Metabolic Adaptation in Hypoxic Cancer Cells. *Cells*. 2021 Sep 9;10(9).
130. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999 May 20;399(6733):271–5.
131. Schödel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, et al. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur Urol*. 2016 Apr;69(4):646–57.

132. Provenzano M, Mocellin S. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol.* 2007;593:66–73.
133. Qiu H, Durand K, Rabinovitch-Chable H, Rigaud M, Gazaille V, Clavère P, et al. Gene expression of HIF-1alpha and XRCC4 measured in human samples by real-time RT-PCR using the sigmoidal curve-fitting method. *Biotechniques.* 2007 Mar;42(3):355–62.
134. Zuo Y, Qu C, Tian Y, Wen Y, Xia S, Ma M. The HIF-1/SNHG1/miR-199a-3p/TFAM axis explains tumor angiogenesis and metastasis under hypoxic conditions in breast cancer. *Biofactors.* 2021 May;47(3):444–60.
135. Tayebi N, Leon-Ricardo B, McCall K, Mehinovic E, Engelstad K, Huynh V, et al. Quantitative determination of SLC2A1 variant functional effects in GLUT1 deficiency syndrome. *Ann Clin Transl Neurol.* 2023 May;10(5):787–801.
136. Atlı E, Gürkan H, Güldiken B, Eker D, Yağcıntepe S, Demir S, et al. Investigation of the Genetic Etiology in Idiopathic Generalized Epileptic Disorders by Targeted Next-generation Sequencing Technique. *Balkan Med J.* 2023 Jan 23;40(1):13–20.
137. Ivanova N, Peycheva V, Kamenarova K, Kancheva D, Tsekova I, Aleksandrova I, et al. Three novel SLC2A1 mutations in Bulgarian patients with different forms of genetic generalized epilepsy reflecting the clinical and genetic diversity of GLUT1-deficiency syndrome. *Seizure.* 2018 Jan;54:41–4.
138. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2–3):121–38.
139. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005 Mar;202(3):654–62.
140. Behrooz A, Ismail-Beigi F. Stimulation of Glucose Transport by Hypoxia: Signals and Mechanisms. *News Physiol Sci.* 1999 Jun;14:105–10.
141. Ismail-Beigi F. Metabolic regulation of glucose transport. *J Membr Biol.* 1993 Jul;135(1):1–10.
142. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem.* 1995 Dec 8;270(49):29083–9.
143. Nishioka T, Oda Y, Seino Y, Yamamoto T, Inagaki N, Yano H, et al. Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res.* 1992 Jul 15;52(14):3972–9.
144. Nagase Y, Takata K, Moriyama N, Aso Y, Murakami T, Hirano H. Immunohistochemical localization of glucose transporters in human renal cell carcinoma. *J Urol.* 1995 Mar;153(3 Pt 1):798–801.
145. Ogawa J, Inoue H, Koide S. Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer.* 1997 Apr 22;74(2):189–92.

146. Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, et al. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer*. 1998 Jul 1;83(1):34–40.
147. Kang SS, Chun YK, Hur MH, Lee HK, Kim YJ, Hong SR, et al. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res*. 2002 Oct;93(10):1123–8.
148. Hatanaka M. Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1974 Apr 29;355(1):77–104.
149. Ito S, Fukusato T, Nemoto T, Sekihara H, Seyama Y, Kubota S. Coexpression of glucose transporter 1 and matrix metalloproteinase-2 in human cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jul 17;94(14):1080–91.
150. Beaney RP. Positron emission tomography in the study of human tumors. *Semin Nucl Med*. 1984 Oct;14(4):324–41.
151. Miyakita H, Tokunaga M, Onda H, Usui Y, Kinoshita H, Kawamura N, et al. Significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for detection of renal cell carcinoma and immunohistochemical glucose transporter 1 (GLUT-1) expression in the cancer. *Int J Urol*. 2002 Jan;9(1):15–8.
152. Kokeza J, Strikic A, Ogorevc M, Kelam N, Vukoja M, Dilber I, et al. The Effect of GLUT1 and HIF-1 $\alpha$  Expressions on Glucose Uptake and Patient Survival in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 24;24(13).
153. Avril N, Menzel M, Dose J, Schelling M, Weber W, Jänicke F, et al. Glucose metabolism of breast cancer assessed by 18F-FDG PET: histologic and immunohistochemical tissue analysis. *J Nucl Med*. 2001 Jan;42(1):9–16.
154. Özgür B, Helms HCC, Tornabene E, Brodin B. Hypoxia increases expression of selected blood-brain barrier transporters GLUT-1, P-gp, SLC7A5 and TFRC, while maintaining barrier integrity, in brain capillary endothelial monolayers. *Fluids Barriers CNS*. 2022 Jan 4;19(1):1.
155. Tang M, Park SH, De Vivo DC, Monani UR. Therapeutic strategies for glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Sep;6(9):1923–32.
156. Ebeling P, Koistinen HA, Koivisto VA. Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS Lett*. 1998 Oct 9;436(3):301–3.
157. Maffioletti E, Gennarelli M, Magri C, Bocchio-Chiavetto L, Bortolomasi M, Bonvicini C, et al. Genetic determinants of circulating VEGF levels in major depressive disorder and electroconvulsive therapy response. *Drug Dev Res*. 2020 Aug;81(5):593–9.
158. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):581–611.
159. Choueiri TK, Kaelin WG. Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nat Med*. 2020 Oct;26(10):1519–30.

160. Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med.* 2013 Feb;273(2):114–27.
161. Ruan GX, Kazlauskas A. VEGF-A engages at least three tyrosine kinases to activate PI3K/Akt. *Cell Cycle.* 2012 Jun 1;11(11):2047–8.
162. Bosma EK, Darwesh S, Habani YI, Cammeraat M, Serrano Martinez P, van Breest Smalenburg ME, et al. Differential roles of eNOS in late effects of VEGF-A on hyperpermeability in different types of endothelial cells. *Sci Rep.* 2023 Dec 5;13(1):21436.
163. Sjöberg E, Melssen M, Richards M, Ding Y, Chanoca C, Chen D, et al. Endothelial VEGFR2-PLC $\gamma$  signaling regulates vascular permeability and antitumor immunity through eNOS/Src. *J Clin Invest.* 2023 Oct 16;133(20).
164. El Baba N, Farran M, Khalil EA, Jaafar L, Fakhoury I, El-Sibai M. The Role of Rho GTPases in VEGF Signaling in Cancer Cells. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2020;2020:2097214.
165. Bhattarai D, Xu X, Lee K. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) inhibitors from the last decade (2007 to 2016): A “structure-activity relationship” perspective. *Med Res Rev.* 2018 Jul;38(4):1404–42.
166. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012 Apr;33(4):207–14.
167. Soung NK, Kim HM, Asami Y, Kim DH, Cho Y, Naik R, et al. Mechanism of the natural product moracin-O derived MO-460 and its targeting protein hnRNPA2B1 on HIF-1 $\alpha$  inhibition. *Exp Mol Med.* 2019 Feb 12;51(2):1–14.
168. Bui BP, Nguyen PL, Lee K, Cho J. Hypoxia-Inducible Factor-1: A Novel Therapeutic Target for the Management of Cancer, Drug Resistance, and Cancer-Related Pain. *Cancers (Basel).* 2022 Dec 8;14(24).
169. FDA approves belzutifan for advanced renal cell carcinoma | FDA [Internet]. [cited 2024 Apr 17]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-belzutifan-advanced-renal-cell-carcinoma>
170. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *BMJ.* 2014 Nov 10;349:g4797.
171. Shen C, Kaelin WG. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2013 Feb;23(1):18–25.
172. Koul H, Huh JS, Rove KO, Crompton L, Koul S, Meacham RB, et al. Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. *Am J Cancer Res.* 2011;1(2):240–54.
173. Baldewijns MM, van Vlodrop IJH, Vermeulen PB, Soetekouw PMMB, van Engeland M, de Bruïne AP. VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol.* 2010 Jun;221(2):125–38.
174. Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jan;15(1):55–64.

175. Haase VH. The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int.* 2006 Apr;69(8):1302–7.
176. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol.* 2005 Sep;23(9):1147–57.
177. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev.* 2020 Jun;86:102017.
178. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther.* 2006 Nov;28(11):1779–802.
179. Petrou P. A systematic review of economic evaluations of tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors, mammalian target of rapamycin inhibitors and programmed death-1 inhibitors in metastatic renal cell cancer. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2018 Jun;18(3):255–65.
180. Iacovelli R, Albiges L, Escudier B. Emerging tyrosine kinase inhibitors for the treatment of renal cancer. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2015 Sep;20(3):379–92.
181. Heng DYC, Kollmannsberger C. Sunitinib. *Recent Results Cancer Res.* 2010;184:71–82.
182. Hoeh B, Flammia RS, Hohenhorst L, Sorce G, Panunzio A, Tappero S, et al. IO-IO vs IO-TKI efficacy in metastatic kidney cancer patients: A structured systematic review over time. *Semin Oncol.* 2022 Oct;49(5):394–9.
183. Ogorevc M, Strikic A, Tomas SZ. Determining the immunohistochemical expression of GLUT1 in renal cell carcinoma using the HSCORE method. *Biomed Rep.* 2021 Oct;15(4):79.
184. Haase VH. The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF. *Curr Pharm Des.* 2009;15(33):3895–903.
185. Mack FA, Rathmell WK, Arsham AM, Gnarra J, Keith B, Simon MC. Loss of pVHL is sufficient to cause HIF dysregulation in primary cells but does not promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2003 Jan;3(1):75–88.
186. Ozcan A, Shen SS, Zhai QJ, Truong LD. Expression of GLUT1 in primary renal tumors: morphologic and biologic implications. *Am J Clin Pathol.* 2007 Aug;128(2):245–54.
187. Ambrosetti D, Dufies M, Dadone B, Durand M, Borchiellini D, Amiel J, et al. The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma. *PLoS One.* 2018 Feb 26;13(2):e0193477.
188. Lidgren A, Bergh A, Grankvist K, Rasmuson T, Ljungberg B. Glucose transporter-1 expression in renal cell carcinoma and its correlation with hypoxia inducible factor-1 alpha. *BJU Int.* 2008 Feb;101(4):480–4.
189. Kobayashi M, Uematsu T, Tokura Y, Takei K, Sakamoto K, Narimatsu T, et al. Immunohistochemical expression of sodium-dependent glucose transporter - 2 (SGLT-2) in

- clear cell renal carcinoma: possible prognostic implications. *Int Braz J Urol.* 2019;45(1):169–78.
190. Wang J, Ye C, Chen C, Xiong H, Xie B, Zhou J, et al. Glucose transporter GLUT1 expression and clinical outcome in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Mar 7;8(10):16875–86.
  191. Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol.* 2018 Dec;36(12):1913–26.
  192. Sadri N, Zhang PJ. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. *Cancers (Basel).* 2013 Apr 2;5(2):320–33.
  193. Singer K, Kastenberger M, Gottfried E, Hammerschmied CG, Büttner M, Aigner M, et al. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: high expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8(+) T-cell infiltration in the tumor. *Int J Cancer.* 2011 May 1;128(9):2085–95.
  194. Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol.* 2012 Nov;24(6):650–4.
  195. Zambrano A, Molt M, Uribe E, Salas M. Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 9;20(13).
  196. Vera JC, Reyes AM, Velásquez F V, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, et al. Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry.* 2001 Jan 23;40(3):777–90.
  197. Wang YD, Li SJ, Liao JX. Inhibition of glucose transporter 1 (GLUT1) chemosensitized head and neck cancer cells to cisplatin. *Technol Cancer Res Treat.* 2013 Dec;12(6):525–35.
  198. Rastogi S, Banerjee S, Chellappan S, Simon GR. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2007 Nov 18;257(2):244–51.
  199. Zhang D, Wang Y, Dong L, Huang Y, Yuan J, Ben W, et al. Therapeutic role of EF24 targeting glucose transporter 1-mediated metabolism and metastasis in ovarian cancer cells. *Cancer Sci.* 2013 Dec;104(12):1690–6.
  200. Melstrom LG, Salabat MR, Ding XZ, Milam BM, Strouch M, Pelling JC, et al. Apigenin inhibits the GLUT-1 glucose transporter and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human pancreatic cancer cells. *Pancreas.* 2008 Nov;37(4):426–31.
  201. Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Hurren R, Mao X, Saiz FS, et al. A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol Cancer Ther.* 2008 Nov;7(11):3546–55.
  202. Shuch B, Linehan WM, Srinivasan R. Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013 Jun;13(6):711–9.



203. Chan DA, Sutphin PD, Nguyen P, Turcotte S, Lai EW, Banh A, et al. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med*. 2011 Aug 3;3(94):94ra70.
204. Linehan WM, Rubin JS, Bottaro DP. VHL loss of function and its impact on oncogenic signaling networks in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Apr;41(4):753–6.
205. NA XI, WU G, RYAN CK, SCHOEN SR, di'SANTAGNESE PA, MESSING EM. Overproduction of Vascular Endothelial Growth Factor Related to von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Mutations and Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Expression in Renal Cell Carcinomas. *Journal of Urology*. 2003 Aug;170(2):588–92.
206. Swiatek M, Jancewicz I, Kluebsoongnoen J, Zub R, Maassen A, Kubala S, et al. Various forms of  $\text{HIF-1}\alpha$  protein characterize the clear cell renal cell carcinoma cell lines. *IUBMB Life*. 2020 Jun 6;72(6):1220–32.
207. Liu YM, Ying SP, Huang YR, Pan Y, Chen WJ, Ni LQ, et al. Expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  correlates to biological and clinical significance in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2015 Dec 4;14(1):30.
208. Minardi D, Lucarini G, Santoni M, Mazzucchelli R, Burattini L, Pistelli M, et al. VEGF expression and response to sunitinib in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2013 Nov;33(11):5017–22.
209. Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley JB, Sarkar K, Kimura H, Liu Y V., et al. Effects of Aging and Hypoxia-Inducible Factor-1 Activity on Angiogenic Cell Mobilization and Recovery of Perfusion After Limb Ischemia. *Circ Res*. 2007 Dec 7;101(12):1310–8.
210. Xiao-fen W, Ting C, Jie L, Deng-yang M, Qing-feng Z, Xin L. Correlation analysis of VHL and Jade-1 gene expression in human renal cell carcinoma. *Open Medicine*. 2016 Jan 1;11(1):226–30.
211. Sumera S, Ali A, Yousafzai YM, Durrani Z, Alorini M, Aleem B, et al. Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Its Relation with Aggressiveness and Grade of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Diagnostics*. 2023 Jan 26;13(3):451.
212. Mazumder S, Higgins PJ, Samarakoon R. Downstream Targets of VHL/HIF- $\alpha$  Signaling in Renal Clear Cell Carcinoma Progression: Mechanisms and Therapeutic Relevance. *Cancers (Basel)*. 2023 Feb 19;15(4):1316.
213. Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Expression as an Intrinsic Marker of Hypoxia. *Clinical Cancer Research*. 2004 Dec 15;10(24):8405–12.
214. Balamurugan K, Luu VD, Kaufmann MR, Hofmann VS, Boysen G, Barth S, et al. Onconeural cerebellar degeneration-related antigen, Cdr2, is strongly expressed in papillary renal cell carcinoma and leads to attenuated hypoxic response. *Oncogene*. 2009 Sep 17;28(37):3274–85.

215. Wan L, Huang J, Chen J, Wang R, Dong C, Lu S, et al. Expression and significance of FOXP1, HIF-1a and VEGF in renal clear cell carcinoma. *J BUON*. 2015;20(1):188–95.
216. Schultz L, Chau A, Albadine R, Hicks J, Kim JJ, De Marzo AM, et al. Immunoexpression Status and Prognostic Value of mTOR and Hypoxia-Induced Pathway Members in Primary and Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *American Journal of Surgical Pathology*. 2011 Oct;35(10):1549–56.
217. Gudas LJ, Fu L, Minton DR, Mongan NP, Nanus DM. The role of HIF1 $\alpha$  in renal cell carcinoma tumorigenesis. *J Mol Med*. 2014 Aug 12;92(8):825–36.
218. Wu Q, You L, Nepovimova E, Heger Z, Wu W, Kuca K, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape. *J Hematol Oncol*. 2022 Jun 3;15(1):77.
219. Wohlrab C, Vissers MCM, Phillips E, Morrin H, Robinson BA, Dachs GU. The Association Between Ascorbate and the Hypoxia-Inducible Factors in Human Renal Cell Carcinoma Requires a Functional Von Hippel-Lindau Protein. *Front Oncol*. 2018 Nov 30;8.
220. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Genetic Alterations in Renal Cancers: Identification of The Mechanisms Underlying Cancer Initiation and Progression and of Therapeutic Targets. *Medicines*. 2020 Jul 29;7(8):44.
221. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007 Dec 15;13(24):7388–93.
222. Velickovic M, Delahunt B, Störkel S, Grebem SK. VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4815–9.
223. Song SH, Jeong IG, You D, Hong JH, Hong B, Song C, et al. VEGF/VEGFR2 and PDGF-B/PDGFR- $\beta$  expression in non-metastatic renal cell carcinoma: a retrospective study in 1,091 consecutive patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):7681–9.
224. Strikic A, Kokeza J, Ogorevc M, Kelam N, Vukoja M, Dolonga P, et al. Differential expression of HIF1A and its downstream target VEGFA in the main subtypes of renal cell carcinoma and their impact on patient survival. *Front Oncol*. 2023;13:1287239.
225. Situ Y, Xu Q, Deng L, Zhu Y, Gao R, Lei L, et al. System analysis of VEGFA in renal cell carcinoma: The expression, prognosis, gene regulation network and regulation targets. *Int J Biol Markers*. 2022 Mar 6;37(1):90–101.
226. Kraljević M, Marijanović I, Barbarić M, Sokolović E, Bukva M, Cerić T, et al. Prognostic and predictive significance of VEGF, CD31, and Ang-1 in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma treated with first-line sunitinib. *Bosn J Basic Med Sci*. 2022 Jun 8;
227. Moch H, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2022 Nov;82(5):458–68.

