



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ
ΦΡΟΝΤΙΔΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: « Η έκφραση της καρβονικής ανυδράσης 9 και του HIF-1a σε
καρκίνο εκ διαυγών κυττάρων »**

Τασούδη Άννα Ίρις

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ :Καθηγητής Νεφρολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Τμήμα Ιατρικής, Επιβλέπων

ΙΩΑΝΝΟΥ ΜΑΡΙΑ :Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Τμήμα Ιατρικής

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ : Αναπληρωτής Καθηγητής Νεφρολογίας, Πανεπι-
στήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής

Λάρισα, Μάιος, 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ
ΦΡΟΝΤΙΔΑ»**

MASTER THESIS

**Title: “ The expression of HIF-1 a and Carbonic ahnydrase 9 in clear
cell Renal cell carcinoma”**

Larissa, May, 2020

Περίληψη

Σκοπός. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του HIF-1 α , σε εγχειρητικά παρασκευάσματα νεφροκυτταρικού καρκίνου διαυγοκυτταρικού τύπου και η συσχέτιση της με την έκφραση της καρβοανυδράσης (CAIX) και με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Υλικό και μέθοδος. Το υλικό προέρχεται από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του ΠΘ. Μελετήθηκαν ιστολογικές τομές από το νεοπλασματικό όγκο 42 ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, διαυγοκυτταρικού τύπου, πυρηνικού βαθμού (grade) 1-4 κατά Furhman. Για την έκφραση του HIF-1 α και της CAIX διενεργήθησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε τομές παραφίνης και αξιολογήθηκε μικροσκοπικά το ανοσοϊστοχημικό histoscore για κάθε όγκο. Χρησιμοποιήθηκε στατιστική μέθοδος SPSS v24 software (IBM,USA) για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και των συσχετίσεων.

Αποτελέσματα. Η έκφραση του HIF- 1 α σχετίζεται με την έκφραση της CAIX με στατιστικά σημαντική σχέση ($p=0,001$). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του HIF- 1 α με το φύλο, την ηλικία, τη δεξιά η αριστερή εντόπιση του όγκου, τη διήθηση αγγειακής φλέβας και τη περινευρική διήθηση. Το ίδιο ισχύει και για την CAIX. Ωστόσο υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του HIF-1 α και του ιστολογικού βαθμού Grade Furhman ($p=0,001$). Επίσης όταν έγινε σύγκριση της έκφρασης του HIF- 1 α μεταξύ νεοπλασματικών όγκων Furhman 1 και 2 και καρκινωμάτων Furhman 3 και 4 βρέθηκε ότι εκφράζεται περισσότερο στο 3-4 και αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό ($p=0,001$). Ακόμη στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε με την αγγειακή διήθηση ($p=0,041$). παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν σχετικά με την έκφραση CAIX και τις αντίστοιχες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Συμπεράσματα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1 α , στο διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα συσχετίζεται με ιστοπαθολογικούς προγνωστικούς παράγοντες και με την έκφραση της CAIX η οποία φαίνεται να υπερεκφράζεται στους όγκους με υψηλότερο

βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης κατά Furhman. Περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων αυτών, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και αξιολόγηση περισσότερων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων, θα μπορούσε να συνεισφέρει σε πληρέστερη αξιολόγηση της δράσης HIF-1 α στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού και να αναδείξει ενδεχομένως νεότερους πιθανούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς ιστοκούς βιοδείκτες.

Λέξεις κλειδιά: Hif-1 α, CAIX, διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα

Abstract

Background. The aim of this study was to investigate the immunohistochemical expression of HIF-1 α in surgical specimens of clear cell renal cell carcinoma and its association with the immunohistochemical expression of carbonic anhydrase 9 (CAIX) and with clinicopathological parameters.

Patients and methods. The material comes from the Archive of the Laboratory of Pathological Anatomy of the University of Thessaly. Histological sections from the neoplastic tumor of 42 patients with renal cell carcinoma, clear cell type, nuclear grade 1-4 according to Furhman were studied. For the expression of HIF-1a and CAIX, each case was evaluated microscopically and a histological immunoscore was given for each marker. The statistical method SPSS v24 software (IBM,USA) was used to evaluate the results and the correlations

Results. The expression of HIF-1a was found statistically correlated to the expression of CAIX. There was no statistically significant correlation between HIF-1a expression and sex, age, right or left tumor location, vascular infiltration and perineural infiltration. The same goes for CAIX. There was a statistically significant correlation between the expression of HIF-1a and nuclear grade Furhman.($p = 0.001$). Moreover, the immun-expression of HIF-1 a was more pronounced in tumors of grade 3-4 than in cases with nuclear grade 1 and 2 and this was statistically significant ($p=0,001$). Another statistically significant correlation was found between HIF-1 a immunoexpression and angio-invasion ($p=0,041$). Similar correleations were also found between immunohistochemical expression of CAIX and relevant clinicopathological parameters.

Conclusions: The results of this study suggest that hypoxia induced HIF-1a in clear cell renal cell carcinoma is associated with histopathological prognostic factors and with the expression of CAIX which appears to be overexpressed in tumors with a higher degree of nuclear grade Furhman. Further investigation, in large series of patients and evaluation of additional clinical parameters, might probably contribute to further evaluation of the role of HIF-1a in clear cell renal cell carcinoma and might possibly reveal novel prognostic and predictive tissue markers.

Key words: Hif-1 α , CAIX, clear cell Renal cell carcinoma

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών « Νεφρολογική Φροντίδα», αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που στάθηκαν αρωγοί στην προσπάθειά μου αυτή.

Πρώτο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου και υπεύθυνο του ΠΜΣ, καθηγητή Νεφρολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Ιατρικής κο Στεφανίδα Ιωάννη, αρχικά διότι με εμπιστεύθηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να παρακολουθήσω το ΠΜΣ και εν συνεχεία διότι υπήρξε για μένα δάσκαλος και πηγή έμπνευσης σε όλη αυτή την πορεία.

Η κα Ιωάννου Μαρία, καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, του τμήματος Ιατρικής υπήρξε για μένα μέντορας, και την ευχαριστώ για την ευγένεια, την υπομονή και το ακαδημαϊκό ήθος με το οποίο με καθοδήγησε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους διδάσκοντες του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών διότι ο καθένας με τον τρόπο του συνέβαλλε στην προσωπική μου βελτίωση ως άνθρωπο και ως επιστήμονα.

Τελευταίους αλλά πολύ σημαντικούς θεωρώ και θέλω να ευχαριστήσω, τους γονείς μου που με στήριξαν με κάθε τρόπο στην προσπάθειά μου αυτή. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον πατέρα μου κο Τασούδη Βασίλειο ο οποίος στάθηκε πολύτιμος καθοδηγητής και βοηθός στην στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων της μελέτης μου.

Πίνακας συμβόλων-ακρωνυμίων-συντομογραφιών

HIF 1 –α	Hypoxia inducible factor
CAIX	Carboanthymorphic 9
GD	Grade Furhman
NKK	Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα
RCC	Renal Cell Carcinoma
BMI	Body Mass Index
EKKN	Επίκτητη Κυστική Νόσος του Νεφρού
ΔΚΚ	Διαγγοκυτταρικό Καρκίνωμα
PAX	Paired- Box gene
HKIM-1	Human Kidney Injure Molecule 1
HRE	Hypoxia Response Element
HAS	HIF Ancillary Sequence
EPO-1	Ερυθροποιητίνη-1
TAD	Trans Activation Domain
ODD	Oxygen Dependent Degradation
NLS	Nuclear Localization Signal
ARNT-1	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator 1
BHLH	Basic Helix Looor Helix
PAS	p-aminobenzioc acid
EPAS	Endothilia PAS
PHDs	Prolyl Hydroxylases
VHL	Von Hipple Lindau

ROS	Reactive Oxygen Species
MiRNAs	Micro RNAs
DFO	Desferioxamine
NF-kB	Nuclear Factor kappa light chain-enhancer of activated B cells
LPS	Lipopolysaccharide
TNFa	Tumor Necrotic Factor a
IL-1B	Interleukin 1B
Stat3	Signal Transducer and activator of transcription 3
IGFs	Insulin-like growth factors
HGF	Hepatocyte Growth Factor
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase
AKT	AK Thionine
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
EGF	Epidermal Growth Factor
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor-binding protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
Ras	Rat Sarcoma
Hsp90	Heat Shockprotein 90
GSK	Glycogen Synthase Kinase 3
NES	Nuclear Export signal
CRM1	Chromosomal Maintenance 1

CKs	Casein Kinases
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
ARD1	Arrest Defective Protein 1a
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SEN1	SUMO- specific protease1
GLUT 1	Glucose Transporter
HK2	Hexokinase 2
PKD1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
LDH	Lactate Dehydrogenase

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΝΕΦΡΟΥ Επιδημιολογικά Στοιχεία	12
1.2 Παράγοντες Κινδύνου	13
1.3 Κάπνισμα	13
1.4 Υπέρταση	14
1.5 Σακχαρώδης Διαβήτης	14
1.6 Επαγγελματική έκθεση σε τοξικούς παράγοντες	14
1.7 Παχυσαρκία	15
1.8 Επίκτητη Κυστική Νόσος του νεφρού	15
1.9 Πολυκυστικοί Νεφροί	16
1.10 τοξικότητα από φάρμακα	16
1.11 Γενετική Προδιάθεση	16
1.12Κυτταροτοξική χημειοθεραπεία	17
1.13 Αλκόολ	17
1.14Χρόνια Μόλυνση από Ηπατίτιδα	17
1.15Δίαιτα υψηλή σε λιπαρά	17
1.16 Αιμοκάθαρση	17
2.1 ΔΝΚΚ	19
2.1.1Μακροσκοπική Εικόνα	19
2.1.2Μικροσκοπική Εικόνα	19
2.2Ιστολογικοί Προγνωστικοί Παράγοντες στο ΔΝΚΚ	20
3.1 Η Υποξία και η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων	22
3.2 HIF-1 α	23
3.2.1 HIF-1 B/ARNT	24
3.3 HIF-2α	24
3.4 HIF-3α	25
3.5 Η ρύθμιση επιπέδων μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 α	25

3.5.1 Η εξαρτώμενη από οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1 α	25
3.5.2 Η ανεξάρτητη από οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α	26
3.5.3 Η ρύθμιση του HIF-1 από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις	30
3.5.4 Ο ρόλος του HIF-1 στο μεταβολισμό φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων	31
3.5.5 προγνωστικοί παράγοντες	32
3.6 Υποξία όγκου και CAIX	33
3.7 CAIX στο διαυγοκυτταρικό	35
Σκοπός	
4.1 Υλικό	38
4.2 Μέθοδοι	40
4.2.1 Ανοσοϊστοχημεία	40
4.2.2 Αξιολόγηση Ανοσοϊστοχημείας	41
4.3 Στατιστική Επεξεργασία	42
5.1 Αποτελέσματα	43
5.1.1 Έκφραση του HIF-1α	50
5.1.2 Έκφραση CAIX	50
Συζήτηση	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Γενικό μέρος

Εισαγωγή

1.1 Επιδημιολογικά Στοιχεία

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα ΝΚΚ το οποίο επίσης καλείται και υπερνέφρωμα αναπτύσσεται πρωτοπαθώς στο νεφρό, κυρίως στο φλοιό, και παρουσιάζει διαφοροποίηση, τουλάχιστον εστιακά, προς ώριμα νεφρικά σωληνάκια. (Kummar, 2007). Τα ΝΚΚ αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% νέων διαγνώσεων καρκίνου συμπαγών οργάνων και και το 85% όλων των νεφρικών όγκων στους ενήλικους. Καταγράφονται περίπου 30.000 νέες περιπτώσεις το χρόνο και 12.000 θάνατοι από την νόσο (Kummar,2007). Αυτοί οι όγκοι εμφανίζονται με παρόμοια συχνότητα ανάμεσα σε όλες τις εθνικές ομάδες και γεωγραφικές περιοχές, τα υψηλότερα ποσοστά καταγράφονται στην Βόρεια Ευρώπη και Βόρεια Αμερική και τα χαμηλότερα στις Ασιατικές χώρες, κεντρική και Νότια Αμερική. (Myoad,2001).

Η επίπτωση του ΝΚΚ παρουσιάζει σταθερή άνοδο στις ΗΠΑ από το 1970 μέχρι σήμερα, και εκτιμάται περίπου στις 51.000 νέες περιπτώσεις ανά έτος. Αυτή η αύξηση έχει μελετηθεί ως προς τη φυλή και το φύλο και έχει βρεθεί ότι είναι 3.9% και 4.3% το έτος, ανάμεσα σε μαύρους άντρες και γυναίκες αντίστοιχα, ενώ είναι 2.3% και 3.1% ανάμεσα σε καυκάσιους άντρες και γυναίκες (Ferlay et al, 2010,Jemal et al, 2010,Stafford et al,2008).

Στην Ευρώπη, κατά τη διάρκεια του έτους 2006 διαγνώστηκαν 63.000 νέες περιπτώσεις ΝΚΚ (Ferlay et al., 2007). Στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, η συχνότητα εμφάνισης του νεφρικού καρκίνου έχει μειωθεί ή σταθεροποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, ίσως εν μέρει λόγω της μείωσης τους καπνίσματος από τους άντρες. Επίσης, η θνησιμότητα από νεφρικό καρκίνωμα έχει σταθεροποιηθεί στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, κυρίως στη Σκανδιναβία και άλλες Δυτικές Ευρωπαϊκές χώρες. Στους άνδρες ο δείκτης θνησιμότητας ανά 100.000 άτομα πληθυσμό έχει μειωθεί από το 4.8 το 1990-1994 στο 4.1 το 2000-2004, ενώ και στις γυναίκες παρουσιάζει επίσης πτώση (Levi et al., 2008). Στο Ηνωμένο Βασίλειο , κατά τη διάρκεια του έτους 2009, υπήρξαν 9.286

νέες περιπτώσεις νεφρικού καρκίνου. Από αυτές το 5,706 (61%) ήταν άνδρες και το 3,580 (39%) ήταν γυναίκες (άντρες/γυναίκες: 16/10) (Cancer research UK 2011).

Το διαυγοκυτταρικό ΝΚΚ (ΔΝΚΚ) είναι ο πιο συχνός τύπος και συνιστά το 65% των καρκινωμάτων του νεφρού(Robbins) και το 75% με 80% των μεταστατικών ΝΚΚ.

1.2 Παράγοντες Κινδύνου

Ένας μεγάλος αριθμός περιβαλλοντικών και κλινικών παραγόντων σχετίζονται με την εμφάνιση του ΝΚΚ. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν το κάπνισμα, την υπέρταση, την επαγγελματική έκθεση σε τοξικούς παράγοντες, την παχυσαρκία, την επίκτητη κυστική νόσο των νεφρών (συσχετιζόμενη με την αιμοδιάλυση), την τοξικότητα από φάρμακα καθώς και με γενετικούς παράγοντες προδιάθεσης.(Shiao et al.,2009) (Kaelin et al., 2007).

1.3 Κάπνισμα

Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, το κάπνισμα διπλασιάζει τη πιθανότητα ανάπτυξης του ΝΚΚ, και ευθύνεται για το 1/3 των νέων περιπτώσεων (Hunt et al, 2005). Αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη του ΝΚΚ, ιδιαίτερα σε βαρείς καπνιστές και η διακοπή του καπνίσματος φαίνεται ότι μειώνει τη πιθανότητα ανάπτυξης ΝΚΚ (Tsivian et al., 2011). Σε άλλες μελέτες, το ιστορικό καπνίσματος έχει συσχετισθεί με δυσμενέστερα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και με μειωμένα ποσοστά επιβίωσης, καθώς και με αυξημένο συχνότητα μετάλλαξης στο γονίδιο p53 (Kroeger et al., 2011).

Σε μελέτες DNA που ελήφθη από κύτταρα του περιφερικού αίματος έδειξε ότι οι ασθενείς που έπασχαν από ΝΚΚ είχαν μικρότερου μήκους τελομερή σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες και η διαφορά αυτή παρουσίαζε συσχέτιση με το κάπνισμα.(Wu et al., 2003). Επίσης, στους καπνιστές η μικρή ποσότητα μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) σε περιφερικά λεμφοκύτταρα συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΝΚΚ(Xing et al., 2008). Εντούτοις, Τα συγκεκριμένα ευρήματα θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιωθούν σε περισσότερες προοπτικές μελέτες και σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

1.4 Υπέρταση

Η υπέρταση αποτελεί ένα παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης ΝΚΚ, τόσο σε μαύρους όσο και σε λευκούς ασθενείς αν και ο βιολογικός μηχανισμός, ο οποίος εξηγεί τη συσχέτιση της υπέρτασης με το ΝΚΚ παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. **(Weikert et al., 2008)**. Σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, ο έλεγχος και η θεραπεία της υπέρτασης ενδέχεται να μειώσει την επίπτωση του ΝΚΚ αν και μεγάλες προοπτικές μελέτες απαιτούνται για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης **(Colt et al., 2011)**.

1.5 Σακχαρώδης Διαβήτης

Υπάρχουν δεδομένα τα οποία καταδεικνύουν ότι η επίπτωση των συμπαγών όγκων αυξάνεται σημαντικά σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, συμπεριλαμβανομένων των Rcc. Οι ασθενείς που είναι διαβητικοί και έχουν RCC, εμφανίζουν μια εστιακή κυρίαρχη περιοχή μικρών διαυγών κυττάρων RCC. Σε αντίθεση, οι γυναίκες με ιστορικό RCC εμφανίζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα διαβήτη απ ό τι οι άντρες **(Samy et al, 2012)**. Τα ευρήματα άλλων μελετών δείχνουν ότι το ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη έχει συσχετισθεί με μέτρια αύξηση του κινδύνου εμφάνισης RCC. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη επίπτωση της υπέρτασης στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. **(Setiawan et al, 2007)**

1.6 Επαγγελματική έκθεση σε τοξικούς παράγοντες

Το ΝΚΚ δεν θεωρείται μια επαγγελματική ασθένεια, εντούτοις σε αρκετές μελέτες η επαγγελματική έκθεση σε συγκεκριμένους τοξικούς παράγοντες όπως το κάδμιο, ο αμίαντος και τα παράγωγα του πετρελαίου έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΝΚΚ. Σε μια διεθνή πολυκεντρική μελέτη, η οποία περιέλαβε πάνω από 1700 ασθενείς καταγράφηκε αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου σε εκείνους που εκτέθηκαν σε αμίαντο (σχετικός κίνδυνος 1.4), σε κάδμιο (σχετικός κίνδυνος 2.0) και σε βενζίνη (σχετικός κίνδυνος 1.6) **(Mandel et al., 1995, Canadian, Cancer Society 2012)** ενώ επίσης φαίνεται ότι έχουν ιδιαίτερα αυξημένη επίπτωση εμφάνισης ΝΚΚ οι εργάτες, οι οποίοι εκτίθενται σε κάδμιο και είναι καπνιστές **(Kolonel et al., 1976)**

1.7 Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία σύμφωνα με μελέτες αποτελεί ιδιαίτερο παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη ΝΚΚ τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (Pischon et al., 2006). Μία μετά-ανάλυση προοπτικών μελετών παρείχε στοιχεία για τη συσχέτιση ανάμεσα στον αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (body mass index από 5 kg/m² (BMI)) και του κινδύνου ανάπτυξης ΝΚΚ, με ισχυρότερη συσχέτιση στις γυναίκες (Renehan et al., 2008) και μάλιστα σε σχέση με την κατανομή του σωματικού λίπους (Pischon et al., 2006; Adams et al., 2008). Σε άλλη μελέτη, η επίπτωση του ΝΚΚ διπλασιάζεται στα παχύσαρκα άτομα (BMI>29kg/m²) σε σχέση με άτομα με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος. Ακόμη στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η επίπτωση αυξάνεται έως και 50% στα παχύσαρκα άτομα σε σχέση με τα υπέρβαρα (BMI 25-30kg/m²). (Bergstrom et al., 2001).

1.8 Επίκτητη κυστική Νόσος του νεφρού

Αυτή η νόσος επηρεάζει μόνο το ένα τρίτο ή/και λίγο περισσότερο από το ένα τρίτο των ασθενών που υποβάλλονται σε μακροχρόνια αιμοκάθαρση (≥ 3 yr). Αναφέρεται ότι περίπου το 20% των ασθενών με ΕΚΝΝ θα αναπτύξουν ΝΚΚ. Το ποσοστό αυτό αντιπροσωπεύει περίπου το 5% του συνολικού ποσοστού των ατόμων με ΝΚΚ (Charman et al., 2007). Η ηλικία, το φύλο, η φυλή και η διάρκεια της αιμοκάθαρσης αποτελούν τους κύριους παράγοντες κινδύνου. Συσχετίζεται σε μικρότερο βαθμό με την περιτοναϊκή κάθαρση και υπάρχει πιθανότητα να υποχωρήσει μετά από μεταμόσχευση (Lien, 1993). Ο μηχανισμός παθογένεσης της ασθένειας, δεν είναι κατανοητός, αλλά ίσως να σχετίζεται με την ενεργοποίηση κάποιων πρώτο-ογκογονιδίων, τα οποία ενδεχομένως να είναι υπεύθυνα για τη μεταγενέστερη ανάπτυξη του ΝΚΚ (Oya et al., 2005). Η μεταμόσχευση ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου περισσότερο απ' ό,τι η έκθεση σε ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες. Σύμφωνα με τους Kasiske et al, ασθενείς ο κίνδυνος ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκινώματος ήταν σημαντικά αυξημένος την πρώτη τριετία μετά τη μεταμόσχευση σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Επίσης βρέθηκε ότι είχαν 39% υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των νεφρών σε αυτό το διάστημα, σε σχέση με τα άτομα που βρίσκονταν στη λίστα αναμονής για μεταμόσχευση νεφρού (Kasiske et al., 2004).

1.9 Πολυκυστικοί Νεφροί

Το ποσοστό επιπολασμού του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος ήταν 8,3% σε ασθενείς με πολυκυστική νόσο και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε σε 12%, όταν στους ασθενείς της μελέτης συμπεριελήφθησαν και εκείνοι που είχαν υποβληθεί σε ένα έτος αιμοκάθαρση ή μετά από μεταμόσχευση νεφρού (Hajj et al., 2009)

1.10 Τοξικότητα από φάρμακα

Η μακροχρόνια λήψη αναλγητικών φαρμάκων και ιδιαίτερα σκευασμάτων που περιέχουν φαινακετίνη, στις οποίες η ακεταμινοφαίνη αποτελεί το κύριο μεταβολίτη τους, αλλά και η κατάχρηση ασπιρίνης, συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΝΚΚ, ανάπτυξης καρκινωμάτων της νεφρικής πυέλου και ουροθηλιακών καρκινωμάτων. (Gago-Dominguez et al., 1999, Sorensen et al., 2003, Derby et al., 1996).

1.11 Γενετική προδιάθεση

Το κληρονομικό ΝΚΚ σχετίζεται με οικογενή σύνδρομα που εμπλέκονται στην εμφάνιση του καρκίνου και ιδιαίτερα με το σύνδρομο Von Hippel- Lindau (VHL). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο VHL. Η νόσος VHL είναι κληρονομική, μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και εκδηλώνεται με μια ποικιλία από καλοήθεις και κακοήθεις όγκους (Kaelin et al., 2007).

Άλλα οικογενή σύνδρομα που συσχετίζονται με την ανάπτυξη ΝΚΚ είναι το σύνδρομο επίκτητου θηλώδους ΝΚΚ (Hereditary papillary renal carcinoma/HPRC το οποίο σχετίζεται με σε αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη θηλώδους ΝΚΚ τύπου 1 (Zbar et al., 1994, Dharmawardana et al., 2004; Schmidt et al., 2004, (Schmidt et al., 1997), και το σύνδρομο Birt-Hogg-Dube (BHD) στο οποίο παρατηρούνται αμφοτερόπλευρα, πολυεστιακά ΝΚΚ καθώς και ποικίλες δερματολογικές και πνευμονικές αλλοιώσεις (Menko et al., 2009).

Τα κληρονομικά / οικογενή ΝΚΚ εμφανίζονται σε μικρότερη ηλικία σε σχέση με τους σποραδικούς όγκους, και συχνότερα σε γυναίκες (Björnsson et al., 1996). Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μετά- ανάλυση αποδείχθηκε ότι τα άτομα με συγγενή πρώτου βαθμού ο οποίος πάσχει από ΝΚΚ, έχουν διπλάσιες πιθανότητες ανάπτυξης της ίδιας μορφής καρκίνου σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Clague et al., 2009).

1.12 Κυτταροτοξική χημειοθεραπεία

Η χορήγηση κυτταροτοξικών χημειοθεραπειών στη παιδική ηλικία για κακοήθειες, αυτοάνοσες διαταραχές ή μεταμόσχευση μυελού των οστών αποτελούν αιτίες, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με τη μεταγενέστερη ανάπτυξη νεφροκυτταρικού καρκινώματος (Argani et al, 2006).

1.13 Αλκοόλ

Μείωση του κίνδυνου εμφάνισης καρκίνου του θυρεοειδή και καρκίνου των νεφρών έχει συσχετισθεί με τη κατανάλωση αλκοόλ (Allen et al, 2009). Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλης έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαυγοκυτταρικού καρκινώματος τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες (Lew et al, 2011).

1.14 Χρόνια μόλυνση από ηπατίτιδα C

Μια επιδημιολογική μελέτη σε 67.000 ασθενείς, κατέδειξε ότι η χρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C συσχετίστηκε με ένα σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου εκ διαυγών κυττάρων του νεφρού. Ο δείκτης κινδύνου υπολογίστηκε και βρέθηκε στο 1.77 μετά από προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο, την εθνικότητα και τη παρουσία χρόνιας ασθένειας των νεφρών (Gordon et al, 2010).

1.15 Δίαιτα υψηλή σε λιπαρά

Δίαιτες υψηλές σε λιπαρά και σε πρωτεΐνες, καθώς και σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη Rcc (Kiren et al, 2002). Αντίθετα, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκινώματος (Lee et al, 2009).

1.16 Αιμοκάθαρση

Ο κίνδυνος εμφάνισης διαυγοκυτταρικού καρκινώματος έχει εκτιμηθεί ότι είναι 30 φορές μεγαλύτερος σε ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση και έχουν επίκτητη πολυκυστική νόσο, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Truong et al, 1995)

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΓΚΩΝ ΝΕΦΡΟΥ (ΠΟΥ 2004)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΤΟ ΔΙΑΥΓΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (ΔΝΚΚ)

Το ΔΝΚΚ είναι κακοήθες επιθηλιακό νεόπλασμα του νεφρού, αποτελούμενο από κύτταρα με διαυγές ή ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Είναι ο πιο κοινός τύπος ΝΚΚ και αφορά στο 70% το 80% όλων των καρκινωμάτων του νεφρού (Sean, 2012). Απαντάται συνήθως η σποραδική του μορφή ενώ σπανιότερα είναι οικογενές.

2.1.1 Μακροσκοπική εικόνα

Το ΔΝΚΚ συνήθως είναι μονήρεις μονόπλευροι όγκοι του νεφρού. Ανευρίσκονται συχνά στον άνω πόλο (άλλη ονομασία υπερνέφρωμα), έχουν καλώς περιγεγραμμένα όρια, καθώς απωθούν τον περιβάλλοντα μη νεοπλασματικό ιστό και στις διατομές εμφανίζουν πορτοκαλοκίτρινη χροιά, η οποία οφείλεται στα λιπίδια του κυττροπλάσματος των καρκινωματοδών κυττάρων. Συχνά παρουσιάζουν αιμορραγία, νέκρωση και ασβεστοποίηση. Μεγάλοι όγκοι ενδέχεται να εμφανίζουν διήθηση της νεφρικής φλέβας ή/και σαρκωματοώδη διαφοροποίηση, η οποία μακροσκοπικά εμφανίζεται ως συμπαγής περιοχή με μαλακή σύσταση. Το ΔΝΚΚ μπορεί να παρουσιάζει επίσης κυστική εκφύλιση. Πολυεστιακοί, αμφοτερόπλευροι, κυστικοί όγκοι με μορφολογία ΔΝΚΚ, απαντώνται συχνότερα σε άτομα με νόσο VHL ή οζώδη σκλήρυνση (Sean, 2012).

2.1.2 Μικροσκοπική εικόνα

Στην ιστολογική εξέταση το ΔΝΚΚ παρουσιάζει συμπαγές, σωληνωδοκυστικό, ή κυψελιδώδες πρότυπο ανάπτυξης με εστιακή παρουσία ψευδοθηλών. Το στρώμα είναι

έντονα αγγειοβριθές. Το μέγεθος των νεοπλασματικών κυττάρων είναι περίπου διπλάσιο απ' αυτό των κυττάρων του φυσιολογικού επιθηλιακού σωληναρίου. Τα καρκινωματώδη κύτταρα εμφανίζουν σαφή κυτταρικά όρια και διαυγές κυτταρόπλασμα που οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση γλυκογόνου και λιπιδίων. Στο κυτταρόπλασμα επίσης δυνατόν να ανιχνευθούν σωμάτια υαλίνης και μυοσφαιρίνη. Σπανιότερα, ενδέχεται ο όγκος να παρουσιάζει χαρακτηρες αγγειολυομωματοώδους τύπου ή ψευδοαγγειακό πρότυπο ανάπτυξης λόγω απώλειας της κυτταρικής συνοχής (Kuhn et al., 2006, Shannon et al., 2009, Gobbo et al., 2008).

Στην ανοσοϊστοχημική μελέτη τα κύτταρα του όγκου είναι θετικά στον επιθηλιακό δείκτη pankeratin, στο CD10, στη Vimentin, στο EMA, και παρουσιάζουν διάχυτη μεμβρανική έκφραση καρβονικής ανυδράσης (CA) IX

Νεότεροι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του δι-αυγοκυτταρικού ΝΚΚ είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες PAX-8 PAX-2 και o hKIM-1 (Human Kidney Injury Molecule-1). Οι δείκτες αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, πρέπει όμως να αξιολογούνται σε συνδυασμό με την μορφολογία και τα κλινικά δεδομένα, αφού είναι δυνατόν να εκφράζονται και σε άλλα καρκινώματα (Sangoi 2010)

2.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΟ ΔΝΚΚ

Ένας από τους ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για το ΝΚΚ και ιδιαίτερα για το ΔΝΚΚ είναι ο πυρηνικός βαθμός κακοηθείας κατά Fuhman (Rini, Brian I; Campbell, Steven C; Escudier, Bernard (2009). "Renal cell carcinoma". The Lancet. **373** (9669): 1119–1132.)

Για την εκτίμηση του πυρηνικού βαθμού κακοήθειας κατά Fuhman (1982), η ιστολογική τομή του όγκου εξετάζεται σε χαμηλή μεγέθυνση (X10) και αξιολογούνται το μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα, η ποιότητα της χρωματίνης και η παρουσία διακριτού η όχι πυρηνίου (Ivan et al., 2007)

Σύστημα εκτίμησης πυρηνικού βαθμού κακοηθείας κατά Fuhrman

Grade	Μέγεθος Πο- ρήνα	Σχήμα Πο- ρήνα	Χρωματίνη	Πυρήνιο
1	<10 μm	Στρογγυλό	Πυκνή	Μη διακριτό
2	15 μm	Στρογγυλό	Λεπτοκοκ- κιδής	Μικρό (μη διακριτό σε μεγέθυνση x10
3	20 μm	Στρογγυλό / ωοειδές	Αδρή κοκ- κιδής	Εμφανές (σε μεγέθυνση x 10)
4	>20 μm	Πλειόμορφο / πολύλοβο	Υπερχρωμα- σία	Μακροπυρή- νιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Η υποξία και η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων HIF

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ζωής. Αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στη σύνθεση του ATP από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα και είναι αναγκαίο για τις ενεργειακές μετατροπές σε όλα τα βιολογικά συστήματα. Τα επίπεδα του οξυγόνου στα κύτταρα πρέπει να διατηρούνται σε φυσιολογικά επίπεδα (6-20% O₂), τα οποία διαφέρουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε ιστού. Η υποξία, δηλαδή η έκθεση σε μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου, μπορεί να συμβαίνει φυσιολογικά, όπως κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, σε έντονη μυϊκή δραστηριότητα ή κατά την παραμονή σε υψηλό υψόμετρο, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η ισχαιμία, η φλεγμονή, η παχυσαρκία ή ο καρκίνος. Η έκθεση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας επηρεάζει αρνητικά τις λειτουργίες τους και μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο. Για το λόγο αυτό τα μετόζωα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ομοιοστασίας, ώστε να μπορούν να επιβιώσουν και να προσαρμοστούν στο υποξικό περιβάλλον. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι και η ενεργοποίηση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (Hypoxia Inducible Factors, HIFs), οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή μιας πληθώρας γονιδίων που έχουν στόχο αφενός να αυξήσουν την πρόσληψη και μεταφορά και αφετέρου να μειώσουν την κατανάλωση οξυγόνου, ρυθμίζοντας λειτουργίες όπως η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός, η κυτταρική ανάπτυξη/ επιβίωση και η Απόπτωση (Semenza GL, 2012).

Οι HIFs είναι ετεροδιμερείς μεταγραφικοί παράγοντες που αποτελούνται από μια α και μια β υπομονάδα (Εικ. 2). Η υπομονάδα α , η οποία εκφράζεται σε συνθήκες υποξίας, απαντάται σε τρεις ισομορφές (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), ενώ η υπομονάδα β (HIF-1 β

ή αλλιώς ARNT), εκφράζεται συνεχώς και είναι κοινή ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των HIF. Η υπομονάδα α συνδέεται με την υπομονάδα β, σχηματίζοντας τους παράγοντες HIF-1, HIF-2 και HIF-3 (Semenza GL, 2012). Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF, προσδένονται σε ειδική αλληλουχία DNA (5'-A/G CGTG-3) των υποκινητών των γονιδίων-στόχων τους, που ονομάζεται στοιχείο απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Element, HRE) και επάγουν τη μεταγραφή τους (Semenza GL, 2010). Παρόλο που η συγκεκριμένη αλληλουχία είναι αρκετά συχνή μέσα στο γονιδίωμα, λιγότερο από το 1% αποτελούν πραγματικές θέσεις πρόσδεσης του HIF-1 (HRE). Εκτός από το HRE, υποκινητές πολλών γονιδίων περιέχουν και μια αλληλουχία που προσομοιάζει το HRE και βρίσκεται 8-9 νουκλεοτίδια καθοδικά αυτού, γνωστή ως HIF ancillary sequence (HAS), με άγνωστη όμως λειτουργία (Dengler VI et al, 2014).

Τα γονίδια-στόχοι των HIF εμπλέκονται στην προσαρμογή του κυττάρου στις συνθήκες υποξίας και σε διαδικασίες επιβίωσης, όπως η αναερόβια γλυκόλυση, η σηματοδότηση μέσω αυξητικών παραγόντων, η κινητικότητα του κυττάρου, η αγγειογένεση και η ερυθροποίηση (Semenza GL, 2010).

3.2 HIF-1a

Το ανθρώπινο γονίδιο του HIF-1a βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων. Η αναγνώριση του προέκυψε το 1992 από την έρευνα της επαγωγής σε υποξία του γονιδίου της ερυθροποιητίνης-1 (EPO-1), μιας γλυκοπρωτεϊνικής ορμόνης που προάγει τη δημιουργία ερυθρών αιμοσφαιρίων, αυξάνοντας έτσι την παροχή του οξυγόνου (Semenza GL, 2010).

Η αλληλουχία του HIF-1a είναι αρκετά συντηρημένη, καθώς εμφανίζει πάνω από 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Ο HIF-1a ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών με δομή βασικής έλικας-θηλιάς-έλικας (bHLH (basic Helix-Loop-Helix)-PAS (PER-ARNT-SIM)). Ο HIF-1a στην αμινοτελική του περιοχή περιέχει τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που απαιτούνται για το διμερισμό του με τον ARNT και την πρόσδεσή του στα HREs. Το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1a περιέχει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs): μια αμινοτελική, την N-TAD και μια καρβοξυτελική, την C-TAD. Η N-TAD περιοχή περιλαμβάνει μέρος της ονομαζόμενης εξαρτώμενης από το οξυγόνο περιοχής αποικοδό-

μησης (Oxygen Dependent Degradation, ODD). Η C-TAD περιοχή έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως η πρωτεΐνη πρόσδεσης στον CREB (CBP, CREB Binding Protein) και ο p300, απαραίτητους για την σύνδεση του συμπλόκου HIF-WARNT στα HREs των γονιδίων-στόχων τους. Συγκεκριμένα, οι CBP/p300, που δρουν ως ακετυλοτρασφεράσες των ιστονών, διευκολύνουν τη μεταγραφή επιτρέποντας την πρόσβαση της πολυμεράσης στο DNA και σταθεροποιούν το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής (Masoud GN et al,2015).

Στον HIF-1α έχουν εντοπιστεί σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS), στην αμινοτελική περιοχή (N-NLS) και στην καρβοξυτελική περιοχή (C-NLS) (Semenza GI et al, 2010).

Αρχικά, είχε αναγνωριστεί το πρώτο NLS στην καρβοξυτελική περιοχή, που αλληλεπιδρά με τις ιμφορτίνες α/β και οδηγεί τον HIF-1α στον πυρήνα (Depping et al ,2008). Μετέπειτα δείχτηκε ότι και οι ιμφορτίνες 4 και 7 μεσολαβούν την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα και συγκεκριμένα η ιμφορτίνη 7 που συνδέεται με την αμινοτελική περιοχή του (Chachami et al,2009)

3.2.1 HIF-1 β / ARNT

Η β -υπομονάδα των HIF ονομάζεται αλλιώς ARNT1 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1) λόγω ετεροδιμερισμού με τον παράγοντα του ειδικού υποδοχέα AhR με στόχο την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων, όπως η διοξίνη. Αποτελείται από 789 αμινοξέα και παρουσιάζει σταθερή έκφραση. Στο αμινοτελικό του άκρο φέρει μια ακολουθία NLS, μια περιοχή bHLH πρόσδεσης στο DNA και μια περιοχή PAS για ετεροδιμερισμό με τον HIF-1α.

Το καρβοξυτελικό του άκρο φέρει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, η οποία δεν έχει δειχθεί ότι συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργότητα των διμερών που σχηματίζει (Keith B et al , 2011)(Εικ.2).

3.3 HIF-2 α

Ο HIF-2 α είναι επίσης γνωστός ως ενδοθηλιακή πρωτεΐνη με περιοχή PAS 1 (endothelial PAS protein 1, EPAS1), εφόσον ανιχνεύτηκε πρώτα σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο HIF-2 α εκτός από την ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία του, σε ποσοστό

48%, παρουσιάζει κοινά δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά με τον HIF-1α, όπως ο ετεροδιμερισμός με τον HIF-1β/ABNT και η πρόσδεση σε αλληλουχίες HREs (Εικ.2). Σε αντίθεση με τον HIF-1α, που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς, η έκφραση του HIF-2α είναι ιστοειδική, καθώς ο HIF-2α εκφράζεται, εκτός από το ενδοθήλιο, κυρίως, στους πνεύμονες, στους νεφρούς, στην καρδιά και στο λεπτό έντερο (Putel SA et al, 2008). Διαφορά υπάρχει και στο χρόνο δράσης των δύο παραγόντων. Σε συνθήκες οξείας υποξίας (μικρότερης των 24 ωρών) η ενεργοποίηση γονιδίων επιτελείται κυρίως από τον HIF-1α, με στόχο την άμεση προσαρμογή των κυττάρων, π.χ. μέσω της ενεργοποίησης της γλυκόλυσης, ενώ σε μεγαλύτερες περιόδους υποξίας υπερισχύει η δράση του HIF-2α, η οποία σχετίζεται με την επαγωγή γονιδίων που προάγουν την αγγειογένεση και τον καρκίνο (Dengler VL et al, 2014)

3.4 HIF-3α

Ο HIF-3α, ο οποίος ανακαλύφθηκε μεταγενέστερα των HIF-1α και HIF-2α, εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, διμερίζεται με τον HIF-1β/ARNT και προσδένεται στα HREs. Ο HIF-3α παρουσιάζει μικρότερη ομοιότητα με τις άλλες δύο υπομονάδες και διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά (Εικ.2). Πολλές από τις ισομορφές του HIF-3α έχουν μόνο μια αμινοτελική και στερούνται την C-TAD. Ο ρόλος του HIF-3α, είναι ελάχιστα μελετημένος, αν και θεωρείται συνήθως ότι κατόπιν πρόσδεσης ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική δράση των άλλων ισομορφών, HIF-1α και HIF-2α (Dengler VL et al, 2008).

3.5 Η ρύθμιση των επιπέδων και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α

3.5.1Η εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α

Σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου (νορμοξία - 21% O₂), ο HIF-1α αν και μεταγράφεται και μεταφράζεται ιδιοστατικά, αποτελεί μια ιδιαίτερα ασταθή πρωτεΐνη, η οποία αποικοδομείται. Αναλυτικά, σε νορμοξία, ειδικές προλυλ-υδροξυλάσες (prolyl hydroxylases, PHDs 1-3), οι οποίες έχουν στο καταλυτικό τους κέντρο Fe(II) και χρησιμοποιούν ως υποστρώματα οξυγόνο και α-κετογλουταρικό, υδροξυλιώνουν τον HIF-

1α σε δύο κατάλοιπα προλίνης (P402 και P564 στον ανθρώπινο HIF-1α) που βρίσκονται στην περιοχή ODD του. Κατά την ενζυμική αυτή αντίδραση ένα άτομο οξυγόνου ενώνεται με το κατάλοιπο προλίνης του HIF-1α και το άλλο άτομο οξυγόνου αντιδρά με το α-κετογλουταρικό και έτσι παράγεται ηλεκτρικό οξύ και CO₂. Τα υδροξυλιωμένα κατάλοιπα προλίνης του HIF-1α αποτελούν περιοχή πρόσδεσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης VHL (von Hippel-Lindau), η οποία αλληλεπιδρώντας με την ελονγκίνη C και στρατολογώντας τη λιγάση E3 της ουβικιτίνης καταλύει την ουβικιτινίωση του HIF-1α και την επικείμενη αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα (Semenza GL, 2010), (Koyasu et al, 2018).

Οι PHDs όχι μόνο λειτουργούν ως «αισθητήρες οξυγόνου», αλλά και η έκφραση των 2 μελών της οικογένειας PHD2 και PHD3 ρυθμίζεται από την υποξία και τα γονίδια τους αποτελούν μεταγραφικούς στόχους του HIF-1α. Σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (<6% O₂), η δράση των PHDs, και κατά συνέπεια η υδροξυλίωση και η αποικοδόμηση του HIF-1α αναστέλλονται, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και συσσώρευση του (Semenza GL, 2010), (Koyasu et al, 2018).

Η συγκέντρωση οξυγόνου ρυθμίζει επίσης αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο FIH-1 (Factor inhibiting HIF -1α - παράγοντας που αναστέλλει τον HIF -1α) αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (N803 στον HIF-1α ανθρώπου) της C-TAD. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση του HIF-1α με συνενεργοποιητές, όπως ο CBP/p300, και κατ' επέκταση η μεταγραφική του δράση (Koyasu et al, 2018) .

3.5.2 Η ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α

Αν και η υποξία θεωρείται ως ο βασικός ενεργοποιητής του HIF-1α, στη ρύθμιση των επιπέδων του συμμετέχουν και ποικίλοι άλλοι μηχανισμοί που δρουν ανεξάρτητα από το οξυγόνο. Ο HIF-1α μπορεί να επαχθεί και σε νορμοξία από ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ιόντα μετάλλων, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και σηματοδοτικά μόρια (Masoud GN et al, 2015), αλλά και microRNAs (miRNAs) (Serocki M et al, 2018).

Τα μιτοχόνδρια λειτουργούν ως «αισθητήρες» της υποξίας και σε ήπια υποξία μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή ROS, και έτσι να επηρεάσουν τη λειτουργία των PHDs και την αποικοδόμηση του HIF-1α (Majmundar AJ et al, 2010), (Liu LZ et al, 2006).

Εκτός από τα επίπεδα οξυγόνου, η δράση των PHDs μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες που δεσμεύουν τους απαιτούμενους συμπαράγοντες τους. Συγκεκριμένα, ενώσεις όπως είναι η διμεθυλοξαλο - γλυκίνη (dimethyloxalolglycine, DMOG), που είναι ανάλογη του α-κετογλουταρικού και η δεσφεριοξαμίνη (desferioxamine, DFO), που δεσμεύει το Fe²⁺, και δισθενή μέταλλα, όπως το κοβάλτιο ή το νικέλιο, παρεμποδίζουν την δράση των PHDs και επιτρέπουν έτσι την σταθεροποίηση του HIF-1α (Semenza GL et al,2010).

Ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα κάπα-ελαφριάς αλυσίδας-ενισχυτή των ενεργοποιημένων Β κυττάρων (nuclear factor kappa-light-chainenhancer of activated B cells, NF-κB) κατά τη φλεγμονή, μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή του HIF-1α σε επίπεδο μεταγραφής (Rius J et al, 2018). Ο υποκινητής του HIF-1α περιέχει πιθανή θέσης πρόσδεσης του NF-κB η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική του ενεργοποίηση (Van Uden P et al,2011), (Bonello S et al,2007). Σταθεροποίηση και επαγωγή του HIF-1α μέσω θρομβίνης, H₂O₂ (Bonello S et al, 2007) ή φλεγμονωδών παραγόντων, όπως του λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide, LPS) (Frede S et al, 2006), του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumour necrosis factor α, TNFα) (Van Uden P et al,2011) και της ιντερλευκίνης 1β (interleukin 1β, IL-1β) (Jung YJ, 2003) βρέθηκε ότι εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω του NF-κB.

Στη ρύθμιση του HIF-1α συμμετέχει και η πρωτεΐνη μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3 (signal transducer and activator of transcription 3, Stat-3). Η Stat-3 αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή του HIF-1 και αναστέλλοντας την πρόσδεση του pVHL, οδηγεί σε σταθεροποίηση του (Jung JE et al,2008). Έχει ακόμη βρεθεί ότι σε μετασχηματισμένα και καρκινικά κύτταρα, η μεταγραφή του HIF-1α εξαρτάται άμεσα από την Stat-3 (Niu G et al,2008), (Papadakis AI et al,2010).

Στη σταθεροποίηση του HIF-1α συμβάλλουν ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες όπως η αγγειοτενσίνη 2 (Wolf F et al, 2004), η ινσουλίνη (Feldser D et al,1999), αυξητικοί παράγοντες που μιμούνται την ινσουλίνη (insulin-like growth factors, IGFs) (Feldser D et al,1999) και ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor, HGF) (Lin YM et al,2012).

Η έκφραση του HIF-1α μπορεί να ρυθμιστεί στο επίπεδο της μετάφρασης και μέσω μονοπατιών κυτταρικών υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες ή υποδοχέων με

δράση κινάση τυροσίνης, που ενεργοποιούνται από ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες, αντίστοιχα, και δρουν ανεξάρτητα της συγκέντρωσης του οξυγόνου (Kuschel A et al,2012).

Αναλυτικά, η ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate-3-kinase, PI3K) / Akt (Ak thymoma)/ στόχου της ραπαμυκίνης θηλαστικών (mammalian target of rapamycin, mTOR) (PI3K/Akt/mTOR) από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), ή ο IGF-1 και ορμόνες, όπως ινσουλίνη, μπορεί να αυξήσει τη μετάφραση του HIF-1α.

Το mTOR δρα φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη πρόσδεσης στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eukaryotic translation initiation factor binding protein-4E-BP1), παρεμποδίζει την αναστολή της μετάφρασης του mRNA και οδηγεί στη μετάφραση του HIF-1α. Παράλληλα, η φωσφορυλίωση της κινάσης p70S6 (S6K) από τον mTOR προάγει τη φωσφορυλίωση της, ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 και επάγει τη μετάφραση του HIF-1α. Το μονοπάτι αυτό ανταγωνίζεται η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN (phosphatase and tensin homolog), η οποία παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση των προϊόντων της PI3K (Masoud GN et al, 2015).

Αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 έχει αποδοθεί και στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinases, MAPK). Στο μονοπάτι των MAPK διάφοροι αυξητικοί παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των Ras (Rat Sarcoma), οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των κινασών ρυθμιζόμενων από εξωκυττάρια σήματα (extracellular signal-regulated kinase, ERK). Η ενεργοποιημένη ERK φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες 4E-BP1, S6K και MAP kinase interacting kinase (MNK), με αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό σύνθεσης του HIF-1α, αλλά και της μεταγραφικής του ενεργότητας. Η ERK φωσφορυλιώνει τον συνενεργοποιητή CBP/p300 και επάγοντας τη δημιουργία συμπλόκου HIF-1α/p300 προάγει τη μεταγραφική του δράση (Masoud GN et al,2015).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (heat-shock protein, Hsp90), η οποία δρα ανεξάρτητα από τον pVHL, προσδένεται στην περιοχή PAS του HIF-1α και ρυθμίζει τη

δράση του προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση του. Αντίθετα, αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF-1α και μείωση της μεταγραφικής του δράσης (Isaacs JS et al,2002).

Εκτός από την υδροξυλίωση συμβαίνουν και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση και η σουμοϋλίωση, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη δράση του HIF-1α.

Ο HIF-1α αποτελεί στόχο ενός μεγάλου αριθμού κινασών. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α επηρεάζει τη σταθεροποίηση του, την μετατόπιση στον πυρήνα και τη μεταγραφική του δράση (Kietzmann T et al, 2016)

Διάφορες θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν βρεθεί για την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), η ρύθμιση από την οποία είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του οξυγόνου και της δράσης του pVHL και των PHDs. Συνέπεια της φωσφορυλίωσης αυτής είναι η αποικοδόμηση του HIF-1α που επιτελείται μέσω συμπλόκου ειδικών πρωτεϊνών (Flugel D et al,2007).

Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις p42/44 MAPK (ERK1/2) στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση ενός σήματος πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES) του HIF-1α, που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη CRM1 (chromosomal maintenance 1), τον βασικό υποδοχέα εξαγωγής από τον πυρήνα κυττάρων θηλαστικών. Με αυτόν τον τρόπο, ο HIF-1α, τελικά, παραμένει στον πυρήνα του κυττάρου, συνδέεται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Mylonis I et al,2006), (Mylonis I et al,2008).

Τροποποιήσεις της C-TAD από τις κινάσες καζεΐνης (Casein Kinase, CKs) 1 και 2 μπορούν, επιπλέον, να ρυθμίσουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Αναλυτικότερα, η CK2 δείχθηκε ότι είναι θετικός ρυθμιστής της δράσης του HIF-1, εφόσον αναστολή της μειώνει τη δράση του. Η CK2, σε υποξία, είχε βρεθεί αρχικά να φωσφορυλιώνει τον HIF-1 στη θρεονίνη 796 (Gradin K et al,2002) και να επάγει τη δράση του μέσω αναστολής της εξαρτώμενης από την HIF υδροξυλίωσης του (Lancaster De et al,2004). Αντίθετη επίδραση παρουσιάζει η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την EE1δ στη σερίνη 247 που μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 αποσταθεροποιώντας το σύμπλοκο HIF-1α/ARNT (Kalousi A et al, 2010).

3.5.3 Η ρύθμιση του HIF-1α από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Εκτός από την υδροξυλίωση συμβαίνουν και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση και η σουμοϋλίωση, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη δράση του HIF-1α.

Ο HIF-1α αποτελεί στόχο ενός μεγάλου αριθμού κινασών. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α επηρεάζει τη σταθεροποίηση του, την μετατόπιση στον πυρήνα και τη μεταγραφική του δράση (Kietzmann T et al, 2016)

Διάφορες θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν βρεθεί για την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), η ρύθμιση από την οποία είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του οξυγόνου και της δράσης του pVHL και των PHDs. Συνέπεια της φωσφορυλίωσης αυτής είναι η αποικοδόμηση του HIF-1α που επιτελείται μέσω συμπλόκου ειδικών πρωτεϊνών (Flugel D et al,2007).

Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις p42/44 MAPK (ERK1/2) στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση ενός σήματος πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES) του HIF-1α, που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη CRM1 (chromosomal maintenance 1), τον βασικό υποδοχέα εξαγωγής από τον πυρήνα κυττάρων θηλαστικών. Με αυτόν τον τρόπο, ο HIF-1α, τελικά, παραμένει στον πυρήνα του κυττάρου, συνδέεται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Mylonis I et al,2006), (Mylonis I et al, 2008).

Τροποποιήσεις της C-TAD από τις κινάσες καζεΐνης (Casein Kinase, CKs) 1 και 2 μπορούν, επιπλέον, να ρυθμίσουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Αναλυτικότερα, η CK2 δείχθηκε ότι είναι θετικός ρυθμιστής της δράσης του HIF-1, εφόσον αναστολή της μειώνει τη δράση του. Η CK2, σε υποξία, είχε βρεθεί αρχικά να φωσφορυλιώνει τον HIF-1 στη θρεονίνη 796 (Gradin K et al,2002) και να επάγει τη δράση του μέσω αναστολής της εξαρτώμενης από την FIH υδροξυλίωσης του (34). Αντίθετη επίδραση παρουσιάζει η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την EE1δ στη σερίνη 247 που μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 αποσταθεροποιώντας το σύμπλοκο HIF-1α/ARNT (Kalousi A et al, 2010).

Λιγότερο μελετημένη είναι η επίδραση της ακετυλίωσης του HIF-1α. Ακετυλίωση σε κατάλοιπο λυσίνης στη θέση 531 από την ακετυλοτρανσφεράση Arrest Defective protein-1a (ARD1) αποσταθεροποιεί τον HIF-1α, προάγοντας την αλληλεπίδραση με τον pVHL. Σε συνθήκες υποξίας η έκφραση της ARD1 μειώνεται με αποτέλεσμα η μειωμένη ακετυλίωση του HIF-1α να συμβάλλει στη σταθεροποίηση του σε συνθήκες υποξίας (Jeong JW et al, 2011).

Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση της σουμοϋλίωσης του HIF-1α από τον μικρό τροποποιητή τύπου ουβικιτίνης (SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier) στη σταθερότητα του και τη μεταγραφική του ενεργότητα (Lij et al, 2014). Αρχικά, είχε βρεθεί ότι σουμοϋλίωση του HIF-1α σε 2 κατάλοιπα λυσίνης οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α (Bue SH et al, 2004). Μετέπειτα, αντικρουόμενες μελέτες υπέδειξαν ότι σουμοϋλίωση του HIF-1α μειώνει τη μεταγραφική του ενεργότητα (Berta MA et al, 2007), αλλά μπορεί και να προάγει την αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω του pVHL, ενώ αντίθετο αποτέλεσμα παρουσιάζει η από-σουμοϋλίωση του από την ειδική πρωτεάση του SUMO 1 (SUMO-specific protease 1, SENP1) (Cheng J et al, 2007).

3.5.4 Ο ρόλος του HIF-1 στο μεταβολισμό των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων.

Ο HIF επιδρά στον μεταβολισμό των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων (Dengler VL et al, 2014). Στα φυσιολογικά κύτταρα η απαιτούμενη ενέργεια για την επιβίωση και ανάπτυξη, προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία εξαρτάται από την συγκέντρωση του οξυγόνου. Τα κύτταρα προσαρμόζονται στο υποξικό περιβάλλον μέσω της δράσης των HIF, οι οποίοι ενεργοποιούν γονίδια που σχετίζονται με την αλλαγή του μεταβολισμού των υδατανθράκων από οξειδωτική φωσφορυλίωση σε αναερόβια γλυκόλυση. Συγκεκριμένα, οι HIF προάγουν την πρόσληψη και τον καταβολισμό της γλυκόζης μέσω επαγωγής γονιδίων μεταφορέων γλυκόζης (glucose transporter 1-GLUT1) και γονιδίων γλυκόλυσης αντίστοιχα, όπως η εξωκινάση-2 (hexokinase 2, HK2). Παράλληλα, οι HIF επάγουν γονίδια που αναστέλλουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως η κινάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1) ή κατευθύνουν προς τη γλυκόλυση, όπως η

γαλακτική δεϋδρογονάση (Lactate Dehydrogenase, LDH). Η αυξημένη ροή της γλυκόλυσης αποτελεί ένα πλεονέκτημα για την κυτταρική επιβίωση, μέσω άμεσης και αναερόβιας παραγωγής ATP (Majmundar AJ et al, 2010).

Ο ρόλος των HIF είναι σημαντικός σε φυσιολογικές καταστάσεις, όπως η εμβρυογένεση αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ισχαιμία, η φλεγμονή η ίνωση και η νεοπλασματική νόσος (Semenza GL, 2012). Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αλλαγές στη μεταβολική τους δραστηριότητα, με κυρίαρχη την αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης και της αναερόβιας γλυκόλυσης, φαινομένου γνωστού ως «Warburg effect». Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν και οι παράγοντες HIF που ενεργοποιούνται στο υποξικό μικροπεριβάλλον του όγκου (Del Rey MJ et al, 2017) και ευοδώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, υποδεικνύοντας έτσι την πιθανότητα να αποτελέσουν συμπληρωματικό στόχο της αντικαρκινικής θεραπείας (Semenza GL, 2012).

3.5.5 Προγνωστικοί παράγοντες

Η χρήση ιστικών μικροσυστοιχιών έχει επιτρέψει την συγκριτική αξιολόγηση ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών (Junker et al, 2000, Takahasi et al 2001) σε πολλαπλούς όγκους με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανοσοφαινοτυπικού προφίλ που περιλαμβάνει και ορισμένους δείκτες με προγνωστική σημασία για τους ασθενείς με διαγνοκυτταρικό καρκίνωμα (Gonzalzo et al 2004, Kosari et al 2005, Jones et al 2005).

Ένας πολύ σημαντικός προγνωστικός παράγοντας είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF. Η λειτουργική (μέσω μεταλλάξεων) απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και λαμβάνει χώρα σε πάνω από 70% των όγκων, οδηγεί στη σταθεροποίηση του HIF-1a παράγοντα και στη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF. Η ανεξέλεγκτη αύξηση του όγκου συνοδεύεται από ανώμαλη σηματοδότηση με αποτέλεσμα, ανάμεσα στα άλλα και την παραγωγή ανώμαλων τριχοειδών αγγειακών κλάδων, ανεπαρκώς να υποστηρίξουν την διαρκώς αυξανόμενη κυτταρική μάζα. Έτσι αναπτύσσονται πολλαπλές περιοχές ιστικής υποξίας σε ποικίλες θέσεις του συμπαγούς όγκου (Wolf G et al, Stiehl Dp et al) Η άμεση ανταπόκριση του νεο-

πλασματικού κυττάρου στην υποξία εκδηλώνεται με την υπερέκφραση του επαγόμενου από υποξία παράγοντα 1 και 2 (HIF-1,2) (Feldser et al) και της GLUT-1 (Van Uden P et al, Bonello S et al).

Η υποξία στο μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελεί έναν από τους παράγοντες που συσχετίζονται με περισσότερο επιθετική βιολογική συμπεριφορά (Ref). Η έκφραση των HIF-1a πρωτεϊνών ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία σε ποσοστό 40 – 81% των διαυγοκυτταρικών καρκινωμάτων (Wiesener et al, 2001, Na et al, 2003, Gong et al, 2005, Shao et al, 2005, Zhang et al, 2006) και έχει συσχετισθεί με την πρόγνωση.

3.6 Υποξία του όγκου και CAIX

Επιπρόσθετα, πρώιμη αντίδραση στην υποξία αποτελεί και η υπερέκφραση της καρβονικής ανυδράσης IX (CAIX) στην επιφάνεια των υποξικών κυττάρων του όγκου. Μελέτες σε κύτταρα HeLa (Pastorek J et al) έχουν καταδείξει ότι η έκφραση της CAIX επάγεται από τον HIF 1-a.

Η CAIX είναι μία διαμεμβρανική διμερής πρωτεΐνη (De Simone G et al) που ανήκει στη μεγάλη οικογένεια μεταλλικών ενζύμων του ψευδαργύρου, τα οποία δρουν ως καταλύτες στην αναστρέψιμη ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) προς όξινο ανθρακικό άλας και πρωτόνιο ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3 + \text{H}$) (Supuran C T et al). Στη συνέχεια η CAIX λειτουργεί ως “καταλυτικός μετατροπέας” ο οποίος (Swietach W T et al) μεταφέρει διττανθρακικό άλας μέσα στο κυτταρόπλασμα των κακοήθων κυττάρων, προστατεύοντας έτσι το κυτταρόπλασμα από τα χαμηλά επίπεδα του pH (Neri D et al, Fang J S et al), ενώ ταυτόχρονα αναγκάζει τα πρωτόνια να συγκεντρωθούν στον εξωκυττάριο χώρο, συμβάλλοντας στην περαιτέρω οξισοποίηση του εξωκυττάρου μικροπεριβάλλοντος.

Σε φυσιολογικές καταστάσεις παρατηρείται παροδική υπερέκφραση της CAIX. Για παράδειγμα, στα σχετικά υποξικά εμβρυϊκά περιβάλλοντα, παρατηρείται έκφρασή της σε ανώριμους ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης, σε επιδερμικά και επενδυματικά κύτταρα (Liao S Y et al). Σε νορμοξικούς ιστούς ενηλίκων, η δράση της CAIX επηρεάζει σε κάποιο βαθμό τη λειτουργικότητα των πλαγιοβασικών επιφανειών των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρικού βλεννογόνου (Hilvo M et al) καθώς και των πολλαπλασιαζόμενων κρυπτών του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του βλεννογόνου του ειλεού (Saarnio et al). Επίσης παρατηρείται δράση της CAIX στα φυσιολογικά μεσοθηλιακά

κύτταρα [Kaluz et al] στο ορχικό και ωοθηκικό δίκτυο [Kaluz et al, Karhuma et al], στη χοληδόχο κύστη και στις παγκρεατικές αδενοκυψέλες [Kivela et al], και ιδιαίτερα στα τριχοθυλάκια και στους σημηματογόνους του δέρματος [Liao et al, Kaluz et al, Kivela et al]. Συνολικά, η έκφραση της CAIX σε φυσιολογικούς ιστούς ενήλικων, φαίνεται να σχετίζεται με τη κυτταρική προέλευση και τη λειτουργική κατάσταση (Liao et al). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της CAIX παρατηρούνται στα βασικά κύτταρα των πλακωδών ή αναπνευστικών κυττάρων του επιθηλίου σε περιοχές ιστικής επούλωσης μετά από τραυματισμό ή φλεγμονή (Liao et al).

Στα κακοήθη νεοπλάσματα, και ιδιαίτερα στους συμπαγείς όγκους, η CAIX υπερεκφράζεται συχνά, αν και η υπερέκφρασή της δεν συσχετίζεται με τον εκάστοτε ιστολογικό τύπο. Η δράση της CAIX έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των γειτονικών φυσιολογικών κυττάρων και την επιτάχυνση της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας (31,32), ευνοώντας με τον τρόπο αυτό την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό (33), τη διήθηση και την μεταστατική δραστηριότητα των ανθεκτικών στην υποξία καρκινικών κυττάρων (Swietach et al, Parks et al, Stubs et al-Fischer et al) ενώ έχει συσχετισθεί επίσης με βραχύτερη επιβίωση των ασθενών [Pastorek et al, Swinson et al-Brennan et al].

Πέραν του ελέγχου του pH στο μικροπεριβάλλον του όγκου, η CAIX συμβάλλει σε μία σειρά ιδιότητες του όγκου. Η γενετική σίγαση της CAIX σε πειραματικά μοντέλα όγκων in vivo έχει επιβεβαιώσει την ανάγκη ενεργοποίησης της CAIX για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των όγκων σε συνθήκες υποξίας καθώς και για την εκδήλωση της μεταστατικής τους συμπεριφοράς (Mueller et al). Η CAIX διαταράσσει τις κυτταρικές συνδέσεις, μέσω ανταγωνισμού με την E- Cadherin/catenin (Mueller et al- Shin et al) και συμμετέχει στην ανάπτυξη επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής του καρκινικού κυττάρου (EMT) (Shinn et al), που του προσδίδει ικανότητα ταχύτερης επέκτασης και μεταστατικής διήθησης.

Η φαρμακευτική παρέμβαση έναντι της CAIX, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ή ειδικών αναστολέων της CAIX, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Επιπλέον, η φαρμακευτική καταστολή της CAIX αύξησε σημαντικά την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας και της χημειοθεραπείας σε πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, αυξάνοντας το ρυθμό αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στα νεοπλασματικά κύτταρα (Proeschold et al). Άλλες πρόσφατες

μελέτες αναφέρουν πως οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης (π.χ. imatinib και nilotinib) δρουν επίσης κατασταλτικά και για την CAIX των καρκινικών κυττάρων (Ahlskog et al-Parkila et al).

Εντούτοις, η προβλεπτική αξία της CAIX στην ταυτοποίηση των φαρμακοάντοχων καρκίνων δεν έχει τεκμηριωθεί προφανώς διότι η ανάπτυξη φαρμακευτικής αντίστασης οφείλεται σε πολύπλοκες διαδικασίες ως συνέπεια ποικίλων τυχαίων αλλαγών στο παρακείμενο περιβάλλον του όγκου(Saunders et al).

Τα ανωτέρω δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αναστολή της CAIX στα κακοήθη νεοπλάσματα θα μπορούσε ενδεχομένως να αποτελεί συμπληρωματική θεραπευτική στόχευση τουλάχιστον σε προχωρημένους όγκους (Lock et al).

3.7 CAIX στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, παρατηρείται συχνή υπερέκφραση της CAIX στο διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (95 έως και 100% των περιπτώσεων). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση παρατηρείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων (Kaluz et al,Stillebroer et al-Tostain et al).

Δεδομένης της συχνής υπερέκφρασης της CAIX στο διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, ο συγκεκριμένος δείκτης χρησιμοποιείται διαγνωστικά στην ιστοπαθολογική εξέταση του όγκου.

Επιπλέον, σε πρόσφατες μελέτες έχει καταδειχθεί η σημασία της CAIX στην πρόγνωση του όγκου. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση συνδέεται με ευνοϊκότερη πρόγνωση (Kaluz et al), και μεγαλύτερη επιβίωση ασθενών με μεταστατική νόσο. Επίσης σε περίπτωση εντοπισμένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος, η υπερέκφραση της CAIX έχει συσχετισθεί με ελάχιστη ή και αμελητέα πιθανότητα υποτροπής. Υπάρχουν ενδείξεις ότι σε αυτούς του όγκους, η CAIX θα μπορούσε να έχει ρόλο τσαπερόνης με ανοσοενισχυτική δράση, κάτι που ενδεχομένως θα δικαιολογούσε την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με IL-2, (Wang et al,Donato et al).

Στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL, σταθεροποιεί τον HIF- 1a τόσο σε νορμοξία, όσο και σε υποξία, γεγονός το οποίο δηλώνει ότι η υπερέκφραση της CAIX, η οποία παρατηρείται οφείλεται σε μηχανισμούς ανεξάρτητους από την υποξία. (Wykoff et al –Wang et al)

Πιστεύεται επίσης ότι η υψηλή έκφραση της CAIX σε όγκους RCC μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας θετικής ανάδρασης βρόγχου που επάγεται από τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ο οποίος συχνά υπερεκφράζεται στο RCC. Σύμφωνα με πρόσφατα αποτελέσματα, ο EGFR φωσφορυλιώνει την CAIX στον ενδοκυττάριο τμήμα της (CAIX-pY), με επακόλουθη ενεργοποίηση της Akt και ενεργοποίηση του HIF-1a, που με τη σειρά του ενισχύει την έκφραση της CAIX διευκολύνοντας έτσι τις αλλαγές στο νεοπλασματικό υπόστρωμα και τη νεοπλασματική διήθηση (Dorai et al)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1α έχει κομβική σημασία στην επιβίωση των κακοήθων κυττάρων. Σε αυτό το μονοπάτι συμμετέχει ενεργά η καρβονική ανυδράση IX. Αν και η έκφραση του παράγοντα HIF-1α και της CAIX είναι γνωστή στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, εντούτοις υπάρχουν ορισμένα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα σχετικά με την σημασία τους στο βαθμό κακοήθειας και κατέπекταση στην πρόγνωση των ασθενών. Για παράδειγμα έχει αναφερθεί στην έρευνα της Leticia Serrano Oviedo et al ότι η έκφραση της CAIX στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα φαίνεται ότι είναι συνεπής και για αυτό πρέπει να θεωρηθεί ένας χαρακτηριστικός και αποκλειστικός δείκτης του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος. Παρ' όλο το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης, η χρήση της ως προγνωστικό δείκτη δεν είναι σαφής και το ζήτημα εξακολουθεί να είναι υπό συζήτηση. Ωστόσο η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της είναι αυτό που θα τη συσχετίσει με τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Επίσης ο Klatter et al στη μελέτη του διαπίστωσε θετική σχέση του HIF-1 α με τα νεφρικά κύτταρα, στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, αλλά καμία σχέση με το στάδιο του όγκου, τον πυρηνικό βαθμό κατά Furhman και την ανοσοϊστοχημική έκφραση για τον HIF-1 α

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του HIF-1α, σε εγχειρητικά παρασκευάσματα νεφροκυτταρικού καρκίνου, διαυγοκυτταρικού τύπου και η συσχέτιση της με την έκφραση της CAIX και με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΥΛΙΚΑ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σε αρχειακό υλικό του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Μελετήθηκαν ιστολογικές τομές καρκινωμάτων σε εγχειρητικά παρασκευάσματα 42 ασθενών. 27 ασθενείς ήταν άρρενες και 15 θήλεις. Μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 67 έτη με εύρος από 50-79 έτη.

Όλοι οι ιστοί είχαν μονιμοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης και είχαν σκηνωθεί σε παραφίνη. Αρχικά μελετήθηκε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε πολλαπλές τομές για την αναγνώριση και ταξινόμηση του ιστολογικού τύπου και του πυρηνικού βαθμού (grade) κατά Furrhman. Τα δεδομένα με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αναγράφονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 1 που ακολουθεί.

Παράμετρος		Μέτρηση
Ηλικία (έτη)	Μέσος όρος	67
	Εύρος	50-79
Φύλο	Άρρεν	27(64,28%)
	Θήλυ	15 (35,7 %)
Ιστολογικός βαθμός	Furhman 1	2 (4,8%)
Ιστολογικός βαθμός	Furhman 2	17 (40,5%)
Ιστολογικός βαθμός	Furhman 3	15 (35,7%)
Ιστολογικός βαθμός	Furhman 4	8 (19%)
Εντόπιση όγκου	Αριστερά	20 (47,62%)
	Δεξιά	22 (52,38 %)
Διήθηση νεφρικής φλέβας		
	Αρνητική	36 (85,7 %)
	Θετική	6 (14,3 %)
Αγγειακή διήθηση		
	Αρνητική	35 (83,3%)
	Θετική	7 (16,7%)
Περινευρική διήθηση		
	Αρνητική	39 (92,8%)
	Θετική	3 (7,2%)

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Ανοσοϊστοχημική χρώση πραγματοποιήθηκε για τους επίτοπους: HIF-1α, CAIX Χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές ιστού 4 μm. Για την αποπαραφίνωση των τομών έγινε εμβάπτιση τους σε διάλυμα ξυλόλης και ακολούθησε ενυδάτωση τους με χρήση διαλυμάτων αλκοόλης μειούμενης συγκέντρωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε θερμικώς επαγόμενη ανάκτηση επίτοπου. Η διαδικασία ανάκτησης περιλαμβάνει εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων που φέρουν τις ιστολογικές τομές σε αραιωμένο διάλυμα Target Retrieval Solution (Dako, 0.01 M κιτρικό νάτριο pH 6.0 και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων (LG Wavedom, 850W). Εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε η ανοσοϊστοχημική διαδικασία δυο βημάτων EnVision+ Dual Link System-HRP (Dako), με έτοιμα προς χρήση διαλύματα.

Το σύστημα αυτό βασίζεται σε ένα πολυμερές σημασμένο με HRP που είναι συζευγμένο με δευτεροταγή αντισώματα. Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: για τον HIF-1α (H1a67, aa 432-528, IgG2b; Novus Biologicals, Littleton CO, dilution 1:25), και για την CAIX (EPR415, rabbit monoclonal, Epitomics CA dilution 1:250).

Για τον HIF-1α η επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα διήρκησε όλη τη νύχτα στους 4 οC, ενώ για την CAIX μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν εφαρμόστηκε διάλυμα χρωμογόνου στα δείγματα (DAB, 3,3 διάμινοβενζιδίνη) με επώαση 5 λεπτών. Τέλος οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίσθηκαν σε υδατική αιματοξυλίνη.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές από νεφροκυτταρικό καρκίνωμα με γνωστή μετάλλαξη VHL.

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές οι οποίες επώασθηκαν με μη αντιγονικό ορό αντί για το πρωτοταγές αντίσωμα.

4.2.2 Αξιολόγηση τη Ανοσοϊστοχημείας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της εντόπισης και της έκτασης της χρώσης ως ποσοστό θετικότητας στην ιστολογική τομή του όγκου. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε, η ένταση και η ποιότητα αυτής, στα καρκινικά κύτταρα του όγκου

Θετική έκφραση HIF-1α θεωρήθηκε η πυρηνική έκφραση σε νεοπλασματικά κύτταρα σε ποσοστό >10% επί του συνόλου των καρκινικών κυττάρων της ιστολογικής τομής.

Ως θετική έκφραση CAIX θεωρήθηκε η ανοσοϊστοχημική αντίχνευση στη μεμβράνη ή/και στο κυτταρόπλασμα σε οποιοδήποτε ποσοστό νεοπλασματικών κυττάρων.

Ποσοτικοποίηση των επιπέδων του HIF-1α

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Hif-1a βασίστηκε στην αξιολόγηση της έκτασης και της έντασης της χρώσης. Για τον υπολογισμό των επιπέδων του HIF-1α χρησιμοποιήθηκε το Q score (Quick score), το οποίο δίνεται από τον τύπο:

$Q = \text{ποσοστό \% πυρήνων που εκφράζουν τον HIF-1α} \times \text{Ένταση χρώσης I}$

Δηλαδή, $Q = P \times I$

Η ένταση της χρώσης υπολογίστηκε με βάση τη παρακάτω κλίμακα

0 πόντοι- δεν παρατηρείται χρώση

1 πόντος – ασθενής ένταση χρώσης

2 πόντοι – μέτρια ένταση χρώσης

3 πόντοι – έντονη ένταση χρώσης

Η μέγιστη τιμή που μπορεί να έχει το Q είναι το 300, ενώ η ελάχιστη είναι το 0

Ποσοτικοποίηση των επιπέδων CAIX

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του CAIX βασίστηκε στην έκταση και την ένταση της χρώσης. Για τον υπολογισμό των επιπέδων της CAIX χρησιμοποιήθηκε το Q score (Quick score), το οποίο δίνεται από τον τύπο:

$Q = \text{ποσοστό \% κυττάρων που εκφράζουν τον CAIX} \times \text{Ένταση χρώσης I}$

Δηλαδή, $Q = P \times I$

Η ένταση της χρώσης υπολογίστηκε με βάση τη παρακάτω κλίμακα

0 πόντοι- δεν παρατηρείται χρώση

1 πόντος – ασθενής ένταση χρώσης

2 πόντοι – μέτρια ένταση χρώσης

3 πόντοι – έντονη ένταση χρώσης

Η μέγιστη τιμή που μπορεί να έχει το Q είναι το 300, ενώ η ελάχιστη είναι το 0

4.3 Στατιστική επεξεργασία

Όλες οι συγκρίσεις καθώς και ο έλεγχος της συσχέτισης έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας παραμετρικές και μη παραμετρικές δοκιμασίες. Εφόσον βρέθηκε ότι υπήρχε κανονικότητα (χρησιμοποιήθηκε το Kolmogorov- Smirnov test για να βρεθεί η κανονικότητα) στις τιμές του HIF-1 α και της CAIX, χρησιμοποιήθηκε correlation analysis για να βρεθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ τους. Στα ποιοτικά χαρακτηριστικά ή σε εκείνα, τα οποία δεν εμφάνιζαν κανονικότητα και για να βρούμε τη σχέση της CAIX και του HIF-1 α με το φύλλο, την ηλικία, την εντόπιση, τη διήθηση, κτλ χρησιμοποιήσαμε το Kruskal- Wallis test (όλοι οι παράγοντες μαζί με τον υπό συσχέτιση παράγοντα πχ CAIX ή HIF-1 α , οι παραπάνω παράγοντες στη προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ως grouping variables). Εδώ αφού ποσοτικά χαρακτηριστικά μετατράπηκαν σε ποιοτικά με βάση τους μέσους όρους τους (ηλικία μ.ο.=66,9 έτη 0 έως 67 έτη και 1 πάνω από 67, το ίδιο έγινε με τον HIF-1 α μ.ο.=1,0738 και της CAIX μ.ο.=1,5976), που χρησιμοποιήθηκαν ως cutoff points έγινε το test με σκοπό να βρούμε στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ τους. Στη προκειμένη περίπτωση το φύλλο κωδικοποιήθηκε με 0 και 1 (άντρες, γυναίκες). Ο Grade Furhman κωδικοποιήθηκε και αυτός σε 0 και 1 (1-2, 3-4). Επίσης η δεξιά εντόπιση του όγκου κωδικοποιήθηκε ως 1 και η αριστερή ως 0. Ακόμη η διήθηση της νεφρικής φλέβας, η αγγειακή

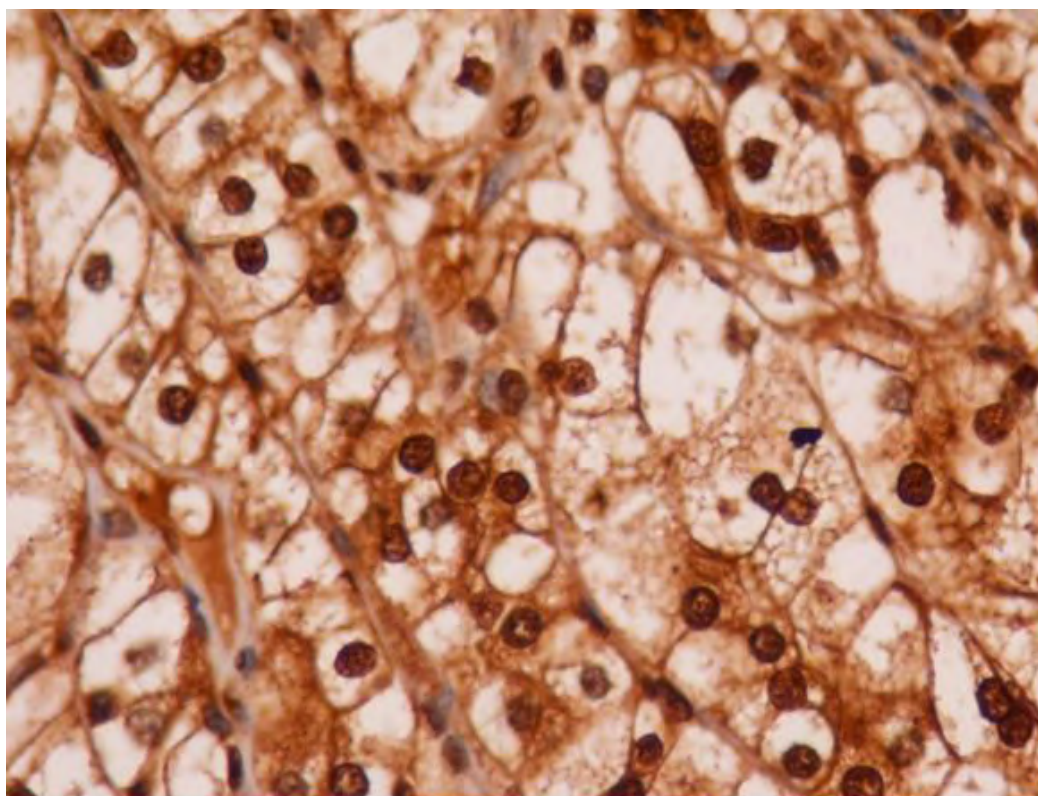
διήθηση και η περινευρική διήθηση, όταν δεν υπήρχαν κωδικοποιήθηκαν ως 0 και όταν υπήρχαν κωδικοποιήθηκαν ως 1. Εκεί που βρέθηκαν διαφορές συνεχίσαμε με Mann-Whitney test(συσχέτιση ανά 2 πχ Grade Fuhrman με CAIX)για να έχουμε πιο ακριβή στατιστικά αποτελέσματα. Αυτό συνέβη διότι οι τιμές της CAIX και του HIF-1 α έμειναν τώρα στην ποσοτική τους μορφή, διότι ως grouping variable χρησιμοποιήθηκε ο Grade Fuhrman και ο βαθμός διήθησης των αγγείων(στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα). Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS v24 software (IBM, USA). Μετρήσεις με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

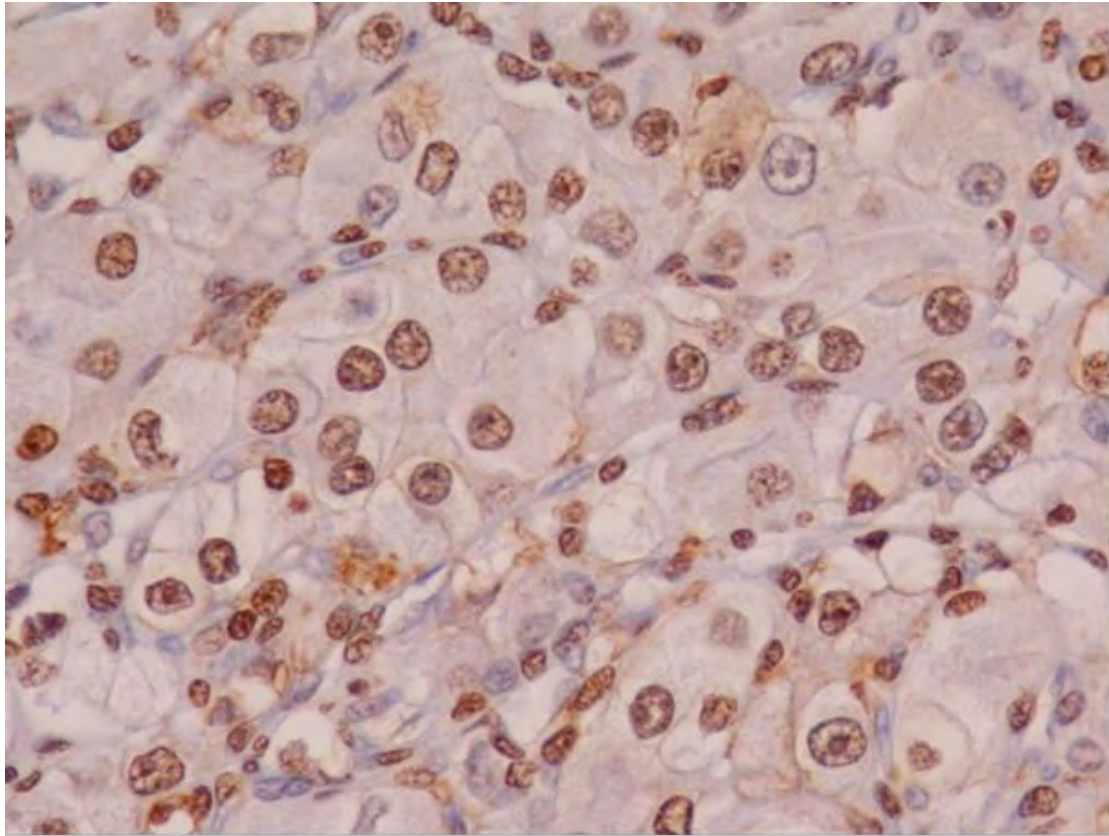
5.1.1 Έκφραση HIF-1α

Θετική πυρηνική χρώση παρατηρήθηκε σε 42 δείγματα (100%), Σε όλες τις θετικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε πυρηνική εντόπιση της χρώσης. (Εικόνα 1).



Εικόνα 1

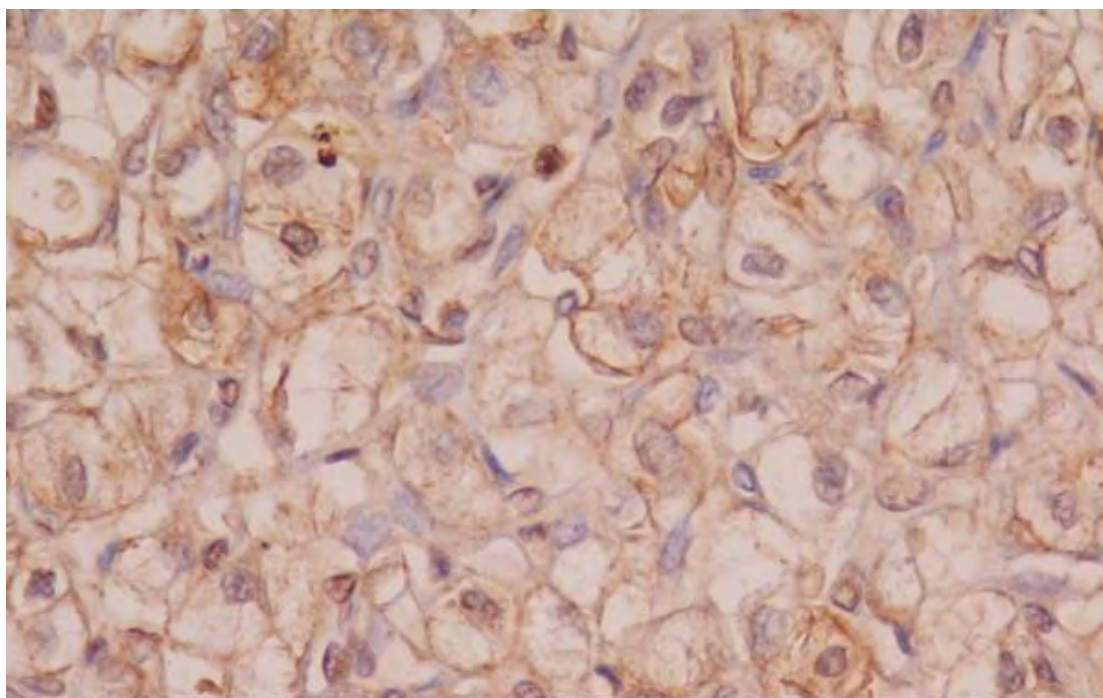
(Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α σε περίπτωση διαυγοκυτταρικού νεφροκυτταρικού καρκίνου (μεγέθυνση 40X). Η χρώση είναι πυρηνική και παρατηρείται στο σύνολο των νεοπλασματικών κυττάρων. Η ένταση της χρώσης είναι έντονη) Το μεγαλύτερο ποσοστό έντονης θετικότητας αφορούσαν σε όγκους Furhman 2 (40,5%), ενώ το υψηλότερο ποσοστό των περιπτώσεων με έντονη θετικότητα παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις κατά Furhman 2 (40,5%) και 3 (35,7%) .



\

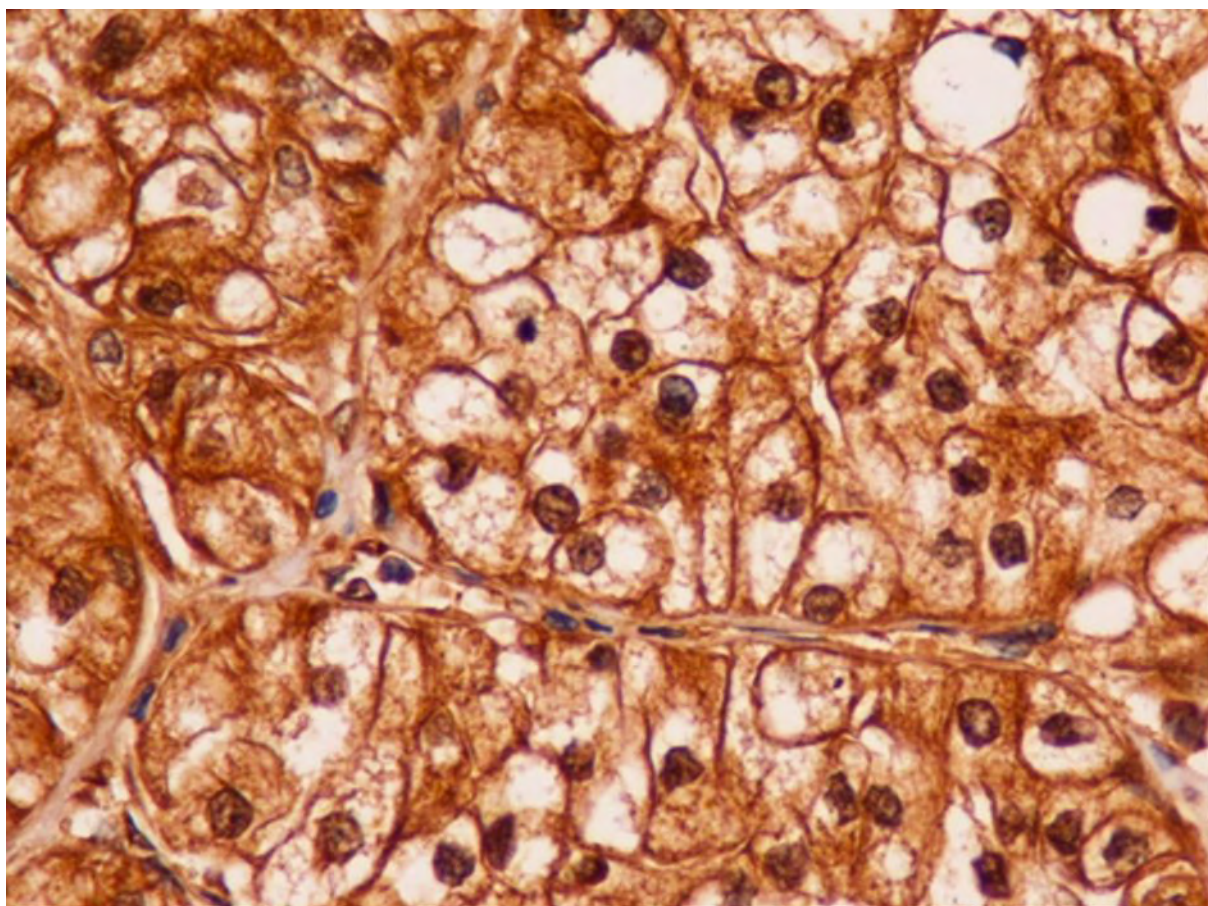
Εικόνα 2

(Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α σε περίπτωση διαυγοκυτταρικού νεφροκυτταρικού καρκίνου (μεγέθυνση 40X). Η χρώση είναι πυρηνική και παρατηρείται σε μεγάλο αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων. Η ένταση της χρώσης είναι μέτρια.)



Εικόνα 3

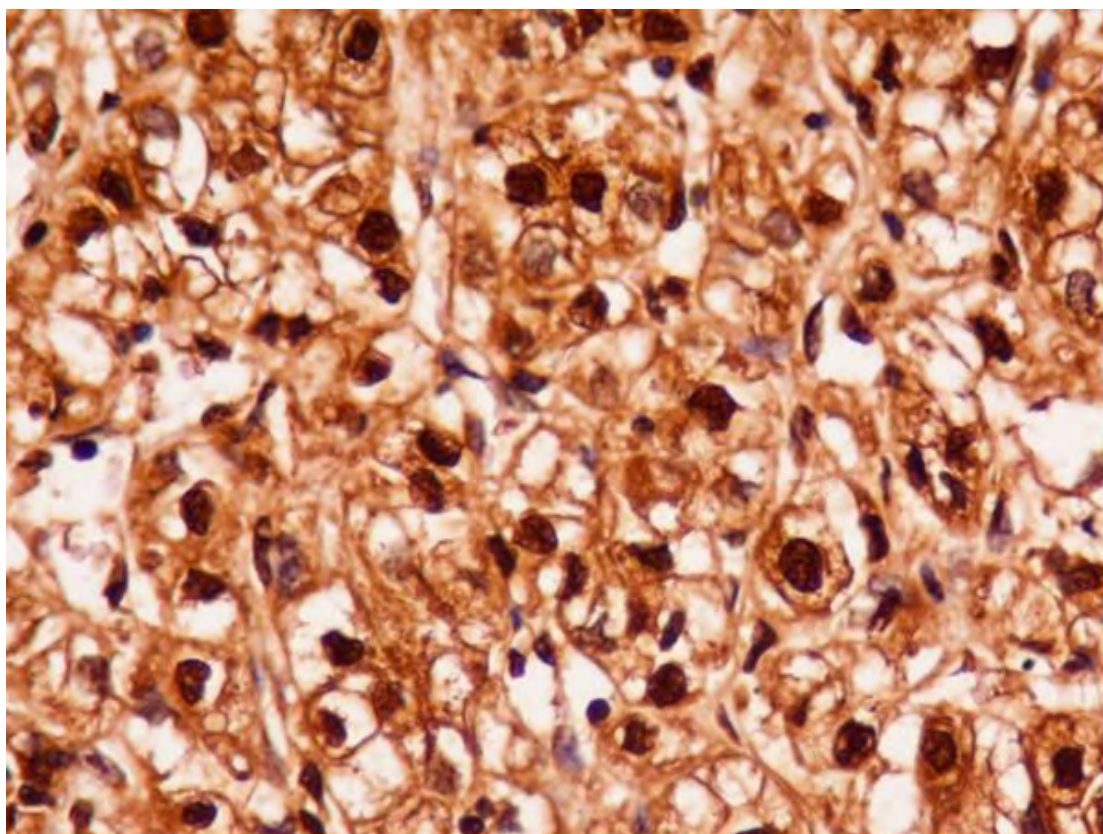
(Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α σε ελάχιστα κύτταρα διαυγοκυτταρικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος (μεγέθυνση 40X). Η χρώση είναι πυρηνική, ασθενής σε ένταση.)



Εικόνα 4

(Έντονη, θετική πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α σε διαυγοκυτταρικού

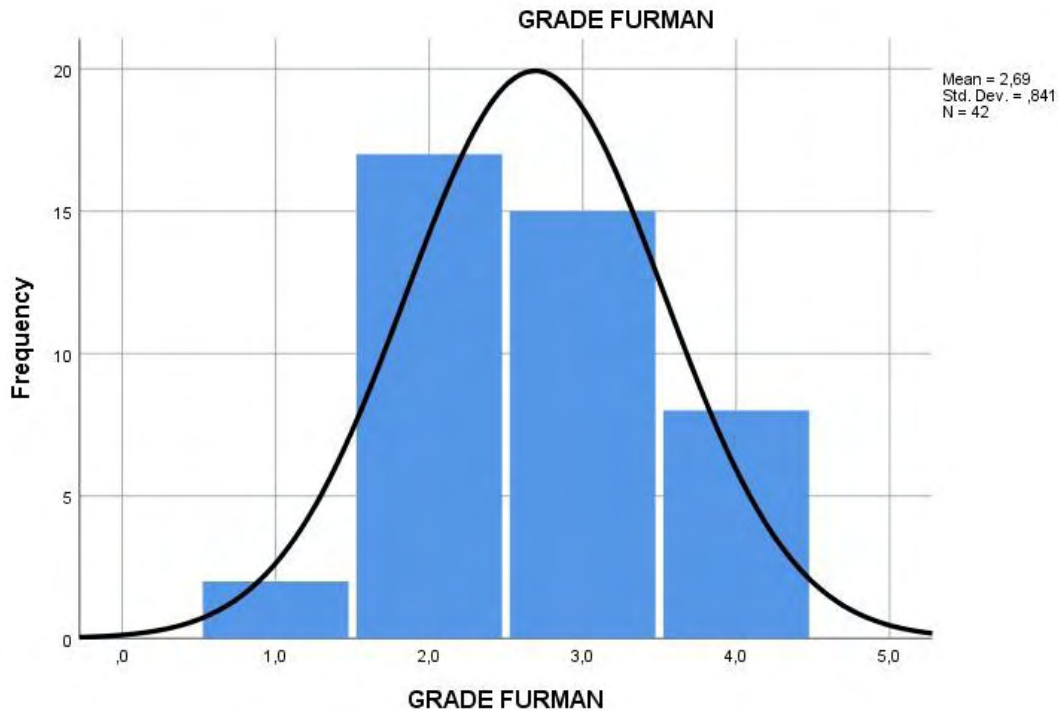
νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, Furhman grade 3 (μεγέθυνση 40X).)



Εικόνα 5

(Έντονη, θετική πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α σε διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, Furhman grade 4 (μεγέθυνση 40X).

Histogram



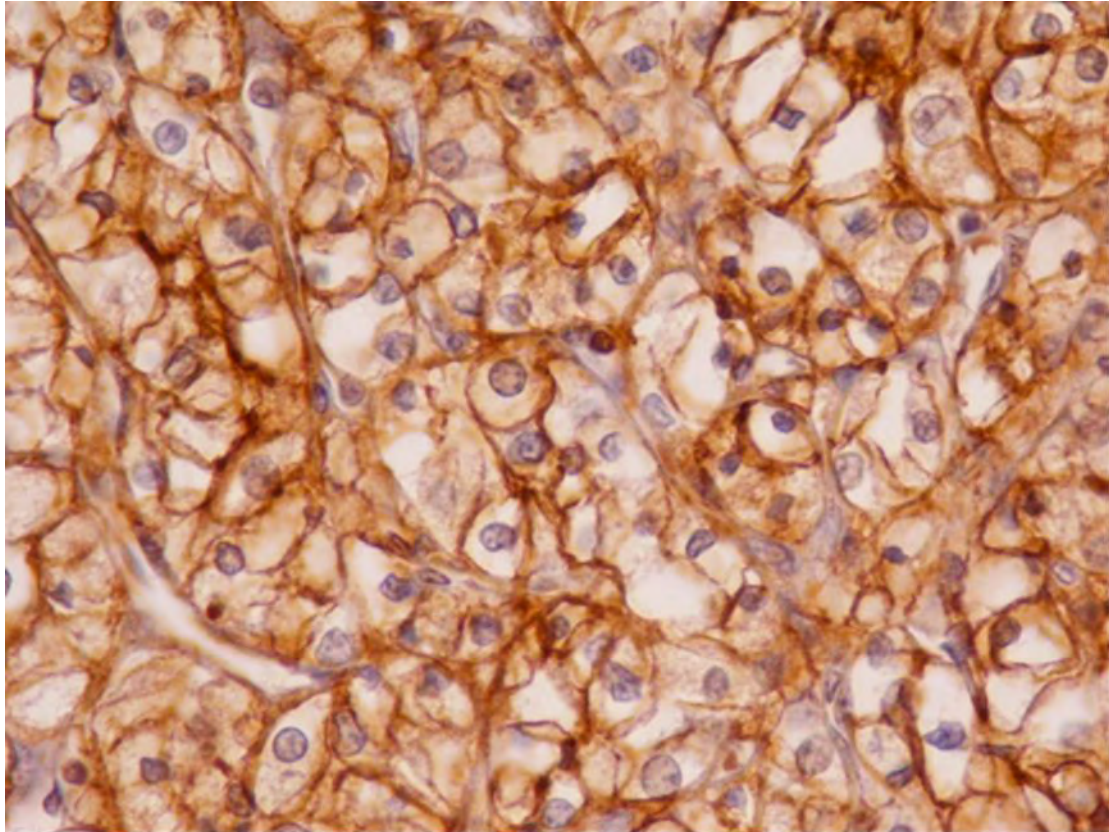
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της έκφρασης με τον ιστολογικό βαθμό της grade κατά Furhman. ($p=0,001$). Όταν συγκρίθηκε η έκφραση του HIF- 1 α μεταξύ νεοπλασματικών όγκων Furhman 1 και 2 και καρκινωμάτων Furhman 3 και 4, βρέθηκε ότι εκφράζεται περισσότερο στα καρκινώματα κατά Furhman 3-4 και η διαφορά μεταξύ τους ήταν στατιστικά σημαντική ($P=0.001$) (asymt. Sig. 2-tailed).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης της HIF-1 α και της ηλικίας, του φύλου, της δεξιάς ή αριστερής εντόπισης του όγκου, (παράμετροι απο πίνακα 1)

Παρομοίως μη στατιστικά σημαντική ήταν και η σχέση του HIF-1a με την διήθηση της αγγειακής φλέβας ($p=0,081$) και της περινευρικής διήθησης ($p=0,076$) αν και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με την αγγειακή διήθηση ($p= 0,041$)

5.1.2 Έκφραση CAIX

Όλα τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα της μελέτη παρουσίαζαν έκφραση CAIX.



Εικόνα 6

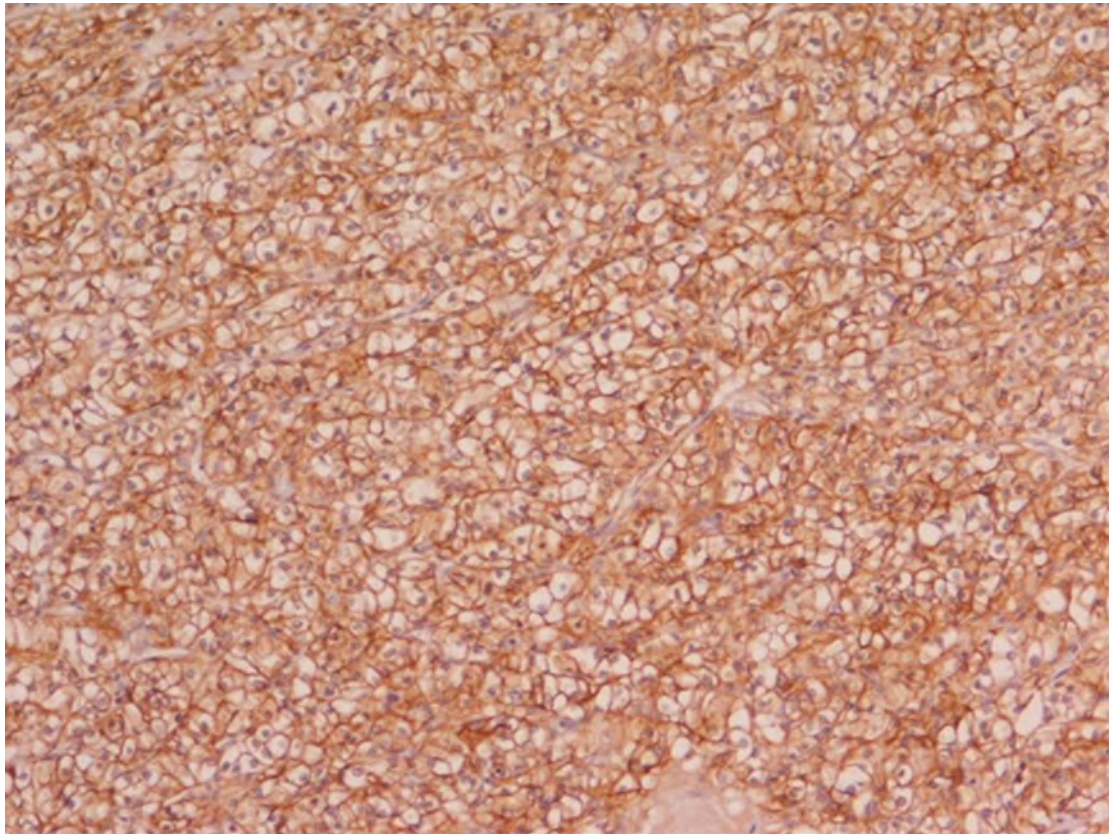
(Έντονη, θετική χρώση για CAIX σε όλα τα κύτταρα διαυγοκυτταρικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος με μεμβρανική εντόπιση (μεγέθυνση 40X).)

Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση της CAIX παρουσιάζεται στην Εικόνα 2 Η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε στην κυτταρική μεμβράνη ενώ παρατηρήθηκε ασθενέστερη έκφραση και στο κυτταρόπλασμα σποραδικών κυττάρων του όγκου. Η κατηγορία “έντονη έκφραση” αφορούσε σε ποσοστό 45,3% (23/42), η κατηγορία “ασθενής έκφραση” σε ποσοστό 44,7% (19/42).

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης της CAIX και grade Furhman του όγκου ($p=0.003$). Όταν συγκρίθηκε η έκφραση της CAIX μεταξύ ασθενών με όγκους Furhman 1 και 2 και ασθενών με όγκους Furhman 3 και 4, βρέθηκε ότι

εκφραζόταν περισσότερο σε όγκους κατά Furhman 3-4 και υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους $P=0,003$), (asymt. Sig. 2-tailed).

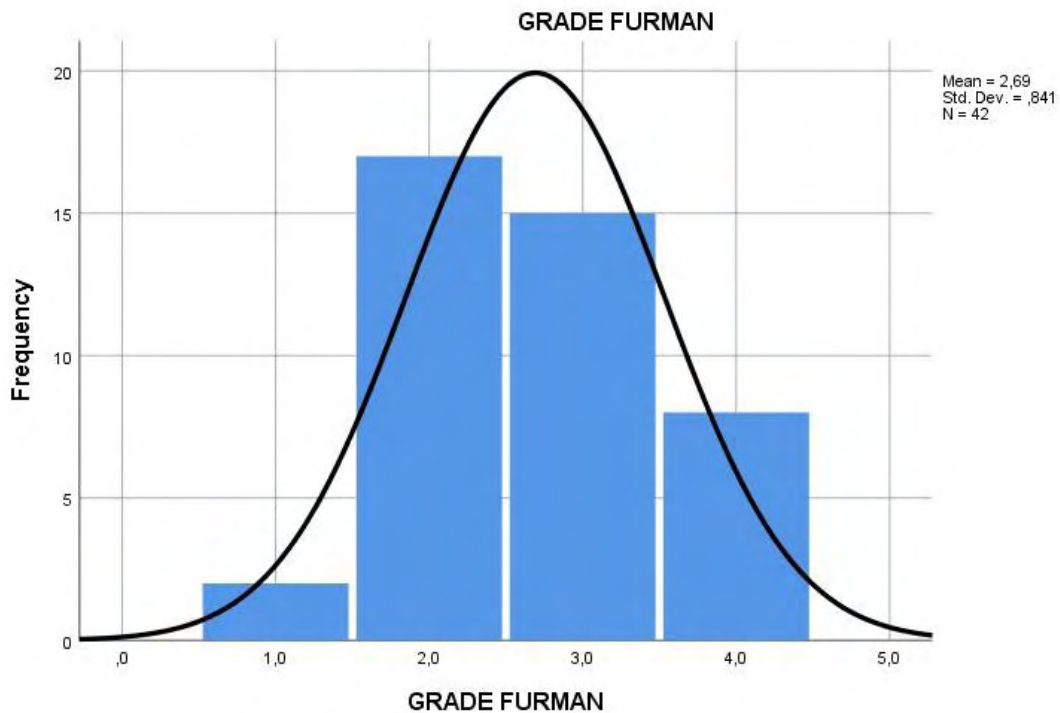
Το μεγαλύτερο ποσοστό έντονης θετικότητας αφορούσαν σε όγκους Furhman 2, ενώ το υψηλότερο ποσοστό των περιπτώσεων με έντονη θετικότητα παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις Furhman 2 -3.



Εικόνα 7

(Θετική, μεμβρανική χρώση για CAIX σε όλα τα κύτταρα διαυγοκυτταρικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος (μεγέθυνση 10X). Η ένταση είναι μέτρια.)

Histogram



Συσχέτιση της έκφρασης HIF-1α με την έκφραση της CAIX

Εφαρμόστηκε η δοκιμασία συσχέτισης pearson Correlation προκειμένου να προσδιοριστεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της HIF-1α με την έκφραση της CAIX. και Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0.001$, Πίνακας 3).

Tb value	HIF-1 α	CAIX
HIF- 1 α	1	0,730
p-value	0,000	
CAIX	0,730	1
p-value	0,000	

Πίνακας 3. Συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων HIF-1α και CAIX

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1 α ενεργοποιείται σε μεγάλο αριθμό κακοήθων όγκων και συσχετίζεται με την ρύθμιση πολλών άλλων μοριακών οδών που επηρεάζουν την αγγειογένεση, το μεταβολισμό της γλυκόζης, το pH, αλλά και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (Sowter HM et al). Το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού συσχετίζεται αιτιοπαθογενετικά με την απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL, με συνεπακόλουθη την απορρύθμιση των μοριακών οδών της υποξίας. Στα πλαίσια αυτής της απορρύθμισης παρατηρείται συχνά υπερέκφραση του HIF-1α ((Ivanov SV et al, Grabmeier K et al).

Σε όλα τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα της μελέτης μας ανιχνεύσαμε θετική έκφραση του HIF-1α. Η έκφραση ήταν ανεξάρτητα από την ηλικία των ασθενών και από το φύλο, όπως άλλωστε έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Daniel Minardi et al).

Η ανοσοϊστοχημική χρώση εμφάνιζε σε όλες τις περιπτώσεις πυρηνική εντόπιση, εύρημα το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αφορά στην ενεργοποιημένη μορφή του HIF-1α και υποδηλώνει τη δυνατότητα δράσης του ως μεταγραφικού παράγοντα (Di Cristofano et al.)

Χρησιμοποιώντας μία μέθοδο ημιποσοτικού υπολογισμού της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης σε ιστολογικές τομές, τα καρκινώματα διακρίθηκαν σε εκείνα με υψηλή έκφραση HIF-1α και σε καρκινώματα με χαμηλή έκφραση και αποδείξαμε ότι η υψηλότερη έκφραση συσχετίζεται, στατιστικά σημαντικά, με το βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης 3 και 4 κατά Furhman. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ανακοινώσει και άλλοι ερευνητές (Juana Dornbusch et al, Tastekin Ebru et al και Burgesser Maria Virginia et al). Δεδομένης της προγνωστικής σημασίας του βαθμού Furhman, τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να υποδεικνύουν το συμπληρωματικό ρόλο της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για HIF-1 α στην ιστοπαθολογική εξέταση των καρκινωμάτων διαυγοκυτταρικού τύπου.

Επιπλέον, η έκφραση του HIF-1 α έχει συσχετισθεί, σε αρκετές δημοσιεύσεις, με την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο νεφρού (Dornbusch et al, Burgesser et al, Yang fan et al). Σε μία πρόσφατη μεταανάλυση, που περιέλαβε 14 μελέτες στις οποίες αξιολο-

γήθηκε η έκφραση του HIF-1 α σε 1258 ασθενείς, φάνηκε ότι η ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση του HIF-1 α, σε ασθενείς με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού, συσχετίζεται με μειωμένη ολική επιβίωση (Yang Fan, Hongzhao Li, et al) Σύμφωνα με τους Juana Dornbusch et al η ανοσοϊστοχημική έκφραση HIF-1 α συσχετίζεται με το παθολογοανατομικό στάδιο του όγκου, και με το στάδιο TNM ενώ οι Burgesser Maria Virginia et al, έδειξαν τη συσχέτιση της έκφρασης του HIF-1 α με το στάδιο του όγκου και ειδικότερα με τη διήθηση της νεφρικής φλέβας. Στη δική μας μελέτη δεν καταδείξαμε συσχέτιση με τη διήθηση της νεφρικής φλέβας, ωστόσο η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού περιπτώσεων, θα μπορούσε ενδεχομένως να επιβεβαιώσει το συγκεκριμένο εύρημα.

Επιπρόσθετα, αν και ο αριθμός των περιπτώσεων στη μελέτη μας είναι περιορισμένος, εντούτοις καταδείχθηκε ότι η υψηλή έκφραση HIF-1 α παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αγγειακή διήθηση, ένα παράγοντα που υποδηλώνει εμμέσως επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά.

Σχετικά με την περινευρική διήθηση στις περιπτώσεις της μελέτης μας, δεν καταλήξαμε σε στατιστική συσχέτιση με τον HIF-1 α, ενώ δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι καρβονικές ανυδράσες είναι διαμεμβρανικά ένζυμα τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του pH των ιστών (Dorai T et al). Η καρβονική ανυδράση IX παράγεται από την υποξία, μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα HIF-1 α. Στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού, η επαγωγή μέσω της υποξίας συσχετίζεται με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο VHL (Ivanov SV et al, Grabmeier K et al). Η έκφραση της CAIX σε πολύ μεγάλο ποσοστό των διαυγοκυτταρικών καρκινωμάτων, την έχει καταστήσει διαγνωστικό δείκτη για τον συγκεκριμένο ιστολογικό υπότυπο, ωστόσο, ο ρόλος της στην πρόγνωση και η προβλεπτική σημασία της στην θεραπευτική αντιμετώπιση, παραμένουν διαφορούμενες.

Στην μελέτη μας διερευνήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση CAIX σε όλα τα καρκινώματα με έκφραση HIF-1α, και επιπλέον με τη χρήση ημιποσοτικού υπολογισμού σε ιστολογικές τομές βαθμοποιήσαμε τα επίπεδα έκφρασης και τα συσχετίσαμε με την έκφραση HIF-1α και με τις διαθέσιμες ιστολογικές προγνωστικές πληροφορίες.

Σε όλες τις περιπτώσεις των καρκινωμάτων της παρούσας μελέτης, ανιχνεύσαμε έκφραση της CAIX, ανεξάρτητα από την ηλικία ή το φύλο των ασθενών, εύρημα το οποίο συμφωνεί με τα δεδομένα προηγούμενων δημοσιεύσεων (Zhang W et al, Franziska Busket et al.).

Παρατηρήθηκε εντούτοις, διαβάθμιση στην έκταση και ένταση της χρώσης ανάμεσα σε διαφορετικά καρκινώματα και στατιστικά σημαντική συσχέτιση της υψηλότερης έκφρασης με το ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης κατά Furhman. Σε πολλές προηγούμενες δημοσιεύσεις έχει διερευνηθεί η παρουσία και ο ρόλος της CAIX στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (Zhangw et al , Franziska Busket et al). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τη μελέτη των Franziska et al, σύμφωνα με την οποία η ανοσοϊστοχημική έκφραση της CAIX παρουσίαζε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης κατά Furhman. Αντίθετα, οι Zhang et al συμπεραίνουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης κατά Furhman, ενώ οι Genega et al (Am J Clin Pathol) διαπίστωσαν υψηλότερη ανοσοϊστοχημική έκφραση στα καρκινώματα χαμηλού βαθμού κατά Furhman. Διαφορές ως προς την μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, τα διαφορετικά αντισώματα, αλλά και σε σχέση με την ετερογένεια των νεοπλασματικών κυττάρων εντός του ίδιου νεοπλάσματος θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν τις διαφορές.

Σχετικά με την προγνωστική αξία της έκφρασης CAIX υπάρχουν επίσης διαφορετικά δεδομένα. Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν πως η έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη CAIX συσχετίζεται με ευνοϊκότερη πρόγνωση των ασθενών με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (Zhao Z et al). Αντίθετα, άλλες μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα πως η έκφραση της CAIX δεν αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα (Kim SH et al, Zhang BY et al, Zerati M et al) Επιπλέον, νεότερες μέθοδοι απομόνωσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (liquid biopsy/υγρή βιοψία) προσφέρουν νέες προοπτικές στην αξιολόγηση προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών. Συγκεκριμένα, η παρουσία CAIX σε κύτταρα διαυγοκυτταρικού καρκινώματος που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα ασθενών έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου και κατ'επέκταση με την κλινική πορεία (Zhou, G.X. et al). Στη δική μας μελέτη, οι περισσότεροι ασθενείς με υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση είχαν νεοπλάσματα με υψηλό βαθμό Furhman, που αποτελεί ένα από τους δυσμενείς ιστολογικούς προγνωστικούς δείκτες. Εντούτοις, δεν βρήκαμε συσχέτιση ανά-

μεσα στην έκφραση της CAIX με άλλους δυσμενείς προβλεπτικούς ιστολογικούς δείκτες όπως με τη διήθηση της νεφρικής φλέβας, την αγγειακή διήθηση και τη περινευρική διήθηση του όγκου, ενδεχομένως λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών που περιελήφθησαν στη συγκεκριμένη μελέτη.

Στη συνέχεια, αναζητήσαμε τη σχέση μεταξύ της έκφρασης του HIF-1 α και CAIX. Εφαρμόζοντας τη στατιστική δοκιμασία pearson correlation αποδείξαμε ότι οι δυο ανοσοιστοχημικοί δείκτες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση, αποδεικνύοντας έτσι την αιτιολογική συνάφειά τους. Ανάλογα ευρήματα έχουν δημοσιευθεί τόσο στον καρκίνο του νεφρού, όσο και σε άλλα καρκινώματα (Franziska et al)

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1α , στο διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα φαίνεται ότι συσχετίζεται με ιστοπαθολογικούς προγνωστικούς παράγοντες και επάγει την έκφραση της CAIX η οποία φαίνεται να υπερεκφράζεται στους όγκους με υψηλότερο βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης κατά Furhman. Περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων αυτών που υπαινίσσονται αποδιαφοροποίηση του όγκου και επειδείνωση της βιολογικής εξέλιξης, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και αξιολόγηση περισσότερων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων, θα μπορούσε να συνεισφέρει σε πληρέστερη αξιολόγηση της δράσης HIF-1 α στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού και να αναδείξει ενδεχομένως νεότερους πιθανούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς ιστοικούς βιοδείκτες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Kumar, Abbas, Fausto, Mitchell, Robbin basic pathology 8th edition. saunders \Elsevier. 2007.

Myoad MA. Reveiw of potential risk factors for kidney(renal cell) cancer. Semin urol oncol. 2001; 19:280-290.

Ferlay. J, Shin. H.R, Bray. F, Forman. D, Mathers. C, Parkin. D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010; 15:2893-2917

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010; 60:277.

Stafford HS, Saltzstein SL, Shimasaki S, Sanders C, Downs TM, Sadler GR. Racial/ethnic and gender disparities in renal cell carcinoma incidence and survival. J Urol. 2008; 179(5):1704-1708.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol. 2007; 18(3):581-92.

Kidney cancer incidence statistic, cancer research UK 2009

Shiao Y-H. Genetic signature for human risk assessment: lessons from trichloroethylene. Environ Mol Mutag. 2009; 50:68–77.

Kaelin WG, Jr von Hippel-Lindau disease. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2007; 2:145–173

Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. Int J Cancer. 2005; 114:101

Tsivian M, Moreira DM, Caso JR, Mouraviev V, Polascik TJ. Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2011; 29(15):2027-31. doi: 10.1200/JCO.2010.30.948

Wu X, et al. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. J Natl Cancer Inst. 2003; 95:1211–1218.

- Xing J, et al. Mitochondrial DNA content: its genetic heritability and association with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100:1104–1112.
- Steffen Weikert et al *American Journal of Epidemiology*, Volume 167, Issue 4, 15 February 2008, Pages 438–446,
- Colt JS, Schwartz K, Graubard BI, Davis F, Ruterbusch J, DiGaetano R, Purdue M, Rothman N, Wacholder S, Chow WH. Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans, National Institutes of Health, *Epidemiology.* 2011; 22(6):797-804
- Samy L Habib, Thomas J Prihoda, Maria Luna, Sherry A Werner. Diabetes and risk of renal cell carcinoma. *Journal of Cancer.* 2012; 3:42-8.
- Setiawan VW, Stram DO, Nomura AM, et al. Risk factors for renal cell cancer: the multiethnic cohort. *Am J Epidemiol.* 2007; 166:932
- Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, et al. International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer.* 1995; 61:601.
- Canadian Cancer Society, Guidline 2012
- Kolonel LN. Association of cadmium with renal cancer. *Cancer* 1976; 37:1782
- Pischon.T, Lahmann. P.H, Boeing. H, et al. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2006; 118:728–738
- Renehan .A. G, Tyson. M, Egger. M, Heller. R.F, Zwahlen. M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008; 371, 569-578.
- Adams. K.F, Leitzmann. M.F, Albanes. D, et al. Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008; 168: 268–277
- Bergstrom A, Lindblad P, Wolk A. Birth weight and risk of renal cell cancer. *Kidney Int* 2001; 59: 1110-1113.

Chapman AB, Rahbari-Oskoui FF, Bennett WM. Acquired cystic disease of the kidney in adults. UpToDate version 15.1 ;2007.

Lien YH, Hunt KR, Siskind MS, Zukoski C. Association of cyclosporin A with acquired cystic kidney disease of the native kidneys in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 1993; 44:613–616.

Oya M, Mikami S, Mizuno R, Marumo K, Mukai M, Murai M. C-jun activation in acquired cystic kidney disease and renal cell carcinoma. *J Urol.* 2005; 174, 726–730

Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant.* 2004; 4:905–913

Pascal Hajja, Sophie Ferlicotb, Walid Massouda, Ayman Awada, Yacine Hammoudia, Bernard Charpentierc, Antoine Durrbachc, Stéphane Droupya, Gérard Benoîta, Prevalence of Renal Cell Carcinoma in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and Chronic Renal Failure, *Urology*, Volume 74, Issue 3, September 2009, Pages 631-634

Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castelao JE, et al. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1999; 81:542

Sorensen HT, Nørgård B, Friis S, et al. [Non-steroidal anti-inflammatory agents and prevention of colorectal cancer and other types of cancer]. *Ugeskr Laeger* 2003; 165:1260

Derby LE, Jick H. Acetaminophen and renal and bladder cancer. *Epidemiology.* 1996; 7:358

Kaelin WG, Jr von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2007; 2:145–173.

Zbar B, Tory K, Merino M, et al. Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J Urol.* 1994; 151:561

Menko FH, van Steensel MA, Giraud S, et al. Birt-Hogg-Dubé syndrome: diagnosis and management. *Lancet Oncol* 2009; 10:1199.

Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ, Henske EP. Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features.

Am J Pathol. 1996; 149:1201

Clague J, et al. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. Cancer Epidemiol

Biomarkers Prev. 2009; 18:801–807

Argani P, Laé M, Ballard ET, et al. Translocation carcinomas of the kidney after chemotherapy in childhood. J Clin Oncol 2006; 24:1529.

Allen NE, Beral V, Casabonne D, Kan SW, Reeves GK, Brown A, Green J Moderate alcohol intake, cancer incidence in women. J Natl Cancer Inst.

2009; 101: 296–305

Lew JQ, Chow WH, Hollenbeck AR, et al. Alcohol consumption and risk of renal cell cancer: the NIH-AARP diet and health study. Br J Cancer 2011;

104:537

Gordon SC, Moonka D, Brown KA, et al. Risk for renal cell carcinoma in chronic hepatitis C infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;

19:1066.

Kiren H, Nancy K, diet pattern and risk of renal cell carcinoma, Public Health Nutrition . 2002 December; Volume 5(Issue 06), pp 757-767

Lee. J.E, Männistö. S, Spiegelman. D, et al. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009; 18:1730-1739.

Kuhn E, De Anda J, Manoni S, Netto G, Rosai J. Renal cell carcinoma associated with prominent angioleiomyoma-like proliferation. Am J Surg Pathol 2006;30:1372

Shannon BA, Cohen RJ, Segal A, Baker EG, Murch AR. Clear cell renal cell carcinoma with smooth muscle stroma. Hum Pathol 2009;40:425

Gobbo S, Eble JN, MacLennan GT, Grignon DJ, Shah RB, Zhang S, Martignoni G, Brunelli M, Cheng L. Renal cell carcinomas with papillary architecture and clear cell components: the utility of immunohistochemical

and cytogenetical analyses in differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:1780.

Sean W, M.D, Clear cell renal cell carcinoma, PathologyOutlines.com, Inc. 2012.

Ivan D, Fang F. *Cancer Grading Manual*, springer science+business media LCC, 2007

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-408.

Chowdhury R, Hardy A, Schofield CJ. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chemical Society reviews*. 2008; 37(7):1308-19.

Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2010;2(3):336-61.

Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2014;49(1):1-15.

Masoud GN, Li W. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2015;5(5):378-89.

Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1783(3):394-404.

Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;390(2):235-40.

Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews Cancer*. 2011;12(1):9-22.

Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell death and differentiation*. 2008;15(4):628-34.

Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer science*. 2018;109(3):560-71.

- Serocki M, Bartoszewska S, Janaszak-Jasiecka A, Ochocka RJ, Collawn JF, Bartoszewski R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis*. 2018;21(2):183-202.
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*. 2010;40(2):294-309.
- Liu LZ, Hu XW, Xia C, He J, Zhou Q, Shi X, et al. Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free radical biology & medicine*. 2006;41(10):1521-33.
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NFkappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. 2008;453(7196):807-11.
- van Uden P, Kenneth NS, Webster R, Muller HA, Mudie S, Rocha S. Evolutionary conserved regulation of HIF-1beta by NF-kappaB. *PLoS genetics*. 2011;7(1):e1001285.
- Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):755-61.
- Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *The Biochemical journal*. 2006;396(3):517-27.
- Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(14):2115-7.
- Jung JE, Kim HS, Lee CS, Shin YJ, Kim YN, Kang GH, et al. STAT3 inhibits the degradation of HIF-1alpha by pVHL-mediated ubiquitination. *Experimental & molecular medicine*. 2008;40(5):479-85.
- Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, et al. Signal transducer and

activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Molecular cancer research* : MCR. 2008;6(7):1099-105.

Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. eIF2 $\{\alpha\}$ Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1 $\{\alpha\}$. *Cancer research*. 2010;70(20):7820-9.

Wolf G, Schroeder R, Stahl RA. Angiotensin II induces hypoxia-inducible factor-1 α in PC 12 cells through a posttranscriptional mechanism: role of AT2 receptors. *American journal of nephrology*. 2004;24(4):415-21.

Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS letters*. 2002;512(1-3):157-62.

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer research*. 1999;59(16):3915-8.

Lin YM, Huang YL, Fong YC, Tsai CH, Chou MC, Tang CH. Hepatocyte growth factor increases vascular endothelial growth factor-A production in human synovial fibroblasts through c-Met receptor pathway. *PloS one*. 2012;7(11):e50924.

Kuschel A, Simon P, Tug S. Functional regulation of HIF-1 α under normoxia is there more than post-translational regulation? *Journal of cellular physiology*. 2012;227(2):514-24.

Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):29936-44.

Eskandani M, Vandghanooni S, Barar J, Nazemiyeh H, Omidi Y. Cell physiology regulation by hypoxia inducible factor-1: Targeting oxygen-related nanomachineries of hypoxic cells. *International journal of biological macromolecules*. 2017;99:46-62.

Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016;4:11.

Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(9):3253-65.

Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(44):33095-106.

Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(41):27620-7.

Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(26):23508-14.

Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *The Biochemical journal*. 2004;383(Pt. 3):429-37.

Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 17):2976-86.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002;111(5):709-20.

Li J, Xu Y, Jiao H, Wang W, Mei Z, Chen G. Sumoylation of hypoxia inducible factor-1alpha and its significance in cancer. *Science China Life sciences*. 2014;57(7):657-64.

Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324(1):394-400.

Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;360(3):646-52.

Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell*. 2007;131(3):584-95.

Del Rey MJ, Valin A, Usategui A, Garcia-Herrero CM, Sanchez-Arago M, Cuezva JM, et al. Hif-1alpha Knockdown Reduces Glycolytic Metabolism and Induces Cell Death of Human Synovial Fibroblasts Under Normoxic Conditions. *Scientific reports*. 2017;7(1):3644

Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Callebaut, I.; Mornon, J.P.; Zelnik, V.; Opavsky, R.; Zat'ovicova, M.; Liao, S.; Portetelle, D.; Stanbridge, E.J.; *et al.* Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*, **1994**, 9(10), 2877-2888

De Simone, G.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 1804(2), 404-409

Swietach, P.; Patiar, S.; Supuran, C.T.; Harris, A.L.; VaughanJones, R.D. The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284(30), 20299-20310.

Neri, D.; Supuran, C.T. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, 10(10), 767-777

Fang, J.S.; Gillies, R.D.; Gatenby, R.A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin. Cancer Biol.*, **2008**, 18(5), 330-337.

Liao, S.Y.; Lerman, M.I.; Stanbridge, E.J. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Develop. Biol.*, **2009**, 9,22.

Hilvo, M.; Rafajova, M.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Parkkila, S. Expression of carbonic anhydrase IX in mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **2004**, 52(10), 1313-1322

Saarnio, J.; Parkkila, S.; Parkkila, A.K.; Waheed, A.; Casey, M.C.; Zhou, X.Y.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Karttunen, T.; Haukipuro, K.; Kairaluoma, M.I.; Sly, W.S. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J. Histochem. Cytochem.*, **1998**, 46(4), 497-504.

Kaluz, S.; Kaluzova, M.; Liao, S.Y.; Lerman, M.; Stanbridge, E.J. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1795*(2), 162-172.

Karhumaa, P.; Kaunisto, K.; Parkkila, S.; Waheed, A.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Sly, W.S.; Rajaniemi, H. Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CA IX and CA XII, in the human male excurrent ducts. *Mol. Human Reprod.*, **2001**, *7*(7), 611-616.

Kivela, A.J.; Parkkila, S.; Saarnio, J.; Karttunen, T.J.; Kivela, J.; Parkkila, A.K.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Waheed, A.; Sly, W.S.; Rajaniemi, H. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem. Cell Biol.*, **2000**, *114*(3), 197-204.

Mastrolorenzo, A.; Zuccati, G.; Massi, D.; Gabrielli, M.G.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. Immunohistochemical study of carbonic anhydrase isozymes in human skin. *Eur. J. Dermatol.*, **2003**, *13*(5), 440-444

Gatenby, R.A.; Gillies, R.J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, *8*(1), 56-61.

Gillies, R.J.; Gatenby, R.A. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metast. Rev.*, **2007**, *26*(2), 311-317.

Ivanov, S.V.; Kuzmin, I.; Wei, M.H.; Pack, S.; Geil, L.; Johnson, B.E.; Stanbridge, E.J.; Lerman, M.I. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1998**, *95*(21), 12596-12601.

Parks, S.K.; Chiche, J.; Pouyssegur, J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J. Cell. Physiol.*, **2011**, *226*(2), 299-308.

Swietach, P.; Hulikova, A.; Vaughan-Jones, R.D.; Harris, A.L. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene*, **2010**, *29*(50), 6509-6521.

Stubbs, M.; McSheehy, P.M.; Griffiths, J.R.; Bashford, C.L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today*, **2000**, *6*(1), 15-19.

Fukumura, D.; Xu, L.; Chen, Y.; Gohongi, T.; Seed, B.; Jain, R.K. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor

transcription in brain tumors *in vivo*. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(16), 6020-6024.

Kato, Y.; Nakayama, Y.; Umeda, M.; Miyazaki, K. Induction of 103-kDa gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*(16), 11424-11430.

Martinez-Zaguilan, R.; Seftor, E.A.; Seftor, R.E.; Chu, Y.W.; Gillies, R.J.; Hendrix, M.J. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metast.*, **1996**, *14*(2), 176-186.

Fischer, B.; Muller, B.; Fischer, K.G.; Baur, N.; Kreutz, W. Acidic pH inhibits non-MHC-restricted killer cell functions. *Clin. Immunol.*, **2000**, *96*(3), 252-263

Swinson, D.E.; Jones, J.L.; Richardson, D.; Wykoff, C.; Turley, H.; Pastorek, J.; Taub, N.; Harris, A.L.; O'Byrne, K.J. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **2003**, *21*(3), 473-482.

Kim, S.J.; Rabbani, Z.N.; Dewhirst, M.W.; Vujaskovic, Z.; Vollmer, R.T.; Schreiber, E.G.; Oosterwijk, E.; Kelley, M.J. Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **2005**, *49*(3), 325-335.

Ilie, M.; Mazure, N.M.; Hofman, V.; Ammadi, R.E.; Ortholan, C.; Bonnetaud, C.; Havet, K.; Venissac, N.; Mograbi, B.; Mouroux, J.; Pouyssegur, J.; Hofman, P. High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic inients with non-small cell lung cancer. *Brit. J. Cancer*, **2010**, *102*(11), 1627-1635.

Saarnio, J.; Parkkila, S.; Parkkila, A.K.; Haukipuro, K.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Kairaluoma, M.I.; Karttunen, T.J. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am. J. Pathol.*, **1998**, *153*(1), 279-285.

Korkeila, E.; Talvinen, K.; Jaakkola, P.M.; Minn, H.; Syrjanen, K.; Sundstrom, J.; Pyrhonen, S. Expression of carbonic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer. *Brit. J. Cancer*, **2009**, *100*(6), 874-880.

Chia, S.K.; Wykoff, C.C.; Watson, P.H.; Han, C.; Leek, R.D.; Pastorek, J.; Gatter, K.C.; Ratcliffe, P.; Harris, A.L. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J.*

Clin. Oncol., **2001**, *19*(16), 3660-3668.

Trastour, C.; Benizri, E.; Ettore, F.; Ramaioli, A.; Chamorey, E.; Poussegur, J.; Berra, E. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int. J. Cancer*, **2007**, *120*(7), 1451-1458.

Tan, E.Y.; Yan, M.; Campo, L.; Han, C.; Takano, E.; Turley, H.; Candiloro, I.; Pezzella, F.; Gatter, K.C.; Millar, E.K.; O'Toole, S.A.; McNeil, C.M.; Crea, P.; Segara, D.; Sutherland, R.L.; Harris, A.L.; Fox, S.B. The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *Brit. J. Cancer*, **2009**, *100*(2), 405-411.

Loncaster, J.A.; Harris, A.L.; Davidson, S.E.; Logue, J.P.; Hunter, R.D.; Wycoff, C.C.; Pastorek, J.; Ratcliffe, P.J.; Stratford, I.J.; West, C.M. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(17), 6394-6399.

Kim, J.Y.; Shin, H.J.; Kim, T.H.; Cho, K.H.; Shin, K.H.; Kim, B.K.; Roh, J.W.; Lee, S.; Park, S.Y.; Hwang, Y.J.; Han, I.O. Tumor-associated carbonic anhydrases are linked to metastases in primary cervical cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2006**, *132*(5), 302-308.

Lee, S.; Shin, H.J.; Han, I.O.; Hong, E.K.; Park, S.Y.; Roh, J.W.; Shin, K.H.; Kim, T.H.; Kim, J.Y. Tumor carbonic anhydrase 9 expression is associated with the presence of lymph node metastases in uterine cervical cancer. *Cancer Sci.*, **2007**, *98*(3), 329-333.

Woelber, L.; Kress, K.; Kersten, J.F.; Choschzick, M.; Kilic, E.; Herwig, U.; Lindner, C.; Schwarz, J.; Jaenicke, F.; Mahner, S.; Milde-Langosch, K.; Mueller, V.; Ihnen, M. Carbonic anhydrase IX in tumor tissue and sera of patients with primary cervical cancer. *BMC Cancer*, **2011**, *11*, 12.

Hoskin, P.J.; Sibtain, A.; Daley, F.M.; Wilson, G.D. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Brit. J. Cancer*, **2003**, *89*(7), 1290-1297.

Choschzick, M.; Oosterwijk, E.; Muller, V.; Woelber, L.; Simon, R.; Moch, H.; Tennstedt, P. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian

cancer. *Virchows Archiv.*, **2011**, 459(2), 193-200.

Nordfors, K.; Haapasalo, J.; Korja, M.; Niemela, A.; Laine, J.; Parkkila, A.K.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Waheed, A.; Sly, W.S.; Parkkila, S.; Haapasalo, H. The tumour-associated carbonic anhydrases CA II, CA IX and CA XII in a group of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumours: an association of CA IX with poor prognosis. *BMC Cancer*, **2010**, 10,148.

Hoogsteen, I.J.; Marres, H.A.; Wijffels, K.I.; Rijken, P.F.; Peters, J.P.; van den Hoogen, F.J.; Oosterwijk, E.; van der Kogel, A.J.; Kaanders, J.H. Colocalization of carbonic anhydrase 9 expression and cell proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11(1), 97-106.

De Schutter, H.; Landuyt, W.; Verbeken, E.; Goethals, L.; Hermans, R.; Nuyts, S. The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy. *BMC Cancer*, **2005**, 5, 42.

Koukourakis, M.I.; Bentzen, S.M.; Giatromanolaki, A.; Wilson, G.D.; Daley, F.M.; Saunders, M.I.; Dische, S.; Sivridis, E.; Harris, A.L. Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. *J. Clin. Oncol.*, **2006**, 24(5), 727-735.

Eckert, A.W.; Lautner, M.H.; Schutze, A.; Bolte, K.; Bache, M.; Kappler, M.; Schubert, J.; Taubert, H.; Bilkenroth, U. Coexpression of Hif1alpha and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *J. Oral Pathol. Med.*, **2010**, 39(4), 313-317.

Choi, S.W.; Kim, J.Y.; Park, J.Y.; Cha, I.H.; Kim, J.; Lee, S. Expression of carbonic anhydrase IX is associated with postoperative recurrence and poor prognosis in surgically treated oral squamous cell carcinoma. *Human Pathol.*, **2008**, 39(9), 1317-1322.

Hussain, S.A.; Ganesan, R.; Reynolds, G.; Gross, L.; Stevens, A.; Pastorek, J.; Murray, P.G.; Perunovic, B.; Anwar, M.S.; Billingham, L.; James, N.D.; Spooner, D.; Poole, C.J.; Rea, D.W.; Palmer, D.H. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Brit. J. Cancer*, **2007**, 96(1), 104-109.

Klatte, T.; Seligson, D.B.; Rao, J.Y.; Yu, H.; de Martino, M.; Kawaoka, K.; Wong, S.G.; Belldegrun, A.S.; Pantuck, A.J. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. *Cancer*, **2009**, *115*(7), 1448-1458.

Haapasalo, J.A.; Nordfors, K.M.; Hilvo, M.; Rantala, I.J.; Soini, Y.; Parkkila, A.K.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Parkkila, S.M.; Haapasalo, H.K. Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*(2), 473-477.

Koukourakis, M.I.; Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Simopoulos, K.; Pastorek, J.; Wykoff, C.C.; Gatter, K.C.; Harris, A.L. Hypoxiaregulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*(11), 3399-3403.

Hedley, D.; Pintilie, M.; Woo, J.; Morrison, A.; Birle, D.; Fyles, A.; Milosevic, M.; Hill, R. Carbonic anhydrase IX expression, hypoxia, and prognosis in patients with uterine cervical carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*(15), 5666-5674.

Bui, M.H.; Seligson, D.; Han, K.R.; Pantuck, A.J.; Dorey, F.J.; Huang, Y.; Horvath, S.; Leibovich, B.C.; Chopra, S.; Liao, S.Y.; Stanbridge, E.; Lerman, M.I.; Palotie, A.; Figlin, R.A.; Belldegrun, A.S. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*(2), 802-811.

Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M.I.; Sivridis, E.; Pastorek, J.; Wykoff, C.C.; Gatter, K.C.; Harris, A.L. Expression of hypoxiainducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(21), 7992-7998.

Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.*, **2003**, *23*(2), 146-189.

Brennan, D.J.; Jirstrom, K.; Kronblad, A.; Millikan, R.C.; Landberg, G.; Duffy, M.J.; Ryden, L.; Gallagher, W.M.; O'Brien, S.L. CA IX is an independent prognostic marker in premenopausal breast cancer patients with one to three positive lymph

nodes and a putative marker of radiation resistance. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*(21), 6421-6431

Proescholdt, M.A.; Merrill, M.J.; Stoerr, E.M.; Lohmeier, A.; Pohl, F.; Brawanski, A. Function of carbonic anhydrase IX in glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.*, **2012**, *14*(11), 1357-1366.

Ahlskog, J.K.; Schliemann, C.; Marlind, J.; Qureshi, U.; Ammar, A.; Pedley, R.B.; Neri, D. Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours. *Brit. J. Cancer*, **2009**, *101*(4), 645-657.

Dubois, L.; Lieuwes, N.G.; Maresca, A.; Thiry, A.; Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Wouters, B.G.; Lambin, P. Imaging of CA IX with fluorescent labelled sulfonamides distinguishes hypoxic and (re)-oxygenated cells in a xenograft tumour model. *Radiother. Oncol.*, **2009**, *92*(3), 423-428.

Parkkila, S.; Innocenti, A.; Kallio, H.; Hilvo, M.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. The protein tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib strongly inhibit several mammalian alpha-carbonic anhydrase isoforms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*(15), 4102-4106

Saunders, N.A.; Simpson, F.; Thompson, E.W.; Hill, M.M.; EndoMunoz, L.; Leggatt, G.; Minchin, R.F.; Guminski, A. Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. *EMBO Mol. Med.*, **2012**, *4*(8), 675-684.

Lock, F.E.; McDonald, P.C.; Lou, Y.; Serrano, I.; Chafe, S.C.; Ostlund, C.; Aparicio, S.; Winum, J.Y.; Supuran, C.T.; Dedhar, S. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene*, **2013**, *32*(44), 5210-5219.

Kaluz, S.; Kaluzova, M.; Liao, S.Y.; Lerman, M.; Stanbridge, E.J. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1795*(2), 162-172.

Stillebroer, A.B.; Mulders, P.F.; Boerman, O.C.; Oyen, W.J.; Oosterwijk, E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur. Urol.*, **2010**, *58*(1), 75-83.

Wykoff, C.C.; Beasley, N.J.; Watson, P.H.; Turner, K.J.; Pastorek, J.; Sibtain, A.; Wilson, G.D.; Turley, H.; Talks, K.L.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J.; Harris, A.L. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.*, **2000**, *60*(24), 7075-7083.

Tostain, J.; Li, G.; Gentil-Perret, A.; Gigante, M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur. J. Cancer*, **2010**, *46*(18), 3141-3148.

Wang, Y.; Wang, X.Y.; Subjeck, J.R.; Kim, H.L. Carbonic anhydrase IX has chaperone-like functions and is an immunoadjuvant. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, *7*(12), 3867-3877.

Donato, D.P.; Johnson, M.T.; Yang, X.J.; Zynger, D.L. Expression of carbonic anhydrase IX in genitourinary and adrenal tumours. *Histopathology*, **2011**, *59*(6), 1229-1239.

Dorai, T.; Sawczuk, I.S.; Pastorek, J.; Wiernik, P.H.; Dutcher, J.P. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur. J. Cancer*, **2005**, *41*(18), 2935-2947.

IlleticiaSerrano-OviedoPh.D.aJosé M.Giménez-BachsPh.D., M.D.bSyongh Y.Nam-ChaM.D .cFrancisco J.CimasPh.D.aJesúsGarcía-CanoPh.D.aRicardoSánchez-PrietoPh.D.aAntonio S.Salinas-SánchezPh.D., M.D.b, Implication of VHL, ERK5, and HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma: Molecular basis,Elsevier, Volume 35, Issue 3, March 2017, Pages 114.e15-114.e22

Tobias Klatte,1David B. Seligson,2 Stephen B. Riggs,1JohnT. Leppert,1Maria K. Berkman,1Mark D. Kleid,1HongYu,2 Fairouz F. Kabbinavar,3 AllanJ. Pantuck,1and Arie S. Belldegrun1, Hypoxia-Inducible Factor 1Ain Clear Cell Renal Cell Carcinoma Daniel Minardi, et al , Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma Is Predicted by HIF-1 α Expression, ANTICANCER RESEARCH 35: 433-438 (2015)

Di Cristofano C, Minervini A, Menicagli M, et al. Nuclear expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal cell carcinoma is involved in tumor progression. *Am J Surg Pathol.* 2007;*31*:1875–1881).

Juana Dornbusch1 ., Aristeidis Zacharis1., Matthias Meinhardt2, Kati Erdmann1,

Ingmar Wolff¹, Michael Froehner¹, Manfred P. Wirth¹, Stefan Zastrow¹, Susanne Fuessel¹. Analyses of Potential Predictive Markers and Survival, Vol 8 (9), September 2013

Data for a Response to Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma

Tastekin Ebru 1, Oz Puyan Fulya 1, Akdere Hakan 2, Yurut-Caloglu Vuslat 3, Sut Necdet 4, Can Nuray 1, Ozyilmaz Filiz, Analysis of various potential prognostic markers and survival data in clear cell renal cell carcinoma, Vol. 43 (3): 440-454, May - June, 2017 doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0521

Bürgesser María Virginia, Riva Verónica, Ojeda Silvia María, Muñoz Morales Duberney, Calafat Patricia, Diller Ana, Expression of VEGF-A, HIF-1 A, CD34 AND KI67 in clear cell renal cell carcinomas and their relationship with conventional markers, Revista de la Facultad de Ciencias Medicas 2014; 71(1):7-15

Yang Fan, Hongzhao Li, Xin Ma, Yu Gao, Luyao Chen, Xintao Li, Xu Bao, MD, Qingshan Du, MD, Yu Zhang, Xu Zhang. Prognostic Significance of Hypoxia-Inducible Factor Expression in Renal Cell Carcinoma. A PRISMA-compliant Systematic Review and Meta-Analysis Am J Clin Pathol 2010;134(6)873-879

Zhao Z, Liao G, Li Y, Zhou S, Zou H, et al. (2014) Prognostic Value of Carbonic Anhydrase IX Immunohistochemical Expression in Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis of the Literature. PLoS ONE 9(11): e114096. doi:10.1371/journal.pone.0114096

Kim SH, Park WS, Park EY, Park B, Joo J, Joung JY, et al. (2017) The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry. PLoS

Zhang BY, Thompson RH, Lohse CM, Dronca RS, Cheville JC, et al. (2013) Carbonic anhydrase IX (CAIX) is not an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) after long-term follow-up. BJU Int 111: 1046–1053.

Zerati M, Leite KR, Pontes-Junior J, Segre CC, Reis ST, et al. (2013) Carbonic Anhydrase IX is not a predictor of outcomes in non-metastatic clear cell renal cell carcinoma - a digital analysis of tissue microarray. Int Braz J Urol 39: 484–492.

Zhou, G.X.; Ireland, J.; Rayman, P.; Finke, J.; Zhou, M. Quantification of carbonic anhydrase IX expression in serum and tissue of renal cell carcinoma patients using enzyme-linked immunosorbent assay: prognostic and diagnostic potentials. *Urology*, 2010, 75(2),257-26

D. Minardi et al, Prognostic role of tumor necrosis, microvessel density, vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1 α in patients with clear cell renal carcinoma after radical nephrectomy in a long term follow up, *international journal of immunopathology and pharmacology* ,Vol. 21, no. 2, 447-455 (2008)

Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην πτυχιακή εργασία. Επίσης έχω αναφέρει τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επίσης βεβαιώνω ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά ειδικά για τις απαιτήσεις του προγράμματος σπουδών του Μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης στη Νεφρολογική Φροντίδα, του Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.