



Narodowy Instytut Onkologii

**im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy**

MACIEJ ŁUBA

ZNACZENIE EKSPRESJI LIGANDU PD-L1 ORAZ NACIEKU LIMFOCYTARNEGO W OCENIE ROKOWANIA RAKA NERKOWOKOMÓRKOWEGO

**The importance of PD-L1 ligand expression and lymphocytic infiltration in the
assessment of the prognosis of renal cell carcinoma**

PRACA DOKTORSKA

**PROMOTOR: dr hab. Paweł Wiechno, Profesor Instytutu
PROMOTOR POMOCNICZY: dr n. biol. Natalia Rusetska**

**Praca została wykonana w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej
Narodowego Instytutu Onkologii Państwowego Instytutu Badawczego im.
Marii Skłodowskiej - Curie w Warszawie.**

Kierownik Zakładu: dr hab. Elżbieta Sarnowska, Profesor Instytutu

Warszawa 2023

Pragnę najserdeczniej podziękować Promotorowi mojej pracy, Panu dr hab. n. med. Pawłowi Wiechno, prof. Instytutu za wsparcie, opiekę oraz zaangażowanie okazane mi w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Dziękuję Promotor pomocniczej, Pani dr n. biol. Natalii Rusetskiej za całą okazaną pomoc i wsparcie.

Dziękuję Pani dr hab. n. med. Elżbiecie Sarnowskiej, prof. Instytutu, kierownik Zakładu Immunoterapii Eksperymentalnej za okazaną pomoc i opiekę.

Podziękowania składam mojej Żonie i Rodzicom, których pomoc i cierpliwość pozwoliły mi spełnić marzenie.

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE:	11
SUMMARY:	13
I. WSTĘP	14
1.1. RAK NERKI	14
1.2 RAK JASNOKOMÓRKOWY	16
1.2.1 <i>Stopień zaawansowania nowotworu</i>	16
1.2.2 <i>Diagnostyka histopatologiczna</i>	18
1.2.3 <i>Diagnostyka kliniczna</i>	18
1.2.4 <i>Diagnostyka obrazowa</i>	18
1.2.5 <i>Biopsja nerki</i>	19
1.2.6 <i>Diagnostyka genetyczna</i>	19
2. MODELE PROGNOSTYCZNE.....	20
3. ZMIANY MOLEKULARNE W RAKU JASNOKOMÓRKOWYM (ccRCC)	24
3.1 <i>VHL</i>	25
3.2 <i>PBRM1</i>	26
3.3 <i>BAP1</i>	27
3.4 <i>SETD2</i>	27
3.5. <i>Defekt w naprawie DNA</i>	27
4. IMMUNOBIOLOGIA RAKA NERKI.....	27
5. LECZENIE	28
5.1 <i>Postępowanie w przypadku zlokalizowanego RCC</i>	28
5.2 <i>Postępowanie w przypadku miejscowo zaawansowanego RCC</i>	31
5.3 <i>Postępowanie w przypadku zaawansowanego i przerzutowego RCC</i>	33
5.3.3. <i>Leczenie systemowe</i>	34
5.3.3.2 <i>Terapie celowane</i>	34
5.3.3.3 <i>Immunoterapia</i>	35
II. CELE PRACY	40
III. MATERIAŁY I METODY	41
III.1 APARATURA.....	41
III.2 MATERIAŁY ZUŻYWALNE	41
III.3 ODCZYNNIKI	41
III.4 PRZECIWCIAŁA	42
III.5 ZESTAWY ODCZYNNIKÓW	42
III.6 MATERIAŁ KLINICZNY I ETYKA DOŚWIADCZEŃ	42
III.7 METODY	42
7.1 <i>Krojenie bloczków parafinowych i odparafinowanie</i>	42
7.2 <i>Immunohistochemia</i>	44
7.3 <i>Dane kliniczne</i>	45
7.4 <i>Analizy bioinformatyczne</i>	45
7.5 <i>Analiza statystyczna</i>	45
IV. WYNIKI	47
IV.1 ANALIZA EKSPRESJI PD-L1, CTLA-4 ORAZ CD4 I CD8A W DANYCH WIELKOSKALOWYCH DOSTĘPNYCH W GENE EXPRESSION OMNIBUS DATABASE ORAZ TCGA.....	47
IV.2 CHARAKTERYSTYKA GRUP PACJENTÓW	51
IV.3 OKREŚLENIE NACIEKU LIMFOCYTÓW T W MIKROŚRODOWISKU GUZA W MATERIALE POBRANYM OD PACJENTÓW Z ROZPOZNANYM RAKIEM NERKOWOKOMÓRKOWYM ccRCC	52
IV.4 ANALIZA EKSPRESJI GENÓW ZWIĄZANYCH Z NACIEKIEM LIMFOCYTÓW T U PACJENTÓW Z ccRCC W ZALEŻNOŚCI OD MUTACJI W GENIE <i>PBRM1</i>	54
IV.5 BADANIE ZALEŻNOŚCI EKSPRESJI <i>RRM2</i> OD NACIEKU LIMFOCYTARNEGO	57

IV.6 ANALIZA ZALEŻNOŚCI NACIEKU LIMFOCYTÓW T NA ILOŚĆ I LOKALIZACJĘ PRZERZUTÓW U PACJENTÓW Z ROZPOZNANYM cCRCC.	59
IV.7 BADANIE ILOŚCI BIAŁKA PD-L1 W TKANKACH POBRANYCH OD PACJENTÓW Z ROZPOZNANYM RAKIEM NERKOWOKOMÓRKOWYM cCRCC.	61
IV.8 ANALIZA CZYNNIKÓW RYZYKA POTENCJALNIE WYPŁYWAJĄCYCH NA CZAS PRZEŻYCIA PACJENTÓW.	62
IV.9 ANALIZA POTENCJALNYCH CZYNNIKÓW WPLYWAJĄCYCH NA STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA CHOROBY.....	64
V. DYSKUSJA.....	65
VI. WNIOSKI:	73
BIBLIOGRAFIA.....	74
SPIS RYSUNKÓW.....	83
SPIS TABEL.....	85

Spis skrótów

- APC – komórki prezentujące antygen (ang. antigen presenting cell)
- AS – aktywna obserwacja (ang. active surveillance)
- ATP – adenozyno-5'-trifosforan
- BAF – kompleks SWI/SNF związany z Brahma (ang. Brahma-associated factor)
- BAP1 – gen kodujący białko pierwsze powiązane z BRCA1
- BRCA1 – ludzki gen supresorowy znajdujący się na długim ramieniu 17 chromosomu w locus 17q21
- BRCA2 – ludzki gen zlokalizowany na chromosomie 13.
- CA – krioablacja (ang. cryoablation)
- ccRCC – rak jasnokomórkowy (ang. clear-cell RCC)
- chRCC – rak chromofobowy (ang. chromophobe RCC)
- CTLA4 – cytotoksyczny antygen komórek T4 (ang. cytotoxic T cell antigen 4)
- DFS – przeżycie wolne od choroby (ang. disease free survival)
- EAU – Europejskie Towarzystwo Urologiczne (ang. European Association of Urology)
- ECOG – skala sprawności według Eastern Cooperative Oncology Group)
- FGFR – receptor czynnika wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor receptors)
- FNA – biopsja cienkoigłowa (ang. fine needle aspiration)
- HIF-1 α – czynnik indukowany hipoksją 1 α (ang. hypoxia-inducible factor 1 α)
- HIF-2 α – czynnik indukowany hipoksją 2 α (ang. hypoxia-inducible factor 2 α)
- HFSR – zespół skórny ręka-stopą (ang. hand-foot skin reaction)
- HR – hazard względny (ang. hazard ratio)
- HU – jednostki Hounsfielda (ang. Hounsfield unit)
- IHC - immunohistochemia
- IL-1 – Interleukina 1
- IL-2 – Interleukina 2
- IMDC – międzynarodowe konsorcjum bazy danych dotyczącego przerzutowego raka nerkowokomórkowego (ang. International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium)
- IO – immunoterapia (ang. immunotherapy)
- IFN- α – Interferon alfa
- ISUP – Międzynarodowe Towarzystwo Patologii Urologicznej (ang. International Society of Urological Pathology)
- JARID1C – gen kodujący demetylazę specyficzną dla lizyny 5C

komórki NK – „urodzeni” zabójcy (ang. Natural Killer)

MMR – naprawa niezgodności (ang. mismatch repair)

MRI – rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance imaging)

MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center.

mTOR – białko ssaczego celu rapamycyny (ang. mammalian target of rapamycin)

NED – żadnych dowodów na chorobę (ang. no evidence of disease)

NIO-PIB – Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

NRL – stosunku neutrocytów do limfocytów (ang. neutrophil-to-lymphocyte ratio)

NSS – operacja nerkooszczędzająca (ang. nephron sparing surgery)

OS – całkowite przeżycie (ang. overall survival)

PBRM1 – gen kodujący białko BAF180

PD-1 – receptor programowanej śmierci 1 (ang. programmed death protein 1)

PD-L1 – receptor programowanej śmierci 1 ligand 1 (ang. programmed death protein 1 ligand1)

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)

PN – częściowe wycięcie nerki (ang. partial nephrectomy)

pRCC – rak brodawkowaty (ang. papillary RCC)

RCC – rak nerkowokomórkowy (ang. renal cell carcinoma)

RN – nefrektomia radykalna (ang. radical nephrectomy)

RFA – ablacja prądem o częstotliwości radiowej (ang. radiofrequency ablation)

RFS – przeżycie wolne od nawrotu nowotworu (ang. recurrence free survival)

RRM2 – podjednostka reduktazy rybonukleozydo-difosforanu M2 (ang. Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2)

SETD2 – gen kodujący metylotransferazę histonową, która katalizuje trimetylację lizyny 36 w histonie H3 (H3K36me3)

SSIGN – skala do oceny po nefrektomii radykalnej u pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki (ang. Stage, Size, Grade, Necrosis)

TCR – receptor limfocyту T (ang. T-cell receptor)

TGF- α – transformujący czynnik wzrostu alfa (ang. transforming growth factor alpha)

TILs – limfocyty naciekające środowisko guza (ang. tumor infiltrating lymphocytes)

TK – tomografia komputerowa

TKI – inhibitory kinaz tyrozynowych (ang. tyrosine kinase inhibitors)

TME – mikrośrodowisko guza (ang. tumor microenvironment)

TNM – klasyfikacja nowotworów wg UICC (ang. Tumor, Node, Metastasis)
UISS – zintegrowany system oceny Uniwersytetu Kalifornijskiego (ang. University of California Integrated Staging System)
USG – badanie ultrasonograficzne
UTX – gen kodujący demetylazę specyficzną dla lizyny 6A
VEGF – czynnik wzrostu śródbłonnki (ang. vascular endothelial growth factor)
VHL – gen kodujący białko VHL (ang. von Hippel-Lindau)
WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organisation)
WW – baczna obserwacja (ang. watchful waiting)

Streszczenie:

Immunoterapia jest obecnie szeroko stosowana w leczeniu miejscowo zaawansowanego i przerzutowego jasnokomórkowego raka nerki (ccRCC), jednak nie wszyscy pacjenci odpowiadają na to leczenie. Obecnie uważa się, że ekspresja PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych nie jest odpowiednim narzędziem do przewidywania odpowiedzi na leczenie. Aby immunoterapia anty-PD-1/PD-L1 była skuteczna, w mikrośrodowisku guza (TME) muszą znajdować się limfocyty T naciekające guz (TIL). TIL wyczerpują się pod wpływem TME i bezpośredniego kontaktu z komórkami nowotworowymi, co oznacza, że nie są w stanie zniszczyć komórek nowotworowych. Zatem obecność PD-L1 na tkance nowotworowej może być markerem skuteczności immunoterapii, choć nie potwierdzono, że brak barwienia anty-PD-L1 oznacza nieskuteczność immunoterapii. Obecne badania skupiają się głównie na aktywności limfocytów T CD8, które pełnią głównie funkcję cytotoksyczną. Modele prognostyczne stosowane u chorych na raka nerkowokomórkowego po radykalnym leczeniu nie uwzględniają informacji o typach TIL i zmianach w układzie odpornościowym. Informacje takie, w ograniczonym zakresie, są wykorzystywane w prognostycznej klasyfikacji pacjentów z chorobą przerzutową (model IMDC).

Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na analizie i ocenie ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych oraz liczbie i rodzaju limfocytów T naciekających mikrośrodowisko ccRCC. Uzyskane wyniki skorelowano z danymi klinicznymi. Materiał badawczy stanowiły próbki tkanek raka jasnokomórkowego nerki pochodzące z guza pierwotnego.

Nasze wyniki wykazały znacząco wyższy naciek limfocytów T CD4 niż limfocytów T CD8 w mikrośrodowisku ccRCC we wszystkich badanych grupach, chociaż stosunek CD4/CD8 dramatycznie spadał w pierwotnych przerzutowych ccRCC. Dodatkowo ekspresja CD4 była znacząco wyższa w próbkach ccRCC w porównaniu ze zdrową tkanką i dodatnio koreluje z markerami wyczerpania komórek T CD8, takimi jak TIGIT, LAG3 itp.. Badania IHC nie wykazały istotnie podwyższonej ilości PD-L1 na powierzchni komórek ccRCC. Co ciekawe, lokalizację jądrową PD-L1 zaobserwowano w grupie pacjentów z przerzutowym ccRCC.

Ocena stosunku CD4/CD8 koreluje z prognozą u pacjentów z ccRCC i w przyszłości można będzie wykorzystać to jako nowy marker prognostyczny. Dodatkowo, TIL CD4 mogą indukować wyczerpanie komórek T CD8 w TME, chociaż dokładna funkcja efektorowych

komórek T CD4 w ccRCC nie jest w pełni poznana. Funkcja jądrowego PD-L1 w przerzutach ccRCC wymaga dalszej oceny.

Summary:

Immunotherapy is now widely used in the treatment of locally advanced and metastatic renal cancer, however, not all patients respond well to this type of treatment. It is currently believed that PD-L1 expression on the surface of neoplastic cells is not an appropriate tool to predict response to treatment. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) must be present in tumor microenvironment (TME) for effective anti-PD-L1 immunotherapy. TILs become exhausted by TME and direct contact with cancer cells, which means that they cannot destroy cancer cells. Therefore, the presence of PD-L1 on cancer tissue can be a marker for effectiveness of immunotherapy, although it has not been confirmed that negative staining of tumor tissue for the PD-L1 means that immunotherapy is ineffective. The current research focuses mainly on the activity of the CD8 T cells, which mainly have a cytotoxic function. The prognostic models used in patients with renal cell carcinoma, after radical treatment, do not take into account information about types of TILs and changes in the immune system. Such information, on a limited basis, is used in the prognostic classification of patients with metastatic disease (IMDC Model).

The following doctoral dissertation focuses on the analysis the evaluation of the PD-L1 expression on the surface of neoplastic cells and the number and type of T lymphocytes infiltrating the ccRCC environment. The obtained results were correlated with clinical and pathological variables. The research material consisted of tissue samples with clear cell carcinoma of the kidney from the primary tumor.

Our results showed significantly higher infiltration of CD4 T cells than CD8 T cells in ccRCC samples in all studied groups, although the CD4/CD8 ratio dramatically decreased in primary metastatic ccRCC. Additionally, the expression of CD4 was significantly higher in ccRCC samples compare to healthy control, and positively correlates with CD8 T cell exhaustion markers like TIGIT, LAG3 and other immune-dependent genes (e.g. CD80, CD86, etc.). IHC studies showed no significant overexpression of PD-L1 on the surface of ccRCC cells. Interestingly, the nuclear localization of PD-L1 was observed in a group of patients with metastatic ccRCC.

The evaluation of CD4/CD8 ratio correlates with ccRCC prognosis, which can be used in the future as new prognostic marker. Additionally, the CD4 TILs may induce the CD8 T cell exhaustion in TME, although the exact function of effector CD4 T cells in ccRCC is not fully understand. The function of nuclear PD-L1 in metastasis of ccRCC needs to be further evaluated.

I. Wstęp

1.1. Rak nerki

Rak nerkowokomórkowy (RCC, ang. renal cell carcinoma) stanowi 2-3% wszystkich nowotworów złośliwych u ludzi, z czego większość zachorowań występuje w krajach wysoko rozwiniętych. Jest odpowiednio szóstym u mężczyzn oraz dziesiątym u kobiet najczęściej występującym nowotworem złośliwym w populacji europejskiej. RCC w przewadze występuje u mężczyzn, z największą częstością występowania między 60. a 70. rokiem życia [1]. Rak nerkowokomórkowy jest najczęstszą zmianą litą występującą w nerkach i stanowi około 90% nowotworów złośliwych wywodzących się z nerek. RCC wstępuje w różnych podtypach, o zróżnicowanych cechach histopatologicznych i genetycznych [2]. Do czynników środowiskowych, bezpośrednio powiązanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby zalicza się palenie papierosów, otyłość, nadciśnienie tętnicze. Ostatnio także cukrzycę wiąże się z większym ryzykiem zachorowania [3]. Czynniki genetyczne także odgrywają istotną rolę: posiadanie krewnego pierwszego stopnia, u którego rozpoznano raka nerkowokomórkowego, wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworu nerki. Wydaje się, że umiarkowane spożycie alkoholu ma działanie zapobiegawcze, lecz mechanizm ochronny nie jest poznany. Najskuteczniejszą profilaktyką raka nerki jest zaprzestanie palenia oraz redukcja masy ciała [2].

W 2016 roku WHO opublikowało nową klasyfikację histopatologiczną podtypów raka nerki, które zostały sklasyfikowane na podstawie dominujących cech cytoplazmatycznych, cech architektury, anatomicznej lokalizacji guzów, korelacji ze specyficznym podłożem choroby nerek oraz zmian molekularnych (tabela 1) [2].

Tabela 1 Klasyfikacja guzów nerek wg WHO

Renal cell tumours		Mesenchymal tumours occurring mainly in adults	
Clear cell renal cell carcinoma	8310/3	Leiomyosarcoma	8890/3
Multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential	8316/1*	Angiosarcoma	9120/3
Papillary renal cell carcinoma	8260/3	Rhabdomyosarcoma	8900/3
Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma-associated renal cell carcinoma	8311/3*	Osteosarcoma	9180/3
Chromophobe renal cell carcinoma	8317/3	Synovial sarcoma	9040/3
Collecting duct carcinoma	8319/3	Ewing sarcoma	9364/3
Renal medullary carcinoma	8510/3*	Angiomyolipoma	8860/0
MiT family translocation renal cell carcinomas	8311/3*	Epithelioid angiomyolipoma	8860/1*
Succinate dehydrogenase-deficient renal carcinoma	8311/3	Leiomyoma	8890/0
Mucinous tubular and spindle cell carcinoma	8480/3*	Haemangioma	9120/0
Tubulocystic renal cell carcinoma	8316/3*	Lymphangioma	9170/0
Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma	8316/3	Haemangioblastoma	9161/1
Clear cell papillary renal cell carcinoma	8323/1	Juxtaglomerular cell tumour	8361/0
Renal cell carcinoma, unclassified	8312/3	Renomedullary interstitial cell tumour	8966/0
Papillary adenoma	8260/0	Schwannoma	9560/0
Oncocytoma	8290/0	Solitary fibrous tumour	8815/1
Metanephric tumours		Mixed epithelial and stromal tumour family	
Metanephric adenoma	8325/0	Cystic nephroma	8959/0
Metanephric adenofibroma	9013/0	Mixed epithelial and stromal tumour	8959/0
Metanephric stromal tumour	8935/1	Neuroendocrine tumours	
Nephroblastic and cystic tumours occurring mainly in children		Well-differentiated neuroendocrine tumour	8240/3
Nephrogenic rests		Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Nephroblastoma	8960/3	Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3
Cystic partially differentiated nephroblastoma	8959/1	Phaeochromocytoma	8700/0
Paediatric cystic nephroma	8959/0	Miscellaneous tumours	
Mesenchymal tumours		Renal haematopoietic neoplasms	
Mesenchymal tumours occurring mainly in children		Germ cell tumours	
Clear cell sarcoma	8964/3	Metastatic tumours	
Rhabdoid tumour	8963/3	The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours.	
Congenital mesoblastic nephroma	8960/1	The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions.	
Ossifying renal tumour of infancy	8967/0	*New code approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O.	

Rak nerkowokomórkowy powstaje z nabłonka nerkowych kanalików proksymalnych, ale może się również wywodzić z bardziej dystalnych części nefronu. Zmiany zlokalizowane są najczęściej w obrębie warstwy korowej [2]. Trzy podtypy raka nerkowokomórkowego są najczęstsze:

- Rak jasnokomórkowy (ccRCC, ang. clear-cell RCC)
- Rak brodawkowy (pRCC, ang. papillary RCC)
- Rak chromofobowy (chRCC, ang. chromophobe RCC)

1.2 Rak jasnokomórkowy

Rak jasnokomórkowy (ccRCC) jest najczęstszym typem, odpowiadającymi za 65% przypadków raka nerkowomórkowego. Zwykle są to guzy pojedyncze, dobrze odgraniczone, bez torebki. Na przekroju mają kolor żółty, często z wylewami krwawymi oraz martwicą. W niektórych przypadkach obecne jest naciekanie otaczającego mięszu niewielkimi wypustkami lub tworzenie drobnych ognisk satelitarnych co wskazuje na agresywny wzrost guza. Histologicznie zbudowany jest z komórek o jasnej cytoplazmie. W zależności od ilości wewnątrzkomórkowych lipidów i glikogenu komórki raka jasnokomórkowego mogą mieć charakter lity lub przypominający komórki zwakualizowane.

W większości przypadków są to nowotwory sporadyczne oraz rzadziej rodzinne. Często stwierdza się utratę krótkiego ramienia chromosomu – 3p i mutację genu von Hippel-Lindau (VHL) na chromosomie 3p25. Utrata funkcji białka von Hippel-Lidanu prowadzi do inicjacji nowotworzenia, progresji choroby i występowania przerzutów. Ponadto locus 3p zawiera cztery geny supresorowe dla raka jasnokomórkowego (UTX, JARID1C, SETD2, PBRM1). Ogólnie rak jasnokomórkowy ma gorsze rokowanie niż rak brodawkowy czy chromofobowy, aczkolwiek zależy to również od stopnia zaawansowania oraz histologicznego stopnia złośliwości [4,5,6].

1.2.1 Stopień zaawansowania nowotworu

Stopień zaawansowania nowotworu jest określany według klasyfikacji TNM (ang. The Tumor Node Metastasis classification system). Uwzględnia ona wielkość guza, naciek żylny, naciek torebki nerkowej, naciek tłuszczu okołonerkowego, zajęcie nadnerczy, przerzuty do węzłów chłonnych oraz przerzuty odległe. Ostatnia klasyfikacja została opublikowana w 2017 roku. (tabela 2) [4, 7].

Tabela 2 Klasyfikacja nowotworów nerki TNM 2017r.

T (<i>tumor</i>) - guz pierwotny nowotworu	
Tx	nie można ocenić guza pierwotnego
T0	nie stwierdza się guza pierwotnego
T1	guz o średnicy do 7 cm, ograniczony do mięszu nerki
T1a	guz nie większy niż 4 cm
T1b	guz większy niż 4 cm i nie większy niż 7 cm
T2	guz o średnicy powyżej 7 cm, lecz ograniczony do mięszu nerki
T2a	guz większy niż 7 cm i nie większy niż 10 cm
T2b	guz większy niż 10 cm ograniczony do mięszu nerki
T3	guz nacieka główne naczynia żyłne lub tkankę tłuszczową okołonerkową lecz bez przekraczania powięzi Geroty czy naciekania gruczołu nadnerczowego
T3a	guz wrasta w żyłę nerkową lub jej odgałęzienia lub nacieka tkankę tłuszczową okołonerkową bez przekraczania powięzi Geroty
T3b	guz wrasta w żyłę główną dolną poniżej przepony
T3c	guz wrasta w żyłę główną dolną powyżej przepony lub nacieka ścianę żyły głównej dolnej
T4	guz nacieka poza powięź Geroty (w tym naciekanie przez ciągłość gruczołu nadnerczowego)

N (<i>lymph nodes</i>) - stan regionalnych węzłów chłonnych	
Nx	nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych
N0	brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1	obecne przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych

M (<i>metastases</i>) - przerzuty odległe	
M0	nie stwierdza się obecności przerzutów odległych
M1	stwierdza się przerzuty odległe

Stopień zaawansowania raka nerki na podstawie klasyfikacji TNM	
Stopień I	T1 N0 M0
Stopień II	T2 N0 M0
Stopień III	T3 N0 M0
	T1,T2,T3 N1 M0
Stopień IV	T4 każdy N M0
	każdy T każdy N M1

1.2.2 Diagnostyka histopatologiczna

Ocena histopatologiczna obejmuje, oprócz typu raka nerkowokomórkowego, ocenę stopnia zaawansowania według morfologii i wielkości jądra komórkowego, obecność martwicy, cech mięsakowatych, naciekania naczyń, naciekania układu kielichowo-miedniczkowego oraz tłuszczu okołonerkowego. Stopień złośliwości guza (ang. grade) jest jednym z najważniejszych czynników prognostycznych. Od wielu lat używana była skala złośliwości według Fuhrman, która opierała się na badaniu wielkości i kształcie jądra oraz obecności jąderka [8, 9]. Obecnie skala wg. Fuhrman została zastąpiona czterostopniową klasyfikacją WHO/ISUP, która zapewnia lepsze informacje prognostyczne. W guzach stopnia 1-3 oceniane są wyłącznie jąderka, zaś w stopniu 4 występuje zawsze transformacja mięsakowata oraz rabdoidalna [10]. Guzy stopnia 1 mają jąderka, które są niepozorne i zasadochłonne przy powiększeniu $\times 400$; guzy stopnia 2 mają jąderka, które są wyraźnie widoczne przy 400-krotnym powiększeniu i są eozynofilowe; guzy stopnia 3 mają wyraźnie widoczne jąderka przy powiększeniu $\times 100$; a guzy stopnia 4 mają skrajny pleomorfizm lub morfologię rabdoidalną i/lub sarkomatoidalną. Ten system klasyfikacji został zwalidowany dla raka jasnokomórkowego nerkowokomórkowego i raka brodawkowatego nerkowokomórkowego [11].

1.2.3 Diagnostyka kliniczna

Zdecydowana większość raków nerki rozwija się bezobjawowo, aż do zaawansowanego stadium choroby. Większość guzów wykrywanych jest przypadkowo podczas diagnostyki niespecyficznym objawów oraz innych patologii w obrębie jamy brzusznej. Szacuje się, iż jest to około 60% przypadków niezależnie od stopnia zaawansowania [12]. Historyczna triada objawów Virchowa, obejmująca krwiomocz, ból w okolicy lędźwiowej oraz wyczuwalny guz podczas badania przedmiotowego, jest obecnie rzadko spotykana w praktyce klinicznej. Jej obecność świadczy o agresywnym przebiegu lub znacznym zaawansowaniu choroby. U części pacjentów występują objawy spowodowane chorobą przerzutową, takie jak przewlekły kaszel lub bóle kostne [13].

1.2.4 Diagnostyka obrazowa

Podstawowym badaniem służącym do rozpoznania guza nerki jest tomografia komputerowa (TK) z podaniem środka kontrastującego. Typową cechą raka nerkowokomórkowego jest wzmocnienie kontrastowe o co najmniej 15 jednostek Hounsfielda

(HU). Dzięki tomografii komputerowej możliwa jest ocena położenia, wielkości i naciekanie guza, funkcja i morfologia kontrlateralnej nerki, zajęcie naczyń żylnych, powiększenie lokalnych węzłów chłonnych, stan nadnerczy i innych narządów sąsiednich [14]. Alternatywnym badaniem dla tomografii komputerowej jest rezonans magnetyczny (MRI). Zalecany jest do wykonania u pacjentów uczulonych na środki kontrastowe podawane podczas tomografii komputerowej. Jest to również badanie, które w części przypadków może lepiej niż TK obrazować zajęcie naczyń żylnych, szczególnie zasięg inwazji oraz charakter czopa w żyłę główną dolną. Należy pamiętać, iż w badaniu MRI wykorzystywany jest dożylny środek kontrastowy zawierający gadolin, który przeciwwskazany jest u pacjentów ze znaczną niewydolnością nerek, ze względu na ryzyko rozwoju nerkopochodnego włóknienia układowego [15].

1.2.5 Biopsja nerki

Przezskórną biopsję nerki należy wykonać u pacjentów, którzy są kandydatami do aktywnej obserwacji (AS, ang. Active surveillance) oraz u chorych z małymi guzami nerek, aby uzyskać wynik histopatologiczny przed planowanym leczeniem ablacyjnym. Diagnostykę biopsyjną wykonuje się także przed leczeniem systemowym u pacjentów z procesem uogólnionym wtedy, gdy nefrektomia jest przeciwwskazana. Zabieg wykonywany jest w znieczuleniu miejscowym, pod kontrolą USG lub tomografii komputerowej. Istnieją dwie techniki wykonywania badania, biopsja rdzeniowa lub aspiracja cienkoigłowa (FNA, ang. fine needle aspiration). Pierwsza z metod stosowana jest do guzów litych, zaś druga do zmian o charakterze torbielowatym. Niezależnie od metody biopsji, należy ją wykonywać techniką współosiową (coaxial technique), umożliwiającą wielokrotne pobranie materiału przez jedną kaniulę, aby uniknąć ryzyka rozsiewu guza w kanale biopsyjnym [16].

1.2.6 Diagnostyka genetyczna

Rak nerki może być związany z mutacjami dziedzicznymi lub monogenową zmianą linii zarodkowej występującą *de novo*. Dziedziczny rak nerki odpowiada za 5-8% wszystkich przypadków raka nerki, aczkolwiek może to być liczba niedoszacowana. U około 38% pacjentów z chorobą przerzutową rozpoznaje się mutacje w linii zarodkowej. Ocena genetyczna wskazana jest u pacjentów, u których rak nerki został rozpoznany poniżej 46r.ż., w przypadkach występowania guzów obustronnych lub wieloogniskowych, z wywiadem raka nerki u krewnego pierwszego lub drugiego stopnia oraz wtedy, gdy badanie histopatologiczne sugeruje

obecność dziedzicznej formy raka jasnokomórkowego. W tabeli 3 wymieniono najważniejsze zespoły genetyczne związane z występowaniem raków nerki [17, 18].

Tabela 3 Najważniejsze zespoły dziedziczne związane z występowaniem raków nerki

Najważniejsze zespoły dziedziczne związane z występowaniem raków nerki		
Zespół	Gen	Typ raka narki
Zespół von Hippel–Lindaua	<i>VHL</i>	Rak jasnokomórkowy
Dziedziczny rak brodawkowy nerki	<i>MET</i>	Rak brodawkowy, typ 1
Zespół HLRCC (hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer; dziedziczny zespół mięśniakowatości i brodawkowatych raków nerki)	<i>FH</i>	Rak brodawkowy, typ 2
Zespół Birta–Hogg–Dubé	<i>FLCN</i>	Rak chromofobowy lub onkocytoma
Stwardnienie guzowate	<i>TSC 1/2</i>	Wszystkie podtypy
Zespół Cowden	<i>PTEN</i>	Wszystkie podtypy
Zespół dziedzicznego guza chromochłonnego	<i>SDH B/C/D</i>	Rak jasnokomórkowy
Rak jasnokomórkowy związany z translokacjami chromosomu 3		Rak jasnokomórkowy

2. Modele prognostyczne

Modele prognostyczne zostały opracowane celem dokładniejszej oceny rokowania pacjentów z rozpoznaniem rakiem nerki. Są one dokładniejsze niż klasyfikacja TNM czy oceny złośliwości histopatologicznej w przewidywaniu przeżycia i wyników leczenia onkologicznego. Ich zastosowanie jest zalecane w codziennej praktyce klinicznej, co zostało ujęte w wytycznych Europejskiego Towarzystwa Urologicznego i Europejskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej [19, 23]. W modelach rokowniczych zaleconych do powszechnego stosowania u pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym po leczeniu radykalnym w żaden sposób nie uwzględnia się możliwych do pozyskania informacji o zmianach w układzie immunologicznym pacjenta. Takie informacje, choć w bardzo ograniczonym zakresie są stosowane w klasyfikacji rokowniczej pacjentów z chorobą uogólnioną. Modele rokownicze są różne w zależności od zaawansowania choroby w chwili rozpoznania. Dla choroby ograniczonej pierwotnie do narządu najczęściej wykorzystywane są modele UISS (University of California Integrated Staging System) oraz SSIGN ((S-stage, stopień; S-size, rozmiar; G-grade, stopień złośliwości; N-necrosis, martwica, model Leibovitcha). Model UISS dotyczący pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym zawiera klasyfikację TNM, stopień sprawności w skali Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) oraz stopień złośliwości – model dotyczy

pacjentów z chorobą ograniczoną i chorych z przerzutami odległymi (u chorych z chorobą uogólnioną nie jest zalecany do powszechnego stosowania, stąd pominięto w tabeli), przy czym pacjenci z zajęтыми węzłami chłonnymi oceniani byli w części modelu dotyczącym choroby przerzutowej [20]. Ostatnia aktualizacja modelu to 2004 rok [21]. Drugi model, także zalecany do powszechnego użytku to model SSIGN dla pacjentów z rakiem jasnokomórkowym, często nazywany jest także modelem Leibovitcha [22]. W tabeli 4. przedstawiono oba omawiane powyżej modele.

Tabela 4 Modele rokownicze UISS oraz SSIGN dla pacjentów po leczeniu radykalnym

MODEL UISS					
Grupa		Grupa rokownicza			
		Cecha T	Złośliwość w skali Fuhrman	Stopień sprawności w skali ECOG	Pięcioletnie przeżycie wolne od progresji DFS (%)
Guz ograniczony do nerki (N0, M0)	Ryzyko niskie	1	1–2	0	91.1
	Ryzyko pośrednie	1	1–2	co najmniej 1	80.4
		1	3–4	każdy	
		2	każdy	każdy	
		3	1	każdy	
		3	2–4	każdy	
	Ryzyko wysokie	3	2–4	co najmniej 1	54.7
		4	każdy	każdy	
MODEL SSIGN					
Cecha				Punktacja	
Cecha T (klasyfikacja z 2002 r.)				pT1a	0
				pT1b	2
				pT2	3
				pT3a-pT3c	4
				pT4	4
Cecha N (klasyfikacja z 2002 r.)				pNx, pN0	0

	pN1, pN2	2
Rozmiar guza	<10 cm	0
	≥10 cm	1
Stopień złośliwości	1 - 2	0
	3	1
	4	3
Martwica w utkaniu guza	Nie	0
	Tak	1

Punktacja	Grupa	Pięcioletnie przeżycie wolne od przerzutów (%)
0–2	Ryzyko niskie	97.1
3–5	Ryzyko pośrednie	73.8
6 i więcej	Ryzyko wysokie	31.2

W przypadku pacjentów z chorobą uogólnioną stosowany jest obecnie model IMDC (International mRCC Database Consortium), zwany także skalą Henga [24], w którym uwzględniane są następujące czynniki pogarszające rokowanie:

- stan sprawności Karnofskiego (PS) <80%;
- poziom hemoglobiny poniżej dolnej granicy normy
- czas od diagnozy do leczenia <1 rok;
- skorygowany poziom wapnia powyżej górnej granicy normy;
- liczba płytek krwi powyżej górnej granicy normy
- neutrofile ponad górną granicą normy.

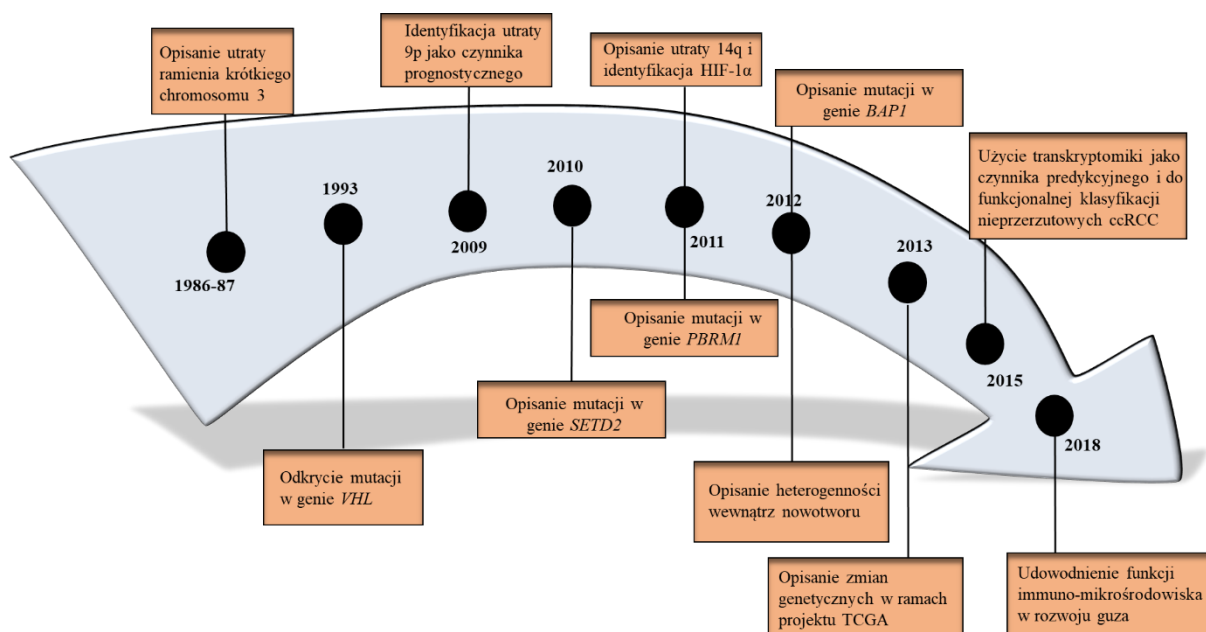
W tabeli 5. przedstawiono powyższy model.

Tabela 5 Model rokowniczy IMDC dla pacjentów z uogólnionym rakiem nerki

Liczba obecnych czynników	Grupa rokownicza	Mediana przeżycia (miesiące)	
		Pierwsza linia	Druga linia
0	Korzystna	43.2	35.3
1–2	Pośrednia	22.5	16.6
3–6	Niekorzystna	7.8	5.4

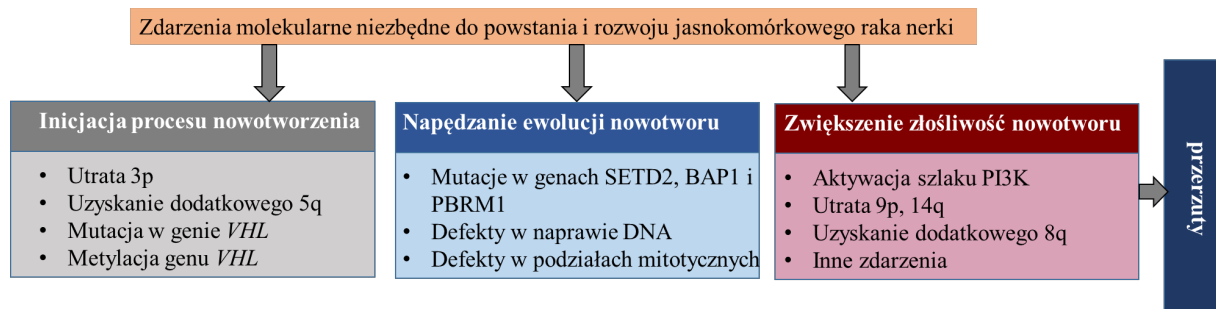
3. Zmiany molekularne w raku jasnokomórkowym (ccRCC)

Badania molekularne, prowadzone na całym świecie, trwają od wielu lat. Umożliwiły one zrozumienie molekularnego podłoża powstawania i rozwoju ccRCC (rysunek 1).



Rys.1. Najważniejsze odkrycia naukowe, które miały znaczenie w poznaniu przyczyny powstawania i rozwoju jasnokomórkowego raka nerki (źródło: „Rak nerki nowe spojrzenie”, wyd.2022/1(15)).

Badania naukowe nad immunologią powstawania raka nerkowokomórkowego pozwoliły na udzielenie odpowiedzi na istotne klinicznie pytanie: jakie zmiany molekularne są wymagane, aby zdrowe komórki przeszły transformację do komórek nowotworowych, a potem dalej do komórek nowotworowych o potencjale metastatycznym (rysunek 2).



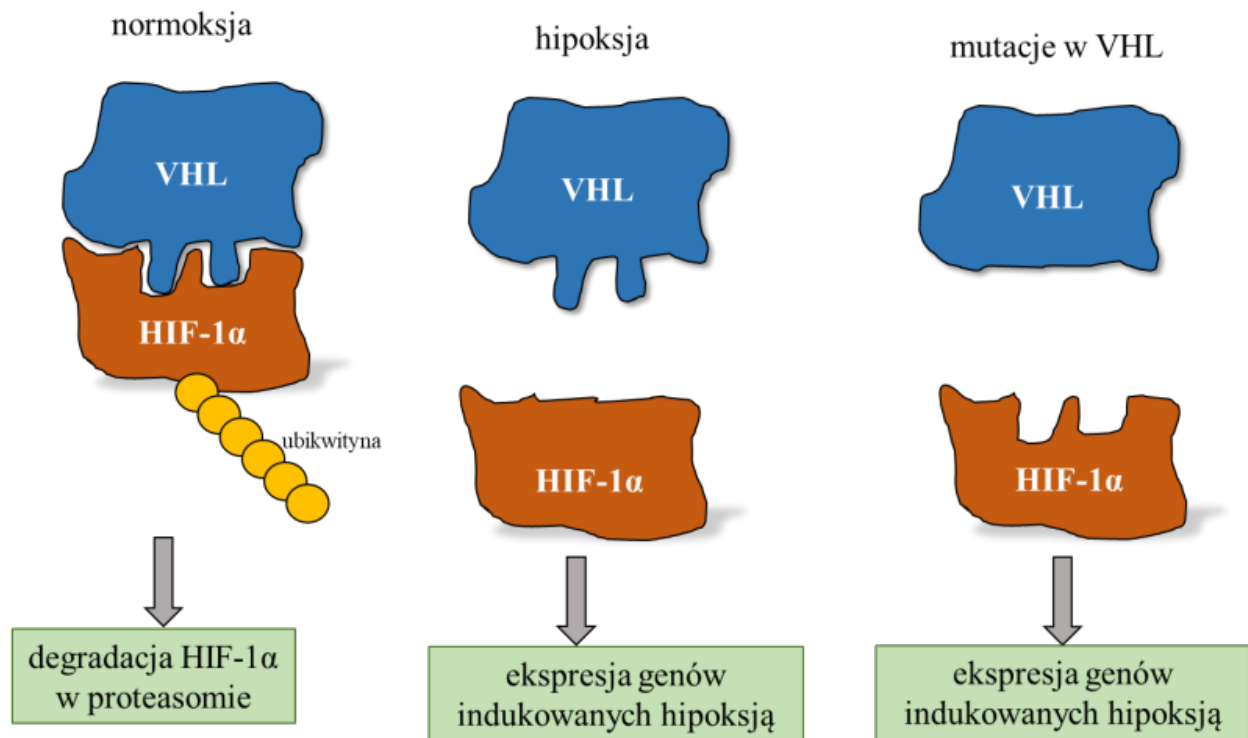
Rys. 2. Zmiany molekularne odpowiedzialne za powstawanie i rozwój jasnokomórkowego raka nerki (źródło: „Rak nerki nowe spojrzenie”, wyd.2022/1(15)).

W początkowym etapie rozwoju ccRCC, zachodzą dwa wczesne zdarzenia: utrata krótkiego ramienia chromosomu 3 i mutacja lub delecja w genie *VHL*. Utrata krótkiego ramienia chromosom powodując dezaktywację *VHL*. Utrata krótkiego ramienia chromosomu 3 jest obecna w większości przypadków ccRCC. Na chromosomie tym obecne są między innymi takie geny jak: *BAP1*, *PBRM1*, *SETD2*, które są często zmutowane w ccRCC. Utrata krótkiego ramienia chromosomu 3 jest jednym z pierwszych zdarzeń, które prowadzą do powstania raka jasnokomórkowego, a dochodzi do tego w okresie dojrzewania. Mutacja lub utrata w genie *VHL* jest jednym z obowiązkowych zdarzeń prowadzących do rozwoju ccRCC [25,26].

3.1 *VHL*

W rodzinach obciążonych chorobą von Hippel-Lindau germinalna utrata *VHL* jest dziedziczona autosomalnie dominująco. U chorych z mutacją często występują wielogniskowe, obustronne raki jasnokomórkowe. Somatyczna utrata *VHL* obecna jest u większości pacjentów ze sporadycznym ccRCC. Gen *VHL* koduje białko *VHL*, które jest E3 ligazą ubikwityny. Substratami procesu ubikwitynacji są białka *HIF1α* i *HIF2α*. Miejscem wiązania dla *HIF* jest domena β białka *VHL*. W warunkach normoksji dochodzi do degradacji białka *HIF1α* i *HIF2α*. Białka *HIF* są głównymi czynnikami transkrypcyjnymi w komórce w warunkach hipoksji, odpowiadają za transkrypcje genów kodujących czynniki wzrostu – *VEGF*, *PDGF*, *TGF-α*. Mutacja w genie *VHL* i dysfunkcja białka prowadzi do rozregulowania tych mechanizmów. Białka *HIF* są aktywne niezależnie od stężenia parcjalnego tlenu w

komórce, a co za tym idzie, nadprodukcji czynników wzrostu. Przypuszcza się, iż jest to główny mechanizm nieprawidłowej angiogenezy w bogato unaczynionych guzach nerek w zespole von Hippa-Lindau [27] (rysunek 3).



Rys.3. Funkcja białka VHL w warunkach normoksji i hipoksji oraz w przypadku mutacji w genie VHL (źródło: „Rak nerki nowe spojrzenie” , wyd.2022/1(15)).

3.2 PBRM1

Mutacja genu PBRM1 obecna jest w znaczącej ilości przypadków ccRCC. Gen ten koduje białko BAF180, które jest składową kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF – PBAF. Brak PBRM1, a co za tym idzie, aktywności PBAF, zaburza wysoce zorganizowaną strukturę chromatyny i zakłóca transkrypcję wielu genów. Prowadzi to do rozregulowania procesów komórkowych. Mutacja w genie PBRM1 występuje z częstością ok. 30-40% w raku jasnokomórkowym nerki. Jednak najbardziej agresywne odmiany ccRCC, z komponentą mięsaka, zwykle nie posiadają tych mutacji. Częściowe obniżenie ekspresji genu PBRM1 powoduje zwiększoną proliferację komórek. Podobnie jak VHL, gen PBRM1 odgrywa istotną rolę w stabilności genomowej [28].

3.3 BAP1

Gen BAP1 jest również zaangażowany w przebudowę struktury chromatyny. Zlokalizowany jest na ramieniu krótkim chromosomu 3 i jest inaktywowany w ccRCC. Gen BAP1 zmutowany jest w około 10-20% przypadków ccRCC. Odpowiada za kodowanie białka zawierającego kilka funkcjonalnych domen, m.in. odpowiedzialną za oddziaływanie z BRCA1. Utrata genu BAP1 powiązana jest silnie ze złym rokowaniem, nawet u chorych z guzami o niskim zaawansowaniu klinicznym. U pacjentów, u których zastosowane leczenie celowane, obecność mutacji BAP1 związane jest z gorszymi wynikami leczenia [29].

3.4 SETD2

Gen SETD2 odpowiada za produkt białkowy, który zaangażowany jest w przebudowę chromatyny. Uważany jest za supresor procesu nowotworzenia w ccRCC. SETD2 jest istotne w naprawie DNA oraz metylacji mikrotubul. Komórki z niedoborem SETD2 wykazują defekty w cytokinezie i tworzeniu wrzeciona mitotycznego oraz wzrost tworzenia mostków chromosomowych. [30]

3.5. Defekt w naprawie DNA

Oprócz wymienionych mutacji, w raku jasnokomórkowym występują mutacje liczby par zasad, a zmiany w liczbie kopii chromosomów ulegają zwiększeniu wraz z zaawansowaniem raka. Wewnątrz komórki istnieje kilka ścieżek naprawy określonych rodzajów uszkodzeń DNA. Jednym z nich jest tzw. naprawa źle dopasowanych par zasad MMR (ang. mismatch repair). Głównym mechanizmem prowadzącym do uszkodzenia systemu naprawy MMR w ccRCC jest utrata lub nieprawidłowe funkcjonowanie genu MHL1 [31].

4. Immunobiologia raka nerki

Rak jasnokomórkowy nerki jest nowotworem wysoko immunogennym, co pozwala na wykorzystywanie modyfikacji funkcji układu odpornościowego w leczeniu pacjentów z chorobą zaawansowaną a ostatnio także w leczeniu uzupełniającym po leczeniu radykalnym. W ccRCC występują komórki odpornościowe naciekające nowotwór, takie jak limfocyty T cytotoksyczne, komórki dendrytyczne oraz limfocyty T pomocnicze, które wydzielają interleukiny (IL-1 i IL-2) i działają jako komórki prezentujące antygen. Odkrycie mechanizmów molekularnych zachodzących w układzie odpornościowym pacjenta z guzem

nerki pozwoliło na skuteczne terapie raka jasnkomórkowego. Nowe schematy immunoterapii, polegające na aktywacji lub utrzymaniu żywotności limfocytów T, pobudzaniu komórek dendrytycznych antygenami nowotworowymi lub blokowaniu indukowanej przez nowotwór immunosupresji są obecnie powszechnie stosowane w raku przerzutowym. Efektywność immunoterapii potwierdzona w badaniach klinicznych potwierdza istotną rolę gospodarki immunologicznej gospodarza dla przebiegu RCC. Czynniki obniżające ekspresję efektorowych limfocytów T są szczególnie ważne w raku jasnkomórkowym. Mowa tu o antygenie-4 cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4) i cząsteczce programowanej śmierci 1 (PD-1); glikoproteinowe receptory występujące na limfocytach T, są kluczowe dla procesu regulacji odpowiedzi immunologicznej. W normalnych warunkach receptory te uczestniczą w zachowaniu równowagi układu odpornościowego, zapobiegając rozwojowi chorób autoimmunologicznych. Zwiększona aktywacja tych receptorów prowadzi do obniżenia poziomu limfocytów T efektorowych i tolerancji immunologicznej. Dzieje się tak, na przykład, przez zwiększoną ekspresję ligandu zaprogramowanej śmierci 1 (PD-L1) przez guz [32, 33, 34]. Udowodniono, iż zwiększona ekspresja ligandu PD-L1 wiąże się z gorszą prognozą długoterminową u pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym typem jasnkomórkowym [35]. Dzięki tym badaniom, u pacjentów z przerzutowym ccRCC, wprowadzono do leczenia humanizowane przeciwciała monoklonalne, które blokują PD-1, PD-L1 i CTLA-4 [36].

5. Leczenie

5.1 Postępowanie w przypadku zlokalizowanego RCC

5.1.1 Aktywny nadzór oraz baczna obserwacja

U pacjentów z guzem <4cm, którzy są w podeszłym wieku lub mają liczne choroby współistniejące, ryzyko zgonu z powodu RCC jest niskie w porównaniu z ryzykiem zgonu z powodu innych przyczyn. U takich chorych możliwe jest zastosowanie aktywnego nadzoru (AS), które polega na monitorowaniu choroby przy użyciu badań obrazowych (USG, TK, MRI). Leczenie onkologiczne wdrażane jest w przypadku ewidentnej progresji choroby nowotworowej. Wzrost rozmiarów guzów nerek zazwyczaj jest powolny i tylko w sporadycznych przypadkach dochodzi do uogólnienia procesu nowotworowego. W bacznej obserwacji z kolei (WW) choroby współistniejące pacjenta stanowią przeciwwskazanie do leczenia onkologicznego, a leczenie wdraża się jedynie w przypadku dolegliwości. Stąd diagnostyka obrazowa wykonywana jest wyłącznie w przypadku wskazań klinicznych [37, 38].

5.1.2. Ablacja guza

Metody ablacyjne małych guzów nerek stanowią alternatywę dla częściowej nefrektomii/tumorektomii u pacjentów obciążonych lub w podeszłym wieku. Przed leczeniem konieczne jest wykonanie biopsji guza nerki. W chwili obecnej wykonywane są krioablacja (CA) oraz ablacja prądem o częstotliwości radiowej (RFA).

5.1.2.1 Krioablacja (CA)

Krioablacje można wykonać techniką laparoskopową lub przezskórną. Zalecana jest przy rozmiarach guza do 4cm. Skuteczność terapii szacowana jest na 95%. Wznowa choroby jest często leczona przy pomocy powtórnej krioablacji, jednak skuteczność wynosi wówczas ok 45% [39].

5.1.2.2 Ablacja prądem o częstotliwości radiowej (RFA)

Ablacja prądem o częstotliwości radiowej może być również wykonywana przezskórnie lub laparoskopowo. Wskazane jest w guzach do 3cm. Skuteczność jest podobna do metody krioablacyjnej, i wynosi 94% [40].

5.1.3 Leczenie operacyjne

W przypadku raka jasnokomórkowego nerki, w stadium ograniczonym do narządu, leczeniem z wyboru jest częściowe usunięcie nerki z zachowaniem zdrowego mięszu (NSS) lub nefrektomia radykalna (RN). Zakres operacji uzależniony jest od właściwości guza, czyli wielkości, umiejscowienia oraz zaawansowania zmiany. Głównym celem leczenia chirurgicznego jest całkowite wycięcie nowotworu przy zachowanej czynności nerek. W związku z tym, preferowanym sposobem leczenia małych guzów nerek jest operacja nerkooszczędzająca (NSS) [41].

5.1.3.1 T1 RCC

Częściowa nefrektomia oraz tumorektomia jest metodą z wyboru leczenia małych guzów, ograniczonych do narządu (skala T1 w klasyfikacji TNM). Takie podejście chirurgiczne pozwala na zachowanie lepszej funkcji nerek po operacji, a co za tym idzie, zmniejsza również ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych. W badaniach retrospektywnych udowodniono również większy czas przeżycia dla pacjentów po operacja nerkooszczędzających w stosunku

do leczenia radykalnego. Różnice są większe u młodych i stosunkowo zdrowych pacjentów. Ryzyko powikłań po leczeniu częściowym jest nieznacznie większe niż po RN [41].

5.1.3.2 T2 RCC

Istnieją ograniczone dane porównujące leczenie nerkooszczędzające z radykalną nefrektomią u pacjentów z dużymi zmianami guzowatymi ograniczonym do nerki (skala T2 w klasyfikacji TNM). W grupach pacjentów poddanych NSS zaobserwowano niższą śmiertelność specyficzną dla raka oraz związaną z nawrotem guza. Ryzyko powikłań oraz utrata krwi są mniejsze u chorych po RN. Przed leczeniem operacyjnym stopień ryzyka oraz potencjalne korzyści powinny być omówione z pacjentem. Leczenie nerkooszczędzające powinno być zwłaszcza rozważane u chorych z jedną nerka, z guzami obu nerek oraz z przewlekłą niewydolnością nerek [42].

5.1.3.3 T3 RCC

W badaniach naukowych nie udowodniono korzyści płynących z wykonania operacji z zaoszczędzeniem zdrowego mięszu nerki (NSS). Jedynek aspektem mogącym mieć wpływ na zaniechania wykonania RN są korzyści funkcjonalne nerki [43].

5.1.3.4 Limfadenektomia

Wskazania do limfadenektomii podczas radykalnej nefrektomii (RN) lub częściowego wycięcia nerki (PN) wciąż pozostaje tematem dyskusji. Według badań klinicznych rozpoznanie podejrzanych węzłów chłonnych opiera się na badaniu tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego oraz wyczuwalnych powiększonych węzłów chłonnych podczas operacji. Okazuje się, że mniej niż 20% węzłów chłonnych podejrzanych o przerzut (cN+) okazuje się być dodatnimi węzłami chłonnymi w badaniu histopatologicznym (pN+). Zarówno badanie tomografią komputerową oraz rezonansem magnetycznym nie dają szansy na pewne wykrycie zajętych węzłów chłonnych, które w obrazowaniu radiologicznym mogą być prawidłowego kształtu oraz wielkości [44, 45]. Brak jest dowodów naukowych na to, aby limfadenektomia u chorych z chorobą wysokiego ryzyka, a niezajętymi klinicznie węzłami chłonnymi (cN0), wiązała się ze zmniejszeniem ryzyka wystąpienia przerzutów odległych oraz śmiertelnością swoistą dla raka i całkowitą [46]. W przypadku choroby pN+ pacjenci odnoszą korzyści z limfadenektomii w odniesieniu do przeżycia swoistego dla choroby. W takim przypadku należy wykonać rozszerzoną limfadenektomię, która obejmuje co najmniej 15 węzłów [47].

5.1.3.5. Adrenalectomia

Czynnikiem predykcijnym zajęcia nadnercza jest rozmiar guza, ale nie jego lokalizacja w górnym biegunie nerki. Adrenalectomia nie ma wpływu na rokowanie pacjenta w odniesieniu do przeżycia całkowitego. Wskazaniem do adrenalectomii jest kliniczne podejrzenie nacieku guza nerki na nadnercze [48].

5.2 Postępowanie w przypadku miejscowo zaawansowanego RCC

5.2.1 Rola limfadenektomii w miejscowo zaawansowanym RCC

5.2.1.1 Leczenie klinicznie negatywnych węzłów chłonnych (cN-)

W przypadku raka nerki z klinicznie ujemnymi węzłami chłonnymi ryzyko ich zajęcia wynosi między 0% a 25%. Głównym czynnikiem ryzyka jest wielkość guza oraz obecność przerzutów odległych. W przypadku ujemnych węzłów w badaniach obrazowych (cN-) jedynym wskazaniem do limfadenektomii jest powiększony lub badalny węzeł chłonny podczas operacji. Główną korzyścią z limfadenektomii jest właściwa ocena stopnia zaawansowania choroby oraz prognoza przeżycia [49].

5.2.1.2 Leczenie klinicznie pozytywnych węzłów chłonnych (cN+)

W przypadku klinicznie dodatnich węzłów chłonnych (cN+), szansa na potwierdzenie przerzutu do węzłów chłonnych wynosi do 55%. Podejrzane węzły wykryte śródoperacyjnie są wskazaniem do limfadenektomii [49].

5.2.2 Leczenie RCC z czopem nowotworowym

Czop nowotworowy w przebiegu RCC, wrastający do układu żylnego jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Sam zasięg czopa w żyłę nerkowej, głównej dolnej czy w jamach serca nie jest wymierny do obecności przerzutów odległych. Postępowaniem z wyboru, u pacjentów z RCC z obecnością czopa nowotworowego, niezależnie od zasięgu, jest leczenie operacyjne. Nie zaleca się embolizacji tętnic nerkowych przed leczeniem radykalnym [50, 51].

5.2.3 Systemowe leczenie uzupełniające

5.2.3.1 Leczenie neoadjuwantowe

Leczenie przedoperacyjne systemowe, podobnie jak radioterapia przedoperacyjna w obecnym stanie wiedzy mogą być prowadzone wyłącznie w ramach badań klinicznych. Brak jest doniesień naukowych wskazujących na zasadność wdrożenia leczenia neoadjuwantowego do powszechnej praktyki.

5.2.3.2 Radioterapia adjuwantowa

Radioterapia adjuwantowa nie zwiększa przeżywalności [52].

5.2.3.3 Systemowe leczenie adjuwantowe

Liczne badania III fazy oceniały zasadność wdrożenia systemowego leczenia uzupełniającego po radykalnym leczeniu chirurgicznym. Najważniejszym z nich było badanie Keynote-564, na podstawie którego opracowano wytyczne EAU do włączenia leczeniem uzupełniającego pembrolizumabem. Punktem końcowym badania Keynote-564 był dłuższy czas wolny od choroby w porównaniu do placebo oraz zmniejszone ryzyko nawrotu choroby i śmierci o 32%. W wyniku przedstawionych danych pembrolizumab stosowany uzupełniająco po radykalnej nefrektomii, najlepiej w ciągu 12-16 tygodni od operacji, należy wdrożyć do leczenia u pacjentów z wysokim ryzykiem nawrotu określonym w badaniu Keynote-564 [53]:

- Średnio-wysokie ryzyko:
 - pT2, stopień złośliwości guza 4 lub cechy mięsakowate, N0, M0
 - pT3, każdy stopień złośliwości guza, N0, M0
- Wysokie ryzyko
 - pT4, każdy stopień złośliwości guza, N0, M0
 - każde pT, każdy stopień złośliwości guza, N+, M0
- M1 z brakiem objawów choroby (NED – ang. no evidence of disease)
 - NED po resekcji ognisk skąpoprzeczutowych < 1 rok od nefrektomii

5.3 Postępowanie w przypadku zaawansowanego i przerzutowego RCC

5.3.1 Cytoredukcyjna nefrektomia

Resekcja guza nerki jest wyłącznie skuteczna w sytuacji, gdy możliwe jest usunięcie zmiany pierwotnej wraz z ogniskami przerzutowymi oraz pacjent nie wymaga w pierwszej kolejności leczenia systemowego. W takich przypadkach leczenie chirurgiczne powinno być wdrożone bezzwłocznie.

U większości pacjentów z chorobą przerzutowa nefrektomia cytoredukcyjna wykonywana jest ze wskazań paliatywnych i wymagane jest następcze leczenie systemowe. Wytyczne EAU, względem cytoredukcyjnej nefrektomii oparte są w głównej mierze na dwóch badaniach, SURTIME oraz CARMENA. Wnioskiem końcowym badań jest zalecenie, aby pacjenci z mRCC, z grup średniego i złego ryzyka IMDC, byli bezzwłocznie poddani leczeniu systemowemu, w schemacie opartym na immunoterapii. Dopiero po uzyskaniu odpowiedzi klinicznej można rozważyć wykonanie cytoredukcyjnej nefrektomii. W praktyce klinicznej oznacza to, iż CN jest korzystną opcją u chorych w dobrym stanie klinicznym, z objawami związanymi z guzem nerki oraz chorobą oligometastatyczną. Leczenie chirurgiczne ma korzystny wpływ na układ odpornościowy oraz niesie szanse na remisję choroby i ustąpienie objawów związanych z przerzutami [54, 55, 56].

5.3.2 Leczenie miejscowe ognisk przerzutowych

Coraz częściej stosowane jest leczenie chirurgiczne lub radioterapia ognisk przerzutowych w leczeniu z mRCC w stadium oligometastatycznym. Podłożem takiego leczenia jest redukcja łącznej masy choroby, co ma przełożenie na poprawę rokowania chorych. Wdrożenie takiego leczenia może opóźnić konieczność zastosowania leczenia systemowego, a w części przypadków uzyskanie trwałych remisji choroby. Najważniejszym czynnikiem rokowniczym jest radykalność resekcji przerzutów. Najkorzystniejsze rokowania mają pacjenci z izolowanymi przerzutami do płuc [57].

5.3.3. Leczenie systemowe

5.3.3.1 Chemioterapia

Chemioterapia w raku nerki okazała się nieskuteczna. Wdrażana jest do leczenia jedynie u określonej grupy chorych, tj. u pacjentów z rakiem z kanalików zbiorczych i w raku rdzeniastym.

5.3.3.2 Terapie celowane

5.3.3.2.1 Inhibitory kinaz tyrozynowych

W przypadku chorych na przerzutowego raka nerkowokomórkowego istnieje wiele możliwości terapeutycznych o udowodnionej skuteczności. Inhibitory kinazy tyrozynowej (TKIs) to leki blokujące aktywność enzymów uczestniczących w szlakach sygnalizacji komórkowej. Szlaki te są istotne dla wzrostu, różnicowania i przeżycia komórek. W komórkach nowotworowych kinazy tyrozynowe mogą być nadaktywne, co prowadzi do niekontrolowanego wzrostu i proliferacji komórek. TKIs uniemożliwiają fosforylację docelowego substratu, poprzez wiązanie się z miejscem wiązania ATP na enzymie kinazy tyrozynowej. Zakłóca to szlak sygnałowy. Inhibitory kinaz tyrozynowych mogą być selektywne względem określonej kinazy tyrozynowej lub działać na wiele kinaz tyrozynowych. Selektywne TKI mają mniejszą toksyczność oraz mniej efektów niepożądanych, ale mogą być mniej skuteczne, w sytuacji, gdy występują oboczne szlaki aktywacyjne. W leczeniu RCC zostało zatwierdzonych kilka TKIs, w tym sunitynib, pazopanib, aksytynib, kabozantynib, lenwatynib, sorafenib, tivozanib. TKI wykorzystywane w leczeniu RCC celują w wiele kinaz tyrozynowych zaangażowanych we wzrost i przeżycie komórek nowotworowych, w tym czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR), receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR), receptora czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR) czy kinazę tyrozynową receptora c-Met (inhibitory kinaz różnią się jednak szerokością działania na kinazy oraz siłą ich hamowania). Leczenie mRCC z wykorzystaniem TKI niesie ze sobą wiele korzyści klinicznych, w tym poprawę przeżycia wolnego od progresji i przeżycia całkowitego. Mają stosunkowo łatwy do kontroli profil toksyczności oraz można podawać je doustnie. Niestety z czasem może rozwijać się oporność na terapię TKI. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi są astenia, nudności, biegunka, brak apetytu, zapalenie jamy ustnej i objawy dermatologiczne w tym zespół skórny ręka-stopa (HFSR, hand-foot skin reaction). Ponadto może występować nadciśnienie tętnicze, niedoczynność tarczycy oraz mielosupresja [58, 59, 60, 61].

5.3.3.2.2 Przeciwciało monoklonalne VEGF

Bewacyzumab jest przeciwciałem monoklonalnym działającym przeciwko czynnikowi wzrostu śróbłoka naczyniowego (VEGF), białka odpowiedzialnego za neoangiogenezę. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi jest nadciśnienie tętnicze, białkomocz, zmęczenie, utrata masy ciała oraz zaburzenia czynności nerek. Badania udowodniły, iż połączeniu bewacyzumabu z INF-alfa poprawia przeżycie wolne od progresji choroby i przeżycie całkowite u pacjentów z mRCC. Niemniej jednak, bewacyzumab, sam lub w leczeniu skojarzonym, nie jest powszechnie stosowany w zaawansowanym raku nerki z uwagi na dostępne lepsze alternatywy [62, 63].

5.3.3.2.3 Inhibitory kinazy mTOR

Inhibitory mTOR to grupa leków, która działa na szlak sygnałowy ssaczego celu rapamycy (mTOR). Kinaza mTOR to kinaza białkowo treoninowo-serynowa. Szlak sygnałowy mTOR bierze udział we wzroście, proliferacji i ruchu komórek oraz w procesie translacji i transkrypcji. W leczeniu RCC zarejestrowane są temsyrolimus oraz ewerolimus. Obecnie inhibitory mTOR nie są wykorzystywane jako leki pierwszego rzutu. Mogą stanowić opcję terapeutyczną u pacjentów nietolerujących innych grup leków lub po wcześniejszej nieskutecznej terapii IO i TKI [64, 65, 66].

5.3.3.3 Immunoterapia

5.3.3.3.1 Inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych

Sposób postępowania w zaawansowanym raku nerki zmienił się wraz z wprowadzeniem do leczenia immunoterapii. Wiadomo, że RCC jest guzem wysoce immunogennym. Może aktywować układ odpornościowy oraz wywoływać odpowiedź immunologiczną. Odpowiedź immunologiczna jest często nieskuteczna, co pozwala na wzrost guza oraz jego rozprzestrzenianie się. Kluczową rolę w immunogenności i immunoedycji ogrywa mikrośrodowisko guza (TME - tumor microenvironment). TME w raku nerkowokomórkowym powoduje wzrost populacji limfocytów naciekających guz (TILs). TILs obejmuje różne typy komórek odpornościowych, takie jak limfocyty T, limfocyty B, komórki NK oraz makrofagi. Wykazano, iż limfocyty T CD8⁺ są szczególnie ważne w niszczeniu komórek nowotworowych RCC. I o ile masywny naciek limfocytów T CD8⁺ w guzach litych zwykle wiąże się z poprawą przeżycia, w ccRCC wiąże się z gorszym rokowaniem. To gorsze rokowanie prawdopodobnie

jest wynikiem wyczerpania limfocytów T, o czym świadczy elewacja biomarkerów hamowania odpowiedzi immunologicznej i nacieki komórek immunosupresyjnych [67, 68]. Taki mechanizm można wytłumaczyć immunoedycją.

Immunoedycja to proces, w którym układ odpornościowy może rozpoznawać i eliminować komórki rakowe lub przedrakowe. Możemy wyróżnić trzy etapy: eliminację, równowagę i ucieczkę. W etapie eliminacji układ odpornościowy rozpoznaje i eliminuje komórki rakowe. W tym etapie biorą udział komórki NK, limfocyty T i makrofagi. Niestety część komórek nowotworowych może uciec z tego etapu i przejść w stan równowagi. Na tym etapie komórki nowotworowe utrzymywane są w uśpieniu przez układ odpornościowy, ale nie są całkowicie eliminowane. W ostatnim etapie, ucieczki, komórki nowotworowe wytwarzają mechanizmy unikania układu odpornościowego, na przykład przez obniżanie ekspresji antygenów lub interakcję z komórkami NK [69].

Zrozumienie procesu immunoedycji doprowadziło do opracowania immunoterapii, która obecnie jest podstawą leczenia zaawansowanego raka nerkowokomórkowego.

5.3.3.3.1.1 Układ CD28/CTLA-4

CTLA-4 jest receptorem inhibitorowym ulegający ekspresji wyłącznie na limfocytach T, zarówno na limfocytach pomocniczych T CD4+, jak i cytotoksycznych limfocytach T CD8+. Głównie jednak ulega ekspresji na limfocytach pomocniczych CD4+. Jednakże, u pacjentów leczonych przeciwciałami anti-CTLA-4 dochodzi do zwiększenia nacieku przez limfocyty CD8+ na komórki nowotworowe. Najprawdopodobniej jest to pośredni efekt aktywacji limfocytów CD4+.

CTLA-4 ogrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez modulację aktywacji i proliferacji limfocytów T. Kiedy limfocyty T są aktywowane, dochodzi do ekspresji receptora CTLA-4 na powierzchni komórki. CTLA-4 wiąże się wówczas z białkami CD80 i CD86. Białka obecne są na komórkach prezentujących antygen (APCs), takich jak komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B. Połączenie CTLA-4 z białkami na APC powoduje wysłanie sygnału do limfocytów T, aby zahamować ich aktywację i proliferację. Zapobiega to nadmiernej odpowiedzi immunologicznych, co mogłoby prowadzić do rozwoju chorób autoimmunologicznych [70, 71, 72].

W procesie nowotworowym, zaangażowanie CTLA-4/CD28 powoduje zmniejszoną aktywność limfocytów T pomocniczych oraz wzmacnia immunosupresyjne działanie limfocytów T regulatorowych (Treg) [72].

Terapia anty-CTLA-4 aktywuje ekspresję markerów stymulujących na limfocytach T. Efektem ubocznym takiego leczenia jest efekt prozapalny. W raku nerki wykorzystywane jest ludzkie przeciwciało monoklonalne IgG1 anty-CTLA-4 ipilimumab [73].

5.3.3.3.1.2 Szlak PD-1/PD-L1

Szlak PD-1/PD-L1 kontroluje indukcję i utrzymanie tolerancji immunologicznej w mikrośrodowisku guza. Aktywność PD-1 i jego ligandów PD-L1 lub PD-L2 odpowiada za aktywację, proliferację i sekrecję limfocytów T [74].

- PD-1 (białko programowanej śmierci komórki 1) to białko transbłonowe. Jest inhibitorem zarówno nabytej, jak i wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Ulega ekspresji na powierzchni różnych komórek odpornościowych, w tym na aktywowanych limfocytach T, limfocytach B, komórkach NK, makrofagach, komórkach dendrytycznych i monocytach. Ulega silnej ekspresji zwłaszcza na limfocytach T swoistych dla nowotworu. Czynnikiem transkrypcyjnym mogą być czynniki jądrowe aktywowanych limfocytów T, NOTCH, białko Forkhead box protein (FOX) i czynnik regulujący interferon (IFN) γ (IRF9). W trakcie przewlekłych infekcji dochodzi do ekspresji PD-1 na wyczerpanych limfocytach T CD8+. PD-1 oddziałuje z dwoma ligandami, PD-L1 i PD-L2, które ulegają ekspresji na powierzchni różnych komórek, w tym komórek nowotworowych i komórek prezentujących antygen. Kiedy PD-1 łączy się ze swoimi ligandami, zostaje wysłany sygnał hamujący do limfocytów T, co zmniejsza ich aktywność i zapobiega atakowaniu normalnych komórek. Komórki nowotworowe wykorzystują szlak PD-1, aby uniknąć układu odpornościowego poprzez ekspresję PD-L1 lub PD-L2 na swojej powierzchni. Zapobiega to atakowaniu ich przez limfocyty T [75].
- Ligand PD-1 (PD-L1) jest glikoproteiną transbłonową. Ulega ekspresji na różnych komórkach, w tym limfocytach T, limfocytach B, komórkach dendrytycznych, ale również komórkach nabłonkowych i komórkach nowotworowych. Ekspresja PD-L1 na komórkach nowotworowych jest adaptacyjnym mechanizmem odpornościowym, pozwalającym komórkom rakowym uniknąć odpowiedzi przeciwnowotworowej. PD-L1 działa jako czynnik pronowotworowy w komórkach nowotworowych. Dzieje się tak przez wiązanie się z jego receptorami i aktywację szlaków sygnałowych proliferacji i przeżycia [76].

W raku nerkowokomórkowym, PD-L1 ulega silnej ekspresji w komórkach nowotworowych i limfocytach naciekających guz (TILs). Ekspresja PD-L1 koreluje z gorszym rokowaniem oraz krótszym czasem przeżycia w porównaniu z guzami, w których nie ma ekspresji PD-L1. PD-1 ulega ekspresji bardziej rozproszonej niż CTLA-4, będąc obecnych nie tylko na limfocytach T, ale również na limfocytach B, komórkach NK, komórkach dendrytycznych, makrofagach i monocytach, zmniejszając ich zdolności lityczne. Zarówno PD-1 i CTLA-4 nie występują na limfocytach dziewiczych oraz limfocytach pamięci. Ekspresja PD-1 na aktywowanych limfocytach T zajmuje więcej czasu niż CTLA-4, gdyż wymaga aktywacji transkrypcji. Przewlekła ekspozycja na antygen może powodować przewlekłe podwyższoną ekspresję PD-1, czego skutkiem jest wyczerpanie limfocytów T specyficznych dla antygeny. W doświadczeniach in-vitro wykazano, że jest to proces odwracalny po zablokowaniu szlaku PD-1/PD-L1 [77].

W procesach fizjologicznych, PD-1 odgrywa kluczową rolę w hamowaniu limfocytów T, w tkankach obwodowych, podczas reakcji zapalnych. W ten sposób zmniejszana jest autoimmunizacja oraz uszkodzenia uboczne. Dzięki wzmożonej ekspresji PD-L1 w komórkach nowotworowych, guzy rozwijają oporność immunologiczną w mikrośrodowisku guza (TME). Dzieje się tak, przez kilka procesów adaptacyjnych. Jednym z nich jest wzmożone wiązanie się ligandu PD-L1 obecnego na komórce nowotworowej z PD-1 obecnym na limfocytach T CD8+ specyficznych dla antygeny. Powoduje to hamowanie aktywności cytotoksycznej wobec komórek prezentujących antygeny nowotworowe. Aktywacja PD-1 bezpośrednio hamuje efekty, w których pośredniczy receptor limfocytu T (TCR) oraz zwiększa migrację w tkankach limfocytów T. Przy zwiększonej migracji oraz krótszym czasie ekspozycji, limfocyty T mogą nie identyfikować komórek o niskim poziomie MHC. Komórki nowotworowe unikają w ten sposób nadzoru immunologicznego i destrukcji. Ponadto sygnalizacja PD-1 ma wpływ na produkcję cytokin przez limfocyty T, hamując przy tym produkcję IFN- γ , TNF- α i IL-2. PD-1 może również hamować proliferację limfocytów T [76].

W chwili obecnej, zarejestrowane są dwa preparaty stosowane w raku nerkowokomórkowym. Są to niwolumab i pembrolizumab (anty-PD-1). W fazie badań klinicznych pozostają awelumab i durwalumab (anty-PD-L1).

5.3.3.3 Strategie leczenia

Immunoterapia oparta na dwóch lekach jest obecnie standardem leczenia u pacjentów z wszystkich grup ryzyka IMDC. Wykorzystywane jest połączenie IO+TKIs (pembrolizumabu z aksytynibem lub z lenwatynibem oraz niwolumabu z kabazantynibem). Dodatkowo u

pacjentów z grup średniego i złego ryzyka IMCD można wdrożyć do leczenia połączenie dwóch leków immunokompetentnych: ipillimumabu i niwolumabu. Terapia oparta na monoterapii z wykorzystaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych w pierwszej linii ma obecnie mniejsze znaczenie. Monoterapia sunitynibem, pazopanibem i kabazantynibem pozostają alternatywą dla pacjentów, u których immunoterapia szlaku PD-1/PD-L1 jest przeciwwskazana. Należy jednak wskazać, że w grupie o rokowaniu dobrym nie potwierdzono, by terapie wielolekowe były lepsze od dotychczasowego standardu, tj. sunitynibu [78, 79].

Tabela 6 Leczenie pierwszego rzutu u pacjentów z przerzutowym rakiem nerkowokomórkowym, podtyp jasnokomórkowy

	Standard leczenia	Monoterapia
IMDC kategoria korzystna	niwolumab/kabazantynib pembrolizumab/aksytynib pembrolizumab/lenwatynibem	sunitynib pazopanib
IMDC kategoria pośrednia i niekorzystna	niwolumab/kabazantynibem pembrolizumab/aksytynib pembrolizumab/lenwatynibem niwolumab/ipillimumab	kabazantynib sunitynib pazopanib

5.3.3.4 Czynniki prognostyczne w uogólnionym raku nerki

W przypadku raka nerkowokomórkowego podstawą kwalifikacji do leczenia systemowego jest model prognostyczny IMDC (International Metastatic RCC Database Consortium). Poprzednio, kwalifikacja do leczenia opierała się na starszych kryteriach MSKCC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center). Obecnie skala MSKCC nie jest szeroko wykorzystywana, z uwagi na fakt, iż powstała na bazie danych dotyczących skuteczności stosowania interferonu. Skala IMDC została oparta na danych pacjentów, którzy byli leczeni terapią antyangiogenną. W odróżnieniu do skali IMDC, która została omówiona w poprzednich rozdziałach, w skali MSKCC nie była brana pod uwagę liczna neutrofilii oraz płytek, zaś do kwalifikacji pacjentów do poszczególnej grupy brano pod uwagę stężenie dehydrogenazy mleczanowej [24].

II. Cele pracy

Powszechnie akceptowanym poglądem jest uznawanie raka jasnokomórkowego nerki za nowotwór zależny od stanu immunologicznego pacjenta, a odpowiedź na leczenie zależy od zmian w układzie immunologicznym. Szczegółowa analiza mikrośrodowiska guza oraz naciekających guz komórek układu odpornościowego może być ważnym czynnikiem prognostycznym i rokowniczym w przypadku jasnokomórkowego raka nerki. Identyfikacja pacjentów o wysokim ryzyku progresji do postaci przerzutowej ccRCC ułatwi identyfikację kandydatów do leczenia uzupełniającego z zastosowaniem leków immunokompetentnych.

Celem tej pracy jest ocena znaczenia rokowniczego wykładników stanu immunologicznego gospodarza na przebieg ccRCC. Ocenione zostało znaczenie:

1. Ekspresji ligandu PD-L1 w komórkach jasnokomórkowego raka nerki.
2. Nacieku limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodowisku guza.
3. Wpływu mutacji w genie *PBRM1* na nacieki limfocytów T w jasnokomórkowym raku nerki.
4. Zmian w zakresie wykładników krwi obwodowej (poziomu płytek krwi; stosunku liczby neutrofilów do limfocytów).

Te dane zostały skorelowane z danymi klinicznymi i patologicznymi w odniesieniu do przynależności do grupy i przeżycia całkowitego. Celem analizy było dołączenie danych odnośnie reakcji immunologicznej na guz do innych czynników rokowniczych.

Efektem pracy ma być ewentualna poprawa dotychczas stosowanych schematów rokowniczych z uwzględnieniem najnowszych informacji naukowych dotyczących zmian w układzie immunologicznym w przebiegu raka nerkowokomórkowego. Być może, pozwoli to na wyodrębnienie grupy chorych, u których szczególnie pilne jest włączenie do badań w zakresie leczenia uzupełniającego po nefrektomii.

III. Materiały i metody

III.1 Aparatura

- Autoklaw: Prestige Medical Standard, Bionovo
- Dygestorium Ductless Fume Cupboard, Model 4850, Labcaire
- Suszarka i komora temperaturowa WTC, Binder
- Łaźnia wodna UltraTherm BWT-U, Biosan
- Łaźnia wodna, Leica
- Mikroskop świetlny, Leica DM2000LED
- Mikrotom RM2245, Leica
- Ultrawirówka: miniSpin, Eppendorf
- Pipeta Gilson Pipetman
- lodówko-zamrażarka: Indesit
- zamrażarka -20°C, Bosch

III.2 Materiały zużywalne

- Bibuły Whatmanna, BioRad
- Końcówki do pipet: 10 µl, 200 µl, 1000 µl, Citoplast
- Probówki laboratoryjne (typu Eppendorf): 0,2 ml, 1,5 ml, Profilab
- Szkiełka mikroskopowe podstawowe SuperFrost® Plus

III.3 Odczynniki

- Etanol 99%, 96%, 70%, 50%, POCH
- Hematoksylina, Mayer's, DAKO
- Ksylen 99%, POCH
- PBS (phosphate buffered saline), przygotowany samodzielnie o 1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 M Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄ pH 7,3
- Woda dejonizowana 18mΩ, otrzymana systemem MiliQ
- Woda destylowana, dostępna w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Centrum Onkologii

III.4 Przeciwciała

- anty-CD-4, (EPR6855), Rabbit mAb, Abcam
- anty-CD-8, (D8A8Y), Rabbit mAb, Cell Signaling Technology
- PD-L1(E1L3N), Cell Signaling Technology
- RRM2 (E7Y9J), Cell Signaling Technology

III.5 Zestawy odczynników

- odczynniki do immunohistochemii oraz immunocytochemii: EnVision FLEX System, oparty na Peroksydazie, DAKO Agilent Pathology Solutions

III.6 Materiał kliniczny i etyka doświadczeń

Na badanie retrospektywne, nieinterwencyjne uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, nr 20/2020 wydana dnia 21 maja 2020 roku. Zidentyfikowano 161 pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki leczonych i obserwowanych w NIO-PIB w Warszawie (w latach 2014-2020) dla których dostępne są bloki preparatów histopatologicznych. Liczebność grup przedstawia się następująco:

- 60 pacjentów z chorobą pierwotnie ograniczoną do narządu, u których w co najmniej 5-letniej obserwacji nie doszło do rozsiewu.
- 49 pacjentów z chorobą pierwotnie ograniczoną do narządu, u których w co najmniej 5-letniej obserwacji u których doszło do rozsiewu.
- 52 pacjentów z chorobą pierwotnie uogólnioną.

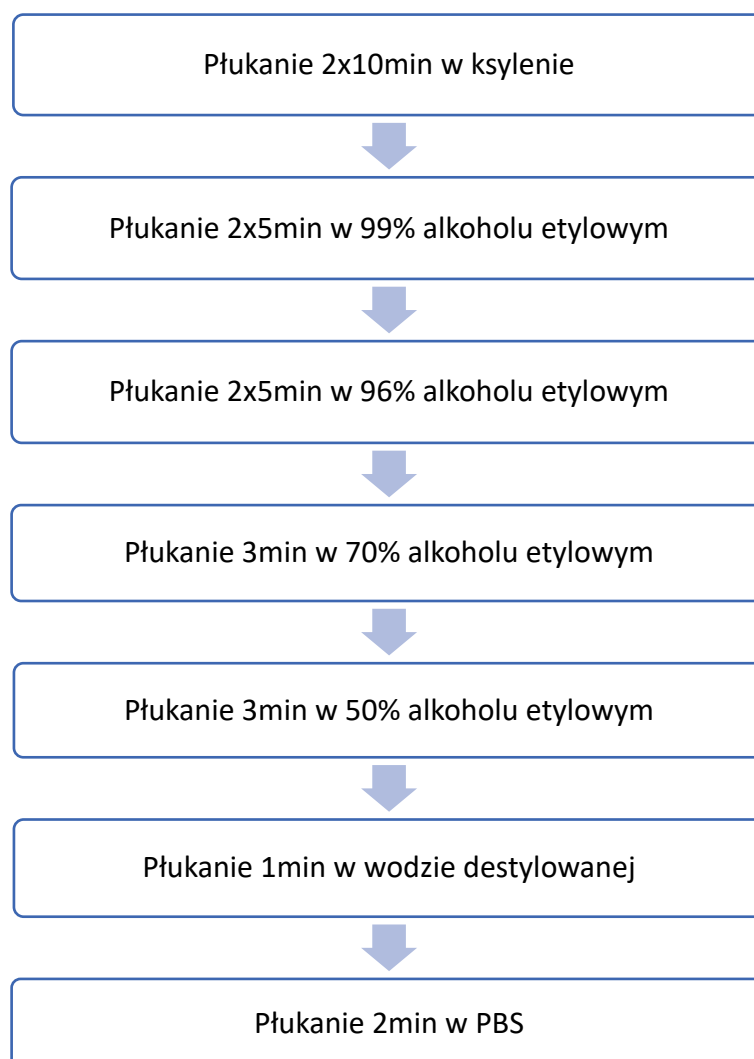
III.7 Metody

7.1 Krojenie bloczków parafinowych i odparafinowanie

Badanie immunohistochemiczne zostało wykonane w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej NIO-PIB na wycinkach histopatologicznych. Materiał uzyskany w trakcie operacji guzów nerki przeszedł proces utrwalenia w buforowanej formalinie 4%, a później odwodnieniu tkanki w Zakładzie Patomorfologii NIO-PIB. Proces odwadniania prowadzony jest etapami, poprzez umieszczanie tkanki w rozworach etanolu o wzrastającym stężeniu. Następnie materiał umieszczany jest w mieszaninie etanol-ksylen i dalej w czystym ksylenu. Ma to na celu usunięcie alkoholu z preparatu. Kolejnym krokiem jest przygotowanie do zatopienia w parafinie. Pierwszy etap, zwany przepajaniem, odbywa się w temperaturze 50°C

i polega na umieszczeniu tkanki w mieszaninie parafiny z ksylenem, a następnie w ciekłej parafinie, w której przebywa około 3 godzin. Tak przygotowany materiał jest następnie zatapiany we wnętrzu bloczka parafinowego, który sporządza się, wlewając porcję parafiny do metalowej formy i wprowadzając fragment tkanki ustawiony w odpowiedniej orientacji przestrzennej. Wycinki histopatologiczne, o grubości 3,5 μm , zatopione w parafinie zostały uzyskane poprzez krojenie bloczków parafinowych z wykorzystaniem mikrotomu. Preparaty badanej tkanki zostały umieszczone na szkiełkach podstawowych (SuperFrost®). Skrawki umieszczone na szkiełkach podstawowych zostały suszone w temperaturze 56°C przez godzinę i poddane procedurze odparafinowania. Odparafinowanie odbyło się poprzez umieszczenie szkiełek w dwóch zmianach ksylenu, a następnie wycinki zostały uwodnione etanolem o malejącym stężeniu (z 96% do 50%). Na zakończenie procedury po etanole skrawki trafiają do wody i PBS.

Całą procedurę odparafinowania można przedstawić w takim schemacie:



7.2 Immunohistochemia

W celu odsłonięcia miejsc antygenowych, materiał był inkubowany w łaźni wodnej, w buforze Target Retrieval Solution (Dako) przy temperaturze 96-97°C przez 30 min, w zależności od używanego przeciwciała. Po schłodzeniu, skrawki były płukane 3 x 5 min, RT w PBS, a następnie traktowano buforem blokującym endogenny sygnał peroksydazy 5 min, RT. Kolejnym etapem była inkubacja ze specyficznym dla badanego białka przeciwciałem pierwszorzędowym, w optymalnym rozcieńczeniu, czasie i temperaturze (informacja podana w Tabeli 6). Dalsza część inkubacji prowadzona była w dołączonych do zestawu EnVision® FLEX+ (Dako) buforach – EnVision FLEX Mouse Linker, 15 min w RT i EnVision FLEX HRP, 20 min w RT. Po każdej zmianie odczynnika preparaty były płukane 3 x 5 min w PBS. Po ostatnim płukaniu skrawki inkubowano 1 min w RT z substratem dla peroksydazy chrzanowej (DAB, 3,3'-diaminobenzzydina), płukano w wodzie 3 min w RT, a następnie inkubowano z hematoksyliną 15 sekund w RT, w celu wybarwienia jąder komórkowych i znów płukano w wodzie 3 min w RT. Po tym czasie inkubowano kolejno w 99% alkoholu etylowym przez 3 min w RT i ksylene – 5 min w RT w celu odwodnienia wybarwionych tkanek. Skrawki utrwalano poprzez zaklejenie odpowiednim szkiełkiem nakrywkowym przy użyciu odczynnika DPX Mountant for histology. Barwienie komórkowe wizualizowano za pomocą mikroskopu.

Tabela 7 Przeciwciała użyte do badań i warunki ich wykorzystania.

Przeciwciała wykorzystane do badań	Rozcieńczenia przeciwciała używane w badaniach	Temperatura inkubacji z przeciwciałom	Czas inkubacji z przeciwciałom	Czas i temperatura wykorzystana dla odsłonięcia antygenu
anty-CD-4	1:500	RT	1h	96 ^o , 30''
anty-CD-8	1:200	RT	1h	96 ^o , 30''
PD-L1	1:100	4 ^o	18h	97 ^o , 30''
RRM2	1:200	RT	1h	96 ^o , 30''

7.3 Dane kliniczne

Poza badaniem immunohistochemicznym, oceniono morfologię krwi obwodowej z oceną parametrów wskazujących na funkcje układu immunologicznego tj. liczby płytek i neutrocytów w mm^3 oraz stosunku neutrocytów do limfocytów (NRL). Uwzględniono także czynniki ujęte w powszechnie uznanych modelach rokowniczych, takie jak stopień zaawansowania klinicznego, stopień złośliwości guza, obecność martwicy w obrębie guza, rozmiar guza, obecność przerzutów oraz czynniki konstytucyjne jak wiek i płeć.

7.4 Analizy bioinformatyczne

Analizy bioinformatyczne zostały przeprowadzone przy użyciu programów *Microsoft Excel* i oprogramowaniu statystycznemu R oraz GraphPad, z przyjętym poziomem istotności równym $p=0,05$. Dodatkowo przeanalizowano bazę danych TCGA przy pomocy platformy UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>), w której zgromadzono próbki jasnokomórkowego raka nerki – ccRCC od 533 pacjentów z guza pierwotnego i 72 tkanki zdrowej nerki oraz bazę Gene Expression Omnibus database.

7.5 Analiza statystyczna

Analizie statystycznej podlegały trzy grupy pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym, typ jasnokomórkowy, o różnej charakterystyce klinicznej:

- pacjenci z chorobą pierwotnie ograniczoną do narządu, u których w czasie co najmniej 5-letniej obserwacji nie doszło do rozsiewu;
- pacjenci z chorobą pierwotnie ograniczoną do narządu, u których w czasie co najmniej 5-letniej obserwacji doszło do rozsiewu;
- pacjenci z chorobą pierwotnie uogólnioną.

W zależności od rozkładu poszczególnych czynników potencjalnie wpływających na stopień zaawansowania choroby, wymienione grupy zostały porównane metodą ANOVA, testem Kruskala-Wallisa lub testem chi kwadrat. Normalność rozkładów zweryfikowano testem Shapiro-Wilka. W przypadku wykrycia istotnych statystycznie różnic, do identyfikacji różniących się par grup zastosowano odpowiednie testy statystyczne z poprawką Bonferroniego na poziom istotności.

Krzywe przeżywalności Kaplana-Meiera w poszczególnych grupach zostały wygenerowane, a następnie porównane testem logrank. Obserwacje cenzurowano na dacie zgonu lub przeżycia, które zweryfikowano w bazie PESEL, dn. 03.06.2022 r. Zbudowano

model proporcjonalnego hazardu Coxa w celu identyfikacji czynników potencjalnie wpływających na przeżycie, uwzględniając: (1) pacjentów ze wszystkich grup jednocześnie, (2) pacjentów w każdej z trzech grup osobno. Ostateczne modele zbudowano, stosując metodę krokowej selekcji zmiennych w przód i w tył na poziomie istotności $<0,1$ na następującym zbiorze zmiennych: poziom limfocytów CD4; poziom limfocytów CD8; złośliwość w skali Furhman; poziom płytek krwi; stosunek liczby neutrofilów do limfocytów; wiek w czasie nefrektomii; ekspresja ligandu PD-L1 (błonowa) hscore; ekspresja ligandu PD-L1 (jądrowa) hscore. Wykonano również odpowiednie analizy jednowymiarowe.

Przeprowadzono wielomianową analizę regresji logistycznej (ang. multinomial logistic regression) czynników potencjalnie wpływających na stopień zaawansowania choroby. Podobnie jak w przypadku modelu Coxa, model regresyjny zbudowano metodą krokowej selekcji zmiennych na poziomie istotności $<0,1$ wśród zmiennych wskazanych powyżej; zaraportowano analizy jednowymiarowe.

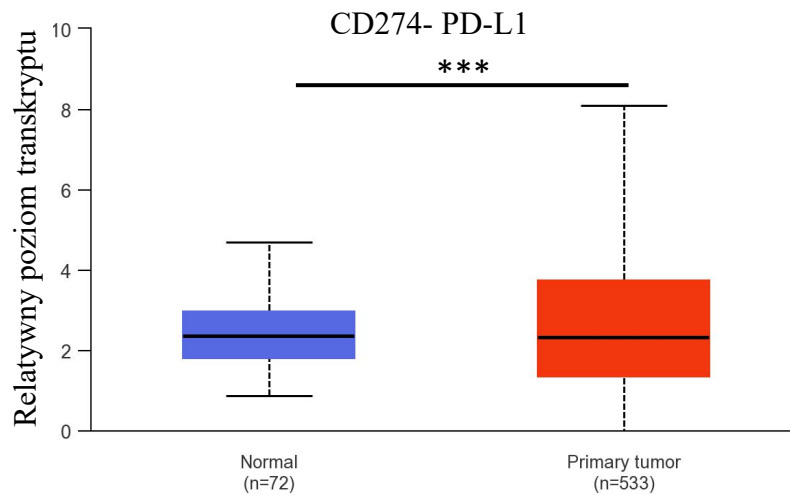
Pacjenci zostali zaklasyfikowani do grupy niskiego, średniego i wysokiego ryzyka (wznowy choroby / zgonu w ciągu 5 lat) za pomocą modelu UISS (ang. ULCA integrated staging system). Ze względu na brak pacjentów wysokiego ryzyka w grupie osób bez wznowy, na potrzeby analiz grupy średniego i wysokiego ryzyka zostały połączone. Przygotowano model jednowymiarowy określający wpływ wyniku w skali UISS na stopień zaawansowania choroby, a następnie metodą krokową dołączano kolejne zmienne spośród tych, które zbudowały wcześniej model wielomianowej regresji logistycznej. Model ostateczny i pierwotny zawierający wyłącznie UISS zostały następnie porównane testem ilorazu wiarygodności w celu weryfikacji, czy uwzględnienie dodatkowych zmiennych wniosło istotną informację do modelu.

Dla zmiennych ciągłych zaraportowano – w zależności od normalności rozkładu – średnie i odchylenia standardowe lub mediany i rozstępy międzykwartyłowe; dla zmiennych jakościowych – licznosci i odsetki. Wszystkie wykonane testy statystyczne były dwustronne, a poziom istotności $<0,05$ ustalono jako wskazujący istotność statystyczną.

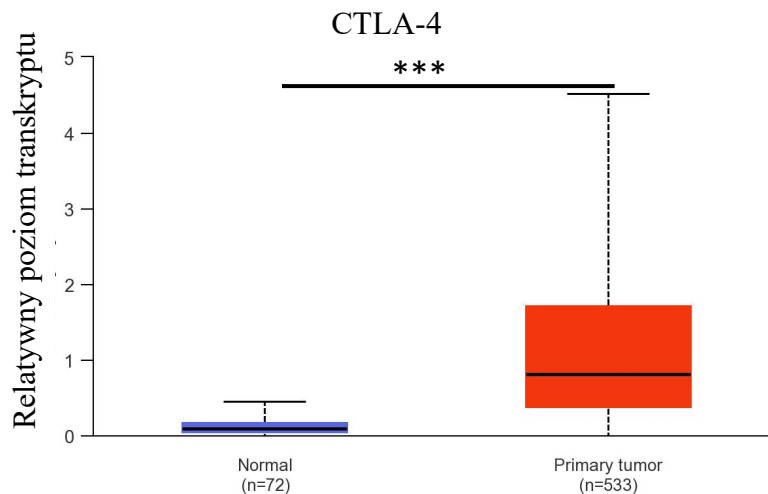
IV. Wyniki

IV.1 Analiza ekspresji PD-L1, CTLA-4 oraz CD4 i CD8A w danych wielkoskalowych dostępnych w Gene Expression Omnibus database oraz TCGA.

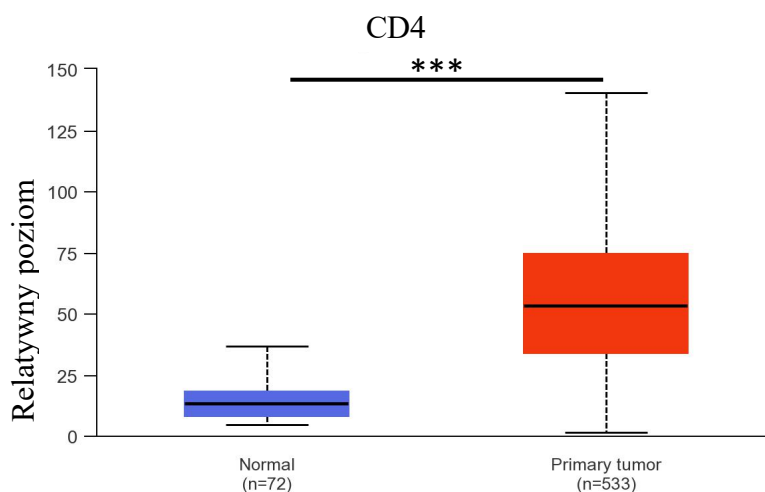
Z uwagi na to, że jasnokomórkowy rak nerki jest nowotworem, który wywołuje silną odpowiedź układu odpornościowego, sprawdzono ekspresje genów warunkujących tą odpowiedź – CD274 (Rys. 4) i CTLA4 (Rys. 5), oraz genów CD4 (Rys. 6) i CD8A (Rys. 7) specyficznych dla nacieku limfocytów T CD4 i CD8. W tym celu użyto platformy UALCAN i bazy danych wielkoskalowych TCGA. W analizie uwzględniono profil ekspresji genów pobranych z 72 zdrowych nerek oraz z 533 nowotworów pierwotnych nerki – ccRCC.



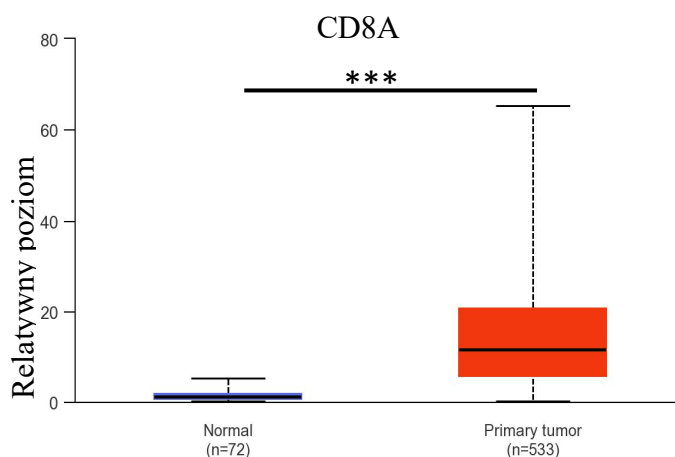
Rys. 4 Analiza ekspresji CD274 (PD-L1) w ccRCC w porównaniu do tkanki zdrowej nerki, wg bazy TCGA $p < 0,001$.



Rys. 5 Analiza ekspresji CTLA-4 w ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową, wg bazy TCGA $p < 0,001$.

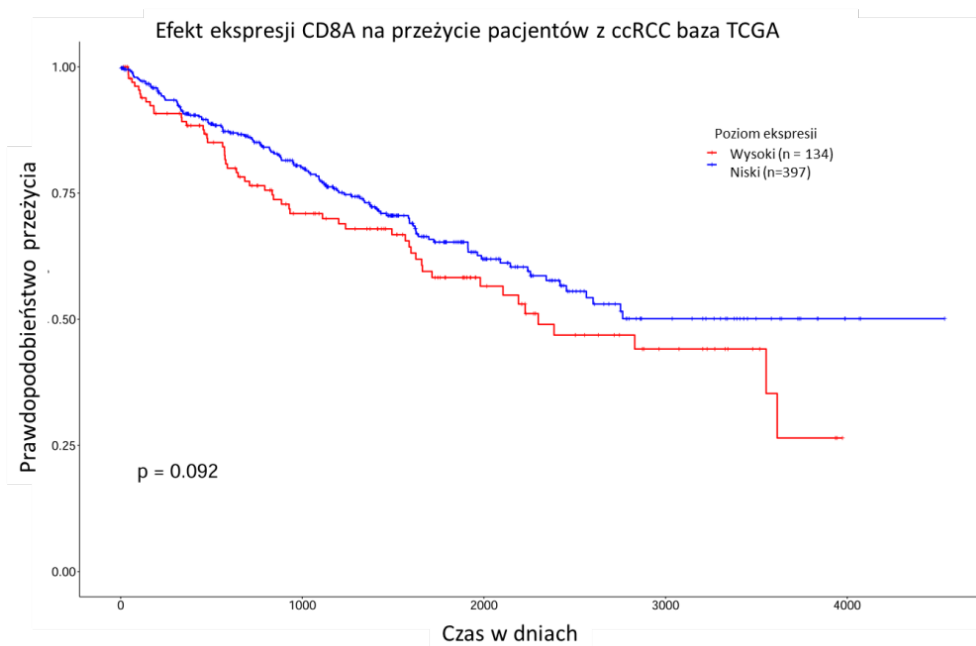


Rys. 6 Analiza ekspresji CD4, markera specyficznego dla limfocytów T CD4, wg bazy TCGA $p < 0,001$.

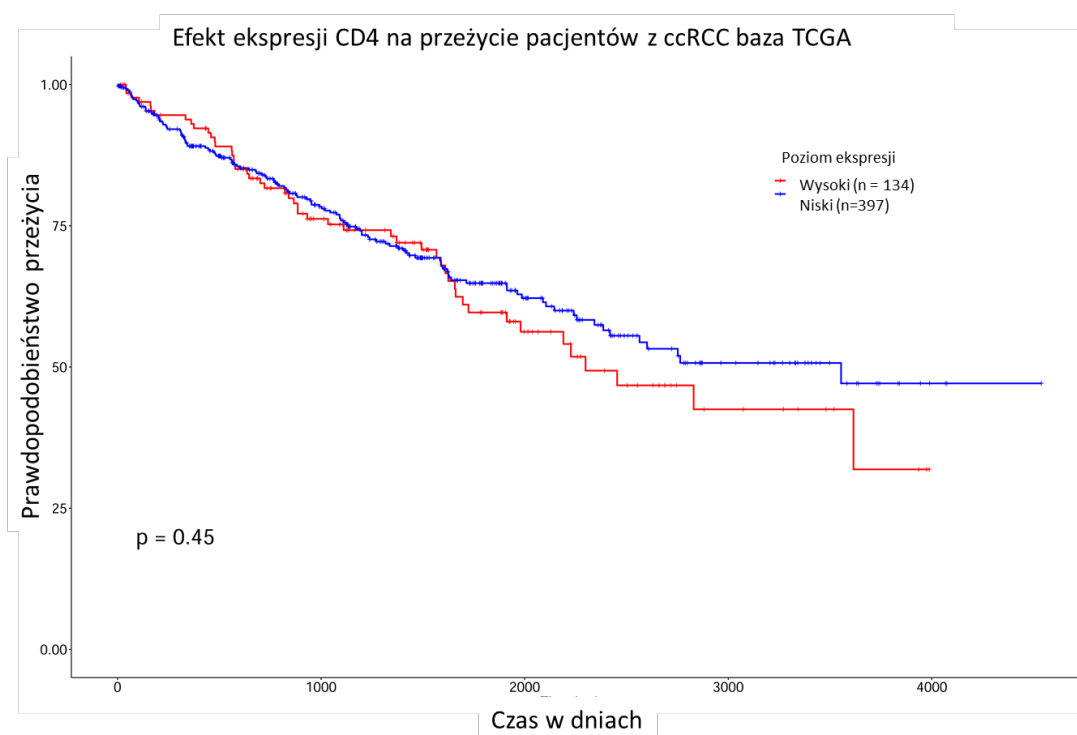


Rys. 7 Analiza CD8A, markera charakterystycznego dla limfocytów T CD8 w próbkach ccRCC vs tkanka zdrowa, wg bazy TCGA $p < 0,001$.

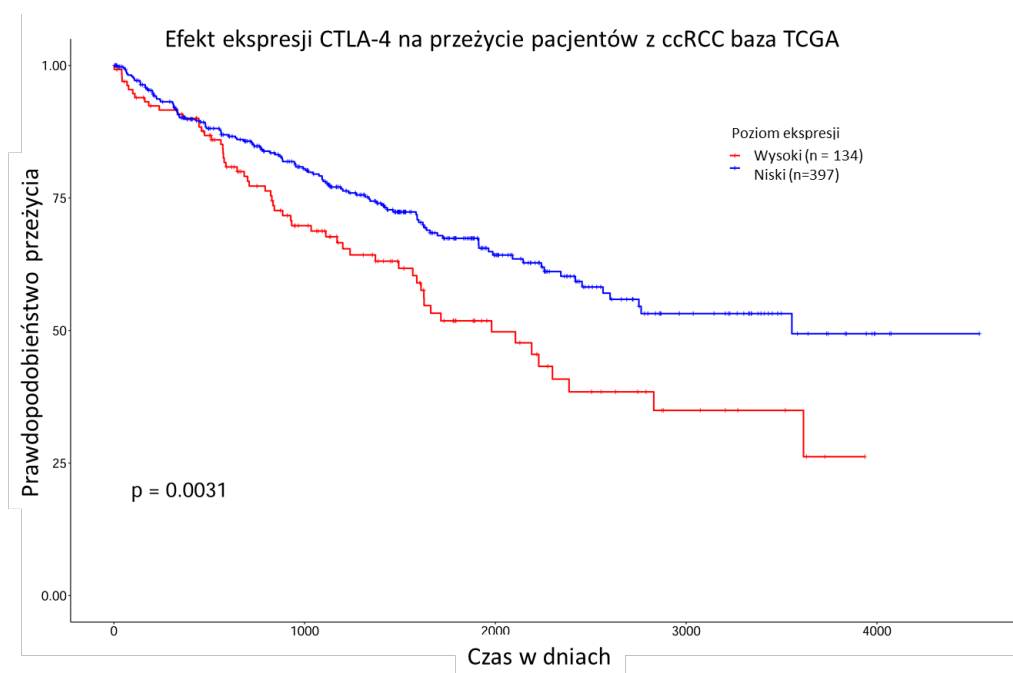
Analiza wykazała statystycznie znaczącą nadekspresję zarówno CD4 jak i CD8A, co świadczy o dużym nacieku limfocytów T w mikrośrodowisku guza oraz nadekspresję CD274, kodującego PD-L1 i CTLA4, co świadczy o immunosupresyjnym działaniu mikrośrodowiska. Ponadto zaobserwowano, że wysoki poziom ekspresji CD8A korelował z gorszym przeżyciem pacjentów z ccRCC, natomiast ekspresja CD4 w mikrośrodowisku guza nie miała wpływu na czas przeżycia (Rys. 8 i Rys. 9).



Rys. 8 Wpływ ekspresji CD8A, jednej z podjednostek receptora CD8 na limfocytach T na czas przeżycia pacjentów z rozpoznanym ccRCC.



Rys. 9 Wpływ ekspresji CD4 na czas przeżycia pacjentów z rozpoznanym ccRCC.



Rys. 10 Wpływ ekspresji CTLA-4 na czas przeżycia pacjentów z rozpoznanym ccRCC.

IV.2 Charakterystyka grup pacjentów

W związku z tym, iż pacjenci, którzy brali udział w badaniu zostali podzieleni na trzy niezależne grupy w zależności od stadium choroby, przeprowadzono dokładną charakterystykę pacjentów pod kątem klinicznym jak również zbadano zależności pomiędzy grupami. Dane zostały zebrane w Tabeli 8.

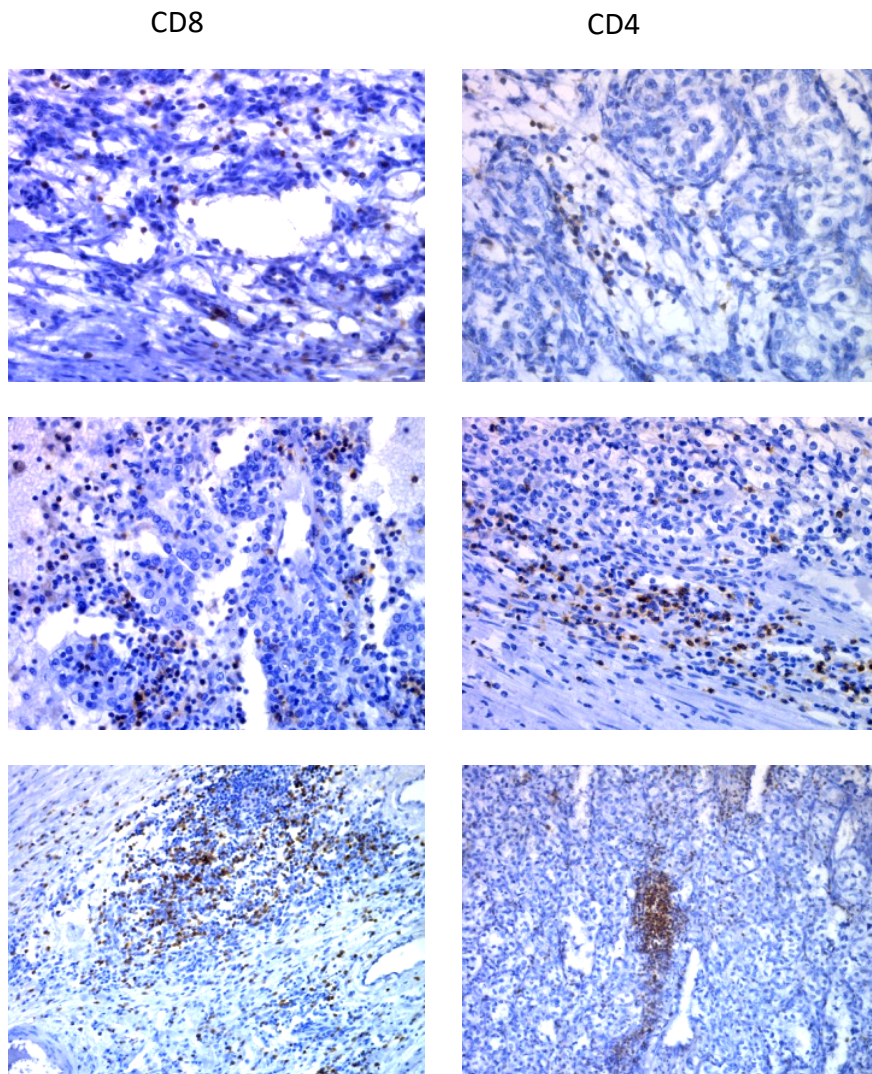
Tabela 8 Charakterystyka pacjentów oraz zależności między grupami (* test ch-kwadrat; # ANOVA; ** test Kruskalla-Wallisa)

	Charakterystyka grup pacjentów			Porównanie wszystkich grup (1 vs 2 vs 3)	Porównania par grup		
	Grupa 1 - pacjenci bez wznowy	Grupa 2 - pacjenci ze wznową	Grupa 3 - pacjenci z chorobą pierwotnie uogólnioną		p-value	gr1 vs gr2	gr1 vs gr3
Wiek, średnia (odchylenie standardowe)	60 (10.2)	64 (9.3)	64 (9.2)	0.0634#			
Płeć, n (%)							
kobieta	27 (45)	21 (42.9)	15 (28.8)				
mężczyzna	33 (55)	28 (57.1)	37 (71.2)	0.177*			
ECOG, n (%)							
0	41 (68.3)	28 (57.1)	14 (26.9)				
1	19 (31.7)	20 (40.8)	28 (53.8)				
2	0 (0)	1 (2)	9 (17.3)				
3	0 (0)	0 (0)	1 (1.9)	<0.001*	0,303	<0.001	0,004
Skala TNM - T, n (%)							
1 (1, 1a, 1b)	53 (88.3)	22 (44.9)	14 (26.9)				
2 (2, 2a, 2b)	5 (8.3)	7 (14.6)	3 (5.8)				
3 (3, 3a, 3b)	2 (3.3)	18 (37.5)	34 (65.4)				
4	0 (0)	2 (4.2)	1 (1.9)	<0.001*	<0.001	<0.001	0,036
Skala TNM - N, n (%)							
0	4 (6.7)	2 (4.1)	1 (1.9)				
1	0 (0)	0 (0)	10 (19.2)				
x	56 (93.3)	47 (97.9)	41 (78.8)	<0.001*	0,556	0,001	0,005
Skala TNM - M, n (%)							
0	60 (100.0)	49 (100.0)	0 (0.0)				
1	0 (0.0)	0 (0.0)	52 (100.0)	<0.001*	.	<0.001	<0.001
Średnica guza [cm], mediana (rozstęp międzykwartylowy)	3.35 (3.3)	5 (4)	8 (4.9)	<0.001**	0,003	<0.001	<0.001
Złośliwość w skali Fuhman, n (%)							
1	6 (10)	8 (16.3)	3 (5.8)				
2	42 (70)	22 (44.9)	11 (21.2)				
3	10 (16.7)	13 (26.5)	24 (46.2)				
4	2 (3.3)	6 (12.2)	14 (26.9)	<0.001*	0,048	<0.001	0,006
Poziom limfocytów [G/l], mediana (rozstęp międzykwartylowy)	2.115 (1)	1.92 (0.8)	1.685 (0.7)	0.009**	0,046	0,003	0,4
Poziom neutrofilów [G/l], mediana (rozstęp międzykwartylowy)	4.11 (2.6)	4.58 (2.3)	5.085 (2.3)	0.021**	0,083	0,007	0,316
Neutrofilia (>8 G/l), n (%)	6 (10.0)	4 (8.2)	6 (11.5)	0.851*			
Poziom płytek krwi [G/l], mediana (rozstęp międzykwartylowy)	225 (76.5)	228 (97)	262.5 (115)	0.060**			
Nadpłytkowość (>450 G/l), n (%)	2 (3.3)	1 (2.0)	5 (9.6)	0.165*			
Stosunek liczby neutrofilii do limfocytów, mediana (rozstęp międzykwartylowy)	2.0 (1.06)	2.5 (1.35)	3.0 (1.48)	<0.001**	0,007	<0.001	0,078
Odsetek CD4, mediana (rozstęp międzykwartylowy)	58.6 (30.7)	57 (35.4)	46.65 (39.6)	0.138**			
Odsetek CD8, mediana (rozstęp międzykwartylowy)	18.15 (22.4)	19.2 (17.5)	30.6 (22.1)	<0.001**	0,088	<0.001	0,004
H-score PD-L1 błonowa, mediana (rozstęp międzykwartylowy)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.773**			
H-score PD-L1 jądrowa mediana (rozstęp międzykwartylowy)	0 (17.3)	0 (0)	25 (66.5)	<0.001**	<0.001	<0.001	<0.001

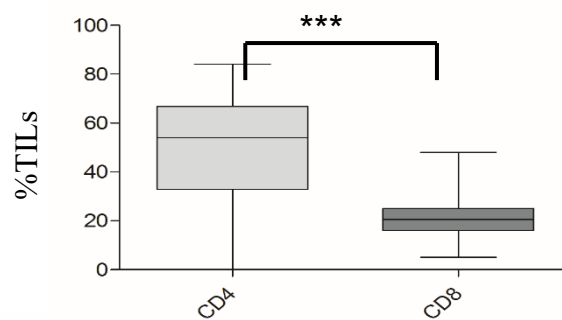
Zaobserwowano, że największe różnice pomiędzy grupami występowały pod względem parametrów: klasyfikacji TNM, wielkości guza, skali złośliwości guza wg. Fuhman, stosunku limfocytów do neutrofilii w krwi obwodowej oraz odsetka naciekających guz limfocytów T CD8 i obecności białka PD-L1 w jądrze komórkowym w komórkach ccRCC.

IV.3 Określenie nacieku limfocytów T w mikrośrodowisku guza w materiale pobranym od pacjentów z rozpoznaniem rakiem nerkowokomórkowym ccRCC.

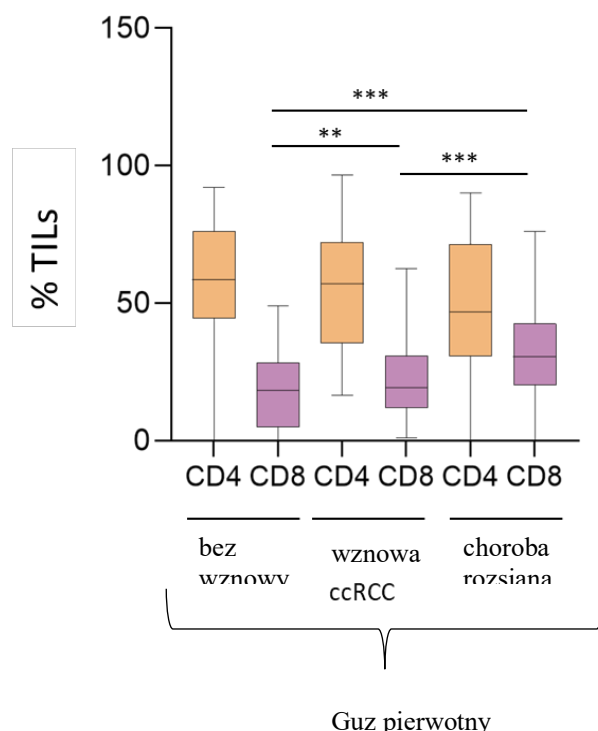
W celu dokładnej analizy ilości i rodzaju limfocytów T naciekających mikrośrodowisko guza (TILs) przeprowadzono analizę immunohistochemiczną przy użyciu przeciwciał specyficznie rozpoznających antygen CD4 i CD8 na limfocytach T. W materiale klinicznym zaobserwowano naciek zarówno limfocytów T CD8 jak i CD4 (rysunek 11), natomiast zdecydowanie większy odsetek limfocytów T CD4 naciekał mikrośrodowisko ccRCC niezależnie od grupy pacjentów (bez wznowy, wznowa i choroba pierwotnie rozsiana) (rysunek 12). Nie zaobserwowano różnic między ilością TILs CD4 naciekających ccRCC pomiędzy badanymi grupami, natomiast wraz ze wzrostem agresywności nowotworu zwiększała się ilość TILs CD8. Najwięcej limfocytów T CD8 naciekających guza zaobserwowano w grupie pacjentów z chorobą rozsianą (rysunek 13).



Rys. 11 Analiza immunohistochemiczna próbek ccRCC z użyciem przeciwciał anti-CD8 i anti-CD4. W mikrośrodowisku guza ccRCC obserwowany jest wyraźny naciek limfocytów T CD8 i CD4. (Powiększenie 400x(A-D), 200x(E-F))



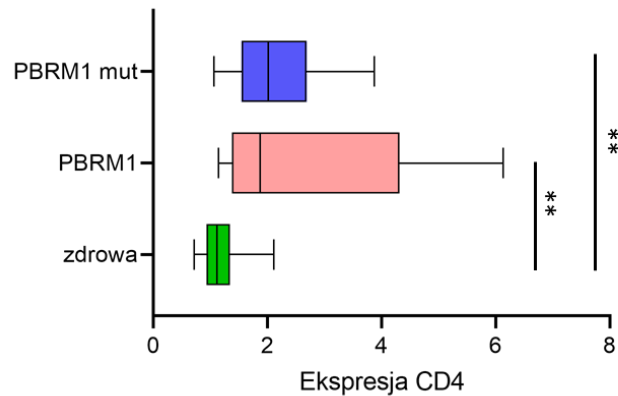
Rys. 12 Analiza ilości naciekających limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodowisku guz ccRCC bez podziału na podgrupy; $p < 0,0001$.



Rys. 13 Analiza statystyczna % nacieku limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodowisku guza ccRCC z uwzględnieniem podziału na grupy: pacjenci bez wznowy, ze wznową oraz z chorobą pierwotnie rozsianą. $p < 0,0001$.

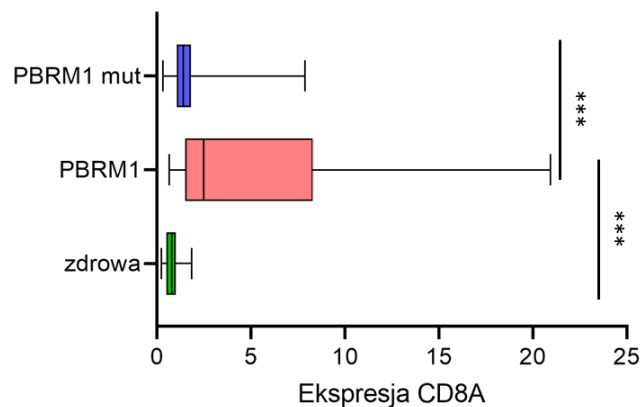
IV.4 Analiza ekspresji genów związanych z naciekiem limfocytów T u pacjentów z ccRCC w zależności od mutacji w genie *PBRM1*

Naukowcy zaobserwowali zależność reakcji układu odpornościowego od rodzaju mutacji występujących w ccRCC. W związku z tym, z dostępnej bazy danych Gene Omnibus Database o numerze GSE38695, gdzie przeprowadzono analizę transkryptomiczną 21 tkanek zdrowej nerki i 29 próbek ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1*, przeanalizowałem ekspresję CD4, markera powierzchniowego dla limfocytów T CD4+, PD-L1 (CD274), CTLA-4 oraz CD8A, markera dla limfocytów T cytotoksycznych CD8+. PD-L1 i CTLA-4 są białkami powierzchniowymi należącymi do tzw. białek immunologicznego punktu kontroli.



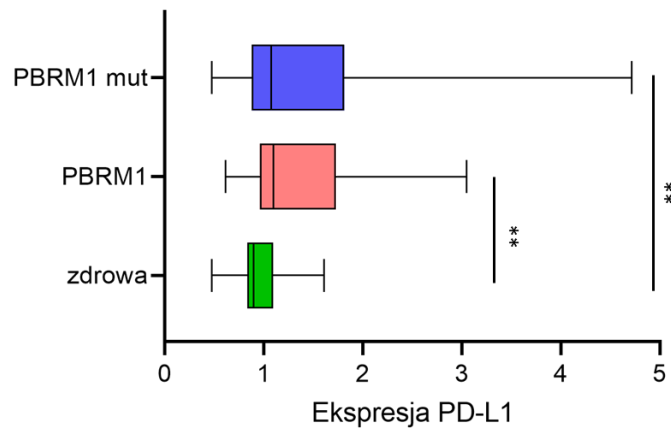
Rys. 14 Analiza ekspresji CD4 w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value<0,05, ** p value<0,001, *** p value <0,0001.

Przeprowadzona analiza wykazała, że w próbkach ccRCC wzrastała ekspresja CD4, co świadczyło o zwiększeniu nacieku limfocytów T CD4 w mikrośrodowisku guza w porównaniu z tkanką zdrową. Wzrost ten był niezależny od mutacji w genie *PBRM1*.



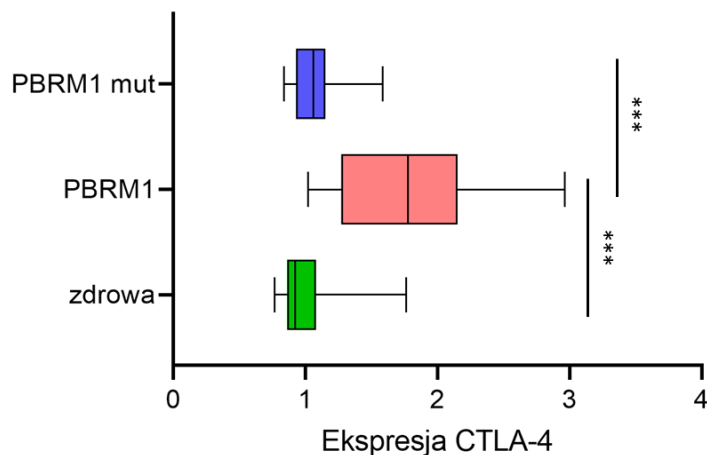
Rys. 15 Analiza ekspresji genu CD8A w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value<0,05, ** p value<0,001, *** p value <0,0001.

Analiza jednoznacznie wykazała wzrost ekspresji genu CD8A, który koduje podjednostkę alfa białka CD8 na limfocytach T w próbkach ccRCC, jednak wzrost był znacząco większy w ccRCC z brakiem mutacji w genie *PBRM1*. Świadczy to o tym, że w mikrośrodowisku guzów z mutacją w *PBRM1* najprawdopodobniej będzie znacznie mniej cytotoksycznych limfocytów T CD8.



Rys. 16 Analiza ekspresji PD-L1 (CD274) w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value<0,05, ** p value<0,001, *** p value <0,0001.

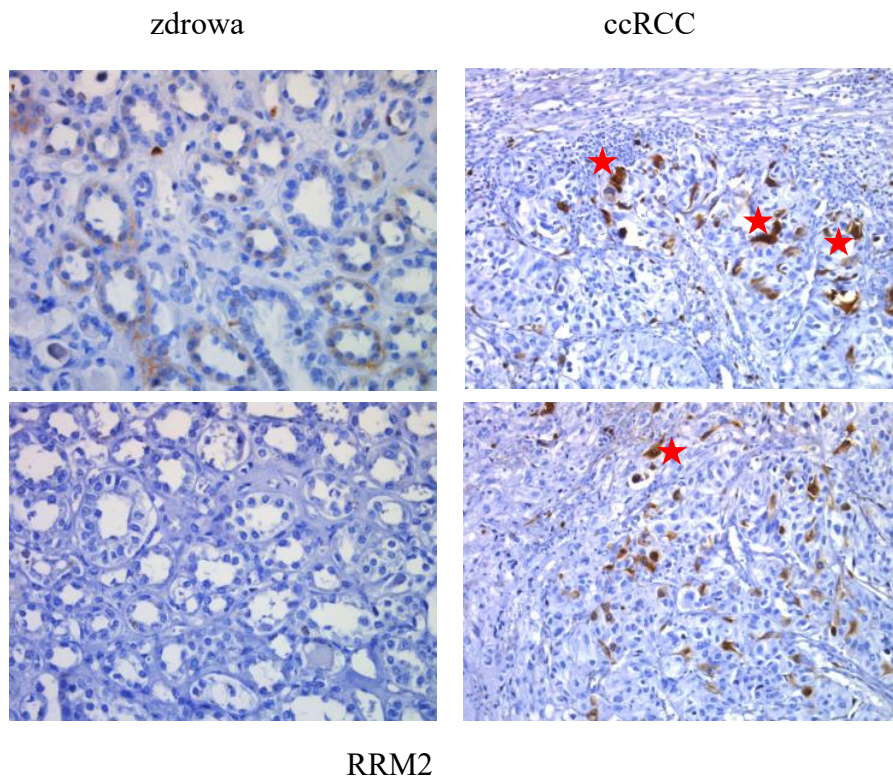
Wykonana analiza wykazała, że ekspresja genu kodującego białko PD-L1 wzrastała w próbkach ccRCC w porównaniu do tkanki zdrowej i wzrost ten była niezależny od mutacji w genie *PBRM1*. Natomiast ekspresja CTLA-4 była istotnie wyższa w próbkach ccRCC bez mutacji w genie *PBRM1*. W ccRCC z mutacją w *PBRM1* ekspresja CTLA-4 była na porównywalnym poziomie jak w tkance zdrowej.



Rys. 17 Analiza ekspresji CTLA-4 w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value<0,05, ** p value<0,001, *** p value <0,0001.

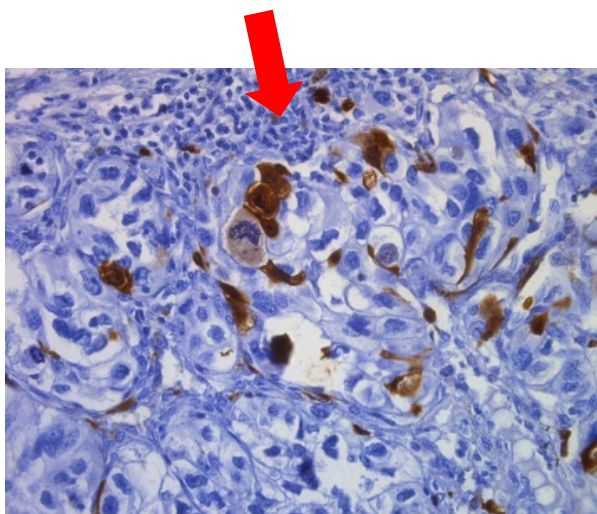
IV.5 Badanie zależności ekspresji RRM2 od nacieku limfocytarnego

Niekontrolowana proliferacja komórek nowotworowych jest jedną z cech charakteryzujących nowotwór, co zostało zdefiniowane przez Hannahana i Weinberga w 2000 roku [86]. Aby komórki nowotworowe mogły się dzielić niezbędne jest dostarczenie materiałów budulcowych. Jednym z nich są deoksynukleotydy niezbędne do procesu replikacji oraz naprawy DNA. Głównym enzymem, który jest zaangażowany w ten proces jest reduktaza rybonukleotydów, a jej najważniejszą podjednostką jest białko RRM2. W trakcie badań prowadzonych w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie zaobserwowano wzrost ekspresji RRM2 w komórkach ccRCC. W związku z tym, sprawdziłem czy ekspresja białka RRM2 może korelować z naciekiem limfocytów T.



Rys. 18 Ekspresja RRM2 w komórkach zdrowej nerki i ccRCC, gwiazdką oznaczono przykładowe skupiska komórek guza, które barwią się pozytywnie przeciwciałami anti-RRM2. Analiza IHC. (Powiększenie 200x, 400x) (Dane opublikowane w pracy Szarkowska i wsp. 2021 [81]).

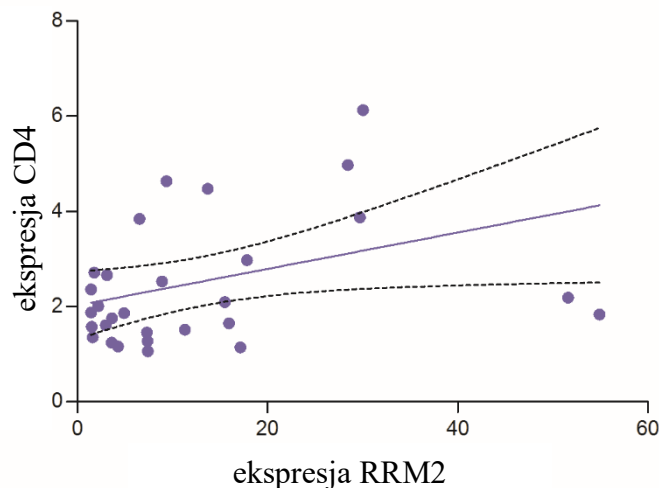
TILs



Rys. 19 W miejscach wysokiej ekspresji RRM2 w ccRCC obserwowano obfity naciek limfocytów T – TILs. (Powiększenie x630) (Dane opublikowane w pracy Szarkowska i wsp. 2021 [81]).

Przeprowadzona analiza wykazała, że w miejscach w nowotworze, gdzie obserwowana była obecność RRM2, otaczające mikrośrodowisko bogate było w naciek limfocytów T.

Następnie przeprowadziłem korelację ekspresji RRM2 z ekspresją markerów limfocytów T CD4 oraz CD8A. Wykazałem pozytywną korelację tylko dla markera CD4.

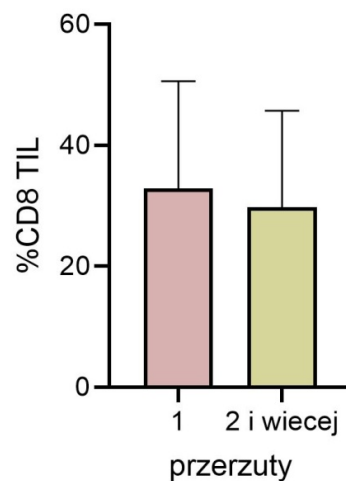


Rys. 20 Korelacja pomiędzy ekspresją RRM2 i CD4 w próbkach klinicznych ccRCC. (Dane opublikowane w pracy Szarkowska i wsp. 2021 [81]).

Wynik ten może świadczyć o tym, że w obszarach w guzie o wysokiej ekspresji RRM2 występuje naciek limfocytów T CD4. Dane te zostały opublikowane w naszej pracy Szarkowska i wsp. 2021 [81].

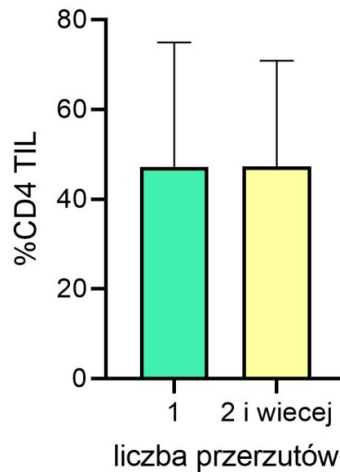
IV.6 Analiza zależności nacieku limfocytów T na ilość i lokalizację przerzutów u pacjentów z rozpoznaniem ccRCC.

Układ odpornościowy ma zdolności do zwalczania komórek nowotworowych, jednak w pewnym momencie rozwoju guza funkcja cytotoksyczna limfocytów T zostaje zahamowana. W związku z tym sprawdziłem, czy ilość naciekających mikrośrodowisko guza limfocytów T, zarówno CD4 jak i CD8, może determinować ilość i lokalizacje przerzutów u pacjentów z zaawansowanym ccRCC.



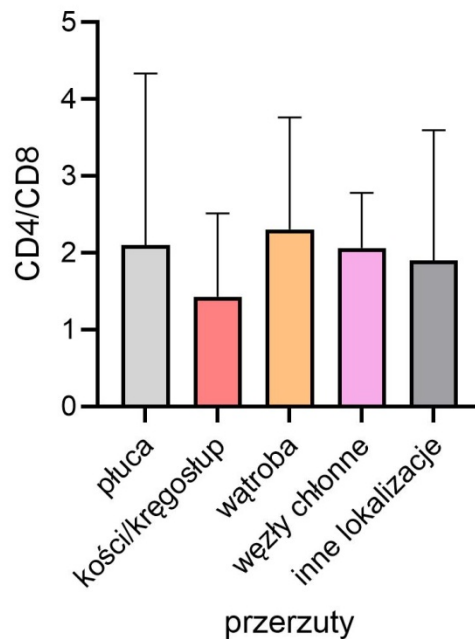
Rys. 21 Analiza ilości przerzutów odległych w zależności od ilości naciekających limfocytów T CD8 w mikrośrodowisku guza.

Nie zaobserwowano różnic w ilości przerzutów w zależności od nacieku limfocytów T cytotoksycznych CD8.



Rys. 22 Analiza ilości przerzutów odległych w zależności od ilości naciekających limfocytów T CD4 w mikrośrodkowisku guza.

Podobnie jak w przypadku limfocytów T CD8, nie zaobserwowano różnic w ilości przerzutów w zależności od nacieku limfocytów T cytotoksycznych CD8.

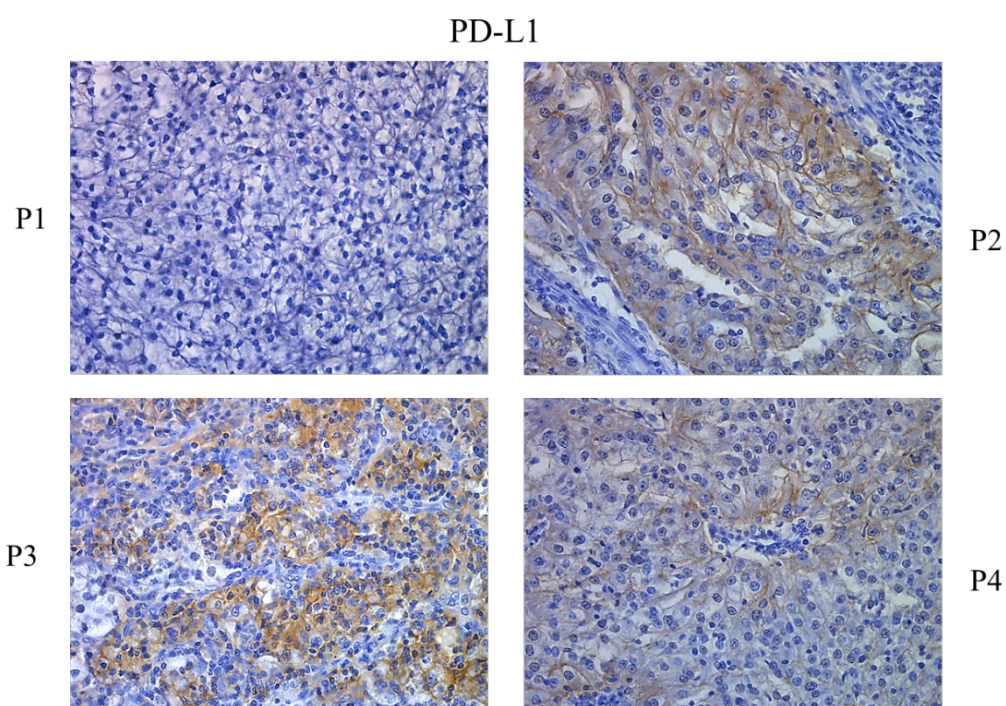


Rys. 23 Analiza lokalizacji występowania przerzutów w zależności od stosunku ilości limfocytów T CD4 do CD8 naciekających mikrośrodkowisko guza u pacjentów z zaawansowanym ccRCC.

Stosunek ilości limfocytów T CD4/CD8 w mikrośrodkowisku guza nie determinował miejsca pojawienia się przerzutów odległych u pacjentów z zaawansowanym ccRCC.

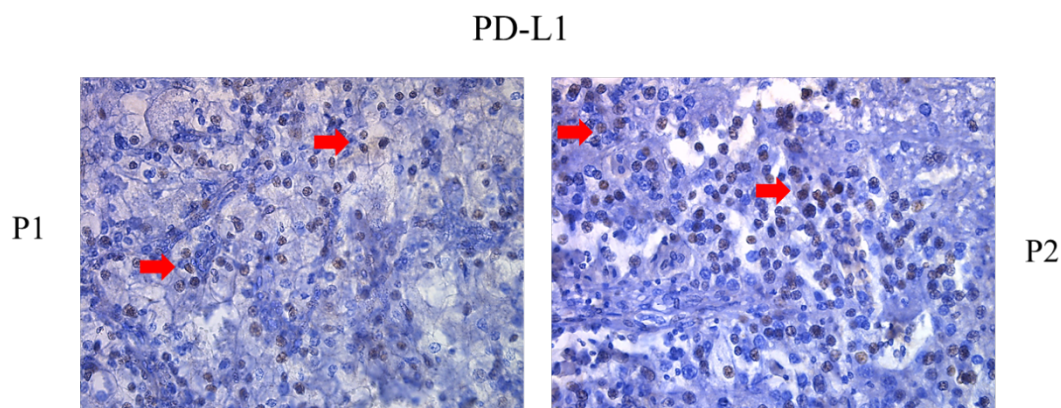
IV.7 Badanie ilości białka PD-L1 w tkankach pobranych od pacjentów z rozpoznaniem rakiem nerkowokomórkowym ccRCC.

W związku z tym, że ekspresja genu kodującego PD-L1- CD274 w ccRCC znacząco wzrasta w porównaniu z tkanką zdrowej nerki, sprawdziłem ilość i lokalizację białka PD-L1 w próbkach klinicznych ccRCC (Rysunek 24).



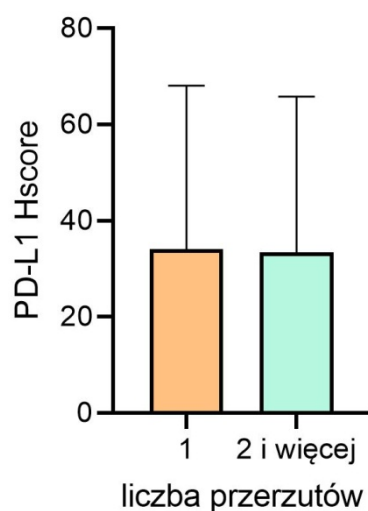
Rys. 24 Analiza ilości PD-L1 w próbkach od pacjentów z ccRCC. Barwienie wykonano metodą IHC z użyciem specyficznego przeciwciała anti-PD-L1. P- pacjent. (Powiększenie 400x).

Przeprowadzona analiza wykazała, że w większości przypadków nie zaobserwowano nadekspresji PD-L1 w komórkach nowotworowych. Co ciekawe, głównie w grupie pacjentów z pierwotnie rozsianą chorobą, zaobserwowano jądrową lokalizację PD-L1 w komórkach ccRCC (Rysunek 25).



Rys. 25 Jądrowa lokalizacja PD-L1 w próbkach od pacjentów z pierwotnie rozsianym ccRCC. Strzałki wskazują przykładowe barwienie jądrowe PD-L1. (Powiększenie 400x).

Wynik ten wskazuje, że PD-L1 może pełnić inną funkcję niż immunosupresyjną, w zależności od stadium zaawansowania nowotworu. Natomiast ilość PD-L1 nie korelowała z ilością przerzutów występujących u tych pacjentów (Rysunek 26).



Rys. 26 Analiza ilości PD-L1 w grupie pacjentów z pierwotnie rozsianym ccRCC wg ilości występowania przerzutów.

IV.8 Analiza czynników ryzyka potencjalnie wpływających na czas przeżycia pacjentów.

Analiza czynników ryzyka, które potencjalnie wpływają na czas przeżycia pacjentów wg modelu proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 8 i 9).

Tabela 9 Model proporcjonalnego hazardu Coxa czynników ryzyka potencjalnie wpływających na przeżycie pacjentów dla wszystkich grup łącznie.

Czynniki potencjalnie wpływające na przeżycie pacjentów (wszystkie grupy łącznie)	Modele jednowymiarowe				Model wielowymiarowy			
	Hazard ratio (HR)	95% CI		p-value	Hazard ratio (HR)	95% CI		p-value
Wiek w czasie operacji	1,02	1,00	1,05	0,077	1,03	1,00	1,06	0,057
Płytki krwi (wzrost o 50 tys)	1,21	1,10	1,34	<.001	1,18	1,06	1,32	0,002
Stosunek liczby neutrofilii do limfocytów	1,09	1,02	1,15	0,007	1,10	1,02	1,19	0,017
Złośliwość w skali Furhman								
1	1,00				1,00			
2	2,46	0,58	10,45	0,223	3,31	0,76	14,38	0,110
3	7,54	1,80	31,54	0,006	6,57	1,55	27,82	0,010
4	12,14	2,78	52,96	0,001	9,65	2,12	43,98	0,003
PD-L1 jądrowa (hscore)	1,01	1,01	1,02	<.001	1,01	1,00	1,02	0,021
PD-L1 błonowa (hscore)	1,01	1,00	1,02	0,048
CD4 (%)	0,99	0,98	1,00	0,178	0,99	0,98	1,00	0,009
CD8 (%)	1,03	1,01	1,04	<.001	1,03	1,01	1,04	0,001

Niezależnie od zastosowanego modelu, ilość limfocytów T CD4, CD8, złośliwość w skali Furhman, ilość płytek krwi we krwi obwodowej, stosunek liczby neutrofilii do limfocytów T, wiek w czasie operacji oraz jądrowa lokalizacja PD-L1 (model wielowymiarowy) mają znaczenie rokownicze i wpływ na czas przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ccRCC.

Tabela 10 Model proporcjonalnego hazardu Coxa czynników ryzyka potencjalnie wpływających na przeżycie pacjentów z podziałem na poszczególne grupy w zależności od stanu zaawansowania choroby.

Czynniki potencjalnie wpływające na przeżycie pacjentów (dla poszczególnych grup)	Modele jednowymiarowe				Modele jednowymiarowe			
	Hazard ratio (HR)	95% CI		p-value	Hazard ratio (HR)	95% CI		p-value
Grupa 1								
Płytki krwi (wzrost o 50 tys)	1,33	0,92	1,92	0,135	1,33	0,92	1,92	0,135
PD-L1 jądrowa (hscore)	1,02	1,00	1,04	0,038	1,02	1,00	1,04	0,038
Grupa 2								
Stosunek liczby neutrofilii do limfocytów	1,08	0,99	1,18	0,094	1,08	0,99	1,18	0,094
Złośliwość w skali Furhman								
1	1,00				1,00			
2	1,19	0,25	5,77	0,825	1,19	0,25	5,77	0,825
3	4,07	0,90	18,44	0,068	4,07	0,90	18,44	0,068
4	2,38	0,40	14,29	0,343	2,38	0,40	14,29	0,343
Grupa 3								
CD8 (%)	1,02	1,00	1,04	0,027	1,02	1,00	1,04	0,027

W przypadku zastosowania modelu Coxa w poszczególnych grupach, tylko jądrowa lokalizacja PD-L1 u pacjentów z brakiem wznowy do 5-u lat po resekcji guza pierwotnego może mieć wpływ na czas przeżycia pacjentów, co zostało potwierdzone w analizie jedno i wielowymiarowej. Natomiast dla grupy 3, czyli u pacjentów z pierwotnie rozsianym ccRCC, znaczenie rokownicze ma ilość limfocytów T CD8 naciekających guza pierwotnego.

IV.9 Analiza potencjalnych czynników wpływających na stopień zaawansowania choroby

Analiza czynników, które potencjalnie mogłyby wpływać na stopień zaawansowania choroby, pomiędzy poszczególnymi grupami została przeprowadzona za pomocą wielomiarowej regresji logistycznej (multinomial logistic regression) (Tabela 10).

Tabela 11 Analiza potencjalnych czynników mogących mieć wpływ na zaawansowanie choroby.

Potencjalne czynniki wpływające na stopień zaawansowania choroby w poszczególnych grupach	Modele jednowymiarowe				Model wielowymiarowy			
	Relative risk ratio (RRR)	95% CI		p-value	Relative risk ratio (RRR)	95% CI		p-value
Grupa 2 vs grupa 1								
Wiek w czasie operacji	1,04	1,00	1,08	0,068	1,05	1,00	1,10	0,029
CD4 (%)	0,99	0,98	1,01	0,463	0,99	0,97	1,01	0,280
CD8 (%)	1,03	1,00	1,05	0,059	1,04	1,01	1,07	0,018
Płytki krwi (wzrost o 50 tys)	1,12	0,89	1,40	0,339	1,19	0,92	1,54	0,192
Stosunek liczby neutrofilii do limfocytów	1,22	0,98	1,52	0,069				
PD-L1 jądrowa (hscore)	0,92	0,87	0,98	0,007	0,92	0,87	0,98	0,006
Grupa 3 vs grupa 1								
Wiek w czasie operacji	1,04	1,00	1,09	0,037	1,06	1,01	1,12	0,027
CD4 (%)	0,98	0,97	1,00	0,044	0,96	0,94	0,99	0,002
CD8 (%)	1,06	1,03	1,09	<0,001	1,07	1,04	1,11	<0,001
Płytki krwi (wzrost o 50 tys)	1,32	1,07	1,63	0,010	1,50	1,14	1,96	0,003
Stosunek liczby neutrofilii do limfocytów	1,24	1,00	1,53	0,051				
PD-L1 jądrowa (hscore)	1,03	1,01	1,04	<0,001	1,03	1,01	1,05	0,002

Czynnikami, które potencjalnie mają znaczenie na zaawansowanie choroby to ilość limfocytów T, głównie CD8, jądrowa lokalizacja PD-L1 oraz wzrost ilości płytek krwi w krwi obwodowej pacjenta.

V. Dyskusja

W leczeniu raka nerkowokomórkowego obowiązuje paradygmat, że szanse na trwałe wyleczenie mają chorzy, u których leczeniem operacyjnym udało się uzyskać pełną resekcję zmian nowotworowych. Dane dotyczące proporcji chorych doświadczających uogólnienia procesu nowotworowego mówią, że około 20% pacjentów z nowotworem nerkowokomórkowym ma rozpoznawaną chorobę już na etapie przerzutowym, a 30% pacjentów doświadcza wtórnego uogólnienia procesu nowotworowego [89], co dramatycznie pogarsza rokowanie pacjenta z nowotworem nerkowokomórkowym.

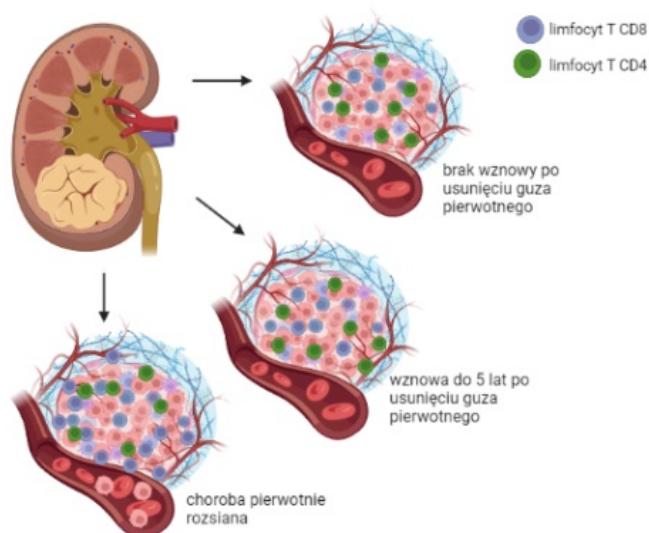
Jasnokomórkowy rak nerki jest nowotworem zależnym od stanu immunologicznego pacjenta, co przekłada się na sposoby terapii, w których znaczącą rolę odgrywa modyfikacja odpowiedzi immunologicznej za pomocą inhibitorów immunologicznego punktu kontroli [34, 36]. Interesujące jest także zastosowanie takich leków w terapii uzupełniającej po leczeniu radykalnym u pacjentów z gorszym rokowaniem. Aby immunoterapia blokująca oś PD-1/PD-L1 była skuteczna, w mikrośrodowisku guza muszą być obecne limfocyty T naciekające nowotwór (TIL). Aktywne, naciekające limfocyty T, poprzez kontakt z komórkami nowotworowymi, stają się niereaktywne i „wyczerpane”, a zastosowanie immunoterapii odblokowuje limfocyty, które eliminują komórki nowotworowe [90]. Wydawałoby się, że aby immunoterapia skierowana na oś PD-1/PD-L1 była skuteczna musi być obecny ligand PD-L1 na komórkach nowotworowych, jednak nie potwierdzono, by negatywne barwienie tkanki guza na obecność PD-L1 oznaczało brak efektywności nowoczesnej immunoterapii w uogólnionym raku nerkowokomórkowym [91, 92].

Obecnie prowadzone badania naukowe skupiają się głównie na aktywności populacji limfocytów T CD8 [93]. Limfocyty te mają głównie funkcję cytotoksyczną. Jednak w pracy zespołu dr Matzinger wykazano, że limfocyty T CD4 są znacznie bardziej efektywne w eliminacji komórek nowotworowych niż limfocyty T CD8 [94]. W modelach rokowniczych zaleconych do powszechnego stosowania u pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym po leczeniu radykalnym w żaden sposób nie uwzględnia się informacji o zmianach w układzie immunologicznym pacjenta oraz o nacieku TIL. Takie informacje, choć w bardzo ograniczonym zakresie, są stosowane w klasyfikacji rokowniczej pacjentów z chorobą uogólnioną [21, 24].

Z uwagi na powyższe, postanowiłem zbadać ekspresję ligandu PD-L1 oraz naciek limfocytarny w zależności od stopnia zaawansowania raka jasnokomórkowego nerki, a uzyskane wyniki poddać korelacji z danymi kliniczno-patologicznymi. Na wstępie przeanalizowałem dane transkryptomyczne pochodzące od pacjentów z rozpoznanym ccRCC

dostępne w bazie Gene Omnibus Database i TCGA. Wykazano, że w nowotworze występuje nadekspresja genów CD8A i CD4, co świadczy o nacieku mikrośrodowiska guza przez limfocyty T, zarówno CD4 jak i CD8. Ponadto w guzie, w porównaniu z tkanką zdrową, zaobserwowano nadekspresje PD-L1 i CTLA-4. Wysoka ekspresja CTLA-4 wiązała się z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia. Inaczej przedstawiała się istotność ekspresji PD-L1 (CD274) - wysoka była dobrym czynnikiem rokowniczym. Ekspresja CD4, czyli nacieki limfocytów T CD4 w mikrośrodowisku guza, nie miał wpływu na czas przeżycia pacjentów z ccRCC, natomiast wydaje się, że nadekspresja CD8A, czyli duża infiltracja limfocytów T CD8, wiązała się z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia. W celu weryfikacji uzyskanych wyników transkryptomicznych przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne przeciwko ligandowi PD-L1 oraz białkom CD4 i CD8, charakteryzujących limfocyty T CD4 i CD8. W kolejnym etapie przeprowadzono ocenę mikroskopową wybarwionych preparatów. Badania te wykazały zdecydowanie większy udział limfocytów T CD4 niż CD8 w nacieku tkanki nowotworowej we wszystkich badanych grupach. Co ciekawe, ilość limfocytów T CD4 w mikrośrodowisku guza była podobna we wszystkich badanych grupach, niezależnie od tego, czy choroba była ograniczona do narządu czy uogólniona. Natomiast ilość limfocytów T CD8 była najmniejsza w mikrośrodowisku guza w grupie pacjentów, u których nie nastąpiła wznowa (do 5-u lat) po resekcji guza. Ilość naciekających limfocytów T CD8 wzrastała u pacjentów, u których obserwowano wznowę, a u pacjentów z chorobą uogólnioną była prawie równa ilości limfocytów T CD4.

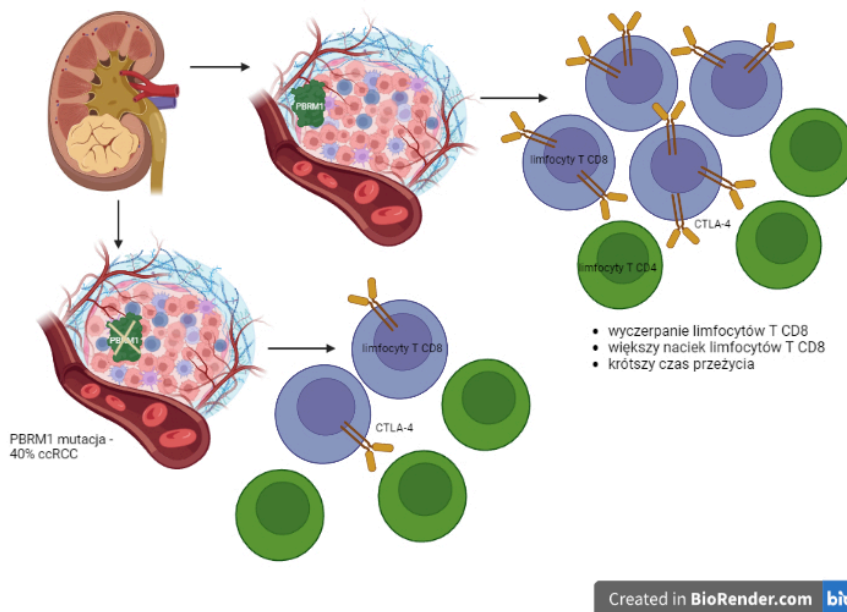
Wydaje się zatem, że duża ilość limfocytów T CD8 w guzie jest negatywnym czynnikiem rokowniczym. Im mniejszy stosunek limfocytów T CD4/CD8 w mikrośrodowisku guza, tym gorsze rokowanie dla pacjenta. Potwierdza to analiza transkryptomiczna, gdzie zwiększona ekspresja CD8A korelowała z gorszym rokowaniem, jak również model wielowymiarowy proporcjonalnego hazardu Coxa, gdzie ilość limfocytów T CD8 jest istotna jako czynnik wpływający na przeżycie pacjentów. Ponadto duża ilość limfocytów T CD8 jest również jednym z czynników wpływających na stopień zaawansowania choroby.



Rys. 27 Schemat pokazujący nacieki limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodkowisku jasnokomórkowego raka nerki. Rysunek zrobiono przy pomocy programu Biorender.

Ekspresja CD8A, podjednostki alfa CD8, w całym guzie, łącznie z mikrośrodkowiskiem, korelowała z występowaniem mutacji w genie *PBRM1*. Mutacja w tym genie występuje w ok 40% ccRCC. U pacjentów z brakiem mutacji obserwowano statystycznie znaczącą wysoką ekspresję CD8A, co świadczy o większym nacieku limfocytów T CD8 w mikrośrodkowisku guza. W przypadku ekspresji CD4 nie obserwowano takiej zależności. Dodatkowo, podobny profil ekspresji jak w przypadku CD8A zaobserwowano dla CTLA-4. Wysoka ekspresja CTLA-4 występowała w guzach z brakiem mutacji w genie *PBRM1*. CTLA-4 jest cząsteczką, która występuje w dużej ilości na powierzchni limfocytów T CD8, które są niereaktywne i w stanie wyczerpania. Jest to jeden z markerów wyczerpania limfocytów T, głównie CD8. Wyniki te mogą tłumaczyć, dlaczego mutacja w *PBRM1* (skutkująca utratą bądź ekspresją skróconej formy białka BAF180, kodowanego przez *PBRM1*) jest zasocjowana z mniejszą ilością komórek układu odpornościowego infiltrujących mikrośrodkowisko guza. Inni autorzy zauważyli, że występowanie mutacji w genie *PBRM1* wiąże się z gorszą odpowiedzią pacjentów na immunoterapię z użyciem inhibitorów immunologicznego punktu kontroli [80]. Jednak w wielu pracach wykazano, że mutacje w *PBRM1* są związane z lepszymi wynikami klinicznymi i odpowiedzią na blokadę immunologicznego punktu kontroli u pacjentów z przerzutowym ccRCC [28, 99]. W wielu badaniach obserwowano korelację między mutacjami powodującymi utratę funkcji *PBRM1* a odpowiedzią na immunoterapię w drugiej linii (ccRCC oporny na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych) [100]. Inne prace, w których analizowano leczenie immunoterapią w pierwszej linii, nie potwierdziły tego związku. Niewątpliwie mutacje

w genie *PBRM1* wiążą się z odpowiedzią na immunoterapię w ccRCC [99]. Dlatego lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw związku między występowaniem mutacji w genie *PBRM1* a odpowiedzią na immunoterapię inhibitorami immunologicznego punktu kontroli może pozwolić na rozszyfrowanie tych pozornie sprzecznych wyników [81].



Rys. 28 Schemat przedstawia naciek limfocytów T w mikrośrodowisku jasnokomórkowego raka nerki w zależności od mutacji w genie *PBRM1*. Rysunek zrobiono przy pomocy programu Biorender.

Innym ważnym czynnikiem prognostycznym w jasnokomórkowym raku nerki jest ekspresja mniejszej podjednostki reduktazy rybonukleotydów RRM2 [82], a jej zahamowanie indukuje apoptozę i eliminację komórek nowotworowych. Dodatkowo, ekspresja RRM2 w komórkach ccRCC jest zależna od kompleksu SWI/SNF z podjednostką BAF180 (*PBRM1*) [83]. W przedstawionej pracy nadekspresja RRM2 występowała w pojedynczych komórkach ccRCC lub skupiskach komórek, a nie w całym guzie. Zaobserwowano, że wokół komórek raka nerki z dużą ilością RRM2 występował obfity naciek limfocytów T. Ekspresja RRM2 korelowała z ekspresją CD4, co może świadczyć, że wokół komórek ccRCC z nadekspresją RRM2 występują limfocyty T CD4, a nie CD8. Limfocyty T CD4 są głównymi limfocytami infiltrującymi mikrośrodowisko ccRCC i niewątpliwie, poprzez wydzielanie wielu cytokin i innych cząsteczek, wywierają wpływ na komórki nowotworowe, które włączają mechanizmy obronne przed atakiem układu odpornościowego i wraz z rozwojem guza zwiększają swój

potencjał do tworzenia przerzutów odległych. W przeprowadzonych w tej pracy badaniach wykazano, że ilość naciekających limfocytów T (CD4 i CD8) w mikrośrodowisku ccRCC u pacjentów z chorobą pierwotnie rozsianą nie miała wpływu na ilość przerzutów. Podobnie stosunek limfocytów T CD4/CD8 nie determinował miejsca występowania przerzutów odległych.

Początkowo, kiedy wdrażano immunoterapię anty PD-1/PD-L1 wydawało się, że ilość PD-L1 na komórkach nowotworowych będzie dobrym czynnikiem predykcyjnym dla tego leczenia. Z czasem okazało się jednak, że ilość PD-L1 na komórkach nowotworowych nie jest dobrym markerem [91, 92]. Przeprowadzone badanie ilości PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych u pacjentów z ccRCC nie wykazała wyraźnej nadekspresji tego markera w komórkach raka. Dodatkowo pragnę zaznaczyć, że tylko w pojedynczych przypadkach obserwowałem ekspresję PD-L1 na komórkach ccRCC i nie korelowało to z żadną z badanych grup pacjentów. Ilość PD-L1 była różna i wydaje się, że wynikała z uwarunkowań osobniczych u poszczególnych pacjentów. Co ciekawe, w komórkach ccRCC u pacjentów z chorobą pierwotnie rozsianą, PD-L1 miał wyraźną lokalizację jądrową. To, jaką funkcję może pełnić PD-L1 w jądrze komórkowym w komórkach ccRCC wciąż nie jest zbadane. Środowisko naukowe jest podzielone uważając, że jądrowa lokalizacja PD-L1 może być artefaktem wynikającym z barwienia, niespecyficzności przeciwciał itp.. Jednak coraz więcej prac potwierdza, że PD-L1 pełni pewną funkcję w jądrze komórkowym, a nawet może brać udział w „odwróconej sygnalizacji”, gdzie PD-L1 działa jako receptor - co opisano w chłoniaku Hodgkina [84]. Ponadto wykazano, że acetylacja PD-L1 powoduje jego translokację do jądra komórkowego [85]. Natomiast w czerniaku oka odkryto, że jądrowy PD-L1 indukuje angiogenezę i zwiększa potencjał inwazyjny komórek nowotworowych [86].

Terapia neoadjuwantowa jest obecnie przedmiotem badań i dostępna jest w programach klinicznych. Jeśli zaś chodzi o terapię adjuwantową, ta wciąż stanowi ona przedmiot do dyskusji, zwłaszcza wobec sprzecznych wyników badań klinicznych z zastosowaniem modyfikacji odpowiedzi immunologicznej. Aktualna wiedza oparta jest na czterech badaniach klinicznych: Keynote-564, IMmotion010, CheckMate 914 oraz PROSPER.

Badanie Keynote-564 jest pierwszym i jedynym badaniem przedstawiającym korzyść z leczenia uzupełniającego u pacjentów z pośrednim stopniem ryzyka wznowy (pT2, stopień 4 lub cechy mięsakowate, N0, M0 oraz pT3, każdy stopień, N0, M0) i wysokim stopniem ryzyka wznowy (pT4, każdy stopień złośliwości guza, N0, M0 lub każde pT, każdy stopień złośliwości guza, N+, M0 lub M1 z brakiem objawów choroby po resekcji ognisk skąpoprzerzutowych < 1 rok od nefrektomii). Do leczenia stosowano pembrolizumab, czyli humanizowane przeciwciało

monoklonalne, którego celem jest receptor białka programowanej śmierci komórkowej 1 (PD-1) w limfocytach. W badaniu wykazano dłuższy czas przeżycia wolny od choroby (DFS) u pacjentów leczonych pembrolizumabem. Całkowite przeżycie (OS) wykazało nieistotną statystycznie korzyść ze stosowania pembrolizumabu (97% w porównaniu do 94% w grupie placebo), jednak okres obserwacji był stosunkowo krótki (2 lata). Korzyści odnieśli chorzy w każdej grupie badanej, w tym pacjenci z chorobą M1 po radykalnej resekcji [95]. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że taka terapia jest w Polsce od niedawna refundowana w ramach programu lekowego.

Nie można jednak pominąć w dyskusji badań negatywnych. W badaniu III fazy, IMmotion010, chronologicznie pierwszym z omawianych tutaj, oceniono leczenie adjuwantowe z wykorzystaniem inhibitora PD-L1 - atezolizumabu. W badaniu zastosowano kryteria włączenia analogiczne jak w badaniu Keynote-564, czyli terapii poddano pacjentów z pośrednim i wysokim ryzykiem wznowy, oraz pacjentów z chorobą M1 po radykalnej resekcji. Główny punkt końcowy, tj. poprawa okresu przeżycia wolnego od choroby (DFS), nie został osiągnięty dla grupy badanej. Mediana DFS wyniosła 57,2 miesiąca dla atezolizumabu oraz 49,5 miesiąca dla placebo. Żadna z podgrup badawczych nie sugerowała korzyści w zakresie DFS w przypadku atezolizumabu, nawet podgrupa z chorobą M1, z cechami mięsakowatymi (wyraźne korzyści wykazano w badaniu Keynote-564) oraz u pacjentów, u których ekspresja PD-L1 wynosiła powyżej 1%. Nie wykazano również różnic w całkowitym przeżyciu [96].

W badaniu CheckMate 914 oceniono skojarzenie humanizowanych przeciwciał monoklonalnych, które blokują PD-1 i CTLA-4, to jest niwolumabu i ipilimumabu, w leczeniu uzupełniającym w raku nerkowokomórkowym. Pacjenci włączeni do badania należeli do grupy pośredniego i wysokiego ryzyka, jednak bez chorych w stadium oligometastatycznym. Okres obserwacji wynosił 37 miesięcy. Główny punkt końcowy, jakim było przeżycie wolne od choroby (DFS), nie został osiągnięty. Co ciekawe, u pacjentów z komponentą sarkomatoidalną i chorych z ekspresją PD-L1 >1% ryzyko względne (HR) było niższe w terapii skojarzonej [97], co dało sygnał, iż dla części pacjentów immunoterapia może zmieniać przebieg choroby.

Ostatnie badanie, PROSPER, to leczenie okołoperacyjne składające się z jednego cyklu niwolumabu, po którym wykonywana jest radykalna lub częściowa nefrektomia, a następnie prowadzone jest leczenie niwolumabem, już o założeniu adjuwantowym. Grupą kontrolną byli pacjenci bez leczenia systemowego. Do badania włączano pacjentów z podejrzeniem raka nerkowokomórkowego w stadium klinicznym \geq cT2 lub każde cT, cN+ lub pacjentów z wybraną chorobą oligometastatyczną, jeśli w ciągu 12 tygodni po operacji nie występowały u nich cechy wznowy miejscowej lub uogólnienia choroby. Przed wdrożeniem

do badania konieczne było wykonanie biopsji nerki. Główny punkt końcowy, jakim było przeżycie wolne od nawrotu nowotworu (RFS) był podobny w obu grupach badawczych. Całkowite przeżycie (OS) również nie wykazywało różnicy statystycznej [98].

We wszystkich wymienionych badaniach kryteriami do włączenia jest stopień zaawansowania choroby w klasyfikacji TNM. Pomimo wysokiej immunogenności ccRCC, status immunologiczny nie jest brany pod uwagę w kryterium włączenia do badania. W ograniczonym stopniu uwzględnia się zmiany immunologiczne, w postaci ekspresji PD-L1 w guzie >1% - dotyczyło to badań IMmotion010 oraz CheckMate 914.

Wedle zaleceń Europejskiego Towarzystwa Urologicznego, jedyną zalecaną formą leczeniem adjuwantowego u pacjentów pośredniego i wysokiego ryzyka wznowy oraz u pacjentów z chorobą oligometastatyczną po radykalnej resekcji jest terapia pembrolizumabem. Stopień zaleceń jest słaby, a panel ekspercki zaznacza, iż duży odsetek pacjentów otrzymuje niepotrzebne i potencjalnie szkodliwe leczenie. Należy bowiem pamiętać o możliwości wystąpienia groźnych, czasem fatalnych następstwach immunoterapii – co z kolei jest doskonale udokumentowane w omawianych powyżej badaniach klinicznych. Ponadto warto zaznaczyć, iż w chwili obecnej nie ma biomarkerów pozwalających przewidzieć wynik leczenia. Na podstawie przeprowadzonych analiz, naciek limfocytów CD4 i CD8 oraz ich wzajemny stosunek może być potencjalnie jednym z czynników prognostycznych, ułatwiających kwalifikację do leczenia pacjentów szczególnie narażonych na nawrót.

Na podstawie wszystkich uzyskanych w tej pracy wyników oraz danych klinicznych przeprowadzono analizę czynników ryzyka potencjalnie wpływających na czas przeżycia pacjentów za pomocą modelu proporcjonalnego hazardu Coxa. W analizie jedno, jak i wielowymiarowej wytypowano, iż ilość limfocytów T CD4 i CD8 naciekających guz, stopień złośliwości, ilość płytek krwi we krwi obwodowej, stosunek liczby neutrofilów do limfocytów T, wiek w czasie operacji oraz jądrowa lokalizacja PD-L1 (model wielowymiarowy) mają znaczenie rokownicze i wpływ na czas przeżycia pacjentów z rozpoznaniem ccRCC. W analizie modelu proporcjonalnego hazardu Coxa, z podziałem na poszczególne grupy pacjentów, tylko jądrowa lokalizacja PD-L1 u pacjentów z brakiem wznowy do 5-u lat po resekcji guza pierwotnego może mieć wpływ na czas przeżycia pacjentów. Należy zaznaczyć, że u pacjentów z pierwotnie rozsiałym ccRCC znaczenie rokownicze ma ilość limfocytów T CD8 naciekających guz pierwotny. Analiza potencjalnych czynników wpływających na stopień zaawansowania choroby przeprowadzonej za pomocą wielomiarowej regresji logistycznej wykazała, że czynnikami, które mogą mieć znaczenie dla stopnia zaawansowania choroby są: ilość limfocytów T (głównie CD8), wyższa ilość płytek krwi w krwi obwodowej oraz jądrowa

lokalizacja PD-L1. W wielu pracach wykazano, że płytki krwi, często pomijany składnik układu odpornościowego, sprzyjają wzrostowi nowotworu. W raku jasnokomórkowym nerki wykazano, że krążące komórki nowotworowe są powiązane z płytkami krwi i komórkami zapalnymi układu odpornościowego [85]. Sugeruje się, że płytki krwi chronią przetrzutuujące komórki przed uszkodzeniem i zniszczeniem przez komórki układu odpornościowego.

Wydaje się, że badanie komórek układu odpornościowego, a głównie limfocytów T naciekających nowotwór, wciąż jest niedocenionym czynnikiem, który może okazać się pomocny w planowaniu leczenia i obserwacji pacjenta. Jednak włączenie przedstawionych obserwacji do praktyki klinicznej wymaga dalszych intensywnych badań.

VI. Wnioski:

1. Jądrowa lokalizacja PD-L1 w komórkach nowotworowych przeważała u pacjentów z pierwotnie rozsianym ccRCC.
2. Błonowa ekspresja PD-L1 na komórkach ccRCC występowała w pojedynczych przypadkach i nie stwierdzono korelacji jej występowania z żadną z grup pacjentów.
3. Limfocyty T CD4 występują w większej ilości niż limfocyty T CD8 w mikrośrodowisku jasnokomórkowego raka nerki.
4. Wraz ze wzrostem zaawansowania choroby zwiększa się naciek limfocytów T CD8 i maleje stosunek limfocytów T CD4 do CD8.
5. Stosunek CD4/CD8 może być w przyszłości dobrym markerem predykcyjnym u pacjentów z ccRCC jednak wymaga to walidacji na większej grupie pacjentów.
6. Mutacja w genie PBRM1 w ccRCC powoduje znaczące zmniejszenie infiltracji limfocytów T CD8, ale nie CD4.
7. Ilość płytek krwi we krwi obwodowej oraz stosunek liczby neutrofilów do limfocytów T mają znaczenie rokownicze i wpływają na czas przeżycia pacjentów z rozpoznanym ccRCC.

Bibliografia

- [1] Capitanio, U., et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*, 2019. 75: 74.
- [2] Moch, H., et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*, 2016. 70: 93.
- [3] Tahbaz, R., et al. Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: lifestyle, medication and nutrition. *Curr Opin Urol*, 2018. 28: 62.
- [4] Moch H, et al. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, ed. WHO. 2016, Lyon.
- [5] Klatte, T., et al. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol*, 2018. 36: 1943.
- [6] Keegan, K.A., et al. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by subtype and stage. *J Urol*, 2012. 188: 391.
- [7] Novara, G., et al. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Eur Urol*, 2010. 58: 588.
- [8] Fuhrman, S.A., et al. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1982. 6: 655.
- [9] Zhang, L., et al. Tumor necrosis as a prognostic variable for the clinical outcome in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 2018. 18: 870.
- [10] Delahunt, B., et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol*, 2013. 37: 1490.
- [11] Moch H. WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome [The WHO/ISUP grading system for renal carcinoma]. *Pathologe*. 2016 Jul;37(4):355-60. German.
- [12] Jayson, M., et al. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*, 1998. 51: 203.
- [13] Vasudev, N.S., et al. Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer. *BMJ Open*, 2020. 10: e035938.
- [14] Israel, G.M., et al. Pitfalls in renal mass evaluation and how to avoid them. *Radiographics*, 2008. 28: 1325.
- [15] Pedrosa, I., et al. MR imaging of renal masses: correlation with findings at surgery and pathologic analysis. *Radiographics*, 2008. 28: 985.

- [16] Maturen, K.E., et al. Renal mass core biopsy: accuracy and impact on clinical management. *AJR Am J Roentgenol*, 2007. 188: 563
- [17] Bratslavsky, G., et al. Genetic risk assessment for hereditary renal cell carcinoma: Clinical consensus statement. *Cancer*, 2021. 127: 3957.
- [18] Mucci, L.A., et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*, 2016. 315: 68.
- [19] Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bedke J, Capitanio U, Dabestani S, Fernández-Pello S, Giles RH, Hofmann F, Hora M, Klatte T, Kuusk T, Lam TB, Marconi L, Powles T, Tahbaz R, Volpe A, Bex A. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2022 Update. *Eur Urol*. 2022 Oct;82(4):399-410.
- [20] Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Chao DH, Gitlitz BJ, Moldawer N, Lazarovici D, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Mathematical model to predict individual survival for patients with renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1368-74
- [21] Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A, Ficarra V, Han KR, Cindolo L, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Dinney CP, Wood CG, Swanson DA, Abbou CC, Lobel B, Mulders PF, Chopin DK, Figlin RA, Belldegrun AS. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3316-22.
- [22] Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, Weaver AL, Parker AS, Zincke H. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer*. 2003 Apr 1;97(7):1663-71
- [23] Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, Grünwald V, Gillessen S, Horwich A; ESMO Guidelines Committee. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019 May 1;30(5):706-720.
- [24] Heng, D.Y., et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol*, 2013. 14: 141.
- [25] Yoshida, M. A. i wsp. Rearrangement of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet*. 19, 351–354 (1986).
- [26] Szucs, S.,i wsp. Deletion 3p: the only chromosome loss in a primary renal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet*. 26, 369–373 (1987).

- [27] Okuda H, Saitoh K, Hirai S, Iwai K, Takaki Y, Baba M, Minato N, Ohno S, Shuin T. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein mediates ubiquitination of activated atypical protein kinase C. „J Biol Chem”. 276(47):43611-7, 2001
- [28] Braun, David A et al. “Clinical Validation of PBRM1 Alterations as a Marker of Immune Checkpoint Inhibitor Response in Renal Cell Carcinoma.” JAMA oncology vol. 5,11 (2019): 1631-1633.
- [29] Walton, Joseph et al. “PBRM1, SETD2 and BAP1 - the trinity of 3p in clear cell renal cell carcinoma.” *Nature reviews. Urology* vol. 20,2 (2023): 96-115.
- [30] Li, Jun et al. “SETD2: an epigenetic modifier with tumor suppressor functionality.” *Oncotarget* vol. 7,31 (2016): 50719-50734.
- [31] Li, GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18, 85–98 (2008).
- [32] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455-2465.
- [33] Rijnders M, de Wit R, Boormans JL, Lolkema MPJ, van der Veldt AAM. Systematic Review of Immune Checkpoint Inhibition in Urological Cancers. *Eur Urol*. 2017;72(3):411-423.
- [34] Zibelman M, Plimack ER. Integrating Immunotherapy Into the Management of Renal Cell Carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(6):841-847.
- [35] Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006;66(7):3381-3385.
- [36] McDermott DF, Atkins MB. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer J*. 2008;14(5):320-324.
- [37] Smaldone MC, Kutikov A, Egleston BL, et al. Small renal masses progressing to metastases under active surveillance: a systematic review and pooled analysis. *Cancer*. 2012; 118(4): 997–1006
- [38] Uzosike AC, Patel HD, Alam R, et al. Growth kinetics of small renal masses on active surveillance: variability and results from the DISSRM registry. *J Urol*. 2018; 199(3): 641–648
- [39] Deng W, Chen L, Wang Y, et al. Cryoablation versus partial nephrectomy for clinical stage T1 renal masses: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer*. 2019; 10(5): 1226–1236
- [40] Rivero JR, De La Cerda J, Wang H, et al. Partial nephrectomy versus thermal ablation for clinical stage T1 renal masses: systematic review and meta-analysis of more than 3,900 patients. *J Vasc Interv Radiol*. 2018; 29(1): 18–29

- [41] Van Poppel, H., et al. A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2011. 59: 543.
- [42] Shah, P.H., et al. Partial Nephrectomy is Associated with Higher Risk of Relapse Compared with Radical Nephrectomy for Clinical Stage T1 Renal Cell Carcinoma Pathologically Up Staged to T3a. *J Urol*, 2017. 198: 289.
- [43] Liu, H., et al. A meta-analysis for comparison of partial nephrectomy vs. radical nephrectomy in patients with pT3a renal cell carcinoma. *Transl Androl Urol*, 2021. 10: 1170.
- [44] Bekema, H.J., et al. Systematic review of adrenalectomy and lymph node dissection in locally advanced renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2013. 64: 799.
- [45] Capitanio, U., et al. Lymph node dissection in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2011. 60: 1212.
- [46] Gershman B, Thompson R, Boorjian S, et al. Radical nephrectomy with or without lymph node dissection for high risk nonmetastatic renalcell carcinoma: a multi-institutional analysis. *J Urol*. 2018; 199(5): 1143–1148
- [47] Capitanio PU, Suardin, Matloob R, et al. Extent of lymph node dissection at nephrectomy affects cancer-specific survival and metastatic progression in specific sub-categories of patients with renal cell carcinoma (RCC). *BJU Int*. 2014; 114(2): 210–215,
- [48] Lane, B.R., et al. Management of the adrenal gland during partial nephrectomy. *J Urol*, 2009. 181: 2430.
- [49] Bhindi, B., et al. The role of lymph node dissection in the management of renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BJU Int*, 2018. 121: 684.
- [50] Moinzadeh, A., et al. Prognostic significance of tumor thrombus level in patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus extension. Is all T3b the same? *J Urol*, 2004. 171: 598.
- [51] Nesbitt JC, Soltero ER, Dinney CP, et al. Surgical management of renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus. *Ann Thorac Surg*. 1997; 63(6): 1592–1600
- [52] Rodríguez-Fernández, I.A., et al. Adjuvant Radiation Therapy After Radical Nephrectomy in Patients with Localized Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Oncol*, 2019. 2: 448.
- [53] Choueiri T, Tomczak P, Park S, et al. Adjuvant pembrolizumab after nephrectomy in renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2021; 385(8): 683–694

- [54] Bhindi, B., et al. Systematic Review of the Role of Cytoreductive Nephrectomy in the Targeted Therapy Era and Beyond: An Individualized Approach to Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*, 2019. 75: 111.
- [55] Mejean, A., et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2018. 379: 417.
- [56] Bex, A., et al. Comparison of Immediate vs Deferred Cytoreductive Nephrectomy in Patients With Synchronous Metastatic Renal Cell Carcinoma Receiving Sunitinib: The SURTIME Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 2019. 5: 164.
- [57] Ouzaid I, Capitanio U, Staehler M, et al. Young Academic Urologists Kidney Cancer Working Group of the European Association of Urology. Surgical metastasectomy in renal cell carcinoma: a systematic review. *Eur Urol Oncol*. 2019; 2(2): 141–149
- [58] Porta C, Szczylik C, Tannir NM, et al. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma: a practical guide. *Oncologist*. 2011;16(6):756-768.
- [59] Rini BI, Atkins MB. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2009;10(10):992-1000.
- [60] Hutson TE, Lesovoy V, Al-Shukri S, et al. Axitinib versus sorafenib as first-line therapy in patients with metastatic renal-cell carcinoma: a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14(13): 1287–1294
- [61] Choueiri TK, Hessel C, Halabi S, et al. Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update. *Eur J Cancer*. 2018; 94: 115–125
- [62] Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomized, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007;370(9605):2103-2111.
- [63] Escudier B, Bellmunt J, Négrier S, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol*. 2010;28(13):2144-2150.
- [64] Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(22):2271-2281.
- [65] Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449-456.

- [66] Hutson TE, Escudier B, Esteban E, et al. Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(8):760-767.
- [67] Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, et al. Kidney Cancer, Version 3.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021 Mar 1;19(3): 258-291.
- [68] Chen, Yaping et al. “The Role of the Tumor Microenvironment and Treatment Strategies in Colorectal Cancer.” *Frontiers in immunology* vol. 12 792691. 2 Dec. 2021
- [69] Kase AM, George DJ, Ramalingam S. Clear Cell Renal Cell Carcinoma: From Biology to Treatment. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 21;15(3):665.
- [70] Leach, D R et al. “Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 271,5256 (1996): 1734-6.
- [71] Tivol, E A et al. “Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4.” *Immunity* vol. 3,5 (1995): 541-7.
- [72] Coulie, Pierre G et al. “Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy.” *Nature reviews. Cancer* vol. 14,2 (2014): 135-46.
- [73] Motzer, Robert J et al. “Survival outcomes and independent response assessment with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma: 42-month follow-up of a randomized phase 3 clinical trial.” *Journal for immunotherapy of cancer* vol. 8,2 (2020): e000891.
- [74] Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261-8.
- [75] Goldberg MV, Maris CH, Hipkiss EL, Flies AS, Zhen L, Tuder RM, Grosso JF, Harris TJ, Getnet D, Whartenby KA, Brockstedt DG, Dubensky TW Jr, Chen L, Pardoll DM, Drake CG. Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):186-92. doi: 10.1182/blood-2006-12-062422. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17392506; PMCID: PMC1896112.
- [76] Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):883-95. doi: 10.1084/jem.20051776. Epub 2006 Apr 10. PMID: 16606670; PMCID: PMC2118286.

- [77] Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999 Aug;11(2):141-51.
- [78] Motzer, Robert J et al. “Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma.” *The New England journal of medicine* vol. 373,19 (2015): 1803-13.
- [79] Ornstein, M.C., et al. Prospective phase II multi-center study of individualized axitinib (Axi) titration for metastatic renal cell carcinoma (mRCC) after treatment with PD-1 / PD-L1 inhibitors. *J Clin Oncol*, 2018. 36.
- [80] Liu, Xian-De et al. “PBRM1 loss defines a nonimmunogenic tumor phenotype associated with checkpoint inhibitor resistance in renal carcinoma.” *Nature communications* vol. 11,1 2135. 1 May. 2020.
- [81] Zhou, Mi et al. “PBRM1 Inactivation Promotes Upregulation of Human Endogenous Retroviruses in a HIF-Dependent Manner.” *Cancer immunology research* vol. 10,3 (2022): 285-290.
- [82] Zou, Yun et al. “Ribonucleotide reductase subunit M2 as a novel target for clear-cell renal cell carcinoma.” *OncoTargets and therapy* vol. 12 3267-3275. 30 Apr. 2019.
- [83] Szarkowska, Joanna et al. “RRM2 gene expression depends on BAF180 subunit of SWISNF chromatin remodeling complex and correlates with abundance of tumor infiltrating lymphocytes in ccRCC.” *American journal of cancer research* vol. 11,12 5965-5978. 15 Dec. 2021
- [84] Sadaf, Hummaira et al. “New molecular targets in Hodgkin and Reed-Sternberg cells.” *Frontiers in immunology* vol. 14 1155468. 15 May. 2023.
- [85] Gao, Yang et al. “Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy.” *Nature cell biology* vol. 22,9 (2020): 1064-1075.
- [86] Yu, Jie et al. “Nuclear PD-L1 promotes EGR1-mediated angiogenesis and accelerates tumorigenesis.” *Cell discovery* vol. 9,1 33. 28 Mar. 2023.
- [87] Guan, Yibing et al. “Prognostic value of circulating tumor cells and immune-inflammatory cells in patients with renal cell carcinoma.” *Urologic oncology* vol. 40,4 (2022): 167.e21-167.e32.
- [88] Hanahan, D, and R A Weinberg. “The hallmarks of cancer.” *Cell* vol. 100,1 (2000): 57-70.
- [89] Heidenreich, Axel et al. “Surgical resection of urological tumor metastases following medical treatment.” *Deutsches Arzteblatt international* vol. 109,39 (2012): 631-7.

- [90] Matsuki, Masahiro et al. "Tumor-infiltrating CD8⁺ T cells recognize a heterogeneously expressed functional neoantigen in clear cell renal cell carcinoma." *Cancer immunology, immunotherapy: CII* vol. 71,4 (2022): 905-918.
- [91] Motzer, Robert J et al. "Nivolumab plus cabozantinib versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma (CheckMate 9ER): long-term follow-up results from an open-label, randomised, phase 3 trial." *The Lancet. Oncology* vol. 23,7 (2022): 888-898.
- [92] Motzer, Robert et al. "Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma." *The New England journal of medicine* vol. 384,14 (2021): 1289-1300.
- [93] Huang AC, Postow MA, Orlovski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, Xu W, Harmon S, Giles JR, Wenz B, Adamow M, Kuk D, Panageas KS, Carrera C, Wong P, Quagliarello F, Wubbenhorst B, D'Andrea K, Pauken KE, Herati RS, Staupe RP, Schenkel JM, McGettigan S, Kothari S, George SM, Vonderheide RH, Amaravadi RK, Karakousis GC, Schuchter LM, Xu X, Nathanson KL, Wolchok JD, Gangadhar TC, Wherry EJ. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2017 May 4;545(7652):60-65. doi: 10.1038/nature22079. Epub 2017 Apr 10.
- [94] Perez-Diez, Ainhoa et al. "CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells." *Blood* vol. 109,12 (2007): 5346-54.
- [95] Powles, Thomas et al. "Pembrolizumab versus placebo as post-nephrectomy adjuvant therapy for clear cell renal cell carcinoma (KEYNOTE-564): 30-month follow-up analysis of a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial." *The Lancet. Oncology* vol. 23,9 (2022): 1133-1144.
- [96] Pal, Sumanta Kumar et al. "Adjuvant atezolizumab versus placebo for patients with renal cell carcinoma at increased risk of recurrence following resection (IMmotion010): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial." *Lancet (London, England)* vol. 400,10358 (2022): 1103-1116.
- [97] Motzer, R.J., et al. Adjuvant nivolumab plus ipilimumab (NIVO+IPI) vs placebo (PBO) for localized renal cell carcinoma (RCC) at high risk of relapse after nephrectomy: Results from the randomized, phase III CheckMate 914 trial. *Ann Oncol*, 2022. 33 Suppl 7: S808.
- [98] Allaf, M., et al. Phase III randomized study comparing perioperative nivolumab (nivo) versus observation in patients (Pts) with renal cell carcinoma (RCC) undergoing nephrectomy (PROSPER, ECOG-ACRIN EA8143), a National Clinical Trials Network trial. *Ann Oncol*, 2022. 33 Suppl 7: S808.

[99] Braun, David A et al. “Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma.” *Nature medicine* vol. 26,6 (2020): 909-918.

[100] Hsieh, James J et al. “Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma.” *European urology* vol. 71,3 (2017): 405-414.

Spis rysunków

Rys.1. Najważniejsze odkrycia naukowe, które miały znaczenie w poznaniu przyczyny powstawania i rozwoju jasnokomórkowego raka nerki.

Rys. 2. Zmiany molekularne odpowiedzialne za powstawanie i rozwój jasnokomórkowego raka nerki.

Rys.3. Funkcja białka VHL w warunkach normoksji i hipoksji oraz w przypadku mutacji w genie VHL.

Rys. 4 Analiza ekspresji CD274 (PD-L1) w ccRCC w porównaniu do tkanki zdrowej nerki, wg bazy TCGA $p<0,001$.

Rys. 5 Analiza ekspresji CTLA-4 w ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową, wg bazy TCGA $p<0,001$.

Rys. 6 Analiza ekspresji CD4, markera specyficznego dla limfocytów T CD4, wg bazy TCGA $p<0,001$.

Rys. 7 Analiza CD8A, markera charakterystycznego dla limfocytów T CD8 w próbkach ccRCC vs tkanka zdrowa, wg bazy TCGA $p<0,001$.

Rys. 8 Wpływ ekspresji CD8A, jednej z podjednostek receptora CD8 na limfocytach T na czas przeżycia pacjentów z rozpoznanym ccRCC.

Rys. 9 Wpływ ekspresji CD4 na czas przeżycia pacjentów z rozpoznanym ccRCC.

Rys. 10 Wpływ ekspresji CTLA-4 na czas przeżycia pacjentów z rozpoznanym ccRCC.

Rys. 11 Analiza immunohistochemiczna próbek ccRCC z użyciem przeciwciał anti-CD8 i anti-CD4. W mikrośrodowisku guza ccRCC obserwowany jest wyraźny naciek limfocytów T CD8 i CD4.

Rys. 12 Analiza ilości naciekających limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodowisku guz ccRCC bez podziału na podgrupy; $p<0,0001$.

Rys. 13 Analiza statystyczna % nacieku limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodowisku guza ccRCC z uwzględnieniem podziału na grupy: pacjenci bez wznowy, ze wznową oraz z chorobą pierwotnie rozsianą. $p<0,0001$.

Rys. 14 Analiza ekspresji CD4 w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value $<0,05$, ** p value $<0,001$, *** p value $<0,0001$.

Rys. 15 Analiza ekspresji genu CD8A w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value $<0,05$, ** p value $<0,001$, *** p value $<0,0001$.

Rys. 16 Analiza ekspresji PD-L1 (CD274) w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value<0,05, ** p value<0,001, *** p value <0,0001.

Rys. 17 Analiza ekspresji CTLA-4 w próbkach ccRCC w zależności od statusu mutacji w genie *PBRM1* w porównaniu z tkanką zdrową. * p value<0,05, ** p value<0,001, *** p value <0,0001.

Rys. 18 Ekspresja RRM2 w komórkach zdrowej nerki i ccRCC, gwiazdką oznaczono przykładowe skupiska komórek guza, które barwią się pozytywnie przeciwciałami anti-RRM2. Analiza IHC.

Rys. 19 W miejscach wysokiej ekspresji RRM2 w ccRCC obserwowano obfity naciek limfocytów T – TILs.

Rys. 20 Korelacja pomiędzy ekspresją RRM2 i CD4 w próbkach klinicznych ccRCC.

Rys. 21 Analiza ilości przerzutów odległych w zależności od ilości naciekających limfocytów T CD8 w mikrośrodowisku guza.

Rys. 22 Analiza ilości przerzutów odległych w zależności od ilości naciekających limfocytów T CD4 w mikrośrodowisku guza.

Rys. 23 Analiza lokalizacji występowania przerzutów w zależności od stosunku ilości limfocytów T CD4 do CD8 naciekających mikrośrodowisko guza u pacjentów z zaawansowanym ccRCC.

Rys. 24 Analiza ilości PD-L1 w próbkach od pacjentów z ccRCC. Barwienie wykonano metodą IHC z użyciem specyficznego przeciwciała anti-PD-L1. P- pacjent.

Rys. 25 Jądrowa lokalizacja PD-L1 w próbkach od pacjentów z pierwotnie rozsianym ccRCC. Strzałki wskazują przykładowe barwienie jądrowe PD-L1.

Rys. 26 Analiza ilości PD-L1 w grupie pacjentów z pierwotnie rozsianym ccRCC wg ilości występowania przerzutów.

Rys. 27 Schemat pokazujący naciek limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodowisku jasnokomórkowego raka nerki. Rysunek zrobiono przy pomocy programu Biorender.

Rys. 28 Schemat przedstawia naciek limfocytów T w mikrośrodowisku jasnokomórkowego raka nerki w zależności od mutacji w genie *PBRM1*.

Spis tabel

Tabela 1 Klasyfikacja guzów nerek wg WHO

Tabela 2 Klasyfikacja nowotworów nerki TNM 2017r.

Tabela 3 Najważniejsze zespoły dziedziczne związane z występowaniem raków nerki

Tabela 4 Modele rokownicze UISS oraz SSIGN dla pacjentów po leczeniu radykalnym

Tabela 5 Model rokowniczy IMDC dla pacjentów z uogólnionym rakiem nerki

Tabela 6 Leczenie pierwszego rzutu u pacjentów z metastatycznym rakiem nerkowokomórkowym podtyp jasnokomórkowy

Tabela 7 Przeciwciała użyte do badań i warunki ich wykorzystania.

Tabela 8 Charakterystyka pacjentów oraz zależności między grupami (* test ch-kwadrat; # ANOVA; ** test Kruskalla-Wallisa)

Tabela 9 Model proporcjonalnego hazardu Coxa czynników ryzyka potencjalnie wpływających na przeżycie pacjentów dla wszystkich grup łącznie.

Tabela 10 Model proporcjonalnego hazardu Coxa czynników ryzyka potencjalnie wpływających na przeżycie pacjentów z podziałem na poszczególne grupy w zależności od stanu zaawansowania choroby.

Tabela 11 Analiza potencjalnych czynników mogących mieć wpływ na zaawansowanie choroby.