



im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy

GRZEGORZ STAWARZ

ZMIANY MOLEKULARNE W JASNOKOMÓRKOWYM RAKU NERKI

Molecular Changes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR: dr hab. Elżbieta Sarnowska, Profesor Instytutu
PROMOTOR POMOCNICZY: dr hab. 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 2024

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

Promotorowi dr hab. Elżbiecie Sarnowskiej, Profesorowi Instytutu oraz Promotorowi
Pomocniczemu dr hab. Natalii Rusetskiej
składam podziękowania
za pomoc, życzliwość oraz trud
włożony w opracowanie niniejszej pracy.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	1
Streszczenie.....	5
Summary.....	7
I.Wstęp.....	9
I.1. Nowotwory jako choroby cywilizacyjne.....	9
I.2. Jasnokomórkowy rak nerki.....	11
I.3.Zaburzenia genetyczne jasnokomórkowego raka nerki.....	15
I.4. Biologia i immunologia jasnokomórkowego raka nerki.....	17
I.5. Diagnostyka jasnokomórkowego raka nerki.....	20
I.6. Leczenie jasnokomórkowego raka nerki.....	21
II.Immunologia nowotworów.....	27
III. Immunoterapia.....	29
IV.Limfocyty naciekające guz - Tumor Infiltrating Lymphocytes: TILS.....	32
V. Onkostatyna M i jej Receptor - OSMR.....	34
VI. IDO-1.....	37
VII. Tmprss2.....	40
VIII. Cele pracy.....	42
IX. Materiały.....	44
X. Metody.....	46
X.1. Krojenie bloczków parafinowych i odparafinowanie.....	46
X. 2. Analiza immunohistochemiczna.....	47
X. 3. Analizy statystyczna.....	48

X. 4. Opracowanie graficzne.....	49
XI. Analiza Danych TCGA.....	49
XII. Wyniki.....	50
XIII. Dyskusja.....	90
XIV. Wnioski.....	98
XV. Piśmiennictwo.....	99
Spis Rysunków.....	119
Spis Tabel.....	122

Wykaz skrótów

APC - komórka prezentująca antygen (ang. antigen presenting cell)

BAP-1 - (ang. BRCA1 Associated Protein 1)

C-index - (ang. Centrality index)

CAR-T - terapia wykorzystująca zmodyfikowane (chimeryczne) limfocyty T, (ang. chimeric antigen receptor (CAR) T- cell therapy)

ccRCC - jasnokomórkowy rak nerki (ang. clear cell renal cell carcinoma)

CRP - białko C-reaktywne (ang. C-reactive protein)

CTLA-4- (ang. cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)

CD4 CTLs - limfocyty CD4+ cytotoksyczne (ang. cytotoxic subset of lymphocytes CD4)

DAMPs - (ang. damage-associated molecular patterns)

EMT - przejście nabłonkowo-mięśniakowe (ang. epithelial-mesenchymal transition)

EPO- erytropoetyna

FDA - Agencja ds. Żywności i Leków (ang. The Food and Drug Administration)

Foxp3 - (ang. forkhead box P3)

G-CSF - czynnik stymulujący kolonię granulocytów (ang. granulocyte colony-stimulating factor)

GM-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

HAR - (ang. HyperAcute Renal)

HIF -1 α - czynnik indukowany hipoksją -1 α (ang. hypoxia inducible factor - 1 α)

HIF -1 β - czynnik indukowany hipoksją - 1 β (ang. hypoxia inducible factor - 1 β)

HIF-2 α - czynnik indukowany hipoksją -2 α (ang. hypoxia inducible factor -2 α)

ICIs - inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego (ang. immune checkpoint inhibitors)

IDO-1 - dioksygenaza 1 2-3 indolaminy (ang. indoleamine 2,3-dioxygenase 1)

IFN - γ - interferon gamma (ang. interferon-gamma)

iRAE - działania niepożądane związane z układem immunologicznym (ang. immune related adverse effects)

ISUP - International Society of Urological Pathologists

LAG-3 - gen aktywacji limfocytów 3 (ang. lymphocyte-activation gene 3)

LDH - dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase)

mTOR- (ang. mammalian target of rapamycin)

MAGE-1 - (ang. melanoma - associated antigen 1)

MAPK - kinazy białkowe aktywowane mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinases)

MDSC - mieloidalne komórki supresorowe (ang. myeloid-derived suppressor cells)

NK - komórki NK- naturalni zabójcy (ang. natural killer)

NKT - limfocyty NKT (ang. Natural killer T)

NLR - (ang. nod-like receptor: nucleotide oligomerization domain receptor)

NSCLC- rak niedrobnokomórkowy płuca (ang. non-small cell lung cancer)

NSS - zabieg nefrektomii oszczędzającej (ang. Nephron sparing surgery)

OSMR - receptor dla onkostatyny M (ang. oncostatin M receptor)

PADUA - (ang. Preoperative Aspects and Dimensions Used for an Anatomical)

PAMPs - (ang. pathogen-associated molecular patterns)

PBRM-1 - (ang. protein polybromo-1)

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

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

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

PI3K-Akt - (ang. protein kinase B (PKB or Akt))

PLT - płytki krwi (ang. platelets)

R.E.N.A.L - (ang. (R)adius, (E)xophytic/endophytic properties of the tumor, (N)earness of tumor deepest portion to the collecting system or sinus, (A)nterior (a)/posterior (p) descriptor and the (L)ocation relative to the polar line)

RBC czerwone krwinki (ang. red blood cells)

SDHD- podjednostka kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej D (ang. succinate Dehydrogenase Complex Subunit)

SETD2 - (ang. SET Domain Containing 2)

TCR - receptor limfocytów T (ang. T-cell receptor)

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

TLR - receptor toll-podobny (ang. toll-like receptor)

TME - mikrośrodowisko guza (ang. tumor microenvironment)

TMPRSS2 - transbłonowa proteaza serynowa 2 (ang. transmembrane serine protease 2)

TRAIL - ligand indukujący apoptozę związany z TNF (ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand)

Treg - limfocyty T regulatorowe (ang. regulatory T-cells)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

VHL - Von Hippel - Lindau

**VISTA - Supresor aktywacji limfocytów T zawierający domenę immunoglobuliny typu V
(ang. V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation)**

WBC - białe krwinki (ang. white blood cells)

WHO - World Health Organization

Streszczenie

Wstęp: Jasnokomórkowy rak nerki (ang. clear cell renal cell carcinoma - ccRCC) jest najczęstszym nowotworem złośliwym tego narządu. Pomimo postępów w terapii ccRCC jest to nowotwór oporny na leczenie i cechuje się niepomyślnym rokowaniem w zaawansowanych stadiach. W związku z tym, konieczne jest poszukiwanie nowych ścieżek terapeutycznych w oparciu zarówno o analizę zaburzeń molekularnych jak i ich korelację z naciekiem i aktywnością układu immunologicznego. ccRCC jest jednym z nowotworów charakteryzujących się wysoką immunogennością z obfitym naciekiem limfocytów T w mikrośrodowisku guza (ang. tumor infiltrating lymphocytes - TILs). Dostępne dane sugerują, że nowotwór ten charakteryzuje się wysokim odsetkiem TILs z przewagą limfocytów CD4+ nad limfocytami CD8+. Niemniej jednak, limfocyty T obecne w środowisku guza wydają się być jednak uśpione i nie spełniają swojej funkcji. Onkostatyna M i jej receptor OSMR są białkami zaangażowanymi w patogenezę ccRCC i w części nowotworów mogą działać jako stymulator układu odpornościowego, podczas gdy w pozostałych chorobach nowotworowych pośredniczą w immunosupresji. Przeprowadzone badania wykazały, że OSMR może być zaangażowany w wyczerpanie efektorowych limfocytów T CD4+, podobnie jak białko TMPRSS2.

Materiał i metody: Materiał badawczy stanowiło 161 próbek ccRCC uzyskanych od pacjentów z Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego - NIO-PIB. Wszystkie próbki zostały scharakteryzowane pod kątem typu, stadium (klasyfikacja TNM) oraz stopnia złośliwości histologicznej. Za pomocą analizy immunohistochemicznej oceniano obecność OSMR,IDO-1 i TMPRSS2 w badanym materiale.

Wyniki: Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że ccRCC charakteryzuje się dużą liczbą TILs w mikrośrodowisku guza. Ponadto, białko OSMR jest obecne nie tylko na powierzchni komórek

nowotworowych, ale także na powierzchni TILs. Dodatkowo, poziom OSMR obecnego na TILs jest wysoki zwłaszcza w zaawansowanej chorobie przerzutowej ccRCC. Ponadto, liczba limfocytów T z obecnością OSMR korelowała z naciekiem TILs. Z kolei, ekspresjęIDO1 wykryto przede wszystkim w cytoplazmie komórek kanalików proksymalnych zdrowej nerki, chociaż w komórkach raka obserwowano ekspresję ektopową. Tmprss2 był obecny w TILs tylko w niektórych przypadkach i nie korelował z TILs ani progresją ccRCC.

Wnioski: OSMR występuje nie tylko w komórkach nowotworowych, ale przede wszystkim na powierzchni TILs. Co więcej, poziom OSMR obecnego na TILs wykazuje silną korelację ze stopniem zaawansowania choroby i może służyć jako marker wyczerpania limfocytów T CD4+. Jednakże, jego funkcja prognostyczna w odpowiedzi na immunoterapię będzie oceniana w przyszłości. Dodatkowo, OSMR może pełnić także rolę receptora bezpośrednio zaangażowanego w inaktywację limfocytów T CD4+.

Summary

Introduction: Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) represents the most prevalent malignant tumor affecting the renal organ. Despite therapeutic advancements, ccRCC remains a treatment-resistant malignancy with a poor prognosis, particularly in advanced stages. Consequently, the exploration of novel therapeutic avenues becomes imperative, grounded in the analysis of molecular abnormalities and their correlation with the immune system. ccRCC distinguishes itself among tumors due to its heightened immunogenicity, featuring a profuse infiltration of T lymphocytes within the tumor microenvironment, known as tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). Current data indicates a notable abundance of TILs, with a prevalence of CD4⁺ lymphocytes over CD8⁺ lymphocytes. Unfortunately, T cells within the tumor milieu appear dormant, failing to fulfill their intended functions. Oncostatin M and its OSMR receptor are proteins implicated in the pathogenesis of ccRCC. In certain cancers, they may act as immune system stimulators, while in others, they mediate immunosuppression. Our conducted research suggests that OSMR may play a role in the exhaustion of effector CD4⁺ T cells in ccRCC, akin to the Tmprss2 protein.

Materials and Methods: The research material comprised 161 ccRCC samples obtained from patients from the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology. All samples were evaluated based on type, stage (TNM classification), and histological grade. The presence of OSMR, IDO-1 and Tmprss2 in the examined material was assessed using the immunohistochemical method.

Results: The findings from the conducted studies reveal that ccRCC is characterized by a significant presence of TILs within the tumor microenvironment. Additionally, the OSMR protein is not only evident in the tumor cells but is also present on the surface of TILs, exhibiting elevated

levels in disseminated ccRCC. Furthermore, the abundance of T lymphocytes exhibiting OSMR correlates with the infiltration of TILs. IDO-1 expression was mainly identified in the cellular cytoplasm of normal kidney proximal tubules. However, ectopic expression was observed in cancer cells. TMPRSS2 was found in TILs only in select cases and did not exhibit correlation with TILs or ccRCC progression.

Conclusions: OSMR manifests not only within cancer cells but predominantly within TILs. The OSMR level exhibited by TILs demonstrates a robust correlation with the disease stage and may potentially serve as a marker for CD4+ T cell exhaustion. However, its prognostic role in response to immunotherapy will be subject to future assessment. Furthermore, OSMR could emerge as a novel receptor directly implicated in the inactivation of CD4+ T cells.

I. 1. Wstęp

1.1 Nowotwory jako choroby cywilizacyjne

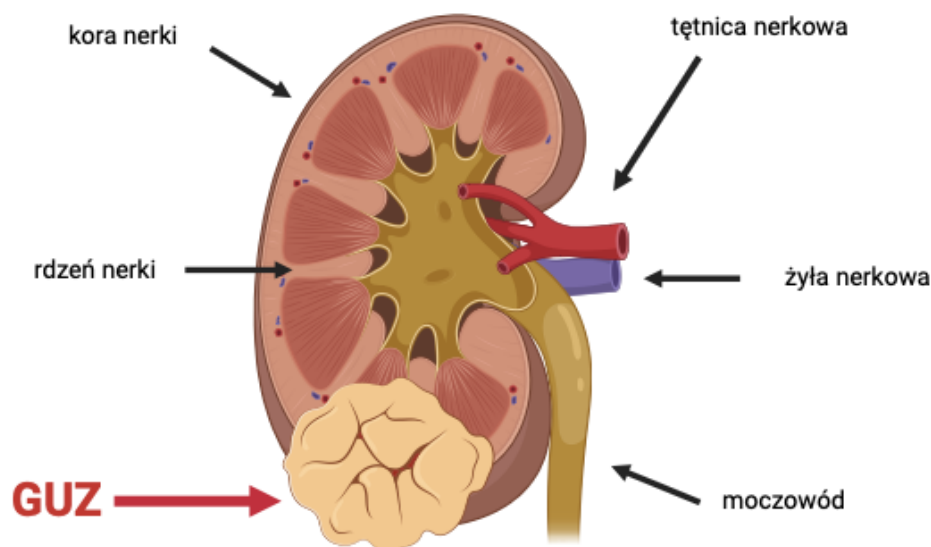
Zapadalność na nowotwory oraz śmiertelność przez nie powodowana ulegają stałemu wzrostowi od wielu lat. Zwiększona ilość zachorowań oraz starzenie się społeczeństwa wymagają podjęcia kroków nie tylko związanych z promocją zachowań prewencyjnych, ale przede wszystkim dotyczących leczenia chorych na nowotwory złośliwe. Leczenie chirurgiczne w połączeniu z chemioterapią lub radioterapią może być skuteczne w guzach o niewielkim zaawansowaniu. W wielu przypadkach jednak, zwłaszcza w stadium choroby przerzutowej, okazuje się, że dotychczas stosowane metody leczenia są nieskuteczne. Jasnokomórkowy rak nerki jest nowotworem, który mimo częściowo poznanej etiologii oraz czynników ryzyka, wciąż stanowi wyzwanie dla klinicystów zwłaszcza na etapie choroby przerzutowej. Dane z ostatnich dwóch dekad wskazują na wzrost zachorowalności na jasnokomórkowego raka nerki, średnio o 2 % rocznie zarówno w Europie jak i na świecie [1]. Wobec powyższego, kluczowe wydaje się poszukiwanie nowych ścieżek terapeutycznych dla jasnokomórkowego raka nerki. Tak jak niewielkie ograniczone do narządu guzy nerki wykazują dobrą odpowiedź na stosowane leczenie, tak przerzuty odległe mogące pojawiać się nawet wiele lat po zakończeniu leczenia stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny. Oporność na stosowane schematy terapeutyczne wydaje się być skutkiem ciągłej ewolucji nowotworów oraz szeroko pojętej heterogenności komórek nowotworowych. Tym bardziej konieczne jest poznanie molekularnych podstaw patogenezy chorób nowotworowych w celu poszukiwania nowych potencjalnych metod leczenia. Obecnie głównym przedmiotem badań nad chorobami nowotworowymi są nie tylko zaburzenia genetyczne, gdzie mutacja działa jak czynnik spustowy dla rozpoczęcia procesu karcynogenezy, ale także „relacja” jaką nowotwór ma z układem

immunologicznym chorego. Wydaje się, że wobec licznych niepowodzeń stosowanej chemioterapii lub radioterapii oraz związanych z nimi poważnymi skutkami ubocznymi, immunoterapia staje się nadzieją, nie tylko systemów opieki zdrowotnej, ale przede wszystkim pacjentów onkologicznych, na to by uczynić z raka przynajmniej chorobę przewlekłą. Choć w przypadku jasnokomórkowego raka nerki są już obecnie stosowane schematy immunoterapeutyczne to jednak ich skuteczność wciąż jest niezadowalająca zwłaszcza w stadium choroby przerzutowej [2]. Wobec powyższego, wydaje się, że zadaniem priorytetowym nie tylko dla naukowców czy przedstawicieli opieki medycznej, ale także pacjentów jest zwalczanie chorób nowotworowych na każdym ich etapie, włącznie z profilaktyką obejmującą zdrowy tryb życia i okresowe badania lekarskie. Coraz nowsze metody diagnostyczne wykorzystywane zarówno przez klinicystów jak i naukowców pozwalają na zbadanie zarówno molekularnych aspektów chorób nowotworowych jak i ich korelacji z układem immunologicznym, co może przybliżyć nas do opracowania skutecznych terapii przeciwnowotworowych.

1.2 Jasnokomórkowy rak nerki

Jasnokomórkowy rak nerki (ang. clear cell renal cell carcinoma - ccRCC) to najczęściej występujący nowotwór złośliwy tego narządu, który stanowi około 80-90% przypadków raka nerki. Jest to też trzeci co do częstości występowania nowotwór złośliwy układu moczowego, cechuje się on najwyższą śmiertelnością [3]. Największy odsetek zachorowań na jasnokomórkowego raka nerki odnotowuje się w Europie Zachodniej oraz w Stanach Zjednoczonych. Krajowy Rejestr Nowotworów nie prowadzi statystyki uwzględniającej podtyp histologiczny raka nerki. Zakładając jednak, że ccRCC stanowi około 80% wszystkich zachorowań, dane wyraźnie wskazują na wzrost zarówno zachorowalności jak i śmiertelności z powodu ccRCC w porównaniu do lat poprzednich [1]. Co więcej, prognoza zachorowań na kolejne lata również wskazuje tendencję wzrostową. Obecnie w Polsce stwierdza się około 5000 nowych zachorowań na raka nerki rocznie (mężczyźni — około 3000, kobiety — około 2000 przypadków), a z powodu raka nerki umiera każdego roku około 2500 chorych (odpowiednio: 1500 i 1000 osób) [1]. Wzrost liczby nowych zachorowań na jasnokomórkowego raka nerki może również po części wynikać z większej wykrywalności ccRCC związanej z większą dostępnością do badań diagnostycznych takich jak chociażby USG, a także z powodu wzrostu ogólnej świadomości społeczeństwa na temat czynników ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe. Histologicznie nowotwór ten wywodzi się z komórek nabłonkowych kanalika proksymalnego nefronu i lokalizuje się najczęściej jako pojedynczy guz w warstwie korowej nerki (Rys.1) [4]. Makroskopowo jest to otorebkowany żółty, owalny lub okrągły dobrze odgraniczony guz z bogatą siecią naczyń krwionośnych oraz ogniskami martwicy, wylewów krwawych czy zmian torbielowatych występujących w różnych proporcjach. Swoje żółte zabarwienie ccRCC zawdzięcza obecności tłuszczu takich jak cholesterol czy fosfolipidy [5]. Cechą charakterystyczną jasnokomórkowego raka nerki jest jego ekspansywny wzrost często prowadzący do zajęcia

okolicznych tkanek. Pod względem histologicznym rak ten składa się z wielu rodzajów komórek, w tym przede wszystkim z tak zwanych komórek jasnych. Komórki jasne są owalnego kształtu, z obfitą ilością cytoplazmy zawierającej eozynofilowe ziarnistości, glikogen, estry cholesterolu oraz fosfolipidy. Co więcej, 3 do 5 % ccRCC może wykazywać cechy sarkomatyczne zwieszające ryzyko szerzenia się nowotworu drogą naczyń krwionośnych i tym samym powstawania przerzutów odległych [6].



Created in BioRender.com bio

Rysunek 1. Schemat prezentujący prawą nerkę z guzem.

Analiza obrazu mikroskopowego jądra komórkowego w komórkach ccRCC stanowiła podstawę do określenia stopnia złośliwości histologicznej (grading). Stosowany w ostatnich latach system Fuhrmann'a, oparty na wielkości jądra komórkowego, regularności jego kształtu oraz obecności jąderka [7, Tabela 1], został zastąpiony skalą WHO/ISUP (World Health Organization/International Society of Urological Pathologists). System WHO, w odróżnieniu od systemu Fuhrmann'a, opisuje w odniesieniu do jądra komórkowego jedynie stopień IV, który charakteryzuje się obecnością

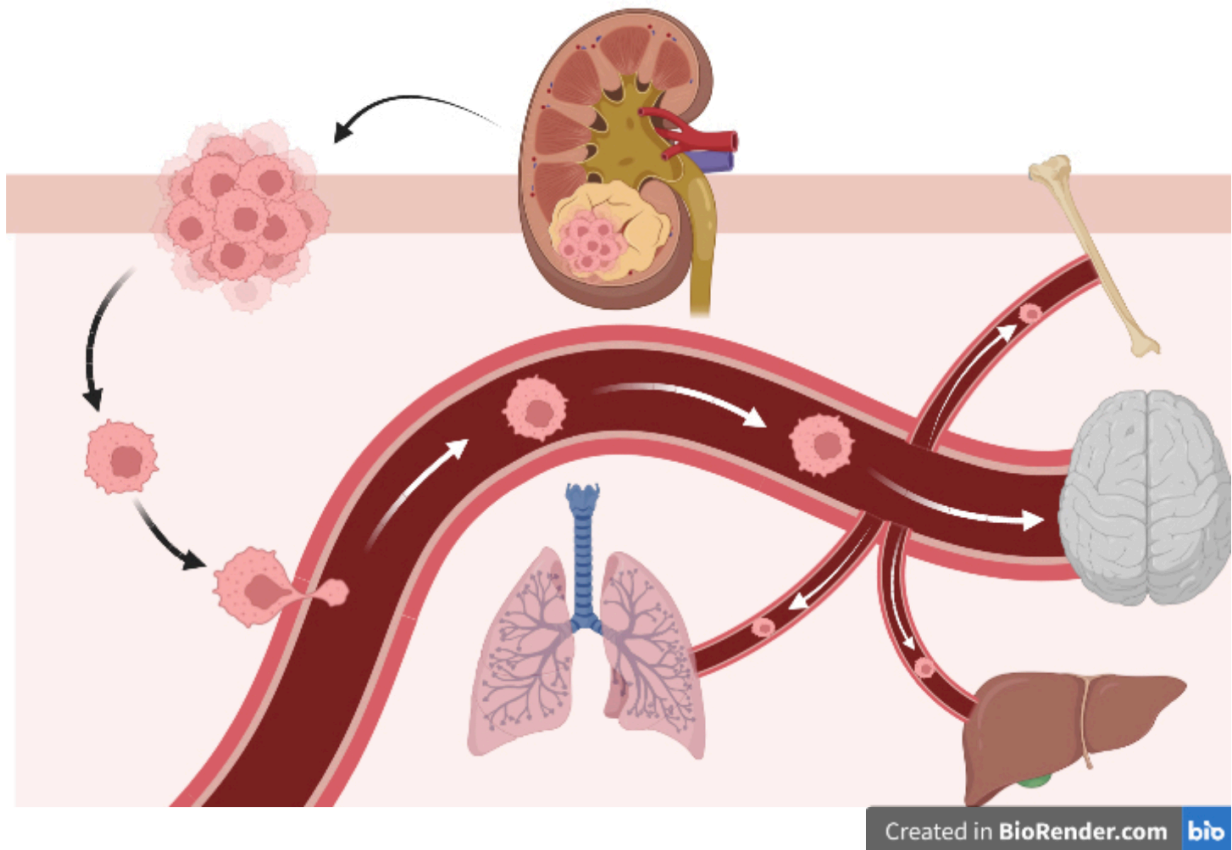
dużych, pleomorficznych, wielopłatowych komórek olbrzymich z nieregularnymi brzegami, uznawanych za najbardziej złośliwy typ nowotworu [Tabela 1,8].

Tabela 1. Stopnie złośliwości histologicznej (grading) ccRCC wg Furhmann'a i WHO.

Stopień	Skala Furhmann'a	Skala WHO/ISUP
Stopień 1 (Grade 1)	Jądra komórek nowotworowych są małe (10 µm), hiperchromatyczne i okrągłe (przypominające dojrzałe limfocyty), jąderka nie są widoczne	Jąderka komórek nowotworowych nieobecne/ niewidoczne przy powiększeniu 400x
Stopień 2 (Grade 2)	Jądra komórek nowotworowych są nieco większe (15 µm) z ziarnistą chromatyną oraz małymi trudno widocznymi jąderkami	Jąderka komórek nowotworowych eozynofilowe i widoczne przy powiększeniu 400x
Stopień 3 (Grade 3)	Jądra komórek nowotworowych są większe (20 µm), mogą być owalne z obecnością skondensowanej ziarnistej chromatyny, jąderka są z łatwością widoczne	Jąderka komórek nowotworowych eozynofilowe i wyraźne przy powiększeniu 400x
Stopień 4 (Grade 4)	Jądra komórek nowotworowych są pleomorficzne z obecnością luźnej chromatyny oraz pojedynczych lub licznych makrojąderek	Jądra komórek nowotworowych są pleomorficzne, olbrzymie, rabdoidne, mięsakowate

Jasnokomórkowy rak nerki występuje zazwyczaj w postaci pojedynczego guza. Z kolei, rzadziej diagnozowane mnogie zmiany w jednej lub obu nerkach najczęściej mają podłoże genetyczne, choć „odszczępienie się” fragmentów tkankowych z pojedynczego guza jest również możliwe [9]. ccRCC dotyczy przede wszystkim osób w piątej - siódmej dekadzie życia i zdecydowanie częściej występuje u mężczyzn. Literatura podaje, że stosunek ten wynosi około 2:1 [M:K] [10]. Spośród znanych czynników ryzyka wystąpienia tego nowotworu wymienić należy przede wszystkim palenie tytoniu, otyłość, ale też ekspozycję na takie czynniki środowiskowe jak azbest, kadm oraz węglowodory aromatyczne [11]. Co więcej, poza czynnikami środowiskowymi zwiększającymi ryzyko wystąpienia jasnokomórkowego raka nerki, rak ten może mieć również podłoże genetyczne gdzie występuje w postaci mnogiej o czym wspomniano powyżej. Szacuje się, że odsetek ccRCC będącego wynikiem konstytucji zaburzeń genetycznych stanowi około 4%. Zespoły genetyczne

związane z występowaniem raka nerki to przede wszystkim zespół von Hippel-Lindau czy BAP-1 Tumor Predisposition Syndrome [12]. W początkowym stadium rak nerki może nie dawać żadnych dolegliwości, a charakterystyczna triada objawów (triada Virchowa): krwimocz, ból w okolicy lędźwiowej i guz wyczuwalny przez powłoki, występuje rzadko (10% przypadków) [13]. ccRCC najczęściej rozwija się skrycie i często bywa wykrywany przypadkowo podczas rutynowo wykonywanych badań obrazowych. Co więcej, jasnokomórkowy rak nerki to nowotwór, który często wiąże się z występowaniem wielu procesów paranowotworowych będących niekiedy pierwszym objawem choroby nowotworowej. Nadciśnienie tętnicze, anemia, kacheksja, bóle mięśniowe czy gorączka będące wynikiem produkowanych przez guz czynników prozapalnych, cytokin czy hormonów, są symptomami spotykanymi najczęściej [14]. Zespół Stauffer'a, w którym dochodzi do zapalenia wątroby oraz podwyższenia enzymów wątrobowych przy uprzednio prawidłowej wątrobie jest również charakterystyczny dla ccRCC [15]. Co więcej, objawy związane z tym zespołem ustępują po chirurgicznym usunięciu raka nerki. Inną cechą charakterystyczną tego nowotworu jest tendencja guza do szerzenia się drogą naczyń krwionośnych - przede wszystkim poprzez żyły nerkowe oraz żyłę główną dolną, wynikiem czego są przerzuty odległe (nawet 30% chorych) i wznowy miejscowe, które mogą pojawić się nawet kilkanaście lat po zakończeniu leczenia [16]. Najczęściej przerzuty odległe lokalizują się w płucach, ale mogą również występować w kościach, wątrobie, otrzewnej, mózgu oraz w narządach w obrębie głowy i szyi. Co ważne, przerzuty odległe w ccRCC mogą pojawić się niezależnie od rozmiaru guza pierwotnego [17]. Z kolei przerzuty szerzące się drogą naczyń chłonnych są rzadsze, występują w ok. 15% przypadków i zwiększają pojawienie się przerzutów odległych nawet o 50 % [18]. Ponadto, szacuje się, że aż ponad 30% chorych z ccRCC ma przerzuty już w chwili rozpoznania, a u 30% pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki ograniczonym do narządu, przerzuty odległe powstaną po leczeniu miejscowym [18]. Dane te jasno wskazują, że jasnokomórkowy rak nerki wciąż pozostaje wyzwaniem zarówno diagnostycznym jak i terapeutycznym.



Rysunek 2. Schemat przedstawiający najczęstsze lokalizacje przerzutów odległych jasnokomórkowego raka nerki.

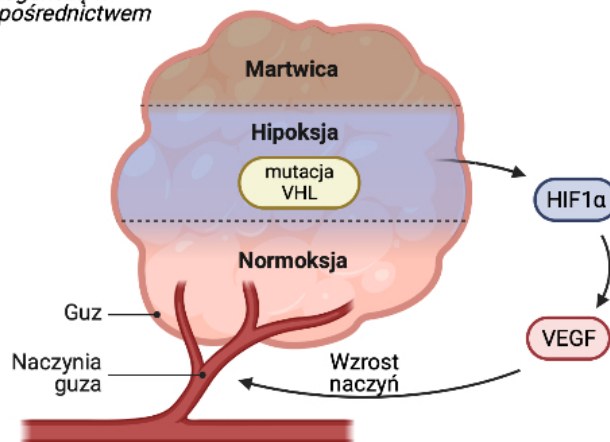
I. 2. Zaburzenia genetyczne jasnokomórkowego raka nerki

Jasnokomórkowy rak nerki choć znacznie rzadziej, może być wynikiem zaburzeń genetycznych oraz występować rodzinnie. Do najczęstszych zespołów genetycznych występowania ccRCC jak już wcześniej wspomniano należy zespół von Hippel-Lindau, który jest wynikiem mutacji genu supresorowego *VHL* [19]. To rzadki zespół dziedziczony w sposób autosomalnie dominujący, który występuje z częstością ok. 1 na 36.000 osób [20]. Jasnokomórkowy rak nerki rozwija się u 50% chorych z zespołem von Hippel Lindau. Pojawia się on znacznie wcześniej niż postać występująca sporadycznie bo już w trzeciej - piątej dekadzie życia i występuje wieloogniskowo i/lub obustronnie [21]. Białka kodowane przez gen *VHL* odpowiadają za degradację białek HIF-1 alfa i beta w

mechanizmie ubikwitynacji dzięki czemu ich poziom w normalnych warunkach jest niski [22]. Rodzaje zaburzeń jakim ulega gen *VHL* w zespole von Hippel Lindau to przede wszystkim mutacje o typie delecji, insercji czy mutacje zmiany sensu [23]. Mutacja genu *VHL* powoduje nagromadzenie białek HIF, przede wszystkim HIF-2 alfa co z kolei indukuje wzmożoną proliferację białka VEGF - głównego czynnika odpowiedzialnego za angiogenezę naczyniową w jasnokomórkowym raku nerki [24]. Inne czynniki, które ulegają wzmożonej ekspresji w patogenezie ccRCC to TGF alfa, PDGF, EPO, które również wpływają na karcynogenezę [25]. Wśród genów, które najczęściej ulegają mutacjom w przypadku sporadycznej formy jasnokomórkowego raka nerki należy wymienić przede wszystkim *PBRM1* (biorącego udział w remodelingu chromatyny), *BAP1* oraz *SETD2* (kodującego metyotranhferazę histonową) [26]. Wszystkie z nich lokalizują się w obrębie chromosomu 3 i występują w 90 % sporadycznej postaci ccRCC [27]. Mutacja genu *BAP1* (kodującego deubikwitynazę histonową) występuje w 14 % raka nerki i wiąże się z gorszym rokowaniem [28]. Zaburzenia genów kodujących białka będące podjednostkami ścieżki PI3K/Akt/mTOR, również wpływają na rozwój ccRCC [29]. Innym zespołem genetycznym, w którym może występować jasnokomórkowy rak nerki jest zespół niedoboru dehydrogenazy bursztynianowej - SDHD. W zespole tym podobnie jak w zespole von Hippel-Lindau ccRCC występuje wieloogniskowo, obustronnie i dotyczy chorych w trzeciej-czwartej dekadzie życia. Poza rakiem nerki dla tego zespołu charakterystyczne są też przyzwojaki głównie w rejonie głowy i szyi oraz guzy chromochłonne [31]. Stwardnienie guzowate czy zespół Birt-Hogg cechują się rzadkim występowaniem raka nerki o typie jasnokomórkowym [32].

Mutacja VHL

Hipoksja i nagromadzenie HIF1 alfa w wyniku mutacji VHL skutkują neoangiogenezą w obrębie guza za pośrednictwem czynnika VEGF



Created in BioRender.com bio

Rysunek 3. Schematyczny rysunek prezentujący mutację genu VHL i jej skutki w jasnokomórkowym raku nerki.

I. 3. Biologia i immunologia jasnokomórkowego raka nerki

Jasnokomórkowy rak nerki charakteryzuje się gorszym rokowaniem niż inne podtypy histopatologiczne tego nowotworu [33]. Paradoksalnie jednak, ccRCC wydaje się reagować lepiej na terapię oparte na inhibitorach VEGF, immunologicznych punktach kontroli, czy wysokich stężeniach interleukiny 2 [34]. ccRCC cechuje się ograniczoną odpowiedzią na obecnie stosowane schematy chemioterapeutyczne, co wiąże się ze złym rokowaniem chorych zwłaszcza w stadium choroby przerzutowej. Poznanie podstaw molekularnych rozwoju i progresji jasnokomórkowego raka nerki pozwoliło na poszerzenie wiedzy nie tylko na temat czynników odpowiedzialnych za brak skuteczności stosowanej chemioterapii, ale także przyczyniło się do opracowania metod leczniczych opartych między innymi na blokadzie VEGF, mTOR czy odpowiedzi układu odpornościowego na toczący się proces nowotworowy. Oporność guza na chemioterapię jest wynikiem ekspresji genów kodujących białka oporności wielolekowej działających jak pompa odpływowa (efflux pump), które pozwalają komórce nowotworowej na usunięcie ze swojego wnętrza hydrofobowych cząsteczek o aktywności cytotoksycznej [35]. Co więcej, ograniczona

odpowieź ccRCC na działanie cisplatyny wydaje się być wynikiem jeszcze innych mechanizmów niż te, które są warunkowane przez białka oporności wielolekowej [36]. Jak sugeruje dostępna literatura, jasnokomórkowy rak nerki to nowotwór cechujący się obfitym naciekiem limfocytarnym w mikrośrodowisku guza z przewagą limfocytów T CD4+ nad limfocytami cytotoksycznymi CD8+ [37]. W skład komórek naciekających mikrośrodowisko guza wchodzi także komórki NK, komórki dendrytyczne czy limfocyty regulatorowe (Treg). Odkrycie to wraz z brakiem oczekiwanych efektów stosowanego leczenia systemowego sprawiło, że coraz bardziej zaczęto interesować się immunobiologią jasnokomórkowego raka nerki. Limfocyty T CD4+ w mikrośrodowisku guza pełnią rolę limfocytów pomocniczych wydzielając interleukinę 1 oraz interleukinę 2. Początkowe schematy immunoterapeutyczne w ccRCC oparte były przede wszystkim na interferonie alfa oraz wysokich dawkach interleukiny 2, które obecnie ze względu na wysoką toksyczność są rzadko stosowane [38]. Choć terapie oparte na IL-2 i interferonie wykazują skuteczność w leczeniu zaawansowanej postaci jasnokomórkowego raka nerki to dotyczy ona jedynie 3- 5% chorych z zaawansowaną chorobą przerzutową [39]. Z kolei spontaniczna regresja guza szacowana jest na 0,3- 1% i prawdopodobnie jest wynikiem „nadzoru” jaki układ odpornościowy pełni nad komórkami nowotworowymi [40]. Skuteczność immunoterapii wciąż jest niezadowalająca i szacuje się ją na około 15 - 20% [41]. Próby pobierania TILs, namnażania ich *ex vivo* i ponownego podawania chorym z rozsiałym procesem nowotworowym w ccRCC wiązało się z ograniczoną skutecznością. Zjawisko to prawdopodobnie jest wynikiem oporności i zdolności komórek nowotworowych do ucieczki przed działaniem układu odpornościowego [42]. Dostępna literatura wskazuje na zaburzenia kontroli jaką pełni układ odpornościowy nad antygenami specyficznymi dla komórek nowotworowych w ccRCC na każdym etapie ich prezentacji [43]. Czynniki mające wpływ na brak lub ograniczoną odpowiedź układu odpornościowego na komórki jasnokomórkowego raka nerki były i są obecnie przedmiotem wielu badań. Główną rolę w immunosupresji ccRCC odgrywają białka takie jak CTLA-4 czy PD-1, które występują na powierzchni limfocytów T i

wpływają na ich zmniejszoną aktywację [44]. W prawidłowych warunkach molekuly te są odpowiedzialne za regulację funkcjonowania układu odpornościowego przede wszystkim w kontekście rozwoju schorzeń autoimmunologicznych. W przypadku karcynogenezy jednak, białko PD-L1 obecne na komórkach nowotworowych łącząc się ze swoim receptorem na powierzchni limfocytów T (PD-1) prowadzi do ograniczonej aktywności limfocytów cytotoksycznych [45]. To z kolei skutkuje immunosupresją i powstaniem warunków korzystnych dla rozwoju i progresji procesu nowotworowego [46]. Thomson i współpracownicy w przeprowadzonym badaniu wykazali, że wysoka ekspresja białka PD-1 w jasnokomórkowym raku nerki wiązała się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby i tym samym gorszym rokowaniem [47]. Obecnie prowadzone próby kliniczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko PD-1 (np. nivolumab lub pembrolizumab) lub PD-L1 (atezolizumab) czy CTLA-4 (ipilimumab) cechuje ograniczona skuteczność w leczeniu ccRCC w stadium choroby przerzutowej [48]. Do tej pory inhibitory receptora o aktywności kinazy tyrozynowej odgrywały główną rolę w leczeniu ccRCC w stadium rozsiewu. Szacuje się, że stosowanie inhibitorów VEGF wiąże się z 20-47% odpowiedzią na leczenie [49]. Wśród blokerów VEGF należy wymienić między innymi: sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, bevacizumab [50]. Co więcej, zwiększenie aktywności białka mTOR, które w normalnych warunkach odpowiada za wzrost i proliferację komórki oraz transkrypcję i syntezę białek jest charakterystyczne dla wielu rodzajów nowotworów w tym również dla jasnokomórkowego raka nerki [51]. Mechanizm w jakim dochodzi do zwiększonej ekspresji mTOR w przebiegu karcynogenezy nie jest jednak do końca poznany. Badania naukowe dowodzą, że molekuly blokujące aktywność mTOR (np. Temsirolimus) mogą wydłużyć czas przeżycia chorych z jasnokomórkowym rakiem nerki w stadium zaawansowanym, u których rokowanie jest niepomyślne [52]. Jednakże to immunologiczne punkty kontroli stanowią obecnie główny kierunek badań nad schematami leczenia jasnokomórkowego raka nerki. Obecnie stosowana immunoterapia opiera się na modulacji komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku guza oraz

hamowaniu immunosupresji komórek nowotworowych. Obserwacje kliniczne chorych z jasnokomórkowym rakiem nerki, u których leczenie oparte było na schematach immunoterapeutycznych skutkujących stabilizacją choroby czy nawet sporadycznie występującą regresją potwierdza jedynie fakt, że ccRCC to nowotwór o wysokiej immunogenności. Mimo przełomowego odkrycia jakim było poznanie cząsteczek PD-1, PD-L1 czy CTLA-4 wciąż istnieje konieczność poznawania molekularnych podstaw ccRCC a także jego oddziaływania na układ immunologiczny. Dane z dostępnej literatury sugerują, że heterogenność komórek jasnokomórkowego raka nerki oraz niewielka ilość mutacji są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za ograniczoną skuteczność dotychczas stosowanych schematów immunoterapeutycznych [53]. Wydaje się, że oprócz poznanych białek takich jak PD-1, PD-L1 czy CTLA-4 istnieją molekuly, które mogą odgrywać podobną rolę w „uśpieniu” limfocytów T i braku odpowiedzi układu odpornościowego na toczący się proces nowotworowy. Poznanie ich ekspresji oraz sposobu działania może stanowić potencjalny punkt uchwytu dla nowych schematów immunoterapeutycznych w leczeniu jasnokomórkowego raka nerki.

I. 4. Diagnostyka jasnokomórkowego raka nerki

Chociaż badanie fizykalne chorych z jasnokomórkowym rakiem nerki ma ograniczone znaczenie w postawieniu diagnozy, to objawy takie jak obecność guza wyczuwalnego przez powłoki brzuszne, obrzęki kończyn dolnych czy żylaki powrózka nasiennego powinny skłonić klinicystę do konieczności poszukiwania guza w obrębie przestrzeni zaotrzewnowej, w tym przede wszystkim nowotworu nerki [54]. Podstawowe badania laboratoryjne takie jak poziom hemoglobiny, kreatyniny, wapnia, WBCs, RBCs, PLT, LDH, CRP powinny być wykonane u każdego chorego z podejrzeniem guza nerki [55]. Co więcej, badania obrazowe takie jak badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej i układu moczowego może być pomocne w potwierdzeniu obecności procesu

rozrostowego nerki, jednak nie jest ono w stanie rozstrzygnąć czy zmiana ma charakter łagodny czy złośliwy. Badanie TK z kontrastem obejmujące klatkę piersiową, jamę brzuszną i miednicę stanowi podstawę diagnostyki obrazowej w ccRCC [56]. Choć TK mózgu oraz scyntygrafia układu kostnego nie są konieczne do postawienia diagnozy to są to badania zalecane zwłaszcza przy podejrzeniu choroby w stadium rozsiewu. Do postawienia właściwej diagnozy pomocne jest pobranie wycinka z guza nerki drogą biopsji otwartej celem ustalenia rozpoznania histopatologicznego [57]. Ponadto, badaniem, które może być wykorzystane w diagnostyce ccRCC jest płynna biopsja, która polega na analizie wolno-cyrkułującego DNA nowotworowego wyizolowanego z krwi obwodowej chorego. Jest to metoda nieinwazyjna, która umożliwia ocenę heterogenności komórek guza, przeprowadzenie badań genetycznych oraz innych analiz, a także pozwala przewidzieć ewentualną odpowiedź na stosowane inhibitory immunologicznych punktów kontroli [58].

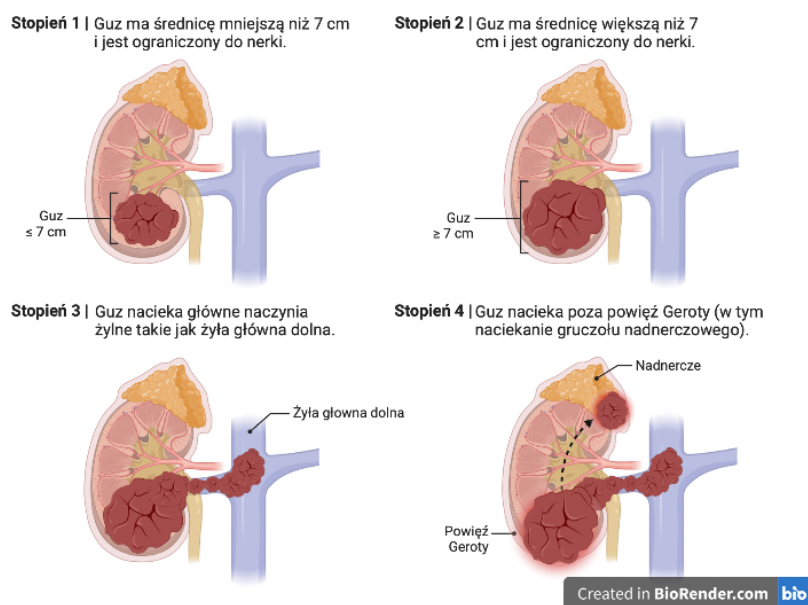
I. 5. Leczenie jasnokomórkowego raka nerki

Podstawą leczenia jasnokomórkowego raka nerki ograniczonego do narządu jest leczenie operacyjne. Zabiegi nefrektomii częściowej (NSS - nephron sparing surgery) z użyciem mało inwazyjnych technik laparoskopowych stanowią obecnie podstawę terapii chorych z ccRCC o niskim i średnim stadium zaawansowania [59]. Dokładna charakterystyka stopni zaawansowania klinicznego (staging) przedstawiona jest w **Tabeli 2** oraz na **Rys. 4**. PADUA, RENAL, C-index to najczęściej używane skale wykorzystywane przy kwalifikacji chorych do zabiegu operacyjnego polegającego na częściowym usunięciu nerki [60]. W większości przypadków NSS zastąpiła radykalną nefrektomię, która jest metodą bardziej inwazyjną i zwiększającą ryzyko wystąpienia przewlekłej choroby nerek. Ponadto, co raz częstsze zastosowanie systemów chirurgii robotycznej w operacjach nowotworów nerek powoduje, że skraca się czas hospitalizacji i inwazyjność zabiegu

[61]. Podczas, gdy zabiegi chirurgiczne wydają się być skuteczne w przypadku guzów o niskim i średnim stopniu zaawansowania, leczenie zaawansowanych postaci ccRCC z obecnością przerzutów odległych wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Terapie celowane z użyciem inhibitorów czynnika VEGF oraz immunomodulatorów takich jak interleukina 2 cechują się ograniczoną skutecznością. Wśród blokerów receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej takich jak receptor dla VEGF czy PDGF należy wymienić między innymi sunitinib, sorafenib, lenvatinib, axitinib, pazopanib czy cabozantinib [62]. Jednakże, terapia oparta na inhibitorach kinaz wiąże się z licznymi skutkami ubocznymi o dużej toksyczności a ich skuteczność jest ograniczona [62]. Choć pierwsze terapie z użyciem blokerów receptorów dla VEGF czy PDGF zrewolucjonizowały podejście terapeutyczne w ccRCC, to aktualne dane jasno wskazują, że większość chorych nabywa oporności na inhibitory kinaz już w pierwszym roku leczenia, co z kolei prowadzi zarówno do nawrotu jak i progresji choroby nowotworowej [63]. W związku z tym, obecnie monoterapia oparta na inhibitorach kinaz straciła na znaczeniu w przypadku postępowania w zaawansowanych postaciach ccRCC i stanowi pierwszą linię leczenia tylko w przypadku braku możliwości zastosowania immunoterapii [64]. Analiza zaburzeń molekularnych w jasnokomórkowym raku nerki przyczyniła się także do opracowania terapii opartej na inhibitorach mTOR (ang. mammalian target of rapamycin). Środki takie jak temsirolimus czy everolimus to blokery kinazy mTOR, które stosowane w połączeniu z inhibitorami receptorów VEGF, PDGF czy immunoterapią, stanowią kolejną opcję terapeutyczną w leczeniu zaawansowanych postaci jasnokomórkowego raka nerki. Niemniej jednak, podobnie jak w przypadku inhibitorów kinaz tyrozynowych, terapia oparta na blokerach mTOR wiąże się z umiarkowaną skutecznością [65]. Dane opublikowane w dostępnej literaturze wskazują, że większość chorych, u których stosowano inhibitory mTOR rozwija oporność już w trakcie terapii, co skutkuje progresją choroby nowotworowej [65]. Tym samym, ograniczona skuteczność wyżej wymienionych terapii prowadząca do progresji choroby nowotworowej, wymusiła konieczność poszukiwania nowych

ścieżek terapeutycznych - w tym opartych na immunoterapii. Obecnie stosowane schematy immunoterapeutyczne w jasnokomórkowym raku nerki polegają przede wszystkim na wykorzystaniu blokerów białek PD-1, PD-L1 oraz CTLA-4 (ICI). Blokada tych białek wiąże się z aktywacją limfocytów T cytotoksycznych i wzrostem ich proliferacji (**Rys. 5**). Zastosowanie nivolumabu, pembrolizumabu (blokerów PD-1) oraz ipilimumabu (inhibitora CTLA-4) u pacjentów z chorobą przerzutową bądź zaawansowaną lokalnie wiązało się z wydłużeniem przeżycia całkowitego [66]. Obecnie terapia oparta na ICIs stanowi jedną z pierwszych linii leczenia w przerzutowym jasnokomórkowym raku nerki [67]. Niemniej jednak, jak wskazują najnowsze dane z przeprowadzonych badań klinicznych takich jak KEYNOTE-426 czy JAVELIN Renal 101 zastosowanie immunoterapii w połączeniu z inhibitorami kinaz wiązało się z większym odsetkiem obiektywnych odpowiedzi (ang. ORR - objective response rate) i dłuższym przeżyciem całkowitym niż każda z terapii osobno [68]. Pomimo potwierdzonej skuteczności immunoterapii opartej na ICIs w połączeniu z inhibitorami kinaz, dotyczy ona tylko części chorych z zaawansowanym jasnokomórkowym rakiem nerki [69]. Tym samym, konieczne wydaje się poszukiwanie nowych terapii, skutecznych w jasnokomórkowym raku nerki, zwłaszcza w jego postaci przerzutowej. Najnowsze dane z dostępnej literatury wskazują na nowe schematy terapeutyczne dla chorych z rozsiałym ccRCC, które uwzględniają nowe terapie celowane, immunoterapię HyperAcute Renal (HAR), a także nowe leki stosowane w połączeniu z powszechnie znanymi środkami skutecznymi w leczeniu jasnokomórkowego raka nerki [70]. Szczególnie interesująca wydaje się immunoterapia HAR, gdzie allogeniczne komórki raka nerki uprzednio zmodyfikowane genetycznie do ekspresji α -1,3-galaktozylotransferazy (enzymu odpowiedzialnego za wytwarzanie silnego ksenoantygeny na powierzchni komórki) były podawane pacjentom z rozsiałą chorobą nowotworową w celu aktywacji układu odpornościowego [71]. Badanie z wykorzystaniem tej terapii jest obecnie na wczesnym etapie, gdzie próbuje ustalić się maksymalną dawkę tolerowaną. Niemniej jednak, wstępne wyniki wskazują na dobrą tolerancję leczenia i potwierdzoną aktywność

przeciwnowotworową układu odpornościowego [71]. Choć radioterapia stanowi obecnie jeden z filarów leczenia onkologicznego, to zazwyczaj nie znajduje ona zastosowania w leczeniu jasnokomórkowego raka nerki, gdyż komórki tego nowotworu są odporne na działanie promieniowania jonizującego [72]. Metoda ta jest stosowana jako forma paliatywnego leczenia przerzutów, wznowy miejscowej i choroby w stadium oligometastatycznym [73]. Ponadto, poza opornością na leczenie radioterapeutyczne, jasnokomórkowy rak nerki wykazuje również brak wrażliwości na chemioterapeutyki co czyni go nowotworem szczególnie trudnym w postępowaniu terapeutycznym [74]. Z kolei, zastosowanie terapii genowych w ccRCC na chwilę obecną pozostaje w fazie badań eksperymentalnych [75]. Powyższe dane jasno potwierdzają konieczność poszukiwania nowych ścieżek terapeutycznych w leczeniu jasnokomórkowego raka nerki. Co więcej, wydaje się, że to przede wszystkim kombinacje terapii opartych na różnych schematach leczenia stanowią przyszłość postępowania z chorymi z jasnokomórkowym rakiem nerki, zwłaszcza w stadium rozsiewu.



Rysunek 4. Schemat przedstawiający staging jasnokomórkowego raka nerki.

Tabela 2. Klasyfikacja wg. TNM jasnokomórkowego raka neki.

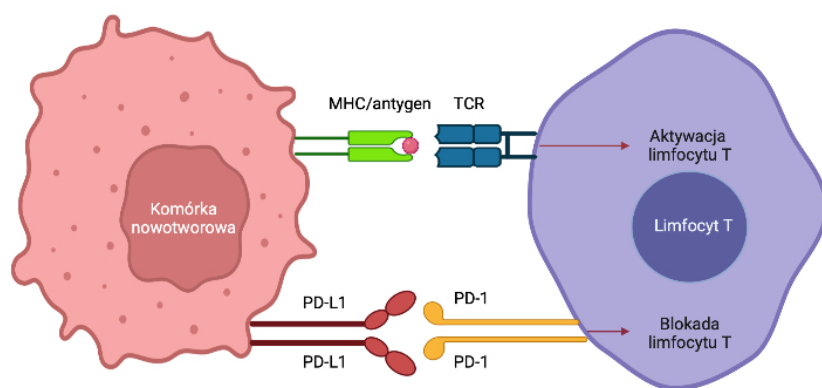
Klasyfikacja T	Opis
Tx	Brak danych o guzie pierwotnym
T0	Brak dowodów obecności guza w nerce
T1	Guz ≤ 7 cm w największym wymiarze, ograniczony do nerki
T1a	Guz ≤ 4 cm, ograniczony do nerki
T1b	Guz > 4 cm ale ≤ 7 cm, ograniczony do nerki
T2	Guz powyżej 7 cm, w największym wymiarze, ograniczony do nerki
T2a	Guz o największym wymiarze >7 cm, ale ≤ 10 cm, ograniczony do nerki
T2b	Guz o największym wymiarze >10 cm, ograniczony do nerki
T3	Guz szerzy się w świetle dużych żył lub nacieka tkankę tłuszczową okołonerkową, ale bez naciekania nadnercza po tej samej stronie co guz i nie przekracza powięzi Geroty.

T3a	Guz widoczny makroskopowo w świetle żyły nerkowej lub jej segmentalnych dopływów (zawierających warstwę mięśniową) albo naciekający tkankę tłuszczową okołonerkową i/lub wnęki nerki, lecz nieprzekraczający powięzi Geroty.
T3b	Guz widoczny makroskopowo w świetle żyły głównej dolnej poniżej przepony
T3c	Guz widoczny makroskopowo w świetle żyły głównej dolnej powyżej przepony lub naciekający ścianę żyły głównej dolnej
T4	Guz przekracza powięź Geroty (w tym naciekanie przez ciągłość nadnercza po stronie guza).
Klasyfikacja N	Opis
Nx	Nie można ocenić przerzutów w węzłach chłonnych
N0	Brak przerzutów do węzłów chłonnych
N1	Przerzuty do pojedynczego regionalnego węzła chłonnego
N2	Przerzuty do wielu regionalnych węzłów chłonnych
Klasyfikacja M	Opis
Mx	Nie można ocenić przerzutów odległych
M0	Brak przerzutów odległych
M1	Przerzuty odległe obecne

II. Immunologia nowotworów

Chociaż pierwsze doniesienia na temat roli jaką układ odpornościowy pełni w procesie karcynogenezy pochodzą z ubiegłego wieku, to dopiero w ciągu ostatnich kilkunastu lat immunologia nowotworów stała się dziedziną o dużym zainteresowaniu naukowców oraz klinicystów. Obecnie immuno-onkologia przeżywa swój renesans, prezentując kluczowe koncepcje odporności adaptacyjnej w nowotworach: nadzoru immunologicznego i edycji immunologicznej [76]. Co więcej, aktualne doniesienia naukowe potwierdzają, że istnieją różne komponenty układu odpornościowego, które w zależności od etapu choroby, kontrolują lub przyczyniają się do jej postępu. Przeprowadzone badania wskazują, że zarówno wrodzone jak i adaptacyjne mechanizmy odpornościowe wpływają bezpośrednio oraz pośrednio na ewolucję raka, w tym także na etapie przednowotworowym [77]. Układ odpornościowy posiada liczne mechanizmy dzięki którym jest w stanie zarówno rozpoznawać jak i niszczyć patogeny a także komórki nowotworowe. Zjawisko to nosi nazwę nadzoru immunologicznego. Układ immunologiczny człowieka rozpoznaje komórki nowotworowe poprzez zidentyfikowanie antygenów nowotworowych obecnych na ich powierzchni. Antygeny te mogą być częścią białek, które występują tylko w komórkach nowotworowych - tak zwane antygeny swoiste, lub są białkami, które ulegają odmiennej ekspresji w komórkach zdrowych i komórkach objętych chorobą nowotworową - i są to antygeny nieswoiste [78]. MAGE-1 – (ang. melanoma associated antigen - 1) czyli antygen swoisty dla czerniaka, był jednym z pierwszych zidentyfikowanych antygenów nowotworowych. Przeprowadzone badania potwierdziły, że układ immunologiczny jest zdolny nie tylko do rozpoznawania komórek wykazujących ekspresję antygenu MAGE-1, ale także potrafi je eliminować [79]. Obecnie wiadomo, że istnieją także inne antygeny, które mogą stanowić potencjalny punkt uchwytu dla immunoterapii onkologicznej. Jednakże, rozwijające się nowotwory dzięki wielu procesom molekularnym jakie wykształciły na drodze swojej ewolucji, są w stanie kontrolować działania układu immunologicznego. Jest to tak

zwana immunoedycja - określająca stopień interakcji komórek nowotworowych z komórkami układu odpornościowego, na którą składają się trzy etapy: etap eliminacji, etap równowagi oraz etap uciezki [80]. W etapie eliminacji swoiste i nieswoiste mechanizmy układu odpornościowego rozpoznają antygeny specyficzne dla komórek nowotworowych co umożliwia ich eliminację. Podczas tej fazy zazwyczaj nie dochodzi do wystąpienia żadnych objawów mogących sugerować pojawienie się choroby nowotworowej. Część nowopowstałych komórek nowotworowych, które „przeszły” przez etap eliminacji, wchodzi w tak zwany etap równowagi. Są to heterogenne komórki niewrażliwe na działanie układu odpornościowego, zachowujące zdolność do podziału. Na tym etapie zazwyczaj dochodzi do pojawienia się pierwszych objawów nowotworu. Końcowym etapem procesu immunoedycji jest uciezka. Niektóre z komórek nowotworowych rozwinęły mechanizmy, dzięki którym nie są rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego przez co w środowisku guza dochodzi do wytworzenia immunosupresyjnych warunków w mikrośrodowisku. Komórki nowotworowe proliferują. W tym etapie dochodzi do nasilenia uprzednio występujących dolegliwości związanych z rozwojem choroby nowotworowej [81]. Komórka nowotworowa jest w stanie „uciec” przed atakiem układu immunologicznego wykorzystując różne mechanizmy m.in. osłabioną ekspresję antygenów na ich powierzchni, utratę epitopów na antygenach, barierę fizyczną wytwarzaną przez guza uniemożliwiająca penetrację przez komórki układu odpornościowego oraz ekspresję inhibitorowych białek sygnałowych [82]. Co więcej wytworzenie tolerancji przez układ immunologiczny, anergia limfocytów T, zaburzenia dotyczące komórek prezentujących antygeny - APC czy wytwarzanie molekuł, które ograniczają aktywację limfocytów T również wpływają na „ucieczkę” komórki nowotworowej przed układem odpornościowym [83].



Created in BioRender.com bio

Rysunek 5. Schemat obrazujący interakcję komórki nowotworowej z limfocytym T.

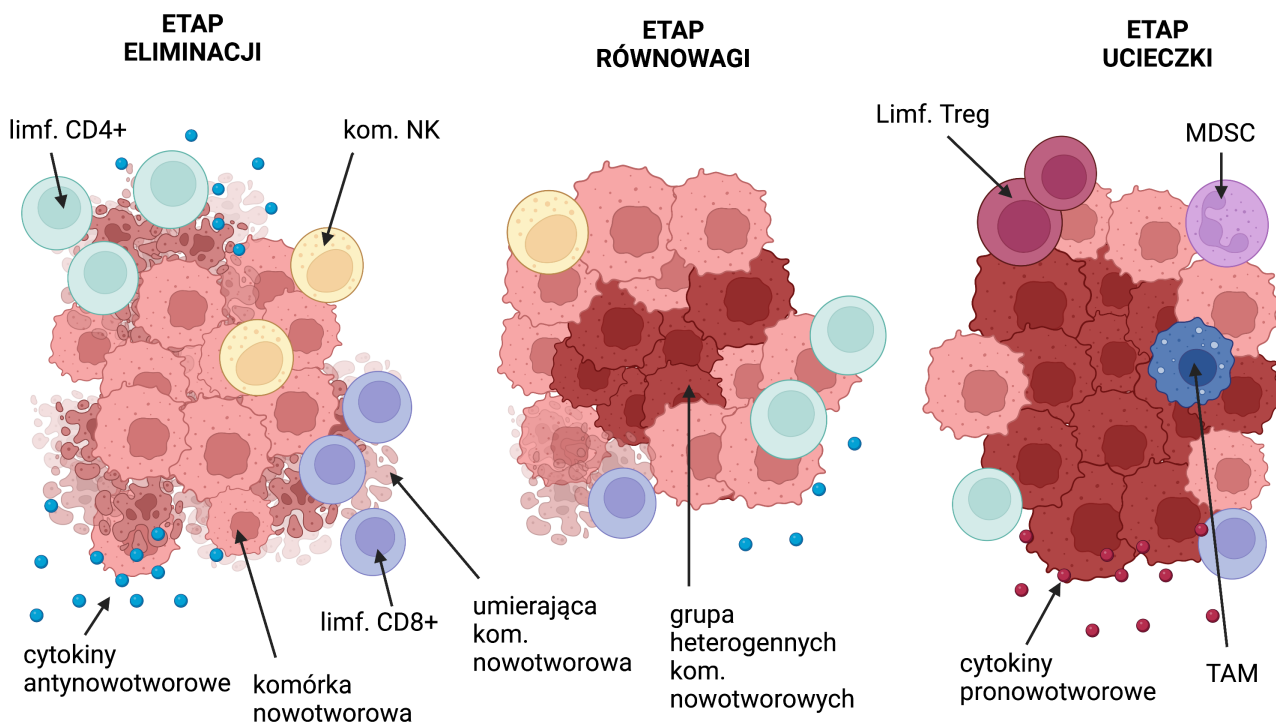
III. Immunoterapia

Dynamiczny rozwój immunoterapii w ciągu ostatnich lat sprawił, że została ona uznana obok chemioterapii, radioterapii, terapii celowanych czy leczenia chirurgicznego za jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów złośliwych. Choć przypuszczenia, że układ odpornościowy ma wpływ na toczący się proces nowotworowy datuje się już na XIX wiek, to dopiero rozwój technik biologii molekularnej w ostatnich latach umożliwił zbadanie tych mechanizmów. Już pod koniec XIX wieku William B. Coley uważany za „ojca immunoterapii” zauważył, że intensywna reakcja układu odpornościowego na podawane żywe inaktywowane szczepy bakterii *Streptococcus Pyogenes* i *Serratia Marcescens* skutkowało zmniejszeniem rozmiarów guza u chorych z nieoperacyjnym nowotworem złośliwym [84]. Z kolei Paul Ehrlich w 1909 roku wysnuł hipotezę, że układ odpornościowy jest w stanie eliminować wytwarzane przez organizm nowotworowe lub zmienione komórki [85]. Hipoteza ta wraz z koncepcją zaproponowaną przez Thomas’a i Macfarlane’a dotyczącą nadzoru immunologicznego stanowią fundament dzisiejszego rozumienia immunologii nowotworów [86]. Zjawisko nadzoru immunologicznego oraz edycji immunologicznej wyjaśnia, w jaki sposób układ odpornościowy z jednej strony broni się przed rozwijającym się nowotworem a z drugiej, wpływa na immunogenność guza. Badania

odpowiedzi układu immunologicznego po wszczepieniu komórek nowotworowych u myszy oraz doniesienia kliniczne o spontanicznej regresji czerniaka u pacjentów ze współistniejącą chorobą autoimmunologiczną dostarczyły dodatkowych dowodów potwierdzających wpływ układu odpornościowego na toczący się proces nowotworowy. Co więcej, stworzenie modelu myszy (tzw. knockout mice) było niezbędne do eksperymentalnego wykazania związku między niedoborem odporności a rakiem [87]. Ostatnia dekada w immunologii nowotworów to pasmo przełomowych odkryć dotyczących mechanizmów wykorzystywanych przez nowotwór do ucieczki przed układem odpornościowym. Zaawansowane techniki biologii molekularnej oraz biochemii umożliwiły zidentyfikowanie specyficznych reakcji układu odpornościowego na toczący się proces nowotworowy. Stało się jasne, że komórki układu immunologicznego, przede wszystkim limfocyty T toczą zaciętą walkę z komórkami nowotworowymi. Można powiedzieć, że immunoterapia zrewolucjonizowała współczesną onkologię. Przeprowadzone badania wyraźnie wskazują, że zastosowane schematy immunoterapeutyczne znacząco wpłynęły na wydłużenie życia niektórych chorych onkologicznych z do tej pory niepomyślnym rokowaniem. Dotychczas wykorzystywane strategie immunoterapeutyczne opierały się przede wszystkim na stymulowaniu lub uzupełnianiu komórek efektorowych w mikrośrodowisku guza. Jak wiadomo, układ odpornościowy człowieka jest stale atakowany przez egzogenne jak i endogenne antygeny. To powoduje, że wszystkie mechanizmy obronne układu immunologicznego, zarówno odpowiedzi swoistej jak i nieswoistej, działają wspólnie celem eliminacji antygenów, które są rozpoznawane jako obce. Z kolei dzięki zjawisku tolerancji immunologicznej nie dochodzi do uszkodzenia prawidłowych komórek organizmu podczas walki z obcymi antygenami [88]. Immunologiczne punkty kontroli to białka warunkujące tolerancję immunologiczną, które zapobiegają wytwarzaniu przeciwciał przeciwko własnym antygenom. Białka te są obecne na błonie komórkowej komórek efektorowych układu odpornościowego, co umożliwia przede wszystkim limfocytom rozpoznawanie komórek jako własne poprzez interakcję z pokrewnymi ligandami [89]. Komórki nowotworowe rozwinęły

zdolność ekspresji białek na swojej powierzchni, które działają jak ligandy dla receptorów na powierzchni limfocytów T tzw. immunologicznych punktów kontroli, co skutkuje wytworzeniem immunotolerancji. Odkrycie białek o charakterze immunologicznych punktów kontroli było przełomem w rozumieniu immunologii nowotworów i stanowi obecnie podstawę stosowanych schematów immunoterapeutycznych. Zatwierdzenie w 2011 przez FDA ipilimumabu jako terapii czerniaka zrewolucjonizowało podejście do leczenia chorób nowotworowych [90]. Co więcej, opracowane dotychczas terapie oparte na ICIs cechują się w większości przypadków nie tylko niewielką toksycznością, ale przede wszystkim wysoką skutecznością w walce z chorobami nowotworowymi [91]. W warunkach homeostazy, tzw. immunologiczne punkty kontroli odpowiadają za utrzymanie równowagi pomiędzy czynnikami prozapalnymi oraz tymi, które są odpowiedzialne za hamowanie reakcji zapalnej [92]. Zaburzenia homeostazy, którymi są nie tylko infekcje, ale też choroby nowotworowe wykazują liczne podobieństwa zwłaszcza w odniesieniu do reakcji układu odpornościowego na pojawienie się obcego antygeny. Jak wskazuje dostępna literatura, zarówno w chorobach nowotworowych jak i infekcjach dochodzi do zmiany ekspresji wielu białek będących immunologicznymi punktami kontroli takich jak: PD-1/PD-L1, CTLA-4, LAG-3, VISTA czy inne receptory. Białka te ulegają wzmożonej ekspresji nie tylko w przypadku infekcji, ale też w wyniku toczącego się procesu nowotworowego [93]. Obecnie prowadzone badania naukowe dotyczące immunoterapii opierają się na poszukiwaniu mechanizmów, które wpływają na aktywację układu immunologicznego przy jednoczesnej ochronie organizmu przed szkodliwymi skutkami nadmiernej stymulacji. Istnieją doniesienia naukowe, że u części pacjentów poddanych terapii ICIs -anty PD-1 oraz anty-CTLA-4 doszło do pojawienia się chorób o podłożu autoimmunologicznym. Podobnie, w przypadku sepsy stymulacja układu odpornościowego może doprowadzić do nasilenia stanu zapalnego oraz uszkodzenia narządów u tych pacjentów [95]. Wobec powyższego wydaje się, że kluczowym aspektem przy opracowaniu i stosowaniu

schematów immunoterapeutycznych jest nie tylko właściwa selekcja chorych, ale także czas w jakim należy rozpocząć leczenie [96].



TAM- tumor associated macrophage MDSC - myeloid -derived suppressor cell

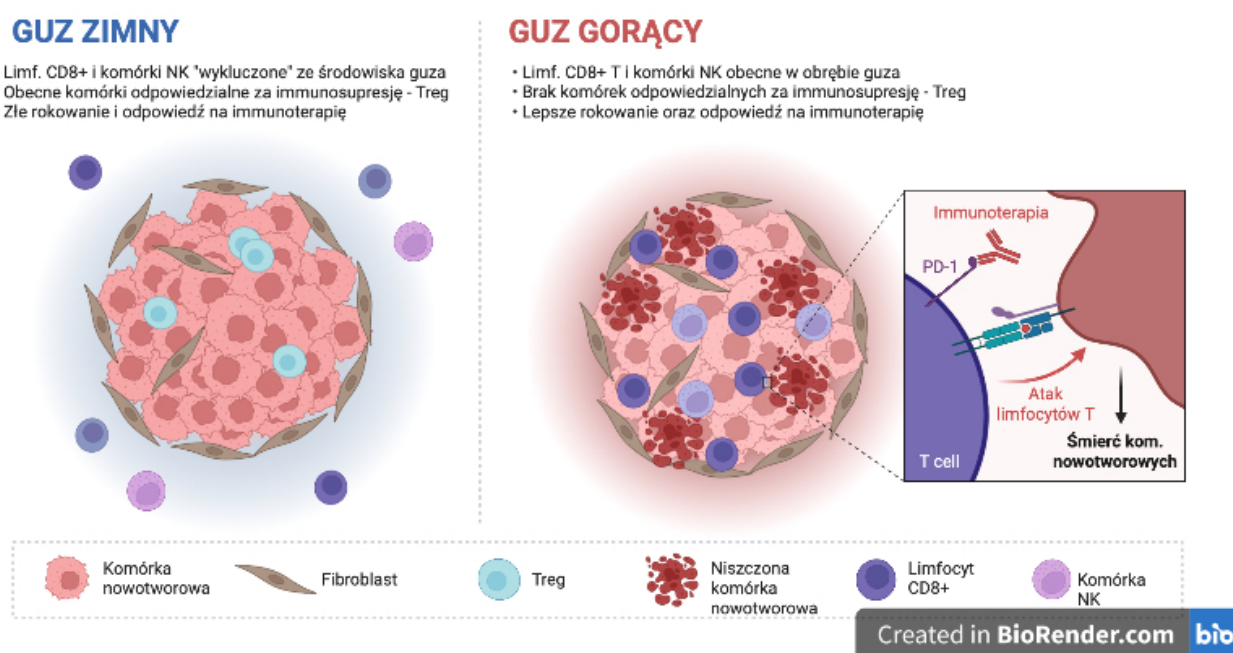
Rysunek 6. Schemat przedstawiający proces immunoedycji nowotworów.

IV. Limfocyty naciekające guz - Tumor infiltrating lymphocytes: TILS

Oprócz komórek nowotworowych w środowisku guza znajdują się także tkanka łączna z substancją pozakomórkową, fibroblasty, komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, a także liczne komórki układu odpornościowego w tym limfocyty T [117]. Limfocyty naciekające środowisko guza (tumor infiltrating lymphocytes) są od kilku lat przedmiotem wielu badań. Są to komórki układu odpornościowego, które uległy migracji z krwioobiegu w obręb mikrośrodowiska guza. W ich skład wchodzi zarówno limfocyty T CD8+, limfocyty T CD4+ jak i komórki NK, komórki dendrytyczne czy limfocyty regulatorowe - Treg [118]. Limfocyty T CD8+ oraz komórki NK wykazują działanie antynowotworowe ze względu na zdolność do rozpoznawania obcych antygenów i niszczenia

komórek guza, z kolei limfocyty Treg i mieloidalne komórki supresorowe (MDSC) stymulują rozwój nowotworu poprzez indukowanie immunosupresji w środowisku guza [119]. Ilość i rodzaj limfocytów T naciekających środowisko guza stały się wskaźnikiem spodziewanej oceny stosowanych schematów immunoterapeutycznych [120]. W zależności od obfitości nacieku limfocytarnego w podścielisku guza nowotwory możemy podzielić na trzy kategorie: guzy zimne, guzy pośrednie oraz tak zwane guzy „w stanie zapalnym” czyli guzy gorące (Rys.7). Guzy zimne cechują się skąpym naciekiem limfocytarnym. Z kolei guzy pośrednie charakteryzują się występowaniem równowagi między limfocytami T zdolnymi do niszczenia komórek nowotworowych a komórkami odpowiedzialnymi za immunosupresję w guzie [121]. Jasnokomórkowy rak nerki to nowotwór o wysokiej immunogenności, cechujący się obfitym naciekiem limfocytarnym w swoim mikrośrodowisku z przewagą limfocytów T CD4+ nad limfocytami T CD8+ [122]. Część danych z dostępnej literatury wskazuje, że obfity naciek TILs w ccRCC wiąże się z lepszym rokowaniem [123]. Niemniej jednak, pomimo bogatego nacieku TILs, limfocyty te wydają się być „uśpione” i nie pełnią one swojej funkcji. Głównym czynnikiem, który uniemożliwia cytotoksycznym limfocytom T CD8+ zwalczanie komórek nowotworowych jest ich mała liczba w środowisku guza. Próbę rozwiązania tego problemu podjęto opracowując adoptywną terapię komórkową z użyciem TILs, gdzie limfocyty T pobrane z podścieliska usuniętego guza, namnożone *ex vivo* w warunkach sprzyjających ich aktywacji (z wykorzystaniem interleukiny 2), są następnie podane pacjentowi [124]. Obecnie trwają próby kliniczne z wykorzystaniem terapii opartej na TILs w leczeniu wielu rodzajów nowotworów. Przykładowo, badania wykazują, że zastosowanie adoptywnej terapii komórkowej opartej na TILs wraz z interleukiną 2 po uprzedniej limfodeplecji uzyskanej drogą chemioterapii, wiązały się z całkowitą odpowiedzią na leczenie opornego na inhibitory PD-L1 NSCLC w stadium rozsiewu [125]. Wydaje się, że terapia z użyciem TILs może mieć przewagę nad terapią CAR-T w leczeniu guzów litych i pochodzenia nabłonkowego, gdzie zastosowanie terapii CAR-T wiązało się ze znacznie mniejszą skutecznością

niż w przypadku nowotworów układu chłonnego [126]. Ograniczona zdolność namnożonych *ex vivo* limfocytów T do migracji w obręb środowiska guza a także, ich duża niestabilność poza ustrojem to główne wady terapii opartej na TILs [127]. Co więcej, ostatnie badania wykazały, że próby pobrania, namnażania i ponownego podania TILs pacjentom z ccRCC wiązały się ze słabszą reakcją TILs wobec komórek guza, niż w przypadku czerniaka w stadium rozsiewu, gdzie terapia ta jest już stosowana z dobrym efektem [128]. Zastosowanie terapii z użyciem TILs w jasnokomórkowym raku nerki wymaga zatem dalszych badań na większej grupie pacjentów. Modyfikacja etapów terapii, zwłaszcza procesu namnażania limfocytów T *ex vivo* być może pozwoli na uzyskanie lepszych efektów leczenia chorych z ccRCC.



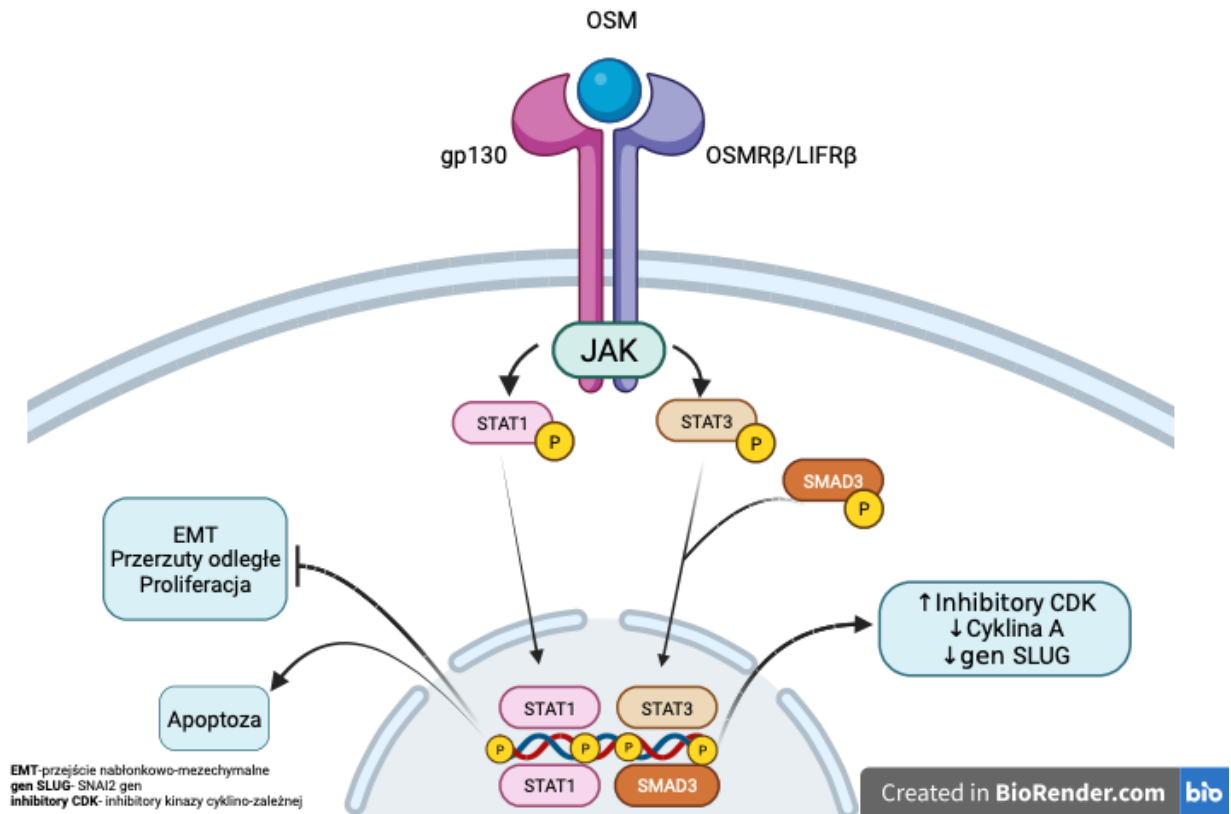
Rysunek 7. Schemat prezentujący podział nowotworów ze względu na nacieki limfocytarne.

V. Onkostatyna M i jej Receptor - OSMR

Onkostatyna M to białko pochodzące z rodziny interleukiny 6 [129]. OSM produkowana jest głównie przez aktywne limfocyty T oraz monocyty, ale także przez komórki nowotworowe. Jest białkiem pełniącym rolę przekaźnika dla układu odpornościowego. Oprócz regulacji wydzielania interleukiny 6, wpływa także na sekrecję takich czynników jak C-CSF czy GM-CSF z komórek

śródbłonna [130]. Rola białka onkostatyny M w karcynogenezie wydaje się nie być do końca poznana. Dane z dostępnej literatury sugerują, że onkostatyna M w wielu nowotworach pełni funkcję stymulatora układu odpornościowego, niekiedy jednak pośredniczy w immunosupresji i odpowiada za progresję guza [131]. W przeprowadzonych badaniach np. na komórkach glejaka, wysoka ekspresja OSM wiązała się z progresją choroby i niepomyślnym rokowaniem [132]. To w jaki sposób OSM działa w przypadku jasnokomórkowego raka nerki nie było dotychczas badane. OSMR czyli receptor dla białka onkostatyny M występuje na powierzchni wielu prawidłowych komórek organizmu i bierze udział w takich kluczowych procesach komórkowych jak regulacja metabolizmu czy kontrola wzrostu i proliferacji komórek [133]. Obecnie wiadomo, że receptor dla onkostatyny M występuje w dwóch formach. Typ I to receptor dla LIF oraz gp130, z kolei typ II składa się z kilku podjednostek (gp130 α /OSMR β), gdzie występuje specyficzna dla OSM podjednostka beta OSMR. Po połączeniu z onkostatyną M OSMR ulega heterodimeryzacji z glikoproteiną 130 co umożliwia przekazywanie sygnału do wnętrza komórki [134]. Badania przeprowadzane w ostatnich latach wskazują, że OSMR po przyłączeniu swojego ligandu jakim jest onkostatyna M prowadzi do aktywacji ścieżek sygnałowych takich jak JAK/STAT, MAPK, PI3/AKT czy lizoform PKC, które z kolei odgrywają kluczową rolę w karcynogenezie (Rys.8) [135]. To w jaki sposób białko OSMR oddziałuje na komórki jasnokomórkowego raka nerki wciąż pozostaje przedmiotem wielu badań. Istnieją trzy ligandy, które mogą połączyć się z receptorem OSMR- interleukina 6, LIF i onkostatyna M, choć w przypadku OSMR typu II, jednym ligandem jest onkostatyna M [136]. Co więcej, wydaje się, że to onkostatyna M jest białkiem, które wykazuje największe powinowactwo do OSMR. Jak wskazują przeprowadzone badania, głównym źródłem onkostatyny M w przypadku jasnokomórkowego raka nerki są makrofagi wchodzące w skład jego mikrośrodowiska [137,138]. Ponadto, ostatnie dane wskazują, że wydzielanie OSM przez komórki takie jak neutrofile, makrofagi czy komórki dendrytyczne jest stymulowane przez chemioterapeutyki takie jak cisplatyna [139]. Prawdopodobnie więc, potencjalne zablokowanie

połączenia OSM z OSMR mogłoby stanowić właściwy punkt uchwytu w chemioterapii nowotworów do tej pory niewrażliwych na cisplatinę. Wyniki ostatnich badań dowodzą, że podwyższona ekspresja OSMR występuje także w komórkach nowotworowych - na przykład w raku nerki, raku piersi czy uprzednio wspomnianym glejaku [140]. Dodatkowo, dotychczas prowadzone badania sugerują występowanie OSMR jedynie na powierzchni komórek nowotworowych, a nie na komórkach układu odpornościowego w tym na limfocytach T. Możliwe, że OSM lub jej receptor mogą stanowić właściwe punkty uchwytu dla opracowania nowych schematów immunoterapeutycznych w leczeniu ccRCC. Jasnokomórkowy rak nerki podobnie jak rak jajnika, rak płuca czy rak jelita grubego to nowotwór gdzie komórki nowotworowe cechują się wysoką ekspresją białka OSMR. Anjali Geethadevi i współpracownicy w swoim badaniu przeprowadzonym na raku jajnika wykazali, że przy zablokowaniu OSMR przy użyciu przeciwciała dochodziło do zablokowania jego dimeryzacji z IL6ST co skutkowało jego degradacją we wnętrzu komórki nowotworowej [141]. Ponadto, dane z ostatnich badań wskazują również, że wysoka ekspresja OSMR koreluje z niekorzystnym rokowaniem chorych z jasnokomórkowym rakiem nerki [142]. Do tej pory jednak dokładna rola białka OSMR w jasnokomórkowym raku nerki zwłaszcza w odniesieniu do jego interakcji z układem odpornościowym wydaje się nie być do końca poznana. Dane naukowe z dostępnej literatury wskazują, że jak dotąd nie wykryto białka OSMR na żadnych komórkach układu immunologicznego. To czy i jaką rolę receptor OSMR odgrywa na powierzchni komórek układu odpornościowego wymaga zatem dalszych badań. Wydaje się jednak, że białko OSMR może stanowić potencjalny punkt uchwytu dla opracowania nowych strategii immunoterapeutycznych.



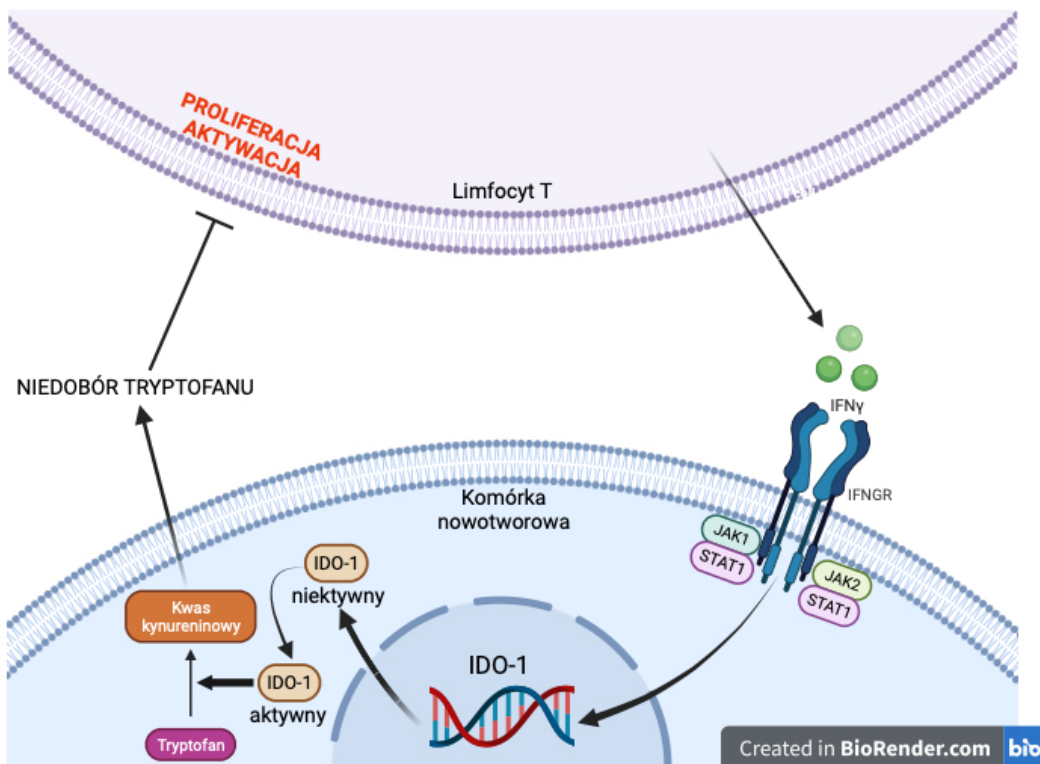
Rysunek 8. Schemat prezentujący niektóre z funkcji onkostatyny M jej receptora -OSMR.

VI. IDO-1

Tryptofan to aminokwas, który jest niezbędny dla funkcjonowania efektorowych limfocytów T. Jego degradacja to jeden z kluczowych mechanizmów za pomocą, którego komórki nowotworowe „bronią się” przed atakiem układu odpornościowego [143]. Dioksygenaza indolaminy 2,3- 1 (IDO-1) jest jednym z trzech enzymów biorących udział w rozkładzie tryptofanu na drodze szlaku kynureninowego. Efektem tego procesu jest zmniejszenie ilości tryptofanu oraz akumulacja produktów jego metabolizmu [Rys.9., 144]. Niektóre z nich takie jak kwas 3-hydroksyantranilowy i kwas chinolowy są toksyczne dla komórek i mogą prowadzić do apoptozy limfocytów T [145]. Inne zaś, mogą mieć wpływ na różnicowanie się limfocytów T w limfocyty regulatorowe, przyczyniając się do indukowania immunosupresji w obrębie mikrośrodowiska nowotworu [146]. IDO-1 jest enzymem o budowie monomeru, produkowanym między innymi przez komórki grasicy, błony śluzowej jelit, komorę przednią oka czy łożysko [147]. Występowanie tego enzymu w różnych tkankach organizmu pozwala na kontrolę układu odpornościowego i stworzenie warunków

immunosupresyjnych, w miejscach gdzie kontrola immunologiczna jest szczególnie ważna. Przykładem mogą być komórki łożyska, gdzie niedobór tryptofanu wiąże się z dezaktywacją limfocytów T i tym samym ochroną komórek zarodka przed reakcją matczyńskich limfocytów T [148]. Jednakże, nie tylko komórki prawidłowo funkcjonującego organizmu, ale też komórki nowotworowe cechują się ekspresjąIDO-1. Mimo, że enzym ten obecny jest wyłącznie w cytoplazmie komórek, a jego produkcja stymulowana jest głównie przez IFN gamma, to zarówno tryptofan jak i produkty jego przemiany są w stanie migrować do wnętrza komórki umożliwiając aktywacjęIDO-1 [149]. Efektem działaniaIDO-1 jest powstanie mikrośrodowiska immunosupresyjnego, gdzie limfocyty T pozbawione tryptofanu są „uśpione” a ich cykl komórkowy zostaje zahamowany w fazie G1. Co więcej, niedobór tryptofanu może także ograniczyć proliferację limfocytów T na drodze zablokowania ścieżki mTOR [150]. W ostatnich latach liczne badania prowadzone nadIDO-1 wykazały, że jego zablokowanie wiąże się z aktywacją limfocytów T mających działanie anty-nowotworowe. InhibitoryIDO-1 w połączeniu z chemioterapią lub bez są obecnie w trakcie badań klinicznych dotyczących niektórych typów nowotworów [151]. W zależności od nowotworu,IDO-1 ulega ekspresji w sposób ciągły lub dopiero pod wpływem działaniaIFN-gamma. EkspresjaIDO-1 jest widoczna zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka [152]. Ostatnie badania wskazują, że wysokie stężenieIDO-1 w komórkach nowotworowych wiąże się z agresywnym przebiegiem choroby, niepomyślnym rokowaniem oraz zwiększoną ilością regulatorowych limfocytów T w mikrośrodowisku guza [153]. Rak nerki podobnie jak rak płuca, rak endometrium czy rak szyjki macicy cechuje się wysoką ekspresjąIDO-1 [154]. Dostępna literatura podaje, żeIDO-1 produkowana jest nie tylko przez komórki nowotworowe same w sobie, ale także przez komórki śródmiąższowe w podścielisku guza z obfitym naciekiem limfocytarnym, gdzie wydzielany przez limfocyty T interferon gamma stymuluje ekspresjęIDO-1. Przykładem może być rak szyjki macicy, gdzie komórki nowotworowe z wysoką ekspresjąIDO-1 występują głównie na obwodzie guza, w bliskim sąsiedztwie TILs [155].

Podobnie w przypadku czerniaka, duża ilość limfocytów T korelowała z podwyższoną ilościąIDO-1 [156]. Wymienione nowotwory z bogatym naciekiem limfocytarnym w swoim mikrośrodowisku to tak zwane guzy gorące, gdzie zastosowanie immunoterapii opartej na blokadzieIDO-1 teoretycznie powinno wiązać się z lepszą odpowiedzią na zastosowane leczenie. Jasnokomórkowy rak nerki to jeden z nowotworów cechujący się wysoką immunogennością i obfitym naciekiem limfocytarnym w swoim podścielisku. Wydaje się więc, że zastosowanie inhibitorówIDO-1 w przypadku ccRCC może wiązać się z aktywacją limfocytów T i stanowić potencjalny immunologiczny punkt uchwytu. Jednakże, w jasnokomórkowym raku nerki w odróżnieniu od innych nowotworów, ekspresjaIDO-1 odbywa się przede wszystkim na poziomie komórek śródbłonkowych guza a nie w komórkach stanowiących jego podścielisko [157]. Zjawisko to nie zostało dotychczas wyjaśnione i wymaga dalszych badań na większej grupie pacjentów. Niemniej jednak, wysoka ekspresjaIDO-1 w nowotworach złośliwych powodująca obniżenie ilości tryptofanu, aminokwasu wykorzystywanego także przez komórki raka, po części wpływa na obniżenie jego proliferacji, co może mieć źródło w zjawisku polegającym na przeprogramowaniu szlaków metabolicznych. Dostępna literatura sugeruje, że przeprogramowanie szlaków metabolizmu aminokwasów jest cechą charakterystyczną wielu nowotworów w tym także jasnokomórkowego raka nerki [158]. Przeprowadzone badania, których wyniki opublikowano w dostępnej literaturze naukowej, wyraźnie wskazują, że wysoka ekspresjaIDO-1 w ccRCC koreluje z niskim stosunkiem CD4/CD8 i lepszą odpowiedzią na immunoterapię z użyciem inhibitorów PD-1 takich jak nivolumab [159].



Rysunek 9. Schemat przedstawiający mechanizm działaniaIDO-1.

VII.TMPRSS2

Innym białkiem, które badałem w swojej pracy doktorskiej był receptor o aktywności proteazy serynowej TMPRSS2 [160]. Jest to białko, które w prawidłowych warunkach bierze udział w wielu procesach fizjologicznych takich jak trawienie, przebudowa tkanek, krzepnięcie krwi, płodność czy reakcje zapalne [161]. TMPRSS2 to błonowe białko o masie 70 KDa, które składa się z kilku domen: domeny transbłonowej, domeny cytoplazmatycznej, domeny bogatej w cysteinę oraz domeny o aktywności proteazy. Ta część receptora, która pełni funkcję domeny o aktywności proteazy serynowej ulega auto-proteolizie po czym dostaje się do środowiska zewnątrzkomórkowego [162]. W prawidłowych warunkach receptor ten występuje na powierzchni komórek nabłonkowych takich tkanek jak prostata, przewód pokarmowy, gruczoły sutkowe, płuca, siatkówka oka czy gruczoły ślinowe [163]. Jego rola została dokładnie zbadana w przypadku raka prostaty, gdzie wysoki poziom TMPRSS2 stymuluje inwazję komórek i wzrost guza, co prowadzi do wystąpienia przerzutów odległych i progresji choroby. Co więcej, ekspresja TMPRSS2 podlega

ściślej regulacji przez hormony androgenowe co również ma wpływ na rozwój i progresję raka gruczołu krokowego [164]. Choć dostępna literatura sugeruje, że białko TMPRSS2 występuje w podwyższonej ilości również w innych nowotworach, to jego rola w ich powstawaniu i progresji nie została dokładnie poznana. Ostatnie badania sugerują, że wysoki poziom TMPRSS2 występuje w takich nowotworach jak rak przetyku, rak brodawkowaty nerki, gruczolakorak płuca czy gruczolakorak jelita grubego [165]. Z kolei guzy takie jak rak piersi, rak wątrobowokomórkowy czy rak żołądka cechują się niską ekspresją TMPRSS2 w porównaniu z tkanką zdrową [166]. Na podstawie dostępnych danych, wydaje się więc, że zaburzenia ekspresji TMPRSS2 mogą być istotne w wielu typach nowotworów. Ponadto, wykazano, że ekspresja TMPRSS2 w raku płuca i raku piersi korelowała z ilością limfocytów T naciekających mikrośrodowisko guza, w tym z ilością limfocytów T CD4+, limfocytów T CD8+, neutrofilii i komórek dendrytycznych. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że niekorzystne rokowanie chorych z rakiem płuca i rakiem piersi wiązało się nie tylko z wysoką ekspresją TMPRSS2, ale także z niskim naciekiem przede wszystkim limfocytów T CD4+ w mikrośrodowisku raka [167]. Dane te wskazują więc, że rodzaj i ilość TILs w mikrośrodowisku nowotworu ma wpływ na ekspresję białka TMPRSS2 [167]. Jednocześnie, TMPRSS2 występuje w obniżonej ilości w nowotworach z rejonu głowy i szyi. Jak wskazują dane z ostatnich lat, jest to receptor niezbędny dla wniknięcia wirusa COVID-19 do komórki ludzkiego organizmu. Jego niska ekspresja zatem, wiąże się z odpornością na zakażenie COVID-19 u pacjentów z nowotworami w obrębie głowy i szyi [168]. To czy i jaką rolę receptor TMPRSS2 pełni w patogenezie jasnokomórkowego raka nerki pozostaje obecnie przedmiotem badań.

VIII. Cele pracy

Obecnie w dostępnej literaturze oraz wytycznych dotyczących leczenia ccRCC nie uwzględnia się danych na temat analizy nacieku limfocytarnego, czyli ilości oraz fenotypu limfocytów T (CD4+ oraz CD8+) w mikrośrodowisku guza. Ponadto, również ekspresja takich białek jak OSMR, IDO1, PD-L1 czy Tmprss2 w mikrośrodowisku guza nie jest rutynowo oceniana w ccRCC. Brak dużej skuteczności zastosowanego leczenia oraz duża ilość naciekających limfocytów T w mikrośrodowisku ccRCC stały się podstawą do badania wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a limfocytami T. Opracowana w niniejszym projekcie badawczym analiza wybranych białek oraz korelacja uzyskanych wyników z naciekiem limfocytarnym może przyczynić się do zaktualizowania nie tylko schematów rokowniczych chorych z ccRCC, ale pozwoli także na ewentualne znalezienie nowych inhibitorów immunologicznych punktów kontroli, które mogą cechować się większą czułością i lepszą odpowiedzią na zastosowane leczenie.

Główne cele pracy:

1. Analiza ilości białek OSMR, IDO-1 oraz Tmprss2, w limfocytach naciekających nowotwór w guzie pierwotnym ccRCC w trzech grupach: pacjenci bez wznowy, pacjenci u których nastąpiła wznowa oraz pacjenci z chorobą pierwotnie rozsianą
2. Analiza ilości białek OSMR, IDO-1 oraz Tmprss2, w guzie pierwotnym ccRCC, w trzech grupach: pacjenci bez wznowy, pacjenci u których nastąpiła wznowa oraz pacjenci z chorobą pierwotnie rozsianą.
3. Ocena zależności pomiędzy uzyskanymi wynikami ekspresji białek OSMR, IDO-1 oraz Tmprss2, oraz danymi kliniko-patologicznymi chorych z okresu obserwacji.

Niniejsza praca po raz pierwszy skupia się na ocenie ekspresji wyżej wymienionych białek oraz ich analizie w limfocytach T naciekających mikrośrodowisko guza w jasnokomórkowym raku nerki. Uzyskana analiza pozwoli na pogłębienie wiedzy na temat molekularnych zaburzeń występujących w ccRCC i ich znaczenia nie tylko w patogenezie procesu nowotworowego, ale przede wszystkim ich korelacji z układem immunologicznym.

IX. Materiały

Materiałem badanym były bloczki parafinowe pobrane od 161 pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki leczonych i obserwowanych w NIO-PIB w Warszawie (w latach 2014-2020). Na badanie retrospektywne, nieinterwencyjne uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, nr 20/2020, która została wydana dnia 21 maja 2020 roku.

Uzyskany materiał był podzielony na trzy grupy według poniższego schematu:

- **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 doszło do rozsiewu.
- **52** pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

Tabela 3. Materiały wykorzystane w procesie odparafinowania i immunohistochemii.

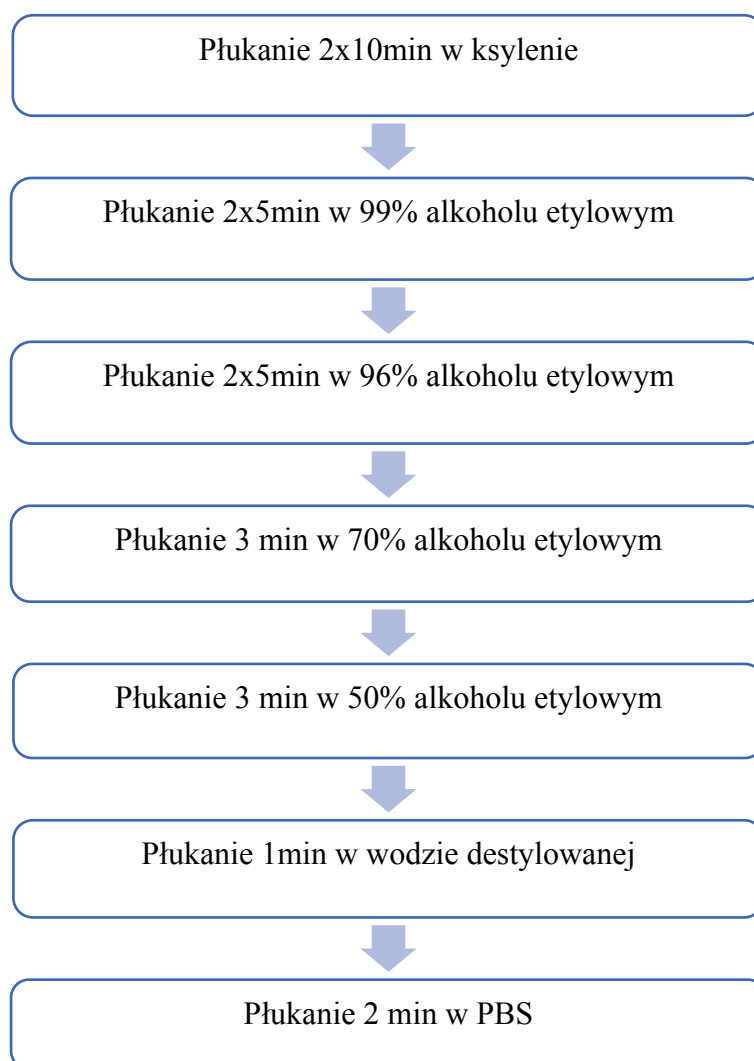
MATERIAŁY	
Aparatura	
Nazwa	Firma
Dygestorium Ductless Fume Cupboard Model 4850	Labcaire
Autoklaw: Prestige Medical Standard	Bionovo
Łaźnia wodna UltraTherm BWT-U	Biosan
Łaźnia wodna	Leica
Suszarka i komora temperaturowa WTC	Binder
Mikroskop świetlny, DM2000LED	Leica
Mikrotom RM2245	Leica
Ultrawirówka: miniSpin	Eppendorf
Lodówka-zamrażarka	Indesit
Pipety	Eppendorf
Zamrażarka -20°C	Bosch
Odczynniki	
Etanol 99%, 96%, 70%, 50%	POCH

Ksylen	POCH
Zamykacz dla preparatów Mounting medium	Dako
Woda dejonizowana 18mΩ, otrzymana systemem MiliQ	MiLiQ
Hematoksylina, Mayer's	Dako
Eosin	Dako
Woda destylowana	Dostępna w NIO-PIB
Przeciwciała	
OSMR (AN-V2) mouse mAb	Invitrogen
IDO (D5J4E) rabbit mAb	Cell Signaling Technology
TMPRSS2(EPR3862) rabbit mAb	Abcam
Zestawy odczynników	
Odczynniki do immunohistochemii EnVision FLEX System	DAKO Agilent Pathology Solutions
Materiały zużywalne	
Szkiełka mikroskopowe podstawowe SuperFrost® Plus	Bionova
Probówki laboratoryjne (typu Eppendorf): 0,2 ml, 1,5 ml	Profilab
Szkiełka nakrywkowe 24x24, 20x40	Bionova
Końcówki do pipet: 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Citoplast
Żyłki do mikrotomu	Leica

X. Metody

X. 1. Krojenie bloczków parafinowych i odparafinowanie

Analiza immunohistochemiczna została wykonana w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej NIO-PIB na preparatach histopatologicznych. Materiał uzyskany w trakcie zabiegów operacyjnych guzów nerki został poddany procesowi utrwalenia w buforowanej formalinie 4%, a później odwodnieniu w Zakładzie Patomorfologii NIO-PIB. Proces odwadniania prowadzony jest etapami, poprzez umieszczanie tkanki w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu. Następnie materiał umieszczany jest w mieszaninie etanolu i ksylenu, a na końcu w czystym ksylenu. Ma to na celu usunięcie alkoholu z preparatu. Kolejnym krokiem jest przygotowanie materiału tkankowego 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. Preparaty histopatologiczne, zatopione w parafinie zostały uzyskane poprzez krojenie bloczków parafinowych z wykorzystaniem mikrotomu. Preparaty badanej tkanki zostały następnie umieszczone na szkiełkach podstawowych (SuperFrost®). Tak przygotowane preparaty zostały poddane suszeniu w temperaturze 56°C przez godzinę aby w kolejnym kroku móc przeprowadzić procedurę odparafinowania. Odparafinowanie odbyło się poprzez umieszczenie szkiełek w dwóch roztworach ksylenu, po czym wycinki zostały uwodnione etanolem o malejącym stężeniu (z 96% do 50%). Na zakończenie procedury z użyciem etanolu, skrawki trafiły do wody oraz PBS. Całą procedurę odparafinowania można przedstawić w następującym schemacie:



Rysunek 10. Schemat prezentujący proces odparafinowania.

X. 2. Analiza immunohistochemiczna

W celu odsłonięcia miejsc antygenowych, materiał był inkubowany w łaźni wodnej, w buforze Target Retrieval Solution (Dako) w temperaturze 96-97°C przez 30 min, w zależności od używanego przeciwciała. Po schłodzeniu, preparaty były płukane 3 x 5 min, RT w PBS, a następnie traktowane buforem blokującym endogenny sygnał peroksydazy przez 5 min w RT. Kolejnym etapem była inkubacja ze specyficznym dla badanego białka przeciwciałem pierwszorzędowym, w optymalnym rozcieńczeniu, czasie i temperaturze (informacja podana w **Tabeli 4**). 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 3 min w RT z substratem dla peroksydazy chrzanowej (DAB, 3,3'-diaminobenzzydina), po czym preparaty 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, skrawki inkubowano kolejno w 99% alkoholu etylowym przez 3 min w RT i w ksylień – 5 min w RT w celu odwodnienia wybarwionych tkanek. Skrawki następnie utrwalano z wykorzystaniem odpowiedniego szkiełka nakrywkowego przy użyciu odczynnika DPX Mountant for histology. Barwienie komórkowe wizualizowano za pomocą mikroskopu.

Tabela 4. Przeciwciała użyte do badań i warunki ich wykorzystania.

Przeciwciała wykorzystane do badań	Rozcieńczenia przeciwciała używane w badaniach	Temperatura inkubacji z przeciwciałem	Czas inkubacji z przeciwciałem	Czas i temperatura wykorzystana dla odsłonięcia antygeny
OSMR	1:200	4 ^o	18h	99 ^o , 30''
IDO	1:200	RT	1h	96 ^o , 30''
TMPRSS2	1:1000	RT	1h	100 ^o , 10''

X. 3. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna była wykonana przy pomocy oprogramowania statystycznego R, wersja, 4.2.1, z przyjętym poziomem istotności równym $p < 0,05$. Dane przedstawiono w formie tabel oraz wykresów słupkowych w przypadku informacji charakteryzujących grupę badaną. Zmienne ilościowe o rozkładzie normalnym przedstawiono jako średnią z odchyleniem standardowym. Dane o rozkładzie istotnie różnym od rozkładu normalnego przedstawiono jako medianę z pierwszym i

trzecim kwartylem. Normalność oceniono przy pomocy testu Shapiro Wilka oraz pomocniczo histogramów i wykresów kwantyl-kwantyl. Do porównań międzygrupowych zmiennych jakościowych zastosowano test Chi2-Pearsona. Dla zmiennych ilościowych zastosowano test Kruskal-Wallis'a- do cech normalnego przypadku rozkładu innego od rozkładu normalnego oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla cech ilościowych o rozkładzie normalnym. Do oceny korelacji między zmiennymi posłużono się współczynnikiem Kendalla.

X. 4. Opracowanie graficzne

Rysunki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały utworzone przy pomocy oprogramowania Biorender (RRID:SCR_018361).

XI. Analiza Danych TCGA

Analizę danych transkryptomicznych dostępnych w bazie TCGA przeprowadzona za pomocą platformy UALCA dostępnej na stronie <https://ualcan.path.uab.edu/>. Wykresy wykonano za pomocą programu GraphPad Prism10 dostępnego w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej.

XII. Wyniki

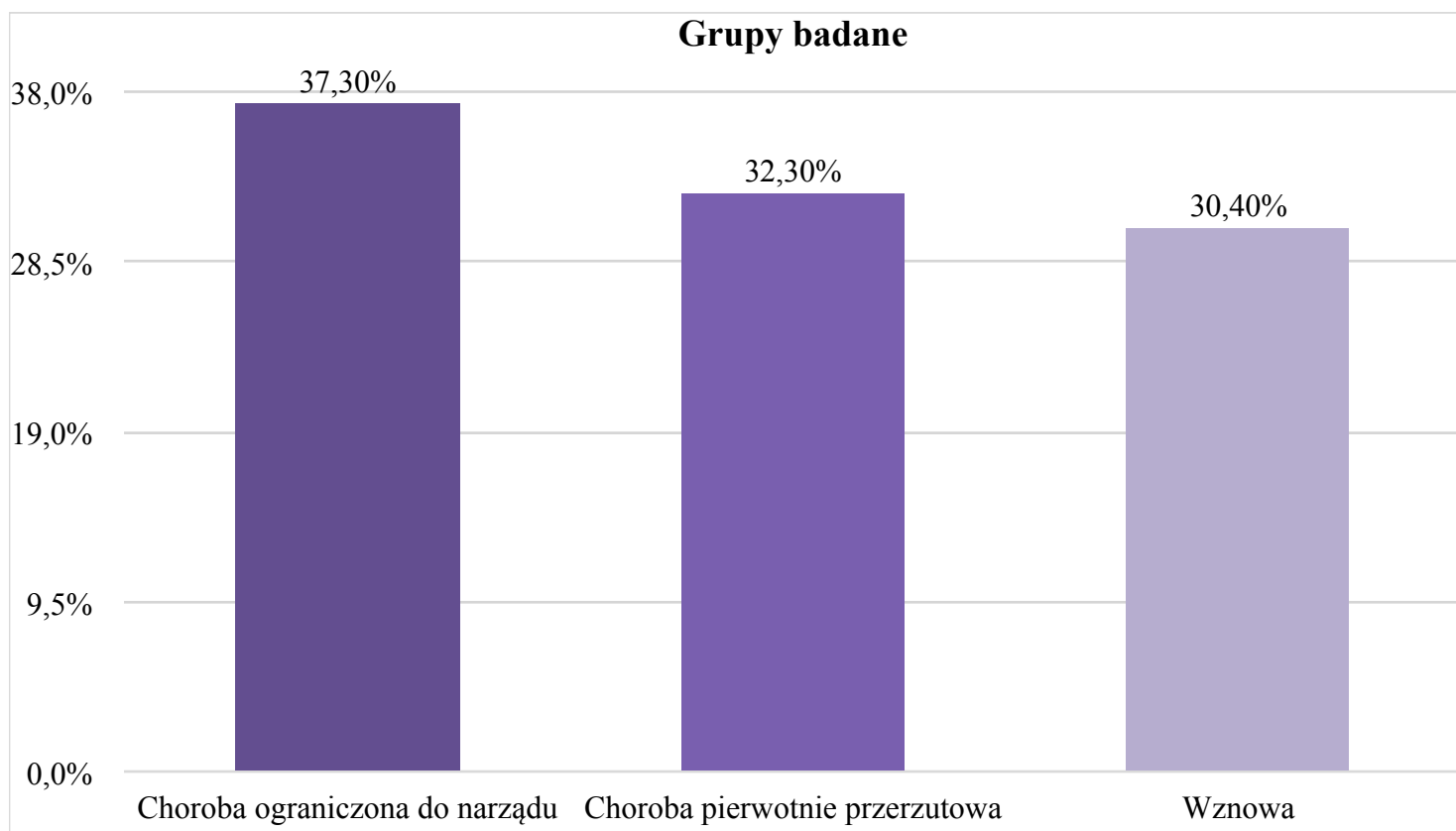
Charakterystyka pacjentów.

Badaniem objęto 161 pacjentów, których podzielono na trzy grupy: pacjenci z chorobą ograniczoną do narządu (37,3%), pacjenci z chorobą pierwotnie przerzutową (32,3%) oraz pacjenci ze wznową nowotworową (30,4%). Średnia wieku w grupie badanej wynosiła 69,7 lat. Dokładna charakterystyka grupy badanej została przedstawiona w **Tabeli 5**.

Tabela 5. Charakterystyka grupy badanej

Grupa	n	%
Choroba ograniczona do narządu	60	37,3
Choroba pierwotnie przerzutowa	52	32,3
Wznowa	49	30,4
<hr/>		
Płeć		
K	63	39,1
M	98	60,9
<hr/>		
Grade		
G1	16	10,3
G2	74	47,4
G3	46	29,5
G4	20	12,8
<hr/>		
T		
T1	88	54,7
T2	15	9,3
T3	54	33,5
T4	3	1,9
Tx	1	0,6
<hr/>		

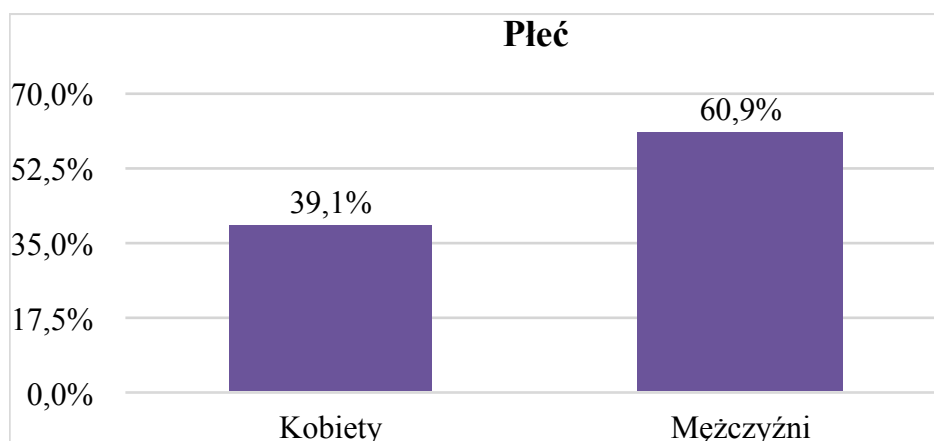
Najwięcej chorych (37,3%) było w grupie z chorobą ograniczoną do narządu, podczas gdy najmniejszy udział procentowy stanowili pacjenci ze wznową (30,4%). Chorzy z chorobą pierwotnie przerzutową odpowiadali za 32,3% wszystkich przypadków (**Rysunek 11**).



Rysunek 11. Podział pacjentów na grupy.

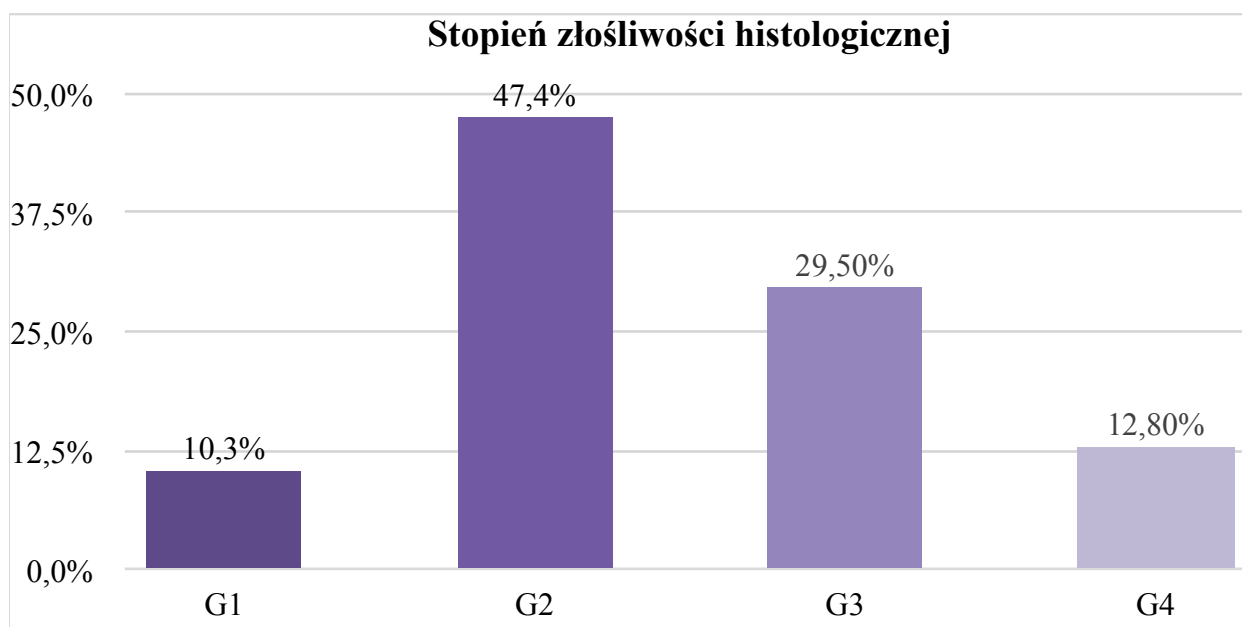
W grupie badanej mężczyźni stanowili większość, tj. 60,9%, zaś kobiety 39,1% (**Rysunek 12**).

Wyniki te potwierdzają dane z literatury, gdzie mężczyźni częściej chorują na ccRCC. Stosunek mężczyzn do kobiet z ccRCC wynosi ok. 2:1.



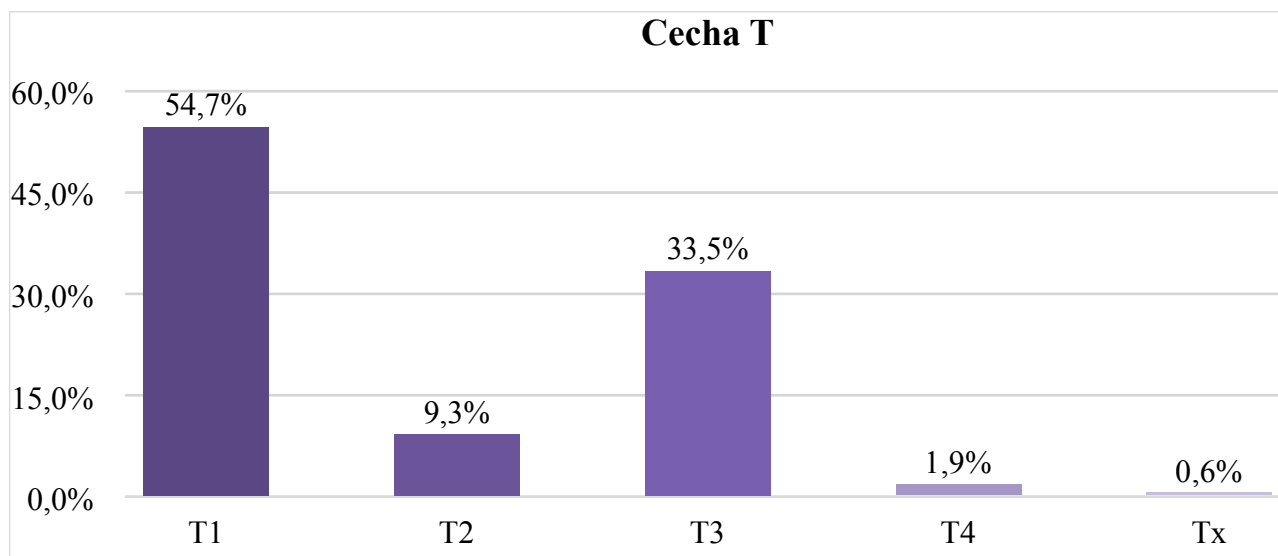
Rysunek 12. Udział płci w grupie badanej.

Analizie poddano również stopień złośliwości histologicznej. W grupie badanej najwięcej pacjentów miało nowotwór na poziomie złośliwości histologicznej G2, co stanowiło 47,40%. Drugim najczęstszym stwierdzanym stopniem złośliwości był stopień G3, który odpowiadał za 29,50% przypadków. Stopień G4 z kolei stwierdzono u 12,80% pacjentów, zaś G1 u 10,30% (Rysunek 13).



Rysunek 13. Udział stopni złośliwości histologicznej (Grade) w grupie badanej.

Kolejna analiza dotyczyła stadium TNM. U większości pacjentów stwierdzono obecność nowotworu w stadium 1, co stanowiło 54,7 %. Drugim najczęściej stwierdzanym stopniem zaawansowania było stadium 3, stanowiące 33,5 %. Z kolei, stadium 2 i 4 stwierdzono u (kolejno) 9,3 % i 1,9 % pacjentów. Tx stwierdzono u 0,6 % (n=1) (**Rysunek 14**).



Rysunek 14. Udział poszczególnych stopni cechy T u pacjentów.

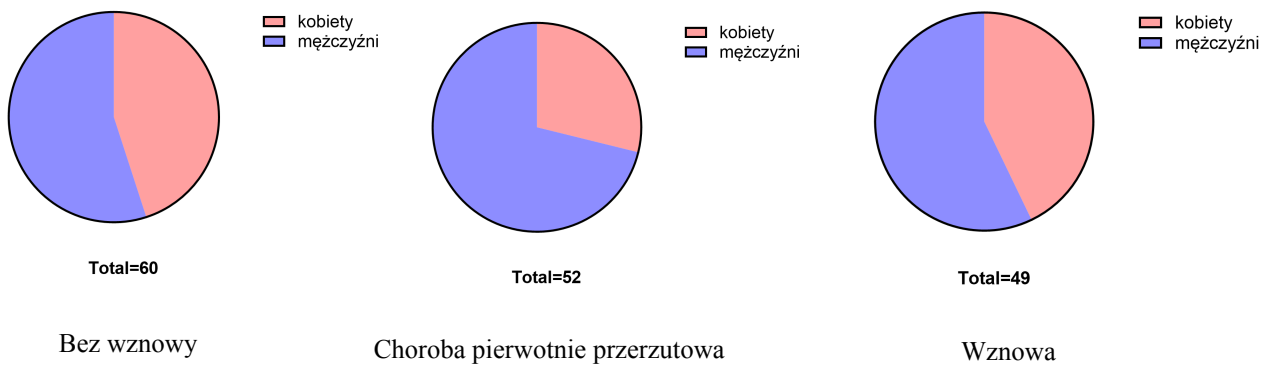
Szczegółowa charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem podziału na grupy jest przedstawiona w poniższej tabeli (**Tabela 6**).

Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej z podziałem na grupy.

	Bez wznowy	Choroba pierwotnie przerzutowa	Wznowa	p-value
	n (%)	n(%)	n(%)	
n max	60	52	49	
Grupa				
Choroba ograniczona do narządu	60 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	<0,001
Choroba pierwotnie przerzutowa	0 (0,0)	52 (100,0)	0 (0,0)	
Wznowa	0 (0,0)	0 (0,0)	49 (100,0)	
Płeć				
K	27 (45)	15 (28,8)	21 (42,9)	0,177
M	33 (55,0)	37 (71,2)	28 (57,1)	
Grade				
G1	6 (10,3)	3 (6,0)	7 (14,6)	<0,001
G2	41 (70,7)	11 (22,0)	22 (45,8)	
G3	10 (17,2)	23 (46,0)	13 (27,1)	
G4	1 (1,7)	13 (26,0)	6 (12,5)	
T				
T1	53 (88,3)	14 (26,9)	21 (42,9)	<0,001
T2	5 (8,3)	3 (5,8)	7 (14,3)	
T3	2 (3,3)	34 (65,4)	18 (36,7)	
T4	0 (0,0)	1 (1,9)	2 (4,1)	
Tx	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,0)	

Spośród pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu było 55% mężczyzn oraz 45% kobiet, co stanowi stosunek 1,2:1. Dominującym stopniem złośliwości histologicznej w tej grupie był stopień G2, który stanowił 70,7%. Drugim najczęściej stwierdzanym stopniem złośliwości histologicznej

był stopień G3 stanowiący 17,2%. Z kolei stopnie G1 i G4 stwierdzono kolejno u 10,3% i 1,7% pacjentów. Większość chorych w tej grupie było w stadium zaawansowania T1, co stanowiło 88,3%. Stadium T2 i T3 natomiast, stwierdzono u kolejno 8,3% i 3,3%. Co więcej, w tej grupie nie stwierdzono stadiów T4 ani Tx. Wśród pacjentów, u których stwierdzono chorobę pierwotnie przerzutową było 71,2% mężczyzn i 28,8% kobiet, co stanowiło stosunek 2,5:1. Dominującym stopniem złośliwości histologicznej w tej grupie był stopień G3 odpowiadający za 46% chorych w tej grupie. Pacjenci ze stopniem złośliwości G4 i G2 stanowili odpowiednio 26% i 22%. Z kolei, stopień G1 stwierdzono u 6% pacjentów. Większość pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową było w stadium T3, stanowiąc 65,4%. Drugim najczęściej stwierdzanym stadium zaawansowania było stadium T1 stanowiące 26,9%. W stadium T2 i T4 było odpowiednio 5,8% i 1,9% pacjentów. W tej grupie chorych nie było pacjentów w stadium Tx. W przypadku chorych, u których stwierdzono wznowę nowotworową było 57,1% mężczyzn i 42,9% kobiet, co stanowiło stosunek 1,3:1. Dominującym stopniem złośliwości histologicznej w tej grupie był stopień G2, który stanowił 45,8%. Stopień G3 z kolei, stwierdzono u 27,1% pacjentów, a G1 i G4 odpowiednio u 14,6% i 12,5% chorych. Dwa najczęściej występujące stadia zaawansowania klinicznego w tej grupie chorych stanowiły stadium T1 (42,9%) oraz T3 (36,7%). Stadium T2 stwierdzono natomiast u 14,3% pacjentów, T4 u 4,1%, a Tx u 2% pacjentów. Różnice w stopniach złośliwości histologicznej oraz stadium zaawansowania klinicznego na podstawie cechy T były istotne statystycznie ($p < 0,001$). Co ciekawe, największy stosunek mężczyzn do kobiet obserwowano w grupie chorych pierwotnie rozsiaanych (**Rys. 15**).



Rysunek 15. Wykresy kołowe przedstawiające ilość kobiet i mężczyzn chorych na ccRCC w poszczególnych grupach.

Średnia wieku w grupie pacjentów, z chorobą ograniczoną do narządu wynosiła 68,6 lat. W grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową średnia wieku wynosiła 70,2 lat, zaś u pacjentów ze stwierdzoną wznową - 70,7 lat. Różnice pomiędzy badanymi grupami nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$) (Tabela 7).

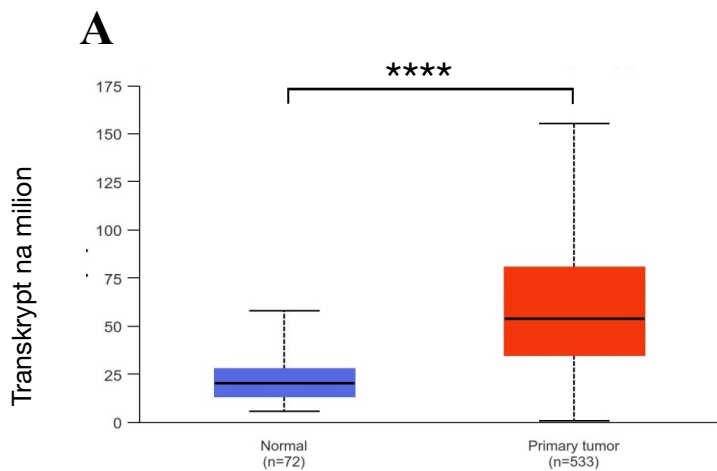
Tabela 7. Średni wiek w badanych grupach.

Grupa	Zmienna	Średnia	SD	p-value
Brak wznowy		68,6	10,2	
Choroba pierwotnie przerzutowa	Wiek	70,2	8,85	
Wznowa		70,7	9,57	0,496

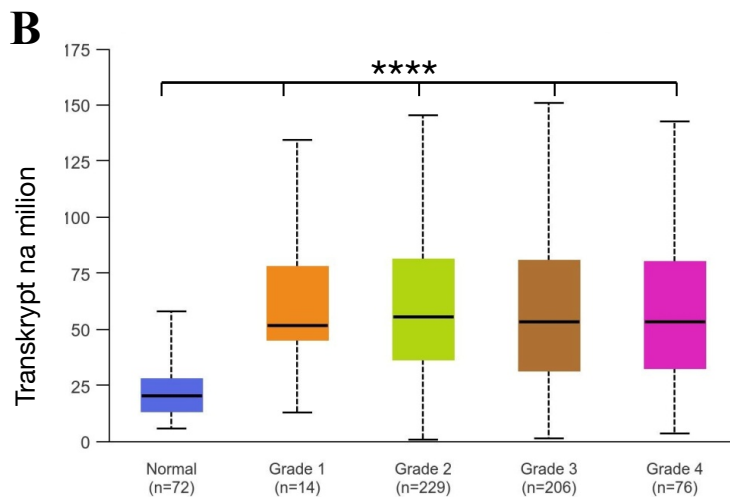
Ekspresja genu OSMR i ilość białka OSMR w próbkach ccRCC

Reanaliza danych transkryptomicznych dostępnych w bazie TCGA (KIRC) wykazała silną nadekspresję genu OSMR w komórkach pierwotnego ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (**Rys. 16A**). Nadekspresja ta była niezależna od stopnia złośliwości histologicznej i stopnia zaawansowania (**Fig.16B i 16C**). Dodatkowo nie wykazano różnic istotnie statystycznych w ekspresji OSMR w guzie pierwotnym ccRCC w zależności od płci (**Fig.16D**).

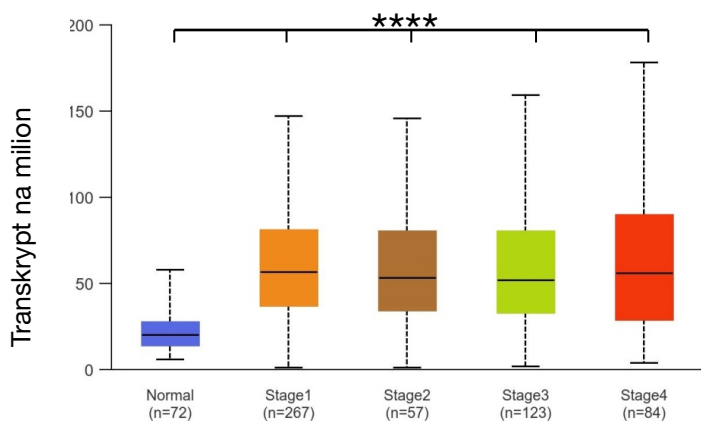
Ekspresja OSMR



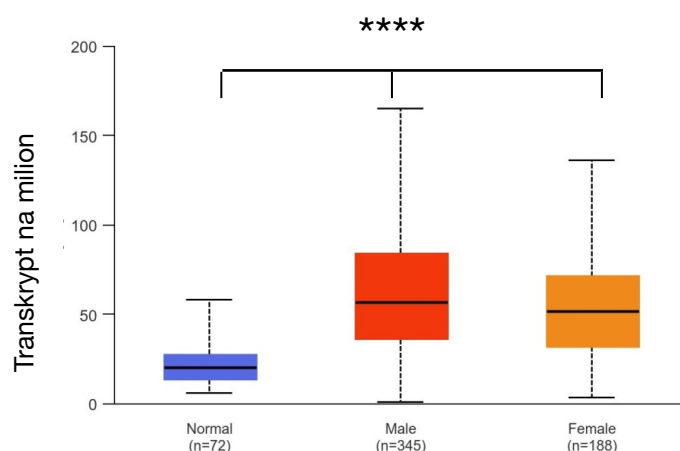
Ekspresja OSMR



Ekspresja OSMR



Ekspresja OSMR



Rysunek 16. Ekspresja genu OSMR w próbkach pierwotnego ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (A), w zależności od stopnia złośliwości G (B), w zależności od stadium zaawansowania (C) oraz w zależności od płci (D).

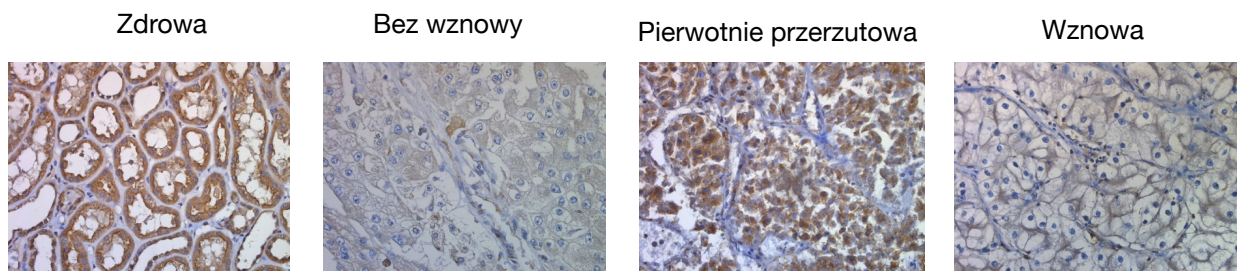
Wynik ten może wskazywać na to, że nadekspresja genu OSMR występuje od początku powstania nowotworu i może być związana z jego progresją.

W celu określenia ilości białka OSMR w komórkach ccRCC przeprowadzono analizę immunohistochemiczną w trzech grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC.

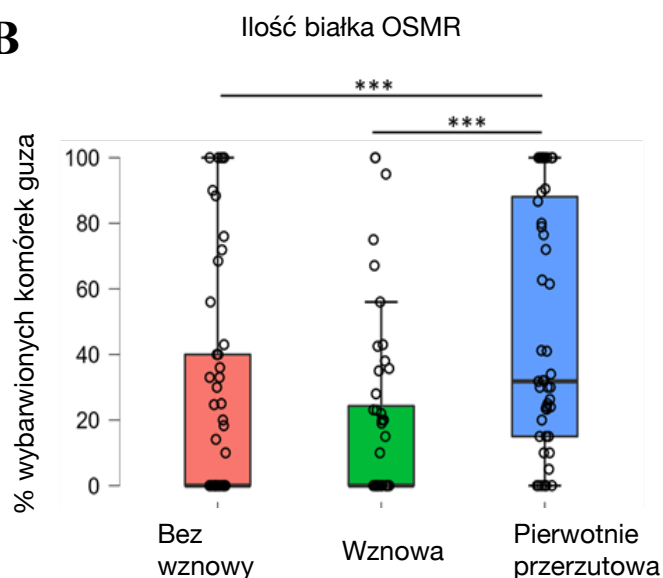
Przeprowadzona analiza wykazała, że białko OSMR występuje w tkance zdrowej nerki, w jej kanalikach proksymalnych, jak również w komórkach jasnokomórkowego raka nerki. **(Rys.17A)**.

Przeprowadzona analiza wykazała, że w komórkach ccRCC ilość białka OSMR jest znacznie wyższa w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową w porównaniu z grupami bez wznowy i z wznową **(Rys.17B)**. W grupie pacjentów z chorobą pierwotnie rozsianą 46% pacjentów było w stadium G3 lub G4, jednak analiza transkryptomyczna nie wykazała różnic w ilości mRNA OSMR u pacjentów z G3 i G4 **(Rys.17B)**. Wydaje się więc, że ilość transkryptu OSMR nie koreluje bezpośrednio z ilością białka OSMR. Dodatkowo, znacząco większa ilość OSMR w guzie pierwotnym u pacjentów z chorobą pierwotnie rozsianą może świadczyć o tym, że białko to może pełnić ważną funkcję w progresji i inwazji nowotworu.

A



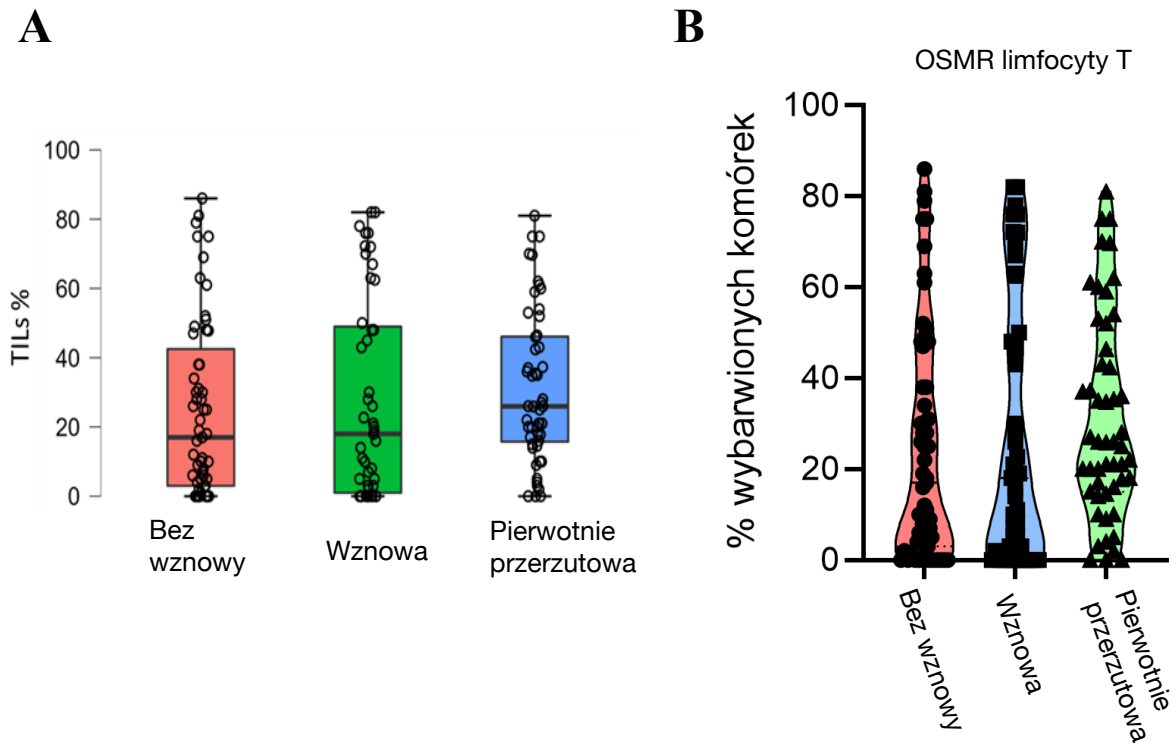
B



Rysunek 17. Analiza ilości białka OSMR w próbkach klinicznych pierwotnego ccRCC w zależności od podziału na grupy: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC. Analiza ilości białek metodą IHC w grupach w porównaniu z tkanką zdrową (A), powiększenie x 40, analiza statystyczna ilości białka OSMR w komórkach ccRCC we wszystkich grupach badanych (B).

OSMR w limfocytach T naciekających nowotwór.

Z prac zespołu Zakładu Immunoterapii Eksperymentalnej wynika, że w wyczerpanych limfocytach T CD4 występuje duża nadekspresja genu OSMR (Jancewicz et.,al. 2021 suplement). Z uwagi na to, że jasnokomórkowy rak nerki jest jednym z najbardziej immunogennych nowotworów i występuje w nim duża infiltracja limfocytów T, sprawdziłem ilość białka OSMR w limfocytach naciekających guz w w/w grupach pacjentów. Przeprowadzona analiza wykazała, że niezależnie od badanej grupy, guz ccRCC infiltrowała podobna ilość limfocytów T (**Rys. 18A**). Białko OSMR obserwowano w podobnej ilości limfocytów T naciekających guz, jednak zdecydowanie większa intensywność barwienia, czyli więcej białka OSMR była widoczna w komórkach ccRCC w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową (**Rys.18B**).

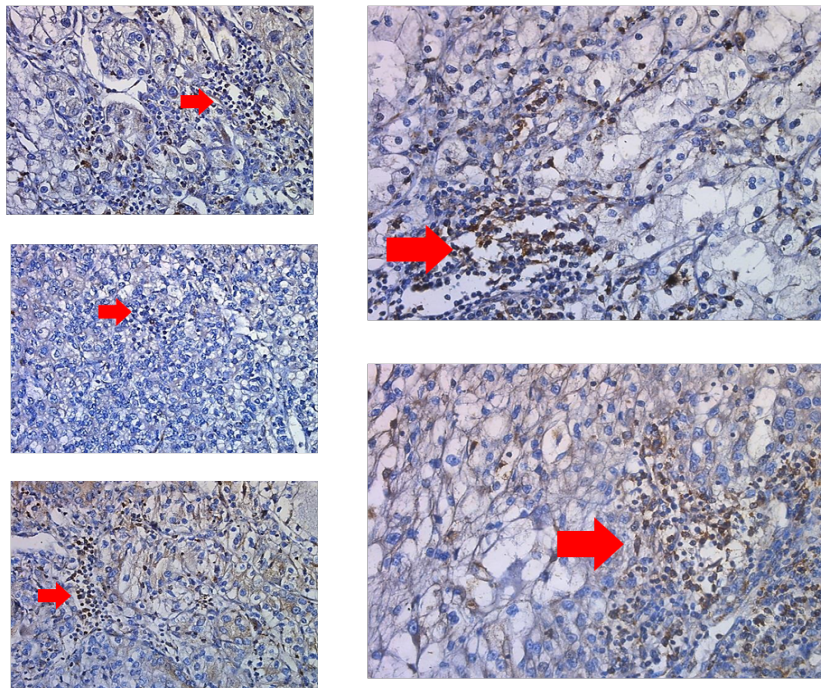


Rysunek 18. Analiza ilości limfocytów T naciekających guza w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC (A). Ilość białka OSMR w limfocytach naciekających nowotwór w tych grupach (B).

Limfocyty T naciekające guz z dużą ilością białka OSMR występowały głównie w skupiskach w różnych częściach guza, nie tylko na obrzeżach ale także w części centralnej guza (**Rys.19**).

OSMR

ccRCC



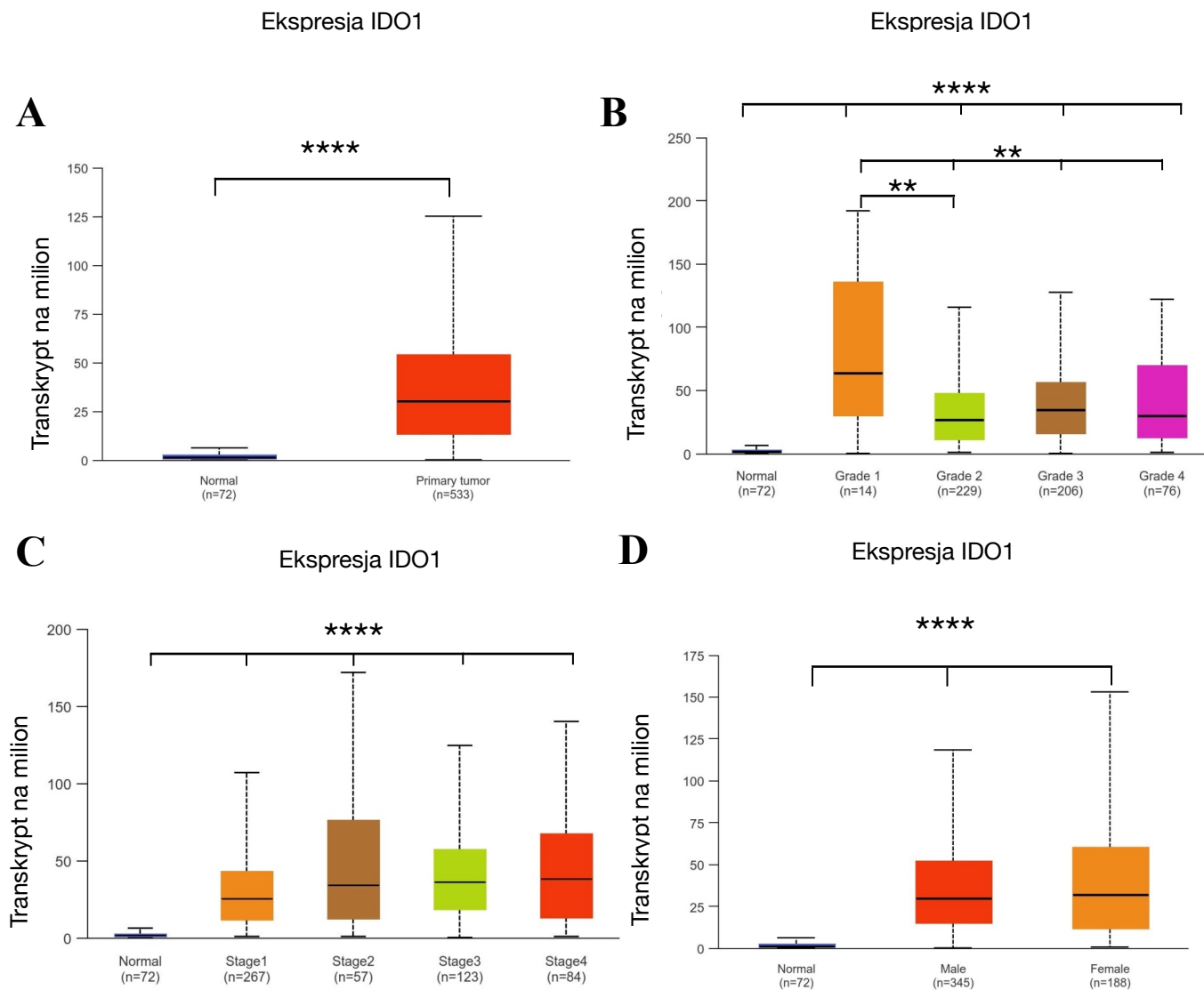
Rysunek 19. Analiza ilości białka OSMR w limfocytach T (powiększenie 40x, 63x). Strzałki wskazują skupiska limfocytów T z pozytywnym barwieniem dla OSMR.

Z uwagi na to, że w aktywnych limfocytach T CD4 nie występuje białko OSMR a jego nadekspresję obserwuje się w limfocytach wyczerpanych, obecność limfocytów T CD4 z pozytywnym barwieniem OSMR we wszystkich grupach badanych może świadczyć o tym, że wyczerpanie limfocytów T następuje już na wczesnych etapach rozwoju nowotworu. Dodatkowo, w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie rozsianą ilość OSMR na limfocytach T CD4 wzrasta.

Ekspresja genu IDO1 i ilość białka IDO1 w próbkach ccRCC

Dioksygenaza 2,3 indoloaminy 1 – IDO1 jest jednym z enzymów odpowiadających za metabolizm tryptofanu. Jej wysoka ekspresja obserwowana jest w wielu typach nowotworów i świadczy o immunosupresyjnym mikrośrodowisku guza. W próbkach ccRCC obserwujemy istotną nadekspresję IDO1 (**Rys. 20A**), co ciekawe najwyższą ilość transkryptyu IDO1 obserwuje się w

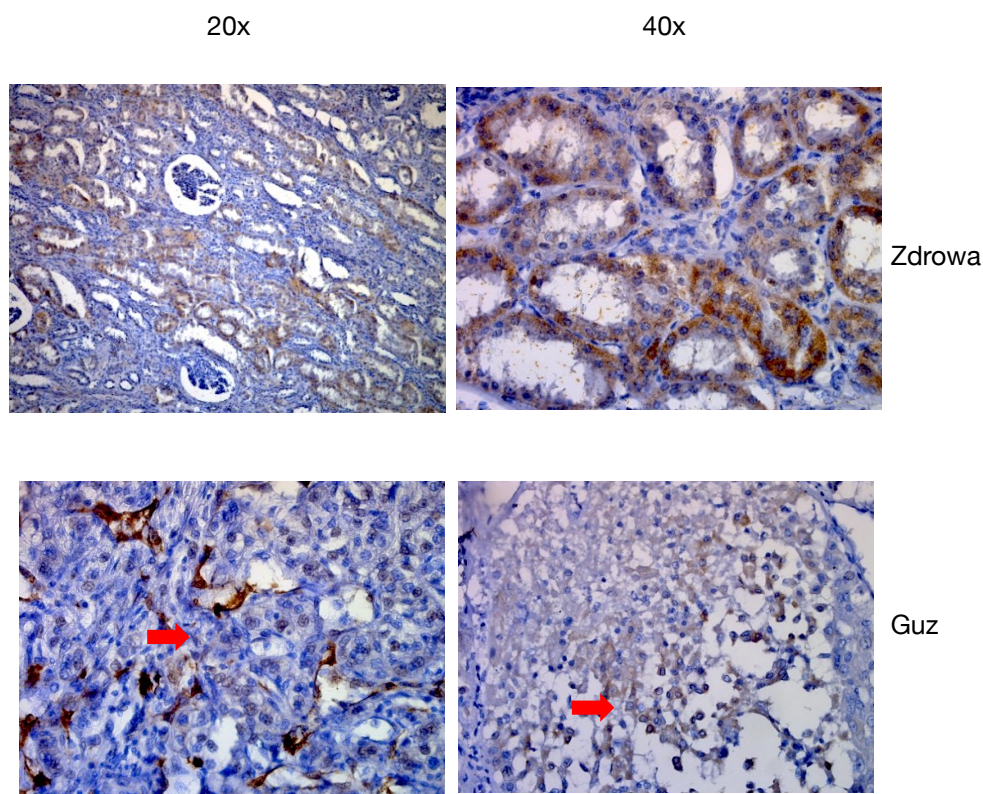
ccRCC o najniższym stopniu złośliwości, co może świadczyć o silnej immunosupresji i ucieczce nowotworu spod kontroli układu odpornościowego (Rys. 20B). Z kolei nadekspresja IDO1 była niezależna od stadium zaawansowania choroby i od płci (Rys. 20C i D).



Rys.20. Ekspresja genu IDO1 w próbkach pierwotnego ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (A), w zależności od stopnia złośliwości G (B), w zależności od stadium zaawansowania (C) oraz w zależności od płci (D).

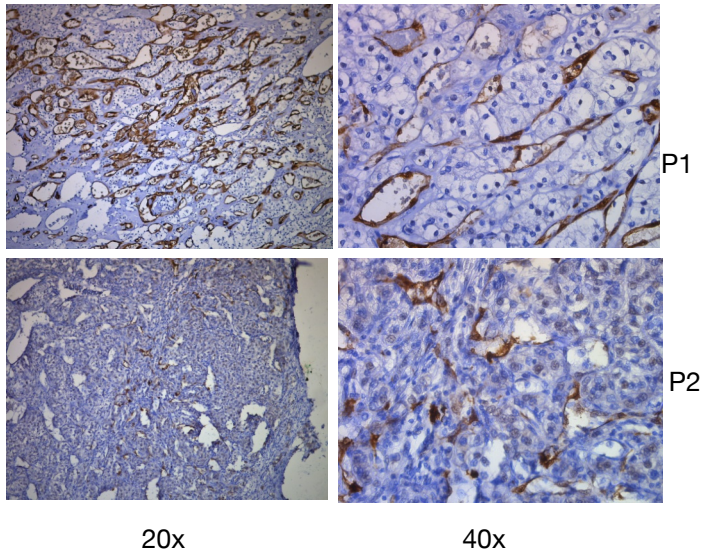
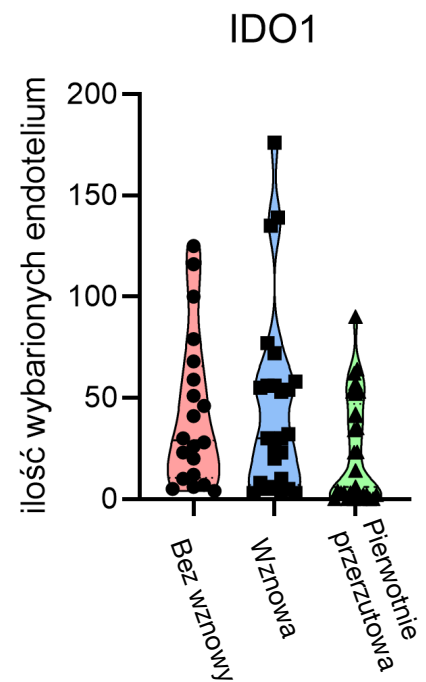
Nadekspresja IDO1 na poziomie mRNA nie korelowała z ilością enzymu IDO1 w komórkach ccRCC. Tylko w pojedynczych komórkach nowotworu obserwowano pozytywne barwienie dla IDO1,

jednakże co ciekawe znacznie wyższą ilość IDO1 obserwowano w tkance zdrowej nerki w jej kanalikach proksymalnych (**Rys. 21**). Może to świadczyć o tym, że enzym ten albo jest wydzielany do mikrośrodowiska guza albo podlega ścisłej kontroli potranslacyjnej.



Rysunek 21. Przykładowe barwienie IHC z użyciem przeciwciał anty-IDO1 w zdrowej tkance nerki i w komórkach nowotworowych ccRCC.

Interesującym wydaje się fakt, że w guzie duża ilość IDO1 jest widoczna w komórkach endotelium naczyń krwionośnych (**Rys. 22A**). Ilość tych IDO1 pozytywnych przestrzeni/naczyń była najmniejsza u pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową (**Rys. 22B**), co może świadczyć o tym, że w dużym guzie dochodzi do hipoksji powodującej ogniska martwicy.

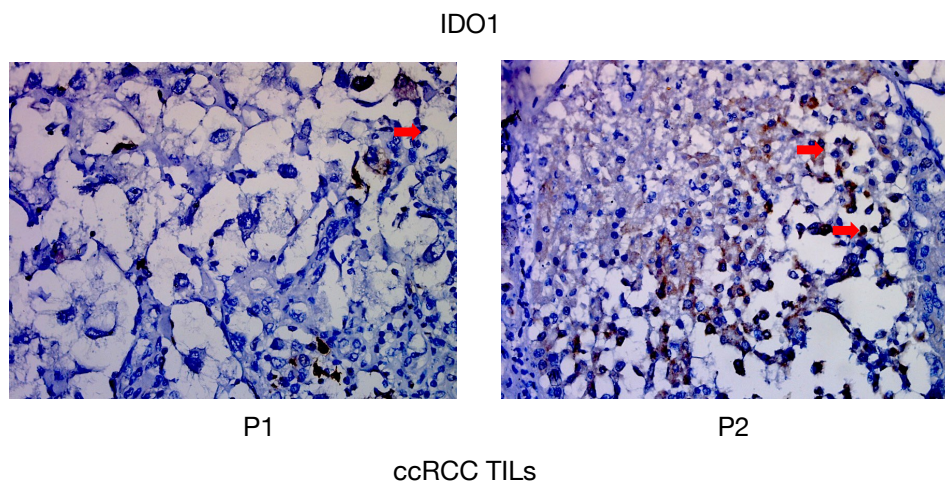
A**B**

Rysunek 22. Ilość IDO1 w pierwotnym guzie ccRCC w endotelium w próbce od pacjenta, u którego nie nastąpiła wznowa (P1) oraz od pacjenta z chorobą pierwotnie przerzutową (P2) (A), ilość wybarwionych przestrzeni/naczyń w guzie ccRCC w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC (B).

Wynik ten, również może świadczyć o tym, że limfocyty T są hamowane i wyłączane już w naczyniach krwionośnych wewnątrz guza.

Ekspresja IDO1 w limfocytach T naciekających nowotwór

Z danych wielkoskalowych transkryptomicznych przeprowadzonych na wyczerpanych limfocytach T CD4 wynika, że charakteryzują się one wysoką ekspresją IDO. Przeprowadzona analiza immunohistochemiczna z użyciem przeciwciał przeciwko IDO1 wykazała, niewielkie barwienie w limfocytach T naciekających nowotwór (**Rys.23**), znacznie niższe niż w komórkach endotelialnych naczyń krwionośnych.



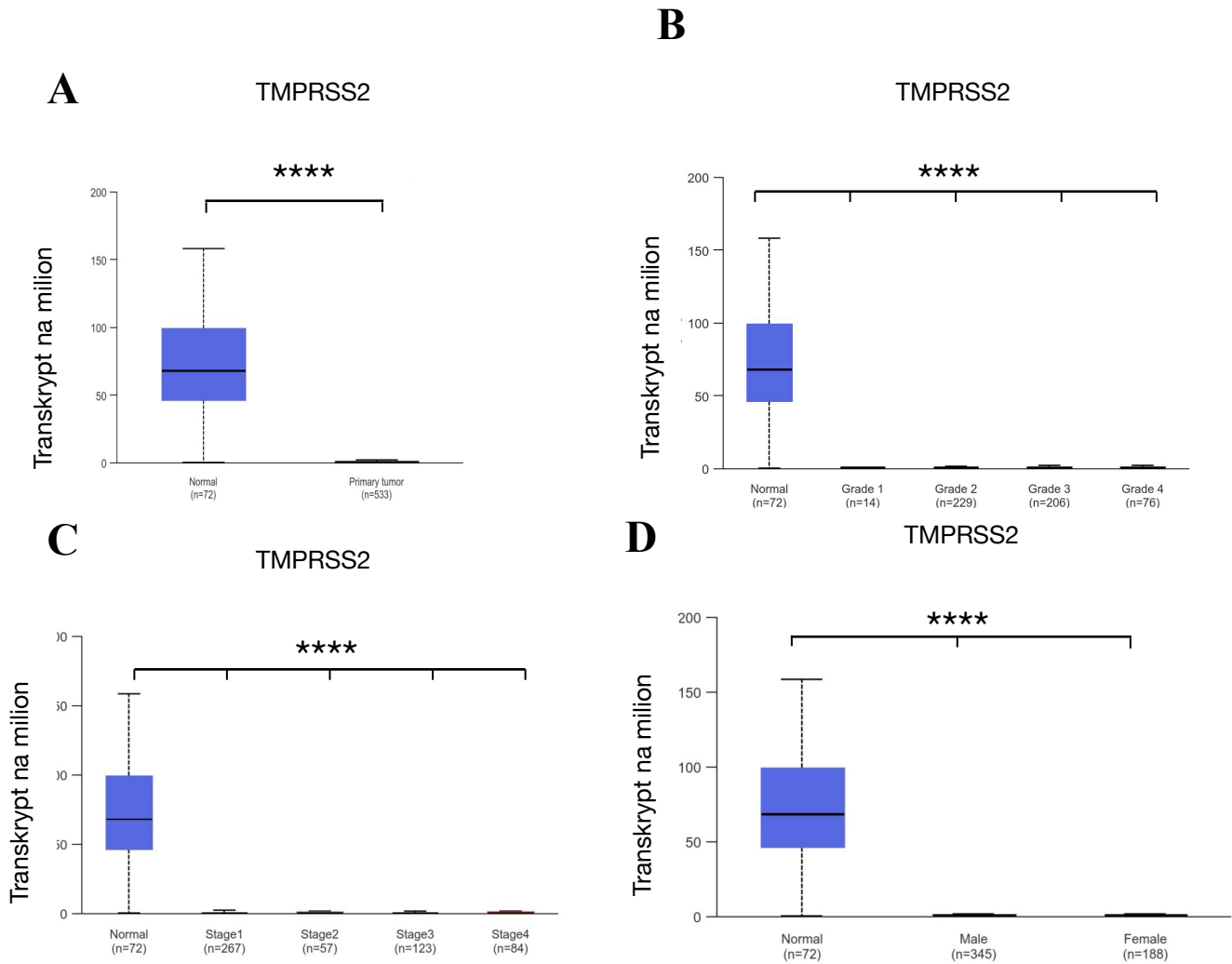
Rysunek 23. Analiza ilości białka IDO1 w limfocytach T naciekających nowotwór w tkance nowotworowej pacjentów z rozpoznaniem ccRCC.

Wynik ten wskazuje na to, że nie tylko w komórkach nowotworowych i endotelium naczyń krwionośnych występuje IDO1 ale również w samych limfocytach T, co zwiększa jeszcze immunosupresyjne mikrośrodowisko guza.

Ekspresja genu TMPRSS2 i ilość białka TMPRSS2 w próbkach ccRCC

Funkcja proteazy TMPRSS2 została dokładnie zbadana w raku prostaty, natomiast w przypadku ccRCC pozostaje obiektem badań. Dane literaturowe wskazują, że na ccRCC choruje dwukrotnie więcej mężczyzn niż kobiet, co sugeruje potencjalny związek z androgenami. W związku z tym

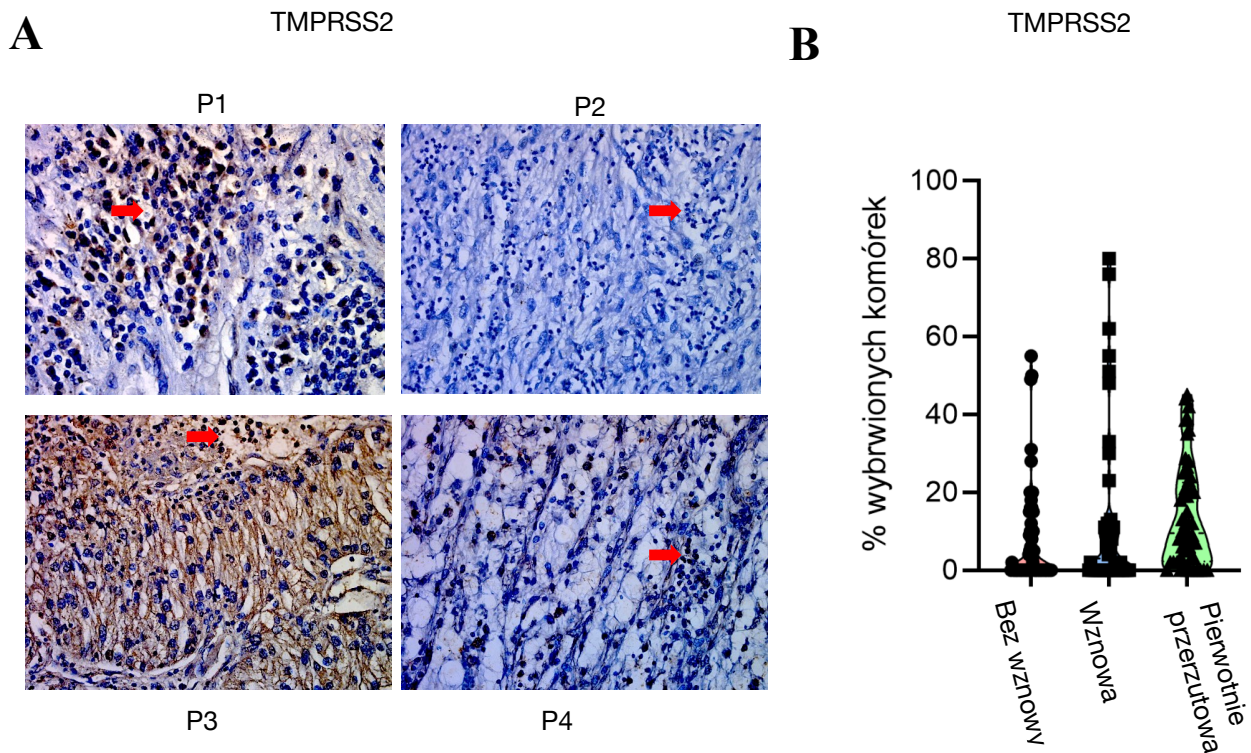
przeprowadziliśmy analizę ekspresji TMPRSS2 w próbkach ccRCC. Zaobserwowano istotne obniżenie ekspresji TMPRSS2 w ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (**Rys.24A**). Co ciekawe, nie zaobserwowano różnic w ekspresji TMPRSS2 w ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej, stadium zaawansowania choroby czy w zależności od płci (**Rys.24 B, C, D**).



Rysunek 24. Ekspresja genu TMPRSS2 w próbkach pierwotnego ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (A), w zależności od stopnia złośliwości G (B), w zależności od stadium zaawansowania (C) oraz w zależności od płci (D).

Znaczne zmniejszenie transkryptów TMPRSS2 w guzie ccRCC, w porównaniu z kanapką zdrową było zaskoczeniem, zwłaszcza, że analiza immunohistochemiczna przeprowadzona na próbkach

ccRCC wykazała, że w komórkach nowotworowych ilość TMPRSS2 była podobna lub nieco zmniejszona w porównaniu z tkanką zdrową (**Rys. 25A**). Dodatkowo, analiza statystyczna wykazała brak różnic w ilości wybarwionych komórek nowotworowych pomiędzy badanymi grupami pacjentów (**Rys. 25B**).



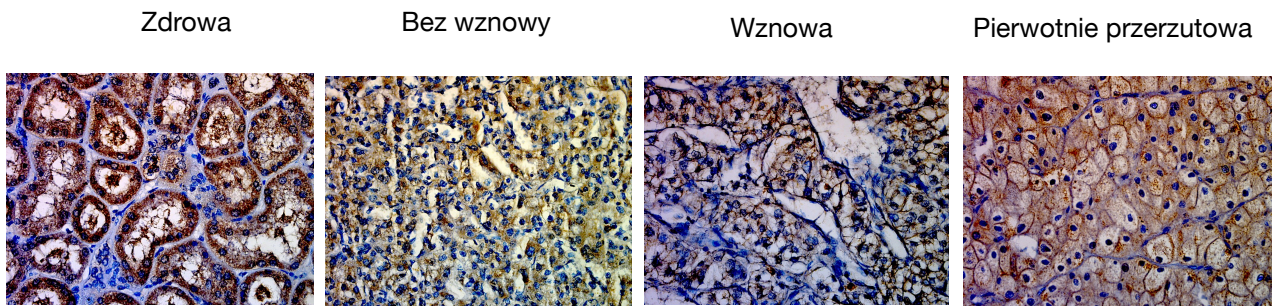
Rysunek 25. Ilość TMPRSS2 w pierwotnym guzie ccRCC w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC - przykładowe barwienie (A), analiza statystyczna ilości wybarwionych komórek (B).

Ekspresja TMPRSS2 w limfocytach T naciekających nowotwór

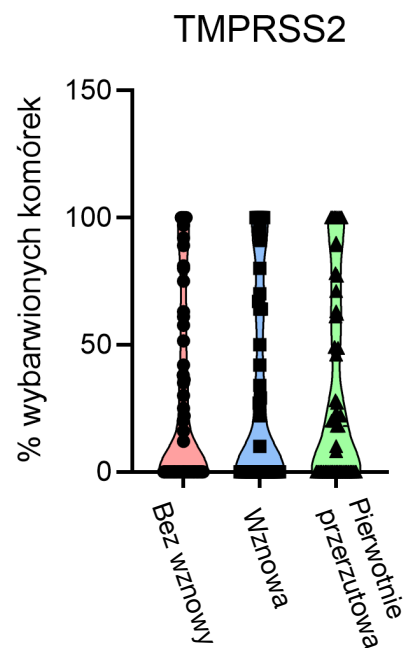
Z danych transkryptomycznych przeprowadzonych w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej NIO-PIB, na wyczerpanych limfocytach T CD4 wynika, że charakteryzują się one wysoką ekspresją TMPRSS2. Przeprowadzona analiza immunohistochemiczna z użyciem przeciwciał

przeciwko TMPRSS2 wykazała, silne barwienie w limfocytach T naciekających nowotwór (**Rys.26A**), co ciekawe ilość wybarwionych komórek była największa w grupie pacjentów z pierwotnie rozsiałym ccRCC (**Rys.26B**). Wynik ten może wskazywać na udział proteazy TMPRSS2 w wyczerpaniu limfocytów T naciekających nowotwór.

A



B



Rysunek 26. Ilość TMPRSS2 w limfocytach T naciekających nowotwór ccRCC w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsiałym ccRCC, przykładowe barwienie, strzałki wskazują wybarwione pozytywnie limfocyty T (A), analiza statystyczna ilości wybarwionych komórek (B).

Odniesienie uzyskanych danych molekularnych do parametrów klinicznych.

W przeprowadzonej analizie ocenie poddano następujące parametry: **białko OSMR (w komórkach nowotworowych i na limfocytach T),IDO-1 oraz białko TMPRSS2 w komórkach nowotworowych, (Tabela 8).**

Tabela 8. Zestawienie ekspresji badanych białek u pacjentów z ccRCC.

Ekspresja białka	N	%
OSMR		
Obecna	86	53,4
Nieobecna	75	46,6
OSMR na limfocytach T		
Obecna	128	79,5
Nieobecna	33	20,5
TMPRSS2		
Obecna	73	45,3
Nieobecna	88	54,7
IDO-1		
Obecna	8	5
Nieobecna	153	95

Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w procentowym udziale ekspresji OSMR między badanymi grupami. Mediany procentowego udziału OSMR w grupie pacjentów, z chorobą ograniczoną do narządu oraz w grupie, w której stwierdzono wznowę nowotworową wynosiły 0 co wskazuje na dominację braku ekspresji tego białka w tych grupach. Z kolei mediana procentowego udziału OSMR w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową wynosiła 31,8 ($p < 0,001$). Ponadto, odnotowano także istotne statystycznie różnice w ekspresji OSMR w HScore między

badanymi grupami. Mediany udziału OSMR HScore w grupie pacjentów, z chorobą ograniczoną do narządu oraz w grupie, w której stwierdzono wznowę nowotworową wynosiły 0 co wskazuje na dominację braku ekspresji tej zmiennej. Natomiast mediana udziału OSMR HScore w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową wynosiła 33,5 ($p < 0,001$) (Tabela 9).

Tabela 9. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCC każdej z badanych grup pacjentów.

Grupa	Zmienna	Mediana	Q1	Q3	p-value
Choroba ograniczona do narządu		0	0	40	
Choroba pierwotnie przerzutową	OSMR %	31,8	15	88,1	
Wznowa		0	0	29,8	<0,001
Choroba ograniczona do narządu		0	0	56	
Choroba pierwotnie przerzutowa	OSMR HScore	33,5	17,5	119	
Wznowa		0	0	39,8	<0,001

Mediana dla choroby pierwotnie przerzutowej była największa i wynosiła 26, natomiast dla grupy z chorobą ograniczoną do narządu była najmniejsza i wynosiła 17. Nie zaobserwowano jednak istotnie statystycznych różnic w ekspresji OSMR na limfocytach T pomiędzy badanymi grupami ($p > 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Udział ekspresji OSMR na limfocytach T w każdej z badanych grup.

Grupa	Zmienna	Mediana	Q1	Q3	p-value
Choroba ograniczona do narządu		17	3	47	
Choroba pierwotnie przerzutowa	OSMR limfocyty	26	15,5	44,7	
Wznowa		19	1	49	0,210

Mediana udziału procentowego ilości białka Tmprss2 w grupach pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu oraz z obecną wznową nowotworową wynosiła 0, zaś w grupie pacjentów z

chorobą pierwotnie przerzutową mediana ta była o 18 wyższa. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie ($p>0,05$). Mediana ekspresji TMPRSS2 HScore w grupach pacjentów z brakiem wznowy i z obecną wznową nowotworową wynosiła 0, zaś w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową mediana ta była o 19 wyższa. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie ($p>0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11. Udział ilości proteazy TMPRSS2 w każdej z badanych grup.

Grupa	Zmienna	Mediana	Q1	Q3	p-value
Choroba ograniczona do narządu		0	0	41,1	
Choroba pierwotnie przerzutowa	TMPRSS2 %	18	0	62,2	
Wznowa		0	0	53,5	0,393
Guz pierwotny		0	0	55	
Choroba pierwotnie przerzutowa	TMPRSS2 Hscore	19	0	62,2	
Wznowa		0	0	53,5	0,47

Przeprowadzona analiza wykazała, że mediana udziału procentowego ekspresji IDO-1 w trzech badanych grupach wynosiła 0. Różnice te nie były istotne statystycznie ($p>0,05$). Podobnie, mediana ekspresji IDO1 HScore w trzech badanych grupach również wynosiła 0. Różnice te nie były istotne statystycznie ($p>0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12. Udział ilości białka IDO-1 w komórkach nowotworowych ccRCC w każdej z badanych grup.

Grupa	Zmienna	median	Q1	Q3	p-value
Choroba ograniczona do narządu		0	0	0	
Choroba pierwotnie przerzutowa	IDO-1 %	0	0	0,075	
Wznowa		0	0	0	0,241
Choroba ograniczona do narządu		0	0	0	
Choroba pierwotnieprzerzutowa	IDO-1 HScore	0	0	0	
Wznowa		0	0	0	0,361

Mediany procentowego udziału ekspresji OSMR w stopniu złośliwości G1 i G2 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego białka. Z kolei w stopniu G4 mediana była wyższa i wynosiła 12,5. Natomiast w stopniu G3 mediana była najwyższa i wynosiła 21,6. Mediany HScore OSMR cytoplazmatycznego w stopniu złośliwości G1 i G2 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tej zmiennej. Z kolei w stopniu G4 była wyższa i wynosiła 19,5. Z kolei, w stopniu G3 mediana była najwyższa i wynosiła 25,6 (**Tabela 13**).

Tabela 13. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	OSMR %	0	0	33,6
G2		0	0	16,5
G3		21,6	0	36,3
G4		12,5	2,5	18
G1	OSMR HScore	0	0	43
G2		0	0	16,5
G3		25,6	0	39,8
G4		19,5	4,75	27,5

Mediana procentowego udziału ekspresji OSMR na limfocytach T w stopniu złośliwości G4 była największa i wynosiła 38,5. Mediany w stopniach G2 i G3 wynosiły odpowiednio: 25,4 oraz 16. Dla stopnia G1 była ona najmniejsza i wynosiła 7 (**Tabela 14**).

Tabela 14. Udział ilości białka OSMR na limfocytach T w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	OSMR limfocyty T	7	0	31
G2		25,4	0,75	59,4
G3		16	5	29
G4		38,5	5	76,5

Mediany procentowego udziału ekspresji TMPRSS2 w stopniach G1, G2 i G4 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego białka. Natomiast w stopniu G3 mediana była najwyższa i wynosiła 27,5. Z kolei analiza H-score dla TMPRSS2 wykazała, że mediana w stopniach G1, G2 i G4 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tej zmiennej w tych stopniach złośliwości. Natomiast w stopniu G3 mediana była najwyższa i wynosiła 27,5 (**Tabela 15**).

Tabela 15. Udział ilości proteazy TMPRSS2 w komórkach nowotworowych ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	TMPRSS2 %	0	0	63,5
G2		0	0	43
G3		27,5	0	75,2
G4		0	0	0
G1	TMPRSS2 HScore	0	0	63,5
G2		0	0	43
G3		27,5	0	77,5
G4		0	0	0

Mediany procentowego udziału i H-score ekspresji IDO1 w każdym stopniu złośliwości Grade wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego białka (**Tabela 16**).

Tabela 16. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G2	IDO-1 %	0	0	0
G3		0	0	0
G4		0	0	0
G2	IDO-1HScore	0	0	0
G3		0	0	0
G4		0	0	0

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między ekspresją w/w czynników a stopniem złośliwości histologicznej Grade ($p > 0,05$) w grupie pacjentów z wznową nowotworową (**Tabela 17**).

Tabela 17. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

Korelacja Kendall'a			
Grade	Zmienna	Cor	p-value
G2-G4	OSMR %	0,140	0,268
	OSMR HScore	0,140	0,254
	OSMR (limfocyty T) %	0,089	0,447
	TMPRS2 %	-0,005	0,965
	TMPRSS2 HScore	0,019	0,877
	IDO-1 %	-	1
	IDO-1 HScore	-	1

Mediany procentowego udziału ekspresji OSMR cytoplazmatycznego w stadiach T1, T2 i Tx wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika w tych stadiach. W stadium T3 mediana wynosiła 7,5, a w stadium T4 była najwyższa i wynosiła 17,5, czyli o 10 jednostek więcej niż w stadium T3. Mediany HScore OSMR cytoplazmatycznego w stadiach T1, T2 i Tx wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika w tych stadiach. W stadium T3 mediana wynosiła 9,5, zaś w stadium T4 była o 12,5 jednostek wyższa wynosząc 22 (**Tabela 18**).

Tabela 18. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCC w zależności od cechy T w skali TNM w grupie pacjentów ze wznową nowotworową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	OSMR %	0	0	26,8
T2		0	0	19
T3		7,5	0	32,6
T4		17,5	8,75	26,2
Tx		0	0	0
T1	OSMR HScore	0	0	41,5
T2		0	0	24
T3		9,5	0	37,3
T4		22	11	33
Tx		0	0	0

Mediana procentowego udziału ekspresji OSMR na limfocytach T w stadium T4 była najwyższa i wynosiła ona 77, natomiast dla stadium T3 wynosiła 16. W stadium T1 oraz T2 mediany wynosiły odpowiednio 19 oraz 26 (**Tabela 19**).

Tabela 19. Udział ilości białka OSMR na limfocytach T w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	OSMR (limfocyty T) %	19	5	49
T2		26	2,5	28
T3		16	0	57,6
T4		77	74,5	79,5

Mediany procentowego udziału ekspresji TMPRSS2 z H-score były tożsame. Mediany procentowego udziału i HScore ekspresji TMPRSS2 w stadium T2 i T3 wynosiła 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika w tych stadiach. W stadium T1 mediana wynosiła 18,5, a w stadium Tx była o 23,5 jednostek wyższa wynosząc 42. W stadium T4 mediana ekspresji TMPRSS2 była najwyższa i wynosiła 50 (**Tabela 20**).

Tabela 20. Udział ilości proteazy TMPRSS2 w komórkach ccRCC w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1		18,5	0	70,2
T2		0	0	0
T3	TMPRSS2 %	0	0	25
T4		50	25	75
Tx		42	42	42
T1		18,5	0	70,2
T2		0	0	0
T3	TMPRSS2 HScore	0	0	25
T4		50	25	75
Tx		42	42	42

Mediany procentowego udziału ekspresji IDO1 i HScore w każdym stadium opisywanym cechą T skali TNM wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika (**Tabela 21**).

Tabela 21. Udział ilości białka IDO-1 w zależności od cechy T w skali TNM w grupie pacjentów ze wznową nowotworową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1		0	0	0
T3	IDO-1 %	0	0	0
T4		0	0	0
T1		0	0	0
T3	IDO-1 HScore	0	0	0
T4		0	0	0

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między w/w zmiennymi a cechą T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową ($p>0,05$) (Tabela 22).

Tabela 22. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową.

Korelacja Kendall'a			
T	Zmienna	Cor	p-value
	OSMR %	0,270	0,019
	OSMR HScore	0,270	0,015
T1-Tx	OSMR (limfocyty T) %	-0,043	0,694
	TMPRSS2 %	-0,087	0,457
	TMPRSS2 HScore	-0,082	0,479
	IDO-1%	0,060	0,728
	IDO-1 HScore	0,075	0,667

Mediana procentowego udziału ekspresji OSMR była najwyższa w stopniu G4 wynosząc 80. W stopniu G3 mediana wynosiła 28,2, w stopniu G2- 19,6, zaś w stopniu G1- 15. Mediana ekspresji OSMR w HScore była najwyższa w stopniu G4 wynosząc 113. W stopniu G3 i G1 mediany były podobne i wynosiły odpowiednio 30,2 i 30. W stopniu G2 mediana wynosiła 28,6 (Tabela 23).

Tabela 23. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCCw zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	OSMR %	15	7,5	57,5
G2		19,6	0	73,7
G3		28,2	16,2	39,2
G4		80	32	100
G1	OSMR HScore	30	15	109
G2		28,6	0	87,7
G3		30,2	16,2	63
G4		113	33,5	200

Mediana procentowej ilości OSMR na limfocytach T była najwyższa w stopniu G2 i wynosiła 37.

Najniższą medianę obserwowano w stopniu G1 i wynosiła ona 20. Mediany w stopniu G3 oraz G4 wynosiły odpowiednio 23,5 oraz 22 (**Tabela 24**).

Tabela 24. Udział ilości białka OSMR na limfocytach T w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	OSMR (limfocyty T) %	20	12	27,5
G2		37	24,4	53,8
G3		23,5	11	41,6
G4		22	17,8	36

Mediany procentowego udziału ekspresji TMPRS2 oraz HScore w stopniach G2 i G4 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika w stopniach G2 i G4. Mediana procentowego udziału ekspresji TMPRS2 oraz HScore w stopniu G3 była najwyższa wynosząc 28, zaś w stopniu 22 była o 6 jednostek niższa i wynosiła 22 (**Tabela 25**).

Tabela 25. Udział ilości proteazy TMPRSS2 w komórkach nowotworowych ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	TMPRSS2 %	22	11	35,5
G2		0	0	65,2
G3		28	9	80
G4		0	0	20
G1	TMPRSS2 HScore	22	11	40,5
G2		0	0	68,2
G3		28	13	82,5
G4		0	0	20

Mediany procentowego udziału ekspresji IDO1 oraz HScore w każdym stopniu złośliwości histologicznej Grade wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika (**Tabela 26**).

Tabela 26. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	IDO-1 %	0	0	0
G2		0	0	0
G3		0	0	1,38
G4		0	0	0,075
G1	IDO-1 HScore	0	0	0
G2		0	0	0
G3		0	0	0,625
G4		0	0	0,075

Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w procentowym udziale ekspresji limfocytów CD8 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ($p=0,006$). Ponadto, odnotowano także istotne statystycznie różnice w procentowym udziale ekspresji OSMR jądrowego w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ($p=0,049$). Dodatkowo, istotne statystycznie różnice były także widoczne w procentowym udziale ekspresji OSMR cytoplazmatycznego w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ($p=0,019$). Istotne statystycznie były również różnice w HScore OSMR cytoplazmatycznym w zależności od stopnia Grade ($p=0,015$) (**Tabela 27**).

Tabela 27. Korelacja Kendalla zmiennych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w skali Grade w grupie pacjentów z chorobą przerzutową.

Korelacja Kendall'a			
Grade	Zmienna	cor	p-value
G1-G4	CD4 %	0,140	0,211
	CD8 %	0,300	0,006
	OSMR jądrowy %	-0,250	0,049
	OSMR jądrowy HScore	-0,250	0,053
	OSMR cytoplazmatyczny %	0,270	0,019
	OSMR cytoplazmatyczny HScore	0,270	0,015
	TMPRS2 %	-0,087	0,457
	TMPRS2 HScore	-0,082	0,479
	IDO1 %	0,060	0,728
	IDO1 HScore	0,075	0,667

Mediana procentowego udziału ekspresji OSMR cytoplazmatycznego była najwyższa w stadium T2 i wynosiła 100. W stadium T3 mediana wynosiła 32. W stadium T1 obserwowano medianę na poziomie 25, a niewiele niższa była w stadium T4, gdzie wynosiła 23,3. Mediana HScore ekspresji

OSMR cytoplazmatycznego była najwyższa w stadium T2, gdzie wynosiła 200. W stadium T3 wynosiła 60. Najniższe mediany obserwowano w stadium T4 i T1, wynoszące odpowiednio 30,3 i 29 (**Tabela 28**).

Tabela 28. Udział ekspresji OSMR cytoplazmatycznego w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	OSMR %	25	5	41,1
T2		100	61,8	100
T3		32	15	90,5
T4		23,3	23,3	23,3
T1	OSMR HScore	29	5	42,6
T2		200	117	207
T3		60	20	139
T4		30,3	30,3	30,3

Mediana procentowego udziału ekspresji OSMR na limfocytach była największa w stadium T1 i wynosiła 46. Najniższą medianę obserwowano w stadium T3 i wynosiła ona 21. Dla stadium T2 oraz T4 mediany wyniosły odpowiednio 22 oraz 37 (**Tabela 29**).

Tabela 29. Udział ekspresji OSMR na limfocytach T w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	OSMR (limfocyty T) %	46	22	60,5
T2		22	12,5	29,6
T3		21	14,5	35,4
T4		37	37	37

Mediana procentowego udziału ekspresji TMPRSS2 była najwyższa w stadium T2, gdzie wynosiła 89. Na drugim miejscu była mediana w stadium T4, gdzie wynosiła 28. Najniższe mediany

obserwowano w stadiach T1 i T3, wynoszące odpowiednio 8 i 5. Mediana HScore ekspresji TMPRSS2 była najwyższa w stadium T2, gdzie wynosiła 94. Na drugim miejscu była mediana w stadium T4, gdzie wynosiła 28. Najniższe mediany obserwowano w stadiach T3 i T1 wynoszące odpowiednio 9 i 8 (**Tabela 30**).

Tabela 30. Udział ekspresji TMPRSS2 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	TMPRSS2 %	8	0	44
T2		89	54,5	94,5
T3		5	0	58,8
T4		28	28	28
T1	TMPRSS2 HScore	8	0	44
T2		94	57	97
T3		9	0	61,2
T4		28	28	28

Mediany procentowego udziału ekspresji IDO1 i HScore w stadiach T1, T2 i T3 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji danego czynnika w tych stadiach (**Tabela 31**).

Tabela 31. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	IDO-1 %	0	0	0
T2		0	0	0
T3		0	0	2,12
T1	IDO-1 HScore	0	0	0
T2		0	0	0
T3		0	0	1,95

Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w procentowym udziale ekspresji IDO-1 w zależności od stadium T1, T2 i T3 skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową (p=0,031). Różnice HScore IDO-1 w zależności od stadium T1, T2 i T3 są na granicy istotności statystycznej (p=0,05). Innych różnic istotnie statystycznych w tej grupie nie zaobserwowano (**Tabela 32**).

Tabela 32. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.

Korelacja Kendalla			
T	Zmienna	cor	p-value
T1-T4	OSMR %	0,098	0,397
	OSMR HScore	0,130	0,253
	OSMR (limfocyty t) %	-0,190	0,098
	TMPRSS2 %	-0,002	0,985
	TMPRSS2 HScore	-0,018	0,878
T1-T3	IDO-1 %	0,380	0,031
	IDO-1 HScore	0,350	0,050

Mediany procentowego udziału ekspresji OSMR cytoplazmatycznego i HScore w stopniach G1, G2 i G4 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika w tych stopniach złośliwości. Mediana procentowego udziału ekspresji OSMR cytoplazmatycznego i HScore w stopniu G3 wynosiły kolejno 14,1 oraz 18,2 (**Tabela 33**).

Tabela 33. Udział ilości białka OSMR w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	OSMR %	0	0	18,8
G2		0	0	49,5
G3		14,1	0	40
G4		0	0	0
G1	OSMR HScore	0	0	18,8
G2		0	0	68
G3		18,2	0	40
G4		0	0	0

Mediana procentowego udziału OSMR na limfocytach była największa dla stopnia G3 i wynosiła 26. Najniższa mediana była obserwowana dla stopnia G4 i wynosiła ona 2. Mediany dla stopnia G1 oraz G2 wynosiły odpowiednio 14,5 oraz 18 (**Tabela 34**).

Tabela 34. Udział ilości białka OSMR na limfocytach T w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	OSMR (limfocyty T) %	14,5	5,5	23,5
G2		18	4	47,5
G3		26	0	48
G4		2	2	2

Mediany procentowego udziału ekspresji TMPRSS2 i HScore we wszystkich stopniach złośliwości Grade wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika (**Tabela 35**).

Tabela 35. Udział ekspresji TMPRSS2 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G1	TMPRSS2 %	0	0	18,8
G2		0	0	58,5
G3		0	0	36,3
G4		0	0	0
G1	TMPRSS2 HScore	0	0	18,8
G2		0	0	62
G3		0	0	51,2
G4		0	0	0

Mediany procentowego udziału poziomu ekspresji IDO1 i HScore w stopniu G2 i G3 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika w tych stopniach. Mediany procentowego udziału poziomu ekspresji IDO-1 i HScore w stopniu G4 wynosiły odpowiednio 1 i 3 (**Tabela 36**).

Tabela 36. Udział ekspresji IDO1 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

Grade	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
G2	IDO-1 %	0	0	0
G3		0	0	0
G4		1	1	1
G2	IDO-1 HScore	0	0	0
G3		0	0	0
G4		3	3	3

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji w/w czynników w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu (**Tabela 37**).

Tabela 37. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie chorych z chorobą ograniczoną do narządu.

Kendall correlation			
Grade	Zmienna	cor	p-value
G1-G4	OSMR %	0,073	0,541
	OSMR HScore	0,095	0,420
	OSMR (limfocyty T) %	0,01	0,210
	TMPRSS2 %	0,010	0,929
	TMPRSS2 HScore	0,008	0,945
G2-G4	IDO-1 %	0,270	0,246
	IDO-1 HScore	0,270	0,246

Mediany udziału procentowego ekspresji OSMR w stadium T3 była najwyższa i wynosiła 53. W stadium T2 mediana wynosiła 14,1, zaś w T1 wynosiła 0. Mediany HScore OSMR w stadium T3 była najwyższa i wynosiła 68. W stadium T2 wynosiła 18,2, zaś w T1 wynosiła 0 (**Tabela 38**).

Tabela 38. Udział ekspresji OSMR w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	OSMR %	0	0	35,2
T2		14,1	0	68,5
T3		53	41,5	64,5
T1	OSMR HScore	0	0	39
T2		18,2	15	68,5
T3		68	64	72

Mediana procentowego udziału ekspresji OSMR na limfocytach była wyższa w stadium T2 i wynosiła 48. Dla stadium T1 mediana wyniosła 14 (**Tabela 39**).

Tabela 39. Udział ekspresji OSMR na limfocytach w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	OSMR (limfocyty T) %	14	2,25	33,2
T2		48	10	49

Mediana udziału procentowego ekspresji TMPRSS2 w stadium T2 była najwyższa i wynosiła 35. W stadium T3 wynosiła 19, zaś w stadium T1 wynosiła 0. Tożsame wyniki prezentuje HScore TMPRSS2 (Tabela 40).

Tabela 40. Udział ekspresji TMPRSS2 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	TMPRSS2 %	0	0	47,8
T2		35	0	42,1
T3		19	17,5	20,5
T1	TMPRSS2 HScore	0	0	58,6
T2		35	0	51,2
T3		19	17,5	20,5

Mediany procentowego udziału ekspresji IDO-1 i HScore w stadiach T1, T2 i T3 wynosiły 0 wskazując na dominację braku ekspresji tego czynnika w tych stadiach (Tabela 41).

Tabela 41. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

T	Zmienna	Mediana	Q1	Q3
T1	IDO-1 %	0	0	0
T2		0	0	0
T3		0	0	0
T1	IDO-1 HScore	0	0	0
T2		0	0	0
T3		0	0	0

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między w/w czynnikami w zależności od stadium złośliwości T1-T3 skali TNM w grupie pacjentów bez wznowy nowotworowej (**Tabela 42**).

Tabela 42. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.

Korelacja Kendall'a			
T	Zmienna	cor	p-value
	OSMR %	0,180	0,140
	OSMR HScore	0,230	0,052
	TMPRSS2 %	0,100	0,401
	TMPRSS2 HScore	0,110	0,344
	IDO- 1 %	-0,150	0,517
	IDO -1 HScore	-0,150	0,517
T1-T2	OSMR (limfocyty T) %	0,010	0,927

XIII. Dyskusja

Pomimo faktu, że jasnokomórkowy rak nerki to nowotwór o częściowo poznanych zaburzeniach molekularnych, które odgrywają istotną rolę w jego patogenezie, szczegółowa charakterystyka molekularna tego nowotworu wciąż wymaga dalszych badań. Nieustający postęp w biologii molekularnej oraz narzędziach diagnostycznych pozwolił na lepsze zrozumienie podstaw patogenezy ccRCC i opracowaniu terapii celowanych, które u części chorych, zwłaszcza w stadium choroby przerzutowej, mogą wpływać na poprawę rokowania. Niemniej jednak, pomimo rozwoju, zarówno na poziomie nauk podstawowych jak i klinicznych, rodzaj zmian molekularnych wpływających na wystąpienie jasnokomórkowego raka nerki wciąż wymaga głębszej analizy. Ograniczona odpowiedź na radioterapię oraz chemioterapię, a także niewielka skuteczność stosowanej obecnie immunoterapii skłaniają zarówno naukowców jak i klinicystów do nieustającego zgłębiania wiedzy dotyczącej ccRCC. Niezbędne podkreślenia wydaje się być, że obecnie stosowana immunoterapia w zaawansowanej chorobie przerzutowej daje chorym niewielkie nadzieje. Tym samym, konieczność analizy zaburzeń molekularnych w ccRCC oraz ich korelacji z układem immunologicznym celem opracowania nowych schematów immunoterapeutycznych o wyższej skuteczności, była głównym motywem niniejszej pracy doktorskiej. Co więcej, identyfikacja zaburzeń molekularnych w jasnokomórkowym raku nerki może być przydatna nie tylko w planowaniu leczenia celowanego, ale także w indywidualizacji oceny rokowania czy markerów nowotworowych w codziennej praktyce klinicznej.

Jasnokomórkowy rak nerki to nowotwór o wysokiej immunogenności z obfitym naciekiem limfocytarnym w swoim mikrośrodowisku. W przypadku jasnokomórkowego raka nerki naciek limfocytarny składa się przede wszystkim z limfocytów T CD4+, których jest około dwa razy więcej w porównaniu do limfocytów CD8+, a duży naciek limfocytów T CD8+ koreluje z gorszym rokowaniem (Łuba i in. dane niepublikowane) [169]. Podobne wyniki uzyskano w badaniu przeprowadzonym na komórkach NSCLC, gdzie odsetek limfocytów T CD8+ również wykazywał

związek z progresją choroby i największe wartości osiągał w zaawansowanej chorobie przerzutowej [170]. Na uwagę zasługuje również fakt, że według dostępnych danych, obfity naciek limfocytarny w mikrośrodowisku ccRCC składający się z limfocytów T CD8+ koreluje z niekorzystnym rokowaniem chorych [172]. Stwierdzenie to wyraźnie kontrastuje z wynikami uzyskanymi podczas analizy nacieku TILs w większości innych nowotworów, takich jak na przykład rak jelita grubego, rak piersi czy czerniak, gdzie wysoki odsetek limfocytów T wiązał się z dobrą odpowiedzią na immunoterapię i tym samym pomyślnym rokowaniem [173-175]. Wysoka immunogenność nowotworu sprawia, że jasnokomórkowy rak nerki wydaje się być odpowiednim „kandydatem” dla zastosowania immunoterapii. Niemniej jednak, w ccRCC mamy do czynienia z przewagą limfocytów pomocniczych (CD4+) nad limfocytami efektorowymi (CD8+), a to ten rodzaj limfocytów jest przede wszystkim odpowiedzialny za niszczenie komórek nowotworowych. Co więcej, limfocyty T CD4+ obecne w mikrośrodowisku guza wydają się być „uśpione” i nie pełnią swojej funkcji. Badania nad TILs prowadzone w ciągu ostatnich lat skupiają się głównie na limfocytach T CD8+ ze względu na ich zdolność do bezpośredniego rozpoznawania i zabijania komórek nowotworowych. Należy jednak dodać, że limfocyty T CD4+ również wpływają na niszczenie nowotworu w takich mechanizmach jak destrukcja naczyń krwionośnych guza, pobudzanie aktywności makrofagów, czy szeroko rozumiane uwrażliwianie komórek układu odpornościowego na antygeny komórek nowotworowych [176]. Limfocyty T CD4+ mogą także wykazywać bezpośrednie działanie cytotoksyczne [176, 177]. Obecnie naukowcy wiążą duże nadzieje z wykorzystaniem uczulonych antygenami komórek nowotworowych limfocytów T CD4+ i CD8+ w warunkach klinicznych [176]. Ponadto, dane z najnowszych publikacji wskazują, że zarówno na poziomie badań przedklinicznych jak i klinicznych udało się zidentyfikować limfocyty T CD4+ o właściwościach cytotoksycznych (CD4 CTLs), które są zdolne do bezpośredniego niszczenia komórek nowotworowych w mechanizmie MHC II zależnym jak i z wykorzystaniem ścieżki receptorowej TRAIL-TRAIL [178]. To czy CD4 CTLs uczestniczą w odpowiedzi układu

odpornościowego na antygeny komórek nowotworowych w ccRCC wymaga dalszych badań. Obecnie wydaje się jednak, że jesteśmy dopiero na początku drogi szczegółowego poznania mechanizmów w jakich cytotoksyczne limfocyty T CD4⁺ niszczą komórki nowotworowe i ich dokładnej roli jaką pełnią w chorobach nowotworowych. Z kolei, na podstawie dostępnych publikacji można stwierdzić, że to stosunek limfocytów T CD4⁺ do limfocytów CD8⁺ ma większe znaczenie prognostyczne w chorobach nowotworowych (na przykład w raku piersi), aniżeli interpretacja każdego z typów limfocytów T osobno [179]. Zhou i współpracownicy w swoim badaniu wyraźnie wskazują, że stosunek CD4/CD8 jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w jasnokomórkowym raku nerki i wiąże się on z krótszym przeżyciem całkowitym [169].

Ponadto, poza naciekiem limfocytarnym, na odpowiedź na stosowaną immunoterapię ma także wpływ ilość neoantygenów prezentowanych przez komórki nowotworowe, która jest bezpośrednim wynikiem liczby mutacji zachodzących w guzie. W przypadku jasnokomórkowego raka nerki ilość mutacji jest niewielka, co ma wpływ na ograniczoną skuteczność obecnie stosowanych immunoterapii [180]. Jednakże, istnieją dane sugerujące, że tak jak w innych nowotworach liczba mutacji i obfitość nacieku limfocytarnego decydują o odpowiedzi na zastosowaną immunoterapię, tak w ccRCC wykazano, że na podstawie tych dwóch biomarkerów nie jesteśmy w stanie przewidzieć skuteczności leczenia immunoterapeutycznego [181]. W związku z czym konieczne są dalsze badania nad poszukiwaniem markerów białkowych, które mogłyby determinować potencjalną odpowiedź na immunoterapię opartą na inhibitorach immunologicznych punktów kontrolnych (ICI) w jasnokomórkowym raku nerki.

Immunologiczne punkty kontroli stanowią obecnie podstawę stosowanej immunoterapii w wielu chorobach nowotworowych, w tym również w jasnokomórkowym raku nerki. Jednakże terapia z wykorzystaniem ICIs wykazuje skuteczność tylko u niewielkiej liczby chorych z ccRCC i może się ona wiązać z różnymi skutkami ubocznymi [182].

Z uwagi na fakt, że limfocyty T naciekające nowotwór są nieaktywne i tracą funkcje cytotoksyczne w swojej pracy doktorskiej zbadalem ilość białek błonowych OSMR i Tmprss2 zarówno w guzie jak i na limfocytach T, które w badaniach *in vitro* wydają się być dobrymi markerami wyczerpania limfocytów T CD4+. Przeprowadzona analiza wykazała, że w jasnokomórkowym raku nerki mamy do czynienia z większą ekspresją białka OSMR we wszystkich badanych grupach w porównaniu z tkanką zdrową. Co więcej, przeprowadzona analiza immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko białku OSMR wykazała pozytywną ekspresję tego białka również na limfocytach T, a jego ilość była zdecydowanie wyższa w porównaniu do OSMR obecnych w komórkach ccRCC. Dodatkowo, ekspresja receptora OSMR jest znacznie wyższa w komórkach ccRCC w porównaniu do tkanki zdrowej, a najwyższą ilość białka OSMR obserwuje się w tkance nowotworowej u pacjentów z chorobą pierwotnie rozsianą. Wyniki te sugerują, że receptor OSMR może pełnić funkcje promujące proces przerzutowania, zamiast hamować rozwój nowotworów, jak pierwotnie zakładano. Tak jak obecność białka OSMR w komórkach wielu typów nowotworów, w tym także jasnokomórkowego raka nerki potwierdzają dane literaturowe [183-186], tak jego ekspresja i obecność na limfocytach T naciekających mikrośrodowisko guza jest zjawiskiem nowym. Przeprowadzone badania dodatkowo wykazały, że wysoka ekspresja białka OSMR na powierzchni limfocytów T nie korelowała z ilością limfocytów T w mikrośrodowisku ccRCC, ale osiągała największe wartości w grupie chorych z chorobą przerzutową, co może świadczyć o głębokim wyczerpaniu limfocytów T, zwłaszcza CD4+, gdyż ekspresji OSMR jak dotąd nikt nie wykazał na wyczerpanych limfocytach T CD8+. W przeprowadzonym badaniu dotyczącym gruczolaka trzustki wykazano, że ekspresja OSMR na powierzchni fibroblastów wchodzących w skład podścieliska guza, stymulowała wydzielanie przez nie czynników prozapalnych prowadząc do wzrostu guza i pojawienia się przerzutów odległych [187]. Dane te potwierdzają, że OSMR wpływa na przeprogramowanie funkcji komórek wchodzących w skład mikrośrodowiska guza, i tym samym wskazują na rolę, jaką

OSMR może pełnić w chorobach nowotworowych i ich interakcji z układem immunologicznym. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że OSMR może służyć jako nowy receptor, który może być bezpośrednio zaangażowany w inaktywację i wyczerpanie limfocytów T CD4+. Co więcej, wydaje się, że poziom OSMR obecny na TILs może być wykorzystany jako marker wyczerpania limfocytów T CD4+, chociaż jego funkcja prognostyczna w odpowiedzi na immunoterapię wymaga dalszych badań i będzie oceniana w przyszłości. Ponadto, wyniki przedstawione w mojej pracy doktorskiej potwierdzają także istotny statystycznie związek pomiędzy wysokim poziomem białka OSMR w komórkach ccRCC z wysokim stopniem złośliwości histologicznej w grupie chorych z chorobą przerzutową. Dane te wykazują podobieństwo do wyników uzyskanych podczas badań nad innymi nowotworami, gdzie między innymi w glejaku wysoki poziom OSMR korelował z wysokim zaawansowaniem choroby zarówno w stadium TNM jak i stopniem złośliwości histologicznej [188]. Wydaje się więc, że nie tylko OSMR obecny na powierzchni limfocytów T, ale także OSMR, który ulega ekspresji w komórkach nowotworowych może stanowić potencjalny punkt uchwytu dla opracowania nowych schematów terapeutycznych w leczeniu ccRCC.

W swojej pracy doktorskiej poza białkiem OSMR zdecydowałem się sprawdzić także poziom enzymuIDO-1 w jasnokomórkowym raku nerki. Przeprowadzana analiza jasno wskazuje na małą ilość tego białka we wszystkich grupach badanych. Analiza immunohistochemiczna wykazała ekspresjęIDO-1 przede wszystkim w komórkach kanalików proksymalnych zdrowej nerki, choć w przypadku komórek raka odnotowano ekspresję ektopową, głównie w komórkach endotelialnych naczyń krwionośnych wewnątrz guza. Naczynia guza tworzą fizyczną barierę, która utrudnia wewnątrzguzowy transport limfocytów T, dodatkowo, wykazano, że komórki śródbłonna w guzie mogą bezpośrednio zabijać limfocyty T lub hamować ich aktywność, być może poprzez wysoką ekspresjęIDO-1 i spowodowany tym głód tryptofanowy, który powoduje wyczerpanie limfocytów T [189].

Jedynym zaobserwowanym związkiem o potwierdzonej istotności statystycznej była podwyższona ilość białka IDO-1 w tkankach pochodzących od pacjentów z chorobą przerzutową, która korelowała z wysokim stadium zaawansowania choroby pod względem cechy T. Nie wykazano natomiast zależności pomiędzy ilością enzymu IDO-1 a stopniem złośliwości histologicznej ccRCC. W dostępnej literaturze istnieją liczne dane sugerujące wykorzystanie IDO-1, zarówno jako markera prognostycznego, jak i potencjalnego punktu uchwytu dla opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych. Jest to związane z korelacją jaka występuje pomiędzy wysoką ekspresją białka IDO-1 a stopniem zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej [190]. Analizując przedstawione przeze mnie wyniki, można stwierdzić, że pomimo ogólnie bardzo niskiej ekspresji IDO-1 w badanym materiale, zaobserwowano podobną zależność do tej, która jest prezentowana w przytoczonej literaturze, dotyczącej korelacji poziomu IDO-1 z zaawansowaniem choroby nowotworowej. Ilość białka IDO-1 w limfocytach T naciekających guza była niewielka, pomimo, że dane z danych *in vitro* wynika, że IDO-1 jest jednym z najsilniej aktywowanych genów w wyczerpanych limfocytach T CD4+ [191]. Może to wynikać z małej czułości metody IHC w porównaniu z metodą Western blot stosowaną w badaniach *in vitro*.

Ostatnie białko jakie poddałem analizie w swojej pracy doktorskiej to białko TMPRSS2. Wykazano niewielką ekspresję białka TMPRSS2 w analizowanym materiale bez względu na przynależność do grupy badanej. Co ciekawe, w przypadku zarówno OSMR jak i IDO-1 analiza transkryptomyczna bazy TCGA wykazała nadekspresję tych dwóch genów w ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową, a w przypadku TMPRSS2 obserwowano spadek ekspresji tego genu. Przeprowadzone badanie IHC wykazało, pozytywne barwienie TMPRSS2 w ccRCC i tkance zdrowej, jednak nie było znaczących różnic pomiędzy grupami. Dodatkowo, obecność białka TMPRSS2 obserwowano również na powierzchni TILs, przy czym najwięcej TMPRSS2 pozytywnych TILs było w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie rozsianą. W dostępnej literaturze istnieje mało danych na temat ekspresji TMPRSS2 w jasnokomórkowym raku nerki. Doniesienia

naukowe skupiają się przede wszystkim na roli jaką białko to pełni w patogenezie raka gruczołu krokowego [192]. Niemniej jednak, ostatnie badania dowodzą, że receptor TMPRSS2 odgrywa rolę co-receptora dla wniknięcia wirusa SARS-CoV-2 do komórek kanalików proksymalnych nefronu, z których wywodzi się jasnokomórkowy rak nerki [193]. Analiza hodowli komórkowych z wykorzystaniem linii ccRCC wykazała, że receptor TMPRSS2 obecny jest także na komórkach jasnokomórkowego raka nerki umożliwiając przez to wniknięcie wirusa do ich wnętrza. Inwazja komórek ccRCC przez wirus SARS-CoV-2 skutkowałą tak zwanym efektem cytopatogenetycznym polegającym na zmianie kształtu komórek nowotworowych i oderwaniu ich od powierzchni wzrostowej [193]. Ponadto, wydaje się, że podwyższony poziom białka TMPRSS2 w ccRCC jest związany z niskim naciekiem limfocytarnym w obrębie guza. Niemniej jednak, dokładna rola jaką białko TMPRSS2 odgrywa w patogenezie jasnokomórkowego raka nerki, a także reakcji układu odpornościowego na toczący się proces nowotworowy wymaga dalszych badań na dużej liczbie chorych.

Podsumowując, na podstawie danych prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej jak i też licznych publikacjach naukowych należy stwierdzić, że dotychczas stosowane formy immunoterapii w jasnokomórkowym raku nerki cechują się umiarkowaną skutecznością. Pomimo dynamicznego rozwoju tej gałęzi medycyny, pacjenci z zaawansowaną chorobą przerzutową ccRCC wciąż mają ograniczone możliwości leczenia co wiąże się z niepomyślnym rokowaniem. W związku z powyższym, kluczowe jest poszukiwanie nowych ścieżek terapeutycznych w oparciu o analizę molekularną jasnokomórkowego raka nerki oraz korelację poznanych zaburzeń molekularnych z reakcją układu immunologicznego.

Wyniki przedstawione w mojej pracy doktorskiej potwierdzają, że jasnokomórkowy rak nerki to nowotwór cechujący się wysoką immunogennością z obfitym naciekiem limfocytarnym w swoim mikrośrodowisku. Przeprowadzone analizy dowodzą, że ccRCC charakteryzuje się zaburzeniami ekspresji białek takich jak OSMR,IDO-1 czy TMPRSS2. Niemniej jednak, kluczowym wnioskiem

płynącym z prezentowanego projektu badawczego jest duża ilość białka OSMR obecnego na limfocytach T, którego ilość może wykazywać istotny związek z zaawansowaniem choroby w jasnokomórkowym raku nerki. Obecność białka OSMR na powierzchni limfocytów T naciekających mikrośrodowisko guza jest zjawiskiem wcześniej nieopisywanym w dostępnej literaturze. Chociaż dokładna rola jaką OSMR pełni w interakcji układu odpornościowego z nowotworem wymaga dalszych badań, to przedstawione przeze mnie wyniki dowodzą, że OSMR obecny na TILs może odgrywać decydującą rolę jako ważny czynnik prognostyczny oraz punkt uchwytu dla nowych immunoterapii w ccRCC.

Ponadto, prezentowane przeze mnie dane mogą stanowić wstęp do wyznaczenia nowego kierunku badań nad poszukiwaniem ICIs w jasnokomórkowym raku nerki w celu opracowania skutecznych schematów immunoterapeutycznych.

XIV. Wnioski

1. W ccRCC obecność OSMR jest charakterystyczna nie tylko dla komórek nowotworowych, ale także dla limfocytów T naciekających środowisko guza.
2. Wysoki poziom limfocytów T z dodatnią ekspresją OSMR wiąże się z wysokim zaawansowaniem choroby, osiągając największe wartości w stadium choroby przerzutowej.
3. Wysoki poziom OSMR w komórkach nowotworowych również wykazuje dodatnią korelację z zaawansowaniem choroby w ccRCC.
4. ccRCC cechuje się zaburzeniami poziomu białek IDO-1 oraz Tmprss2.
5. Jasnokomórkowy rak nerki cechuje się niewielką ekspresją IDO-1, lecz ilość tego białka koreluje dodatnio z zaawansowaniem choroby w stadium TNM.
6. Białko Tmprss2 ulega ekspresji na limfocytach T naciekających nowotwór oraz w komórkach nowotworowych.

XV. Piśmiennictwo

1. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w raku nerkowokomórkowym — aktualizacja. Polish Society of Clinical Oncology and Polish Urological Association guidelines for the diagnosis and treatment of renal cell cancer — update. Wytyczne Postępowania Diagnostyczno - Terapeutycznego. Via-Medica.
2. Kathuria-Prakash N, Drolen C, Hannigan CA, Drakaki A. Immunotherapy and Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Review of New Treatment Approaches. *Life (Basel)*. 2021 Dec 24;12(1):24.
3. Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2010;9(1-6):461-73.
4. Mittal MK, Sureka B. Solid renal masses in adults. *Indian J Radiol Imaging*. 2016 Oct-Dec;26(4):429-442.
5. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. 2015 May-Jun;48(3):166-74.
6. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, et.al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 09;3:17009.
7. Qayyum T, McArdle P, Orange C, Seywright M, Horgan P, et.al . Reclassification of the Fuhrman grading system in renal cell carcinoma-does it make a difference? *Springerplus*. 2013 Aug 10;2:378.
8. Ning Liu, Weidong Gan, Feng Qu, Zhen Wang, Wenyuan Zhuang, Sezim Agizamhan, et al. Does the Fuhrman or World Health Organization/International Society of Urological Pathology Grading System Apply to the Xp11.2 Translocation Renal Cell Carcinoma?: A 10-Year Single-Center Study, *The American Journal of Pathology*, Volume 188, Issue 4, 2018, Pages 929-936.
9. Farhad Kosari, Alexander S. Parker, Dagmar Marie Kube, Christine M. Lohse, Bradley C. Leibovich, et.al. Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Gene Expression Analyses Identify a Potential Signature for Tumor Aggressiveness. *Clin Cancer Res* 15 July 2005; 11 (14): 5128–5139.

10. Liao Z, Wang D, Song N, Xu Y, Ge H, Peng Z. Prognosis of clear cell renal cell carcinoma patients stratified by age: A research relied on SEER database. *Front Oncol.* 2022 Oct 12;12:975779.
11. Kabaria R, Klaassen Z, Terris MK. Renal cell carcinoma: links and risks. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016 Mar 7;9:45-52.
12. Maher, E.R. Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol* 36, 1891–1898 (2018).
13. Mohamed MO, Al-Rubaye S, Reilly IW, McGoldrick S. Renal cell carcinoma presenting as an upper gastrointestinal bleeding. *BMJ Case Rep.* 2015 Aug 14;
14. Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J. Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. *Rev Urol.* 2002 Fall;4(4):163-70.
15. Chavarriaga, J., Fakih, N., Cataño, J. et al. Stauffer syndrome, clinical implications and knowledge gaps, does size matter? Case report. *BMC Urol* **20**, 105 (2020).
16. Oltean MA, Matuz R, Sitar-Taut A, Mihailov A, Rednic N, et.al. Renal Cell Carcinoma With Extensive Tumor Thrombus Into the Inferior Vena Cava and Right Atrium in a 70-Year-Old Man. *Am J Mens Health.* 2019 May-Jun;13(3):1557988319846404.
17. Koul H, Huh JS, Rove KO, Crompton L, Koul S, et.al. Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. *Am J Cancer Res.* 2011;1(2):240-254.
18. Li W, Wang B, Dong S, Xu C, Song Y, et.al. A Novel Nomogram for Prediction and Evaluation of Lymphatic Metastasis in Patients With Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2022 Apr 11;12:851552.
19. Hu, J., Tan, P., Ishihara, M. et al. Tumor heterogeneity in VHL drives metastasis in clear cell renal cell carcinoma. *Sig Transduct Target Ther* 8, 155 (2023).
20. Maher, E. R., Neumann, H. P. & Richard, S. von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 617–623 (2011).

21. Kim E, Zschiedrich S. Renal Cell Carcinoma in von Hippel-Lindau Disease-From Tumor Genetics to Novel Therapeutic Strategies. *Front Pediatr.* 2018 Feb 9;6:16.
22. Schoenfeld AR, Davidowitz EJ, Burk RD. Elongin BC complex prevents degradation of von Hippel-Lindau tumor suppressor gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97:8507–12.
23. C. Shen, W.G. Kaelin Jr. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 23 (1) (2013), pp. 18-25.
24. Clark PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int.* 2009 Nov;76(9):939-45.
25. Anna-Karin Boström, David Lindgren, Martin E. Johansson, Håkan Axelson. Effects of TGF- β signaling in clear cell renal cell carcinoma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 435, Issue 1, 2013, Pages 126-133.
26. Yap NY, Rajandram R, Ng KL, Pailoor J, Fadzli A, et.al. Genetic and Chromosomal Aberrations and Their Clinical Significance in Renal Neoplasms. *Biomed Res Int.* 2015;2015:476508.
27. Mehdi A, Riazalhosseini Y. Epigenome Aberrations: Emerging Driving Factors of the Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 16;18(8)
28. Gallan AJ, Parilla M, Segal J, Ritterhouse L, Antic T. BAP1-Mutated Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2021 Apr 26;155(5):718-728.
29. Fan D, Liu Q, Wu F, Liu N, Qu H, et.al. Prognostic significance of PI3K/AKT/ mTOR signaling pathway members in clear cell renal cell carcinoma. *PeerJ.* 2020 Jun 1;8:e9261.
30. Aggarwal RK, Luchtel RA, Machha V, Tischer A, Zou Y, et.al. Functional succinate dehydrogenase deficiency is a common adverse feature of clear cell renal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Sep 28;118(39):e2106947118.
31. Dawsey, Scott J. and Gupta, Shilpa. 'Hereditary Renal Cell Carcinoma'. 1 Jan. 2022 : 83 – 93.
32. Henske EP, Cornejo KM, Wu CL. Renal Cell Carcinoma in Tuberous Sclerosis Complex. *Genes (Basel).* 2021 Oct 8;12(10):1585.

33. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. 2015 May-Jun;48(3):166-74.
34. Kasherman L, Siu DHW, Woodford R, Harris CA. Angiogenesis Inhibitors and Immunomodulation in Renal Cell Cancers: The Past, Present, and Future. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 9;14(6):1406
35. E. Diamond, A.M. Molina, M. Carbonaro, N.H. Akhtar, P. Giannakakou, et.al. Cytotoxic chemotherapy in the treatment of advanced renal cell carcinoma in the era of targeted therapy, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 96, Issue 3, 2015,Pages 518-52.
36. Xiang Y, Zheng G, Zhong J, Sheng J, Qin H. Advances in Renal Cell Carcinoma Drug Resistance Models. *Front Oncol*. 2022 May 10;12:870396.
37. Zhang, W., Zhang, Q., Zhu, C. *et al*. The intrarenal landscape of T cell receptor repertoire in clear cell renal cell cancer. *J Transl Med* **20**, 558 (2022).
38. Wersäll P. Interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. 1993;10(1-2):71-6.
39. Wein, Alan J.; Kavoussi, Louis R.; Partin, Alan W.; and Peters, Craig A., "Campbell-Walsh Urology: 4-Volume Set (11th Ed.)" (2016). Faculty Bookshelf. 69.
40. Wein, Alan J.; Kavoussi, Louis R.; Partin, Alan W.; and Peters, Craig A., "Campbell-Walsh Urology: 4-Volume Set (12th Ed.)" (2020). Faculty Bookshelf. 69.
41. Chakiryan NH, Jiang DD, Gillis KA, et al. Real-World Survival Outcomes Associated With First-Line Immunotherapy, Targeted Therapy, and Combination Therapy for Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *JAMA Netw Open*. 2021;4(5):e2111329.
42. Spirina L, Yurmazov Z, Usynin E, Kondakova I, Ladutko E, et.al. Regulation of Immunity in Clear Cell Renal Carcinoma: Role of PD-1, PD-L1, and PD-L2. *Curr Issues Mol Biol*. 2021 Sep 6;43(2):1072-1080.

43. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39:1–10.
44. Zhang X., Yin X., Zhang H., Sun G., Yang Y., et al. Differential expressions of PD-1, PD-L1 and PD-L2 between primary and metastatic sites in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2019;19:360.
45. Carlomagno, N., Incollingo, P., Tamaro, V., Peluso, G., Rupealta, N., et al. Diagnostic, Predictive, Prognostic, and Therapeutic Molecular Biomarkers in Third Millennium: A Breakthrough in Gastric Cancer. *Biomed. Res. Int.* 2017, 7869802.
46. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., and Honjo, T. (2017). Cancer Immunotherapies Targeting the PD-1 Signaling Pathway. *J. Biomed. Sci.* 24 (1), 26.
47. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, et.al. Kwon ED. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 15;13(6):1757-61.
48. Kammerer-Jacquet SF, Deleuze A, Saout J, Mathieu R, Laguerre B, et.al. Targeting the PD-1/PD-L1 Pathway in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 4;20(7):1692..
49. Rassy E, Flippot R, Albiges L. Tyrosine kinase inhibitors and immunotherapy combinations in renal cell carcinoma. *Ther Adv Med Oncol.* 2020 Mar 18;12:1758835920907504
50. Lee CH, Motzer RJ. Kidney cancer in 2016: The evolution of anti-angiogenic therapy for kidney cancer. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Jan 19;13(2):69-70.
51. Battelli C, Cho DC. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy.* 2011 Jul;8(4):359-367.
52. Rodríguez-Moreno JF, Apellaniz-Ruiz M, Roldan-Romero JM, Durán I, Beltrán L, et.al. Exceptional Response to Temsirolimus in a Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma With an Early Novel *MTOR*-Activating Mutation. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017 Nov;15(11):1310-1315.

53. Ran X, Xiao J, Zhang Y, Teng H, Cheng F, et.al. Low intratumor heterogeneity correlates with increased response to PD-1 blockade in renal cell carcinoma. *Ther Adv Med Oncol.* 2020 Dec 18;12:1758835920977117.
54. Mohamed MO, Al-Rubaye S, Reilly IW, McGoldrick S. Renal cell carcinoma presenting as an upper gastrointestinal bleeding. *BMJ Case Rep.* 2015 Aug 14;2015.
55. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, et.al. ESMO Guidelines Committee. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2019 May 01;30(5):706-720.
56. Mittal MK, Sureka B. Solid renal masses in adults. *Indian J Radiol Imaging.* 2016 Oct-Dec;26(4):429-442.
57. Tomaszewski JJ, Uzzo RG, Smaldone MC. Heterogeneity and renal mass biopsy: a review of its role and reliability. *Cancer Biol Med.* 2014 Sep;11(3):162-72.
58. Caoili EM, Davenport MS. Role of percutaneous needle biopsy for renal masses. *Semin Intervent Radiol.* 2014 Mar;31(1):20-6.
59. Chen DY, Uzzo RG. Optimal management of localized renal cell carcinoma: surgery, ablation, or active surveillance. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009 Jun;7(6):635-42; quiz 643.
60. Maxwell, Aaron & Baird, Grayson & Iannuccilli, Jason & Mayo-Smith, William & Dupuy, Damian. (2016). Renal Cell Carcinoma: Comparison of RENAL Nephrometry and PADUA Scores with Maximum Tumor Diameter for Prediction of Local Recurrence after Thermal Ablation. *Radiology.* 283. 161225.
61. Krabbe LM, Bagrodia A, Margulis V, Wood CG. Surgical management of renal cell carcinoma. *Semin Intervent Radiol.* 2014 Mar;31(1):27-32.
62. Motzer RJ, Escudier B, Gannon A, Figlin RA. Sunitinib: Ten Years of Successful Clinical Use and Study in Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist.* 2017 Jan;22(1):41-52.

63. Marona, P., Górka, J., Kwapisz, O. et al. Resistance to tyrosine kinase inhibitors promotes renal cancer progression through MCPIP1 tumor-suppressor downregulation and c-Met activation. *Cell Death Dis* **13**, 814 (2022).
64. Michaelis J, Grabbert M, Sigle A, Yilmaz M, Schlager D, et.al. Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Metastasised Renal Cell Carcinoma-Future or the Past? *Cancers (Basel)*. 2022 Aug 3;14(15):3777.
65. Battelli C, Cho DC. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy*. 2011 Jul;8(4):359-367.
66. Rini BI, Battle D, Figlin RA, George DJ, Hammers H, et.al. The society for immunotherapy of cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of advanced renal cell carcinoma (RCC). *J Immunother Cancer*. 2019 Dec 20;7(1):354.
67. Bedke, J. et al. Updated European association of urology guidelines on renal cell carcinoma: Nivolumab plus cabozantinib joins immune checkpoint inhibition combination therapies for treatment-naïve metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* **79**, 339–342 (2021).
68. Yu EM, Linville L, Rosenthal M, Aragon-Ching JB. A Contemporary Review of Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Vaccines (Basel)*. 2021 Aug 18;9(8):919.
69. Thouvenin J, Masson C, Boudier P, Maillet D, Kuchler-Bopp S, et.al. Complete Response in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients Treated with Immune-Checkpoint Inhibitors: Remission or Healing? How to Improve Patients' Outcomes? *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 27;15(3):793
70. Yang J, Wang K, Yang Z. Treatment strategies for clear cell renal cell carcinoma: Past, present and future. *Front Oncol*. 2023 Mar 21;13:1133832.
71. Hahn AW, Drake C, Denmeade SR, Zakharia Y, Maughan BL, et.al. A Phase I Study of Alpha-1,3-Galactosyltransferase-Expressing Allogeneic Renal Cell Carcinoma Immunotherapy in Patients with Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Oncologist*. 2020 Feb;25(2):121-e213.

72. Jiang, Y., Li, W., Yan, Y. *et al.* LINC01094 triggers radio-resistance in clear cell renal cell carcinoma via miR-577/CHEK2/FOXO1 axis. *Cancer Cell Int* **20**, 274 (2020).
73. Nikolaev A, Benda R. Palliative Radiation Therapy for Symptomatic Control of Inoperable Renal Cell Carcinoma. *Urol Case Rep.* 2015 Oct 17;4:51-2.
74. Wang Q, Tang H, Luo X, Chen J, Zhang X, et.al. Immune-Associated Gene Signatures Serve as a Promising Biomarker of Immunotherapeutic Prognosis for Renal Clear Cell Carcinoma. *Front Immunol.* 2022 May 24;13:890150.
75. Iacobas DA, Mgbemena VE, Iacobas S, Menezes KM, Wang H, et.al. Genomic Fabric Remodeling in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC): A New Paradigm and Proposal for a Personalized Gene Therapy Approach. *Cancers (Basel).* 2020 Dec 8;12(12):3678.
76. O'Donnell, J.S., Teng, M.W.L. & Smyth, M.J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 151–167 (2019).
77. Corrales, L., Matson, V., Flood, B. et al. Innate immune signaling and regulation in cancer immunotherapy. *Cell Res* 27, 96–108 (2017).
78. Rothlin CV, Ghosh S Lifting the innate immune barriers to antitumor immunity *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2020;8:e000695.
79. Alsalloum A, Shevchenko JA, Sennikov S. The Melanoma-Associated Antigen Family A (MAGE-A): A Promising Target for Cancer Immunotherapy? *Cancers (Basel).* 2023 Mar 15;15(6):1779.
80. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014 Apr;27:16-25.
81. Liu, S., Sun, Q. & Ren, X. Novel strategies for cancer immunotherapy: counter-immunoediting therapy. *J Hematol Oncol* 16, 38 (2023).

82. Kim Seong Keun, Cho Sun Wook. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Pharmacology* 13, 2022.
83. Mizuno, S., Yamaguchi, R., Hasegawa, T. et al. Immunogenomic pan-cancer landscape reveals immune escape mechanisms and immunoediting histories. *Sci Rep* **11**, 15713 (2021).
84. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006;26:154-8.
85. Ichim CV. Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *J Transl Med.* 2005 Feb 8;3(1):8.
86. Gavin P. Dunn, Lloyd J. Old, Robert D. Schreiber, *The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting*, Immunity, Volume 21, Issue 2, 2004, Pages 137-148.
87. Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest.* 2015 Sep;125(9):3338-46.
88. Romagnani S. Immunological tolerance and autoimmunity. *Intern Emerg Med.* 2006;1(3):187-96.
89. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S. et. al. A. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol.* 2022 Apr 24;29(5):3044-3060.
90. Ledford H. Melanoma drug wins US approval. *Nature.* 2011;471:561.
91. Johnson D.B., Nebhan C.A., Moslehi J.J., Balko J.M. Immune-checkpoint inhibitors: Long-term implications of toxicity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2022;19:254–267.
92. Cai X., Zhan H., Ye Y., Yang J., Zhang M. et. al. Current Progress and Future Perspectives of Immune Checkpoint in Cancer and Infectious Diseases. *Front. Genet.* 2021;12:2352.
93. Pauken K. E., Wherry E. J. (2015). Overcoming T Cell Exhaustion in Infection and Cancer. *Trends Immunol.* 36 (4), 265–276.

94. Escamilla-Tilch, M., Filio-Rodríguez, G., García-Rocha, R., Mancilla-Herrera, I., Mitchison, N.A. et al. The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer?. *Immunol Cell Biol* 2013, 91: 601-610.
95. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252-64.
96. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, et al. Molecular and transcriptional basis of CD4+ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* 2014;40:289-302.
97. Brunet J.-F., Denizot F., Luciani M.-F., Roux-Dosseto M., Suzan M. et al. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*. 1987;328:267–270.
98. Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C. et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet*. 1996 Jul;5(7):1075-80.
99. Brunner M.C., Chambers C.A., Chan F.K., Hanke J., Winoto A., Allison J.P. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation—PubMed. [(accessed on 18 November 2020)]; 100.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64.
101. Rudd C.E., Taylor A., Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev*. 2009;229:12–26.
102. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(2):459–65.
103. Ascierto PA, Del Vecchio M, Robert C, Mackiewicz A, Chiarion-Sileni V. et al. Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(5):611–22.

104. Mullard A. FDA approves first immunotherapy combo. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015;14:739.
105. Fecher L.A., Agarwala S.S., Hodi F.S., Weber J.S. Ipilimumab and Its Toxicities: A Multidisciplinary Approach. *Oncologist.* 2013;18:733–743.
106. Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: Current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2020;10:727.
107. Tang, H., Liang, Y., Anders, R. A., Taube, J. M. et .al (2018). PD-L1 on Host Cells Is Essential for PD-L1 Blockade-Mediated Tumor Regression. *J. Clin. Invest.* 128 (2), 580–588.
108. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., and Honjo, T. (2017). Cancer Immunotherapies Targeting the PD-1 Signaling Pathway. *J. Biomed. Sci.* 24 (1), 26.
109. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009;229:114–125.
110. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med.* 2015;21:24–33.
111. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, et. al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:1757–1761.
112. Koh YW, Jeon YK, Yoon DH, Suh C, Huh J. Programmed death 1 expression in the peritumoral microenvironment is associated with a poorer prognosis in classical Hodgkin lymphoma. *Tumour Biol.* 2016;37:7507–7514.
113. Zhang Y, Kang S, Shen J, He J, Jiang L et.al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) Expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e515.
114. Chen RQ, Liu F, Qiu XY, Chen XQ. The prognostic and therapeutic value of PD-L1 in glioma. *Front Pharmacol* (2019) 9:1503.

115. Yamaguchi, H., Hsu, JM., Yang, WH. *et al.* Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol* **19**, 287–305 (2022).
116. Wang, S. *et al.* Programmed death ligand 1 promotes lymph node metastasis and glucose metabolism in cervical cancer by activating integrin beta4/SNAI1/SIRT3 signaling pathway. *Oncogene* **37**, 4164–4180 (2018).
117. Wei R, Liu S, Zhang S, Min L, Zhu S. Cellular and Extracellular Components in Tumor Microenvironment and Their Application in Early Diagnosis of Cancers. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2020 Jan 8;2020:6283796.
118. Zhao Y, Deng J, Rao S, Guo S, Shen J *et al.* Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Therapy for Solid Tumor Treatment: Progressions and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2022 Aug 27;14(17):4160.
119. Nelson MA, Ngamcherdtrakul W, Luoh SW, Yantasee W. Prognostic and therapeutic role of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2021 Jun;40(2):519-536.
120. Brummel, K., Eerkens, A.L., de Bruyn, M. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes: from prognosis to treatment selection. *Br J Cancer* **128**, 451–458 (2023).
121. Wang L, Geng H, Liu Y, Liu L, Chen Y, *et al.* Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies. *MedComm* (2020). 2023 Aug 26;4(5):e343.
122. Borcherding, N., Vishwakarma, A., Voigt, A.P. *et al.* Mapping the immune environment in clear cell renal carcinoma by single-cell genomics. *Commun Biol* **4**, 122 (2021).
123. Ghatalia P, Gordetsky J, Kuo F, *et al.* Prognostic impact of immune gene expression signature and tumor infiltrating immune cells in localized clear cell renal cell carcinoma *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2019;7:139.
124. Qin SS, Melucci AD, Chacon AC, Prieto PA. Adoptive T Cell Therapy for Solid Tumors: Pathway to Personalized Standard of Care. *Cells*. 2021 Apr 5;10(4):808.

125. Jane Robertson, Max Salm, Markus Dangl, Adoptive cell therapy with tumour-infiltrating lymphocytes: the emerging importance of clonal neoantigen targets for next-generation products in non-small cell lung cancer, *Immuno-Oncology Technology*, Volume 3, 2019, Pages 1-7.
126. Marofi, F., Motavalli, R., Safonov, V.A. et al. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther* 12, 81 (2021).
127. Zhang, P., Zhang, G. & Wan, X. Challenges and new technologies in adoptive cell therapy. *J Hematol Oncol* 16, 97 (2023).
128. Geiger, C., Nößner, E., Frankenberger, B. et al. Harnessing innate and adaptive immunity for adoptive cell therapy of renal cell carcinoma. *J Mol Med* 87, 595–612 (2009).
129. Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;149:39-52. doi: 10.1007/s10254-003-0013-1. Epub 2003 Jun 17.
130. Shao-Hua Chen, Ety N. Benveniste, Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Volume 15, Issue 5, 2004, Pages 379-391.
131. Ali Masjedi, Farnaz Hajizadeh, Farzaneh Beigi Dargani, Behzad Beyzai, Mohsen Aksoun et.al.: A mysterious cytokine in cancers, *International Immunopharmacology*, Volume 90, 2021, 107158.
132. Chen, M., Ren, R., Lin, W. et al. Exploring the oncostatin M (OSM) feed-forward signaling of glioblastoma via STAT3 in pan-cancer analysis. *Cancer Cell Int* 21, 565 (2021).
133. Caffarel, M.M. and Coleman, N. (2014), Oncostatin M receptor is a novel therapeutic target in cervical squamous cell carcinoma. *J. Pathol.*, 232: 386-390.
134. Pöling, J., Gajawada, P., Richter, M. et al. Therapeutic targeting of the oncostatin M receptor- β prevents inflammatory heart failure. *Basic Res Cardiol* 109, 396 (2014).
135. Lantieri, F.; Bachetti, T. OSM/OSMR and Interleukin 6 Family Cytokines in Physiological and Pathological Condition. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11096.

136. Jan Pencik, Ha Thi Thanh Pham, Johannes Schmoellerl, Tahereh Javaheri, Michaela Schledere et.al., JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome, *Cytokine*, Volume 87, 2016, Pages 26-36.
137. Benoit Le Goff, Sofie Singbrant, Brett A. Tonkin, T. John Martin, Evange Romas, et al. Oncostatin M acting via OSMR, augments the actions of IL-1 and TNF in synovial fibroblasts, *Cytokine*, Volume 68, Issue 2, 2014, Pages 101-109.
138. Yuping Zhang, Sathiya P. Narayanan, Rahul Mannan and Arul M. Chinnaiyan et.al. Single-cell analyses of renal cell cancers reveal insights into tumor microenvironment, cell of origin, and therapy response. *Proceedings of the national academy of science*. Vol. 118 | No. 24 June 15, 2021.
139. Stephens M. Jacqueline and Elks M. Carrie, Oncostatin M: Potential Implications for Malignancy and Metabolism, *Current Pharmaceutical Design* 2017; 23 (25) .
140. Araujo AM, Abaurrea A, Azcoaga P, López-Velazco JI, Manzano S et.al. Stromal oncostatin M cytokine promotes breast cancer progression by reprogramming the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2022 Apr 1;132(7):e148667.
141. Geethadevi A, Nair A, Parashar D, Ku Z, Xiong W. et.al. Oncostatin M Receptor-Targeted Antibodies Suppress STAT3 Signaling and Inhibit Ovarian Cancer Growth. *Cancer Res*. 2021 Oct 15;81(20):5336-5352.
142. Nese Unver, Florencia McAllister et.al. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Volume 41, 2018, pages 10-17, ISSN 1359-6101.
143. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, et.al. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*. 2002 Dec;107(4):452-60.
144. Tang, K., Wu, YH., Song, Y. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors in clinical trials for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 14, 68 (2021).

145. Wu T., Dai Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett.* 387, 61–68.
146. De Araújo EF, Feriotti C, Galdino NAL, Preite NW, Calich VLG , et.al. The IDO-AhR Axis Controls Th17/Treg Immunity in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *Front Immunol.* 2017 Jul 24;8:880.
147. Mbongue JC, Nicholas DA, Torrez TW, Kim NS, Firek AF, et.al. The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *Vaccines (Basel).* 2015 Sep 10;3(3):703-29.
148. Murthy GG, Prideaux MA, Armstrong M, Kenney HM, Latchney SE, et.al. Characterization of the temporal, cell-specific and interferon-inducible patterns of indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (IDO1) expression in the human placenta across gestation. *Placenta.* 2021 Nov;115:129-138.
149. Pallotta MT, Rossini S, Suvieri C, Coletti A, Orabona C, et. al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1): an up-to-date overview of an eclectic immunoregulatory enzyme. *FEBS J.* 2022 Oct; 289(20):6099-6118.
150. Metz R, Rust S, Duhadaway JB, Mautino MR, Munn DH, et.al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology.* 2012 Dec 1;1(9):1460-1468.
151. Liu, M., Wang, X., Wang, L. *et al.* Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 11, 100 (2018).
152. Meireson A, Devos M, Brochez L. IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? *Front Immunol.* 2020 Sep 24;11:531491.
153. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, et al. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2015;3:51.

154. Trott JF, Kim J, Abu Aboud O, Wettersten H, Stewart B, et.al. Inhibiting tryptophan metabolism enhances interferon therapy in kidney cancer. *Oncotarget*. 2016 Oct 11;7(41):66540-66557.
155. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol*. 2016 Mar;37(3):193-207
156. Gide, T N, Allanson, B M, Menzies, A M, Ferguson, P M, Madore, J, et. al. (2019) *Histopathology* 74, 817–828.
157. Seeber, A, Klinglmair, G, Fritz, J, et al. High IDO-1 expression in tumor endothelial cells is associated with response to immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2018; 109: 1583–1591.
158. Meireson A, Devos M, Brochez L. IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? *Front Immunol*. 2020 Sep 24;11:531491.
159. Sumitomo M, Takahara K, Zennami K, Nagakawa T, Maeda Y, et.al. Tryptophan 2,3-dioxygenase in tumor cells is associated with resistance to immunotherapy in renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2021, 112(3):1038-1047.
160. Sgrignani J, Cavalli A. Computational Identification of a Putative Allosteric Binding Pocket in TMPRSS2. *Front Mol Biosci*. 2021 Apr 30;8:666626.
161. Wettstein, L.; Kirchhoff, F.; Münch, J. The Transmembrane Protease TMPRSS2 as a Therapeutic Target for COVID-19 Treatment. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 1351.
162. Fraser BJ, Beldar S, Seitova A, Hutchinson A, Mannar D, Li Y, Kwon D, Tan R, Wilson RP, Leopold K, Subramaniam S, Halabelian L, Arrowsmith CH, Bénard F. Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation. *Nat Chem Biol*. 2022 Sep;18(9):963-971.
163. Cao W, Feng Q, Wang X. Computational analysis of TMPRSS2 expression in normal and SARS-CoV-2-infected human tissues. *Chem Biol Interact*. 2021 Sep 1;346:109583.

164. Ko, CJ., Hsu, TW., Wu, SR. *et al.* Inhibition of TMPRSS2 by HAI-2 reduces prostate cancer cell invasion and metastasis. *Oncogene* 39, 5950–5963 (2020).
165. Liu C, Wang K, Zhang M, Hu X, Hu T, et.al. High expression of ACE2 and TMPRSS2 and clinical characteristics of COVID-19 in colorectal cancer patients. *NPJ Precis Oncol.* 2021 Jan 21;5(1):1.
166. Liu, L, Qin, J-F, Zuo, M-Z, Zhou, Q. Multi-omics of the expression and clinical outcomes of *TMPRSS2* in human various cancers: A potential therapeutic target for COVID-19. *J Cell Mol Med.* 2022; 26: 709–724.
167. Xiao X, Shan H, Niu Y, Wang P, Li D, et.al. *TMPRSS2* Serves as a Prognostic Biomarker and Correlated With Immune Infiltrates in Breast Invasive Cancer and Lung Adenocarcinoma. *Front Mol Biosci.* 2022 Apr 26;9:647826.
168. Sacconi A, Donzelli S, Pulito C, Ferrero S, Spinella F, et.al. *TMPRSS2*, a SARS-CoV-2 internalization protease is downregulated in head and neck cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Sep 23;39(1):200.
169. Zhang, W., Zhang, Q., Zhu, C. *et al.* The intrarenal landscape of T cell receptor repertoire in clear cell renal cell cancer. *J Transl Med* 20, 558 (2022).
170. Miguel F. Sanmamed, Xinxin Nie, Shruti S. Desai, Franz Villaroel-Espindola, Ti Badri, et. al. A Burned-Out CD8⁺ T-cell Subset Expands in the Tumor Microenvironment and Curbs Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov* 1 July 2021; 11 (7): 1700–1715
171. Su, S., Akbarinejad, S. & Shahriyari, L. Immune classification of clear cell renal cell carcinoma. *Sci Rep* **11**, 4338 (2021).
172. Rozsypalova A, Rosova B, Filipova A, Nikolov DH, Chloupkova R, et.al. Negative prognostic significance of primary cilia, CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes and PD1⁺ cells expression in clear cell renal cancer. *J BUON.* 2019;24(4):1644–1651172.

173. Hanke T, Melling N, Simon R, Sauter G, Bokemeyer C, et.al. High intratumoral FOXP3(+) T regulatory cell (Tregs) density is an independent good prognosticator in nodal negative colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8227–8235.
174. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, et.al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1949–1955.
175. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, et.al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol.* 2008;26(32):5233–5239.
176. Poncette L, Bluhm J, Blankenstein T. The role of CD4 T cells in rejection of solid tumors. *Curr Opin Immunol.* 2022 Feb;74:18-24.
177. Asis Palazón, Juan Dubrot, Iván Martínez-Forero, Ana Rouzaut-Subirá, Carmen Ochoa, José Luis Pérez-Gracia, et al. Polly Matzinger's “danger model” finds its predicted danger-denoting self moieties, *Inmunología*, Volume 27, Issue 4, 2008, Pages 205-211.
178. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, et al. Tumor-Reactive CD4(+) T Cells Develop Cytotoxic Activity and Eradicate Large Established Melanoma After Transfer Into Lymphopenic Hosts. *J Exp Med* (2010) 207(3):637–50.
179. Wang K, Shen T, Siegal GP, Wei S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol.* 2017 Nov;69:110-117.
180. Lewis Au, Emine Hatipoglu, Marc Robert de Massy et al. Determinants of anti-PD-1 response and resistance in clear cell renal cell carcinoma, *Cancer Cell*, Volume 39, Issue 11, 2021, Pages 1497-1518.e11.
181. Wang J, Tu W, Qiu J, Wang D. Predicting prognosis and immunotherapeutic response of clear cell renal cell carcinoma. *Front Pharmacol.* 2022 Oct 14;13:984080.

182. Choi J, Lee SY. Clinical Characteristics and Treatment of Immune-Related Adverse Events of Immune Checkpoint Inhibitors. *Immune Netw.* 2020 Feb 17;20(1):e9.
183. Kumar B, Ghosh A, Datta C et al. Role of PDL1 as a prognostic marker in renal cell carcinoma: a prospective observational study in eastern India. *Therapeutic Advances in Urology.* 2019;11.
184. Möller K, Fraune C, Blessin NC, Lennartz M et al. Tumor cell PD-L1 expression is a strong predictor of unfavorable prognosis in immune checkpoint therapy-naive clear cell renal cell cancer. *Int Urol Nephrol.* 2021 Dec;53(12):2493-2503.
185. Deng, S., He, S.y., Zhao, P. *et al.* The role of oncostatin M receptor gene polymorphisms in bladder cancer. *World J Surg Onc* 17, 30 (2019).
186. Wei, Shuzhang & Chen, Yin & Shi, Xiaokai & Zuo, Li & Zhang, Lifeng. (2023). OSM May Serve as a Biomarker of Poor Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Promote Tumor Cell Invasion and Migration. *International Journal of Genomics.* 2023. 1-15.
187. Lee BY, Hogg EKJ, Below CR, et al. Heterocellular OSM-OSMR signalling reprograms fibroblasts to promote pancreatic cancer growth and metastasis. *Nat Commun.* 2021 Dec 17;12(1):7336.
188. Guo Q, Guan GF, Cao JY, Zou CY, Zhu C, et.al. Overexpression of oncostatin M receptor regulates local immune response in glioblastoma. *J Cell Physiol.* 2019 Sep;234(9):15496-15509.
189. Lanitis E, Irving M, Coukos G. Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. *Curr Opin Immunol.* 2015 Apr;33:55-63.
190. Wang, S., Wu, J., Shen, H. *et al.* The prognostic value of IDO expression in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 20, 471 (2020).
191. Jancewicz I, Szarkowska J, Konopinski R, Stachowiak M, Swiatek M, Blachnio K, et al. PD-L1 Overexpression, SWI/SNF Complex Deregulation, and Profound Transcriptomic Changes

Characterize Cancer-Dependent Exhaustion of Persistently Activated CD4+ T Cells. *Cancers* (Basel). 2021 Aug 18;13(16):4148.

192. Sun, C., Dobi, A., Mohamed, A. *et al.* *TMPRSS2-ERG* fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates *C-MYC* and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene* **27**, 5348–5353 (2008).

193. Choong OK, Jakobsson R, Bergdahl AG, Brunet S, Kärmander A, et al. (2023) SARS-CoV-2 replicates and displays oncolytic properties in clear cell and papillary renal cell carcinoma. *PLoS ONE* 18(1): e0279578.

Spis Tabel i Rysunków

Spis Rysunków:

Rys.1.Schemat prezentujący prawą nerkę z guzem.....	12
Rys.2.Schemat przedstawiający najczęstsze lokalizacje przerzutów odległych jasnokomórkowego raka nerki.....	15
Rys.3. Schematyczny rysunek prezentujący mutację genu VHL i jej skutki w jasnokomórkowym raku nerki.....	17
Rys.4.Schemat przedstawiający staging jasnokomórkowego raka nerki.....	24
Rys. 5. Schemat obrazujący interakcję komórki nowotworowej z limfocytym T.....	29
Rys. 6. Schemat przedstawiający proces immunoedycji nowotworów.....	32
Rys. 7. Schemat prezentujący podział nowotworów ze względu na nacieki limfocytarne.....	34
Rys.8. Schemat prezentujący niektóre z funkcji onkostatyny M i jej receptora - OSMR.....	37
Rys.9. Schemat przedstawiający mechanizm działaniaIDO-1.....	40
Rys. 10. Schemat prezentujący proces odparafinowania.....	47
Rys. 11. Podział pacjentów na grupy.....	51
Rys. 12. Udział płci w grupie badanej.....	52
Rys. 13. Udział stopni złośliwości histologicznej (Grade) w grupie badanej.....	52
Rys. 14. Udział poszczególnych stopni cechy T u pacjentów.....	53
Rys. 15.Wykresy kołowe przedstawiające ilość kobiet i mężczyzn chorych na ccRCC w poszczególnych grupach.....	56
Rys. 16. Ekspresja genu OSMR w próbkach pierwotnego ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (A), w zależności od stopnia złośliwości G (B), w zależności od stadium zaawansowania (C) oraz w zależności od płci (D).....	57
Rys. 17.Analiza ilości białka OSMR w próbkach klinicznych pierwotnego ccRCC w zależności od podziału na grupy: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci,	

którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC. Analiza ilości białek metodą IHC w grupach w porównaniu z tkanką zdrową (A), analiza statystyczna ilości białka OSMR w komórkach ccRCC we wszystkich grupach badanych (B).....	58
Rys. 18. Analiza ilości limfocytów T naciekających guza w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC (A). Ilość białka OSMR w limfocytach naciekających nowotwór w tych grupach (B).....	60
Rys. 19. Analiza ilości białka OSMR w limfocytach T. Strzałki wskazują skupiska limfocytów T z pozytywnym barwieniem dla OSMR.....	61
Rys. 20. Ekspresja genu IDO1 w próbkach pierwotnego ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (A), w zależności od stopnia złośliwości G (B), w zależności od stadium zaawansowania (C) oraz w zależności od płci (D).....	62
Rys. 21. Przykładowe barwienie IHC z użyciem przeciwciał anti-IDO1 w zdrowej tkance nerki i w komórkach nowotworowych ccRCC.....	63
Rys. 22. Ilość IDO1 w pierwotnym guzie ccRCC w endotelium w próbce od pacjenta, u którego nie nastąpiła wznowa (P1) oraz od pacjenta z chorobą pierwotnie przerzutową (P2) (A), ilość wybarwionych przestrzeni/naczyń w guzie ccRCC w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsianym ccRCC (B).....	64
Rys. 23. Analiza ilości białka IDO1 w limfocytach T naciekających nowotwór w tkance nowotworowej pacjentów z rozpoznaniem ccRCC.....	65
Rys. 24. Ekspresja genu Tmprss2 w próbkach pierwotnego ccRCC w porównaniu z tkanką zdrową (A), w zależności od stopnia złośliwości G (B), w zależności od stadium zaawansowania (C) oraz w zależności od płci (D).....	66

Rys. 25. Ilość Tmprss2 w pierwotnym guzie ccRCC w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsiałym ccRCC - przykładowe barwienie (A), analiza statystyczna ilości wybarwionych komórek (B).....67

Rys. 26. Ilość Tmprss2 w limfocytach T naciekających nowotwór ccRCC w grupach pacjentów: pacjenci, którzy do 5 lat od resekcji guza nie mieli wznowy, pacjenci, którzy mieli wznowę do 5 lat i pacjenci z pierwotnie rozsiałym ccRCC, przykładowe barwienie, strzałki wskazują wybarwione pozytywnie limfocyty T (A), analiza statystyczna ilości wybarwionych komórek (B).....68

Spis Tabel:

Tabela 1. Stopnie złośliwości histologicznej (grading) ccRCC wg Furhamann'a i WHO.....	13
Tabela 2. Klasyfikacja wg. TNM jasnokomórkowego raka neki.....	25
Tabela 3. Materiały wykorzystane w procesie odparafinowania i immunohistochemii.....	44
Tabela 4. Przeciwciała użyte do badań i warunki ich wykorzystania.....	48
Tabela 5. Charakterystyka grupy badanej.....	50
Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej z podziałem na grupy.....	54
Tabela 7. Średni wiek w badanych grupach.....	56
Tabela 8. Zestawienie ekspresji badanych białek u pacjentów z ccRCC.....	69
Tabela 9. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCC każdej z badanych grup pacjentów.....	70
Tabela 10. Udział ekspresji OSMR na limfocytach T w każdej z badanych gru.....	70
Tabela 11. Udział ilości proteazy TMPRSS2 w każdej z badanych grup.....	71
Tabela 12. Udział ilości białka IDO-1 w komórkach nowotworowych ccRCC w każdej z badanych grup.....	71
Tabela 13. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	72
Tabela 14. Udział ilości białka OSMR na libcoytach T w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	73
Tabela 15. Udział ilości proteazy TMPRSS2 w komórkach nowotworowych ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	73
Tabela 16. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	74

Tabela 17. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	74
Tabela 18. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCC w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	75
Tabela 19. Udział ilości białka OSMR na limfocytach T w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	76
Tabela 20. Udział ilości proteazy TMPRS2 w komórkach ccRCC w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	77
Tabela 21. Udział ilości białka IDO-1 w zależności od cechy T w skali TNM w grupie pacjentów ze wznową nowotworową.....	77
Tabela 22. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z wznową nowotworową.....	78
Tabela 23. Udział ilości białka OSMR w komórkach ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	79
Tabela 24. Udział ilości białka OSMR na limfocytach T w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	79
Tabela 25. Udział ilości proteazy TMPRSS2 w komórkach nowotworowych ccRCC w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	80
Tabela 26. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	80
Tabela 27. Korelacja Kendalla zmiennych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w skali Grade w grupie pacjentów z chorobą przerzutową.....	81
Tabela 28. Udział ekspresji OSMR cytoplazmatycznego w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	82

Tabela 29. Udział ekspresji OSMR na limfocytach T w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	82
Tabela 30. Udział ekspresji TMPRSS2 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	83
Tabela 31. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	83
Tabela 32. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą pierwotnie przerzutową.....	84
Tabela 33. Udział ilości białka OSMR w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	85
Tabela 34. Udział ilości białka OSMR na limfocytach T w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	85
Tabela 35. Udział ekspresji TMPRSS2 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	86
Tabela 36. Udział ekspresji IDO1 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	86
Tabela 37. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej w grupie chorych z chorobą ograniczoną do narządu.....	87
Tabela 38. Udział ekspresji OSMR w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	87
Tabela 39. Udział ekspresji OSMR na limfocytach w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	88
Tabela 40. Udział ekspresji TMPRSS2 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	88

Tabela 41. Udział ekspresji IDO-1 w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	89
Tabela 42. Korelacja Kendalla dla zmiennych w zależności od cechy T skali TNM w grupie pacjentów z chorobą ograniczoną do narządu.....	89