
lek. Sumit Sharma

**Analiza wartości prognostycznej markerów molekularnych
raka nerkowokomórkowego z czopem w układzie żylnym**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. i n. o zdr. Łukasz Zapała

Klinika Urologii Ogólnej, Onkologicznej i Czynnościowej Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2026 r.

Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Czop nowotworowy powstający w układzie żylnym (ang. venous tumor thrombus, VTT), związany z rakiem nerkowokomórkowym (ang. renal cell carcinoma, RCC), stanowi oddzielny kompartment w obrębie nowotworu. Znajduje się w pierwszej linii kontaktu z układem krwionośnym i pozostaje w ciągłej interakcji z komórkami krwi gospodarza. Komórki odpowiedzi immunologicznej krwi mogą potencjalnie oddziaływać na VTT, wpływając na jego biologię i modyfikując jego mikrośrodowisko. Mimo rosnącej liczby publikacji aktualizujących wiedzę na temat leczenia raka nerki z VTT, nadal brakuje jego kompleksowej charakterystyki, zwłaszcza w zakresie biologii i unikalnego mikrośrodowiska. W niniejszej rozprawie opisano aktualne koncepcje dotyczące powstawania czopów żylnych raka nerki, ich histopatologii, mikrośrodowiska immunologicznego oraz cech genetycznych i molekularnych, które mogą mieć potencjalny wpływ na rokowanie i inspirować rozwój nowoczesnych terapii zindywidualizowanych. Chociaż skomplikowane, wielospecjalistyczne leczenie operacyjne pozostaje podstawową metodą leczenia RCC z VTT, ostatnie postępy w badaniach nad biologią raka i jego mikrośrodowiskiem rzucają nieco światła na nowe perspektywy na przyszłość, które być może poprawią nie tylko wyniki onkologiczne, ale także bezpieczeństwo pacjentów. W swojej pracy skupiłem się na ocenie ekspresji nowoczesnych markerów immunologicznych: liganda-1 glikoproteiny P-selektyny (ang. P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) oraz cytoplazmatycznego stymulatora genów interferonu (ang. Stimulator of Interferon Genes, STING), w grupie pacjentów z pierwotnym RCC z VTT, w połączeniu z oceną leukocytów naciekających nowotwór (ang. tumor infiltrating leukocytes, TILs) w dwóch kompartmentach, tj. guzie pierwotnym oraz czopie nowotworowym. Jednocześnie oceniany był związek wyżej wymienionych z koekspresją innych markerów immunologicznych, tj. supresora aktywacji komórek T z domeną V (ang. V-domain Ig Suppressor of T-cell Activation, VISTA) oraz liganda receptora programowanej śmierci 1 (ang. Programmed Death-Ligand 1, PD-L1).

Materiały i metody

Kohorta

Badana grupa składała się z 82 pacjentów z pierwotnym jasnokomórkowym RCC (ang. clear-cell RCC, ccRCC) z czopem w układzie żylnym (w stadium klinicznego zaawansowania cT3a lub wyższym) leczonych operacyjnie poprzez wykonanie nefrektomii z trombektomią i ewentualnie kawotomią (jeżeli istniały ku temu wskazania) w latach 2012-2019 w dwóch klinicznych ośrodkach urologicznych. Przed leczeniem chirurgicznym nie zastosowano żadnego dodatkowego leczenia neoadjuwantowego. Leczenie operacyjne przeprowadzono

metodą klasyczną na drodze laparotomii lub lumbotomii. Badana grupa obejmowała również przypadki cN1, u których wykonano jednocześnie limfadenektomię, natomiast przypadki z przerzutami leczono *a priori* chirurgicznie, próbując usunąć wszystkie zmiany nowotworowe lub wykonując nefrektomię cytoredukcyjną. Zebrano następujące dane od pacjentów: wiek, płeć, stadium nowotworu na podstawie tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego klatki piersiowej, jamy brzusznej i miednicy mniejszej zgodnie z systemem klasyfikacji TNM (z ang. Tumor-Node-Metastasis) z 2017 r. (wersja AJCC) [1], przedoperacyjne dane hematologiczne z morfologii krwi obwodowej (liczba neutrofili, płytek krwi, limfocytów, monocytów wraz z odpowiednimi stosunkami: stosunek neutrofilów do limfocytów (ang. neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR)), stosunek limfocytów do monocytów (ang. lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR)) oraz stosunek płytek krwi do limfocytów (ang. platelet-to-lymphocyte ratio (PLR))), uzyskanych z lokalnych certyfikowanych laboratoriów (FACS, Sysmex XM200, Sysmex Polska, Polska), wyniki badań histo-patologicznych, a także wyniki dotyczące przeżycia z lokalnych baz danych instytucjonalnych. W przypadku braku odpowiednich informacji przeprowadzano wizyty telemedyczne celem ich uzupełnienia.

Badanie zostało przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o numerze AKBE/72/2021. Od wszystkich pacjentów biorących udział w badaniu uzyskano świadomą zgodę.

Mikromacierze tkankowe i immunohistochemia

Preparaty ccRCC barwione hematoksyliną i eozyną, pobrane z guza nerki i czopa nowotworowego, zostały zbadane przez dwóch patologów (R.P. i M.K.). Systemy punktacji użyte do oceny cech sarkomatoidalnych/rabdoidalnych i martwicy guza były binarne (obecne vs. nieobecne). Wszystkie przypadki zostały zbadane pod kątem obecności komórek odpornościowych związanych z guzem pierwotnym (TILs). Wybrano reprezentatywne obszary zawierające komórki nowotworowe i TILs. Mikromacierze tkankowe (ang. Tissue Microarrays, TMA), zawierające reprezentatywne próbki pierwotnej masy nowotworowej i nowotworowego czopa żylnego z 82 przypadków ccRCC zostały utworzone za pomocą ręcznego urządzenia Tissue Arrayer MTA-1 (Beecher Instruments, Inc., Sum Prairie, WI, USA), przy użyciu igieł o średnicy 1,5 mm, pobierając 3 próbki zarówno z czopa żylnego (dwie obwodowe, jedna centralna), jak i z guza nerki [2]. Mikromacierze tkankowe zostały pocięte na skrawki o grubości 5 µm do badań immunohistochemicznych [2, 3]. Następnie uzyskane TMA zostały wybarwione przeciwciałem anti-PSGL-1 (klon KLP-1, rozcieńczenie 1:200, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-VISTA (klon D5L5T, rozcieńczenie 1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) i/lub przeciwciałem anti-PD-L1 (klon 22c3, rozcieńczony w stosunku 1:50, DAKO, Agilent, CA, USA). Ekspresję PSGL-1 oceniono oddzielnie w komórkach guza (ang. Tumor Cells, TC) i TILs w obu kompartmentach nowotworowych. Następnie przygotowane mikromacierze wybarwiono przeciwciałem anti-STING (klon OTI4E12; rozcieńczenie 1:100, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ekspresję PD-L1 i VISTA oceniono zgodnie z opisaną wcześniej metodyką [3, 4]. Rdzenie zawierające tkanki migdałków i łożyska służyły jako kontrola pozytywna, natomiast próbki wątroby służyły jako kontrola

negatywna [5]. Ekspresję STING w cytoplazmie i błonie komórkowej TC oceniono przez obliczenie wyniku H (w zakresie od 0 do 300), uzyskanego poprzez pomnożenie odsetka dodatnich (0-100%) przez intensywność barwienia (ocenianą jako 0, 1+, 2+, 3+) zgodnie z wcześniej opisanym schematem [6]. Barwienie cytoplazmatyczne komórek nowotworowych zostało poddane kwantyfikacji, przy czym komórki odpornościowe i śródbłonkowe służyły jako wewnętrzne kontrole pozytywne. Zastosowano próg ekspresji STING wynoszący H-score >100 (wysoki vs. niski), ponieważ stwierdzono, że jest to wartość 75. percentyla dla ekspresji STING w VTT. Ponadto obecność TILs oceniano dychotomicznie jako obecną (co najmniej 1% leukocytów TILs w zrębie) lub nieobecną (mniej niż 1% leukocytów TILs w zrębie). Wartość graniczna 1% została zastosowana ze względów praktycznych, ponieważ pozwala ona na rozróżnienie nowotworów bez leukocytów od nowotworów z co najmniej niewielką infiltracją, co zapewnia powtarzalność oceny. Odsetek komórek pozytywnych każdego typu został oceniony przez 2 patologów posiadających doświadczenie w uropatologii (RP i MK). Ostateczne wyniki uzgodniono po dyskusji.

Statystyka

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 13.3 (TIBCO, Palo Alto, Kalifornia, USA; licencja udzielona Uniwersytetowi Medycznemu w Gdańsku) oraz R statistical environment [7]. Związki między zmiennymi kategorycznymi PSGL-1 oceniono za pomocą testu χ^2 lub dokładnego testu Fishera (ang. Fisher's exact test), jeżeli miało to zastosowanie. Zmienne ciągłe analizowano przy użyciu testu Wilcoxona, testu Kruskala-Wallisa lub korelacji Spearmana, w zależności od przypadku. Krzywe Kaplana-Meiera wyznaczono przy użyciu pakietu „survimer” i porównano za pomocą testu log-rank [8]. Współczynniki ryzyka obliczono za pomocą modelu regresji proporcjonalnego hazardu (ang. Cox proportional hazards regression). Przeżycie całkowite (ang. Overall Survival, OS) określono jako okres między rozpoznaniem a zgonem z jakiegokolwiek przyczyny. Jednoczynnikową analizę przeżycia STING przeprowadzono za pomocą krzywych Kaplana-Meiera i porównano za pomocą testu log-rank. Wieloczynnikową analizę przeżycia przeprowadzono za pomocą regresji proporcjonalnego hazardu Coxa i analizy wariancji kolinearności (ang. Variance Inflation Factor, VIF). Wizualizacje danych przeprowadzono przy użyciu pakietów ggplot2 i survminer w R [8]. Wszystkie testy uznano za statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$.

Wyniki

Ekspresja PSGL-1 różniła się w analizowanych kompartmentach. Odnotowano większą częstotliwość występowania PSGL-1 w komórkach guza w obrębie czopu nowotworowego ($p < 0,0001$), ale i komórkach odpornościowych związanych z guzem w samym nowotworze pierwotnym ($p < 0,0001$). Dodatni wynik PSGL-1 na komórkach guza korelował z wysokim stopniem złośliwości histopatologicznej ($p = 0,017$), natomiast wynik PSGL-1 na komórkach

odpornościowych naciekających guz był związany z martwicą nowotworu ($p=0,014$). Jednoczynnikowa analiza przeżywalności wykazała, że dodatni wynik PSGL-1 w komórkach nowotworowych guzów pierwotnych i TILs w czopach są związane z gorszym rokowaniem co do czasu OS.

Z kolei częstość ekspresji STING w obu analizowanych kompartmentach była podobna ($p=0,18$). Jego obecność nie korelowała z żadnymi cechami kliniczno-patologicznymi, z wyjątkiem obecności martwicy w VTT ($p=0,0023$). Ekspresja PD-L1 w guzie pierwotnym była związana z obecnością ekspresji STING w komórkach nowotworowych w tym samym kompartmentcie ($p=0,02$), ale nie w czopie. Natomiast ekspresja VISTA korelowała z obecnością ekspresji STING w VTT ($p=0,049$). Obecność TILs była związana z dodatnią ekspresją PD-L1 ($p=0,008$) i STING ($p<0,05$) w guzie pierwotnym. Silna ekspresja STING w VTT była związana z gorszym wynikiem OS ($p=0,0061$). Ponadto, obecność TILs okazała się istotnym czynnikiem prognostycznym dla OS zarówno w guzie pierwotnym ($p=0,021$), jak i w VTT ($p=0,034$).

Wnioski

Zwiększona ekspresja PSGL-1 w nowotworowych czopach w układzie żylnym sugeruje jego potencjalną rolę w ułatwianiu interakcji komórek guza z płytkami krwi i śródbłonkiem, przyczyniając się do rozprzestrzeniania przerzutów i może odpowiadać za gorsze wyniki leczenia. Wykazano ponadto wartość prognostyczną ekspresji STING we współczesnej kohorcie pacjentów z RCC i VTT. Ocena występowania TILs okazała się szczególnie cennym narzędziem rokowniczym, które można łatwo wdrożyć w rutynowej ocenie patologicznej. Wykorzystanie zastosowanych w pracy biomarkerów może pomóc w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych i spersonalizowania metod leczenia pacjentów z RCC z współwystępującym VTT.