

Lek. med. Agnieszka Ida

**Mutacje genu VHL u pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki  
w populacji Wielkopolski**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Promotorzy:**

**Prof. UAM dr hab. inż. Joanna Wesoly**

**Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kwias**

Katedra i Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2013



Serdeczne podziękowania pragnę złożyć  
Profesorowi Zbigniewowi Kwiasowi  
za pomoc i życzliwość jaką mnie obdarzał  
oraz za motywację podczas pisania niniejszej  
rozprawy.

Wyrazy wdzięczności kieruję do  
Profesor Joanny Wesoły  
za przyjęcie mnie do zespołu badawczego  
oraz za cenne wskazówki.

Elżbiecie Zodro dziękuję  
za pomoc, jaką mi okazała  
podczas stawiania pierwszych kroków  
w dziedzinie biologii molekularnej.

Rodzinie dziękuję  
za cierpliwość i wyrozumiałość.  
Szczególne podziękowania  
mojemu mężowi za wsparcie.

## Spis skrótów użytych w tekście

AJCC	Amerykańska Połączona Komisja do Spraw Raka
APTT	czas kaolinowo – kefalinowy
BMI	wskaźnik masy ciała
ccRCC	rak jasnokomórkowy nerki
cDNA	sekwencja kodująca kwasu dezoksyrybonukleinowego
CSS	przeżycia związane z rakiem
DFS	przeżycie wolne od choroby
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
EAU	Europejskie Towarzystwo Urologiczne
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
EORTC	Europejska Organizacja do Badań i Leczenia Raka
EPO	erytropoetyna
G	stopień złośliwości komórkowej nowotworu
HIF $\alpha$	czynniki indukowane hipoksją $\alpha$
HIFU	ablacja zorganizowaną wiązką ultradźwiękową
HLRCC	zespół wrodzonej mięśniakowatości i raka nerki
HPRCC	dziedziczny brodawkowaty rak nerkowo komórkowy
IFN - $\alpha$	interferon alfa
IL - 2	interleukina – 2
INR	wystandaryzowany współczynnik czasu protrombinowego
kDa	kilodalton
LOH	utrata heterozygotyczności
LPN	laparoskopowa częściowa nefrektomia
MRI	rezonans magnetyczny
mRNA	informacyjny kwas rybonukleinowy
mTOR	kinaza serynowo - treoninowa
NK	komórki naturalnej cytotoksyczności
NSS	chirurgia oszczędzająca mięśnierz nerki
OB	odczyn Biernackiego
OS	całkowite przeżycia
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy

## Spis skrótów

---

PDGF - $\beta$	płytko-pochodny czynnik wzrostu $\beta$
PDGFR	receptor płytko-pochodnego czynnika wzrostu
pVHL	białko von Hippel – Lindau
RAPN	częściowa resekcja nerki przy asyście robota
RCC	rak nerkowokomórkowy nerki
RFA	przezskórna ablacja wiązką radiową
RTG	rentgenografia
STAT	przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
TGF- $\alpha$	transformujący czynnik wzrostu
TK	tomografia komputerowa
TNF	czynnik martwicy nowotworu
TNM	guz, węzły chłonne, przerzuty
UAM	Uniwersytet Adama Mickiewicza
UICC	Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem
USG	ultrasonografia
VEGF	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
VEGFR	receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu
VHL	von Hippel – Lindau
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia

## Spis treści

Spis skrótów użytych w tekście .....	4
1. Wstęp.....	9
1.1. Rak nerki.....	9
1.1.1. Epidemiologia.....	9
1.1.2. Etiologia.....	10
1.1.3. Klasyfikacja raka nerki.....	11
1.1.3.a. Klasyfikacja histologiczna.....	11
1.1.3.b. Klasyfikacja kliniczna.....	12
1.1.4. Rozpoznanie raka nerki.....	14
1.1.5. Leczenie zabiegowe raka nerki.....	16
1.2. Rola genu VHL.....	22
1.2.1. Budowa oraz funkcje genu VHL i białka VHL.....	22
1.3. Mutacje genu VHL.....	26
1.3.2. Mutacje germinalne genu VHL.....	27
1.3.2.a. Zespół von Hippel – Lindau.....	28
1.3.3. Mutacje somatyczne w sporadycznym raku nerki.....	30
1.4. Terapia celowana przerzutowego raka jasnokomórkowego nerki.....	32
2. Cele pracy .....	37
3. Materiał i metody.....	38
3.1. Pacjenci.....	38
3.2. Metody.....	41
3.2.1. Pobieranie próbek.....	41
3.2.2. Wykaz stosowanej aparatury, odczynników oraz roztworów.....	41
3.2.3. Izolacja DNA z wykorzystaniem metody wysalania.....	45
3.2.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) do amplifikacji DNA.....	46
3.2.5. Kontrolne PCR.....	48
3.2.6. Zastosowanie elektroforezy żelowej w celu rozdzielania produktów PCR.....	49
3.2.7. Oczyszczanie produktów PCR.....	50
3.2.8. Sekwencjonowanie.....	50
3.2.9. Analiza sekwencji.....	51

3.2.10. Klonowanie produktu PCR. ....	51
3.3. Analiza statystyczna. ....	53
4. Wyniki .....	55
4.1. Parametry kliniczne.....	55
4.1.1. Czynniki ryzyka raka nerki w grupie badanej. ....	55
4.1.2. Objawy występujące przed rozpoznaniem raka nerki. ....	56
4.1.3. Choroby współistniejące z rakiem jasnokomórkowym nerki.....	56
4.1.4. Choroby nowotworowe występujące u pacjentów z ccRCC oraz u członków ich rodzin.....	57
4.1.5. Choroby nerek u członków rodzin pacjentów objętych badaniem. ....	59
4.1.6. Stopień zaawansowania i zróżnicowania ccRCC u pacjentów.....	60
4.1.7. Badania laboratoryjne wykonane u pacjentów. ....	62
4.2. Mutacje genu VHL w grupie badanych pacjentów .....	63
4.2.1. Analiza sekwencji genu VHL.....	63
4.2.2. Obecność mutacji w genie VHL u pacjentów z ccRCC. ....	64
4.2.3. Lokalizacja i rodzaje mutacji w genie VHL.....	65
4.2.4. Wpływ mutacji na białko VHL.....	67
4.2.5. Mutacje genu VHL stwierdzone w grupie badanej.....	69
4.3. Analiza statystyczna otrzymanych wyników. ....	71
4.3.1. Ocena wielkości guza nerki w odniesieniu do parametrów klinicznych pacjentów.	71
4.3.2. Analiza stopnia zaawansowania klinicznego w zależności do cech klinicznych pacjentów. ....	80
4.3.3. Ocena stopnia złośliwości nowotworu w odniesieniu do cech klinicznych pacjentów.	86
4.3.4. Analiza parametrów klinicznych w zależności od obecności mutacji genu VHL. ..	89
4.3.6. Analiza parametrów klinicznych w zależności od rodzaju mutacji (somatycznej czy germinalnej).....	96
4.3.7. Analiza parametrów klinicznych w zależności od lokalizacji mutacji w poszczególnych egzonach. ....	97
4.3.8. Analiza parametrów klinicznych w zależności od typu mutacji (punktowa czy z przesunięciem ramki odczytu). ....	98
5. Omówienie. ....	101
6. Wnioski.....	118
7. Streszczenie.....	119
8. Streszczenie w języku angielskim.....	122

## Spis treści

---

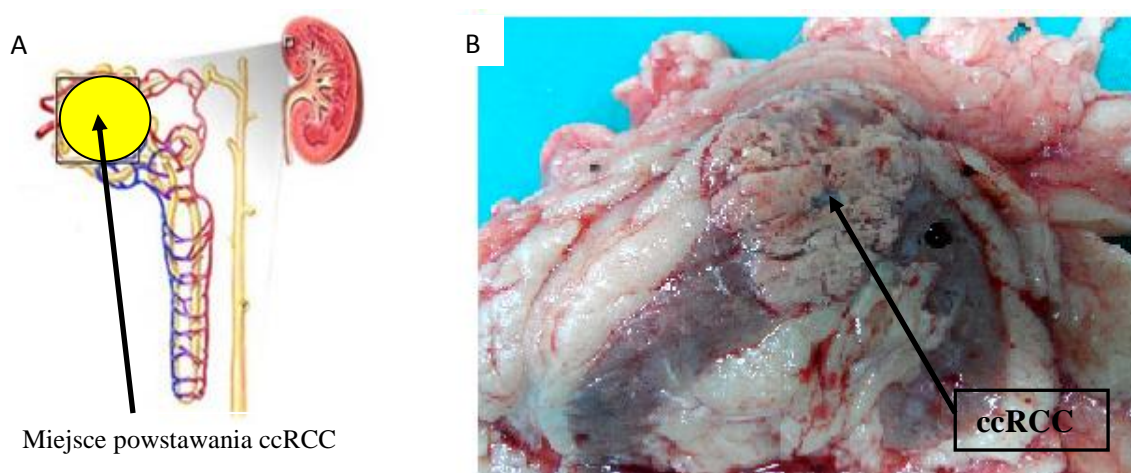
9. Spis tabel.....	125
10. Spis rycin. ....	127
11. Piśmiennictwo. ....	130
12. Załączniki.....	152



## 1. Wstęp

### 1.1. Rak nerki.

Rak nerki nazywany rakiem nerkowokomórkowym, z ang. renal cell carcinoma (RCC) jest gruczolakorakiem wywodzącym się z komórek nabłonka kanalików nerki. Jest to nowotwór złośliwy składający się z wielu podtypów różniących się podłożem molekularnym, i z których najczęstszym typem jest rak jasnokomórkowy, z ang. clear cell renal cell carcinoma (ccRCC).



**Rycina 1.** A. Na schemacie przedstawiono fragment kory nerki zawierający budowę nefronu, strzałką pokazano kanaliki proksymalne nerki, które są miejscem powstawania ccRCC. B. Zdjęcie przedstawiające nerkę z rakiem jasnokomórkowym [materiał własny pacjenta 01-032].

#### 1.1.1. Epidemiologia.

Wśród ludności Unii Europejskiej drugą przyczyną zgonu osób dorosłych są nowotwory złośliwe. W ostatnich 20 latach odsetek zgonów z powodu chorób nowotworowych zwiększył się (wg Eurostat, 2011) [1]. W 2008 roku na świecie odnotowano 12,7 miliona nowych zachorowań na nowotwory złośliwe, zmarło z tego powodu 7,6 miliona osób. Rak nerki występuje stosunkowo rzadko, w 2008 roku odnotowano 273 518 nowych zachorowań na świecie, co stanowi 2,2% wśród wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe. Wśród nowo wykrywanych nowotworów RCC zajmuje 11 miejsce u mężczyzn, a 15 miejsce u kobiet (wg GLOBOCAN, 2008) [2].

W porównaniu z populacją na całym świecie, rak nerki występuje znacznie częściej w krajach wysokorozwiniętych, co może mieć związek z większym dostępem

do małoinwazyjnych metod diagnostyki obrazowej: USG, TK, ale także ze zwiększonym narażeniem na czynniki ryzyka rozwoju raka nerki [3]. Na świecie obserwuje się wzrost zachorowań na raka nerki, natomiast w krajach Europy Zachodniej i Skandynawii w ostatnich latach odnotowano stabilizację zachorowalności i spadek umieralności [4].

W Polsce w 2009 roku na raka nerki zachorowało 2733 mężczyzn i 1866 kobiet, natomiast zmarło 1553 mężczyzn i 984 kobiety. W Wielkopolsce w 2009 roku nowotwory nerek rozpoznano u 263 mężczyzn i u 183 kobiet (wg Krajowej Bazy Danych Nowotworowych) [5]. Szczyt zachorowań u obu płci przypada na szóstą i siódmą dekadę życia [6], jednak RCC występuje u pacjentów w każdym wieku, również u dzieci.

### **1.1.2. Etiologia.**

Etiologia raka nerki nie została wyjaśniona. Wymienia się wiele czynników predysponujących do RCC. Wśród nich największe znaczenie ma palenie tytoniu. U palaczy ryzyko jest od 1,5 do 2 razy większe, zależnie od czasu i ilości wypalanych papierosów i zmniejsza się po zaprzestaniu palenia, szacunkowo 15% po 10 latach przerwy. [7, 8]. Otyłość ma również udowodnione działanie niekorzystne, podobnie jak dieta wysokobiałkowa i tłuszczowa oraz siedzący tryb życia; spożywanie dużej ilości warzyw i owoców natomiast, ma działanie ochronne [9, 10].

Wśród czynników ryzyka raka nerki wymienia się nadciśnienie tętnicze, które niezależnie od płci zwiększa ryzyko 2-3 razy, co potwierdzono w badaniu EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) [11]. Przyjmowanie leków obniżających ciśnienie tętnicze, w tym diuretyków, także może mieć wpływ na powstawanie raka nerki [12].

Wpływ narażenia na szkodliwe substancje podczas wykonywania pracy zawodowej jest przedmiotem wielu publikacji. Dotychczas uważano, że praca z azbestem predysponuje do RCC [13], ostatnio pojawiły się prace dementujące to stanowisko [14]. Zauważono zwiększone występowanie raka nerki wśród rolników, zwłaszcza pracujących przy hodowli zwierząt [15]. Do czynników ryzyka zaliczany jest również kadm, trichloroetylen, promieniowanie jonizujące [16], jednak wpływ tych substancji wymaga dalszych badań.

Zwyrodnienie wielotorbielowate nerek także koreluje z powstawaniem RCC. Dotyczy to chorych na wrodzone wielotorbielowate zwyrodnienie nerek oraz na nabytą wielotorbielowatość nerek. Istotne znaczenie ma dializoterapia; im dłużej chory jest dializowany tym większe ryzyko rozwoju raka nerki [17].

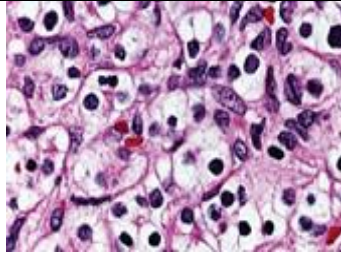
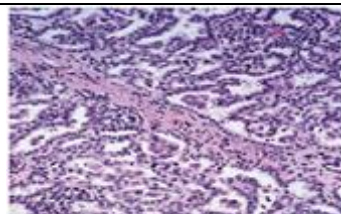
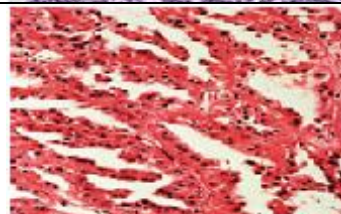
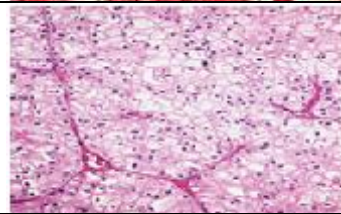
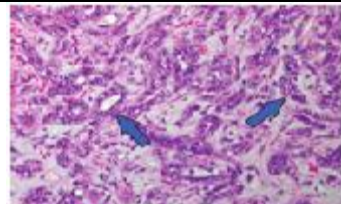
Odnotowano także rodzinne występowanie raka nerki. Posiadanie krewnego pierwszego stopnia, u którego rozpoznano RCC zwiększa ryzyko wystąpienia raka nerki dwu – czterokrotnie [18]. Dziedziczna postać raka nerki występuje w zespole von Hippel – Lindau, w zespole Birth – Hogg – Dube, stwardnieniu guzowatym, w dziedzicznym brodawkowatym RCC (HPRCC) oraz w zespole wrodzonej mięśniakowatości i raka nerki (HLRCC). Dziedziczny RCC występuje rzadko (3-4%) i zazwyczaj pojawia się w młodym wieku, często jest wieloogniskowy i obustronny [19].

### **1.1.3. Klasyfikacja raka nerki.**

#### **1.1.3.a. Klasyfikacja histologiczna.**

Na podstawie badań genetycznych oraz histologicznych w 1997 roku w Heidelbergu utworzono klasyfikację, w której wyróżniono cztery typy raka nerki: najczęstszy rak jasnokomórkowy (70 – 80%), rak brodawkowy (10 – 15%), który podzielono jeszcze na dwa podtypy, rzadziej występujący rak chromofobny (3 – 5%) oraz najrzadszy rak z kanalików zbiorczych (1%) [20,21]. Różnice dotyczące typów raka nerki zebrano w **tabeli 1**.

Stopień zróżnicowania nowotworu określonego z ang. G – grading został usystematyzowany przez Fuhrman'a w 1982 roku i jest powszechnie uznawany za niezależny czynnik prognostyczny w raku nerki [22]. System oparty jest na ocenie jąder komórkowych (wielkość, kształt) oraz jąderek. Fuhrman wyróżnił cztery stopnie: od G1 dla nowotworów dobrze zróżnicowanych, o małych, okrągłych jądrach bez jąderek do G4 dla nowotworów niezróżnicowanych, z dużymi jądrami, o nieregularnym kształcie, płatowych, z obecnością wydatnych jąderek.

<p>Rak jasnokomórkowy (konwencjonalny) 70-80%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- komórki duże, owalne</li> <li>- jasna cytoplazma</li> <li>- małe owalne jąderka</li> <li>- dodatkowo występują komórki ziarniste</li> <li>- utkanie lite, cewkowe lub torbielowate</li> </ul>	
<p>Rak brodawkowaty 10 – 15%</p>	<p>Typ 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- struktura brodawkowata</li> <li>- małe komórki z małą ilością cytoplazmy</li> <li>- zasadochłonne komórki</li> </ul>	
	<p>Typ 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- struktura brodawkowata</li> <li>- małe komórki z małą ilością cytoplazmy</li> <li>- kwasochłonne komórki</li> </ul>	
<p>Rak chromofobny 3 – 5%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- przezroczysta cytoplazma z delikatnym siateczkowym wzorem</li> <li>- obecność mikropęcherzyków, które barwią się na niebiesko techniką Hale'a</li> </ul>	
<p>Rak z kanałików zbiorczych (rak Belliniego) 1%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- komórki słabo zróżnicowane, sześciennie</li> <li>- ziarnista cytoplazma</li> <li>- jądra z dużymi jąderkami</li> <li>- wysoka aktywność mitotyczna</li> </ul>	

**Tabela 1.** Histologiczna klasyfikacja raka nerki na podstawie Barrisford GW i wsp. [23].

### 1.1.3.b. Klasyfikacja kliniczna.

Klasyfikacja raka nerki ma ogromne znaczenie przy wyborze metody leczenia oraz oceny rokowania. Obecnie z klinicznego punktu widzenia istnieją dwa podziały: klasyfikacja Robsona z 1969 roku obowiązująca w krajach anglosaskich [24] oraz szeroko stosowana na świecie klasyfikacja TNM.

Nazwa klasyfikacji TNM pochodzi od słów T – Tumor (guz pierwotny), N – Nodules (węzły chłonne) oraz M – Metastases (przerzuty odległe). Klasyfikacja została utworzona przez Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (Union Internationale Contre le Cancer – UICC). Co kilka lat jest ona uaktualniana zgodnie z postępem wiedzy i przy współpracy z gronem ekspertów z American Joint Committee

on Cancer (AJCC) i World Health Organization (WHO). Obecnie obowiązuje klasyfikacja z 2009 roku [25].

Według klasyfikacji TNM z 2009 roku podzielono guzy w zależności od rozmiaru i faktu, czy dany guz jest ograniczony do nerki, czy nacieka sąsiednie tkanki. Literą X oznaczamy sytuację, gdy nie można ocenić guza, stanu węzłów chłonnych lub obecności przerzutów. Natomiast cyfrą 0 oznaczamy stan, gdy nie ma dowodów na istnienie guza pierwotnego, węzły chłonne są niezajęte lub brak przerzutów. Dane dotyczące klasyfikacji TNM zebrano w **tabeli 2**.

<b>T1</b> guz $\leq 7$ cm w największym wymiarze, ograniczony do nerki	<b>T1a</b> guz $\leq 4$ cm
	<b>T1b</b> guz $> 4$ cm ale $\leq 7$ cm
<b>T2</b> guz $> 7$ cm w największym wymiarze, ograniczony do nerki	<b>T2a</b> guz $> 7$ cm ale $\leq 10$ cm
	<b>T2b</b> guz $> 10$ cm
<b>T3</b> guz wrasta do żył, nacieka tłuszcz okołonerkowy lub okolicy wnęki nerki, ale nie przekracza powięzi Geroty	<b>T3a</b> guz wrasta do żyły nerkowej lub nacieka tłuszcz okołonerkowy
	<b>T3b</b> guz wrasta do żyły głównej dolnej poniżej przepony
	<b>T3c</b> guz wrasta do żyły głównej dolnej powyżej przepony
<b>T4</b> guz nacieka struktury poza powięź Geroty włączając nadnercze.	
<b>N1</b> przerzut w pojedynczym regionalnym węzle chłonnym	
<b>N2</b> zajęcie więcej niż jednego węzła chłonnego	
<b>M1</b> obecność przerzutów odległych	

**Tabela 2.** Klasyfikacja TNM z 2009 roku.

Klasyfikacja TNM pozwala ocenić stopień zaawansowania klinicznego nowotworu, co jest najpoważniejszym czynnikiem rokowniczym. Dane przedstawiono w **tabeli 3**.

I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IV	T4	N0-N2	M0
	T1-T4	N2	M0
	T1-T4	N0-N2	M1

**Tabela 3.** Stopień zaawansowania klinicznego raka nerki [25].

### **1.1.4. Rozpoznanie raka nerki.**

#### **1.1.4.a. Symptomatologia.**

Klasyczna triada objawów raka nerki, do której zaliczamy krwimocz, ból okolicy lędźwiowej i guz wyczuwalny przez powłoki brzuszne obecnie spotykana jest rzadko - u zaledwie (6-10%) pacjentów [26]. Po upowszechnieniu się ultrasonografii i tomografii komputerowej ponad 50% guzów nerki wykrywanych jest przypadkowo [27]. W początkowym stadium, rak nerki rozwija się bezobjawowo, a wystąpienie objawów świadczy o zaawansowaniu procesu i jest uznawane za niekorzystny czynnik prognostyczny [28]. Do objawów tych zaliczamy krwimocz, ból okolicy lędźwiowej, spadek masy ciała, gorączkę oraz pocenie nocne. W badaniu fizykalnym można zauważyć żylaki powrózka nasiennego po stronie lewej, powiększone węzły chłonne w okolicy nadobojczykowej lub obrzęk kończyn dolnych.

W opublikowanym w 2012 roku Cancer Statistics w Stanach Zjednoczonych przerzuty odległe miało 18% pacjentów z rozpoznaniem RCC w latach 2001 – 2007 [29]. Typowo rak nerki daje przerzuty do płuc, kości, nadnercza, wątroby i mózgu, ale miejscem przerzutu może być każdy organ, nawet skóra [30,31].

Z występowaniem raka nerki może być związanych szereg objawów paraneoplastycznych, np.: zwiększone OB, nadciśnienie tętnicze, hiperkalcemia, policytemia, amyloidoza, wynikających z funkcji endokrynej raka nerki [32].

#### **1.1.4.b. Diagnostyka obrazowa.**

W diagnostyce guzów nerek najbardziej dostępnym, nieinwazyjnym badaniem jest USG. Ultrasonografia jamy brzusznej pozwala na uwidocznienie guza nerki, określenie jego rozmiaru i położenia. Dzięki USG można ocenić ruchomość nerki z guzem, potwierdzić obecność czopa nowotworowego w żyłę głównej, przerzutów do wątroby oraz powiększenie węzłów chłonnych. Na **rycinie 2** przedstawiono zdjęcie USG z materiału własnego.



**Rycina 2.** USG nerki. Widoczny guz górnego bieguna nerki prawej [materiał własny pacjent 01-034].



**Rycina 3.** TK jamy brzusznej. Widoczny guz nerki prawej. Stan po nefrektomii lewostronnej z powodu ccRCC [materiał własny pacjent 01-131].

W tomografii komputerowej jamy brzusznej guzy lite nerki różnicuje się na podstawie obecności lub braku wzmocnienia po podaniu środka cieniującego. Za guzy złośliwe przyjmują się guzy, które wzmocniają się ponad 20 jednostek Hounsfield'a [33]. Wykonując TK oceniamy wielkość, położenie i szerzenie się guza, choć dokładność oceny nacieku na tkankę tłuszczową jest mała [34]. TK uwidacznia czop nowotworowy w żyłę nerkowej, powiększone węzły chłonne, przerzuty do wątroby i nadnercza. Dzięki temu badaniu możemy ocenić funkcję drugiej nerki. TK jamy brzusznej z podaniem środka cieniującego łącznie z badaniem klinicznym pozwala na podjęcie decyzji o leczeniu. Na **rycinie 3** przedstawiono guz nerki z materiału własnego.

Rezonans magnetyczny wykorzystuje się u pacjentów z alergią na środki cieniujące używane w TK oraz u kobiet w ciąży. Kolejnym wskazaniem do MRI jest niemożliwa ocena w TK zasięgu czopa nowotworowego w żyłę głównej dolnej. Dopełnieniem badań obrazowych jest wykonanie zdjęcia przeglądowego klatki piersiowej celem wykluczenia przerzutów. Przy podejrzeniu przerzutów wykonuje się bardziej czułe badanie, czyli TK klatki piersiowej. Nie zaleca się rutynowej TK mózgu i scyntygrafii kości. Badania te są wykonywane u pacjentów zgłaszających objawy typowe dla przerzutów.

### **1.1.5. Leczenie zabiegowe raka nerki.**

#### **1.1.5.a. Nefrektomia radykalna.**

Jedynym sposobem na wyleczenie raka nerki jest wycięcie zmiany nowotworowej. Nefrektomia radykalna ustanowiona przez Robsona w 1969 roku przestała być złotym standardem postępowania. Według Robsona radykalne usunięcie nerki wykonywano z dostępu przezotrzewnowego i polegało na wczesnym podwiązaniu tętnicy i żyły nerkowej, następnie usunięciu nerki wraz z tłuszczem okołonerkowym i powięzią Geroty, nadnerczem i na końcu wykonaniem rozległej limfadenektomii od przepony po rozwidlenie aorty [24].

Obecnie radykalne usunięcie nerki wykonuje się zarówno z dostępu przezotrzewnowego jak i pozaotrzewnowego, tzw. lędźwiowego [35]. Przy dużych guzach górnego bieguna lub przy obecności czopa nowotworowego powyżej przepony stosuje



się dostęp piersiowo – brzuszny. Pojawienie się technik laparoskopowych umożliwiło laparoskopowe wycięcie nerki zarówno przezotrzewnowo jak i pozaotrzewnowo. Laparoskopowa radykalna nefrektomia stosowana jest w przypadku guzów ograniczonych do nerki, bez czopa nowotworowego i przy niepowiększonych węzłach chłonnych. Przy zachowaniu zasad czystości onkologicznej przeżycie po zbiegu laparoskopowym jest porównywalne do tego po zabiegu otwartym, a czas rekonwalescencji znacznie krótszy [36].

Nie zaleca się rutynowego wycięcia nadnercza. Adrenalectomię wykonuje się przy dużym guzie górnego bieguna nerki lub gdy istnieje podejrzenie przerzutu do nadnercza [37]. Przerzuty do węzłów chłonnych są ważnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Podejście do limfadenektomii jest niejednoznaczne. Zwolennicy podkreślają, że pacjenci z powiększonymi węzłami chłonnymi, po cytoredukcyjnej limfadenektomii mają lepsze wyniki leczenia [38, 39]. Według badania European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC nr30881) rozszerzona limfadenektomia nie wydłuża czasu wolnego od nawrotu ani przeżycia chorych po nefrektomii radykalnej [40].

Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Urologicznego z 2010 roku u pacjentów z guzem T1, nefrektomię radykalną przeprowadza się wtedy, kiedy istnieją przeciwwskazania do częściowej resekcji nerki, np. z powodu niekorzystnego położenia guza, lub z powodu gorszego stanu ogólnego. Należy podkreślić, że radykalne wycięcie nerki nadal pozostaje metodą leczenia u pacjentów z guzem większym niż 7 cm, gdy istnieją podejrzenia nacieku na tkankę tłuszczową, przy występowaniu czopa nowotworowego w żyłę, czyli u pacjentów z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu niż T1. Dobrze udokumentowanym jest fakt, iż wykonanie nefrektomii radykalnej u pacjentów z przerzutami odległymi, w dobrym stanie ogólnym, poprawia wyniki leczenia (więcej na temat w paragrafie I.1.6) [41, 42].

### **1.1.5.b. Operacja organooszczędna.**

Operacja organooszczędna, z ang. nephron sparing surgery (NSS) polega na wycięciu guza z minimalnym marginesem zdrowego miększu nerki. Choć po raz pierwszy częściową resekcję nerki wykonał Vincenz Czerny w 1887 roku [43], do niedawna operacje organooszczędne, ze względu na dużą ilość powikłań, wykonywano jedynie u pacjentów z jedyną nerką, z obustronnym guzem nerek lub gdy druga nerka

była obciążona procesem chorobowym. Powszechnie uważa się, iż dla RCC ograniczonego do nerki, wyniki leczenia dla nefrektomii i operacji organooszczędnej są podobne [44, 45, 46]. Ostatnio ukazały się doniesienia, że pacjenci po radykalnej nefrektomii mają krótsze przeżycie ogólne z powodu większego odsetka przewlekłej niewydolności nerek i chorób krążenia [47, 48]. Dlatego NSS jest zalecana dla leczenia guzów nerki w stopniu T1 wg klasyfikacji TNM [49]. Wykonanie częściowej resekcji nerki z powodu guza większego niż 7 cm wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wznowy miejscowej i może być wykonywane jedynie ze wskazań bezwzględnych (guz jedynej nerki).

Laparoskopowa częściowa nefrektomia, z ang. laparoscopic partial nephrectomy (LPN) może być alternatywą do otwartej operacji organooszczędnej, ale tylko wykonywana w wyselekcjonowanej grupie pacjentów (mały guz położony obwodowo) [50]. Należy podkreślić, że czas niedokrwienia nerki jest dłuższy w zabiegu wykonanym z dostępu laparoskopowego, dlatego u pacjentów z wysokim ryzykiem przewlekłej niewydolności nerek powinno się wykonać klasyczną NSS [51, 52]. Wykorzystanie robota w częściowej resekcji nerki, z ang. robot assisted partial nephrectomy (RAPN) daje możliwość trójwymiarowego obrazu, łatwiejsze jest zakładanie szwów, co pozwala na zmniejszenie czasu niedokrwienia, utraty krwi podczas zabiegu oraz ilości powikłań [53, 54, 55].

### **1.1.5.c. Ablacja guza nerki.**

Techniki małoinwazyjnego leczenia raka nerki polegające na niszczeniu guza poprzez wytworzenie martwicy komórek, obejmują krioablację (zamrażanie) oraz przegrzanie przy pomocy fal radiowych (RFA) lub ultradźwięków (HIFU) [56]. Ablację można wykonać poprzez nakłucie powłok pod kontrolą USG lub przy pomocy laparoskopii, dzięki czemu ilość powikłań jest mała a czas rekonwalescencji bardzo krótki [57]. Ablacji poddaje się położone obwodowo małe guzy (do 3 cm). Ponieważ po ablacji nie ma materiału do badania histopatologicznego, przed zabiegiem należy wykonać biopsję. Brak długoterminowych obserwacji potwierdzających skuteczność tych metod. Sugeruje się, że częstość wznowy miejscowej jest większa niż po operacji organooszczędnej, a rozpoznanie wznowy trudne ze względu na rozwijające się po ablacji włóknienie [58].

Wskazaniem do ablacji może być podeszły wiek, choroby współistniejące będące przeciwwskazaniem do leczenia operacyjnego [59]. Techniki małoinwazyjne mogą mieć również zastosowanie u pacjentów z dziedziczną postacią RCC, u których rak nerki występuje wieloogniskowo. Ablacja może być uzupełnieniem leczenia małych zmian, których nie usunięto w czasie NSS. Przeciwwskazaniem do wykonania ablacji jest położenie guza w sąsiedztwie moczowodu, we wnęce nerki. Bezwzględny przeciwwskazaniem są zaburzenia krzepnięcia niepoddające się leczeniu [60].

### **1.1.5.d. Embolizacja.**

Embolizacja ma na celu zamknięcie naczyń doprowadzających krew do guza, w przypadku raka nerki, tętnicy nerkowej z nakłucia tętnicy udowej. Pod kontrolą rentgenowską wprowadza się cewnik do tętnicy nerkowej, podaje kontrast celem uwidocznienia unaczynienia guza a następnie wprowadza się materiał zamykający tętnicę. Materiałami wykorzystywanymi do embolizacji są skrawki spongostanu, metalowe spirale, balony odczepiane, mieszanina kleju cyjanoakrylowego z lipiodolem oraz alkohol poliwinylowy [61].

Embolizację wykonuje się u pacjentów z przeciwwskazaniami do leczenia operacyjnego lub gdy wycięcie nerki z guzem nie powiodło się. Jest to leczenie paliatywne, mające na celu zmniejszenie dolegliwości bólowych i krwawienia do układu zbiorczego nerki [62]. Dobrze udokumentowanym jest fakt, iż wykonywanie embolizacji przed rutynową nefrektomią radykalną nie wydłuża przeżycia chorych. Ilość powikłań podczas obu zabiegów jest podobna, poza jednym wyjątkiem, przy dużych guzach ilość transfuzji krwi jest mniejsza, gdy przed zabiegiem wykonano embolizację [63]. W związku z tym w wybranych przypadkach można wykonać embolizację przed nefrektomią [64]. Opisano wykonywanie embolizacji przed wycięciem przerzutu do kości celem zmniejszenia krwawienia podczas zabiegu [65].

### **1.1.6. Leczenie przerzutowego raka nerki.**

Biorąc pod uwagę fakt, że tylko leczenie chirurgiczne jest jedyną znaną metodą wyleczenia raka nerki, obowiązuje zasada, według której stosuje się wycięcie zmian nowotworowych, jeżeli jest to możliwe z technicznego punktu widzenia i pacjent jest w dobrym stanie ogólnym. Podkreśla się, że wykonanie nefrektomii radykalnej

w rozsianej chorobie nowotworowej i zastosowanie następnie leczenia systemowego wydłuża przeżycie chorych [66]. Wykonuje się również wycięcie zmian przerzutowych. Poprawę rokowania uzyskuje się po wycięciu wszystkich zmian przerzutowych [67].

Radioterapia jest leczeniem paliatywnym przerzutów do kości lub mózgu celem złagodzenia objawów [68]. Opisano także wykorzystanie stereotaktycznej radiochirurgii w leczeniu przerzutów do mózgu. Zastosowanie tej metody u pacjentów z pojedynczym, nieresekwalnym przerzutem wydłużało przeżycie [69].

Leczenie systemowe raka nerki inaczej niż w przypadku leczenia zabiegowego wprowadza się po histopatologicznym rozpoznaniu typu RCC. Dobrze udokumentowanym jest fakt, iż rak jasnokomórkowy nerki jest oporny na chemioterapię. Ma to związek z produkcją przez komórki guza glikoproteiny P, która usuwa cytostatyki z komórki [70, 71, 72]. Podobnie leczenie hormonalne uważa się za nieskuteczne [73, 74].

Rak jasnokomórkowy nerki jest nowotworem immunogennym. Badania kliniczne i laboratoryjne dowodzą oddziaływania pomiędzy układem odpornościowym a komórkami ccRCC, np. odkrycie antygenów specyficznych dla nowotworu prezentowanych przez glikoproteiny głównego układu zgodności tkankowej i odpowiedzi ze strony limfocytów T CD4+ [75]. Od początku lat 80-tych XX wieku testowano działanie różnych cytokin i komórek odpornościowych. Szereg badań klinicznych pokazało, że do cytokin mających aktywność przeciwnowotworową należą interferon alfa i interleukina – 2.

Interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) należy do grupy białek nazywanych interferonami, które po raz pierwszy opisał Isaacs i Lindenmann w 1957 roku [76]. Interferon alfa, wytwarzany przez limfocyty, hamuje namnażanie się wirusa, hamuje proliferację komórek, stymuluje mechanizmy komórkowe układu immunologicznego, bierze udział w różnicowaniu komórek [77]. Szacuje się, że odpowiedź na IFN- $\alpha$  jest głównie częściowa na poziomie średnio 15%, a odpowiedź całkowitą osiąga 1,8% pacjentów. Pomimo stosunkowo niewielkiego odsetka odpowiedzi na leczenie odnotowano wydłużenie przeżycia całkowitego oraz przeżycia wolnego od progresji w stosunku do pacjentów z placebo lub leczonych hormonalnie. Większe prawdopodobieństwo odpowiedzi na leczenie mają pacjenci po nefrektomii, z czystym

rakiem jasnokomórkowym nerki, z przerzutami do płuc i w dobrym stanie ogólnym [78, 79].

Interleukina-2 (IL-2) jest czynnikiem wzrostu limfocytów T. Po inkubacji komórek jednojądrzastych pobranych z krwi obwodowej chorych na raka z wysokimi dawkami interleukiny-2, komórki te nabierały zdolności litycznych wobec komórek nowotworowych. [80, 81]. Doniesienia te były podstawą do zastosowania IL-2 w 1985 roku w leczeniu pacjentów z rozsianą chorobą nowotworową [82]. Procent odpowiedzi (częściowa + całkowita) na leczenie waha się od 7 do 27% [83, 84]. Jednak największy odsetek odpowiedzi całkowitej był obserwowany u pacjentów poddanych leczeniu wysokimi dawkami IL-2 podawanej dożylnie w bolusie, co wymaga hospitalizacji i jest bardziej toksyczne od monoterapii IFN- $\alpha$  [85, 86, 87].

W związku z niezadowalającym wynikiem monoterapii interferonem alfa lub interleukiną-2 oraz na podstawie doniesień o synergistycznym działaniu obu cytokin wdrożono schematy ich łącznego stosowania. Negrier i współautorzy dowiedli, że łączne stosowanie IL-2 z IFN- $\alpha$  daje większy współczynnik odpowiedzi, ale nie ma wpływu na przeżycia całkowite [88]. Łączne stosowanie cytokin i chemioterapeutyków, np. schemat hanowerski (Interferon alfa plus IL-2 plus 5-fluorouracyl) również nie przyniosło wydłużenia przeżycia w porównaniu do schematu wysokich dawek IL-2 podawanej dożylnie [89, 90].

Dopiero odkrycie leków hamujących angiogenezę przyniosło poprawę wyników leczenia chorych z przerzutowym ccRCC. Podłoże molekularne sposobu działania tych leków oraz wytyczne stosowania terapii celowanej u pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki jest przedstawione w rozdziale I.4.

## 1.2. Rola genu VHL.




VHL to gen supresorowy choroby von Hippel – Lindau, choroby dziedziczonej autosomalnie dominująco i powstającej w wyniku inaktywacji tego genu. Mapowanie i identyfikacja genu VHL metodą analizy sprzężeń wykorzystana została do zmapowania genu VHL w rodzinach z obciążeniem genetycznym: w 1988 roku został zlokalizowany na chromosomie 3p przez Seizinger'a [91]. Po dalszych analizach zostało odkryte jego dokładne położenie w regionie 3p25-26. Gen ten ostatecznie został zidentyfikowany w 1993 roku dzięki międzynarodowej współpracy badaczy z American National Cancer Institute i z Uniwersytetu w Cambridge [92].

Ekspresja genu VHL zachodzi zarówno w komórkach osób dorosłych jak i płodu, (od 6-go tygodnia po zapłodnieniu) we wszystkich listkach zarodkowych. Informacyjny RNA (mRNA) wykryto w prawie wszystkich tkankach, szczególnie wysoki poziom ekspresji genu VHL zauważono w ośrodkowym układzie nerwowym, oczach, płucach, jądrach oraz nerkach [93]. U płodu opisano występowanie białka VHL zarówno w korze jak i rdzeniu nerki, jednak wysokie stężenie tego białka odnotowano w komórkach kanalików proksymalnych (skąd wywodzi się rak jasnokomórkowy nerki) [94].

Gen VHL jest genem supresorowym (antyonkogenem). Geny supresorowe pełnią funkcje ochronne w stosunku do komórek, między innymi kodują białka naprawy DNA, regulują cykl komórkowy, wpływają hamująco na proliferację komórek, kodują cząsteczki adhezji komórkowej. Przykładem genu supresorowego jest gen p53, tzw. strażnik genomu, który bierze udział w naprawie uszkodzonego DNA, inicjuje apoptozę, jeżeli uszkodzenia nie można naprawić.

### 1.2.1. Budowa oraz funkcje genu VHL i białka VHL.

Gen VHL składa się z 14 500 par zasad, a region kodujący liczy 642 nukleotydy. Składa się z trzech egzonów (sekwencji kodujących) o długości:

- egzon 1            340 par zasad
- egzon 2            123 par zasad
- egzon 3            179 par zasad

Promotor zawiera wiele miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, ale do tej pory nie ustalono sposobu regulowania ekspresji genu VHL.

Gen VHL koduje białko VHL i ma dwa kodony start wewnątrz egzonu 1, dlatego powstają dwie izoformy białka. Pierwsza licząca 213 aminokwasów powstaje, gdy translacja rozpoczyna się od pierwszego kodonu start. Druga forma białka składa się z 160 aminokwasów i jest tworzona od drugiego kodonu metioniny w pozycji 54. Obydwa kodony start są aktywne, jednak drugi kodon poprzedzony jest silniejszą sekwencją konsensusową Kozak, co jest kluczowe do inicjacji translacji [95]. Kodony od 14 do 53 zawierają osiem powtórzeń pięciu aminokwasów o sekwencji (Gly-X-Glu-Glu-X) w skrócie (GXEEX)<sub>8</sub>, podobną sekwencję odkryto u wiciowca *Trypanosoma Brucei*, jednakże znaczenie tego odkrycia pozostaje niejasne [96].

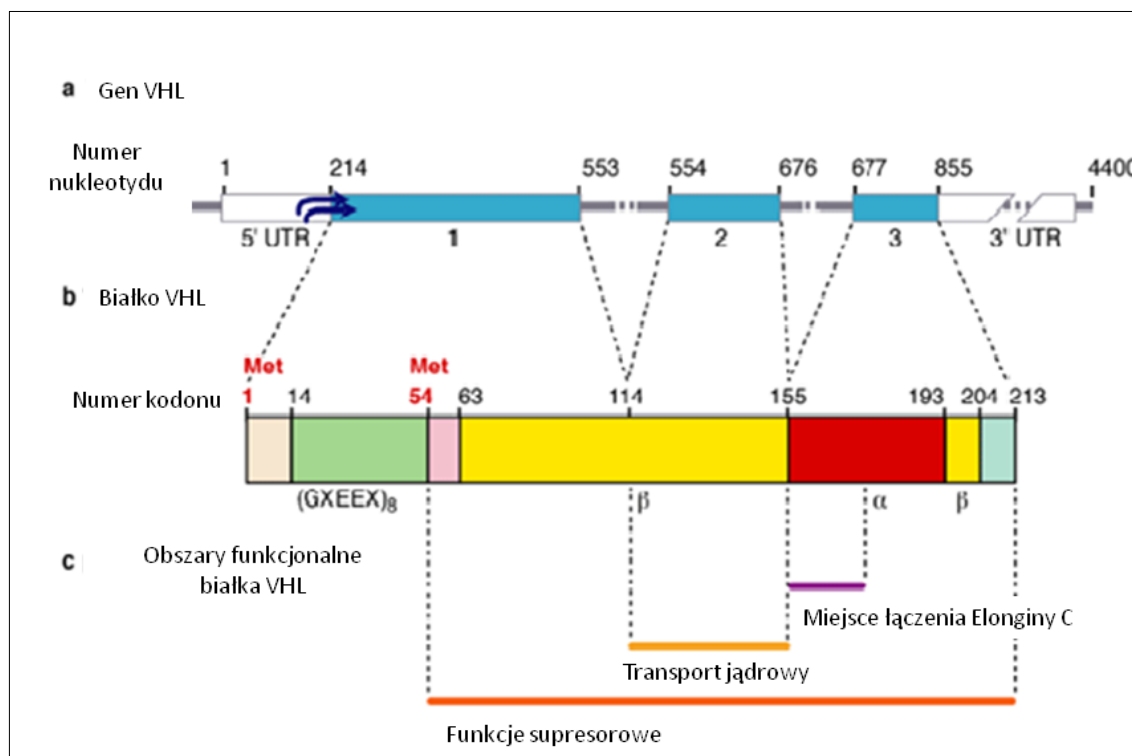
W komórce białko VHL z ang. protein VHL (pVHL) jest odpowiedzialne za regulację odpowiedzi komórkowej na zmieniające się stężenie tlenu [97]. Białko VHL w domenie  $\alpha$  posiada miejsce wiązania z elonginą C, poprzez którą łączy się z elonginą B, culliną-2 i Rbx tworząc kompleks o aktywności ligazy E3 ubikwityny. Kompleks ten wyznacza białka do ubikwitynacji i degradacji w proteosomie [98].

Białko VHL składa się z dwóch domen: alfa i beta. Domena  $\alpha$  jest mniejsza i posiada trzy helisy  $\alpha$ , łączy się z elonginą C. Większa domena  $\beta$  utworzona jest z siedmiu harmonijek  $\beta$  i jednej helisy  $\alpha$ . Odpowiada za transport jądrowy oraz funkcje supresorowe białka VHL [95].

Domena  $\alpha$  jest miejscem częstego występowania mutacji punktowych zmiany sensu, tzw. hot spot region. Szczególnie ważne miejsce zajmuje arginina w pozycji 167, miejsce to odpowiedzialne jest za interakcję z elonginą C i stabilizację struktury pVHL. Białka tworzące powierzchnię domeny  $\beta$  są również regionem częstych mutacji punktowych (Trp88, Asn90, Gln96, Tyr98, Tyr112), region ten uważa się za miejsce łączenia z innymi białkami [99]. Budowę genu VHL i pVHL przedstawiono na **rycinie 4**.

Wyróżniamy dwie izoformy białka VHL: dłuższą (213 aminokwasów) o masie cząsteczkowej około 30 kDa, którą oznacza się pVHL30 oraz krótszą (160 aminokwasów) o masie 19 kDa (pVHL19). Szereg publikacji potwierdza występowanie pVHL w jądrze komórkowym, cytoplazmie i mitochondriach [100, 101]. Obydwie formy pełnią rolę w supresji nowotworów, jednak dowiedziono częstsze występowanie formy pVHL30 [102]. Analiza mutacji występujących przy końcu 5' zmieniających

jedynie pVHL30 wskazała na dodatkowe funkcje supresorowe dłuższej formy białka VHL, niezależne od HIF $\alpha$ . Przypuszcza się, że fosforylacja pVHL30 reguluje wiązanie i sekrecję fibronektyny do macierzy pozakomórkowej [103].



**Rycina 4.** Budowa genu VHL i białka VHL na podstawie Richards FM [95]. Rysunek zmodyfikowano.

Białko VHL jest zaangażowane w wiele procesów komórkowych, takich jak organizację filamentów aktynowych i mikrotubul, tworzenie macierzy pozakomórkowej poprzez połączenie z fibronektyną, kontrolę cyklu komórkowego, wpływa na wzrost i apoptozę komórek. Funkcje te są niezależne od czynnika transkrypcyjnego HIF $\alpha$  [104].

HIF $\alpha$  (ang. hypoxia – inducible factor alpha) czynnik indukowany hipoksją jest białkiem regulatorowym, wchodzącym w kompleks białek inicjujących transkrypcję wielu genów.

Kiedy w komórce jest wystarczająca ilość tlenu (normoksja) HIF $\alpha$  ulega hydroksylacji. Tak zmodyfikowany HIF $\alpha$  łączy się z domeną  $\beta$  białka VHL, co pozwala na przyłączenie do domeny  $\alpha$  białka VHL białek tworzących kompleks ligazy E3. Kompleks, w którego skład wchodzi białko VHL, przyłącza białka ubikwityny do HIF $\alpha$



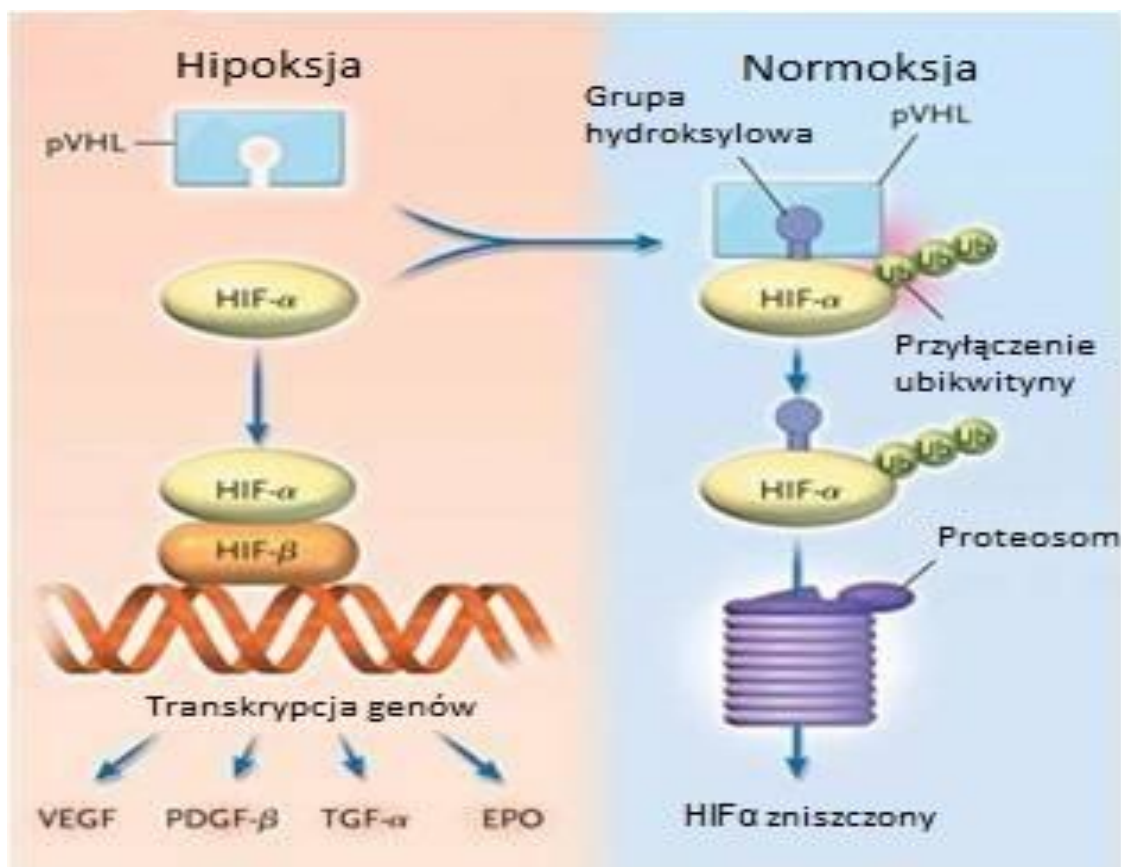
i kieruje czynnik transkrypcyjny do proteosomu. A więc prawidłowe białko VHL przyczynia się do degradacji czynnika transkrypcyjnego genów indukowanych hipoksją.

W warunkach niewystarczającej ilości tlenu w komórce (hipoksja) HIF $\alpha$  nie jest hydroksylowany i nie może połączyć się z białkiem VHL. Następuje akumulacja HIF $\alpha$ , który łączy się z HIF  $\beta$ , ulega stabilizacji i zostaje przetransportowany do jądra. W jądrze dimer HIF $\alpha$  i HIF $\beta$  łączy się z DNA i inicjuje transkrypcję genów indukowanych hipoksją, których produktami są [105]:

- VEGF (ang. Vascular Endothelial Growth Factor), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego – białko pobudzające mitozę komórek śródbłonna naczyniowego, bierze udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych
- PDGF- $\beta$  (ang. Platelet-Derived Growth Factor- $\beta$ ), płytkowy czynnik wzrostu – białko wytwarzane przez płytki krwi, jest silnym mitogenem dla komórek przydanki i mięśni gładkich naczyń, przez co stabilizuje powstałe naczynia, odgrywa też rolę w inicjacji angiogenezy poprzez stymulację syntezy DNA w komórkach śródbłonna [106]
- EPO erytropoetyna – hormon, który pobudza erytropoezę, co prowadzi do zwiększenia produkcji erytrocytów w szpiku kostnym.
- TGF- $\alpha$  (ang. Transforming Growth Factor- $\alpha$ ), transformujący czynnik wzrostu – białko produkowane przez makrofagi, wykazuje aktywność mitogenną w stosunku do fibroblastów, komórek śródbłonna i nabłonka [106]

Rolę białka VHL w regulacji stężenia HIF  $\alpha$ , pod wpływem zmieniających się warunków tlenowych komórki przedstawiono na **rycinie 5**.

Podobna sytuacja jak podczas hipoksji ma miejsce, gdy gen VHL ulega mutacji lub inaktywacji. Następuje akumulacja czynnika transkrypcyjnego HIF $\alpha$  i ekspresja genów białek pro-angiogennych co może mieć kluczowe znaczenie w rozwoju nowotworów bogato unaczynionych [108]. U ponad połowy pacjentów z ccRCC wykazano mutacje w dwóch allelach VHL. Badania na myszach pokazały, że wprowadzenie niezmutowanego genu VHL do komórek ccRCC pozyskanych od pacjentów hamuje zdolność tych komórek do tworzenia guza [109]. Stąd białko VHL należy do rodziny białek supresorowych i nazywane jest strażnikiem nerki.



**Rycina 5.** Interakcja białka VHL (pVHL) z czynnikiem transkrypcyjnym HIF  $\alpha$ , według George I wsp. [107]. Rysunek zmodyfikowano.

Istotny wpływ na utratę funkcji białka VHL ma miejsce mutacji genu VHL. I tak szczególnie istotne są sekwencje genu odpowiadające miejscom wiązania HIF  $\alpha$  w domenie  $\beta$  i elonginy C w domenie  $\alpha$ . Poszczególne mutacje powodują utratę różnych funkcji białka VHL, co może przekładać się na obraz kliniczny pacjentów z mutacjami w genie VHL.

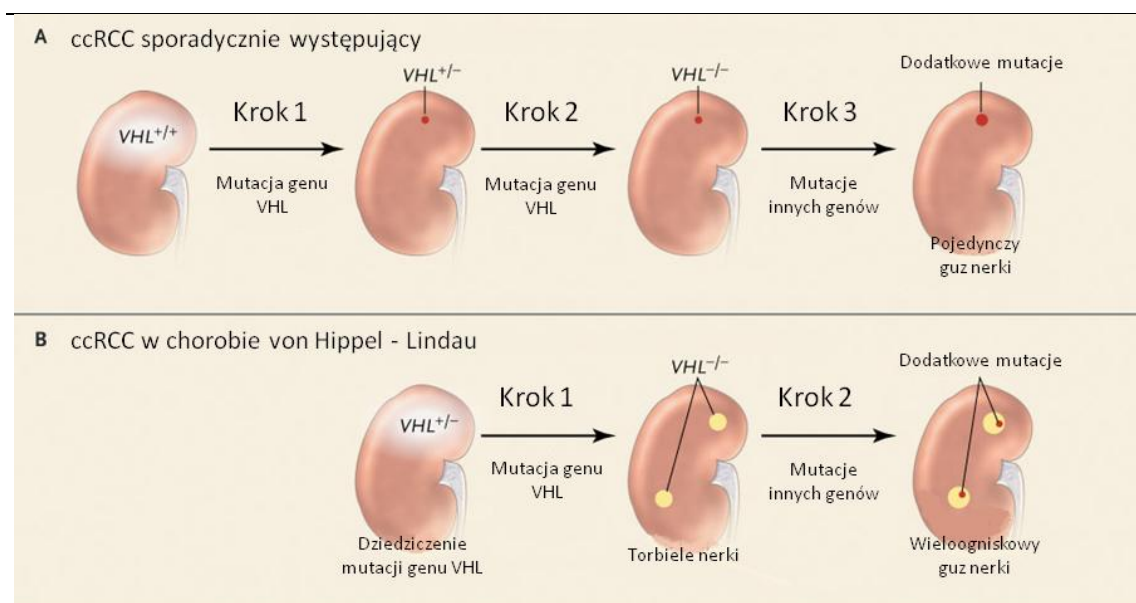
### 1.3. Mutacje genu VHL.

Utrata funkcji białka VHL jest rezultatem wyłączenia allelu, metylacji promotora lub mutacji w genie VHL [95].

Wyróżniamy dwie grupy mutacji: mutacje germinalne i mutacje somatyczne. Mutacje germinalne (generatywne) są obecne we wszystkich komórkach organizmu, w tym w komórkach rozrodczych (plemnikach lub komórce jajowej). Mutacje te są przekazywane na następne pokolenia i odpowiadają za dziedziczną postać raka jasnokomórkowego nerki i zespół von Hippel-Lindau. Natomiast mutacje somatyczne mogą pojawić się w jakiegokolwiek komórce, z wyjątkiem komórek rozrodczych, stąd występują w danej tkance, narządzie. Mutacje somatyczne nie są dziedziczone,

odpowiadają za powstanie dużej liczby sporadycznego konwencjonalnego raka nerki [110, 111, 112].

W związku z tym, że gen VHL jest genem supresorowym wg teorii Knudsona do utraty jego funkcji potrzebna jest inaktywacja obu kopi genu [113]. W sporadycznym raku nerki potrzebne są dwie niezależne mutacje do inaktywacji odziedziczonego prawidłowego genu VHL. Defekt genu VHL jest obserwowany w 60-80% wszystkich sporadycznych raków jasnokomórkowych nerki. W rodzinnym raku nerki odziedziczona jest jedna zmutowana kopia genu VHL, co czyni osobę podatną na kancerogenezę. Wyłączenie jednej kopi genu VHL skutkuje tworzeniem torbieli w nerkach. Uważa się, że utrata funkcji białka VHL jest krokiem inicjującym powstawanie raka jasnokomórkowego nerki, ale do powstania nowotworu potrzebne są jeszcze dodatkowe wydarzenia mutacyjne [114]. Etapy powstawania RCC przedstawiono na **rycinie 6**.



**Rycina 6.** Etapy powstawania raka nerki w sporadycznie występującym ccRCC zależnym od VHL oraz w chorobie von Hippel – Lindau, według Cohen i wsp. [114]. Rysunek zmodyfikowano.

### 1.3.2. Mutacje germinalne genu VHL.

Mutacje germinalne zostały zidentyfikowane u około 1000 rodzin z chorobą von Hippel-Lindau na całym świecie [115]. Analiza tych mutacji daje obraz różnorodności miejsca i typów mutacji genu VHL. Duże delecje przynajmniej jednego egzonu występowały w 40% przypadków, 60% to mutacje wewnątrzgenowe obejmujące: mutacje z przesunięciem ramki odczytu, nonsensowne, zmiany sensu, mutacje miejsc

splicingowych oraz małe delecje [95]. Większość powtarzających się mutacji występuje w szczególnie podatnej na mutacje sekwencji DNA nazywanej z angielskiego ‘hot spots’. Najczęściej występują delPhe76, Asn78Ser/His/Thr, Pro86Leu, Arg161Ter, Cys162Tyr/Phe/Trp, Arg167Gln/Trp and Leu178Pro [116]. Wśród rodzin niemieckich oraz amerykańskich niemieckiego pochodzenia wykryto mutację charakterystyczną dla rodzin zamieszkujących lasy Szwarewaldu, nazywaną ‘Black Forest’, jest to mutacja punktowa substytucja T na C, której rezultatem jest zamiana aminokwasu: Tyr98His [117].

Mutacje germinalne genu VHL skutkują rozwojem:

- Zespołu von Hippel-Lindau, która predysponuje do rozwoju naczyniaków, torbieli i nowotworów złośliwych, w tym pheochromocytoma i RCC.
- Rodzinnie występującego guza chromochłonnego, bez rozwoju innych charakterystycznych dla choroby von Hippel-Lindau objawów [118].

### **1.3.2.a. Zespół von Hippel – Lindau.**

Zespół von Hippel – Lindau jest chorobą genetyczną, dziedziczną autosomalnie dominująco, spowodowaną przez mutacje w genie VHL. Występuje z częstością 1 na 36 tysięcy urodzeń [119]. W Polsce żyje około 1000 osób z zespołem von Hippel – Lindau [120]. W 1904 roku niemiecki okulista Eugen von Hippel opisał dwa przypadki zmian w siatkówce, które uznał za objaw nieopisanej dotąd choroby, nazwanej przez niego naczyniakowatością siatkówki (angiomatosis retinae). W 1926 roku szwedzki patolog Arvid Lindau opisał takie same zmiany na siatkówce skojarzone z guzami mózdzku i innych narządów, w tym nerki [95].

Zespół von Hippel – Lindau charakteryzuje się zwiększoną genetyczną predyspozycją do powstawania guzów łagodnych i złośliwych w różnych narządach. Nowotwory powstają często wieloogniskowo lub obustronnie i w młodszym wieku w porównaniu z osobami bez mutacji w genie VHL. Około 67% pacjentów z zespołem VHL rozwija co najmniej jedną charakterystyczną zmianę narządową przed 30 rokiem życia, a aż 99% pacjentów w wieku 65 lat. Choroba może ujawniać się występowaniem nowotworów w jednym lub kilku narządach [120]. Dwie trzecie pacjentów z zespołem VHL rozwinię zmiany w nerkach, najczęściej są to torbiele nerek (zmiany łagodne). U części pacjentów rozwija się rak jasnokomórkowy nerki, który jest

najczęstszą przyczyną śmierci chorych na VHL [121]. Na podstawie wieloletnich obserwacji rodzin z zespołem VHL, badacze doszli do wniosku, że rodziny te różnią się pod względem manifestacji narządowej choroby i utworzyli podział kliniczny zespołu VHL. Do typu 1-go należą rodziny, w których występują naczyniaki zarodkowe OUN i siatkówki oraz ccRCC, a nie występuje pheochromocytoma. Typ 2-gi choroby VHL charakteryzują się występowaniem guza chromochłonnego nadnerczy i został dodatkowo podzielony na trzy podtypy w zależności od częstości występowania raka jasnokomórkowego nerki. Typ 2A oznacza niewielkie ryzyko rozwoju ccRCC, typ 2B to duże ryzyko ccRCC. Rodzinnie występujący guz nadnerczy, bez innych guzów charakterystycznych dla zespołu VHL określono jako typ 2C [122].

Udowodniono występowanie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem u pacjentów z chorobą von Hippel - Lindau. Stwierdzenie u pacjenta charakterystycznej mutacji, można wykorzystać w praktyce klinicznej celem wdrożenia diagnostyki nowotworu i odpowiednio wczesnego leczenia [123]. I tak delecje, mutacje z przesunięciem ramki odczytu lub nonsensowne występują w typie 1 choroby VHL, natomiast mutacje zmiany sensu są typowe dla typu 2 choroby VHL. Mutacja zmiany sensu w 167 kodonie jest związana z typem 2B choroby VHL i wysokim prawdopodobieństwem rozwoju pheochromocytoma. Dwie specyficzne mutacje zmiany sensu: Tyr98His (mutacje ‘Black Forest’) i Tyr112His są charakterystyczne dla typu 2A choroby VHL [124]. U pacjentów z typem 2C choroby VHL (z rodzinnym guzem chromochłonnym) również wykryto specyficzne mutacje, są nimi mutacje zmiany sensu: Leu188Val, Val84Leu, Ser80Leu [125]. Dane dotyczące podziału zespołu VHL zebrano w **tabeli 4**.

Klasyfikacja	Rodzaj mutacji	Manifestacja narządowa
Typ 1	Całkowita lub częściowa utrata VHL (np. duże delecje)	Naczyniaki zarodkowe OUN i siatkówki <b>ccRCC</b>
Typ 2A	Mutacje punktowe (zmiany sensu)	Naczyniaki zarodkowe OUN i siatkówki Pheochromocytoma Niskie ryzyko ccRCC
Typ 2B	Mutacje punktowe (zmiany sensu)	Naczyniaki zarodkowe OUN i siatkówki Pheochromocytoma <b>Wysokie ryzyko ccRCC</b>
Typ 2C	Mutacje punktowe (zmiany sensu)	Pheochromocytoma

**Tabela 4.** Charakterystyka typów zespołu von Hippel – Lindau.

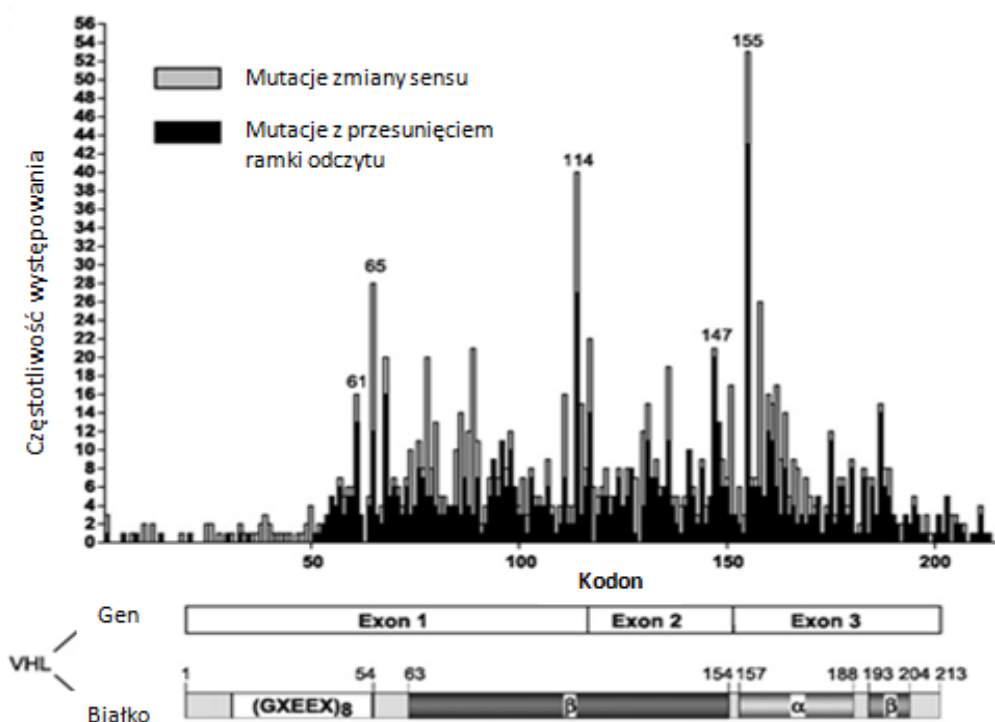
### 1.3.3. Mutacje somatyczne w sporadycznym raku nerki.

W sporadycznym raku jasnokomórkowym nerki zależnym od VHL obserwuje się delecję, wewnątrz genowe mutacje lub metylacje promotora dzikiego allelu genu VHL, co skutkuje utratą funkcji białka VHL lub brakiem ekspresji genu w tkance guza. Obserwacje te są typowe dla genu supresorowego. Dobrze udokumentowanym jest fakt, że w tkance guza ccRCC powszechnie występuje delecja genu VHL, co manifestuje się utratą heterozygotyczności (z ang. loss of heterozygosity LOH) polimorficznych markerów na chromosomie 3p25-p26. Według Young'a i współautorów LOH znaleziono w 89,2% tkanek pozyskanych od pacjentów ze sporadycznym rakiem jasnokomórkowy nerki [126]. Hypermetylację wykazano w 33% guzów, u których nie występowała utrata heterozygotyczności [127].

Mutacje somatyczne, tak samo jak mutacje germinalne, są zlokalizowane wzdłuż genu od kodonu 54 (drugiej metioniny). Podobnie są to mutacje różnych typów: mutacje zmiany sensu, nonsensowne, z przesunięciem ramki odczytu lub mutacje miejsc splicingowych. Rozkład mutacji somatycznych przedstawiono na **rycinie 7**. W populacji niemieckiej wykryto charakterystyczną mutację: delecję łańcucha poli-T (nukleotydów 653–657) jest to mutacja z przesunięciem ramki odczytu od kodonu 148. Mutacja ta nie występuje u pacjentów z innych państw, co może świadczyć o wpływie specyficznego kancerogenu [128]. Mutacje genu VHL w sporadycznym raku jasnokomórkowym nerki występują od 42 do 75% zależnie od autora publikacji [128, 129, 130, 131, 126]. Częstość mutacji zależy od danej populacji. Trzeba zaznaczyć, że bardzo ważna jest dokładna weryfikacja histopatologiczna raka nerki, ponieważ mutacje genu VHL są charakterystyczne tylko dla czystego raka jasnokomórkowego. Według Young'a wysoki poziom mutacji (75%) w porównaniu z wcześniejszymi publikacjami innych autorów wynika z udoskonalenia technik wykrywania mutacji. Należy podkreślić, że autorzy publikacji są zgodni co do wpływu mutacji genu VHL na rozwój raka nerki. Biorąc pod uwagę fakt, że od rodzaju mutacji zależy typ zespołu VHL i manifestacja narządowa choroby, na świecie prowadzone są badania nad istnieniem korelacji pomiędzy rodzajem mutacji somatycznych a biologią sporadycznego raka jasnokomórkowego nerki. Sugeruje się, że obecność lub brak mutacji wpływa na rokowanie. Według Yao istnieje współzależność pomiędzy występowaniem mutacji genu VHL a lepszym rokowaniem u pacjentów w stopniu zaawansowania klinicznego I - III poddanych nefrektomii [132].

Nowo wykryte mutacje genu VHL są wprowadzane do baz danych, dostępnych przez Internet:

- Uniwersal Mutation Database ([www.umd.be/VHL](http://www.umd.be/VHL))
- Sanger Database (<http://www.sanger.ac.uk/>)
- SNPper Database ([snpper.chip.org](http://snpper.chip.org))



**Rycina 7.** Rozkład 1244 mutacji somatycznych genu VHL na podstawie literatury według Young i wsp. [126].

Powszechnie uważa się, że inaktywacja genu supresorowego VHL występuje na wczesnym etapie powstawania raka jasnokomórkowego nerki. Jednak u około 30% sporadycznie występujących ccRCC nie występują zmiany w genie VHL. Ze względu na skąpą ilość badań zajmujących się tą tematyką, oraz ze względu na fakt, iż badania te są prowadzone na małej grupie pacjentów, do tej pory nie ustalono patogenezы powstawania sporadycznego ccRCC niezależnego od genu VHL [133]. Podobnie jak pacjenci z chorobą VHL posłużyli za model badań, których celem było odkrycie znaczenia zmian w genie VHL na kancerogenezę, tak obecnie prowadzone są badania nad rodzinnym ccRCC niezależnym od genu VHL. Występowanie konstytucyjnej translokacji chromosomu 3-go jest związane z patogenezą raka jasnokomórkowego nerki [134]. Analiza najczęściej występujących translokacji chromosomu 3-go doprowadziła do identyfikacji szeregu genów, które są pokrzyżowane w miejscu

przerwania. Do genów tych zaliczmy: FHIT, TRC8, DIRC, LSAMP i NORE1, jednakże rola tych genów w patogenezie ccRCC wymaga potwierdzenia [134]. W 2012 roku utworzono bazę danych (Renal Cancer Gene Database) zawierającą informacje na temat genów, które mogą mieć wpływ na powstawanie różnych typów raka nerki. Baza ta zawiera 240 genów, które zostały opisane w artykułach badawczych dotyczących raka nerki w bazie PubMed [135].

### **1.4. Terapia celowana przerzutowego raka jasnokomórkowego nerki.**

Zasada terapii celowanej w onkologii polega na zastosowaniu leków, które swoiście blokują biologiczne szlaki zaangażowane w kancerogenezę. Dzięki osiągnięciom biologii molekularnej poznano niektóre mechanizmy przyczyniające się do powstawania raka jasnokomórkowego nerki. W komórce ccRCC w wyniku wyłączenia funkcji genu VHL i jego produktu pVHL następuje akumulacja HIF $\alpha$ , który po połączeniu z HIF $\beta$  i przeniknięciu do jądra komórkowego aktywuje transkrypcje szeregu genów zależnych od hipoksji. Geny te są zaangażowane w różne procesy połączone z rozwojem raka i jego wzrostem. Wśród nich VEGF, PDGF, TGF $\alpha$  - białka, które są bezpośrednio związane z angiogenezą i wzrostem guza. [136]. VEGF i PDGF łączą się z receptorami: VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) oraz PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) obecnymi w komórkach śródbłonna. Receptory te są białkami transbłonowymi o aktywności kinazy tyrozynowej. Ich domena zewnątrzkomórkowa wiąże się ze swoistym ligandem, a domena wewnątrzkomórkowa ma aktywność katalityczną [137]. Dodatkowo HIF $\alpha$  aktywuje receptor CXCR4, odpowiedzialny za zmniejszenie stężenia E-kadheryn, oraz bierze udział w procesach przejścia komórek z nabłonka do mezenchymy, procesów niezbędnych do tworzenia przerzutów [112].

Aktywność czynnika transkrypcyjnego HIF $\alpha$  jest regulowana nie tylko na drodze pVHL zależnej. Poznano szlak zależny od mTOR (mammalian target of rapamycin) wpływający na ilość HIF $\alpha$  poprzez aktywację translacji mRNA HIF $\alpha$  do białka HIF $\alpha$ . Aktywacja mTOR – kinazy pełniącej funkcję regulatorową w komórce, powstaje za pośrednictwem złożonych interakcji w przekazywaniu sygnałów, w których biorą udział czynniki wzrostu, kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz kinaza



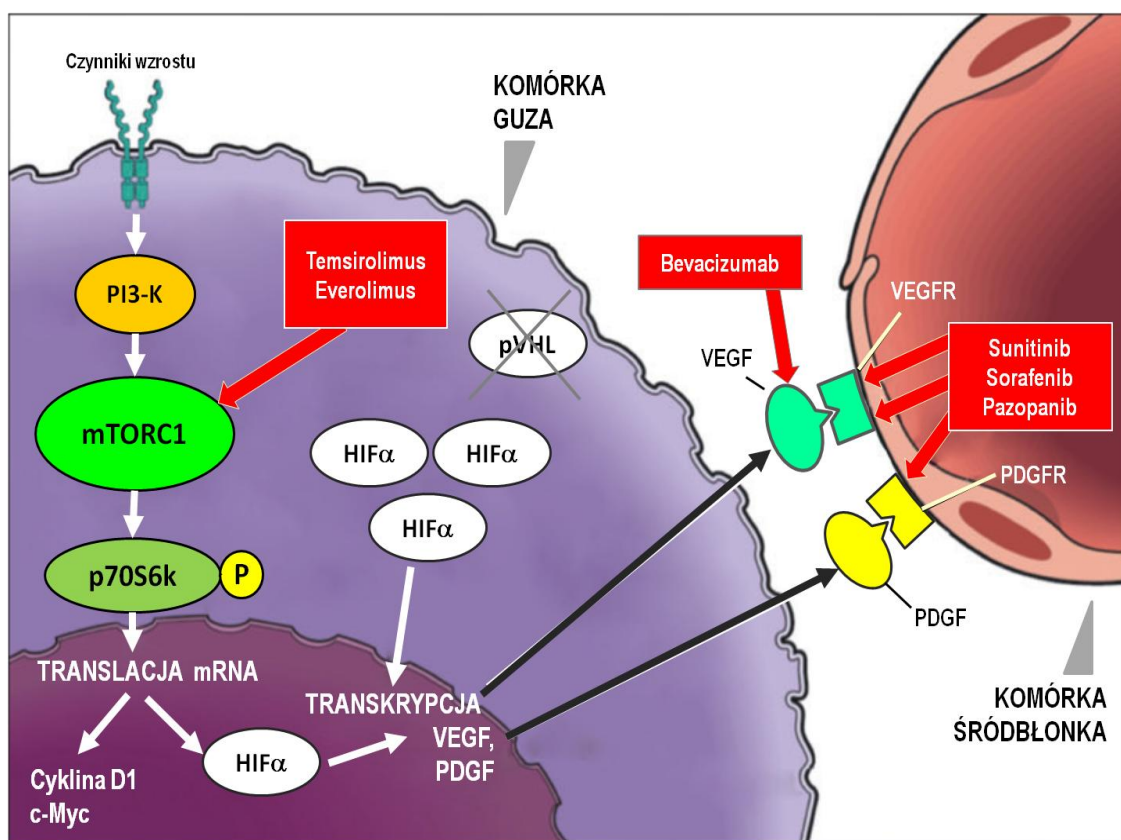
białkowa (AKT) [138]. Aktywna forma mTOR zwiększa produkcję HIF $\alpha$  oraz białek regulujących cykl komórkowy, w tym cyklinę D1 [139].

Dotychczas wprowadzono leki hamujące angiogenezę, których działanie nacelowane jest na blokowanie mTOR lub szlaku VHL/ HIF $\alpha$  poprzez wiązanie się z receptorami VEGFR i PDGFR lub ich ligandem VEGF. To leczenie prowadzi do masywnego uszkodzenia unaczynienia guza z współistniejącą martwicą, jest skuteczne w leczeniu raka jasnokomórkowego nerki z przerzutami. Molekularne cele współcześnie stosowanych leków antyangiogennych przedstawiono na **rycynie 8**. Obecnie zarejestrowanych w Unii Europejskiej jest sześć leków hamujących angiogenezę:

- Sunitinib (Sutent) – inhibitor kinaz tyrozynowych, łączy się z wewnątrzcytoplazmatyczną domeną VEGFR oraz PDGFR, hamuje kinazy c-KIT i FLT3 oraz blokuje przekazywanie sygnałów do komórki [140]. Sutent jest lekiem doustnym podawanym raz na dobę przez cztery tygodnie z następującą przerwą dwutygodniową. Wskaźnik obiektywnych odpowiedzi wynosi 47%, czas wolny od progresji to 11 miesięcy, a mediana całkowitego czasu przeżycia wynosi 26,4 miesięcy [139].
- Sorafenib (Nexavar) – inhibitor kinaz tyrozynowych VEGFR oraz PDGFR o podobnym mechanizmie działania do Sunitinibu. Dodatkowo hamuje aktywność kinaz Raf-1 [140]. Nexavar stosowany jest doustnie dwa razy na dobę. Jest lekiem drugiego rzutu, po niepowodzeniu leczenia cytokinami. Zaobserwowano 10% obiektywnych odpowiedzi, 5,5 miesiąca wolnego od progresji i 17,8 miesięcy całkowitego przeżycia [139].
- Pazopanib (Votrient) - lek drugiej generacji inhibitorów kinaz tyrozynowych, mniej toksyczny, podawany doustnie. Zarejestrowany jest jako lek I-go i II-go rzutu po leczeniu cytokinami, wskaźnik obiektywnych odpowiedzi wynosi 30%, a czas wolny od progresji 9,2 miesiąca. Obecnie trwają badania kliniczne porównujące Pazopanib z Sunitinibem, oczekuje się również na określenie całkowitego czasu przeżycia [139].
- Bevacizumab (Avastin) – rekombinowane ludzkie przeciwciało monoklonalne wiążące się specyficznie z krążącym VEGF. Podaje się łącznie z Interferonem  $\alpha$

we wlewach dożylnych jako leczenie I-go rzutu. Uzyskano 31% odpowiedzi, z 10,2 miesiącami wolnymi od progresji i całkowitym czasem przeżycia wynoszącym 23,3 miesiące [139].

- Temsirolimus (Torisel) – tworzy kompleks z białkiem FK-506, który zapobiega aktywacji mTOR. Stosowany we wlewie dożylnym raz na tydzień u osób źle rokujących, jako lek I-go rzutu. Odnotowano tylko 8,6% odpowiedzi, czas wolny od progresji wynosi 3,8 miesiąca, a całkowite przeżycie 10,9 miesiąca [139].
- Everolimus (Afinitor) – tworzy kompleks białkowy blokujący mTOR. Jest lekiem doustnym, przyjmowanym raz na dobę. Afinitor stosuje się po progresji choroby podczas leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych. Lek został zarejestrowany pomimo niskiego wskaźnika odpowiedzi (1,5) i niespełna 5 miesięcy wolnych od progresji. Całkowity czas przeżycia oblicza się na 14,8 miesięcy [139].



**Rycina 8.** Molekularne cele współczesnej terapii przerzutowego ccRCC. Na podstawie Audenet i wsp. rysunek zmodyfikowano [139].

W **tabeli 5** zostały przedstawione rekomendacje Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (EAU) do stosowania leków hamujących angiogenezę [49].

Leczenie	Grupa ryzyka lub wcześniejsza terapia	Zalecany lek
Pierwszego rzutu	Niskie lub średnie ryzyko	Sunitinib
		Bevacizumab + IFN- $\alpha$
		Pazopanib
	Wysokie ryzyko	Temsirolimus
Drugiego rzutu	Wcześnie cytokiny	Sorafenib
		Pazopanib
	Wcześnie inhibitory VEGFR	Everolimus

**Tabela 5.** Wytyczne EAU do terapii pierwszego i drugiego rzutu u pacjentów z przerzutowym rakiem jasnokomórkowym nerki [49].

Przypisanie pacjentów do grupy niskiego, średniego lub wysokiego ryzyka odbywa się na podstawie kryteriów Motzer’a. Motzer zaproponował pięć czynników prognostycznych:

- 1) stan ogólny oceniany skalą Karnofsky’ego < 80
- 2) czas od diagnozy do leczenia systemowego < 12 miesięcy
- 3) stężenie LDH w surowicy >1,5 × większe niż górna granica normy laboratorium
- 4) stężenie hemoglobiny poniżej normy
- 5) skorygowane stężenie wapnia\* w surowicy > 10 mg/dl

\*skorygowane stężenie wapnia [mg/dl] = stężenie wapnia całkowitego [mg/dl] — 0,707 × (stężenie albumin [g/dl] — 3,4)

Podział pacjentów do grup ryzyka przedstawiono w **tabeli 6**.

Grupa ryzyka	Liczba czynników prognostycznych
Korzystna (niskie ryzyko)	0
Pośrednia (średnie ryzyko)	1-2
Niekorzystna (wysokie ryzyko)	3-5

**Tabela 6.** Podział pacjentów do grup ryzyka według Motzer’a [141].

Terapia lekami hamującymi angiogenezę nie jest wolna od działań ubocznych. Do najczęściej występujących zalicza się biegunkę, wysypkę, zespół ręka – stopa, nadciśnienie tętnicze, osłabienie, białkomocz, limfopenię [139]. Zostało udowodnione, że leki terapii celowanej hamują proliferację komórek śródbłonna oraz tworzenie nowych naczyń, jednak nie niszczą bezpośrednio komórek ccRCC [142]. Guz może wzrastać wzdłuż dużych, dojrzałych naczyń, co obserwowane jest jako progresja

choroby. Wskaźniki odpowiedzi na leczenie oraz czas wolny od progresji nie jest satysfakcjonujący. Cały czas prowadzone są badania nad nowymi lekami, które będą miały dodatkową aktywność hamującą inne szlaki zaangażowane w rozwój guza, lub większą specyficzność w stosunku do substratu. Axitinib, Tivozanib, Regorafenib, Cediranib i Dovitinib stosowane są w badaniach klinicznych. Aby podnieść skuteczność terapii celowanej ważne jest zastosowanie jej u specyficznej grupy pacjentów, takiej, która posiada zmiany w kluczowych szlakach molekularnych mających istotny wpływ na powstawanie guza. Leki hamujące szlak pVHL/HIF/VEGF nie pomagają wszystkim pacjentom. Dlatego tak ważne jest określenie biomarkerów pomagających zoptymalizować leczenie. Zmiany w genie VHL mogą być potencjalnym biomarkerem, ponieważ większość pacjentów z ccRCC ma inaktywowany gen VHL (mutacja, LOH, metylacja promotora). Według Gossage i wsp., którzy dokonali przeglądu piśmiennictwa, istnieje wystarczająco dużo wstępnych dowodów uzasadniających prowadzenie badań mających na celu określenie czy mutacje w genie VHL mogą być predykcyjnym i rokowniczym biomarkerem [143].

## 2. Cele pracy

W erze terapii celowanej przerzutowego raka jasnokomórkowego nerki, powstałej w oparciu o mechanizmy molekularne związane z białkiem VHL, czynnikiem transkrypcyjnym genów HIF $\alpha$  oraz procesami angiogenezy, powstaje pytanie czy inaktywacja oraz/lub mutacja genu VHL może być biomarkerem skuteczności tych terapii. W ostatnich latach wiele ośrodków medycznych na świecie prowadzi badania nad obecnością mutacji i zmian epigenetycznych genu VHL oraz ocenia istnienie zależności pomiędzy stanem molekularnym genu VHL a rokowaniem pacjentów z ccRCC.

Według dostępnych danych, w Polsce nie wykonano badań mutacji genu VHL u pacjentów ze sporadycznie występującym rakiem jasnokomórkowym nerki. Były jedynie prowadzone badania genetyczne pacjentów z chorobą von Hippel – Lindau. Do tej pory nie ukazała się publikacja na temat wpływu mutacji w genie VHL na czynniki prognostyczne w raku jasnokomórkowym nerki w populacji polskiej.

Biorąc po uwagę powyższe stwierdzenia, w oparciu o badania genetyczne DNA wyizolowanego z krwi obwodowej oraz tkanki guza uzyskanych od pacjentów poddanych leczeniu zabiegowemu z powodu raka nerki, postanowiono dokonać analizy obecności mutacji w genie VHL.

Celem przedstawionych badań było:

1. Określenie częstości, rodzaju i lokalizacji mutacji w części kodującej genu VHL.
2. Ocena występowania zależności pomiędzy mutacjami genu VHL a cechami klinicznymi pacjentów z ccRCC.
3. Analiza zależności pomiędzy mutacjami genu VHL a parametrami patologicznymi raka jasnokomórkowego nerki.
4. Kolejnym celem badań jest określenie korelacji pomiędzy cechami klinicznymi a parametrami patologicznymi pacjentów z ccRCC.

### **3. Materiał i metody**

#### **3.1. Pacjenci**

Badania zamieszczone w mojej rozprawie doktorskiej stanowią część projektu badawczego pt: „Wielofunkcyjność białek STAT w rozwoju i progresji raka mięzsza nerki”. Projekt, którego kierownikiem jest profesor Joanna Wesoły, powstał w Zakładzie Genetyki Molekularnej Człowieka Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu dzięki środkom z programu FOCUS Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Zadaniem projektu jest wykonanie badań molekularnych dotyczących mutacji i ekspresji genu VHL, ekspresji HIF1 $\alpha$  oraz białek STAT3 i STAT5.

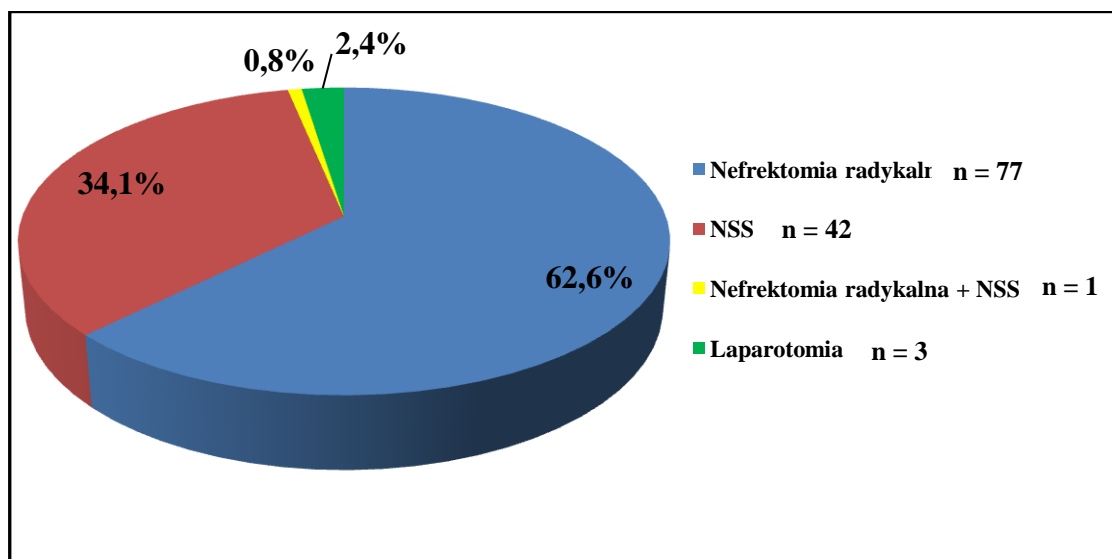
Do badań kwalifikowano pacjentów z klinicznym rozpoznaniem raka nerki hospitalizowanych od grudnia 2009 roku do lipca 2011 roku w Klinice Urologii i Onkologii Urologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozpoznanie ustalano na podstawie tomografii komputerowej jamy brzusznej z kontrastem. Wielkość guza, wiek pacjenta oraz występowanie chorób współistniejących nie stanowiły kryterium kwalifikacji lub wykluczenia z badań. Wykluczano pacjentów z powiększonymi węzłami chłonnymi, oraz z przerzutami do narządów innych niż płuca.

Tak wybraną grupę chorych badano podmiotowo i przedmiotowo, wykonano badania laboratoryjne, tj.: morfologia krwi z rozmazem, grupa krwi, INR, APTT, oznaczano w surowicy krwi stężenie glukozy, elektrolitów (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) i kreatyniny. Obowiązkowo pacjenci mieli wykonane USG jamy brzusznej oraz RTG klatki piersiowej. Na podstawie powyższych badań oraz po konsultacji z lekarzem anestezjologiem 123 pacjentów zakwalifikowano do leczenia operacyjnego: nefrektomii radykalnej lub operacji organooszczędnej. Do badań włączono także 9 pacjentów z nieoperacyjnym guzem nerki poddanych embolizacji, którzy wyłączeni zostali z rozprawy doktorskiej, natomiast zostali włączeni do całego projektu. Tak wyselekcjonowaną grupę 132 chorych poproszono o wzięcie udziału w projekcie badawczym. Wszyscy pacjenci przed przystąpieniem do badań byli poinformowani o przebiegu i zasadności projektu oraz wyrazili świadomą zgodę na udział w pracy naukowej. Wzór informacji dla pacjenta oraz zgody pacjenta zamieszczono

w **załączniku 1**. Po uzyskaniu pisemnej zgody, przeprowadzono wywiady według wzoru ankiety zamieszczonej w **załączniku 2**.

Przed zabiegiem operacyjnym od każdego pacjenta pobrano krew do próbek zawierających EDTA. Na sali operacyjnej, tuż po wycięciu guza lub nerki z guzem pobrano tkankę nowotworową wykorzystaną w projekcie naukowym. Od 9 pacjentów poddanych embolizacji pobrano tylko krew.

Operowanych było 123 pacjentów, z czego wykonano 77 nefrektomii radykalnych, 42 NSS, 3 guzy okazały się nieoperacyjne. U jednego pacjenta z obustronnym guzem wykonano najpierw nefrektomię radykalną nerki prawej, a następnie wycięcie guza nerki lewej. Procentowy i liczbowy rozkład poszczególnych zabiegów przedstawiono na **rycynie 9**.



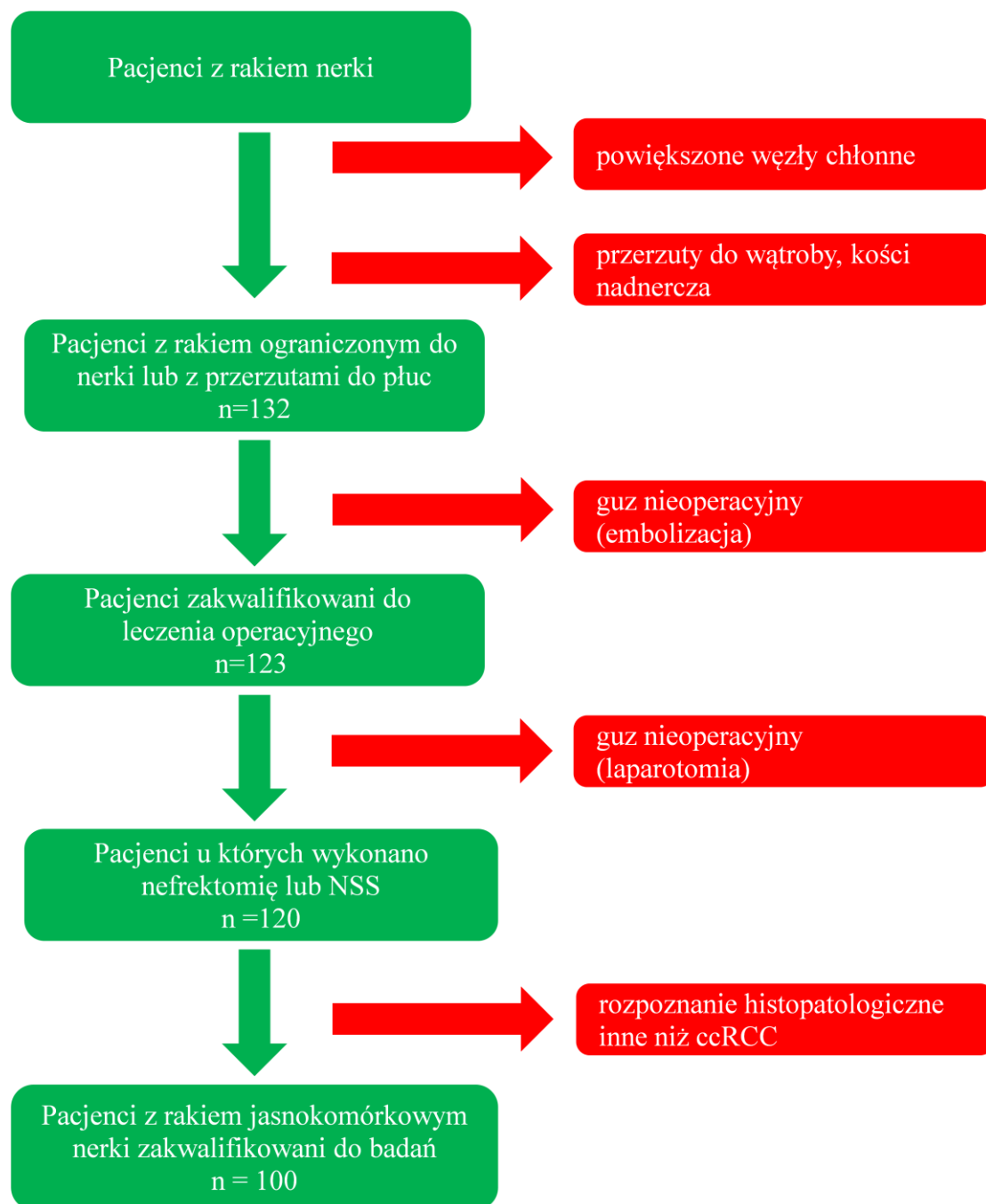
**Rycina 9.** Rodzaj leczenia operacyjnego.

Wszystkie preparaty uzyskane podczas nefrektomii radykalnej lub NSS były poddane ocenie histopatologicznej w Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim im. Józefa Strusia w Poznaniu, w Pracowni Anatomii Patologicznej, której kierownikiem jest doktor Stanisław Łazowski. Do badań wybrano pacjentów z rozpoznaniem ccRCC, a odrzucono z rozpoznaniem innych nowotworów nerki. Jednego pacjenta z rakiem jasnokomórkowym nerki wykluczono z badań, ponieważ zdiagnozowano u niego przerzuty do kości w wykonanej po zabiegu scyntygrafii kości. Dane dotyczące rozpoznań histopatologicznych zebrano w **tabeli 7**.

Na schemacie przedstawiono proces kwalifikacji pacjentów do badań przedstawionych w mojej pracy (**rycina 10**).

Typ histologiczny	Ilość	%
Rak jasnokomórkowy	101	84,2
Rak brodawkowaty	12	10,0
Rak chromofobny	2	1,7
Onkocytoza	4	3,3
Rak urotelialny	1	0,8

Tabela 7. Typy histologiczne nowotworów nerki 120 operowanych pacjentów.



Rycina 10. Proces kwalifikacji pacjentów. Na zielono zaznaczono kryteria kwalifikacji, a na czerwono kryteria wykluczenia z badania.



Badaniem objęto grupę 132 pacjentów z guzem nerki. Ostatecznie z tej grupy do niniejszej pracy zakwalifikowano 100 pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki poddanych leczeniu operacyjnemu. 23 pacjentów zostało wykluczonych z pracy badawczej. 9 pacjentów, u których wykonano embolizację tętnicy nerkowej zostało zakwalifikowanych do projektu, którego częścią jest niniejsza praca.

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu na posiedzeniu 8-go października 2009 roku wyraziła zgodę na cały projekt (Uchwała nr 876/09).

### **3.2. Metody**

#### **3.2.1. Pobieranie próbek.**

W dniu operacji, przed zabiegiem od pacjentów pobrano 4 x 9 ml krwi obwodowej żylniej do probówek zawierających EDTA (nr kat. K0131). Do izolacji DNA wykorzystano 2 probówki x 9 ml krwi. Pozostałe 2 próbki x 9 ml, użyto do izolacji RNA i białka. Podczas operacji, zaraz po wycięciu nerki lub guza nerki, na stoliku przykrytym jałowymi serwetami, przy pomocy sterylnej pęsety i skalpela pobrano dwa wycinki z makroskopowo zmienionej nowotworowo tkanki. Pierwszy wycinek pochodził z centralnej części guza, a drugi z brzegu guza. Pobrane wycinki zostały zawieszono w 6 ml RNAlater (RNAlater® Sigma, R0901). Probówki z krwią oraz z wycinkami zostały przekazane w dniu operacji do Zakładu Genetyki Molekularnej Człowieka Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu. Próbki z wycinkami przechowywano przez co najmniej 1 dzień w temp. +4°C. Następnie RNAlater usunięto. Próbki z wycinkami zamrożono i przechowywano w temp. -80°C. Krew przeznaczoną do izolacji DNA zamrożono i przechowywano w temp. -20°C.

#### **3.2.2. Wykaz stosowanej aparatury, odczynników oraz roztworów.**

Wykorzystane podczas badań odczynniki zebrano w **tabeli 8**, pogrupowano według producenta i ponumerowano.

Dane dotyczące stosowanej aparatury wraz z podaniem firmy produkującej urządzenie przedstawiono w **tabeli 9**.

O.1	Zestaw GeneMATRIX PCR / DNA	<b>Eurx</b>
O.2	Marker wielkości Perfect 100 bp	
O.3	Kwas borowy	<b>CHEMPUR</b>
O.4	Diwodorofosforan potasu	
O.5	Chlorek potasu	
O.6	Diwodorofosforan sodu dwuwodny	<b>PoCH</b>
O.7	Alkohol etylowy 96%	
O.8	Wodorowęglan potasu	<b>Sigma</b>
O.9	RNAlater	
O.10	EDTA	
O.11	Cyjanoksylen	
O.12	Glicerol	
O.13	Błękit bromofenolowy	
O.14	Polimeraza HiFiTaq	<b>Novazym</b>
O.15	dNTP 5mM MIX	
O.16	Polimeraza Pfu	<b>Fermentas</b>
O.17	Clone JET PCR	
O.18	Trizol	<b>MRC</b>
O.19	Startery	<b>GENOMED</b>
O.20	SDS	<b>BioShop</b>
O.21	Chlorek amonu	
O.22	TRIS	
O.23	Agaroza	
O.24	Bromek etydyny	
O.25	Proteinaza K	
O.26	Chlorek sodu	<b>STANLAB</b>
O.27	Ampicylina	<b>PolfaTarchomin</b>
O.28	Pepton	<b>Liofilchem</b>
O.29	Ekstrakt drożdżowy	
O.30	Agar	

**Tabela 8.** Wykaz stosowanych odczynników, podano numer odczynnika, gdzie O oznacza odczynnik.

Sekwenator kapilarny 3730xl DNA Analityzer	<b>Applied Biosystem</b>
Transilluminator UXT-30M-15E (Wavelength 312 nm)	<b>BIO View</b>
Zestaw do elektroforezy poziomej	<b>Carl Roth, Karlsruhe</b>
Zasilacz Elite 300	<b>Wealtec</b>
Spektrofotometr NaNoDrop ND-1000 z oprogramowaniem ND-1000 v 3.1.2	
Wirówka Rotina 420R	<b>Hettich Zentrifugen</b>
Wirówka Mikro 200R	
Wirówka MiniSpin	<b>Labnet</b>
Worteks	
Termocykler Multi Gene II	
Zamrażarka -80	<b>SANYO</b>
Zamrażarka - 20	<b>ARDO</b>

**Tabela 9.** Wykaz stosowanych urządzeń, pogrupowanych według producenta.

W badaniach użyto następujących roztworów:

R1. Bufor do lizy erytrocytów 10 x (1000 ml)

NH <sub>4</sub> Cl	82,99 g
KHCO <sub>3</sub>	10,00 g
EDTA, pH 7,4	3,7 g

R2. Roztwór roboczy bufor do lizy erytrocytów (1000 ml)

10 x Bufor do lizy	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml

R3. Bufor do izolacji (1000 ml)

NaCl	5,8 g
EDTA	3,7 g
Tris, pH 8,0	3,0 g

R4. 10 x PBS (500 ml)

NaCl	40 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	7,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KCl	1,0 g
pH	7,2

R5. Roztwór roboczy 1 x PBS (1000 ml)

10 x PBS	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml

R6. Proteinaza K (4,5 mg/ml)

Proteinaza K	25 mg
ddH <sub>2</sub> O	5,5 ml

R7. 10 x TBE

Tris	54,0 g
Kwas borowy	27,5 g
0,5 M EDTA, pH 8	20 ml

R.8 Roztwór roboczy 1 x TBE (1000 ml)

10 x TBE	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml

R9. 10 x TE (500 ml)

Tris, pH 8,0	6,05 g
EDTA, pH 8,0	0,186 g

R10. Roztwór roboczy 1 x TE (500 ml)

10 x TE	50 ml
Woda	450 ml

R11. 6 x bufor obciążający (50 ml)

0,25%	błękit bromofenolowy
0,25%	cyjanoksylen
30%	glicerol

R12. SDS 20% (1000 ml)

SDS	20 g
-----	------

R13. 6M NaCl (500 ml)

NaCl	175,5 g
------	---------

R14. Roztwór LB

Pepton	1 g
Ekstrakt drożdżowy	0,5 g
NaCl	1 g
Uzupełnić wodą do	100 ml

R15. Roztwór LB z agarem

Pepton	1 g
Ekstrakt drożdżowy	0,5 g
NaCl	1 g
Agar	1,4 g
Rozwór ampicyliny	100 µl
Uzupełnić wodą do	100 ml

R16. Roztwór ampicyliny (100 µg/ml)

Ampicylina	1 mg
ddH <sub>2</sub> O	10 ml

### **3.2.3. Izolacja DNA z wykorzystaniem metody wysalania.**

Izolację DNA z krwi pacjenta przeprowadzono za pomocą wysalania. W pierwszym etapie wykonano lizę erytrocytów. Objętość około 9 ml krwi pacjenta przelewano do probówek typu Falcon 50 ml. Następnie dodano roztworu do lizy

erytrocytów (R2) do objętości 50 ml. Inkubowano 20 min. w temperaturze pokojowej. Próbkę wirowano przez 10 min. przy 2100 rpm. Supernatant starannie odrzucono, osad przemyto 3 razy 10 ml PBS (R5). Osad komórek zawieszono w 2 ml roztworu do izolacji (R3). Lizat DNA przechowywano w temperaturze -20°C. Aby wyizolować DNA z tkanki nowotworowej należało rozdrobnić tkankę przy użyciu skalpela.

2 ml lizatu DNA (z krwi) oraz tkankę poddaną homogenizacji (DNA z guza) umieszczono w 15 ml probówkach typu Falcon, do których dodano 300 µl 10% SDS lub 150 µl 20% SDS (O.20) i 100 µl protK (R6). Objętość uzupełniona została roztworem do lizy (R2) do 3 ml. Po dokładnym wymieszaniu próbki pozostawiono na noc w łaźni wodnej w temperaturze 56°C. Po zakończeniu nocnej inkubacji dodano 1 ml 6 M NaCl (R13) do 3 ml strawionego lizatu DNA, dokładnie zmieszano. Po wytrąceniu białek zawiesina DNA została zwirowana 10 minut w temperaturze 4°C przy 13 000 rpm w celu ich usunięcia. Supernatant został przeniesiony do próbki 15 ml typu Falcon. W celu wytrącenia DNA, supernatant został dodany do 10 ml schłodzonego 96% EtOH. Wytrącone DNA przepłukano w 70% EtOH. DNA przeniesiono do próbki z 200 µl buforu TE (R10). Stężenie DNA mierzono za pomocą NanoDrop (ND-1000 Thermo Scientific). DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

### 3.2.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) do amplifikacji DNA.

Egzony genu VHL zostały amplifikowane metodą PCR. Dla każdego egzonu użyto starterów firmy GENOMED, które przedstawiono w **tabeli 10**.

Egzon	Starter <i>forward</i>	Starter <i>reverse</i>	Długość produktu (pz)
1	ACGGAGGTCGACTCGGGAG	TCAGTTCCCCGTCTGCAA	533
2	CACCGGTGTGGCTCTTAAAC	TGGGCTTAATTTTCAAGTGG	241
3	GCAAAGCCTCTTGTTTCGTTTC	ACCATCAAAGCTGAGATGAA	297

**Tabela 10.** Startery przeznaczone do analizy mutacji genu VHL.

Egzon pierwszy ze względu na swoją długość (533 par zasad) został amplifikowany osobno przy użyciu polimerazy proofreading (O.16) posiadającej również aktywność egzonukleazową 3' → 5'. W **tabeli 11** przedstawiono składniki wykorzystanie podczas PCR pierwszego egzonu, całkowita objętość mieszaniny wynosiła 25 µl na reakcję.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość (µl)
Starter F (50 nM)	1,25
Starter R (50 nM)	1,25
10 x Bufor	2,5
dNTP (5 mM)	4
H <sub>2</sub> O	13,1
Polimeraza Pfu (2,5 U/µl)	0,4
DNA (25 ng)	2,5

**Tabela 11.** Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji egzonu 1.

Dla egzonu 1 użyto programu reakcji składającego się z cykli obejmujących denaturację, przyłączanie startera i wydłużanie, dokładny schemat reakcji przedstawiono w **tabeli 12**.

Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
95°C	3'	1
95°C	30''	35
55°C	30''	35
72°C	4'	35
72°C	10'	1
4°C	∞	

**Tabela 12.** Warunki reakcji PCR dla egzonu 1.

Do amplifikacji drugiego i trzeciego egzonu genu VHL, ze względu na problemy optymalizacji reakcji została użyta polimeraza HiFiTaq (O.14) będąca mieszaniną specjalnie dobranych enzymów Pfu i Taq polimerazy. Polimeraza HiFiTaq jest alternatywą polimerazy proofreading. Wszystkie składniki mieszaniny PCR, której objętość wynosiła 20 µl na reakcję zebrano w **tabeli 13**.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
Starter F (50 nM)	1
Starter R (50 nM)	1
10 x Bufor	2
dNTP (5 mM)	3
H <sub>2</sub> O	12,25
Polimeraza HiFiTaq (5 U/μl)	0,25
DNA (25 ng)	1,5

**Tabela 13.** Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji egzonu 2 i 3.

Warunki reakcji PCR dla egzonu 2 i 3, które przedstawiono w **tabeli 14** zostały tak zoptymalizowane, aby były jednakowe dla par starterów obu egzonów. Każdorazowo, podczas reakcji PCR dla wszystkich egzonów stosowano kontrolę pozytywną, czyli DNA o znanej jakości oraz kontrolę negatywną, gdzie zamiast DNA dodawano analogiczną objętość wody destylowanej.

Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
95°C	9'	1
95°C	1'	35
55°C	45''	35
72°C	45''	35
72°C	7'	1
4°C	∞	

**Tabela 14.** Warunki reakcji PCR dla egzonu 2 i 3.

### 3.2.5. Kontrolne PCR.

Kontrolne reakcje PCR przeprowadzono na losowo wybranych próbkach z grupy pacjentów, aby potwierdzić prawidłowość oznakowania próbek oraz wykluczyć możliwość kontaminacji innym materiałem biologicznym. W celu weryfikacji próbek sprawdzono kontrolnie gen amelogeniny, w celu określenia płci pacjenta. Gen amelogeniny znajduje się na chromosomie X oraz Y i służy do identyfikacji płci. Do reakcji PCR użyto starterów przedstawionych w **tabeli 15**. Wszystkie składniki stosowane podczas reakcji zebrano w **tabeli 16**.

Starter	Sekwencja 3' → 5'	Długość produktu (pz)
<b>Amel X</b>	<b>CTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTG</b>	<b>790</b>
<b>Amel Y</b>	<b>TAAAGAGATTCATTAAGTACTGACTG</b>	<b>977</b>

**Tabela 15.** Startery przeznaczone do amplifikacji genu amelogeniny



Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
Starter F (50 nM)	1
Starter R (50 nM)	1
10 x Bufor	2
dNTP (5 mM)	2
H <sub>2</sub> O	12,75
Polimeraza Taq	0,25
DNA (25 ng)	1

**Tabela 16.** Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji dla genu amelogeniny.

Całkowita objętość mieszaniny PCR to 20 μl na reakcję. Schemat reakcji PCR przedstawiono w **tabeli 17**. Każdorazowo, podczas reakcji PCR stosowano kontrolę pozytywną, czyli DNA o znanej jakości oraz kontrolę negatywną, gdzie zamiast DNA dodawano analogiczną objętość wody destylowanej.

Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
95°C	5'	1
95°C	30''	30
60°C	30''	30
72°C	45''	30
72°C	7'	1
4°C	∞	

**Tabela 17.** Warunki reakcji PCR dla genu amelogeniny.

### 3.2.6. Zastosowanie elektroforezy żelowej w celu rozdzielania produktów PCR.

Produkty PCR analizowano na 1% żelu agarozowym. Do żelu dodano 5 μl bromku etydyny (O.24). Do kieszonki żelu agarozowego dodawano 3 μl produktu PCR. Elektroforeza żelowa została przeprowadzona w polu elektrycznym o napięciu 100 V przez 40 minut. Rozdział elektroforetyczny został udokumentowany przy użyciu transiluminatora UXT-30M-15E (BIO View).

### **3.2.7. Oczyszczanie produktów PCR.**

W celu oczyszczenia produktów PCR użyto zestawu do oczyszczania GeneMATRIX PCR / DNA Clean-Up Purification Kit (nr kat. E3520).

Do każdej próbki zawierającej produkt PCR dodano 400 µl buforu Orange DX i zawieszono krótko za pomocą pipety. Mieszanina DNA została przeniesiona na mini-kolumny, które wcześniej aktywowano poprzez dodanie 40 µl buforu aktywującego (Bufor DX) na membranę. Mini-kolumny wirowano przez 1 min z prędkością 12 000 rpm w temperaturze pokojowej, po odwirowaniu usunięto przesącz. Aby usunąć zanieczyszczenia do każdej mini-kolumny dodano 500 µl buforu płuczającego (Wash DX1), mini-kolumny wirowano przez 1 min z prędkością 12 000 rpm, po odwirowaniu przesącz usunięto. Następnie do każdej mini-kolumny dodano 650 µl buforu płuczającego (Wash DX2) i wirowano przez 1 min z prędkością 12 000 rpm. Przesącz usunięto i mini-kolumny wirowano ponownie przez 2 min z prędkością 12 000 rpm, aby usunąć pozostałości buforu do płukania.

Mini-kolumny zostały umieszczone w nowych próbkach 2 ml typu Eppendorf. W celu zwiększenia wydajności odzysku DNA do mini-kolumny dodano 24 µl buforu do elucji (Elution Buffer) i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 min z prędkością 12 000 rpm. Oczyszczone produkty PCR przechowywano w temperaturze -20°C.

### **3.2.8. Sekwencjonowanie.**

Po oczyszczaniu próbki wysłano do sekwencjonowania do laboratorium Genomed w Warszawie. Próbki sekwencjonowano przy użyciu Sekwenatora kapilarnego 3730 x 1 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Wszystkie próbki wysłane do sekwencjonowania przygotowano dodając odpowiednio:

- 4,5 µl wody MiliQ,
- 1 µl startera (5uM)
- 0,5 µl oczyszczonej matrycy

### 3.2.9. Analiza sekwencji.

Wyniki sekwencjonowania otrzymano w formacie FinchTV. Wynik odczytywano w narzędziu chromatogram viewer - programie FinchTV (Geospiza). Dokładną analizę sekwencji wykonano przy użyciu programu CLS Sequence Viewer (CLC Bio). W CLC Sequence Viewer zsekwencjonowany fragment DNA porównano z sekwencją referencyjną (NC\_000003 - NCBI source).

Wszystkie zmiany scharakteryzowane na poziomie DNA zostały skorelowane ze zmianą w sekwencji aminokwasowej. Wykryte mutacje zostały również sprawdzone pod względem wpływu na zmiany fenotypu za pomocą baz danych Universal Mutation Database, Sanger Database, ENSEMBL Database w genie VHL i bazy danych SNPper Database w genie VHL.

### 3.2.10. Klonowanie produktu PCR.

Klonowaniu poddano wszystkie próby, które po analizie wyników sekwencjonowania miały zmiany sekwencji w jednym z dwóch alleli genu VHL wynoszące ponad 10 par zasad. Zmianami sekwencji były delecje oraz insercje.

Oczyszczone produkty PCR zostały wprowadzone do plazmidowego DNA (wektor pJET 1.2/bunt) przy użyciu CloneJET PCR Cloning Kit firmy Fermentas (nr K1231) zgodnie z zalecanym przez firmę protokołem przedstawianym poniżej:

1. Przygotuj mieszaninę reakcyjną do ligacji przedstawioną w **tabeli 18**.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
2 x Bufor	10
Oczyszczony produkt PCR	1
H <sub>2</sub> O	5
Enzym tworzący tępe końce DNA	1

**Tabela 18.** Przygotowanie produktu PCR do klonowania.

2. Zworteksuj i zwiruj mieszaninę przez 3-5 sek.
3. Inkubuj mieszaninę w 70°C przez 5 min. Schłódź na lodzie.

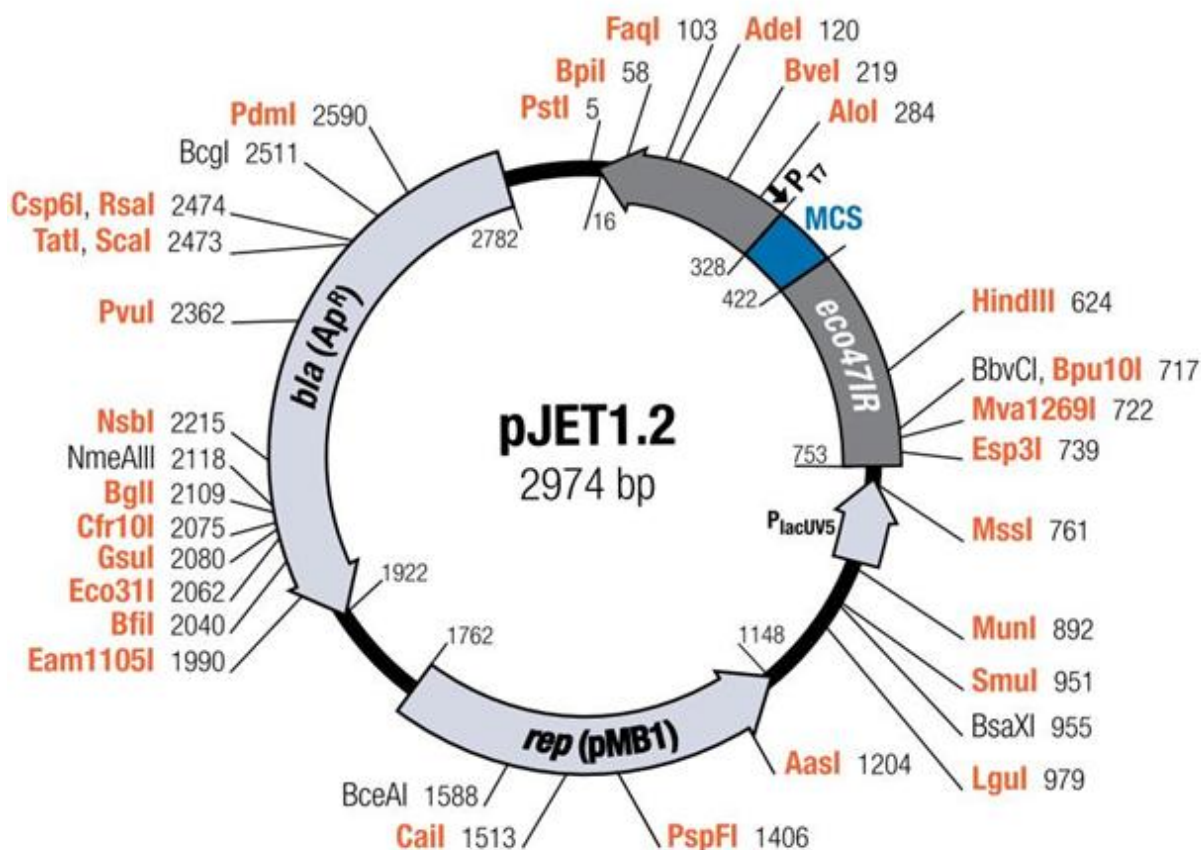
- Umieść mieszaninę reakcyjną na lodzie. Dodaj przedstawioną w tabeli 19 mieszaninę reakcyjną:

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
pJET 1.2/blunt wektor (50 ng/μl)	1
T4 DNA ligaza	1

**Tabela 19.** Mieszanina reakcyjna zawierająca wektor i ligazę DNA.

- Zworteksuj i zwiruj mieszaninę przez 3-5 sek. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosi 20 μl.
- Inkubuj mieszaninę ligacyjną w temperaturze 22°C przez 5 min.
- Użyj mieszaninę reakcyjną bezpośrednio do transformacji.

Na rycinie 11 przedstawiono mapę wektora pJET 1.2/bunt.



**Rycina 11.** Mapa wektora pJET1.2/bunt.

Następnie dokonano transformacji bakterii kompetentnych *E. coli* (szcep DH5 $\alpha$ ) plazmidowym DNA. Wektor pJET1.2/blunt zawierający produkt PCR został wprowadzony do bakterii zgodnie z protokołem przedstawianym poniżej:

1. Rozmrozić i przygotować 50  $\mu$ l bakterii kompetentnych. Pozostawić na lodzie.
2. Dodać 20  $\mu$ l plazmidowego DNA. Pozostawić 20 min. na lodzie.
3. Umieścić zawiesinę komórek kompetentnych oraz plazmidowego DNA w 42°C przez 90 sek.
4. Pozostawić zawiesinę na lodzie przez 5 min.
5. Dodać 500  $\mu$ l medium LB (R14)
6. Inkubować komórki w temperaturze 37°C przez 20 min.
7. Nałożyć zawiesinę komórek na płytki LB z agarem (R15 z ampicyliną) przy użyciu sterylnej głaszczki.
8. Inkubować płytkę z nałożoną zawiesiną komórek przez noc w temp. 37°C.

Po transformacji bakterii *E. coli* plazmidowym DNA uzyskano wyselekcjonowane kolonie zawierające sklonowane produkty PCR egzonów 1, 2 i 3 genu VHL, ponieważ wektor pJET1.2/bunt miał gen odporności na ampicylinę. Zawiesina komórek *E. coli* była nałożona na płytki zawierające ampicylinę i inkubowana wg protokołu.

Następnie pobierano tipsem po 8 kolonii bakteryjnych i przenoszono je do probówki. Kolonie bakteryjne służyły jako matryca do reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna użyta do reakcji PCR była taka sama jak wykorzystana do standardowej reakcji PCR dla egzonu 1, 2 i 3 genu VHL (**tabela 11** i **tabela 13**). Warunki przeprowadzonej reakcji były również takie same (**tabela 12** i **tabela 14**).

### **3.3. Analiza statystyczna.**

Analizowane dane pochodziły z trzech skal pomiarowych: interwałowej, porządkowej i nominalnej. Zgodność danych ze skali interwałowej sprawdzano za pomocą testu Shapiro -Wilka. Ponieważ dane interwałowe wykazały brak zgodności z rozkładem normalnym obliczenia wykonano przy pomocy testów nieparametrycznych, podobnie analizowano dane pochodzące ze skali porządkowej. Do porównania dwóch grup stosowano test Manna - Whitney'a. Porównując więcej niż dwie grupy

jednocześnie zastosowano test Kruskala -Wallisa. Gdy test Kruskala - Wallisa wskazywał na występowanie istotnych różnic między badanymi grupami zastosowano test post-hoc Dunn'a w celu wyznaczenia grup jednorodnych.

Dane ze skali nominalnej analizowano testem niezależności chi - kwadrat, a w przypadku występowania licznosci zerowych w tabelach zastosowano dokładny test Fishera lub test Fishera – Freemana - Haltona. Dla istotnych predyktorów wystąpienia mutacji, objawów lub przynależności do grup G1+G2 vs G3 wyznaczano dodatkowo iloraz szans wraz z 95% przedziałem ufności.

Wszystkie testy były analizowane na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ . Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego Statistica 10 firmy StatSoft oraz pakietu GraphPad 3.06 (GraphPad Software).

## 4. Wyniki

### 4.1. Parametry kliniczne.

Do badań zakwalifikowano 100 chorych, w tym 58 mężczyzn i 48 kobiet w wieku od 26 do 87 lat (średnia wieku wynosiła 63,6 lat, mediana 64 lata, odchylenie standardowe 10,48).

#### 4.1.1. Czynniki ryzyka raka nerki w grupie badanej.

W badanej grupie analizowano występowanie różnych czynników ryzyka rozwoju raka nerki, w tym: otyłości, palenia tytoniu oraz nadciśnienia tętniczego.

Wagę ciała oceniano na podstawie BMI, który wyliczono ze wzoru: waga [kg]/{wzrost [m]}<sup>2</sup>. Pacjentów podzielono na 3 grupy: pierwsza grupa to pacjenci z prawidłową wagą (BMI od 18,5 do 24,99), druga grupa to pacjenci z nadwagą (BMI od 25,0 do 29,99) oraz trzecia grupa to pacjenci otyli (BMI od 30). Najliczniejszą grupę stanowili pacjenci z nadwagą 52,5% a najmniej liczną pacjenci z prawidłowym BMI 20,2%.

Palenie tytoniu w grupie badanych pacjentów dotyczyło 43 palaczy, natomiast 56 nigdy nie paliło papierosów. Mediana czasu palenia papierosów wynosi 34 lata, minimum 2 lata a maksimum 53 lata, odchylenie standardowe 12,95.

Nadciśnienie tętnicze stwierdzono u 67 pacjentów, z czego 63 przyjmowało leki obniżające ciśnienie. 32 pacjentów miało prawidłowe ciśnienie tętnicze krwi.

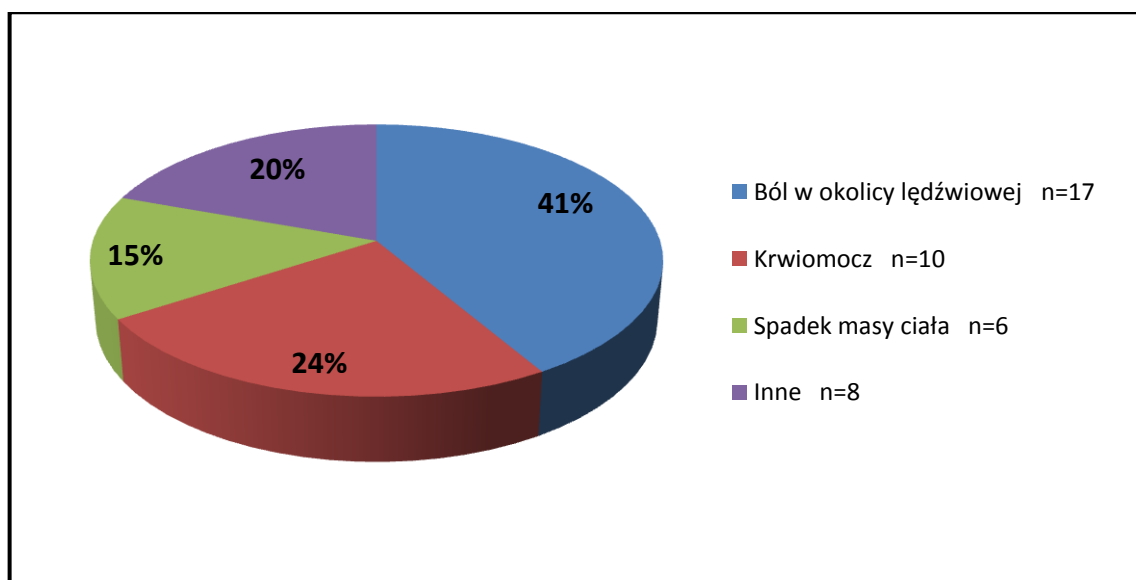
Dane charakteryzujące występowanie czynników ryzyka raka nerki u 99 pacjentów zebrano w tabeli 20.

Czynniki ryzyka raka nerki	Liczba pacjentów	% pacjentów
BMI - norma	20	20,2
BMI - nadwaga	52	52,5
BMI - otyłość	27	27,3
Palący papierosy	43	43,4
Nadciśnienie tętnicze	67	67,7

**Tabela 20.** Charakterystyka grupy badanej pod względem występowania czynników ryzyka RCC.

#### 4.1.2. Objawy występujące przed rozpoznaniem raka nerki.

Rak nerki był wykryty przypadkowo u 70 pacjentów (70%), natomiast występowanie objawów przed rozpoznaniem raka jasnokomórkowego nerki zgłaszało 30 pacjentów (30%). Najczęstszym objawem był ból okolicy lędźwiowej, występujący u 17 pacjentów. Drugi co do częstości występowania krwimocz zgłaszało 10 osób. U dwóch pacjentów występował ból i krwimocz. Sześciu pacjentów zgłaszało spadek masy ciała, a u 8 chorych występowały, inne rzadsze objawy, między innymi: osłabienie, stany podgorączkowe, pocenie nocne. Wyczuwalny guz jamy brzusznej, należący do triady objawów raka nerki, nie występował u żadnego z pacjentów. Rozkład procentowy i liczbowy objawów występujących u 30 pacjentów przedstawiono na **rycinie 12**. Spośród 30 pacjentów 19 (63,3%) zgłaszało więcej niż jeden objaw.



**Rycina 12.** Objawy występujące u 30 pacjentów przed rozpoznaniem raka jasnokomórkowego nerki. 19 pacjentów zgłaszało więcej niż jeden objaw.

#### 4.1.3. Choroby współistniejące z rakiem jasnokomórkowym nerki.

U 60 pacjentów (60,6%) stwierdzono następujący, przedstawiony w **tabeli 21** rozkład chorób współistniejących z rakiem jasnokomórkowym nerki, 39 pacjentów (39,4%) nie zgłaszało chorób innych niż ccRCC. Jak wynika z tabeli najczęściej u pacjentów występowały choroby serca i układu krążenia (włączając chorobę niedokrwienną serca a wyłączając nadciśnienie tętnicze, które omówiono powyżej) oraz cukrzyca.

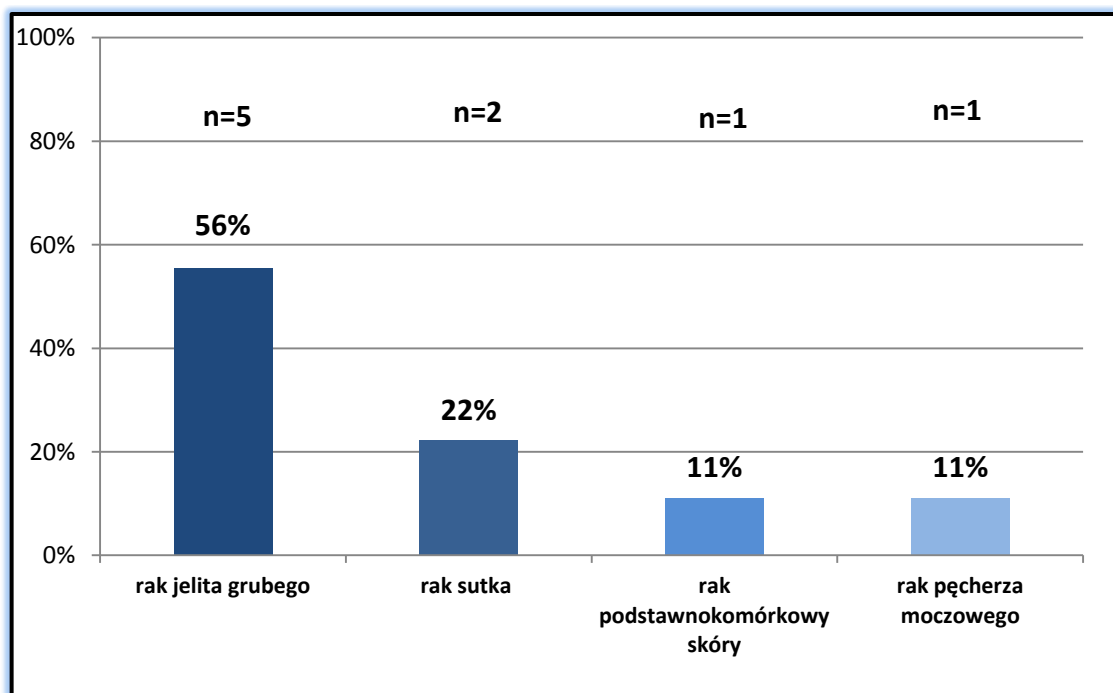


<b>Choroby współistniejące</b>	<b>Liczba pacjentów</b>	<b>% pacjentów</b>
Cukrzyca	21	21,2
Choroba niedokrwienna serca	20	20,2
Choroby serca i układu krążenia	27	27,3
Choroby układu oddechowego	7	7,1
Choroby tarczycy	10	10,1
Łagodny przerost prostaty	8	8,1
Zwyrodnienie stawów kręgosłupa	7	7,1
Depresja	3	3
Łuszczyca	2	2
Inne	11	11,1

**Tabela 21.** Rozkład chorób współistniejących z ccRCC u 99 pacjentów. Podano wartości liczbowe i procentowe.

#### **4.1.4. Choroby nowotworowe występujące u pacjentów z ccRCC oraz u członków ich rodzin.**

Informacje dotyczące występowania chorób nowotworowych u pacjentów przed rozpoznaniem ccRCC uzyskano na podstawie przeprowadzonych wywiadów. W tej grupie 20 pacjentów (20,2%) przed rozpoznaniem raka jasnokomórkowego nerki było leczonych z powodu choroby nowotworowej, u 11 pacjentów były to zmiany niezłośliwe, a u 9 nowotwór złośliwy. Wśród rozpoznań nowotworów niezłośliwych najczęściej rozpoznano mastopatię lub włókniak sutka (u 3 pacjentów), pozostałe rozpoznania to: polip jelita grubego, mięśniaki macicy, torbiel jajnika, zaśnied groniasty, oponiak rynienki węchowej, gruczolak nadnerczy oraz guz rdzenia kręgowego. Z powodu nowotworu złośliwego było leczonych 9 pacjentów (rozkład liczbowy i procentowy nowotworów złośliwych przedstawiono na **rycinie 13**), w momencie rozpoznania ccRCC wszystkie te osoby były bez cech nawrotu poprzedniej choroby nowotworowej.



**Rycina 13.** Typy nowotworów złośliwych u 9 pacjentów przed rozpoznaniem u nich ccRCC.

59 pacjentów miało krewnych I-go lub II-go stopnia, u których rozpoznano nowotwór złośliwy (rozkład liczbowy i procentowy typów nowotworów złośliwych pokazano w **tabeli 22**). Najczęściej występował rak sutka i płuca, odpowiednio 14,3% i 13,1%. Na uwagę zasługuje fakt częstego występowania raka trzustki (10,7%). Wśród nowotworów łagodnych występujących u krewnych pacjentów z ccRCC najczęstsze to guz sutka, mięśniaki macicy, polipy jelita grubego, pozostałe to: guz trzustki, guz mózdzku, torbiel jajnika, guz tarczycy.

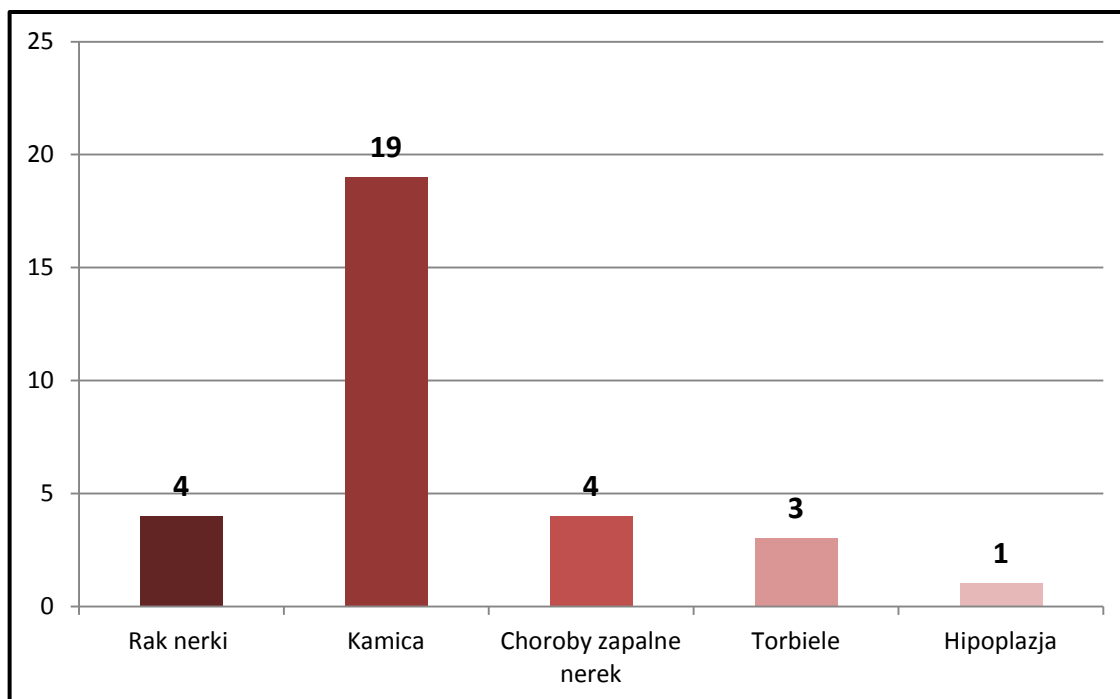
Typ nowotworu złośliwego	Liczba	%
Rak sutka	12	14,3
Rak płuca	11	13,1
Rak żołądka	10	11,9
Rak trzustki	9	10,7
Rak narządu rodneho	9	10,7
Rak wątroby	5	5,9
Rak krtani	5	5,9
Rak nerki	4	4,8
Rak przełyku	4	4,8
Rak jelita grubego	3	3,4

Typ nowotworu złośliwego	Liczba	%
Rak prostaty	2	2,4
Nowotwór złośliwy mózgu	2	2,4
Rak dwunastnicy	1	1,2
Rak pęcherza moczowego	1	1,2
Proces nowotworowy	6	7,1

**Tabela 22.** Rozkład liczbowy i procentowy typów nowotworów złośliwych u krewnych pacjentów zakwalifikowanych do niniejszej pracy. U 6 osób był to rozszany proces nowotworowy o nieznanym punkcie wyjścia.

#### 4.1.5. Choroby nerek u członków rodzin pacjentów objętych badaniem.

Dane dotyczące chorób nerek u krewnych I-go i II-go stopnia pacjentów z ccRCC przedstawiono na **rycynie 14**. Dane te uzyskano z analizy ankiet przeprowadzonych u pacjentów zakwalifikowanych do moich badań. Potwierdziło występowanie chorób nerek u członków rodziny 30 pacjentów (30,3%), 69 pacjentów (69,7%) zaprzeczyło. Najczęściej występowała kamica nerkowa (u 19 osób), u jednego pacjenta kamica nerkowa występowała u dwóch członków rodziny. Znacznie rzadziej występował rak nerki (u 4 osób), torbiele nerek (u 4 osób), choroby zapalne nerek (u 3 osób), jedna osoba miała hipoplastyczną nerkę.



**Rycina 14.** Choroby nerek występujące u krewnych I-go i II-go stopnia pacjentów z ccRCC.

#### 4.1.6. Stopień zaawansowania i zróżnicowania ccRCC u pacjentów.

Ocenie poddano wielkość guza nerki na podstawie wymiarów w opisach wyników TK jamy brzusznej, brano pod uwagę 2 wymiary (największy i najmniejszy w przekrojach czołowych). Średnia arytmetyczna wymiarów najmniejszych to 46,02mm, a wymiarów największych to 57,05mm. Wielkość guza mieściła się w granicach od 18mm do 150mm. Pacjent z największym guzem o wymiarach 150x80mm miał przerzuty do płuc, ale także przerzuty do płuc miał pacjent z guzem o wymiarach 33x32mm.

Według klasyfikacji TNM z 2009 roku dokonano oceny guza - T, węzłów chłonnych - N oraz przerzutów - M. Analizę kliniczną przeprowadzono na podstawie wyników TK jamy brzusznej i RTG klatki piersiowej. Przy podejrzeniu przerzutów do płuc u pacjentów wykonywano TK klatki piersiowej. U 11 pacjentów (11%) zaobserwowano przerzuty do płuc.

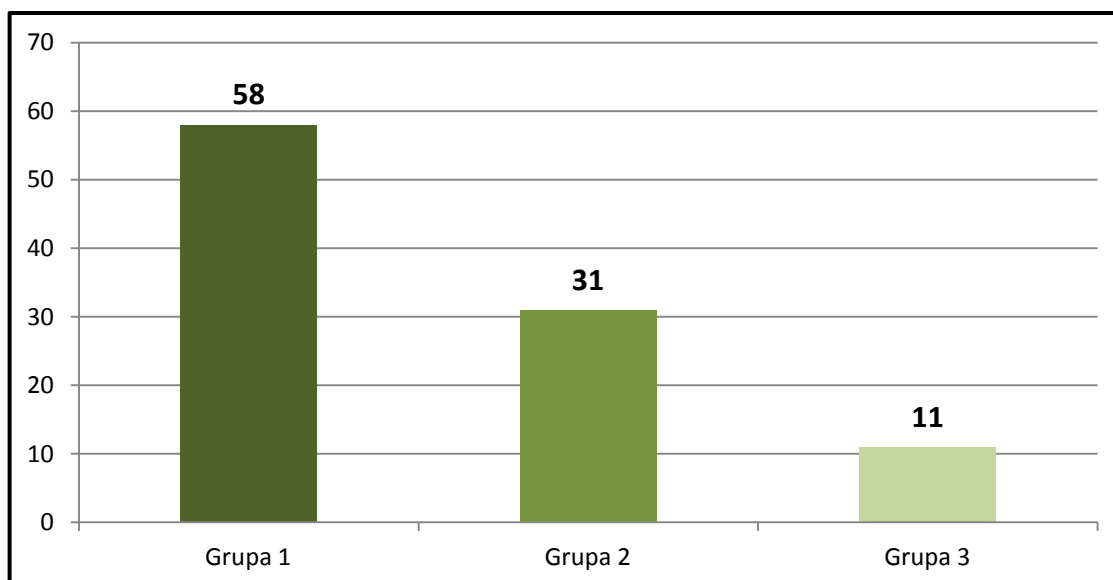
Z pracy wykluczano pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych, wyjątek stanowili pacjenci z przerzutami do płuc. Dlatego pacjenci z podejrzeniem przerzutu do węzłów chłonnych (powiększone węzły chłonne w TK jamy brzusznej) byli wykluczeni z badań. Jednak u wszystkich pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu obligatoryjnie usuwano węzły chłonne. U 3 pacjentów w węzłach chłonnych pochodzących z okolicy wnęki nerki patomorfolog stwierdził komórki raka jasnokomórkowego, byli to pacjenci z przerzutami do płuc.

W **tabeli 23** przedstawiono ilościowy rozkład 100 pacjentów wg klasyfikacji TNM, biorąc pod uwagę kliniczną ocenę guza (T) oraz patologiczną ocenę guza (pT) na podstawie wyników histopatologicznych uzyskanych z preparatów operacyjnych. Na podstawie oceny klinicznej najliczniejszą grupę (n = 37) stanowili pacjenci z małym guzem (T1b), bardzo liczną grupę (n = 33) stanowili pacjenci z najmniejszymi guzami (T1a). Stosunkowo mało (n = 7) było pacjentów, z opisywanym w TK, guzem z naciekiem na tkankę tłuszczową (T3a). Po analizie wyników histopatologicznych stwierdzono, że najliczniejszą grupę (n = 38) stanowili pacjenci z guzem naciekającym tkankę tłuszczową (pT3a). W grupie badanej nie było pacjentów z czopem nowotworowym w żyłę głównej powyżej przepony (T3c).

Klasyfikacja TNM	Ocena kliniczna (T)	Ocena patologiczna (pT)
T1a/ pT1a	33	34
T1b/ pT1b	37	22
T2a/ pT2a	19	3
T2b/ pT2b	1	0
T3a/ pT3a	7	38
T3b/ pT3b	2	1
T4/ pT4	1	2

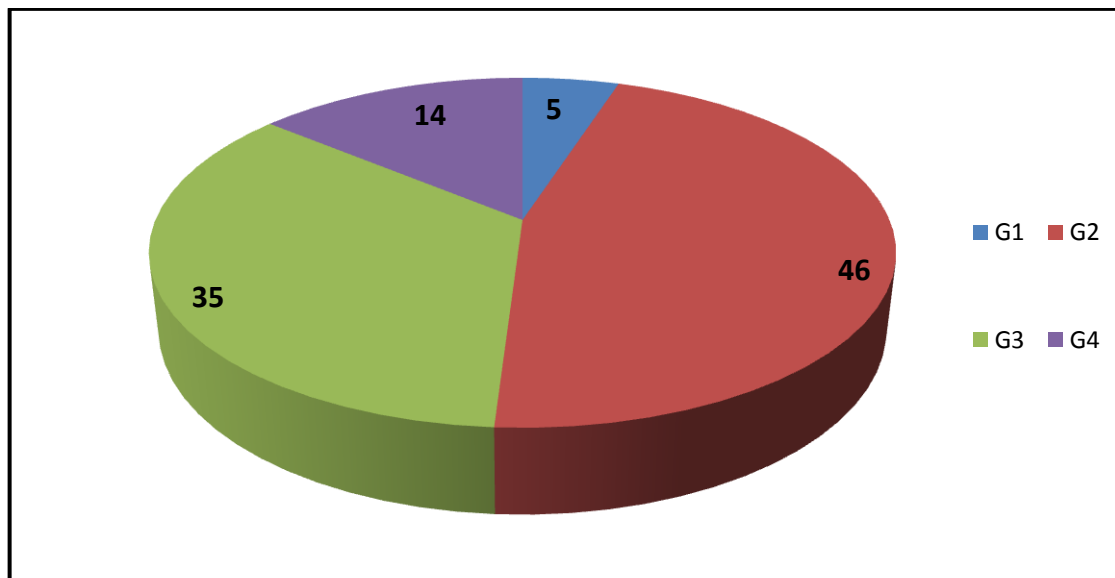
**Tabela 23.** Klasyfikacja oceny stopnia zaawansowania guza nerki 100 pacjentów wg klasyfikacji TNM z 2009 roku.

Na podstawie klasyfikacji TNM zaawansowania nowotworu wszystkich pacjentów podzielono na trzy grupy. Do grupy 1 przydzielono pacjentów z ccRCC ograniczonym do nerki (pT1 + pT2), do grupy 2 włączono pacjentów z rakiem naciekającym tłuszcz okołonerkowy (pT3a), a pacjenci z przerzutami do płuc znaleźli się w grupie 3 (pacjent z rozpoznaniem pT3b miał przerzuty do płuc). Liczebność w poszczególnych grupach przedstawiono na **rycynie 15**. Podziału tego dokonano dla celów statystycznych przy analizie zależności pomiędzy stopniem zaawansowania nowotworu a obecnością mutacji w genie VHL.



**Rycina 15.** Podział pacjentów na trzy grupy w zależności od stopnia zaawansowania choroby nowotworowej. Grupa 1 – pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki, Grupa 2 – pacjenci z rakiem naciekającym tkankę tłuszczową, Grupa 3 – pacjenci z przerzutami do płuc.

Stopień złośliwości nowotworu oceniono zgodnie z czterostopniową klasyfikacją Furhman'a. Na **rycynie 16** pokazano ilościowy udział 100 pacjentów w poszczególnych grupach od G1 do G4, gdzie G1 to guzy dobrze zróżnicowane, najmniej złośliwe, a G4 to guzy niezróżnicowane, najbardziej złośliwe.



**Rycina 16.** Klasyfikacja oceny stopnia zróżnicowania nowotworu wg Furhman'a.

#### **4.1.7. Badania laboratoryjne wykonane u pacjentów.**

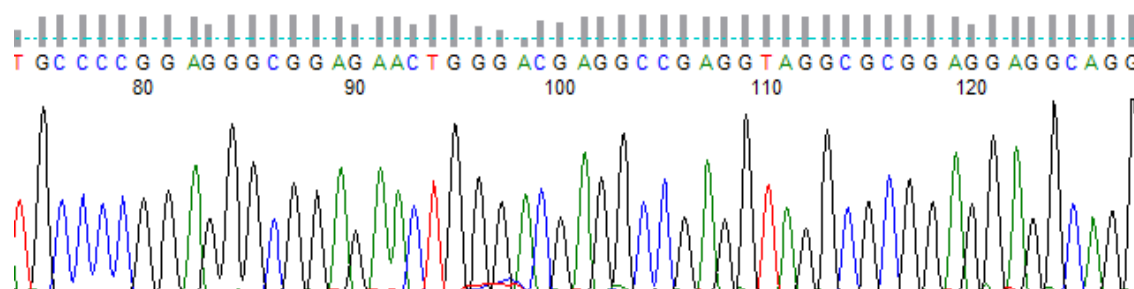
Wszyscy pacjenci mieli wykonaną morfologię krwi, oznaczone stężenia kreatyniny, glukozy, elektrolitów: sodu i potasu. Analizie poddano poziom hemoglobiny. Według wartości referencyjnych normy dla kobiet (12,0 - 16,0g/dl) i dla mężczyzn (14,0 – 18,0g/dl) podzielono pacjentów na trzy grupy: norma, poniżej normy i powyżej normy. Prawidłowe wartości hemoglobiny miało 68 pacjentów, poniżej normy 30 pacjentów, a powyżej normy 2 pacjentów. Również stężenie kreatyniny poddano ocenie. Pogrupowano pacjentów na tych, którzy mieli prawidłowe wartości kreatyniny (62 -106 $\mu$ mol/L) oraz na tych z podwyższonym stężeniem kreatyniny w surowicy krwi. Większość stanowili pacjenci z prawidłowym stężeniem kreatyniny (87), 13 pacjentów miało stężenie kreatyniny powyżej normy.

## 4.2. Mutacje genu VHL w grupie badanych pacjentów

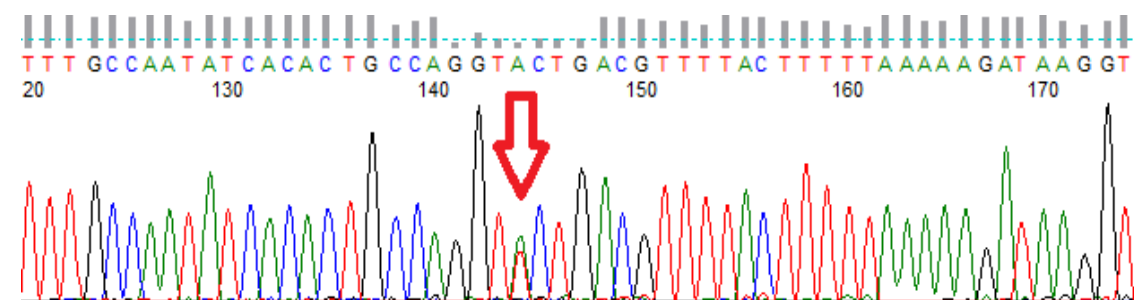
Pacjentów zakwalifikowanych do badań genotypowano na obecność mutacji w genie VHL. U 100 pacjentów sekwencjonowano DNA wyizolowane z krwi obwodowej na obecność mutacji germinalnych. Analizę sekwencji genu VHL na obecność mutacji somatycznych z DNA wyizolowanego z tkanki guza przeprowadzono u 96 pacjentów. Czterech pacjentów wykluczono z oceny obecności mutacji somatycznych, ponieważ tkanka guza była pobrana niezgodnie z protokołem badań.

### 4.2.1. Analiza sekwencji genu VHL.

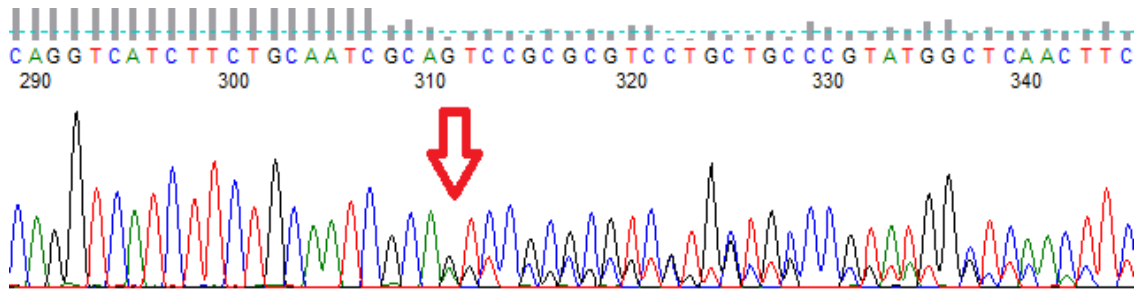
Wyniki sekwencjonowania genu VHL odczytywano w programie FinchTV. Dokładną analizę sekwencji wykonano przy użyciu programu CLS Sequence Viewer. Na **rycynie 17** pokazano reprezentatywny chromatogram prawidłowej sekwencji genu VHL. Przykładowy chromatogram genu VHL zawierający mutację punktową przedstawiono na **rycynie 18**. Chromatogram części sekwencji egzonu 1 zawierającego mutację z przesunięciem ramki odczytu pokazano na **rycynie 19**.



**Rycina 17.** Reprezentatywny chromatogram prawidłowej sekwencji genu VHL.



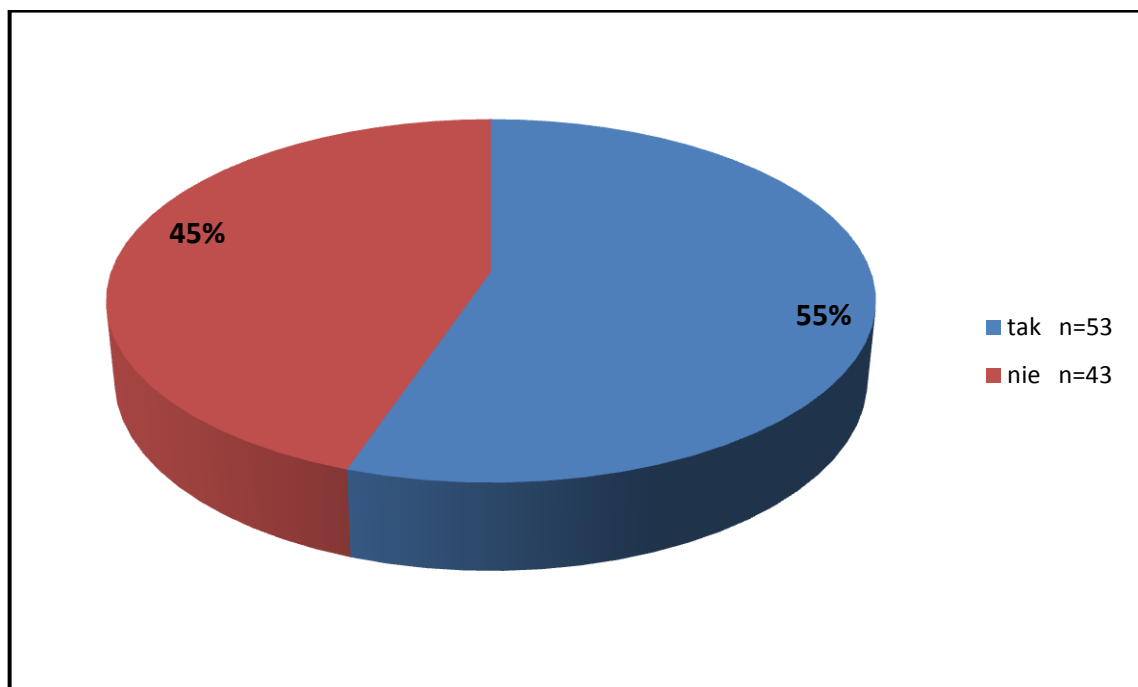
**Rycina 18.** Chromatogram przedstawiający mutację punktową w genie VHL. Część sekwencji egzonu 1. Strzałką wskazano substytucję adeniny na tyminę w pozycji 144 (pacjent 01-105).



**Rycina 19.** Chromatogram przedstawiający mutację z przesunięciem ramki odczytu w genie VHL. Część sekwencji egzonu 1. Strzałką wskazano delecję adeniny w pozycji 451 (pacjent 01-102).

#### 4.2.2. Obecność mutacji w genie VHL u pacjentów z ccRCC.

Po analizie sekwencji genu VHL stwierdzono obecność mutacji u 53 pacjentów, z czego 51 pacjentów miało mutacje somatyczne (guz), a 2 pacjentów miało mutacje germinalne (PBMCs). Dwóch pacjentów, u których rozpoznano zespół von Hippel-Lindau rak jasnokomórkowy nerki był jedyną manifestacją zespołu. Częstość mutacji genu VHL w DNA komórek raka jasnokomórkowego przeanalizowanych u 96 pacjentów przedstawiono na **rycynie 20**. U 55% pacjentów stwierdzono mutację, prawidłową sekwencję genu VHL miało 45% pacjentów.

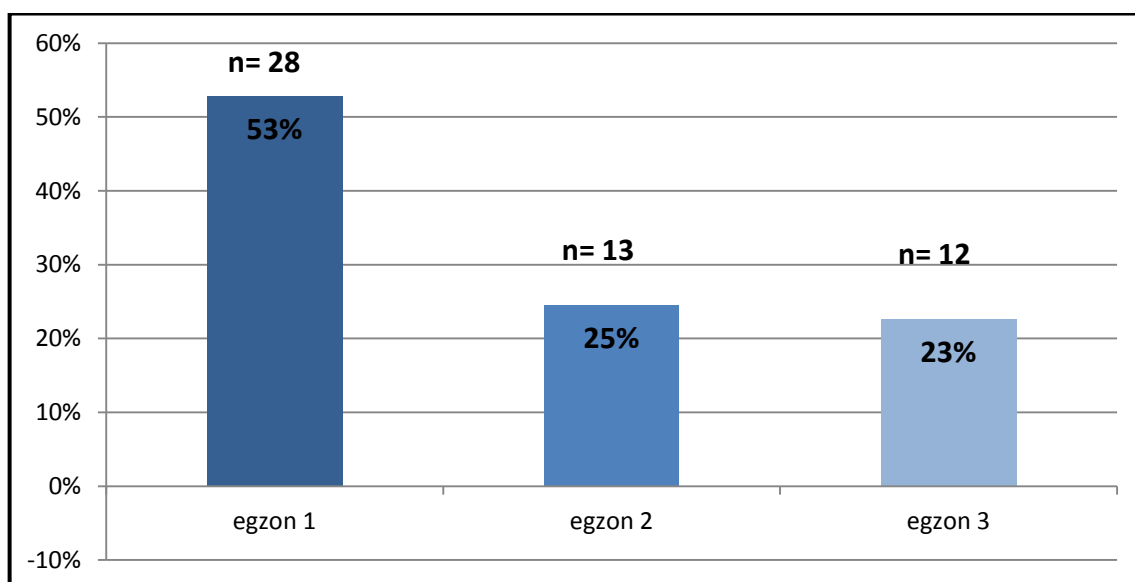


**Rycina 20.** Częstość mutacji w genie VHL. Na niebiesko zaznaczono pacjentów, u których stwierdzono mutacje w genie VHL. Na czerwono zaznaczono pacjentów, u których wykazano brak mutacji w genie VHL.



### 4.2.3. Lokalizacja i rodzaje mutacji w genie VHL.

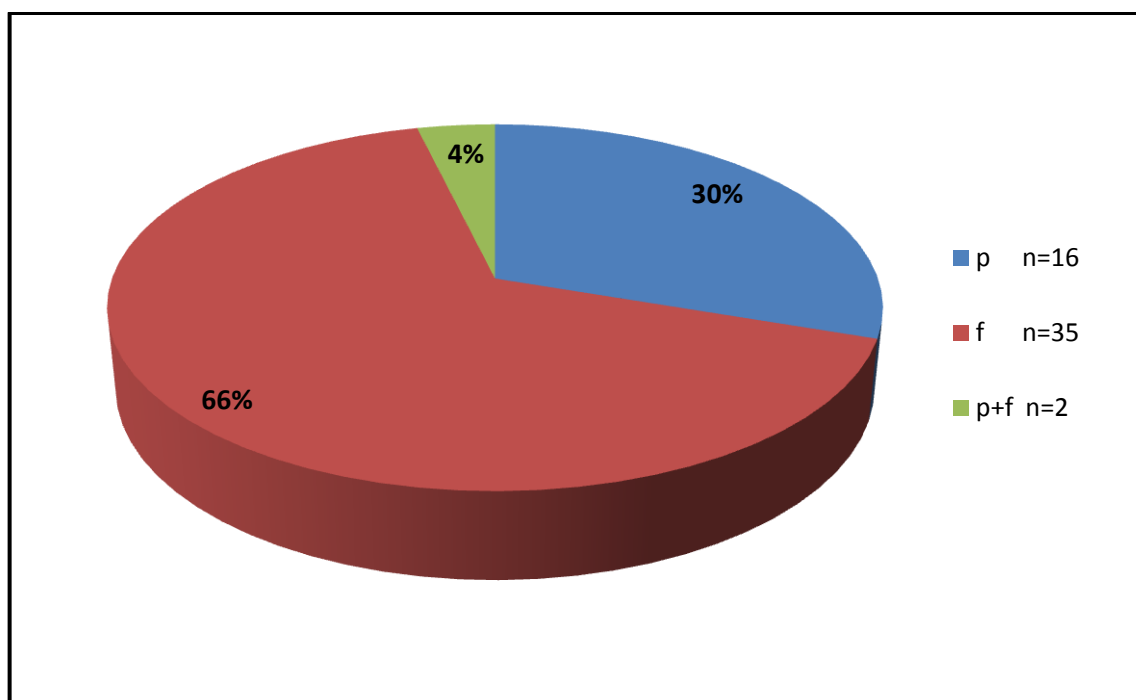
Pacjenci, u których stwierdzono mutacje w egzonie pierwszym stanowili 53%, (n=28). W egzonie drugim mutacje wykryto u 13 pacjentów (25%), najmniejszą grupę liczącą 12 osób (23%) stanowili pacjenci z mutacjami w egzonie trzecim. Na **rycynie 21** przedstawiono procentowy i liczbowy rozkład pacjentów, z uwzględnieniem występowania mutacji w poszczególnych egzonach.



**Rycina 21.** Procentowy i liczbowy rozkład pacjentów, u których stwierdzono mutacje odpowiednio w pierwszym, drugim i trzecim egzonie.

Rozkład mutacji pokazuje wysoką częstość występowania mutacji w przedziale pozycji nukleotydów części kodującej DNA od 230 do 290 (egzon 1) oraz od 400 do 490 (końcowy fragment egzonu 2 i początkowy fragment egzonu 3). Tylko jedna mutacja (pacjent 01-073) była wśród pierwszych 162 nukleotydów (w pozycji nukleotydu 74). Rozmieszczenie mutacji przełożono na budowę białka VHL i stwierdzono, że występują one w DNA kodującym domenę  $\beta$  (miejsce łączenia się z HIF $\alpha$  oraz sterującym transport jądrowy) i domenę  $\alpha$  (miejsce łączenia się z elonginą C).

Wśród 53 pacjentów, u których stwierdzono mutacje genu VHL w tkance guza, 35 osobową grupę stanowili pacjenci z mutacjami z przesunięciem ramki odczytu (66%) (z ang. frameshift mutation). Mutacje punktowe (z ang. point mutation) wykryto u 16 pacjentów (30%). Dwóch pacjentów miało zarówno mutację punktową jak i mutację z przesunięciem ramki odczytu (4%). Graficznie podział pacjentów w zależności od typu mutacji przedstawiono na **rycynie 22**.



**Rycina 22.** Procentowy i liczbowy rozkład pacjentów w zależności od typu mutacji stwierdzonej w genie VHL. Literą **p** oznaczono pacjentów, u których występuje mutacja punktowa. Literą **f** pacjentów, u których stwierdzono mutacje z przesunięciem ramki odczytu, natomiast pacjentów, u których wykryto oba typy mutacji oznaczono **p + f**.

W 4 tkankach guza (nr 01-037, 01-043, 01-066, 01-132) wykryto 2 mutacje:

- 01-037 c. 268\_272 AACTT > TTTTA; c. 273 del C
- 01-043 c. 288 ins A; c. 289\_305 del CCCTACCCAACGCTGCC
- 01-066 c. 192 C > A; c. 193 del T
- 01-132 c. 273 del C; c. 274 G > A

Jeden pacjent (nr 01-110) miał 3 mutacje:

- 01-110 c. 160 A > G; c. 185 T > C; c. 310 del G

U tych pacjentów mutacje były zlokalizowane w pierwszym egzonie. Z tego wynika, że wszystkich mutacji zlokalizowanych w egzonie 1 było 34 (58%).

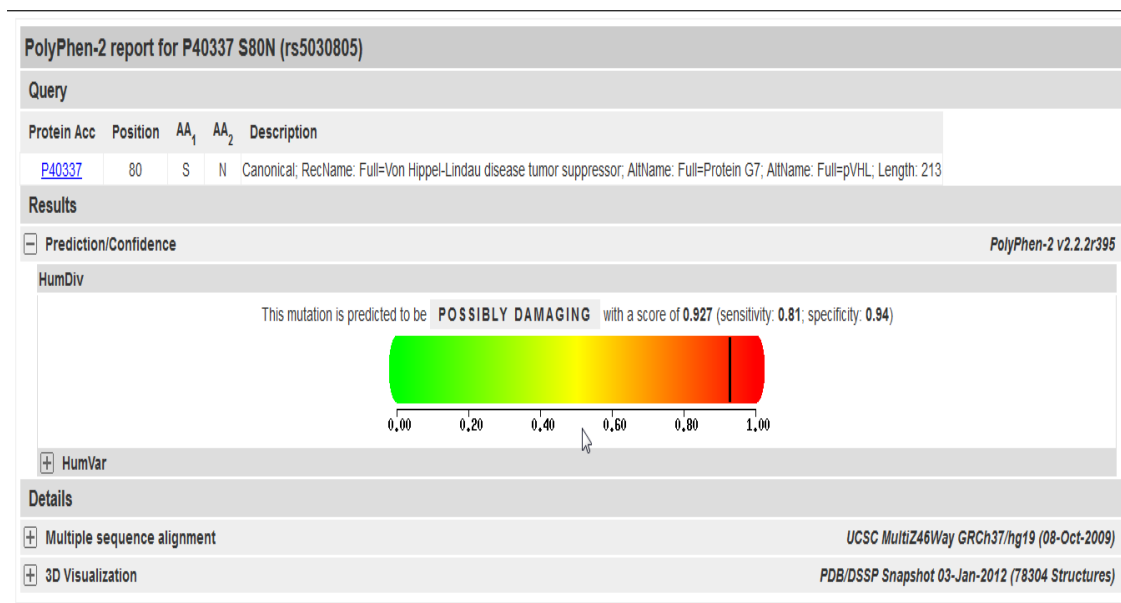
Przeprowadzono analizę mutacji punktowych i podzielono pacjentów w zależności od typu mutacji punktowej (n = 18). 16 pacjentów miało mutację zmiany sensu, co oznacza zamianę aminokwasu na inny w łańcuchu peptydowym. Grupa ta stanowi 89% wszystkich pacjentów, u których stwierdzono substytucję w genie VHL. Mutacje nonsensowne skutkujące pojawieniem się przedwcześnie kodonu STOP w sekwencji nukleotydowej wykryto u 2 pacjentów, co stanowi 11%. Nie odnaleziono mutacji niemych w grupie badanej.

Wśród mutacji z przesunięciem ramki odczytu wyróżniamy: delecję (ubytek nukleotydu lub nukleotydów) oraz insercję (wstawienie nukleotydu lub nukleotydów). Spośród 37 pacjentów posiadających mutację z przesunięciem ramki odczytu 73% stanowili pacjenci z delecją (n = 27 pacjentów), 24% to pacjenci z insercją (n = 9 pacjentów). U jednego pacjenta (nr 01-043) występowały jednocześnie dwa typy mutacji: delecja i insercja.

Dwóch pacjentów z zespołem VHL miało mutacje punktowe. Pacjent 01-064 miał mutację w egzonie 3 substytucję cytozyny na tyminę (Arg/Trp). U pacjenta 01-073 stwierdzono mutację w egzonie 1 substytucję cytozyny na tyminę (Pro/Leu).

#### 4.2.4. Wpływ mutacji na białko VHL.

Przy pomocy programu PolyPhen-2 badano wpływ mutacji na funkcje białka VHL. Do programu wpisuje się numer referencyjny białka (dla białka VHL: NP\_000542.1) i określoną mutację, następnie sprawdza się prawdopodobieństwo wpływu mutacji na funkcjonalność białka. Na **rycinie 23** przedstawiono przykład analizy pacjenta nr 01-028. Widać, że mutacja c. 239 G > A ma wpływ uszkodzający na budowę białka VHL z prawdopodobieństwem 0,927.

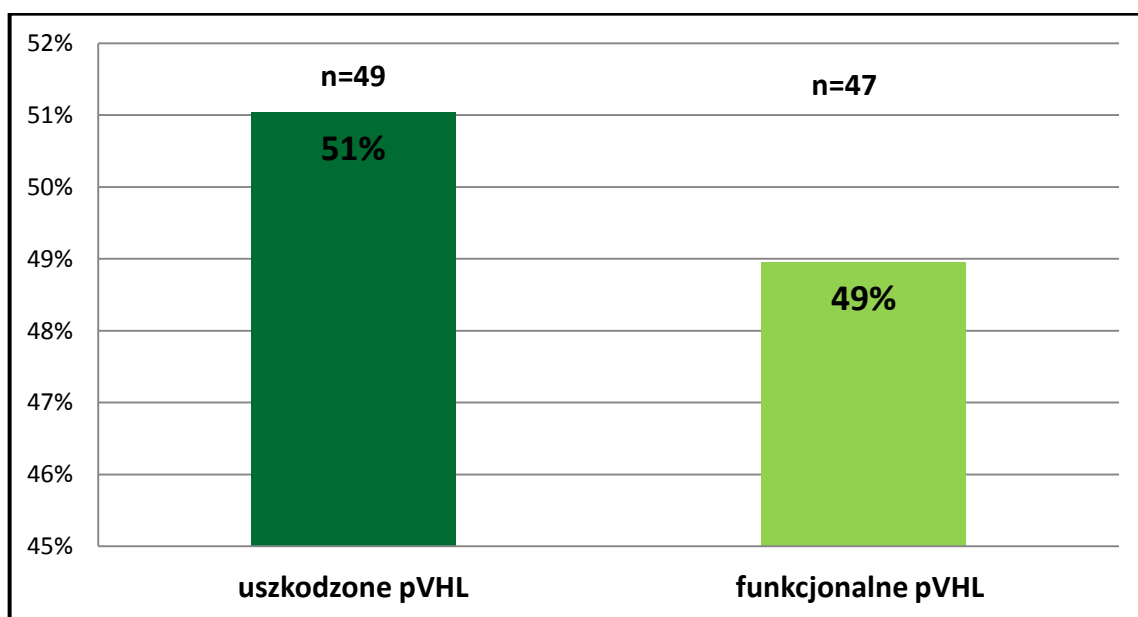


**Rycina 23.** Wynik analizy wpływu mutacji (nr 01-028) na pVHL.

Po analizie otrzymanych wyników sugeruje się, że u 49 pacjentów mutacje z dużym prawdopodobieństwem prowadziły do uszkodzenia pVHL, co może skutkować utratą jego funkcji supresorowej w komórce.

U 4 pacjentów mutacje miały „łagodny” wpływ na budowę białka i można przypuszczać, że funkcja pVHL była zachowana. U tych pacjentów występowały mutacje punktowe zmiany sensu. U dwóch pacjentów były to mutacje somatyczne, a dwóch miało mutacje germinalne.

Choć na podstawie wyników z programu PolyPhen-2 można przypuszczać o wpływie mutacji na budowę i funkcję białek, to dla potrzeb mojej pracy badanych pacjentów podzielono na dwie grupy. Pierwszą grupę liczącą 49 stanowili pacjenci z potencjalnie uszkodzonym białkiem VHL. Do grupy drugiej włączono 47 pacjentów z zachowaną funkcją białka VHL (43 pacjentów, u których nie wykryto mutacji w genie VHL oraz 4 pacjentów z mutacjami, które nie zaburzały funkcji pVHL). Procentowy i liczbowy rozkład pacjentów z funkcjonalnym białkiem VHL oraz pacjentów z uszkodzonym pVHL przedstawiono na **rycinie 24**.



**Rycina 24.** Podział pacjentów ze względu na przewidywaną funkcjonalność białka VHL (pVHL)

#### 4.2.5. Mutacje genu VHL stwierdzone w grupie badanej.

Wszystkie stwierdzone mutacje genu VHL zebrano w **tabeli 24**. Tabela zawiera następujące dane: kod pacjenta nadany podczas kwalifikacji pacjentów do badań, typ mutacji (somatyczna czy germinalna), lokalizację mutacji, sekwencję mutacji, zmianę na poziomie sekwencji aminokwasowej, którą dana mutacja wywołuje. W ostatniej kolumnie tabeli umieszczono informację czy dana mutacja była zamieszczona w dostępnych bazach danych mutacji genu VHL, jeżeli nie, to przyjęto, że jest to nowa mutacja.

Kod pacjenta	Typ mutacji	Egzon	Mutacja	Zmiana aa	status mutacji
01-001	somatyczna	1	c.248 del T	frameshift	nowa
01-003	somatyczna	1	c.287 A>C	Gln/Pro	obecna w bazie
01-004	somatyczna	2	c.448 del A	frameshift	obecna w bazie
01-005	somatyczna	1	c.257 C>T	Pro/Leu	obecna w bazie
01-007	somatyczna	2	408 insT 409	frameshift	obecna w bazie
01-009	somatyczna	2	c.395 del A	frameshift	obecna w bazie
01-011	somatyczna	1	c.240 T>A	Ser/Arg	obecna w bazie
01-015	somatyczna	1	c.290_297 del CCTACCCA	frameshift	nowa
01-018	somatyczna	2	c.369 del G	frameshift	obecna w bazie
01-019	somatyczna	1	c.327 del C	frameshift	obecna w bazie
01-021	somatyczna	3	c.473_480 del TGAAAGAG	frameshift	nowa
01-025	somatyczna	2	c.454 del A	frameshift	obecna w bazie
01-028	somatyczna	1	c.239 G>A	Ser/Asn	obecna w bazie
01-030	somatyczna	3	c.489_494 del CCAGGT	frameshift	nowa
01-034	somatyczna	1	c.183 del C	frameshift	obecna w bazie
01-035	somatyczna	1	c.178_179 CG>TA	Arg/Stop	nowa
01-037	somatyczna	1	c.268_272 AACTT>TTTTA; c.273 del C	frameshift	nowa
01-043	somatyczna	1	c.288 ins A; c.289_305 del CCCTACCCAACGCTGCC	frameshift	nowa
01-044	somatyczna	1	c.174_193 del GCCGCGGCCGTGCTGCGCT	frameshift	nowa
01-056	somatyczna	2	c.446 C>A	Ala/Asp	obecna w bazie
01-058	somatyczna	3	c.533_534 del TG	frameshift	obecna w bazie
01-059	somatyczna	1	c.236_237 ins GCGAGCCCTCCAGGTCATCT TCTGCAATCG	frameshift	nowa
01-060	somatyczna	2	c.350 G>A	Trp/Stop	obecna w bazie
01-064	germinalna	3	c.628 C>T	Arg/Trp	obecna w bazie
01-065	somatyczna	3	c.497 T>A	Val/Asp	obecna w bazie
01-066	somatyczna	1	c.192C>A; c.193 del T	Arg/Arg; frameshift	nowa
01-067	somatyczna	1	c.208_209 ins CG	frameshift	nowa

**Tabela 24.** Zebrane dane dotyczące mutacji w grupie badanej.

## Wyniki

Kod pacjenta	Typ mutacji	Egzon	Mutacja	Zmiana aa	status mutacji
01-068	somatyczna	3	c.472 C>G	Leu/Val	obecna w bazie
01-070	somatyczna	1	c.467_468 ins CGGTGAACTCGCGGAGCCCT CCCAGGTCATCTTCTGCAATC GCAGTCCGCGCGTCGTGCT	frameshift	nowa
01-073	germinalna	1	c.74 C>T	Pro/Leu	obecna w bazie
01-074	somatyczna	1	c.243 T>A	Asn/Lys	nowa
01-075	somatyczna	2	c.381 del G	frameshift	obecna w bazie
01-081	somatyczna	3	c.465 del G	frameshift	nowa
01-083	somatyczna	3	c.467_468 ins A	frameshift	obecna w bazie
01-085	somatyczna	1	c.287 A>C	Gln/Pro	obecna w bazie
01-087	somatyczna	1	c.194 C>G	Ser/Trp	obecna w bazie
01-091	somatyczna	3	c.483_484 ins A	frameshift	obecna w bazie
01-094	somatyczna	3	c.565_566 ins G	frameshift	nowa
01-099	somatyczna	2	c.375_376 ins A	frameshift	nowa
01-101	somatyczna	1	c.163_164 insT	frameshift	nowa
01-102	somatyczna	1	c.238 del A	frameshift	nowa
01-105	somatyczna	1	c.233 A>T	Asn/Ile	obecna w bazie
01-106	somatyczna	1	c.192 del C	frameshift	obecna w bazie
01-110	somatyczna	1	c.160 A>G; c.185 T>C; c.310 del G	Met/Val; Val/Ala; frameshift	nowa/obecna w bazie
01-111	somatyczna	3	c.500 G>T	Arg/Leu	nowa
01-117	somatyczna	2	c.463 del G	frameshift	nowa
01-118	somatyczna	1	c.278 del G	frameshift	obecna w bazie
01-120	somatyczna	1	c.218 del A	frameshift	obecna w bazie
01-124	somatyczna	2	c.415 del T	frameshift	nowa
01-126	somatyczna	3	c.565_566 del GA	frameshift	nowa
01-129	somatyczna	2	c.388_411 del GTTAACCAAACTGAATTATTG TG	frameshift	nowa
01-131	somatyczna	2	c.405 del A	frameshift	obecna w bazie
01-132	somatyczna	1	c.273 del C; c.274 G>A	frameshift	nowa

cd. **Tabela 24.** Zebrane dane dotyczące mutacji w grupie badanej.

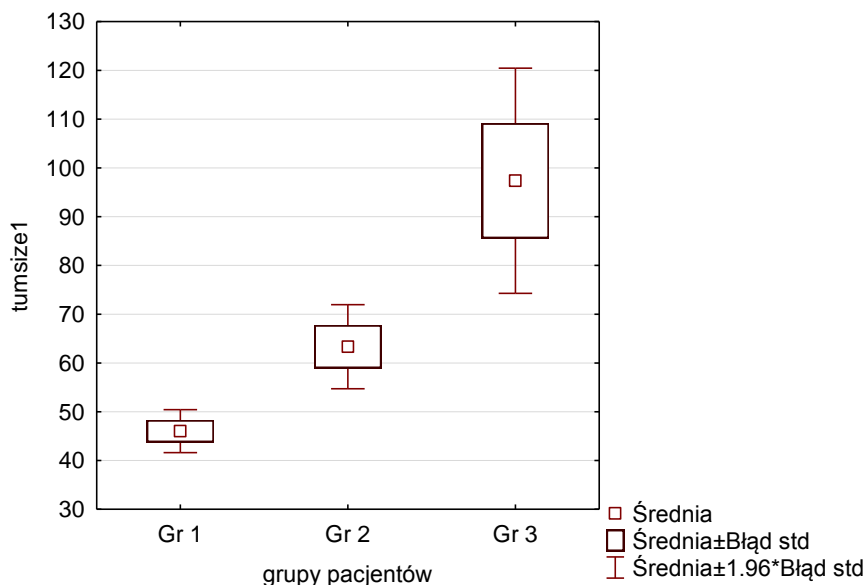
### **4.3. Analiza statystyczna otrzymanych wyników.**

Otrzymane wyniki badań, które zostały przedstawione powyżej zostały poddane analizie statystycznej. Analizowane dane pochodziły z trzech skal pomiarowych: interwałowej, porządkowej i nominalnej. Porównywano badane grupy względem danej cechy tak, aby wykazać czy istnieją istotne zależności lub różnice. Dla istotnych predyktorów wyznaczano dodatkowo iloraz szans wraz z 95% przedziałem ufności.

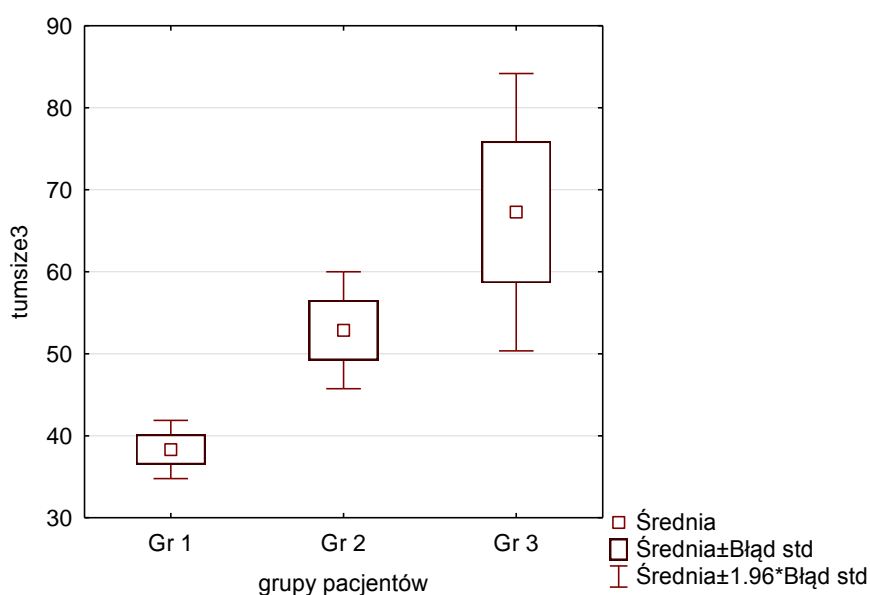
#### **4.3.1. Ocena wielkości guza nerki w odniesieniu do parametrów klinicznych pacjentów.**

Oceniając wielkość guza względem parametrów klinicznych brano pod uwagę najmniejszy i największy wymiar obliczony na podstawie TK jamy brzusznej.

Wykazano istotną zależność pomiędzy wielkością guza a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Analizując stopień zaawansowania klinicznego wykorzystano podział pacjentów na trzy grupy przedstawiony w rozdziale IV.1.6 na str. 61. W grupie 1 (pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki) średnia maksymalna wielkość guza wynosiła 46,03 +/- 17,11mm, średnia minimalna wielkość guza wynosiła 38,33 +/- 13,78mm, w grupie 2 (pacjentów z rakiem zaawansowanym miejscowo) odpowiednio 63,35 +/- 24,47 dla wielkości maksymalnej i 52,87 +/- 20,26mm dla wielkości minimalnej, a w grupie 3 (pacjentów z przerzutami do płuc) 97,36 +/- 39,07mm dla wielkości maksymalnej i 67,27 +/- 28,61mm dla wielkości minimalnej. Porównując grupy pacjentów stwierdzono istotną statystycznie różnicę wielkości maksymalnej guza ( $p < 0,0001$ ) oraz wielkości minimalnej guza ( $p = 0,0001$ ), dane przedstawiono na **rycynie 25** oraz **rycynie 26**.



**Rycina 25.** Maksymalna wielkość guza w grupach pacjentów. Test Kruskala - Wallisa: różnica istotna statystycznie ( $p < 0,0001$ ). Gr1 pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki  $n = 58$ , Gr2 pacjenci z rakiem naciekającym na tkankę tłuszczową okołonerkową  $n = 31$ , Gr3 pacjenci z przerzutami do płuc  $n = 11$ ; tumsze1 – wielkość maksymalna guza [mm].

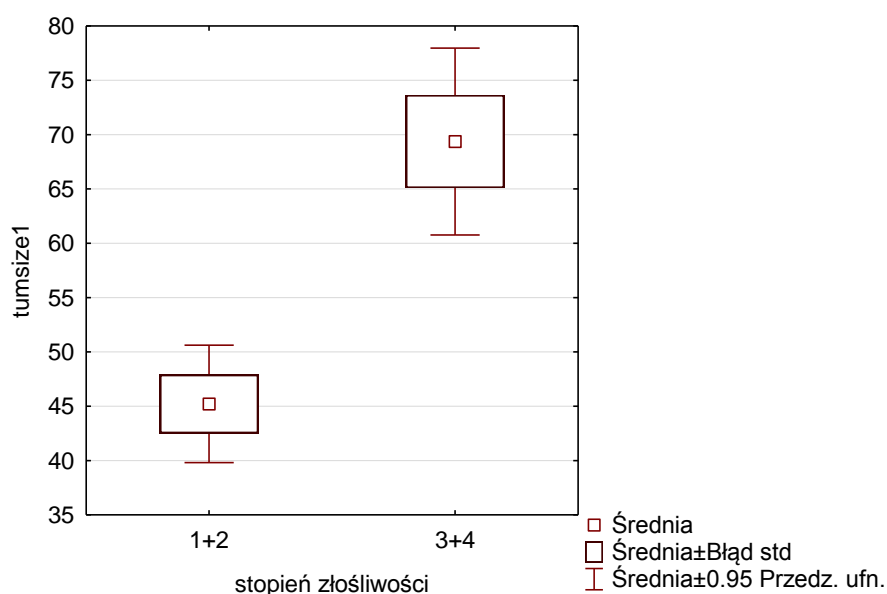


**Rycina 26.** Minimalna wielkość guza w grupach pacjentów. Test Kruskala - Wallisa: różnica istotna statystycznie ( $p = 0,0001$ ). Gr1 pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki  $n = 58$ , Gr2 pacjenci z rakiem naciekającym na tkankę tłuszczową okołonerkową  $n = 31$ , Gr3 pacjenci z przerzutami do płuc  $n = 11$ ; tumsze3 – wielkość minimalna guza [mm].

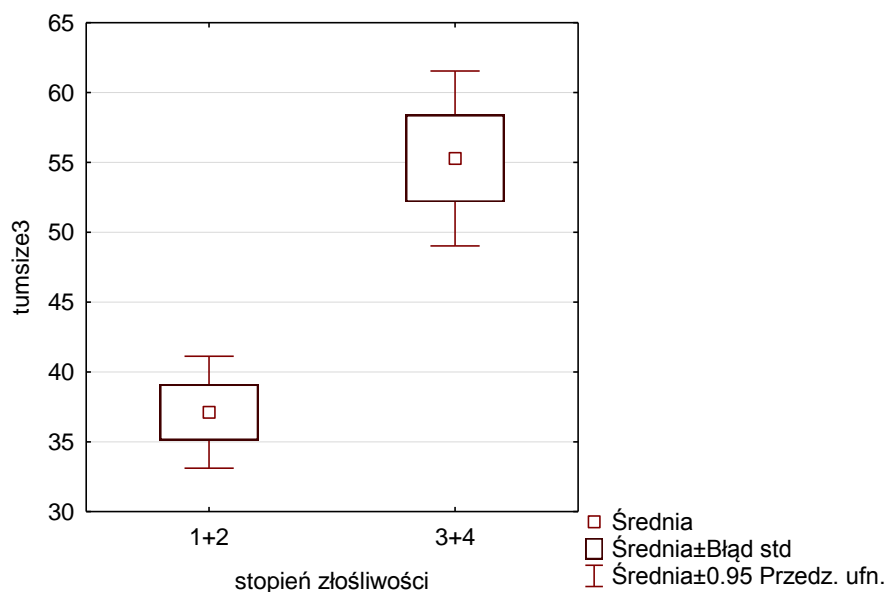
Poddano analizie wielkość guza względem stopnia złośliwości nowotworu. Dla celów statystycznych połączono pacjentów z ccRCC ze stopniem G1 i G2 (raki o niskim stopniu złośliwości  $n = 51$ ) oraz pacjentów z G3 i G4 (raki o wysokim stopniu złośliwości  $n = 49$ ). Porównując pacjentów G1 i G2 z pacjentami G3 i G4 stwierdzono istotną statystycznie różnicę wielkości maksymalnej guza ( $p < 0,0001$ ) między grupami.



W grupie pacjentów z rakiem o niskim stopniu złośliwości średnia wielkość guza wynosiła 45,21 +/- 19,23mm, a w grupie pacjentów z rakiem o wysokim stopniu złośliwości 69,37 +/- 29,93mm. Podobnie wykazano istotną różnicę wielkości minimalnej guza w tych grupach pacjentów ( $p < 0,0001$ ). W grupie pacjentów G1 i G2 średnia wartość wielkości guza to 37,12 +/- 14,24mm vs grupa pacjentów G3 i G4 55,28 +/- 21,79mm. Dane dla wielkości maksymalnej guza zobrazowano na **rycynie 27**, a dla wielkości minimalnej guza na **rycynie 28**.

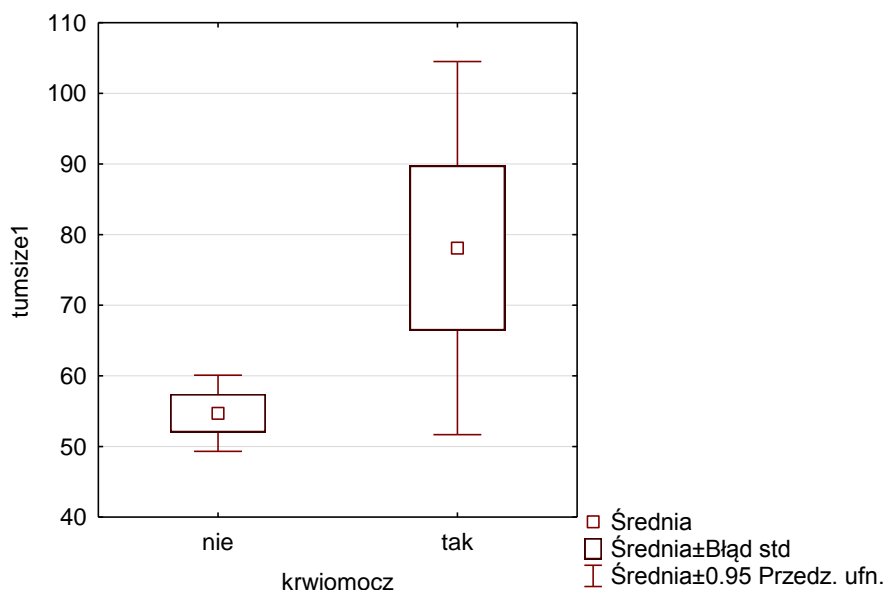


**Rycina 27.** Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów z RCC o niskim stopniu złośliwości 1 + 2 (n = 51) oraz w grupie z RCC o wysokim stopniu złośliwości 3 + 4 (n = 49). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie ( $p < 0,0001$ ). Tumsze1 - największy wymiar guza [mm].

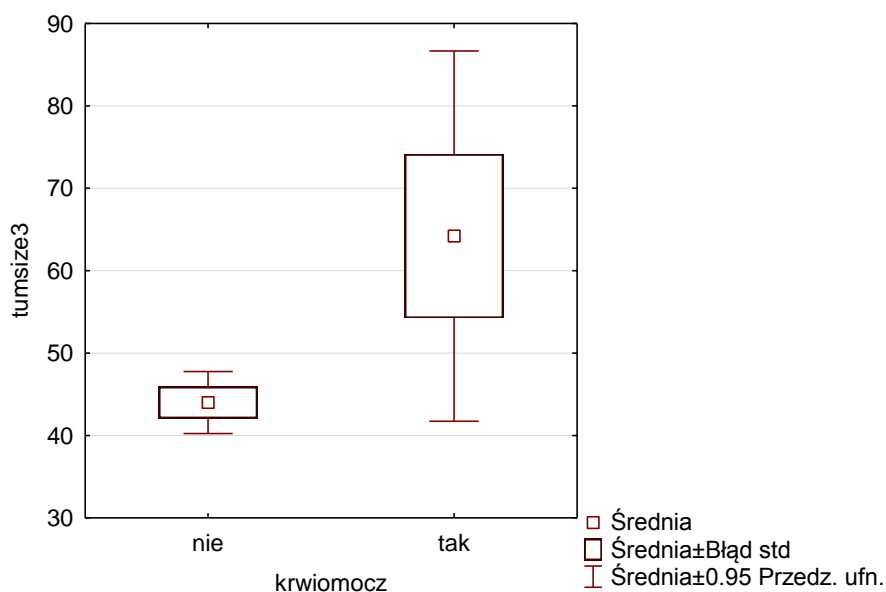


**Rycina 28.** Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów z RCC o niskim stopniu złośliwości 1 + 2 (n = 51) oraz w grupie z RCC o wysokim stopniu złośliwości 3 + 4 (n = 49). Test U Manna – Whitney: różnica istotna statystycznie ( $p < 0,0001$ ). Tumsze3 - najmniejszy wymiar guza [mm].

Analizując grupy pacjentów względem występowania krwimoczu stwierdzono istotną różnicę wielkości guza. W grupie pacjentów z krwimoczem wielkość maksymalna guza była istotnie większa niż w grupie pacjentów bez krwimoczu ( $p = 0,0339$ ). Wielkość guza w grupie pacjentów z krwimoczem (n = 10) wynosiła średnio 78,10 +/- 36,92mm, natomiast w grupie bez krwimoczu (n = 90) średnio 54,71 +/- 25,72mm. Podobnie minimalna wielkość guza była istotnie większa w grupie pacjentów z krwimoczem, średnio 64,20 +/- 31,41mm, w porównaniu do grupy pacjentów bez krwimoczu, średnio 44,00 +/- 17,94mm ( $p = 0,0257$ ). Różnice w wielkości maksymalnej guza przedstawiono na **rycinie 29**, a wielkości minimalnej na **rycinie 30**.



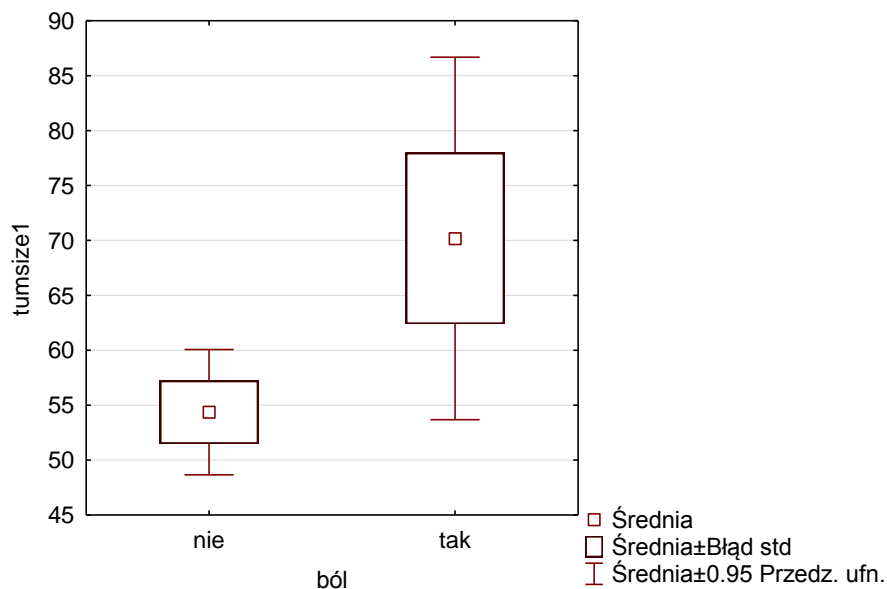
**Rycina 29.** Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów bez krwiomoczu (n = 90) oraz w grupie pacjentów z krwiomoczem (n = 10). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0339). Tumsze1 – wielkość maksymalna guza [mm].



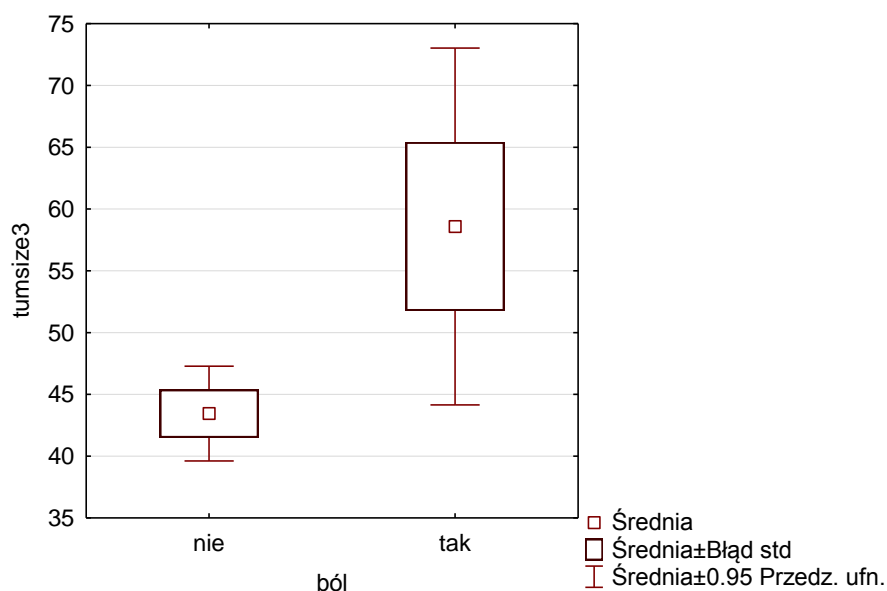
**Rycina 30.** Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów bez krwiomoczu (n = 90) oraz w grupie pacjentów z krwiomoczem (n = 10). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0257). Tumsze3 - wielkość minimalna guza [mm].

Wykazano istotną różnicę wymiarów guza pomiędzy grupą pacjentów zgłaszających ból w okolicy lędźwiowej (n = 17) w porównaniu z grupą pacjentów bez dolegliwości bólowych w tej okolicy (n = 83). Dla wielkości maksymalnej guza w grupie z bólem średnia wynosiła 70,18 +/- 32,10mm, a w grupie bez bólu średnia 54,36 +/- 26,14mm (p = 0,0495) patrz **rycina 31**. Podobnie minimalna wielkość guza

była większa w grupie z bólem średnia wynosiła 58,59 +/- 28,09mm, niż w grupie bez bólu średnia 43,44 +/- 17,57mm (p = 0,0338) patrz **rycina 32**.

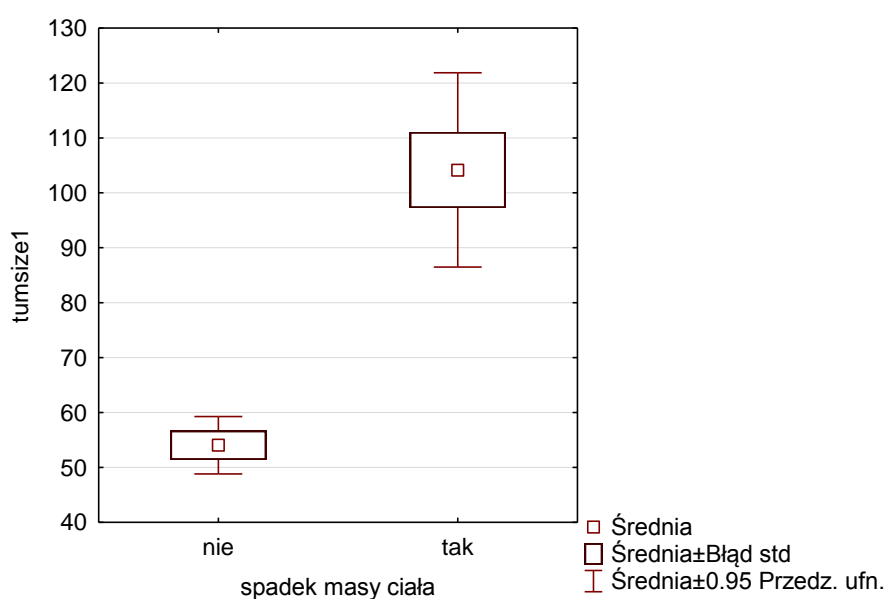


**Rycina 31.** Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów bez bólu w okolicy lędźwiowej (n = 83) oraz w grupie pacjentów z bólem w okolicy lędźwiowej (n = 17). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0495). Tumsze1 – wielkość maksymalna guza [mm].

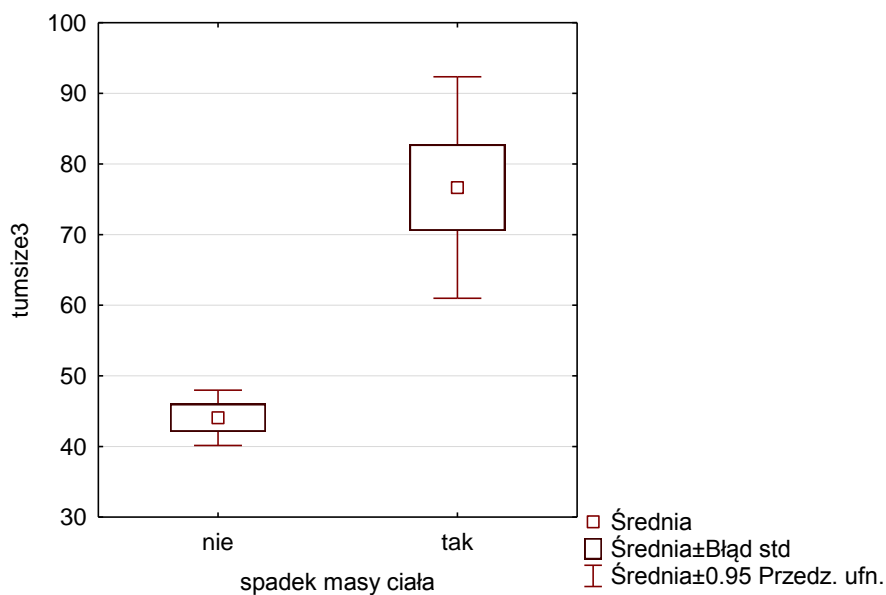


**Rycina 32.** Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów bez bólu w okolicy lędźwiowej (n = 83) oraz w grupie pacjentów z bólem w okolicy lędźwiowej (n = 17). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0338). Tumsze3 - wielkość minimalna guza [mm].

Oceniając wymiary guza w grupie pacjentów ze spadkiem masy ciała ( $n = 6$ ) w porównaniu z grupą pacjentów bez spadku masy ciała ( $n = 94$ ) stwierdzono istotną różnicę wielkości maksymalnej ( $p = 0,0003$ ). Średnia wielkości maksymalnej guza w grupie ze spadkiem masy ciała wynosi  $104,17 \pm 16,86$ mm, a w grupie bez spadku masy ciała średnia  $54,04 \pm 25,50$ . Wykazano również istotną różnicę wielkości minimalnej w obydwu grupach ( $p = 0,0006$ ). W grupie ze spadkiem masy ciała średnio  $76,67 \pm 14,93$  vs  $44,06 \pm 19,14$  w drugiej grupie. Różnice wymiarów guza w obydwu grupach przedstawiono na **rycinach 33** oraz **34**.

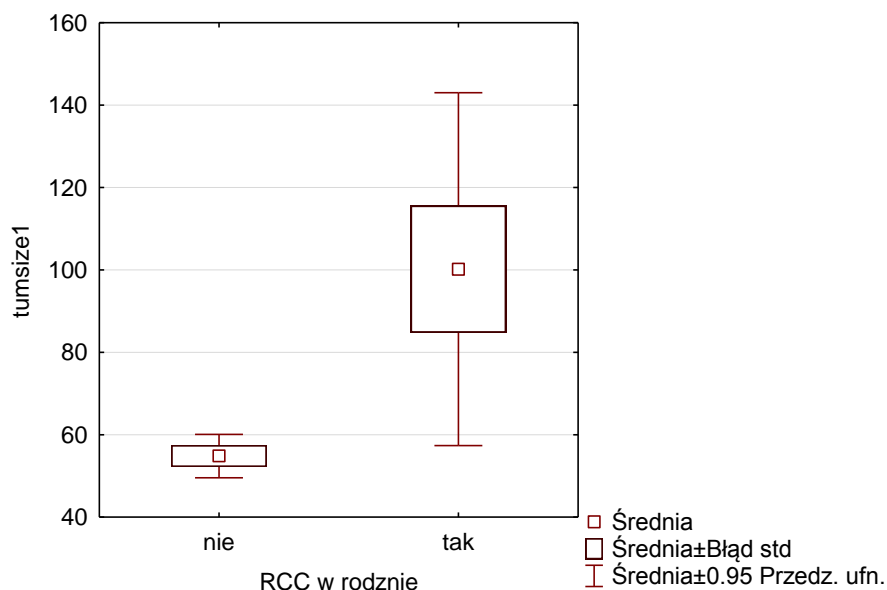


**Rycina 33.** Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów bez spadku masy ciała ( $n = 94$ ) oraz w grupie pacjentów ze spadkiem masy ciała ( $n = 6$ ). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie ( $p = 0,0003$ ). Tumsze1 – wielkość maksymalna guza [mm].

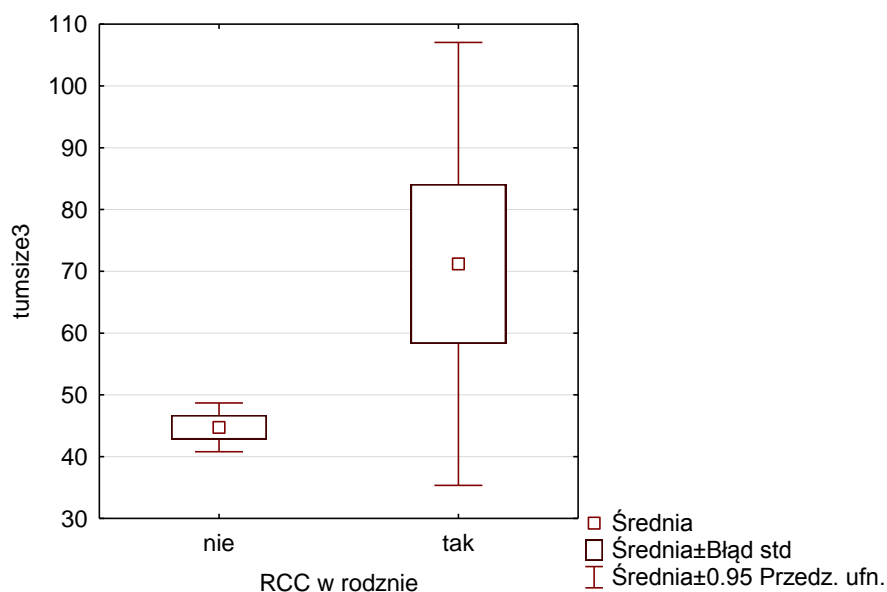


**Rycina 34.** Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów bez spadku masy ciała ( $n = 94$ ) oraz w grupie pacjentów ze spadkiem masy ciała ( $n = 6$ ). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie ( $p = 0,0006$ ). Tumsiz3 - wielkość minimalna guza [mm].

Analizując grupy pacjentów pod względem dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku raka nerki wykazano istotną różnicę wielkości guza. W grupie pacjentów, których członek rodziny chorował na RCC ( $n = 5$ ) średnio największy wymiar guza wynosił  $100,20 \pm 34,50$ mm i był istotnie większy w porównaniu z drugą grupą pacjentów ( $n = 94$ ), gdzie średnio  $54,83 \pm 25,71$ mm; przy istotności statystycznej  $p = 0,0051$ . Dane dotyczące analizy największego wymiaru guza pokazano na **rycinie 35**. Podobnie najmniejszy wymiar guza różnił się istotnie w obu grupach ( $p = 0,0308$ ). W grupie pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (średnio  $71,20 \pm 28,86$ mm), a w drugiej grupie (średnio  $44,74 \pm 19,26$ mm), **rycina 36**.



**Rycina 35.** Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 94) oraz w grupie pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 5). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0051). Tumsze1 – wielkość maksymalna guza [mm].



**Rycina 36.** Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 94) oraz w grupie pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 5). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0308). Tumsze3 - wielkość minimalna guza [mm].

Nie stwierdzono istotnych różnic wielkości guza w grupach pacjentów poddanych analizie pod względem następujących cech klinicznych: nadciśnienie tętnicze, przyjmowanie leków obniżających ciśnienie tętnicze krwi, cukrzyca, palenie tytoniu, choroba niedokrwienna serca, choroby układu oddechowego i krążenia, dodatni

wywiad rodzinny w kierunku nowotworu złośliwego, choroby nerek w rodzinie, stężenie hemoglobiny oraz kreatyniny w surowicy krwi.

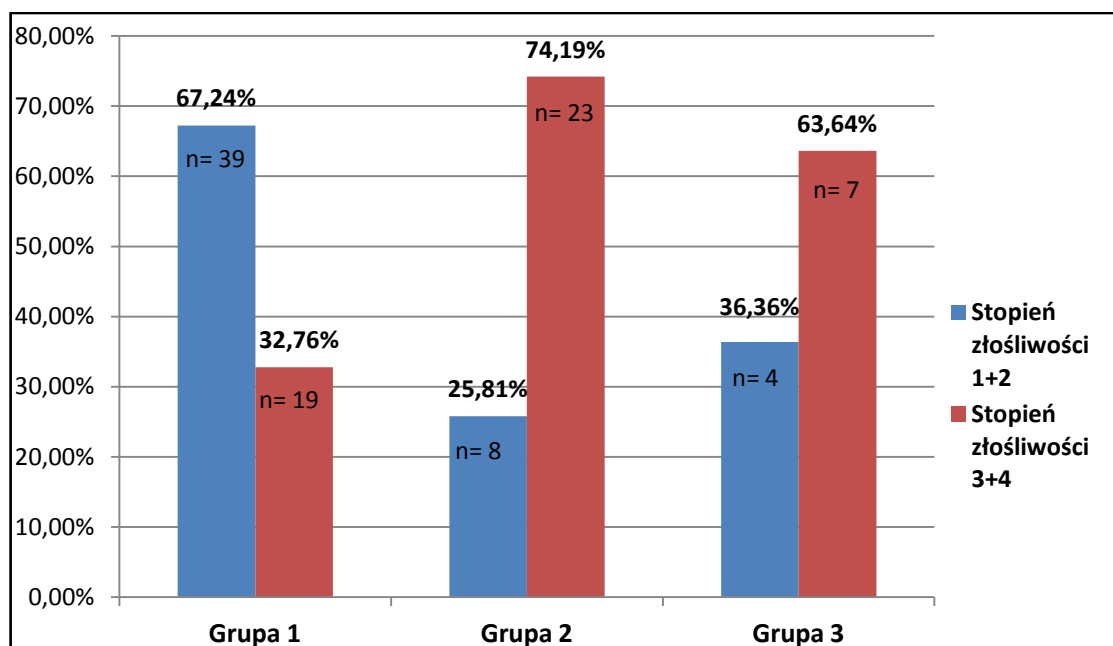
#### **4.3.2. Analiza stopnia zaawansowania klinicznego w zależności do cech klinicznych pacjentów.**

Oceniając stopień zaawansowania klinicznego uwzględniono podział pacjentów na trzy grupy opisane powyżej i przedstawione na **rycinie 15**. Podział ten był wykorzystany do analizy statystycznej zależności pomiędzy grupami pacjentów (Gr1, Gr2 lub Gr3) a następującymi cechami: wiek, płeć, stopień złośliwości nowotworu, obecność objawów, występowaniem krwimoczem, bólu w okolicy lędźwiowej, spadkiem masy ciała, choroby nerek oraz RCC w rodzinie, dodatni wywiad rodzinny w kierunku nowotworów złośliwych, występowanie czynników ryzyka (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie papierosów), BMI, choroby niedokrwiennej serca, stężenie hemoglobiny, poziom hematokrytu, leukocytów oraz stężenie kreatyniny we krwi.

Wykazano istotną zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego a stopniem złośliwości ( $p = 0,0006$ ). Z **ryciny 37** można wyciągnąć wniosek, że w grupie 1 pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki ( $n = 58$ ) częściej występował rak jasnokomórkowy o niższym stopniu złośliwości G1 lub G2 wg Fuhrmana niż rak o wyższym stopniu złośliwości G3 lub G4. Odwrotnie było w grupie 2 pacjentów z rakiem naciekającym na tłuszcz okołonerkowy ( $n = 31$ ) oraz w grupie 3 pacjentów z przerzutami do płuc ( $n = 11$ ). W tych grupach częściej występował rak bardziej złośliwy (G3 lub G4) niż rak o mniejszym stopniu złośliwości (G1 lub G2).

Dokonano również analizy szczegółowej w podgrupach. Pomiedzy grupą 1 a grupą 2 stwierdzono istotną statystycznie różnicę w stosunku do stopnia złośliwości ( $p = 0,0002$ ). W grupie 1 istotnie częściej niż w grupie 2 RCC były o niższym stopniu złośliwości (G1 lub G2). Pomiedzy grupą 1 a grupą 3 oraz pomiedzy grupą 2 a grupą 3 różnice w odniesieniu do stopnia złośliwości nie były istotne statystycznie.



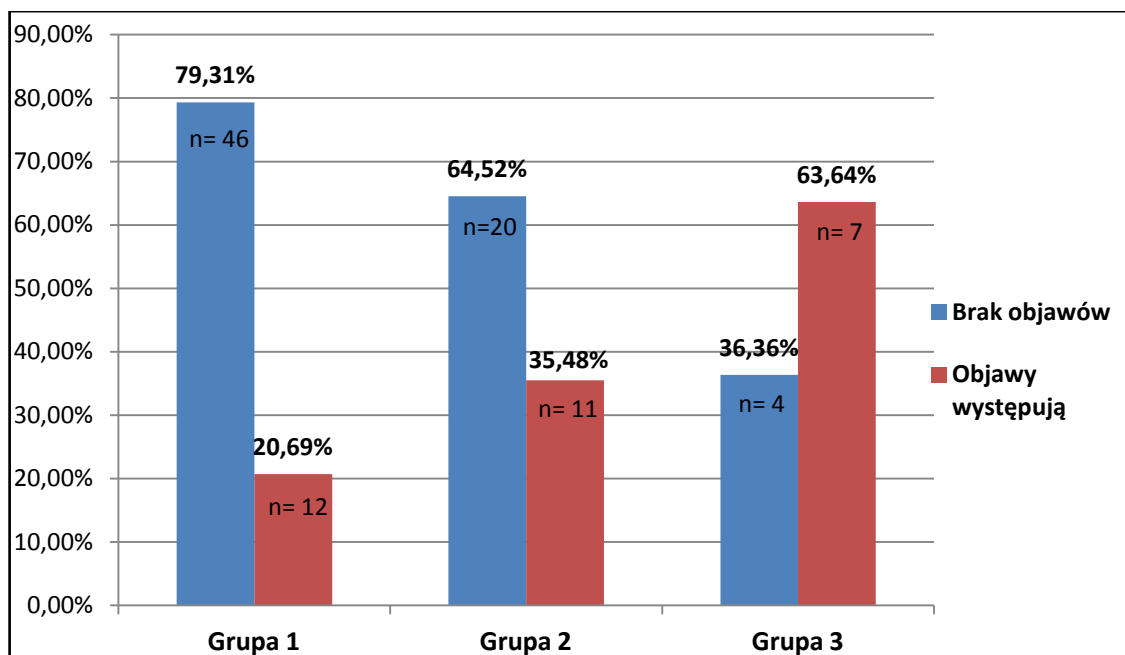


**Rycina 37.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego a stopniem złośliwości nowotworu ( $p = 0,0006$ ). Grupa 1 to pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki ( $n = 58$ ), Grupa 2 to pacjenci z infiltracją torebki tłuszczowej nerki ( $n = 31$ ), Grupa 3 to pacjenci z przerzutami do płuc ( $n = 11$ ). Stopień złośliwości nowotworu 1 + 2 to pacjenci z rakiem dobrze zróżnicowanym G1 lub G2, stopień złośliwości 3 + 4 to pacjenci z rakiem słabo zróżnicowanym G3 lub G4.

Poniżej na **rycinie 38** przedstawiono istotne statystycznie zależności stwierdzone pomiędzy grupami pacjentów a występowaniem lub brakiem objawów przed rozpoznaniem raka nerki. U pacjentów w zaawansowanej chorobie nowotworowej, z przerzutami do płuc (grupa 3) istotnie częściej występowały objawy zanim doszło do rozpoznania raka nerki w porównaniu do pacjentów z chorobą nowotworową ograniczoną do nerki lub zaawansowaną miejscowo (grupa 1 lub grupa 2)  $p = 0,0125$ . W grupie 1 i grupie 2 większość guzów nerek była wykrywana przypadkowo, natomiast w grupie 3 większość stanowili pacjenci z objawowym rakiem nerki.

Dokonując szczegółowej analizy w odniesieniu do poszczególnych grup wykazano istotną statystycznie różnicę występowania objawów przed rozpoznaniem RCC pomiędzy grupą 1 a grupą 3 ( $p = 0,0035$ ). Obliczono iloraz szans z ang. odds ratio (OR), który określa wielkość zależności. Do właściwej oceny zależności konieczne jest uwzględnienie przedziału ufności z ang. confidence interval (CI). Dla badanych cech  $OR = 6,708$ ; 95% CI (1.682 - 26.755). Na tej podstawie stwierdzono, że objawy w grupie 3 występowały prawie 7 razy częściej niż w grupie 1. Różnice

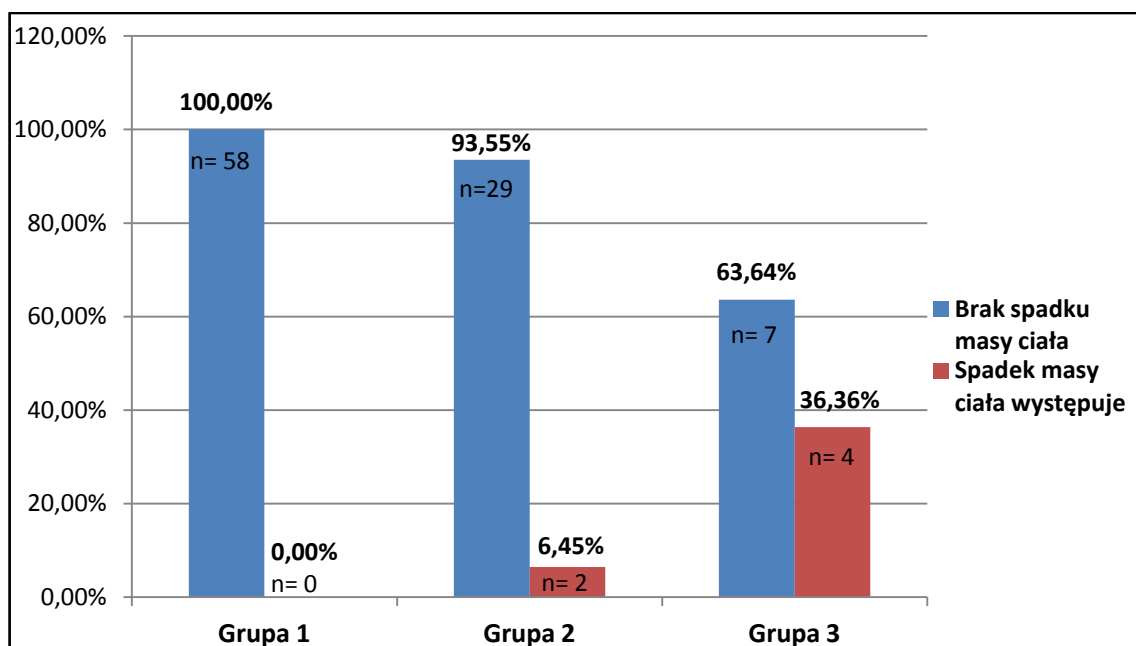
w występowaniu lub braku objawów pomiędzy grupą 2 a grupą 3 nie były istotne statystycznie.



**Rycina 38.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu a występowaniem objawów ( $p = 0,0125$ ). Grupa 1 to pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki ( $n = 58$ ), Grupa 2 to pacjenci z infiltracją torebki tłuszczowej nerki ( $n = 31$ ), Grupa 3 to pacjenci z przerzutami do płuc ( $n = 11$ ).

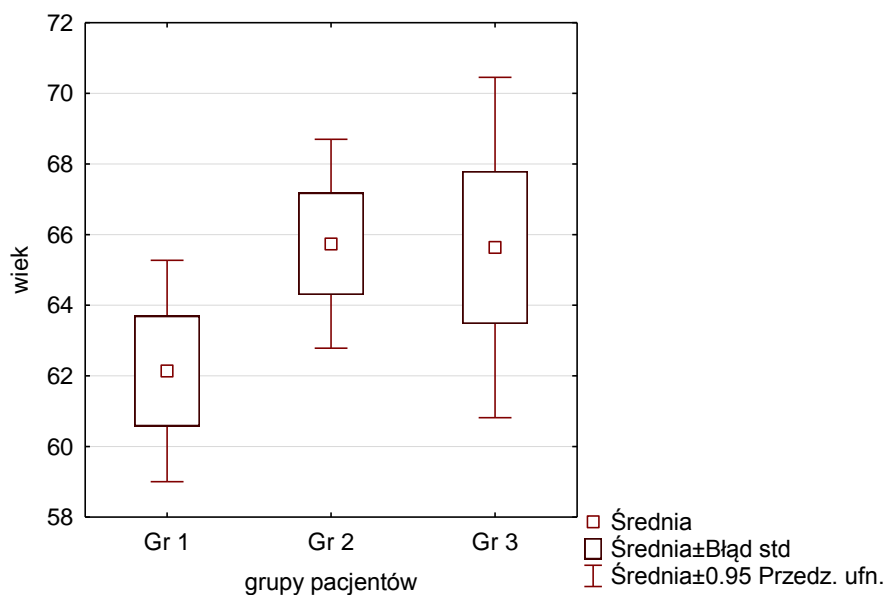
Na kolejnej **rycynie 39** przedstawiono istotne statystycznie zależności pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu (z uwzględnieniem podziału pacjentów na 3 grupy) a spadkiem masy ciała ( $p = 0,0002$ ). Spadek masy ciała występował istotnie częściej w grupie pacjentów z przerzutami do płuc. W grupie pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki spadek masy ciała nie występował.

Po wykonaniu szczegółowej analizy w podgrupach stwierdzono istotne statystycznie różnice w występowaniu spadku masy ciała pomiędzy grupą 1 a grupą 3 ( $p = 0,0004$ ) oraz pomiędzy grupą 2 a grupą 3 ( $p = 0,0321$ ). Różnice w występowaniu spadku masy ciała pomiędzy grupą 1 a grupą 2 były nieistotne statystycznie. Na podstawie obliczonego ilorazu szans, można wnioskować, że spadek masy ciała występował prawie 25 razy częściej w grupie pacjentów z przerzutami do płuc w porównaniu do grupy pacjentów bez przerzutów (grupa 1 + grupa 2). OR = 24,857; 95% CI (3.853 – 160.37).



**Rycina 39.** Test Fishera – Freemana - Haltona: istotna zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego a występowaniem spadku masy ciała ( $p = 0,0002$ ). Grupa 1 to pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki ( $n = 58$ ), Grupa 2 to pacjenci z infiltracją torebki tłuszczowej nerki ( $n = 31$ ), Grupa 3 to pacjenci z przerzutami do płuc ( $n = 11$ ).

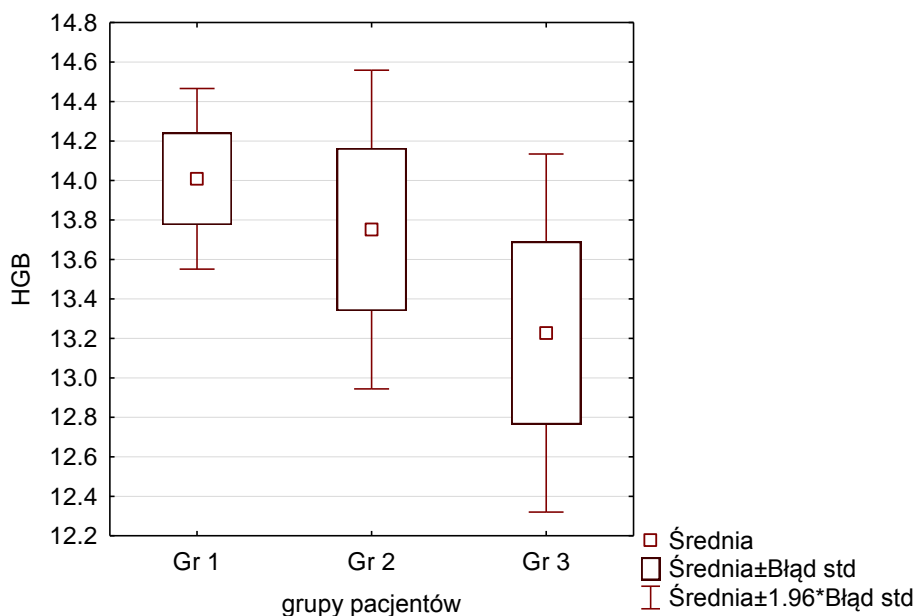
Pozostałe badane zależności pomiędzy cechami (wymienionymi powyżej, str.27) były nieistotne statystycznie. Porównując trzy grupy pacjentów (Gr1, Gr2 i Gr3) nie stwierdzono istotnej różnicy wieku w tych grupach. Średnia wieku dla grupy 1 wynosiła  $62,14 \pm 11,92$  lat, dla grupy 2  $65,74 \pm 8,06$  lat, a dla grupy 3  $65,63 \pm 7,17$  lat ( $p = \text{NS}$ ). Na **rycinie 40** zobrazowano dane dotyczące tej analizy, można zauważyć, że w grupie 1 są młodszy pacjenci (95% pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki jest w wieku poniżej 66 lat).



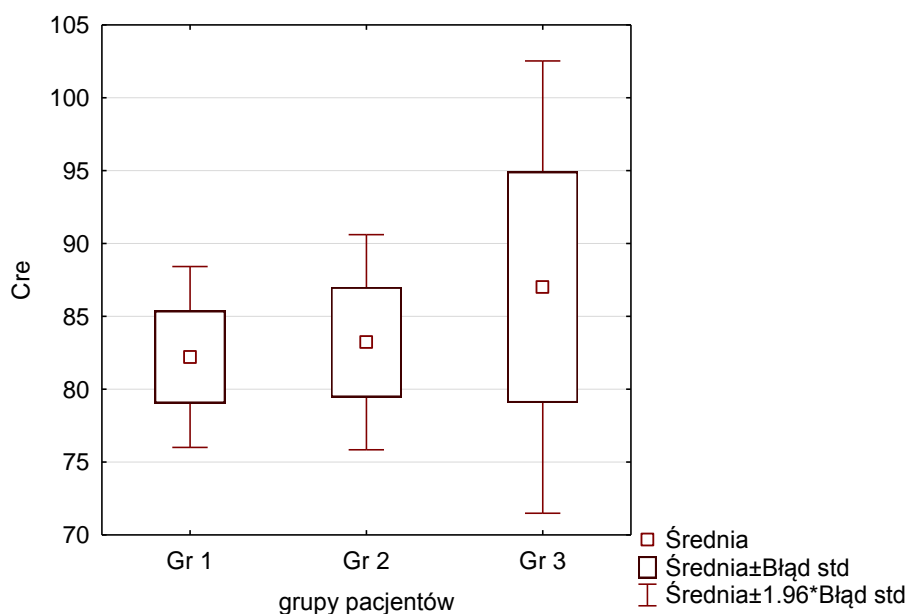
**Rycina 40.** Wiek w poszczególnych grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa ( $p = NS$ ). Gr1 pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki  $n = 58$ , Gr2 pacjenci z rakiem naciekającym na tkankę tłuszczową okołonerkową  $n = 31$ , Gr3 pacjenci z przerzutami do płuc  $n = 11$ ; wiek [lata].

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu hemoglobiny we krwi w poszczególnych grupach. Z **ryciny 41**, gdzie przedstawiono dane analizy można wywnioskować, że średnio najniższe wartości hemoglobiny były w grupie pacjentów z przerzutami do płuc ( $13,23 \pm 1,53$  g/dl). Średnie wartości hemoglobiny w grupie 1 wynosiły  $14,01 \pm 1,78$  g/dl; a w grupie 2 odpowiednio  $13,75 \pm 2,29$  g/dl.

Podobnie nie wykazano istotnej różnicy w stężeniu kreatyniny porównując trzy grupy pacjentów. Średnie wartości w Gr1 wynosiły  $82,22 \pm 24,11$   $\mu\text{mol/L}$ , w Gr2 odpowiednio  $83,23 \pm 20,96$   $\mu\text{mol/L}$ , a w Gr3  $87,01 \pm 26,25$   $\mu\text{mol/L}$  (**rycina 42**).



**Rycina 41.** Stężenie hemoglobiny w surowicy krwi w poszczególnych grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa ( $p = NS$ ). Gr1 pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki  $n = 58$ , Gr2 pacjenci z rakiem naciekającym na tkankę tłuszczową okołonerkową  $n = 31$ , Gr3 pacjenci z przerzutami do płuc  $n = 11$ ; HGB – stężenie hemoglobiny [g/dl].

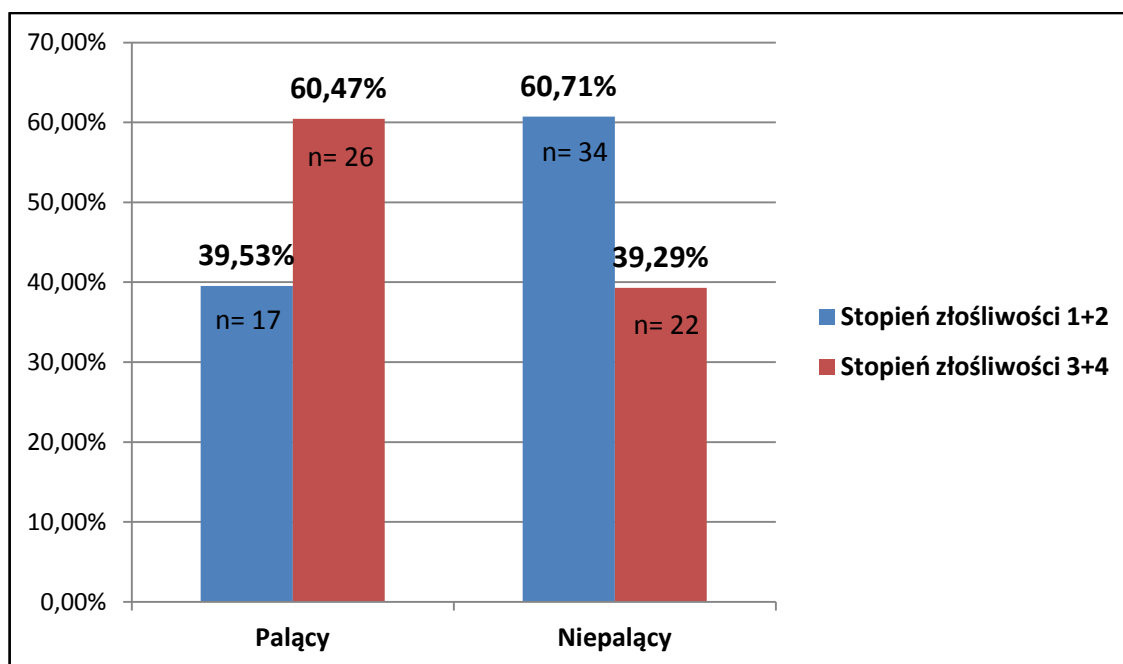


**Rycina 42.** Stężenie kreatyniny w surowicy krwi w poszczególnych grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa ( $p = NS$ ). Gr1 pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki  $n = 58$ , Gr2 pacjenci z rakiem naciekającym na tkankę tłuszczową okołonerkową  $n = 31$ , Gr3 pacjenci z przerzutami do płuc  $n = 11$ ; Cre – stężenie kreatyniny [ $\mu\text{mol/L}$ ].

### 4.3.3. Ocena stopnia złośliwości nowotworu w odniesieniu do cech klinicznych pacjentów.

Szczegółowej analizie poddano również stopień złośliwości nowotworu według skali Fuhrmana w zależności od parametrów klinicznych. Do analizy statystycznej podzielono pacjentów na dwie grupy (grupa pierwsza to pacjenci ze stopniem złośliwości G1 lub G2, grupa druga to pacjenci ze stopniem złośliwości G3 lub G4). W analizie oceniano następujące parametry kliniczne: wiek, płeć, BMI, występowanie czynników ryzyka (nadciśnienie tętnicze krwi, stosowanie leków obniżających ciśnienie, cukrzyca, palenie papierosów), występowanie objawów przed rozpoznaniem guza nerki (krwiomocz, ból w okolicy lędźwiowej, spadek masy ciała), obecność przerzutów do płuc, występowanie choroby nowotworowej przed rozpoznaniem raka nerki, chorób towarzyszących rakowi nerki, tj. choroba niedokrwienna serca oraz chorób układu krążenia i układu oddechowego, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób nerek, RCC oraz innych nowotworów złośliwych, wyników laboratoryjnych (stężenia hemoglobiny i kreatyniny).

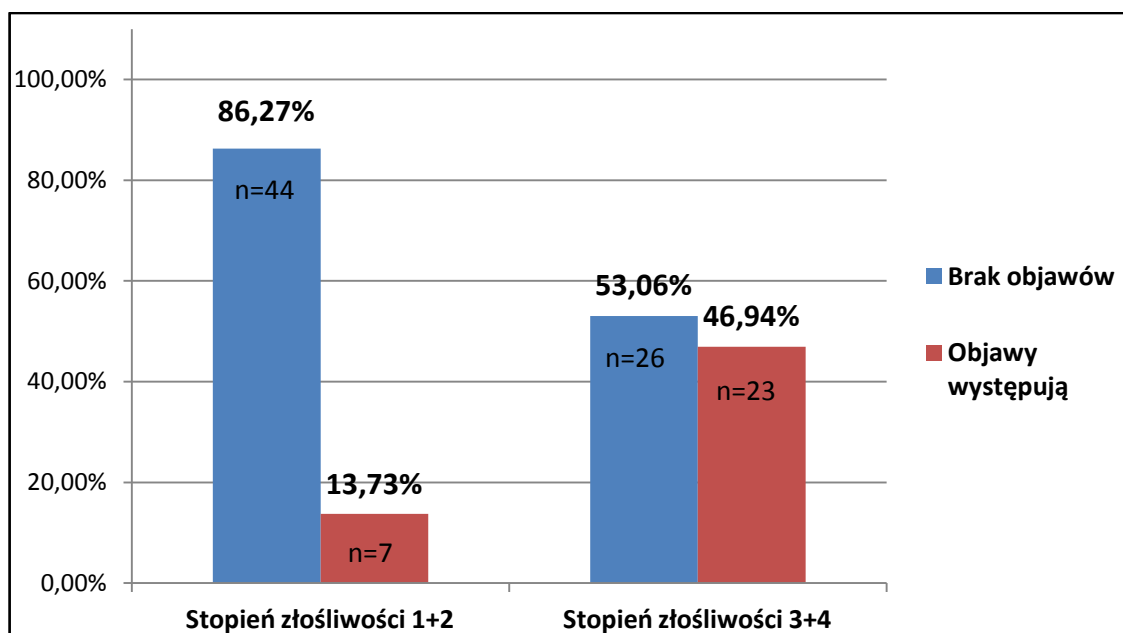
Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy paleniem papierosów a stopniem złośliwości nowotworu ( $p = 0,0366$ ). W wyniku analizy stwierdzono, że palenie tytoniu zwiększa ryzyko raka jasnokomórkowego nerki o większym stopniu złośliwości. Dla badanych cech  $OR = 2.364$ ; 95% CI (1.048 - 5.331). Na tej podstawie stwierdzono, że wysoki stopień złośliwości nowotworu (G3 lub G4) występował ponad dwukrotnie częściej u pacjentów palących niż niepalących. Otrzymane wyniki przedstawiono na **rycinie 43**.



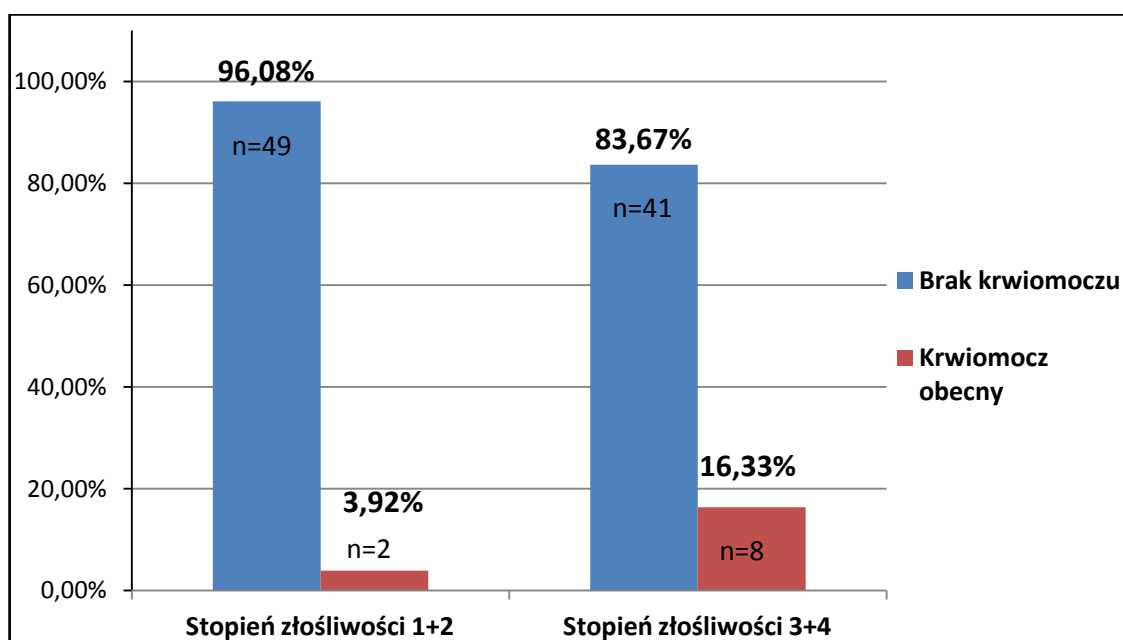
**Rycina 43.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem złośliwości nowotworu a paleniem tytoniu ( $p = 0,0366$ ). Przedstawiono procentowy rozkład pacjentów w poszczególnych grupach: palący ( $n = 43$ ), niepalący ( $n = 56$ ).

Stwierdzono istotną zależność pomiędzy stopniem złośliwości raka jasnokomórkowego nerki a występowaniem objawów przed rozpoznaniem guza nerki. Istotnie częściej objawy zgłaszali pacjenci z rakiem bardziej złośliwym (G3 i G4) w porównaniu z pacjentami z rakiem o niższym stopniu złośliwości (G1 i G2);  $p = 0,0003$ . OR = 5.5604; 95% CI (2,097 - 14,743). Dane przedstawiono na **rycinie 44**.

Poniżej, na **rycinie 45** przedstawiono dane dotyczące występowania zależności pomiędzy stopniem złośliwości a obecnością lub brakiem krwimoczku ( $p = 0,0490$ ). Na podstawie obliczonego ilorazu szans (OR = 4,780) można przypuszczać, że w grupie pacjentów z rakiem nisko zróżnicowanym (G3 i G4) krwimocz występuje prawie 5 - krotnie częściej niż w grupie pacjentów z rakiem dobrze zróżnicowanym (G1 i G2). Jednakże przedział ufności obejmuje wartość neutralną (95% CI: 0.9609 - 23.784) i nie jest istotny statystycznie.



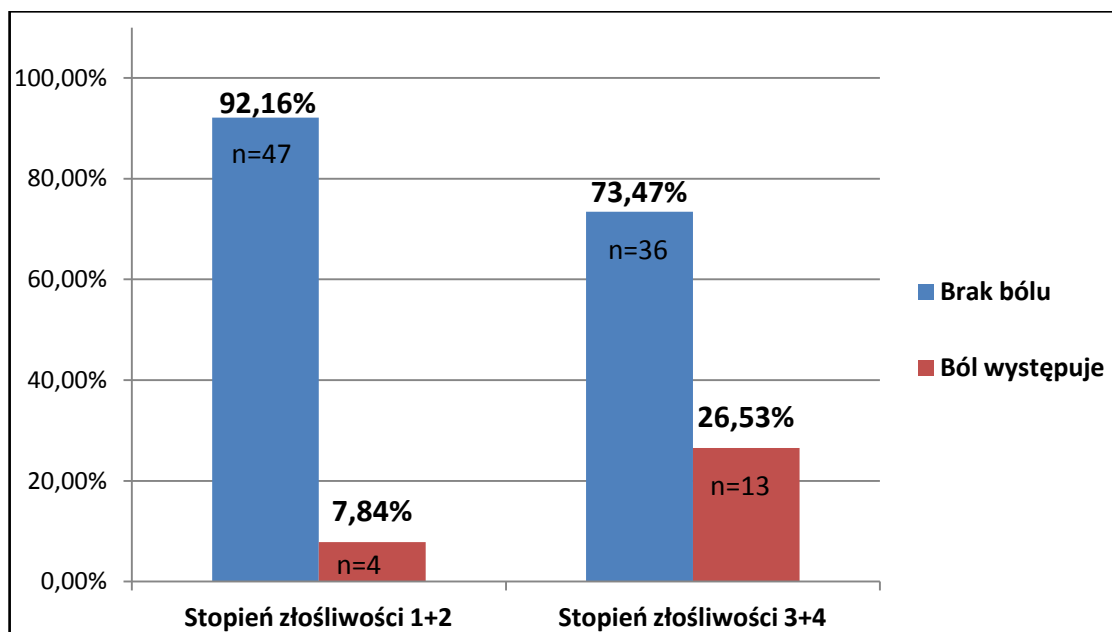
**Rycina 44.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem złośliwości a występowaniem objawów ( $p = 0,0003$ ).



**Rycina 45.** Test niezależności  $\chi^2$ : zależność pomiędzy stopniem złośliwości a występowaniem krwimoczcu ( $p = 0,0490$ ); 95% CI: 0.9609 - 23.784) nie jest istotna statystycznie.

Na kolejnej **rycynie 46** ukazano istotną zależność pomiędzy stopniem złośliwości a zgłaszaniem bólu w okolicy lędźwiowej przez pacjentów przed rozpoznaniem u nich guza nerki ( $p = 0,0165$ ). Pacjenci z nowotworem o wyższym stopniu złośliwości (G3 i G4) odczuwali ból w okolicy lędźwiowej 4 – krotnie częściej niż pacjenci z nowotworem mniej złośliwym (G1 i G2), OR = 4.243; 95% CI (1.275 - 14.117).





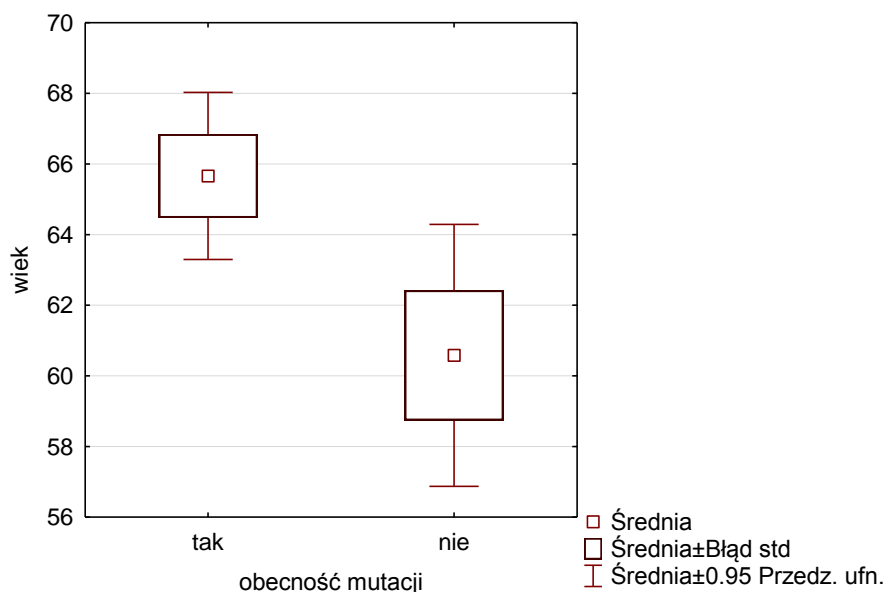
**Rycina 46.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem złośliwości a zgłaszaniem bólu w okolicy lędźwiowej przez pacjentów ( $p = 0,0165$ ).

Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy stopniem złośliwości nowotworu a pozostałymi cechami uwzględnionymi w analizie statystycznej.

#### 4.3.4. Analiza parametrów klinicznych w zależności od obecności mutacji genu VHL.

Analizie poddano występowanie zależności pomiędzy obecnością lub brakiem mutacji w genie VHL a parametrami klinicznym.

Porównując pacjentów względem występowania lub braku mutacji w genie VHL stwierdzono istotną różnicę wieku ( $p = 0,0330$ ). W grupie pacjentów z mutacją ( $n = 53$ ) średnia wieku ( $65,66 \pm 8,58$  lat) była istotnie wyższa niż w grupie pacjentów bez mutacji w genie VHL ( $n = 43$ ), gdzie średnia wynosiła  $60,58 \pm 12,05$  lat. Dane przedstawiono na **rycynie 47**.



**Rycina 47.** Wiek w grupie pacjentów z mutacją genu VHL (n = 53) oraz w grupie bez mutacji genu VHL (n = 43). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0330). Wiek [lata].

Postanowiono dokonać oceny zależności obecności mutacji w genie VHL w odniesieniu do czynników ryzyka raka nerki: nadciśnienia tętniczego krwi, BMI, palenia papierosów. Wykazano istotną zależność pomiędzy obecnością mutacji genu VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi (p = 0,0196). U pacjentów z mutacją istotnie częściej stwierdzano nadciśnienie tętnicze krwi niż u pacjentów bez mutacji genu VHL. Dane z analizy zebrano w **tabeli 25**. W odniesieniu do BMI oraz palenia tytoniu nie wykazano istotnych zależności.

Obecność mutacji w genie VHL	Nadciśnienie tętnicze zdiagnozowane	Ciśnienie tętnicze w normie
<b>tak</b>	n = 41 (77,36%)	n = 12 (22,64%)
<b>nie</b>	n = 23 (54,76%)	n = 19 (45,24%)

**Tabela 25.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi (p = 0,0196). Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.

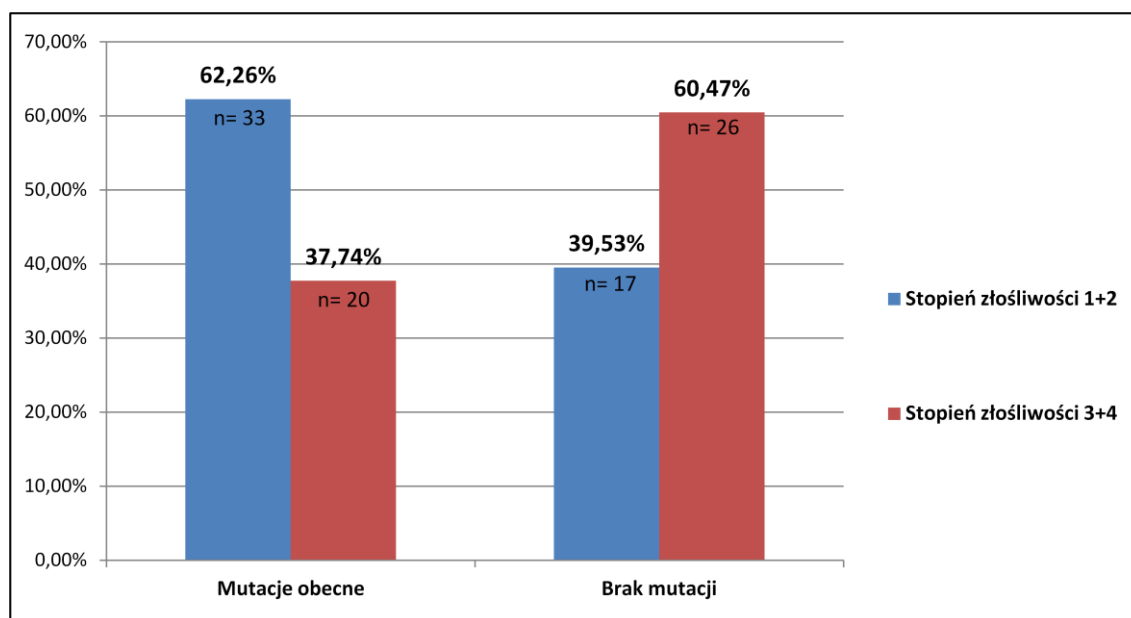
Analizie poddano zależności pomiędzy obecnością mutacji genu VHL a występowaniem objawów przed rozpoznaniem raka nerki, krwimoczem, bólu w okolicy lędźwiowej, spadku masy ciała. Nie wykazano istotnych zależności w odniesieniu do występowania objawów związanych z rakiem nerki rozpatrywanych ogółem. Choć zaobserwowano istotne statystycznie zależności pomiędzy obecnością

mutacji genu VHL a występowaniem bólu w okolicy lędźwiowej ( $p = 0,0184$ ) to nie można wykluczyć wyniku fałszywie dodatniego ze względu na małą liczbę osób zgłaszających ból ( $n = 17$ ).

Wykazano istotną zależność pomiędzy obecnością mutacji genu VHL a stopniem zróżnicowania nowotworu ( $p = 0,0266$ ). W grupie osób z mutacją ( $n = 53$ ) istotnie rzadziej rozpoznano ccRCC o wysokim stopniu złośliwości (G3 lub G4 wg Fuhrmana) w porównaniu z grupą pacjentów bez mutacji ( $n = 43$ ). W **tabeli 26** i na **rycynie 48** ukazano otrzymane wyniki.

Obecność mutacji w genie VHL	Stopień złośliwości G1 + G2	Stopień złośliwości G3 + G4
<b>tak</b>	n = 33 (62,26%)	n = 20 (37,74%)
<b>nie</b>	n = 17 (39,53%)	n = 26 (60,47%)

**Tabela 26.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a stopniem złośliwości nowotworu ( $p = 0,0266$ ). Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.



**Rycina 48.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a stopniem złośliwości nowotworu wg klasyfikacji Fuhrmana ( $p = 0,0266$ ).

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono brak istotnych statystycznie zależności pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a następującymi parametrami klinicznymi: płeć, cukrzyca, choroba niedokrwienna serca, choroby układu krążenia

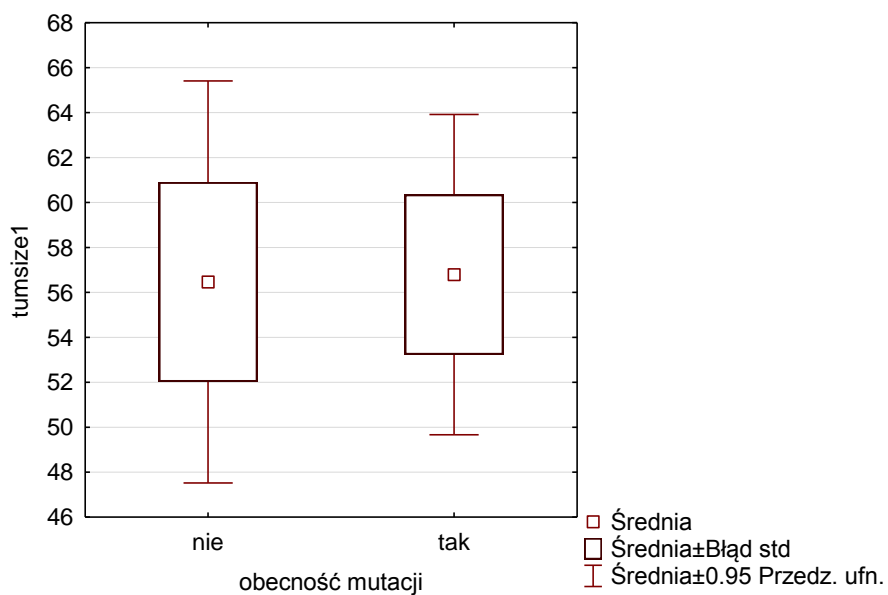
i oddechowego, choroba nowotworowa przed rozpoznaniem RCC, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób nerek, nowotworów złośliwych, RCC, raka trzustki, wyników laboratoryjnych: morfologii i stężenia kreatyniny we krwi.

Podobnie nie wykazano istotnych zależności pomiędzy obecnością mutacji a stopniem zaawansowania klinicznego. W analizie uwzględniono podział na trzy grupy pacjentów przedstawiony powyżej. W **tabeli 27** zestawiono dane, z których wynika, że rozkład pacjentów w Gr1 (pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki), Gr2 (pacjenci z rakiem naciekającym tłuszcz okołonerkowy) oraz Gr3 (pacjenci z przerzutami do płuc) jest podobny u pacjentów z mutacją jak i u pacjentów z brakiem mutacji.

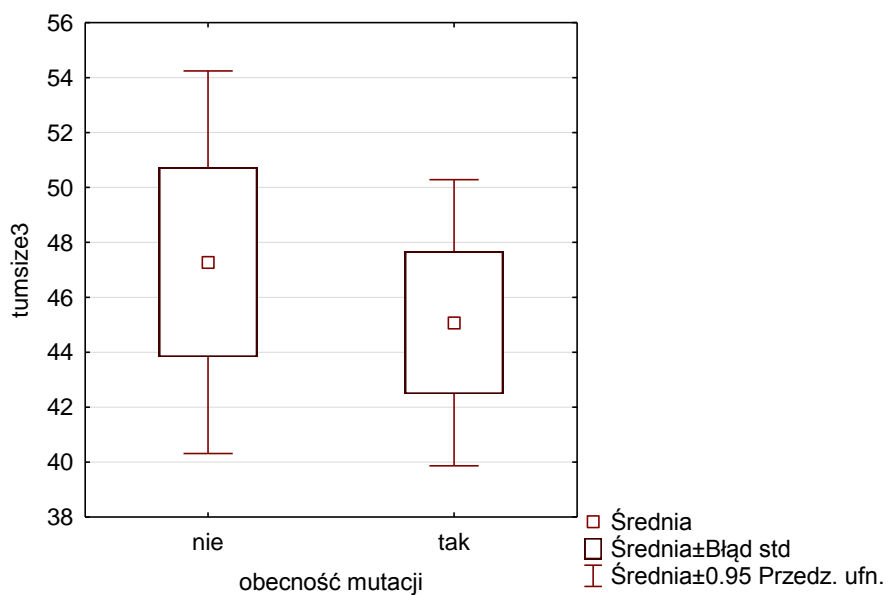
Obecność mutacji w genie VHL	Gr1	Gr2	Gr3
<b>tak</b>	n = 29 (54,72%)	n = 18 (33,96%)	n = 6 (11,32%)
<b>nie</b>	n = 27 (62,79%)	n = 12 (27,91%)	n = 4 (9,30%)

**Tabela 27.** Test niezależności  $\chi^2$ : brak istotnych zależności pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach. Gr1 pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki, Gr2 pacjenci z rakiem naciekającym na tkankę tłuszczową okołonerkową, Gr3 pacjenci z przerzutami do płuc.

Ocenie poddano wielkość guza względem obecności mutacji w genie VHL. W grupie pacjentów z mutacją (n = 53) maksymalny wymiar guza wynosił średnio 56,79 +/- 25,86mm, a minimalny wymiar guza średnio 45,07 +/- 18,90mm. W grupie pacjentów bez mutacji (n = 43) odpowiednio 56,46 +/- 29,06mm dla wymiarów maksymalnych i 47,28 +/- 22,63mm dla wymiarów minimalnych. Różnice te nie były istotne statystycznie. Dane z analizy ukazano na **rycynie 49** dla wymiarów maksymalnych guza, a na **rycynie 50** dla wymiarów minimalnych.



**Rycina 49.** Wielkość maksymalna guza w grupie pacjentów bez mutacji w genie VHL (n = 43) oraz w grupie pacjentów z mutacją w genie VHL (n = 53). Test U Manna – Whitney: p = NS. Tumsze1 - największy wymiar guza [mm].



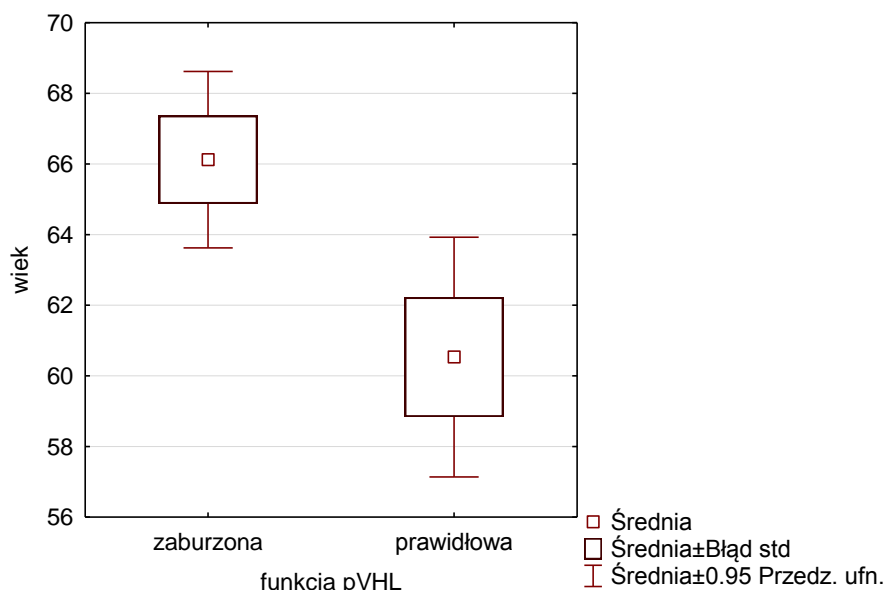
**Rycina 50.** Wielkość minimalna guza w grupie pacjentów bez mutacji w genie VHL (n = 43) oraz w grupie pacjentów z mutacją w genie VHL (n = 53). Test U Manna – Whitney: p = NS. Tumsze3 - wielkość minimalna guza [mm].

#### **4.3.5. Analiza parametrów klinicznych w zależności od funkcjonalności białka VHL.**

Przy pomocy programu PolyPhen-2 analizowano wpływ mutacji na funkcje białka VHL (pVHL), co zostało opisane w rozdziale IV.2.5. W analizie statystycznej uwzględniono przedstawiony powyżej podział pacjentów na dwie grupy w zależności od funkcjonalności białka VHL.

Poddano ocenie funkcjonalność białka VHL pod względem następujących parametrów klinicznych: wiek, płeć, występowanie czynników ryzyka raka nerki, tj. nadciśnienia tętniczego krwi, palenia papierosów, BMI, występowania objawów, krwimoczu, bólu w okolicy lędźwiowej, spadku masy ciała, stopień zaawansowania klinicznego nowotworu, stopień złośliwości nowotworu, obecności przerzutów do płuc, występowanie chorób współistniejących: cukrzyca, choroba niedokrwienności serca, choroba nowotworowa przed rozpoznaniem raka nerki, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób nerek, nowotworu złośliwego, RCC, raka trzustki oraz badania laboratoryjne, tj. poziom hemoglobiny i stężenie kreatyniny we krwi.

Analizując grupy pacjentów względem przewidywanej funkcjonalności białka VHL stwierdzono istotną różnicę wieku ( $p = 0,0115$ ). W grupie pacjentów z zaburzoną funkcją pVHL ( $n = 49$ ) średnia wieku wynosiła  $66,12 \pm 8,70$  lat, a w grupie pacjentów z zachowaną funkcją pVHL ( $n = 47$ )  $60,53 \pm 11,57$  lat. Dane z analizy przedstawiono na **rycynie 51**.



**Rycina 51.** Wiek w grupie pacjentów z przewidywaną zaburzoną funkcją białka VHL (n = 49) oraz w grupie pacjentów z prawidłową funkcją białka VHL (n = 47). Test U Manna – Whitneya: różnica istotna statystycznie (p = 0,0115). Wiek [lata].

Wykazano istotną zależność pomiędzy przewidywaną funkcjonalnością białka VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi (p = 0,0300). W grupie pacjentów z zaburzoną funkcją pVHL (n = 49) istotnie częściej występowało nadciśnienie tętnicze w porównaniu do grupy pacjentów z zachowaną funkcją pVHL (n = 46). Dane przedstawiono w **tabeli 28**.

Funkcja białka VHL	Nadciśnienie tętnicze zdiagnozowane	Ciśnienie tętnicze w normie
<b>zaburzona</b>	n = 38 (77,55%)	n = 11 (22,45%)
<b>prawidłowa</b>	n = 26 (56,52%)	n = 20 (43,48%)

**Tabela 28.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy przewidywaną funkcjonalnością białka VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi (p = 0,0300). Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.

Pozostałe parametry kliniczne poddane analizie nie wykazywały istotnych zależności względem funkcjonalności białka VHL. W **tabeli 29** zestawiono dane z analizy zależności w odniesieniu do stopnia złośliwości. W grupie pacjentów z zaburzoną funkcją pVHL częściej rozpoznano raka o niskim stopniu złośliwości (G1 lub G2) w porównaniu z grupą pacjentów z zachowaną funkcją pVHL, jednak zależności te nie są istotne statystycznie (p = 0,0517).

Funkcja białka VHL	Stopień złośliwości G1 + G2	Stopień złośliwości G3 + G4
<b>zaburzona</b>	n = 30 (61,22%)	n = 19 (38,78%)
<b>prawidłowa</b>	n = 20 (42,55%)	n = 27 (57,45%)

**Tabela 29.** Test niezależności  $\chi^2$ : brak istotnej zależności pomiędzy przewidywaną funkcjonalnością pVHL a stopniem złośliwości nowotworu,  $p = NS$ . Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.

#### 4.3.6. Analiza parametrów klinicznych w zależności od rodzaju mutacji (somatycznej czy germinalnej).

Poddano analizie występowanie zależności pomiędzy obecnością mutacji somatycznych lub germinalnych a cechami klinicznymi badanych pacjentów, tj. płeć, BMI, występowanie czynników ryzyka (palenie papierosów, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca), występowanie objawów przed rozpoznaniem ccRCC (krwiomocz, ból w okolicy lędźwiowej, spadek masy ciała), występowanie chorób nowotworowych przed rozpoznaniem ccRCC, występowanie chorób towarzyszących ccRCC, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób nerek oraz chorób nowotworowych, stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej, stopień złośliwości nowotworu, badania laboratoryjne.

Wykazano zależność pomiędzy rodzajem mutacji (somatycznej lub germinalnej) a stężeniem kreatyniny w surowicy krwi, dane przedstawiono w **tabeli 30**. U pacjentów z mutacją germinalną częściej stwierdzono stężenie kreatyniny powyżej normy ( $p = 0,0261$ ) ale ze względu na małą grupę tych pacjentów ( $n = 2$ ) nie można uznać jej za statystycznie reprezentatywną.

Pozostałe cechy nie wykazywały zależności z występowaniem mutacji somatycznej lub germinalnej.

Obecność mutacji	Stężenie kreatyniny w normie	Stężenie kreatyniny powyżej normy
<b>somatyczna</b>	n = 44 (86,27%)	n = 7 (13,73%)
<b>germinalna</b>	n = 0 (0,00%)	n = 2 (100,00%)

**Tabela 30.** Test niezależności  $\chi^2$ : zależność pomiędzy występowaniem typu mutacji (somatyczna lub germinalna) a stężeniem kreatyniny ( $p = 0,0261$ ). Ze względu na bardzo małe grupy pacjentów należy być ostrożnym w wyciąganiu wniosków. Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.



#### 4.3.7. Analiza parametrów klinicznych w zależności od lokalizacji mutacji w poszczególnych egzonach.

Postanowiono dokonać oceny zależności lokalizacji mutacji w poszczególnych egzonach genu VHL w odniesieniu do cech klinicznych. W analizie uwzględniono następujące cechy kliniczne: wiek, BMI, występowanie czynników ryzyka raka nerki: nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów, występowanie objawów, krwimoczu, bólu w okolicy lędźwiowej, spadku masy ciała, występowanie chorób towarzyszących, cukrzyca, choroba niedokrwienna serca, choroby układu krążenia i układu oddechowego, stopień zaawansowania klinicznego, wielkość guza, stopień złośliwości nowotworu, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób nerek oraz chorób nowotworowych, RCC, raka trzustki, badania laboratoryjne: morfologia, stężenie kreatyniny i elektrolitów we krwi.

Wykazano istotną zależność pomiędzy lokalizacją mutacji w genie VHL a BMI ( $p = 0,0220$ ). Podczas analizy uwzględniono podział BMI przedstawiony w rozdziale IV.1.1 (norma, nadwaga, otyłość). Stwierdzono, że w grupie pacjentów z mutacją w egzonie 1 ( $n = 28$ ) częściej stwierdzono nadwagę lub otyłość w porównaniu do pacjentów z mutacją w egzonie 2 ( $n = 13$ ) lub egzonie 3 ( $n = 12$ ). Dane dotyczące analizy zebrano w **tabeli 31**.

Pozostałe cechy kliniczne nie wykazywały istotnej zależności w odniesieniu do lokalizacji mutacji w genie VHL.

BMI	Egzon 1	Egzon 2	Egzon 3
<b>norma</b>	n = 1 (3,57%)	n = 4 (30,77%)	n = 5 (41,67%)
<b>nadwaga</b>	n = 19 (67,86%)	n = 7 (53,85%)	n = 3 (25,00%)
<b>otyłość</b>	n = 8 (28,57%)	n = 2 (15,38%)	n = 4 (33,33%)

**Tabela 31.** Test niezależności  $\chi^2$ : zależność pomiędzy występowaniem nadwagi i otyłości a lokalizacją mutacji w poszczególnych egzonach genu VHL ( $p = 0,0220$ ). BMI [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] norma (BMI od 18,5 do 24,99), nadwaga (BMI od 25,0 do 29,99), otyłość (BMI > 30). Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.

#### **4.3.8. Analiza parametrów klinicznych w zależności od typu mutacji (punktowa czy z przesunięciem ramki odczytu).**

Poddano analizie występowanie zależności pomiędzy obecnością mutacji punktowych lub z przesunięciem ramki odczytu a cechami klinicznymi badanych pacjentów, tj. wiek, BMI, występowanie czynników ryzyka raka nerki: nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów, występowanie objawów, krwimocz, bólu w okolicy lędźwiowej, spadku masy ciała, występowanie chorób towarzyszących, cukrzyca, choroba niedokrwienna serca, choroby układu krążenia i układu oddechowego, stopień zaawansowania klinicznego, wielkość guza, stopień złośliwości nowotworu, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób nerek oraz chorób nowotworowych, RCC, raka trzustki, badania laboratoryjne: morfologia, stężenie kreatyniny i elektrolitów we krwi.

Analizując BMI uwzględniono podział przedstawiony w rozdziale IV.1.1 (norma, nadwaga, otyłość). Wykazano istotną zależność pomiędzy typem mutacji (punktowa czy z przesunięciem ramki odczytu) a BMI ( $p = 0,0265$ ). Stwierdzono, że w grupie pacjentów z mutacją punktową ( $n = 16$ ) istotnie częściej występuje nadwaga lub otyłość w porównaniu z grupą pacjentów z mutacją z przesunięciem ramki odczytu ( $n = 37$ ). Dla celów statystycznych jednego pacjenta, u którego występowały jednocześnie dwie mutacje (punktowa i z przesunięciem ramki odczytu) włączono do grupy pacjentów z mutacją z przesunięciem ramki odczytu. Dane przedstawiono w **tabeli 32**.

Dokonując szczegółowej analizy pacjentów z prawidłową masą ciała i z otyłością wykazano istotność statystyczną ( $p = 0,0187$ ). Stwierdzono, że w grupie pacjentów z mutacją punktową 12 razy częściej występuje otyłość niż prawidłowe BMI, OR = 12; 95% CI (1.177 - 122.34). Podobnie stwierdzono istotną różnicę porównując pacjentów z nadwagą i z otyłością ( $p = 0,0333$ ). W grupie pacjentów z mutacją punktową ponad 4 – krotnie częściej stwierdzono otyłość niż nadwagę, OR = 4,190; 95% CI (1.077 – 16.298).

Typ mutacji	BMI w normie	Nadwaga	Otyłość
<b>punktowa</b>	n = 1 (6,25%)	n = 7 (43,75%)	n = 8 (50,00%)
<b>frameshift</b>	n = 9 (24,32%)	n = 22 (59,46%)	n = 6 (16,22%)

**Tabela 32.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a BMI ( $p = 0,0220$ ). Frameshift – mutacja z przesunięciem ramki odczytu. BMI [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] norma (BMI od 18,5 do 24,99), nadwaga (BMI od 25,0 do 29,99), otyłość (BMI > 30). Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano istotną zależność pomiędzy typem mutacji (punktowa czy z przesunięciem ramki odczytu) a występowaniem objawów przed rozpoznaniem raka nerki ( $p = 0,0104$ ). Objawy występowały 5 – krotnie częściej w grupie pacjentów z mutacją punktową ( $n = 16$ ) w porównaniu z grupą pacjentów z mutacją z przesunięciem ramki odczytu ( $n = 37$ ). OR = 5,167; 95% CI (1.389 – 19.216). Dane dotyczące analizy zebrano w **tabeli 33**.

Typ mutacji	Objawy występują	Brak objawów
<b>punktowa</b>	n = 8 (50,00%)	n = 8 (50,00%)
<b>frameshift</b>	n = 6 (16,22%)	n = 31 (83,78%)

**Tabela 33.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a występowaniem objawów ( $p = 0,0104$ ). Frameshift – mutacja z przesunięciem ramki odczytu. Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.

Poniżej, w **tabeli 34** zebrano dane dotyczące analizy zależności pomiędzy typem mutacji (punktowa czy z przesunięciem ramki odczytu) a występowaniem bólu w okolicy lędźwiowej. Wykazano istotność statystyczną zależności na poziomie  $p = 0,0250$ . Po obliczeniu ilorazu szans stwierdzono, że w grupie pacjentów z mutacją punktową ( $n = 16$ ) ból w okolicy lędźwiowej występował 12 razy częściej niż w grupie pacjentów z mutacją z przesunięciem ramki odczytu ( $n = 37$ ). OR = 12; 95% CI (1.219 – 118.17).

Typ mutacji	Ból występuje	Brak bólu
<b>punktowa</b>	n = 4 (25,00%)	n = 12 (75,00%)
<b>frameshift</b>	n = 1 (2,70%)	n = 36 (97,30%)

**Tabela 34.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a występowaniem bólu w okolicy lędźwiowej ( $p = 0,0250$ ). Frameshift – mutacja z przesunięciem ramki odczytu. Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach.

Wykazano istotną zależność pomiędzy typem mutacji (punktowa czy z przesunięciem ramki odczytu) a dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku chorób nerek ( $p = 0,0104$ ). W grupie pacjentów z mutacją punktową ( $n = 16$ ) 5 razy częściej krewni I-go i II-go stopnia byli leczeni z powodu chorób nerek w porównaniu z grupą pacjentów z mutacją z przesunięciem ramki odczytu ( $n = 37$ ). OR = 5,167; 95% CI (1.389 – 19.216). Dane dotyczące analizy zebrano w **tabeli 35**.

Typ mutacji	Choroby nerek u krewnych pacjentów z ccRCC	Brak chorób nerek u krewnych pacjentów z ccRCC
<b>punktowa</b>	n = 8 (50,00%)	n = 8 (50,00%)
<b>frameshift</b>	n = 6 (16,22%)	n = 31 (83,78%)

**Tabela 35.** Test niezależności  $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku chorób nerek ( $p = 0,0104$ ). Frameshift – mutacja z przesunięciem ramki odczytu. Podano liczbę i procent pacjentów w danych grupach

Pozostałe badane zależności pomiędzy parametrami klinicznymi (wymienionymi powyżej, str.45) w odniesieniu do typu mutacji punktowych lub z przesunięciem ramki odczytu były nieistotne statystycznie.

## 5. Omówienie.

Rak nerki stanowi od 2 do 3 procent wszystkich nowotworów złośliwych. Mężczyźni chorują częściej niż kobiety. U mężczyzn współczynnik zapadalności wynosi 11,8 a współczynnik śmiertelności 4,1 na 100 000 mieszkańców, u kobiet odpowiednio 5,8 i 1,7. Dane dotyczą krajów wysokorozwiniętych [144].

Dostępne publikacje dotyczące czynników predysponujących do powstania raka nerki mówią o paleniu papierosów, otyłości i nadciśnieniu tętniczym [9, 11, 145]. Ryzyko wystąpienia raka nerki zwiększa posiadanie krewnego I – go stopnia, u którego rozpoznano RCC [146]. Rak nerki stanowi niejednorodną histologicznie grupę nabłonkowych nowotworów złośliwych, z czego najczęściej (70-80%) rozpoznawany jest rak jasnokomórkowy [23]. Ze względu na jego częstość występowania oraz ze względu na fakt, że charakteryzuje się gorszym rokowaniem w porównaniu z innymi typami RCC, rak jasnokomórkowy nerki był przedmiotem wielu badań naukowych. Analiza genetyczna rodzin z zespołem von Hippel – Lindau przyniosła odkrycie genu VHL. Gen ten pełni funkcje supresorowe w komórce. W wyniku kontrolowania ilości czynnika transkrypcyjnego HIF $\alpha$  w zależności od utlenowania komórki, białko VHL reguluje ekspresję genów proangiogennych. Białko VHL poprzez kontrolę cyklu komórkowego wpływa na wzrost i apoptozę komórek, bierze udział w organizacji filamentów aktynowych i mikrotubul oraz w tworzeniu macierzy pozakomórkowej [104]. W świetle dostępnych badań uważa się, że mutacja genu VHL predysponuje do powstania raka jasnokomórkowego nerki, zarówno występującego rodzinnie w zespole von Hippel – Lindau, jak i występującego sporadycznie [111, 112, 126, 147, 148, 149].

W kontekście badań prowadzonych w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej oraz w Europie Zachodniej dotyczących mutacji genu VHL w sporadycznie występującym ccRCC nasuwa się pytanie jak wygląda sytuacja w Polsce. Zgodnie z ogólnie dostępnymi danymi w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii PUM w Szczecinie prowadzone są badania nad mutacjami germinalnymi pacjentów z zespołem von Hippel – Lindau [150, 151]. W ostatnich latach pojawiły się publikacje dotyczące mutacji genu VHL w guzach ośrodkowego układu nerwowego oraz w guzach chromochłonnych nadnercza [152, 153, 154]. Do tej pory nie ukazała się żadna publikacja dotycząca mutacji genu VHL w sporadycznie występującym ccRCC polskiej populacji. Ten fakt skłonił mnie do podjęcia niniejszych badań.

W dostępnym piśmiennictwie częstość mutacji genu VHL w sporadycznym raku jasnokomórkowym nerki ocenia się na 42 - 82%, zależnie od autora publikacji [126, 128, 129, 130, 131, 149]. Brauch i wsp. badali 227 pacjentów z guzami nerki z trzech ośrodków medycznych w Niemczech. Badania genetyczne (mutacje w genie VHL, metylację promotora oraz utratę heterozygotyczności) badano we wszystkich typach histologicznych guzów nerek, ccRCC stanowiło 151 guzów. Największą częstość mutacji somatycznej genu VHL stwierdzono w raku jasnokomórkowym nerki na poziomie 42%, różnica była istotna statystycznie w porównaniu z innymi typami histologicznymi. Na podobnym poziomie (46%) częstość mutacji genu VHL w guzach jasnokomórkowym nerki wykazali badacze z Uniwersytetu w Cambridge [129]. Foster i wsp. włączyli do badań 99 pacjentów z RCC, różniących się histologicznie, z czego 65 pacjentów miało ccRCC. Nieco wyższy odsetek mutacji w genie VHL stwierdzili badacze z Japonii. Shuin i wsp. zakwalifikowali do badań 47 pacjentów, po ocenie histopatologicznej, u 39 rozpoznano rak jasnokomórkowy, u 8 inne typy raka nerki. Spośród 39 pacjentów z ccRCC, mutację genu VHL stwierdzono u 22 pacjentów (56%). Holenderscy badacze (van Houwelingen i wsp.) wykorzystując bloczki parafinowe 235 guzów nerek, stwierdzili mutacje genu VHL u 61% raków jasnokomórkowych nerki (mutacje obecne w 114 guzach z 187 guzów ccRCC). W powyżej opisanych badaniach do wykrywania mutacji stosowano metodę SSCP (z ang. single strand conformation polymorphism). Jest to metoda badania polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA. Foster i Shuin wykorzystywali dodatkowo analizę heterodupleksów – HET (z ang. heteroduplex analysis). DNA pacjentów, u których wykryto polimorfizm, było poddane sekwencjonowaniu.

W moich badaniach mutacje genu VHL stwierdzono u 53 pacjentów z 96 badanych. U wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badań rozpoznano jasnokomórkowy rak nerki. Materiał pozyskiwano z guza bezpośrednio po operacji. Do wykrywania mutacji stosowano metodę sekwencjonowania. Częstość mutacji (55%) była na nieco wyższym poziomie w porównaniu do wyników uzyskanych przez autorów omówionych powyżej.

Różnice w obserwowanych proporcjach mutacji genu VHL można przypisywać technice wykrywania mutacji (SSCP w przeciwieństwie do bezpośredniego sekwencjonowania). Pod uwagę należy wziąć sposób pozyskiwania materiału do badań (bloczki parafinowe guzów czy tkanka z guza pobierana po operacji na potrzeby

badania). Dużą wagę przywiązuje się do dokładnej weryfikacji histopatologicznej guza i eliminacji z badań innych typów RCC niż rak jasnokomórkowy.

Nie mniej istotny wydaje się fakt „zanieczyszczenia” materiału poprzez komórki wchodzące w skład guza, nie będące komórkami ccRCC. Na co zwrócili szczególną uwagę w badaniach Young i wsp. [126]. Badacze z Wielkiej Brytanii oszacowali ilość komórek ccRCC w próbkach guza przeznaczonych do izolacji DNA używając PicoGreen® dsDNA assay. Próbki zawierające poniżej 50% komórek raka były odrzucane z analizy. Zwracano uwagę na dokładną kwalifikację histologiczną jedynie raka jasnokomórkowego. Zachowując powyższe kryteria kwalifikacji i po zastosowaniu bezpośredniego sekwencjonowania Young podaje wyższą częstość mutacji od poprzedników (na poziomie 74,6%). Należy podkreślić, że Young wymienił wszystkie mutacje genu VHL, również występujące w intronach, w pobliżu miejsc splicingowych. Po odjęciu tychże mutacji, częstość mutacji w sekwencji kodującej wyniosło 66%.

Z kolei Nickerson i wsp. szczególną uwagę zwracają na metodę zastosowaną do wykrywania mutacje [149]. Badacze zastosowali nowoczesną metodę skanowania DNA przy użyciu endonukleaz oraz sekwencjonowanie fluorescencyjne Sangera. Wykazali wyższość tych metod nad SSCP oraz DHPLC (z ang. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography, czyli wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa) stwierdzając mutacje u 82% przypadków (169/205). Stosując skanowanie DNA przy użyciu endonukleaz analizowali cały gen VHL, również introny. Mutacje w miejscach splicingowych stwierdzili w 15 przypadkach (spośród 169 przypadków z mutacjami genu VHL). Podobnie jak Young i wsp. przed izolacją DNA z tkanki guza zastosowali weryfikację proporcji komórek raka jasnokomórkowego do normalnych komórek w próbce badanej. Opierali się na recenzji patologa próbki (szkiełka H&E) i kwalifikowali do izolacji DNA fragmenty tkanki guza zawierające przynajmniej 70% komórek ccRCC.

Odnosząc się do wyżej opisanych publikacji, gdzie częstość mutacji była wyższa niż w moich badaniach należy podkreślić, że zaprojektowane startery miały za zadanie amplifikować jedynie egzony, nie badaliśmy intronów. Pomimo tych założeń u 3 pacjentów, niejako przypadkowo stwierdziliśmy mutacje w intronach (w sekwencji przylegającej do egzonów). Young oraz Nickerson w badaniach zakładali ocenę sekwencji miejsc splicingowych.

Sugeruje się, że częstość mutacji jest cechą danej populacji i zależy od czynników środowiskowych. W prezentowanej pracy wykryliśmy 25 nowych mutacji genu VHL. W dostępnym piśmiennictwie praktycznie brak publikacji dotyczących populacji polskiej uniemożliwia porównanie wyników moich badań.

Badania prowadzone nad chorobą von Hippel – Lindau dostarczyły dowodów na zależność pomiędzy genotypem a fenotypem. Specyficzne typy mutacji są związane z predyspozycją do tworzenia konkretnych guzów (rak jasnokomórkowy nerki, hemangioblastoma, guz chromochłonny nadnerczy) [155, 156, 157]. Ten fakt był przyczyną powstania klasyfikacji typów zespołu VHL (omówiono rozdział I.3.1.a) w zależności od rodzaju mutacji germinalnej występującej w rodzinie [158].

W związku z tym kolejnym zagadnieniem, jakie w niniejszej pracy starano się rozwiązać, było wyjaśnienie, czy istnieje związek pomiędzy obecnością mutacji, oraz typem mutacji a cechami klinicznymi pacjentów z ccRCC. W świetle dostępnych badań o raku jasnokomórkowym nerki przyjmuje się, że ważnymi i niezależnymi czynnikami prognostycznymi są wielkość guza, stopień zaawansowania klinicznego, stopień złośliwości nowotworu, stan kliniczny pacjenta [159, 160, 161]. Badając zależności pomiędzy obecnością mutacji a wyżej wymienionymi parametrami klinicznymi podjęto próbę odpowiedzi, czy stan genu VHL może być użytecznym prognostycznym markerem u pacjentów z ccRCC.

W dostępnym piśmiennictwie wielkość guza opisywana jest jako czynnik prognostyczny dotyczący przeżycia związanego z nowotworem [162]. Ships i wsp. do badań włączyli 683 pacjentów operowanych na Oddziale Urologicznym Szpitala Uniwersyteckiego w Austrii. Badacze stwierdzili, że 5 – letnie przeżycia różnią się istotnie w zależności od wielkości guza, na korzyść pacjentów z guzami < 5cm. Wykazali istotną zależność pomiędzy rosnącym wymiarem guza a obecnością objawów przed rozpoznaniem raka nerki. W grupie pacjentów z guzem o średnicy 5cm lub mniejszym 12,6% (55 z 435) prezentowało objawy związane z guzem w porównaniu do 35% (86 z 243) pacjentów w grupie z guzem większym niż 5cm.

W moich badaniach przeprowadzono ocenę wielkości guza w odniesieniu do parametrów klinicznych pacjentów i podobnie jak w publikacji z Austrii, stwierdzono istotną zależność pomiędzy wielkością guza a występowaniem objawów. W grupie pacjentów z krwimoczem wielkość maksymalna guza była istotnie większa niż



w grupie pacjentów bez krwimoczu;  $p = 0,0339$ . Podobnie minimalna wielkość guza była istotnie większa w grupie pacjentów z krwimoczem w porównaniu do grupy pacjentów bez krwimoczu;  $p = 0,0257$ . Wykazano, że różnice wielkości maksymalnej i minimalnej guza w grupie pacjentów zgłaszających ból w okolicy lędźwiowej w porównaniu do grupy bez bólu były znamienne statystycznie,  $p = 0,0495$  oraz  $p = 0,0338$  (dla wielkości maksymalnej oraz minimalnej). Wymiary guza były większe w grupie pacjentów zgłaszających ból w okolicy lędźwiowej. Ponadto wykazano, iż wymiary guza (maksymalny i minimalny) są istotnie większe w grupie pacjentów ze spadkiem masy ciała w porównaniu do grupy bez spadku masy;  $p = 0,0003$  oraz  $p = 0,0006$  (dla wymiarów maksymalnych i minimalnych). Dane te sugerują istotny związek pomiędzy wielkością guza a występowaniem objawów.

Wielkość guza nerki w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego, stopnia zróżnicowania nowotworu, przeżycia i rokowania była przedmiotem badań Sürer i wsp. [163]. Badacze z Turcji przeanalizowali 338 pacjentów z zaawansowaniem nowotworu na poziomie pT1 – pT3aN0M0 wg klasyfikacji TMN z 2002 roku. Wykazali, że w grupie pacjentów z guzem  $> 7\text{cm}$  istotnie częściej występuje wyższy stopień złośliwości nowotworu oraz naciek raka na tłuszcz okołonerkowy (pT3a) w porównaniu z grupą pacjentów z guzem  $\leq 7\text{cm}$ . W wyniku przeprowadzonej analizy, stwierdzili, iż wysoki stopień złośliwości (G3 i G4), wielkość guza  $> 7\text{cm}$  oraz naciek na tłuszcz okołonerkowy są istotnymi czynnikami prognostycznymi w ocenie przeżycia specyficznego dla nowotworu.

Obecnie przeprowadzone badania wykazały istotną zależność pomiędzy wielkością guza a stopniem zaawansowania patologicznego;  $p < 0,0001$  oraz  $p = 0,0001$  (dla wielkości maksymalnej oraz minimalnej). Stwierdzono, że w grupie pacjentów z rakiem ograniczonym do narządu wymiary guza są istotnie mniejsze niż w grupie pacjentów z naciekiem na tkankę tłuszczową i w grupie pacjentów z przerzutami do płuc. Najwyższą średnią wymiarów guza obliczono dla grupy pacjentów z przerzutami do płuc. W wyniku analizy wielkości guza w odniesieniu do stopnia zróżnicowania nowotworu stwierdzono istotną statystycznie różnicę wymiarów guza;  $p < 0,0001$  oraz  $p < 0,0001$  (dla wymiarów maksymalnych i minimalnych). Średnia wielkość maksymalna i minimalna guza była istotnie mniejsza w grupie pacjentów z dobrze zróżnicowanym rakiem jasnokomórkowym nerki (G1 i G2) niż w grupie pacjentów z rakiem słabo zróżnicowanym (G3 i G4).

Na podstawie uzyskanych wyników można powiedzieć, że wraz z wielkością guza rośnie stopień zaawansowania patologicznego nowotworu (pTNM) oraz stopień złośliwości nowotworu wg Fuhrmana. Ostatnie doniesienia z 2012 roku [164, 165] potwierdzają te spostrzeżenia. Według Turun i wsp. zwiększenie wymiaru guza o 1cm był związany z istotnym statystycznie wzrostem ilorazu szans na rozpoznanie ccRCC o wysokim stopniu złośliwości (OR = 1,46; 95% CI: 1,31 – 1,63). Podobne obliczenia dokonano w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu. Iloraz szans dla zależności pomiędzy wysokim stopniem zaawansowania (pT3 lub pT4) a wielkością guza wynosił 1,67 (95% CI 1,39 – 2,00). Na podstawie danych Turun i wsp. stwierdzili, iż zwiększenie wymiaru guza o 1cm powoduje zwiększenie odsetka wysokiego stopnia zaawansowania o 67%. Do podobnych wniosków doszli Tabibi i wsp. [166]. Irańczycy włączyli do badań 212 pacjentów operowanych w Teheranie z powodu guza nerki. Wykazali, że stopień złośliwości nowotworu rośnie wraz ze wzrostem wymiarów guza ( $p = 0,007$ ), również stopień zaawansowania klinicznego rośnie wraz z wielkością guza ( $p < 0,001$ ). Autorzy przeanalizowali wielkość guza w odniesieniu do objawów: krwimocz, ból w okolicy lędźwiowej oraz wyczuwalny guz w jamie brzusznej i stwierdzili, iż wielkość guza jest istotnie większa w grupie pacjentów zgłaszających objawy. W moich badaniach uzyskano podobne wyniki dotyczące zależności pomiędzy wielkością guza a występowaniem objawów oraz stopniem zaawansowania i stopniem złośliwości nowotworu.

Badania prezentowane w niniejszej rozprawie dostarczają oryginalnych spostrzeżeń odnośnie zależności pomiędzy wielkością guza a występowaniem u pacjentów dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku RCC ( $n = 4$ ). Średnia wielkość guza była istotnie większa w grupie pacjentów, których co najmniej jeden z członków rodziny chorował na RCC;  $p = 0,0051$  oraz  $p = 0,0308$  (dla wielkości maksymalnej oraz minimalnej). Posiadanie krewnych z rakiem nerki sugeruje, że u tych pacjentów występuje skłonność do raka nerki i być może powstanie raka nerki w młodszym wieku. Stwierdzono wysoki stopień zaawansowania klinicznego, trzech pacjentów miało raka naciekającego tkankę tłuszczową (75%), z czego dwóch miało przerzuty do płuc (50%). U jednego pacjenta guz był obustronny w momencie rozpoznania (nie stwierdzono u niego mutacji genu VHL).

Stopień zaawansowania nowotworu według klasyfikacji TNM jest uznawany za najważniejszy czynnik prognostyczny u pacjentów z RCC [167, 168]. Rak nerki został włączony do klasyfikacji TNM po raz pierwszy w 1974 roku [169]. Od tego czasu klasyfikacja TNM była wielokrotnie modyfikowana, aby udoskonalić wartość prognostyczną, a w konsekwencji wartość danych użytecznych w planowaniu strategii terapeutycznych. Ostatnie doniesienia potwierdzają wartość klasyfikacji TNM [170]. W opublikowanej w 2012 roku pracy Ornellas i wsp. wykazali, że stopień zaawansowania nowotworu jest istotnie związany z progresją choroby oraz śmiercią zależną od nowotworu ( $p < 0,0001$ ).

Süer i wsp. przebadali 338 pacjentów z rakiem nerki w stopniu zaawansowania pT1 – pT3aN0M0 [163]. Badacze z Turcji stwierdzili istotną statystycznie różnicę przeżycia specyficznego dla nowotworu pomiędzy grupą pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki (pT1 – pT2) a grupą pacjentów z rakiem naciekającym na tkankę tłuszczową (pT3). Badania Süer i wsp. potwierdzają trafność dokonanego w mojej rozprawie podziału pacjentów na trzy grupy w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu (grupa 1 to pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki, grupa 2 to pacjenci z infiltracją torebki tłuszczowej nerki, grupa 3 to pacjenci z przerzutami do płuc).

W moich badaniach stwierdzono istotną zależność pomiędzy stopniem zaawansowania patologicznego (uwzględniając podział pacjentów na trzy grupy) a występowaniem objawów przed rozpoznaniem raka jasnokomórkowego nerki. W grupie 3-ej objawy występowały istotnie częściej niż w grupach 1-szej i 2-ej ( $p = 0,0125$ ). W grupie pacjentów z przerzutami do płuc objawy występowały 7 razy częściej niż w grupie pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki OR = 6,708; 95% CI (1.682 - 26.755). Różnice pomiędzy grupą 2 a grupą 3 nie były istotne statystycznie.

Dokonano również analizy poszczególnych objawów w odniesieniu do stopnia zaawansowania nowotworu, tj.: krwimoczu, bólu w okolicy lędźwiowej, spadku masy ciała. Wykazano istotną zależność pomiędzy stopniem zaawansowania nowotworu a spadkiem masy ciała ( $p = 0,0002$ ). Spadek masy ciała występował prawie 25 razy częściej w grupie pacjentów z przerzutami do płuc w porównaniu do grupy pacjentów bez przerzutów OR = 24,857; 95% CI (3.853 – 160.37). Pozostałe badane cechy nie wykazywały zależności istotnej statystycznie.

Uzyskane przeze mnie wyniki wydają się być zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Ships i wsp. [162]. Badacze z Austrii w publikacji poświęconej badaniu wpływu objawów na rokowanie pacjentów z rakiem nerki, analizowali również zależności pomiędzy występowaniem objawów a cechami klinicznymi pacjentów. Stwierdzili, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu istotnie rośnie procent pacjentów prezentujących objawy w momencie rozpoznania raka nerki ( $p < 0,0001$ ). Ponadto Ships i wsp. wykazali, że przeżycia specyficzne dla nowotworu, 5 – letnie przeżycia i czas wolny od wznowy w grupie pacjentów bezobjawowych wynosiły odpowiednio 91%, 83% i 80% i były istotnie wyższe w porównaniu z 65%, 60% i 55% dla grupy pacjentów zgłaszających objawy ( $p < 0,0001$ ). W analizie wielu zmiennych stwierdzili, iż obecność objawów jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w ocenie przeżycia specyficznego dla nowotworu ( $p = 0,013$ ). Badania autorów z Włoch i Francji potwierdzają istotną zależność pomiędzy występowaniem objawów w momencie rozpoznania raka nerki a przeżyciem specyficznym dla nowotworu [171, 172].

Dostępne publikacje na temat rozpoznania raka nerki głoszą, że pacjenci, u których rak nerki został wykryty przypadkowo charakteryzowali się lepszym rokowaniem niż pacjenci zgłaszający się do lekarza z powodu objawów związanych z rakiem nerki [173, 174, 175]. Autorzy tych publikacji wykazali, że u pacjentów zgłaszających objawy stwierdzono większy wymiar guza nerki, wyższy stopień zaawansowania i zróżnicowania nowotworu w porównaniu do pacjentów bezobjawowych.

Zależność pomiędzy występowaniem objawów przed rozpoznaniem raka nerki a stopniem zróżnicowania nowotworu stwierdzono również w moich badaniach ( $p = 0,0003$ ). Pacjenci, u których rozpoznano ccRCC o wyższym stopniu złośliwości mieli ponad 5 razy częściej objawy w porównaniu do pacjentów z rakiem nerki o niższym stopniu złośliwości OR = 5.5604; 95% CI (2,097 - 14,743). Dodatkowo oceniono występowanie zależności pomiędzy stopniem zróżnicowania nowotworu a konkretnymi objawami: krwimocz, ból w okolicy lędźwiowej, spadek masy ciała. Zauważono zależność stopnia złośliwości nowotworu w odniesieniu do objawów lokalnych związanych z RCC: krwimocz (p = 0,0490) oraz bólu (p = 0,0165). W grupie pacjentów z wyższym stopniem złośliwości krwimocz i ból występował częściej niż w grupie pacjentów z nowotworem mniej złośliwym. Dla zależności pomiędzy stopniem złośliwości a krwimoczem przedział ufności obejmuje wartość

neutralną i nie jest istotny statystycznie. Nie wykazano zależności w odniesieniu do objawów ogólnych (spadku masy ciała).

W wielośrodkowym badaniu pod przewodnictwem Patard'a dokonano oceny wpływu objawów na rokowanie pacjentów z rakiem nerki [176]. Do badania włączono 2242 pacjentów z pięciu ośrodków Europejskich. W zależności od występowania objawów w momencie diagnozy pacjentów podzielono na trzy grupy: S1 to pacjenci bez objawów, S2 – pacjenci z objawami lokalnymi (krwiomocz, ból w okolicy lędźwiowej, wyczuwalny guz w jamie brzusznej) oraz S3 – pacjenci z objawami ogólnymi. Wykazano istotną zależność pomiędzy występowaniem objawów (w analizie uwzględniono klasyfikację S1, S2, S3) a stopniem złośliwości nowotworu ( $p < 0,001$ ). Patard i wsp. zaobserwowali wzrost częstości objawów lokalnych wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu. Podobne zależności wykazałam w prezentowanych przeze mnie badaniach. Dodatkowo autorzy opisywanego wielośrodkowego badania wykazali istotny wzrost występowania objawów ogólnych u pacjentów wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu, czego nie zaobserwowano w moich badaniach. Może to wynikać z faktu, że w badaniach Patard i wsp. zakwalifikowali do analizy pacjentów z wszystkimi objawami ogólnymi (utrata apetytu, spadek masy ciała, osłabienie, gorączka, pocenie nocne, kaszel, objawy paraneoplastyczne), w moich badaniach dokonano analizy pojedynczych zmiennych, więc brano pod uwagę pacjentów tylko ze spadkiem masy ciała. W badaniach Patard i wsp. wykazali ponad to istotną zależność pomiędzy występowaniem objawów (z uwzględnieniem klasyfikacji S1, S2, S3) a stopniem zaawansowania nowotworu, stanem ogólnym pacjenta oraz przeżyciem specyficznym dla nowotworu ( $p < 0,001$ ).

W prezentowanej przeze mnie rozprawie poddano analizie występowanie zależności pomiędzy stopniem zaawansowania nowotworu a stopniem złośliwości nowotworu (dwóch najważniejszych czynników prognostycznych w raku nerki) i uzyskano istotność statystyczną na poziomie ( $p = 0,0006$ ). W grupie pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki częściej występował rak jasnokomórkowy o niższym stopniu złośliwości niż rak o wyższym stopniu złośliwości. Odwrotnie było w grupie pacjentów z rakiem naciekającym na tłuszcz okołonerkowy oraz w grupie pacjentów z przerzutami do płuc. W tych grupach częściej występował rak bardziej złośliwy niż rak o mniejszym stopniu złośliwości.

Założenie, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu rośnie odsetek rozpoznania raka jasnokomórkowego nerki o wysokim stopniu złośliwości wydaje się być słuszne, jednak niewiele jest publikacji wykazujących istotność statystyczną tych zależności. Jalón Monzón i wsp. potwierdzają to założenie w swoich badaniach [177]. Badacze z Hiszpanii poddali analizie 316 pacjentów operowanych z powodu raka nerki. Wykazali, iż w grupie pacjentów z wysokim stopniem zaawansowania nowotworu (T3, T4) istotnie częściej rozpoznano rak nerki o wysokim stopniu złośliwości G3 – G4 ( $p < 0,001$ ). Podobnie, Bretheau i wsp. oceniając 190 pacjentów z RCC opublikowali zależność pomiędzy stopniem złośliwości a stopniem zaawansowania nowotworu,  $p = 0,0001$  [178]. W tej publikacji badacze obliczyli 5 – letnie przeżycia dla stopnia złośliwości od G1 do G4 odpowiednio na poziomie 76%, 72%, 51%, 35%. Zauważono istotną różnicę w przeżyciu pacjentów z rakiem ze stopniem złośliwości G1/G2 w porównaniu do pacjentów z rakiem G3/G4. Badania Bretheau i wsp. dowodzą prawidłowego podziału pacjentów w zależności od stopnia złośliwości nowotworu użytego do analizy statystycznej w mojej pracy.

Palenie papierosów jest ustanowionym czynnikiem ryzyka raka nerki [179, 180, 181]. Hunt i wsp. w meta analizie danych z 24 publikacji włączyli do obliczeń badania populacyjne (1 447 754 osób z których 1 326 miało rozpoznany rak nerki) oraz badania porównawcze przypadków (8 032 pacjentów z RCC i 13 800 osób w grupie kontrolnej). Hunt i wsp. oszacowali ryzyko względne dla raka nerki na poziomie 1,38 dla palaczy w porównaniu z osobami, które nigdy nie paliły papierosów. Stwierdzili istotny wzrost ryzyka zależny od ilości wypalanych papierosów. Korzyści płynące z rzucenia palenia były potwierdzone przez spadek ryzyka względnego dopiero po 10 latach od zaprzestania palenia [182].

W ostatnich latach zasugerowano, iż palenie tytoniu nie tylko jest ryzykiem powstania raka nerki, ale może mieć wpływ na jego biologię. Powstały prace mające na celu ocenę, czy palenie jest związane z większym stopniem zaawansowania nowotworu i gorszym rokowaniem wśród pacjentów z RCC [183, 184]. Tsivian i wsp. zakwalifikowali do badań 845 pacjentów operowanych z powodu raka nerki. Ocenili występowanie zależności pomiędzy paleniem papierosów a stopniem zaawansowania nowotworu. Biorąc pod uwagę stopień zaawansowania, pacjentów podzielili na dwie grupy. Do grupy pierwszej włączyli pacjentów z RCC ograniczonym do nerki, natomiast do grupy drugiej pacjentów z zaawansowanym rakiem nerki (rakiem

zaawansowanym miejscowo ( $\geq T3$ ) oraz rakiem dającym przerzuty odległe lub do węzłów chłonnych). Tsivian i wsp. dowiedli, że zaawansowany RCC był rozpoznawany istotnie częściej wśród palaczy papierosów w porównaniu do osób niepalących ( $p = 0,012$ ). Podobnie wykazali, że nowotwór zaawansowany miejscowo występował istotnie częściej w grupie osób palących papierosy w porównaniu do osób niepalących ( $p = 0,006$ ). Uzyskane dane przez badaczy z Uniwersytetu Duke'a ze Stanów Zjednoczonych sugerują, iż stopień zaawansowania nowotworu jest zależny od palenia papierosów, czasu trwania palenia oraz ilości wypalanych papierosów. Nałogowi palacze mieli większe ryzyko zaawansowanej postaci RCC w momencie rozpoznania choroby. W analizie wielu zmiennych wykazali, że palenie było niezależnym czynnikiem prognostycznym zaawansowanego RCC. W badaniu Tsivian i wsp. nie uwzględnili danych dotyczących stopnia zróżnicowania nowotworu.

Parker i wsp. włączyli do badań 2242 pacjentów operowanych z powodu raka nerki w Mayo Clinic oraz w Rochester w Stanach Zjednoczonych. Badali zależności pomiędzy paleniem papierosów a parametrami klinicznymi. Palacze byli istotnie młodszy w momencie rozpoznania RCC w porównaniu do pacjentów niepalących. Wśród palących przeważali mężczyźni. W grupie palących papierosy istotnie częściej zaobserwowano objawy w momencie rozpoznania RCC, stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych lub przerzuty odległe oraz IV stopień zaawansowania klinicznego nowotworu w porównaniu do grupy pacjentów niepalących. Nie wykazano zależności pomiędzy paleniem papierosów a stopniem zróżnicowania nowotworu. Wyniki uzyskane przez dwa zespoły badawcze ze Stanów Zjednoczonych wydają się potwierdzać, iż palenie papierosów jest związane z wyższym stopniem zaawansowania RCC, nie potwierdzają natomiast związku ze stopniem złośliwości nowotworu.

W moich badaniach wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy paleniem papierosów a stopniem złośliwości nowotworu ( $p = 0,0366$ ). Obliczono, że wysoki stopień złośliwości nowotworu występował ponad dwukrotnie częściej u pacjentów palących niż niepalących, OR = 2.364; 95% CI (1.048 - 5.331). W dostępnym piśmiennictwie nie znalazłam potwierdzenia tych zależności. Natomiast w moich badaniach nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy paleniem papierosów a stopniem zaawansowania nowotworu. Ten fakt można wytłumaczyć małą próbą badanych pacjentów z zaawansowanym RCC w porównaniu do badań ze Stanów Zjednoczonych. W moich badaniach oceniano 11 pacjentów z przerzutami do płuc

a w badaniach Parker'a i wsp. 334. Dodatkowo z moich badań wykluczano pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych.

W najnowszym amerykańskim badaniu z 2012 roku Kroeger i wsp. potwierdzili występowanie zależności pomiędzy paleniem papierosów a wyższym stopniem zaawansowania nowotworu, częstszym występowaniem przerzutów, a w szczególności przerzutów do płuc [185]. Badacze z Los Angeles nie zaobserwowali zależności pomiędzy paleniem a stopniem złośliwości nowotworu. Jednak najważniejszym wynikiem pracy Kroeger i wsp. było stwierdzenie, iż zarówno przeżycie całkowite jak i przeżycie zależne od nowotworu było znamienne gorsze wśród palaczy.

Piśmiennictwo bogate jest w epidemiologiczne dowody wspierające tezę, że otyłość zwiększa ryzyko raka nerki, w szczególności ccRCC [186, 187, 188, 189]. Jednakże patofizjologia wpływu otyłości na powstawanie ccRCC nie została do tej pory wyjaśniona. Powstaje pytanie, czy otyłość jest związana z zaburzeniami molekularnymi ccRCC, a dokładniej inaktywacją genu VHL. Mutacje genu VHL mogą być powiązane z nadwagą i ccRCC poprzez insulinopodobny czynnik wzrostu – 1 (IGF – 1). IGF -1 stymuluje proliferację komórek, a hamuje apoptozę, udowodniono, że jego poziom jest zwiększony u osób otyłych [190, 191]. Ostatnie doniesienia wskazują, że w tkance raka nerki jest zwiększona ekspresja receptora dla IGF -1 [192]. Sugeruje się, iż białko VHL może hamować proliferację komórek zależną od IGF -1 [193]. A więc, u osób z inaktywacją genu VHL zaburzone jest hamowanie IGF -1, którego stężenie jest szczególnie wysokie u osób otyłych [194].

Smits i wsp. postanowili ocenić związek pomiędzy BMI a mutacjami genu VHL w ccRCC w dużym badaniu populacyjnym [195]. Do badania wykorzystali dane z Holenderskiej Bazy Badań Kohortowych zawierającej 120 852 osób. Spośród tej grupy do analizy mutacji genu VHL zakwalifikowano 187 osób z rakiem jasnokomórkowym nerki. Nie wykazali istotnych różnic w BMI pomiędzy grupą ze zmutowanym genem VHL a grupą z prawidłowym genem VHL. Wykazali natomiast, że osoby z mutacją genu VHL miały istotnie wyższe BMI w wieku 20 lat ( $p = 0,035$ ). Dodatkowo stwierdzili, że wysokie BMI w wieku 20 lat było związane ze zwiększonym ryzykiem ccRCC u osób z mutacją w genie VHL. Według Smits'a i wsp. ich wyniki są w zgodzie z hipotezą, iż mutacje genu VHL powstają na wczesnym etapie kancerogenezy RCC.



W moich badaniach nie wykazano istotnych zależności pomiędzy BMI a obecnością lub brakiem mutacji genu VHL, podobnie jak w badaniach Smits'a i wsp. Nie mieliśmy danych odnośnie BMI w młodym wieku badanych przez nas pacjentów. Dokonaliśmy natomiast analizy zależności pomiędzy BMI a lokalizacją mutacji VHL w poszczególnych egzonach. Uzyskane przez nas wyniki dostarczają oryginalnych spostrzeżeń. Stwierdzono, że w grupie pacjentów z mutacją w egzonie 1 istotnie częściej stwierdzono nadwagę lub otyłość w porównaniu do pacjentów z mutacją w egzonie 2 lub egzonie 3 ( $p = 0,0220$ ). W egzonie 1 zakodowana jest sekwencja podjednostki  $\beta$  białka VHL. Datta i wsp. zauważyli, że podjednostka  $\beta$  białka VHL poprzez bezpośrednie oddziaływanie na kinazę C $\delta$  hamuje receptor IGF -1. Powyższe dane sugerują istotny związek pomiędzy otyłością a mutacjami w genie VHL. Dodatkowo wykazaliśmy, że w grupie pacjentów z mutacją punktową istotnie częściej występuje nadwaga lub otyłość w porównaniu z grupą pacjentów z mutacją z przesunięciem ramki odczytu ( $p = 0,0265$ ). Jednakże mała liczba grupy badanej ogranicza wyciąganie jednoznacznych wniosków. Badania wymagają niezależnego potwierdzenia.

Rak nerki może powodować nadciśnienie tętnicze [196], z kolei istnieje szereg publikacji dowodzących, że nadciśnienie predysponuje do powstawania raka nerki [11, 197, 198]. Pojawiły się też badania sugerujące związek ze stosowaniem diuretyków i zwiększonym ryzykiem raka nerki, jednakże nie można wykluczyć w tych badaniach wpływu samego nadciśnienia tętniczego [199, 200]. Chow i wsp. w badaniu szwedzkiej populacji wykazali, że ryzyko powstania RCC rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia tętniczego, natomiast maleje przy obniżeniu ciśnienia tętniczego krwi [201]. Badanie to sugeruje wpływ nadciśnienia tętniczego na powstawanie raka nerki, natomiast mechanizm działania pozostaje niejasny. O hipotezie peroksydacji lipidów donoszą Gago – Dominguez i wsp. [202]. U podłoża mechanizmu leżą przewlekłe niedotlenienie komórek kanalików nerki, peroksydacja lipidów i tworzenie wolnych rodników [203].

Schouten i wsp. zbadali czy nadciśnienie tętnicze oraz przyjmowanie leków obniżających ciśnienie jest związane z ryzykiem powstania ccRCC, oraz dokładniej czy istnieje zależność pomiędzy nadciśnieniem tętniczym a mutacjami genu VHL u pacjentów z ccRCC [204]. Stwierdzili mutacje u 61% pacjentów (187 wszystkich badanych). Współczynnik ryzyka dla diagnozy nadciśnienia tętniczego był wyższy u pacjentów z mutacjami genu VHL w porównaniu do pacjentów z prawidłowym

genem VHL. Zaobserwowali odwrotną zależność jeżeli chodzi o stosowanie leków obniżających ciśnienie krwi. Współczynnik ryzyka dla stosowania diuretyków był wyższy dla osób z prawidłowym genem VHL.

W przedstawionych badaniach uzyskano zbieżne wyniki do danych opublikowanych przez Schouten'a i wsp. Zaobserwowałam istotną zależność pomiędzy obecnością mutacji genu VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi ( $p = 0,0196$ ). U pacjentów z mutacją istotnie częściej stwierdzano nadciśnienie tętnicze krwi niż u pacjentów z prawidłowym genem VHL.

Przeprowadzona przeze mnie analiza statystyczna pokazuje zależność pomiędzy rodzajem mutacji (somaticznej lub germinacyjnej) a stężeniem kreatyniny w surowicy krwi. U pacjentów z mutacją germinacyjną częściej stwierdzono stężenie kreatyniny powyżej normy ( $p = 0,0261$ ). Dane te wynikają z faktu, że ci pacjenci ( $n = 2$ ) mieli obustronny guz nerki, stąd podwyższone stężenie kreatyniny. Dostępne publikacje mówią o obustronnym występowaniu guzów u pacjentów z mutacją germinacyjną genu VHL. Sugerowaną metodą leczenia ccRCC u pacjentów z zespołem VHL są zabiegi oszczędzające nerkę, ze względu na duże prawdopodobieństwo powstania raka w drugiej nerce [205, 206, 207, 208].

Wyjątkowo interesujące w mojej pracy jest wykazanie zależności pomiędzy wiekiem a obecnością mutacji w genie VHL. Porównując pacjentów względem występowania lub braku mutacji w genie VHL stwierdzono istotną różnicę wieku ( $p = 0,0330$ ). W grupie pacjentów z mutacją, średnia wieku była istotnie wyższa niż w grupie pacjentów z prawidłową sekwencją genu VHL. Do podobnych wniosków doszli Kondo i wsp., badając 202 pacjentów z ccRCC [209]. Naukowcy z Japonii mutacje genu VHL stwierdzili u 51% pacjentów. Biorąc pod uwagę wiek podzielili pacjentów na dwie grupy: młodsi do 55 roku życia oraz starsi od 56 roku życia. Mutacje genu VHL istotnie częściej występowały w grupie starszych pacjentów ( $p = 0,0238$ ). Dane te sugerują, iż rak jasnokomórkowy nerki powstający u młodych pacjentów prawdopodobnie ma inne podłoże molekularne.

Badania prezentowane w niniejszej rozprawie dostarczają oryginalnych spostrzeżeń na temat zależności pomiędzy obecnością mutacji genu VHL a stopniem złośliwości nowotworu ( $p = 0,0266$ ). W grupie osób z mutacją istotnie rzadziej

rozpoznano ccRCC o wysokim stopniu złośliwości w porównaniu z grupą pacjentów bez mutacji.

W dostępnym piśmiennictwie praktycznie brak publikacji, które potwierdzałyby moje wyniki. Autorzy publikacji, oceniający zależności pomiędzy zaburzeniami genetycznymi genu VHL a parametrami klinicznymi pacjentów, nie wykazali istotnych statystycznie zależności pomiędzy obecnością mutacji a stopniem złośliwości [126, 131, 210, 211, 212, 213]. Young i wsp. badali zależności pomiędzy obecnością mutacji, metylacji promotora oraz LOH (utrata heterozygotyczności) a następującymi parametrami klinicznymi: wiek, płeć, stopień złośliwości oraz stopień zaawansowania nowotworu. Wykazali istotne zależności pomiędzy obecnością mutacji a płcią. Pozostałe cechy poddane analizie w odniesieniu do obecności mutacji były nieistotne statystycznie. Zauważyli występowanie istotnych zależności pomiędzy LOH a stopniem złośliwości. U pacjentów z LOH istotnie rzadziej stwierdzono wysoki stopień złośliwości (G4). Takie same wyniki uzyskali Banks i wsp. [210]. Wyniki te wydają się być zbieżne z uzyskanymi w mojej rozprawie. Dane te sugerują radsze występowanie ccRCC o wysokim stopniu złośliwości podczas inaktywacji genu VHL (poprzez mutację, czy LOH). Należy podkreślić, że Young i wsp. do analizy statystycznej podzielili pacjentów na 4 grupy pod względem stopnia złośliwości nowotworu. Analiza statystyczna przy podziale na 4 grupy również w moich badaniach nie wykazała zależności pomiędzy stopniem złośliwości a obecnością mutacji w genie VHL. Dopiero uwzględnienie podziału na 2 grupy: nowotwory o niskim stopniu złośliwości (G1 i G2) oraz nowotwory o wysokim stopniu złośliwości (G3 i G4) przyniosło interesujące spostrzeżenia.

Naukowcy z Uniwersytetu Harvarda w 2010 roku zaprezentowali nowoczesne narzędzie PolyPhen-2 [214]. Udoskonalona wersja programu komputerowego PolyPhen-1 przez Adzhubei i wsp. służy do przewidywania wpływu mutacji punktowych zmiany sensu, czyli SNPs (z ang. single nucleotide polymorphisms) na trwałość i funkcję białka. Program ten jest stosowany przez naukowców w celu oceny nowo wykrytych SNPs w różnych chorobach, między innymi w chorobie Alzheimera, chorobie McArdle'a, retinoblastoma, cukrzycy typu MODY2, hemofilii [215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222]. W prezentowanej pracy również postanowiono dokonać oceny wpływu mutacji punktowych zmiany sensu na białko VHL przy pomocy programu PolyPhen-2. Spośród analizowanych 16 pacjentów, u których stwierdzono SNP, 14

pacjentów miało mutacje prawdopodobnie uszkodzające białko VHL. Według programu u 4 pacjentów stwierdzone mutacje miały prawdopodobnie łagodny wpływ na białko VHL i nie zaburzały jego funkcji. Mutacje z przesunięciem ramki odczytu, uznawane są jako mutacje zaburzające funkcje białka. Na tej podstawie podzielono pacjentów na dwie grupy w zależności od funkcjonalności białka VHL i przeprowadzono analizę statystyczną w odniesieniu do cech klinicznych i parametrów patologicznych. Wykazano, iż w grupie pacjentów z zaburzoną funkcją pVHL ( $n = 49$ ) średnia wieku była istotnie wyższa niż w grupie pacjentów z zachowaną funkcją pVHL ( $n = 47$ ); ( $p = 0,0115$ ). Stwierdzono również istotną zależność pomiędzy przewidywaną funkcjonalnością białka VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi ( $p = 0,0300$ ). Nadciśnienie tętnicze istotnie częściej występowało w grupie pacjentów z zaburzoną funkcją białka VHL. Nie wykazano istotności statystycznej zależności pomiędzy funkcjonalnością pVHL a stopniem złośliwości nowotworu jak to miało miejsce w przypadku obecności mutacji genu VHL.

Dokonując oceny uzyskanych przeze mnie wyników należy pamiętać, że PolyPhen-2 to jedynie program komputerowy wykorzystujący analizy matematyczne. Dostępne informacje dotyczące celności przewidywania wpływu SNPs na białko przez różne programy komputerowe obejmują zakres od doskonałej trafności (91,7%) [223] do raczej słabych wyników (dokładność 66,7%) [224]. Badania te dotyczyły pojedynczych genów. Gray i wsp. postanowili ocenić trafność wyników programu PolyPhen-2 analizując 10 913 mutacji punktowych 2372 różnych białek dostępnych w bazie danych UniProt [225]. Wykazali współczynnik prawidłowych wyników programu PolyPhen-2 na poziomie 79%. Dane te pokazują, że wnioski na podstawie analizy programu PolyPhen-2 należy wyciągać ostrożnie.

Oceniając uzyskane w moich badaniach wyniki, odnośnie zależności pomiędzy obecnością mutacji a wiekiem oraz stopniem złośliwości nowotworu, należy mieć na względzie stosunkowo małą próbę badanych pacjentów. Uzyskane przeze mnie wyniki wymagają kontynuowania badań i potwierdzenia. Jednakże warto podkreślić, iż dane przedstawione powyżej są zgodne z ostatnio podnoszoną hipotezą mówiącą o lepszym rokowaniu pacjentów z ccRCC z mutacją genu VHL [132, 226]. Patard i wsp. wykazali, że mutacje genu VHL są związane z niższym stopniem zaawansowania nowotworu, oraz dłuższym czasem wolnym od progresji nowotworu. W najnowszym badaniu dotyczącym rokowania pacjentów z ccRCC w odniesieniu do stanu molekularnego genu

VHL z 2013 roku, Kroeger i wsp. włączyli do badań 288 pacjentów [227]. Wykazali, iż inaktywacja genu VHL wiązała się z lepszym przeżyciem u pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki. Z kolei Parker i wsp. badali ekspresję białka VHL w tkance ccRCC poprzez badania immunohistochemiczne [228]. W wyniku analizy 273 guzów, zaobserwowali lepsze przeżycia specyficzne dla nowotworu u pacjentów z brakiem białka VHL w tkance guza, ale tylko w grupie pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki.

Odkrycie roli białka VHL w regulacji odpowiedzi komórki na hipoksję zależną od czynnika transkrypcyjnego HIF przyczyniło się do stworzenia terapii celowanej raka jasnokomórkowego nerki. Mechanizm działania nowoczesnych leków na szlak pVHL/HIF/ VEGF został opisany w rozdziale I.4. Skuteczność terapii celowanej i jej wyższość nad immunoterapią została już udowodniona [143, 229]. Trzeba jednak podkreślić wysoki koszt terapii, uciążliwe skutki uboczne zgłaszane przez niektórych pacjentów, oraz fakt, że leki antyangiogenne nie pomagają wszystkim pacjentom. W leczeniu innych nowotworów, np. raka jelita grubego stosuje się genotypowanie pacjentów w kierunku mutacji KRAS i wyborze pacjentów do terapii nowoczesnym lekiem cetuximab [230, 231]. Podobnie w raku sutka kwalifikacja do leczenia lekiem trastuzumab wymaga dokładnej oceny statusu ekspresji receptora HER2 [232]. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy stan genu VHL może być czynnikiem warunkującym wybór sposobu leczenia a także optymalizacji klinicznego podejścia do chorych z przerzutowym ccRCC. Moje badania są punktem wyjścia do prowadzenia dalszych obserwacji pacjentów z ccRCC z przerzutami do płuc poddanych terapii celowanej.

## 6. Wnioski.

Analiza otrzymanych wyników w niniejszej rozprawie pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

1. Po przebadaniu 96 guzów ccRCC stwierdzono mutację genu VHL u 53 pacjentów, co stanowi 55%. Mutacje germinalne rozpoznano u 2 pacjentów. Wykazano, iż u osób młodszych rzadziej występowały mutacje genu VHL.
2. Wraz z wielkością guza rośnie stopień zaawansowania oraz stopień złośliwości nowotworu. U pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku RCC stwierdzono guz nerki o większych wymiarach niż u chorych, których członkowie rodziny nigdy nie chorowali na raka nerki. Zaobserwowano, iż u pacjentów zgłaszających objawy ze strony raka nerki rozpoznano guz o większej średnicy, wyższy stopień zaawansowania patologicznego oraz wyższy stopień złośliwości nowotworu.
3. Wykazano zależność pomiędzy stopniem zaawansowania nowotworu a stopniem złośliwości nowotworu. Pacjenci z rakiem ograniczonym do nerki mieli istotnie częściej ccRCC o niskim stopniu złośliwości w porównaniu do pacjentów z rakiem zaawansowanym miejscowo lub dającym przerzuty do płuc. U pacjentów z mutacją genu VHL rzadziej rozpoznawano ccRCC o wysokim stopniu złośliwości. Pacjenci palący papierosy mieli rozpoznany rak jasnokomórkowy nerki o wyższym stopniu złośliwości.
4. U pacjentów z mutacją częściej stwierdzano nadciśnienie tętnicze krwi niż u pacjentów z prawidłowym genem VHL. Wykazano istotną zależność pomiędzy otyłością i nadwagą a częstszym występowaniem mutacji w egzonie 1 genu VHL.

## 7. Streszczenie.

**Wprowadzenie:** Rak nerki stanowi od 2 do 3 procent wszystkich nowotworów złośliwych. Najczęstszym typem histologicznym jest rak jasnokomórkowy nerki ccRCC (70 – 80%). Odkrycie genu VHL przyczyniło się do poznania biologii ccRCC. Uważa się, że mutacja genu VHL predysponuje do powstania raka jasnokomórkowego nerki, zarówno występującego rodzinnie w zespole von Hippel – Lindau, jak i występującego sporadycznie. Odkrycie roli białka VHL w regulacji odpowiedzi komórki na hipoksję zależną od czynnika transkrypcyjnego HIF $\alpha$  przyczyniło się do stworzenia terapii celowanej raka jasnokomórkowego nerki. W wielu ośrodkach medycznych na świecie prowadzone są badania nad określeniem, czy mutacje genu VHL mogą być czynnikiem prognostycznym pacjentów z ccRCC i swoistym biomarkerem.

**Cel:** Określenie częstości, rodzaju i lokalizacji mutacji w genie VHL. Następnie ocena występowania zależności pomiędzy mutacjami genu VHL a cechami klinicznymi pacjentów oraz parametrami patologicznymi ccRCC. Dodatkowo postanowiono dokonać analizy zależności cech klinicznych pacjentów w odniesieniu do parametrów patologicznych raka jasnokomórkowego nerki.

**Material i metody:** Kryteria kwalifikacji do badań spełniło 100 pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki poddanych leczeniu zabiegowemu (nefrektomia lub NNS). DNA izolowano z tkanki guza oraz krwi obwodowej z wykorzystaniem metody wysalania. Amplifikację trzech egzonów genu VHL przeprowadzono przy pomocy PCR. Produkty PCR rozdzielano na żelu agarozowym stosując elektroforezę. Oczyszczone produkty PCR sekwencjonowano. Wyniki sekwencjonowania odczytywano w programie FinchTV. Dokładną analizę sekwencji wykonano przy użyciu programu CLS Sequence Viewer. Sekwencje genu VHL zawierające delecje lub insercje wynoszące ponad 10 par zasad były poddane klonowaniu.

**Wyniki:** Stwierdzono mutacje u 55% (n = 53) pacjentów, z czego u 2 pacjentów były to mutacje germinalne. Rozmieszczenie mutacji przedstawiało się następująco: 53% (n = 28) w egzonie 1, 25% (n = 13) w egzonie 2 i 23% (n = 12) w egzonie 3. Mutacje z przesunięciem ramki odczytu stanowiły 66% (n = 35), mutacje punktowe 30% (n = 16) a łączne występowanie obu rodzajów mutacji zaobserwowano w 4% prób. Zidentyfikowano 25 nowych mutacji genu VHL. Wykazano istotną zależność pomiędzy

wiekem a obecnością mutacji w genie VHL ( $p = 0,0330$ ). W grupie pacjentów z mutacją średnia wieku była istotnie wyższa niż w grupie pacjentów z prawidłową sekwencją genu VHL. Analizując wyniki stwierdzono, iż u pacjentów z mutacją istotnie częściej diagnozowano nadciśnienie tętnicze krwi niż u pacjentów z prawidłowym genem VHL ( $p = 0,0196$ ). Oceniając zależności pomiędzy lokalizacją mutacji a BMI zaobserwowano, że w grupie pacjentów z mutacją w egzonie 1 istotnie częściej stwierdzono nadwagę lub otyłość w porównaniu do pacjentów z mutacją w egzonie 2 lub egzonie 3 ( $p = 0,0220$ ). Badając zależności pomiędzy obecnością mutacji genu VHL a stopniem złośliwości nowotworu wykazano, iż w grupie osób z mutacją istotnie rzadziej rozpoznano ccRCC o wysokim stopniu złośliwości w porównaniu z grupą pacjentów bez mutacji ( $p = 0,0266$ ).

W wyniku szczegółowej analizy cech klinicznych pacjentów w odniesieniu do parametrów patologicznych stwierdzono występowanie statystycznie znamiennej zależności pomiędzy maksymalną oraz minimalną wielkością guza a: stopniem zaawansowania nowotworu ( $p < 0,0001$  oraz  $p = 0,0001$  odpowiednio dla wielkości maksymalnej oraz minimalnej), stopniem złośliwości nowotworu ( $p < 0,0001$  oraz  $p < 0,0001$ ), występowaniem u pacjentów dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku raka nerki ( $p = 0,0051$  oraz  $p = 0,0308$ ) oraz objawów, tj. krwiomoczu ( $p = 0,0339$  oraz  $p = 0,0257$ ), bólu w okolicy lędźwiowej ( $p = 0,0495$  oraz  $p = 0,0338$ ) oraz spadkiem masy ciała ( $p = 0,0003$  oraz  $p = 0,0006$ ).

Wykazano istotne zależności pomiędzy stopniem zaawansowania patologicznego a występowaniem objawów przed rozpoznaniem raka jasnokomórkowego nerki ( $p = 0,0125$ ) oraz spadkiem masy ciała ( $p = 0,0002$ ). Oceniając zależności pomiędzy występowaniem objawów przed rozpoznaniem raka nerki a stopniem zróżnicowania nowotworu zaobserwowano istotność statystyczną ( $p = 0,0003$ ). Analizując wyniki stwierdzono, iż wysoki stopień złośliwości nowotworu występował ponad dwukrotnie częściej u pacjentów palących niż niepalących, ( $p = 0,0366$ ); OR = 2.364; 95% CI (1.048 - 5.331). Stopień zaawansowania jest istotnie związany ze stopniem złośliwości nowotworu ( $p = 0,0006$ ). W grupie pacjentów z rakiem ograniczonym do nerki częściej występował rak jasnokomórkowy o niższym stopniu złośliwości niż w grupie pacjentów zaawansowanym miejscowo lub dającym przerzuty.



**Wnioski:** Wyniki niniejszej rozprawy sugerują występowanie istotnych statystycznie zależności pomiędzy obecnością mutacji genu VHL a parametrami klinicznymi pacjentów z ccRCC. Stwierdzono, iż u osób młodszych rzadziej występowały mutacje genu VHL. Zaobserwowano zależność pomiędzy stopniem złośliwości nowotworu a obecnością mutacji, paleniem papierosów, występowaniem objawów, wielkością guza oraz stopniem zaawansowania choroby nowotworowej. Istotnie częściej rozpoznano ccRCC o wysokim stopniu złośliwości u pacjentów z prawidłową sekwencją genu VHL, palących papierosy, zgłaszających objawy, z guzem nerki o większych wymiarach oraz z rakiem zaawansowanym miejscowo lub dającym przerzuty.

## 8. Streszczenie w języku angielskim.

### **VHL gene mutations in patients with ccRCC representing the population of Western Poland**

#### **Abstract**

##### **Background:**

Kidney cancer accounts for 2 to 3 percent of all cancers. The most common histological type of cancer is clear cell renal cell carcinoma ccRCC (70 - 80%). The discovery of the VHL gene contributed to the understanding of the biology of ccRCC. It is commonly believed that a mutation in the VHL gene predisposes to the formation of ccRCC, both sporadic and the one occurring in families with von Hippel – Lindau disease. Discovery of the role of the VHL protein in the regulation of cellular response to hypoxia, dependent on transcription factor HIF $\alpha$  contributed to the development of targeted therapy of ccRCC. Many medical centers worldwide conduct studies to determine whether mutations in the VHL gene may be a prognostic factor in patients with ccRCC and specific biomarker.

##### **Purpose:**

To determine the frequency, type and location of mutations in the VHL gene. Then, to evaluate the relationships between mutations in the VHL gene and clinical features of patients and pathological parameters of ccRCC. Additionally, we decided to analyze the clinical characteristics of patients with reference to the pathological parameters of the ccRCC.

##### **Experimental design:**

100 patients with ccRCC who underwent kidney surgery (nephrectomy or NNS) have met the eligibility criteria for the study. DNA was isolated from the tumor tissue and peripheral blood using the salting-out method. Amplification of the three exons of the VHL gene was conducted using PCR. PCR products were separated on the agarose gel using electrophoresis. Purified PCR products were then sequenced. The sequencing

results were read in the FinchTV application. The precise sequence analysis was performed using the CLS Sequence Viewer. VHL gene sequences containing deletions or insertions of more than 10 base pairs were cloned.

**Results:**

Mutations were found in 55% (n = 53) of patients of which in 2 patients there were germline mutations. Location of mutations were as follows: 53% (n = 28) in exon 1, 25% (n = 13) in exon 2 and 23% (n = 12) in exon 3. Mutations of frameshift constituted 66% (n = 35), 30% (n = 16) point mutations and the joint presence of both types of mutations were observed in 4% of the VHL gene. 25 new mutations in the VHL gene were identified. The study proved a significant correlation between age and the presence of mutations in the VHL gene (p = 0.0330). In a group of patients with mutations the average age was significantly higher than in a group of patients with proper VHL gene sequence. Analysis of the results showed that patients with mutation were diagnosed with hypertension significantly more often than patients with proper VHL gene (p = 0.0196). Assessment of the relationship between the location of mutations and BMI showed that in the group of patients with mutations in exon 1 the patients were significantly more often overweight or obese compared to the patients with mutations in exon 2 or exon 3 (p = 0.0220). Examination of the relationship between the presence of mutations in the VHL gene and grade has proved that ccRCC with a high grade was identified significantly more seldom in the group of patients with mutation compared to patients without mutation (p = 0.0266).

Detailed analysis of the clinical characteristics of patients in relation to pathological parameters showed statistically significant relationship between the maximum and the minimum size of a tumor and: tumor stage p <0.0001 and p = 0.0001 (for the maximum and the minimum size respectively), cancer grade p <0.0001 and p <0.0001, the presence of a positive family history toward kidney cancer p = 0.0051 and p = 0.0308, and symptoms such as hematuria p = 0.0339 and p = 0.0257, flank pain, p = 0.0495 and p = 0.0338, and a weight loss p = 0.0003 and p = 0.0006.

The study demonstrated significant correlation between staging and incidence of pathological symptoms before the diagnosis of ccRCC (p = 0.0125) and a weight loss (p = 0.0002). Assessment of the relationship between the appearance of symptoms before the diagnosis of kidney cancer and stage showed statistical significance at the level of (p = 0.0003). Analysis showed also that a high grade occurred more than twice

as frequently in smokers than non-smokers ( $p = 0.0366$ ), OR = 2.364, 95% CI (1.048 - 5.331). Stage is significantly related to grade ( $p = 0.0006$ ). In patients with cancer limited to kidney ccRCC is more frequent with a lower grade than in patients with ccRCC locally advanced or metastatic.

**Conclusions:**

The results of this study suggest statistically significant relationship between the presence of mutations in the VHL gene and the clinical parameters in patients with ccRCC. The study demonstrated less frequent mutations in the VHL gene in younger patients. It showed relationship between cancer grade and mutations, smoking cigarettes, symptoms, tumor size and stage. The high grade ccRCC was diagnosed significantly more often in patients with VHL proper gene sequence, smokers, those who reported symptoms, with kidney tumor of larger size and also a locally advanced cancer or a metastatic one.

## 9. Spis tabel.

1. Histologiczna klasyfikacja raka nerki.....	12
2. Klasyfikacja TNM z 2009 roku.....	13
3. Stopień zaawansowania klinicznego raka nerki.....	13
4. Charakterystyka typów zespołu von Hippel – Lindau.....	29
5. Wytyczne EAU do terapii pierwszego i drugiego rzutu u pacjentów z przerzutowym rakiem jasnokomórkowym nerki.....	35
6. Podział pacjentów do grup ryzyka według Motzer’a.....	35
7. Typy histologiczne nowotworów nerki 120 operowanych pacjentów.....	40
8. Wykaz stosowanych odczynników.....	42
9. Wykaz stosowanych urządzeń.....	43
10. Startery przeznaczone do analizy mutacji genu VHL.....	46
11. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji egzonu 1.....	47
12. Warunki reakcji PCR dla egzonu 1.....	47
13. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji egzonu 2 i 3.....	48
14. Warunki reakcji PCR dla egzonu 2 i 3.....	48
15. Startery przeznaczone do amplifikacji genu amelogeniny.....	48
16. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji dla genu amelogeniny....	49
17. Warunki reakcji PCR dla genu amelogeniny.....	49
18. Przygotowanie produktu PCR do klonowania.....	51
19. Mieszanina reakcyjna zawierająca wektor i ligazę DNA.....	52
20. Charakterystyka grupy badanej pod względem występowania czynników ryzyka RCC.....	55
21. Rozkład chorób współistniejących z ccRCC u 99 pacjentów.....	57
22. Rozkład liczbowy i procentowy typów nowotworów złośliwych u krewnych pacjentów zakwalifikowanych do niniejszej pracy.....	59
23. Klasyfikacja oceny stopnia zaawansowania guza nerki 100 pacjentów wg klasyfikacji TNM z 2009 roku.....	61
24. Zebrane dane dotyczące mutacji w grupie badanej.....	69
25. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi.....	90

26. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a stopniem złośliwości nowotworu.....	91
27. Test niezależności $\chi^2$ : brak istotnych zależności pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu.....	92
28. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy przewidywaną funkcjonalnością białka VHL a występowaniem nadciśnienia tętniczego krwi.....	95
29. Test niezależności $\chi^2$ : brak istotnej zależności pomiędzy przewidywaną funkcjonalnością pVHL a stopniem złośliwości nowotworu.....	96
30. Test niezależności $\chi^2$ : zależność pomiędzy występowaniem typu mutacji (somaticzna lub germinalna) a stężeniem kreatyniny.....	96
31. Test niezależności $\chi^2$ : zależność pomiędzy występowaniem nadwagi i otyłości a lokalizacją mutacji w poszczególnych egzonach genu VHL.....	97
32. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a BMI.....	99
33. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a występowaniem objawów.....	99
34. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a występowaniem bólu w okolicy lędźwiowej...100	100
35. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy typem mutacji genu VHL (mutacja punktowa/ frameshift) a dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku chorób nerek.....	100

## 10. Spis rycin.

1. A. Schemat fragmentu kory nerki zawierający budowę nefronu; B. Zdjęcie przedstawiające nerkę z rakiem jasnokomórkowym.....	9
2. USG nerki. Widoczny guz górnego bieguna nerki prawej.....	15
3. TK jamy brzusznej. Widoczny guz nerki prawej. Stan po nefrektomii lewostronnej z powodu ccRCC.....	15
4. Budowa genu VHL i białka VHL.....	24
5. Interakcja białka VHL (pVHL) z czynnikiem transkrypcyjnym HIF $\alpha$ .....	26
6. Etapy powstawania raka nerki w sporadycznym RCC zależnym do VHL oraz w chorobie von Hippel – Lindau.....	27
7. Rozkład 1244 mutacji somatycznych genu VHL.....	31
8. Molekularne cele współczesnej terapii przerzutowego ccRCC.....	34
9. Rodzaj leczenia operacyjnego.....	39
10. Proces kwalifikacji pacjentów.....	40
11. Mapa wektora pJET1.2/bunt.....	52
12. Objawy występujące u 30 pacjentów przed rozpoznaniem raka jasnokomórkowego nerki.....	56
13. Typy nowotworów złośliwych u 9 pacjentów przed rozpoznaniem u nich ccRCC.....	58
14. Choroby nerek występujące u krewnych I-go i II-go stopnia pacjentów z ccRCC.....	59
15. Podział pacjentów na trzy grupy w zależności od stopnia zaawansowania choroby nowotworowej.....	61
16. Klasyfikacja oceny stopnia zróżnicowania nowotworu wg Furhman'a.....	62
17. Reprezentatywny chromatogram prawidłowej sekwencji genu VHL.....	63
18. Chromatogram przedstawiający mutację punktową w genie VHL. Część sekwencji egzonu1.....	63
19. Chromatogram przedstawiający mutację z przesunięciem ramki odczytu w genie VHL. Część sekwencji egzonu 1.....	64
20. Częstość mutacji w genie VHL. Na niebiesko zaznaczono pacjentów u których stwierdzono mutacje w genie VHL.....	64
21. Procentowy i liczbowy rozkład pacjentów, u których stwierdzono mutacje odpowiednio w pierwszym, drugim i trzecim egzonie.....	65

22. Procentowy i liczbowy rozkład pacjentów w zależności od typu mutacji stwierdzonej w genie VHL.....	66
23. Wynik analizy wpływu mutacji (nr 01-028 ) na pVHL.....	67
24. Podział pacjentów ze względu na przewidywaną funkcjonalność białka VHL.....	68
25. Maksymalna wielkość guza w grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa.....	72
26. Minimalna wielkość guza w grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa.....	72
27. Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów z RCC o niskim stopniu złośliwości 1 + 2 (n = 51) oraz w grupie z RCC o wysokim stopniu złośliwości 3 + 4 (n = 49). Test U Manna – Whitneya.....	73
28. Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów z RCC o niskim stopniu złośliwości 1 + 2 (n = 51) oraz w grupie z RCC o wysokim stopniu złośliwości 3 + 4 (n = 49). Test U Manna – Whitneya.....	74
29. Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów bez krwimoczem (n = 90) oraz w grupie pacjentów z krwimoczem (n = 10). Test U Manna – Whitneya.....	75
30. Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów bez krwimoczem (n = 90) oraz w grupie pacjentów z krwimoczem (n = 10). Test U Manna – Whitneya.....	75
31. Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów bez bólu w okolicy lędźwiowej (n = 83) oraz w grupie pacjentów z bólem w okolicy lędźwiowej (n = 17). Test U Manna – Whitneya.....	76
32. Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów bez bólu w okolicy lędźwiowej (n = 83) oraz w grupie pacjentów z bólem w okolicy lędźwiowej (n = 17). Test U Manna – Whitneya.....	76
33. Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów bez spadku masy ciała (n = 94) oraz w grupie pacjentów ze spadkiem masy ciała (n = 6). Test U Manna – Whitneya.....	77
34. Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów bez spadku masy ciała (n = 94) oraz w grupie pacjentów ze spadkiem masy ciała (n = 6). Test U Manna – Whitneya.....	78
35. Maksymalna wielkość guza w grupie pacjentów z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 94) oraz w grupie pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 5). Test U Manna – Whitneya.....	79
36. Minimalna wielkość guza w grupie pacjentów z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 94) oraz w grupie pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku RCC (n = 5). Test U Manna – Whitneya.....	79
37. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego a stopniem złośliwości nowotworu.....	81
38. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu a występowaniem objawów.....	82



39. Test Fishera – Freemana - Haltona: istotna zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego a występowaniem spadku masy ciała.....	83
40. Wiek w poszczególnych grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa.....	84
41. Stężenie hemoglobiny w surowicy krwi w poszczególnych grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa.....	85
42. Stężenie kreatyniny w surowicy krwi w poszczególnych grupach pacjentów. Test Kruskala – Wallisa.....	85
43. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem złośliwości nowotworu a paleniem tytoniu.....	87
44. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem złośliwości a występowaniem objawów.....	88
45. Test niezależności $\chi^2$ : zależność pomiędzy stopniem złośliwości a występowaniem krwimoczem.....	88
46. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy stopniem złośliwości a zgłaszaniem bólu w okolicy lędźwiowej przez pacjentów.....	89
47. Wiek w grupie pacjentów z mutacją genu VHL (n = 53) oraz w grupie bez mutacji genu VHL (n = 43). Test U Manna – Whitneya.....	90
48. Test niezależności $\chi^2$ : istotna zależność pomiędzy obecnością mutacji w genie VHL a stopniem złośliwości nowotworu wg klasyfikacji Fuhrmana.....	91
49. Wielkość maksymalna guza w grupie pacjentów bez mutacji w genie VHL (n = 43) oraz w grupie pacjentów z mutacją w genie VHL (n = 53). Test U Manna – Whitneya.....	93
50. Wielkość minimalna guza w grupie pacjentów bez mutacji w genie VHL (n = 43) oraz w grupie pacjentów z mutacją w genie VHL (n = 53). Test U Manna – Whitneya.....	93
51. Wiek w grupie pacjentów z przewidywaną zaburzoną funkcją białka VHL (n = 49) oraz w grupie pacjentów z prawidłową funkcją białka VHL (n = 47). Test U Manna – Whitneya.....	95

**11. Piśmiennictwo.**

1. [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics\\_explained/index.php/Causes\\_of\\_death\\_statistics/pl](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Causes_of_death_statistics/pl) Dane\_statystyczne\_dotyczące\_przyczyn\_zgonu
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. <http://globocan.iarc.fr>.
3. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013 Mar 1;132(5):1133-45.
4. Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int*. 2008 Apr;101(8):949-58.
5. Krajowa Baza Danych Nowotworowych Zakładu Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut w Warszawie. <http://www.onkologia.org.pl/pl/p/7>
6. Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun A: The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol* 2001; 166: 1611-1623.
7. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114:101–108.
8. Lipworth L, Tarone RE, Lund L, McLaughlin JK. Epidemiologic characteristics and risk factors for renal cell cancer. *Clin Epidemiol*. 2009 Aug 9;1:33-43.
9. Bergström A, Hsieh CC, Lindblad P, Lu CM, Cook NR, Wolk A. Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *Br J Cancer*. 2001 Sep 28;85(7):984-90.
10. Hu J, Mao Y, White K: Diet and vitamin or mineral supplements and risk of renal cell carcinoma in Canada. *Cancer Causes Control* 2003;14(8):705–714.
11. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Becker N, Linseisen J, Trichopoulou A, Mountokalakis T, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Verschuren WM, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, González CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Allen N, Roddam A, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Ferrari P, Norat T, Riboli E. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. 2008 Feb 15;167(4):438-46.

12. Heath CW Jr, Lally CA, Calle EE, et al. Hypertension, diuretics, and antihypertensive medications as possible risk factors for renal cell cancer. *Am J Epidemiol.* 1997;145:607–613.
13. Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, Mellempgaard A, Helmert U, Lindblad P, McCredie M, Adami HO: International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer* 1995;61:601–605.
14. Sali D, Boffetta P: Kidney cancer and occupational exposure to asbestos: a meta-analysis of occupational cohort studies. *Cancer Causes Control* 2000;11(1):37–47.
15. Heck JE, Charbotel B, Moore LE, Karami S, Zaridze DG, Matveev V, Janout V, Kollárová H, Foretova L, Bencko V, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Mates D, Ferro G, Chow WH, Rothman N, Stewart P, Brennan P, Boffetta P. Occupation and renal cell cancer in Central and Eastern Europe. *Occup Environ Med.* 2010 Jan;67(1):47-53.
16. Travis LB, Curtis RE, Storm H, Hall P, Holowaty E, Van Leeuwen FE, Kohler BA, Pukkala E, Lynch CF, Andersson M, Bergfeldt K, Clarke EA, Wiklund T, Stoter G, Gospodarowicz M, Sturgeon J, Fraumeni Jr JF, Boice Jr JD: Risk of second malignant neoplasms among long-term survivors of testicular cancer [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(19): 1429–1439.
17. Lindblad P.: Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scandinavian Journal of Surgery* 93: 88–96, 2004
18. Noordzij MA, Mickisch GH. The genetic make-up of renal cell tumors. *Urol Res.* 2004;32:251–254.
19. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Zbar B, Linehan WM. Hereditary renal cancers. *Radiology.* 2003;226:33–46.
20. Störkel S, Ebie JN, Adlakha K, et al: Classification of renal cell carcinoma: Workgroup no 1 Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80:987-989.
21. Renshaw AA: Subclassification of renal cell neoplasms: an update for the practising pathologist. *Histopathology.* 2002 Oct;41(4):283-300.
22. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;6(7):655-63.
23. Barrisford GW, Singer EA, Rosner IL, Linehan WM, Bratslavsky G. Familial renal cancer: molecular genetics and surgical management. *Int J Surg Oncol.* 2011;2011:658767.

24. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* 1969; Mar;101(3):297-301.
25. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C (eds). *TNM classification of malignant tumors.* UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009: pp. 255-257.
26. Lee CT, Katz J, Fearn PA, et al. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol* 2002 Jul-Aug;7(4):135-40.
27. Novick AC, Bukowski RM, Campbell SC. Renal tumours. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AV, Peters CA (eds). *Campbell-Walsh Urology.* Philadelphia: WB Saunders, 2007: pp. 1565-638.
28. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003 Aug;44(2):226-32.
29. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
30. Flanigan RC, Campbell SC, Clark JI, Picken MM. Metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2003 Oct;4(5):385-90.
31. Terada T: Cutaneous metastasis of renal cell carcinoma: a report of two cases. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(2):175-8.
32. Michalec J. Objawy kliniczne guza nerki w Nowotwory i torbiele nerek. Red. Borkowski A, Czaplicki M. *PZWL* 2002. 115-117.
33. Israel GM, Bosniak MA. How I do it: evaluating renal masses. *Radiology* 2005 Aug;236(2):441-50.
34. Leung AC, Ghavamian R. Advances in the staging of renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002 Dec;2(6):673-80.
35. Mickisch GH. Principles of nephrectomy for malignant disease. *BJU Int.* 2002 Mar;89(5):488-95.
36. Portis AJ, Yan Y, Landman J, Chen C, Barrett PH, Fentie DD, Ono Y, McDougall EM, Clayman RV. Long-term followup after laparoscopic radical nephrectomy. *J Urol.* 2002 Mar;167(3):1257-62.
37. Kuczyk M, Münch T, Machtens S, et al. The need for routine adrenalectomy during surgical treatment for renal cell cancer: the Hannover experience. *BJU Int* 2002 Apr;89(6):517-22.

38. Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F, et al. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes: role of lymph node dissection. *J Urol* 2003;169:2076–83.
39. Canfield SE, Kamat AM, Sa´nchez-Ortiz RF, Detry M, Swanson DA, Wood CG. Renal cell carcinoma with nodal metastases in the absence of distant metastatic (clinical stage TxN1-2M0): the impact of aggressive surgical resection on patient outcome. *J Urol* 2006;175:864–9.
40. Blom JH, van Poppel H, Maréchal JM, et al; EORTC Genitourinary Tract Cancer Group. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881. *Eur Urol* 2009 Jan;55(1):28-34.
41. Jocham D, Richter A, Hoffmann L, et al. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 2004 Feb;363(9409):594-9.
42. Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, et al. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol* 2004 Mar;171(3):1071-6.
43. Herr HW A history of partial nephrectomy for renal tumors. *J Urol*. 2005 Mar;173(3):705-8.
44. Peycelon M, Hupertan V, Comperat E, et al. Long-term outcomes after nephron sparing surgery for renal cell carcinoma larger than 4 cm. *J Urol* 2009 Jan;181(1):35-41.
45. Delakas D, Karyotis I, Daskalopoulos G, et al. Nephron-sparing surgery for localized renal cell carcinoma with a normal contralateral kidney: a European three-center experience. *Urology* 2002 Dec;60(6):998-1002.
46. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. *J Urol* 2004;171:1066-70.
47. Huang WC, Levey AS, Serio AM, et al. Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: A retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2006;7:735-40.
48. Thompson RH, Boorjian SA, Lohse CM, et al. Radical nephrectomy for pT1a renal masses may be associated with decreased overall survival compared with partial nephrectomy. *J Urol* 2008;179:468-71; discussion 472-3.

49. Ljungberg B, Cowan N, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PFA, Patard J-J, Sinescu IC. Guidelines on Renal Cell Carcinoma. European Association of Urology 2012 update april 2010.
50. Marszalek M, Meixl H, Polajnar M, et al. Laparoscopic and open partial nephrectomy: a matched-pair comparison of 200 patients. *Eur Urol* 2009 May;55(5):1171-8.
51. Lane BR, Novick AC, Babineau D, et al. Comparison of laparoscopic and open partial nephrectomy for tumor in a solitary kidney. *J Urol* 2008 Mar;179(3):847-51; discussion 852.
52. Gill IS, Kavoussi LR, Lane BR, et al. Comparison of 1,800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors. *J Urol* 2007 Jul;178(1):41-6.
53. Benway BM, Bhayani SB, Rogers CG, et al. Robot assisted partial nephrectomy versus laparoscopic partial nephrectomy for renal tumors: a multi-institutional analysis of perioperative outcomes. *J Urol* 2009 Sep;182(3):866-72.
54. Dev HS, Sooriakumaran P, Stolzenburg JU, Anderson CJ Is robotic technology facilitating the minimally invasive approach to partial nephrectomy? *BJU Int.* 2012 Mar;109(5):760-8.
55. Minervini A, Siena G, Carini M. Robotic-assisted partial nephrectomy: the next gold standard for the treatment of intracapsular renal tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011 Dec;11(12):1779-82.
56. Dobruch J, Borówka A, Szostek P, Chłosta P, Antoniewicz AA. Małoinwazyjne metody leczenia chirurgicznego guzów nerki – część II. *Urologia Polska* 2008/61/2.
57. Johnson DB, Solomon SB, Su LM, Matsumoto ED, Kavoussi LR, Nakada SY, Moon TD, Shingleton WB, Cadeddu JA. Defining the complications of cryoablation and radio frequency ablation of small renal tumors: a multi-institutional review. *J Urol.* 2004 Sep;172(3):874-7.
58. Kunkle DA, Uzzo RG. Cryoablation or radiofrequency ablation of the small renal mass: a metaanalysis. *Cancer* 2008 Nov;113:2671-80.
59. Dominguez-Escrig JL, Sahadevan K, Johnson P. Cryoablation for small renal masses. *Adv Urol.* 2008:479495.
60. Aron M, Gill IS Minimally invasive nephron-sparing surgery (MINSS) for renal tumours. Part II: probe ablative therapy. *Eur Urol.* 2007 Feb;51(2):348-57. Epub 2006 Oct 27.

61. Jaroń B, Brzozowski K, Twarkowski P, Żukowski P. Embolizacja naczyń nerkowych jako część strategii kompleksowego leczenia chorych z rakiem nerki. *Współcz Onkol* (2005) vol. 9; 3 (89–91).
62. Maxwell NJ, Saleem Amer N, Rogers E, et al. Renal artery embolization in the palliative treatment of renal carcinoma. *Br J Radiol* 2007 Feb;80(950):96-102.
63. May M, Brookman-Amisshah S, Pflanz S, et al. Pre-operative renal arterial embolisation does not provide survival benefit in patients with radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Br J Radiol* 2009 Aug;82(981):724-31.
64. Kwias Z, Strzyżowski J, Sokołowski W. Obserwacje kliniczne po embolizacji w nowotworach nerek i pęcherza moczowego. *Urologia Polska* 1987; 40(3).
65. Kickuth R, Waldherr C, Hoppe H, et al. Interventional management of hypervascular osseous metastasis: role of embolotherapy before orthopedic tumor resection and bone stabilization. *AJR Am J Roentgenol* 2008 Dec;191(6):W240-7.
66. Spiess PE, Fishman MN. Cytoreductive nephrectomy vs medical therapy as initial treatment: a rational approach to the sequence question in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Control*. 2010 Oct;17(4):269-78. Review.
67. van der Poel HG, Roukema JA, Horenblas S, et al. Metastasectomy in renal cell carcinoma: A multicenter retrospective analysis. *Eur Urol* 1999;35(3):197-203.
68. Cutuli BF, Methlin A, Teissier E, Schumacher C, Jung GM. Radiation therapy in the treatment of metastatic renal-cell carcinoma. *Prog Clin Biol Res*. 1990;348:179-86.
69. Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW, et al. Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet* 2004 May;363(9422):1665-72.
70. Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol*. 1995 Feb;22(1):42-60.
71. Milowsky MI, Nanus DM. Chemotherapeutic strategies for renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am*. 2003 Aug;30(3):601-9.
72. Fojo AT, Shen DW, Mickley LA, Pastan I, Gottesman MM. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J Clin Oncol*. 1987 Dec;5(12):1922-7.

73. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. *Lancet*. 1999 Jan 2;353(9146):14-7.
74. Negrier S, Perol D, Ravaud A, Chevreau C, Bay JO, Delva R, Sevin E, Caty A, Escudier B; For The French Immunotherapy Intergroup. Medroxyprogesterone, interferon alfa-2a, interleukin 2, or combination of both cytokines in patients with metastatic renal carcinoma of intermediate prognosis: results of a randomized controlled trial. *Cancer*. 2007 Dec 1;110(11):2468-77.
75. Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH, Bukowski RM, Mueller-Berghaus J, Kirkwood JM, Kwok WW, Storkus WJ. Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med*. 2002 Sep 2;196(5):619-28.
76. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1957 Sep 12;147(927):258-67.
77. Graham SD. Interferon. W. Borkowski A. (red.) AUA Update Series 1997; Lekcja 39: 322.
78. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, et al. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002 Jan;20(1):289-96.
79. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, Bukowski R. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 1;23(4):832-41.
80. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 1976 Sep 10;193(4257):1007-8.
81. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*. 1982 Jun 1;155(6):1823-41.
82. Lotze MT, Matory YL, Ettinghausen SE, Rayner AA, Sharrow SO, Seipp CA, Custer MC, Rosenberg SA. In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J Immunol*. 1985 Oct;135(4):2865-75.



83. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993 Apr;21(85):622-32.
84. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 1995 Mar;13(3):688-96.
85. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005 Jan;23(1):133-41.
86. Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol* 2003 Aug;21(16):3127-32.
87. Alexander RB, Walter MM. Immunoterapia raka jasnokomórkowego nerki: doświadczenia z Kliniki Chirurgii National Cancer Institute. w Borkowski A (red.) *AUA Update Series* 1997; Lekcja 40:330-339.
88. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C, Ravaud A, Mercatello A, Peny J, Mousseau M, Philip T. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 1998 Apr 30;338(18):1272-8.
89. Lopez Hänninen E, Kirchner H, Atzpodien J.
90. Negrier S, Caty A, Lesimple T, Douillard JY, Escudier B, Rossi JF, Viens P, Gomez F. Treatment of patients with metastatic renal carcinoma with a combination of subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa with or without fluorouracil. *J Clin Oncol*. 2000 Dec 15;18(24):4009-15.
91. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, Haines J, Yuen JW, Collins D, Majoor-Krakauer D, et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*. 1988 Mar 17;332(6161):268-9.
92. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Linehan W.M., Zbar B., Lerman M.I et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. 1993 May 28;260(5112):1317-20.

93. Richards FM, Schofield PN, Fleming S, Maher ER. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet.* 1996 May;5(5):639-44.
94. Kessler PM, Vasavada SP, Rackley RR, Stackhouse T, Duh FM, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Williams BR. Expression of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene, VHL, in human fetal kidney and during mouse embryogenesis. *Mol Med.* 1995 May;1(4):457-66.
95. Richards FM. Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Expert Rev Mol Med.* 2001 Mar 19;2001:1-27.
96. Woodward ER, Buchberger A, Clifford SC, Hurst LD, Affara NA, Maher ER. Comparative sequence analysis of the VHL tumor suppressor gene. *Genomics.* 2000 May 1;65(3):253-65.
97. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Oct 1;93(20):10595-9.
98. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, et al. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:12436-12441.
99. Stebbins CE, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science.* 1999 Apr 16;284(5413):455-61.
100. Lee S, Neumann M, Stearman R, Stauber R, Pause A, Pavlakis GN, Klausner RD. Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol.* 1999 Feb;19(2):1486-97.
101. Shiao YH, Resau JH, Nagashima K, Anderson LM, Ramakrishna G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor targets to mitochondria. *Cancer Res.* 2000 Jun 1;60(11):2816-9.
102. Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG Jr. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Sep 29;95(20):11661-6.
103. Lolkema MP, Gervais ML, Snijckers CM, Hill RP, Giles RH, Voest EE, Ohh M. Tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):22205-11.

104. Calzada MJ, Esteban MA, Feijoo-Cuaresma M, Castellanos MC, Naranjo-Suárez S, Temes E, Méndez F, Yáñez-Mo M, Ohh M, Landázuri MO. von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1553-60.
105. Clark PE, Cookson MS. The von Hippel-Lindau gene: turning discovery into therapy. *Cancer.* 2008 Oct 1;113(7 Suppl):1768–1778.
106. Zielonka TM. Angiogeneza. Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia*, 2004, 9(1),25-31.
107. George DJ, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *N Engl J Med.* 2003 Jul 31;349(5):419-21.
108. 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.
109. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med.* 1995 Aug;1(8):822-6.
110. Inoue H, Nonomura N, Kojima Y, Shiba M, Oka D, Arai Y, Nakayama M, Takayama H, Nishimura K, Mori H, Okuyama A. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease gene in renal carcinomas occurring in patients with long-term dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Jul;22(7):2052-5. Epub 2007 Apr 16.
111. Klatte T, Rao PN, de Martino M, LaRochelle J, Shuch B, Zomorodian N, Said J, Kabbinar FF, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009 Feb 10;27(5):746-53.
112. Iliopoulos O. Molecular Biology of Renal Cell Cancer and the Identification of Therapeutic Targets. *J Clin Oncol* 2006, 24:5593-5600.
113. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. 68, No. 4, pp. 820-823, April 1971.
114. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2005 Dec 8;353(23):2477-90.
115. Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF, Lolkema MP, van Brussel A, Voest EE, Giles RH. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat.* 2010 May;31(5):521-37.
116. Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, Crossey PA, Webster AR, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Brauch H, Glavac D, Neumann

- HP, Tisherman S, Mulvihill JJ, Gross DJ, Shuin T, Whaley J, Seizinger B, Kley N, Olschwang S, Boisson C, Richard S, Lips CH, Lerman M, et al. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat.* 1996;8(4):348-57.
117. Brauch H, Kishida T, Glavac D, Chen F, Pausch F, Höfler H, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Neumann HP. Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet.* 1995 May;95(5):551-6.
118. Neumann HP, Wiestler OD. Clustering of features and genetics of von Hippel-Lindau syndrome. *Lancet.* 1991 Jul 27;338(8761):258.
119. Maher ER, Iselius L, Yates JR, Littler M, Benjamin C, Harris R, Sampson J, Williams A, Ferguson-Smith MA, Morton N. Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet.* 1991 Jul;28(7):443-7.
120. Cybulski C, Krzysztofik K, Lubiński J. Choroba von Hippel – Lindau w Nowotwory dziedziczne 2002. Profilaktyka, diagnostyka, leczenie. Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2002. 110-119
121. Barontini M, Dahia PL. VHL disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;24(3):401-13.
122. Chen F, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean M, Gnarr JR, Orcutt ML, Glenn G, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat.* 1995;5(1):66-75.
123. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Dec 15;22(24):4991-5004. Review.
124. Chen F, Slife L, Kishida T, Mulvihill J, Tisherman SE, Zbar B. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau disease: identification of a mutation associated with VHL type 2A. *J Med Genet.* 1996 Aug;33(8):716-7.
125. Crossey PA, Eng C, Ginalska-Malinowska M, Lennard TW, Wheeler DC, Ponder BA, Maher ER. Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease in familial pheochromocytoma. *J Med Genet.* 1995 Nov;32(11):885-6.
126. Young AC, Craven RA, Cohen D, Taylor C, Booth C, Harnden P, Cairns DA, Astuti D, Gregory W, Maher ER, Knowles MA, Joyce A, Selby PJ, Banks RE. Analysis of VHL Gene Alterations and their Relationship to Clinical Parameters in Sporadic Conventional Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Dec 15;15(24):7582-7592. Epub.

127. Prowse AH, Webster AR, Richards FM, Richard S, Olschwang S, Resche F, Affara NA, Maher ER. Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am J Hum Genet.* 1997 Apr;60(4):765-71.
128. Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rödl H, Eichinger M, Feurer M, Weidt E, Puranakanitstha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Störkel S, Rotter M, Masera A, Gugeler N, Decker HJ. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1942-8.
129. Foster K, Prowse A, van den Berg A, Fleming S, Hulsbeek MM, Crossey PA, Richards FM, Cairns P, Affara NA, Ferguson-Smith MA, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet.* 1994 Dec;3(12):2169-73.
130. Shuin T, Kondo K, Torigoe S, Kishida T, Kubota Y, Hosaka M, Nagashima Y, Kitamura H, Latif F, Zbar B, et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):2852-5.
131. van Houwelingen KP, van Dijk BA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Schouten LJ, Gorissen HJ, Schalken JA, van den Brandt PA, Oosterwijk E. Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands cohort study. *BMC Cancer.* 2005 Jun 2;5:57.
132. Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, Miura T, Moriyama M, Nagashima Y, Nakatani Y, Kubota Y, Kondo K. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Oct 16;94(20):1569-75.
133. Morris MR, Maina EN, Morgan NV, Gentle D, Astuti D, Moch H, Kishida T, Yao M, Schraml P, Richards FM, Latif F, Maher ER. Molecular genetic analysis of FH-1, FH, and SDHB candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:706–711.
134. Foster RE, Abdulrahman M, Morris MR, Prigmore E, Gribble S, Ng B, Gentle D, Ready S, Weston PM, Wiesener MS, Kishida T, Yao M, Davison V, Barbero JL, Chu C, Carter NP, Latif F, Maher ER. Characterization of a 3;6 translocation associated with renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007 Apr;46(4):311-7.

135. Ramana J Dr. RCDB: Renal Cancer Gene Database. *BMC Res Notes*. 2012 May 18;5(1):246.
136. Smaldone MC, Maranchie JK. Clinical implications of hypoxia inducible factor in renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2009 May-Jun;27(3):238-45. Review.
137. Żołnierek J, Wysocki P, Nurzyński P. Leczenie farmakologiczne chorych na raka nerki z przerzutami. *Przegląd Urologiczny* 2007/8/5 (45)
138. Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 10;24(35):5601-8. Review.
139. Audenet F, Yates DR, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Rouprêt M. Genetic pathways involved in carcinogenesis of clear cell renal cell carcinoma: genomics towards personalized medicine. *BJU Int*. 2012 Jun;109(12):1864-70.
140. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2006 Apr;49(4):633-43. Epub 2006 Feb 2. Review.
141. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, et al. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002 Jan;20(1):289-96.
142. Huang D, Ding Y, Li Y, Luo WM, Zhang ZF, Snider J, Vandenbeldt K, Qian CN, Teh BT. Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):1053-62.
- Gossage L, Eisen T. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 May;7(5):277-88.
143. Gossage L, Eisen T. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 May;7(5):277-88.
144. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):134.
145. Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol* 2006; Dec;176(6 Pt 1):2353-8
146. Clague J, Lin J, Cassidy A, et al. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 Mar;18(3):801-7
147. Moore LE, Nickerson ML, Brennan P, Toro JR, Jaeger E, Rinsky J, Han SS, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M,

- Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Schmidt LS, Lenz P, Karami S, Linehan WM, Merino M, Chanock S, Boffetta P, Chow WH, Waldman FM, Rothman N. Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors. *PLoS Genet.* 2011 Oct;7(10):e1002312.
148. Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2163-72. Review.
149. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res.* 2008;14:4726–4734.
150. Cybulski C, Krzystolik K, Murgia A, Górski B, Lubiński J, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire VHL gene. *J Med Genet.* 2002 Jul;39(7):E38.
151. Cybulski C, Krzystolik K, Maher ER, Richard S, Kurzawski G, Gronwald J, Lubiński J. Long polymerase chain reaction in detection of germline deletions in the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene. *Hum Genet.* 1999 Oct;105(4):333-6.
152. Cybulski C, Matyjasik J, Soroka M, Szymaś J, Górski B, Debniak T, Jakubowska A, Bernaczyk A, Zimnoch L, Bierzyńska-Macyszyn G, Trojanowski T, Wierzbabobrowicz T, Prudlak E, Markowska-Wojciechowska A, Nowacki P, Roszkiewicz A, Kordek R, Szyłberg T, Matyja E, Zieliński K, Woźniewicz B, Taraszewska A, Kozłowski W, Lubiński J. Mutations in the von hippel-lindau tumour suppressor gene in central nervous system hemangioblastomas. *Hered Cancer Clin Pract.* 2004 Mar 15;2(2):93-7.
153. Krawczyk A, Hasse-Lazar K, Pawlaczek A, Szpak-Ulczok S, Krajewska J, Paliczka-Cieślak E, Jurecka-Lubieniecka B, Roskosz J, Chmielik E, Ziaja J, Cierpka L, Peczkowska M, Preibisz A, Januszewicz A, Otto M, Jarzab B. Germinal mutations of RET, SDHB, SDHD, and VHL genes in patients with apparently sporadic pheochromocytomas and paragangliomas. *Endokrynol Pol.* 2010 Jan-Feb;61(1):43-8.
154. Peczkowska M, Kowalska A, Sygut J, Waligórski D, Malinoc A, Janaszek-Sitkowska H, Prejbisz A, Januszewicz A, Neumann HP. Testing new

- susceptibility genes in the cohort of apparently sporadic pheochromocytoma/paraganglioma patients with clinical characteristics of hereditary syndromes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Apr 1.
155. Knauth K, Bex C, Jemth P, Buchberger A. Renal cell carcinoma risk in type 2 von Hippel-Lindau disease correlates with defects in pVHL stability and HIF-1alpha interactions. *Oncogene*. 2006 Jan 19;25(3):370-7.
156. Knauth K, Cartwright E, Freund S, Bycroft M, Buchberger A. VHL mutations linked to type 2C von Hippel-Lindau disease cause extensive structural perturbations in pVHL. *J Biol Chem*. 2009 Apr 17;284(16):10514-22.
157. Ong KR, Woodward ER, Killick P, Lim C, Macdonald F, Maher ER. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat*. 2007 Feb;28(2):143-9.
158. Kaelin WG Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):673-82. Review.
159. Delahunt B, Kittelson JM, McCredie MR, Reeve AE, Stewart JH, Bilous AM. Prognostic importance of tumor size for localized conventional (clear cell) renal cell carcinoma: assessment of TNM T1 and T2 tumor categories and comparison with other prognostic parameters. *Cancer*. 2002 Feb 1;94(3):658-64.
160. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2002 Dec 1;20(23):4559-66.
161. Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, Reuter V, Motzer R, Goetzl M, McKiernan J, Russo P. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*. 2005 Jan;173(1):48-51.
162. Schips L, Lipsky K, Zigeuner R, Salfellner M, Winkler S, Langner C, Rehak P, Pummer K, Hubner G. Impact of tumor-associated symptoms on the prognosis of patients with renal cell carcinoma: a single-center experience of 683 patients. *Urology*. 2003 Dec;62(6):1024-8. Review.
163. Sürer E, Baltacı S, Burgu B, Aydoğdu O, Göğüş C. Significance of Tumor Size in Renal Cell Cancer with Perinephric Fat Infiltration: Is TNM Staging System Adequate for Predicting Prognosis? *Urol J*. 2013 Winter;10(1):774-9.



164. Zhang C, Li X, Hao H, Yu W, He Z, Zhou L. The correlation between size of renal cell carcinoma and its histopathological characteristics: a single center study of 1867 renal cell carcinoma cases. *BJU Int.* 2012 Dec;110(11 Pt B):E481-5.
165. Turun S, Banghua L, Zheng S. Is tumor size a reliable predictor of histopathological characteristics of renal cell carcinoma? *Urol Ann.* 2012 Jan;4(1):24-8.
166. Tabibi A, Parvin M, Abdi H, Bashtar R, Zamani N, Abadpour B. Correlation between size of renal cell carcinoma and its grade, stage, and histological subtype. *Urol J.* 2007 Winter;4(1):10-3.
167. Beldegrun A, Tsui KH, deKernion JB, Smith RB. Efficacy of nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma: analysis based on the new 1997 tumor-node-metastasis staging system. *J Clin Oncol.* 1999 Sep;17(9):2868-75.
168. Gettman MT, Blute ML. Update on pathologic staging of renal cell carcinoma. *Urology.* 2002 Aug;60(2):209-17.
169. Harmer M. TNM classification of malignant tumors. 3rd ed. Geneva: International Union Against Cancer 1974.
170. Ornellas AA, Andrade DM, Ornellas P, Wisnescky A, de Santos Schwindt AB. Prognostic factors in renal cell carcinoma: analysis of 227 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *Int Braz J Urol.* 2012 Mar-Apr;38(2):185-94.
171. Ficarra V, Guillè F, Schips L, de la Taille A, Prayer Galetti T, Tostain J, Cindolo L, Novara G, Zigeuner R, Bratti E, Li G, Altieri V, Abbou CC, Zanolla L, Artibani W, Patard JJ. Proposal for revision of the TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005 Nov 15;104(10):2116-23.
172. Patard JJ, Dorey FJ, Cindolo L, Ficarra V, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Chopin DK, Figlin RA, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Symptoms as well as tumor size provide prognostic information on patients with localized renal tumors. *J Urol.* 2004 Dec;172(6 Pt 1):2167-71.
173. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de Kernion JB, Beldegrun A. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol.* 2000 Feb;163(2):426-30.
174. Luciani LG, Cestari R, Tallarigo C. Incidental renal cell carcinoma-age and stage characterization and clinical implications: study of 1092 patients (1982-1997). *Urology.* 2000 Jul;56(1):58-62.

175. Masood J, Lane T, Koye B, Vandal MT, Barua JM, Hill JT. Renal cell carcinoma: incidental detection during routine ultrasonography in men presenting with lower urinary tract symptoms. *BJU Int.* 2001 Nov;88(7):671-4.
176. Patard JJ, Leray E, Cindolo L, Ficarra V, Rodriguez A, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Guillé F, Chopin DK, Lobel B. Multi-institutional validation of a symptom based classification for renal cell carcinoma. *J Urol.* 2004 Sep;172(3):858-62.
177. Jalón Monzón A, Alvarez Múgica M, Fernández Gómez JM, Martín Benito JL, Martínez Gómez F, García Rodríguez J, González Alvarez RC, Regadera Sejas FJ. Renal cell carcinoma: prognostic factors and staging. *Arch Esp Urol.* 2007 Mar;60(2):125-36.
178. Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Rampal M, Coulange C. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer.* 1995 Dec 15;76(12):2543-9.
179. Colli JL, Busby JE, Amling CL. Renal cell carcinoma rates compared with health status and behavior in the United States. *Urology.* 2009 Feb;73(2):431-6.
180. Theis RP, Dolwick Grieb SM, Burr D, Siddiqui T, Asal NR. Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *BMC Cancer.* 2008 Dec 24;8:387.
181. Ray G, Henson DE, Schwartz AM. Cigarette smoking as a cause of cancers other than lung cancer: an exploratory study using the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Chest.* 2010 Sep;138(3):491-9.
182. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer.* 2005 Mar 10;114(1):101-8.
183. Tsivian M, Moreira DM, Caso JR, Mouraviev V, Polascik TJ. Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2027-31.
184. Parker A, Lohse C, Cheville J, Leibovich B, Igel T, Blute M. Evaluation of the association of current cigarette smoking and outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Int J Urol.* 2008 Apr;15(4):304-8.
185. Kroeger N, Klatte T, Birkhäuser FD, Rampersaud EN, Seligson DB, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Smoking negatively impacts renal

- cell carcinoma overall and cancer-specific survival. *Cancer*. 2012 Apr 1;118(7):1795-802.
186. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2010 May;7(5):245-57.
187. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1625-38.
188. Sawada N, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Yamaji T, Shimazu T, Tsugane S. Body mass index and subsequent risk of kidney cancer: a prospective cohort study in Japan. *Ann Epidemiol*. 2010 Jun;20(6):466-72.
189. Weikert S, Ljungberg B. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. *World J Urol*. 2010 Jun;28(3):247-52.
190. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Sep 20;92(18):1472-89.
191. Vainio H, Kaaks R, Bianchini F. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev*. 2002 Aug;11 Suppl 2:S94-100.
192. Klinghoffer Z, Yang B, Kapoor A, Pinthus JH. Obesity and renal cell carcinoma: epidemiology, underlying mechanisms and management considerations. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009 Jul;9(7):975-87.
193. Datta K, Nambudripad R, Pal S, Zhou M, Cohen HT, Mukhopadhyay D. Inhibition of insulin-like growth factor-I-mediated cell signaling by the von Hippel-Lindau gene product in renal cancer. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20700-6.
194. McGuire BB, Fitzpatrick JM. BMI and the risk of renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*. 2011 Sep;21(5):356-61.
195. Smits KM, Schouten LJ, Hudak E, Verhage B, van Dijk BA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Goldbohm RA, Oosterwijk E, van den Brandt PA. Body mass index and von Hippel-Lindau gene mutations in clear-cell renal cancer: Results of the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *Ann Epidemiol*. 2010 May;20(5):401-4.
196. Steffens J, Bock R, Braedel HU, Isenberg E, Bührle CP, Ziegler M. Renin-producing renal cell carcinomas--clinical and experimental investigations on a special form of renal hypertension. *Urol Res*. 1992;20(2):111-5.

197. Choi MY, Jee SH, Sull JW, Nam CM. The effect of hypertension on the risk for kidney cancer in Korean men. *Kidney Int.* 2005 Feb;67(2):647-52.
198. Vatten LJ, Trichopoulos D, Holmen J, Nilsen TI. Blood pressure and renal cancer risk: the HUNT Study in Norway. *Br J Cancer.* 2007 Jul 2;97(1):112-4.
199. Setiawan VW, Stram DO, Nomura AM, Kolonel LN, Henderson BE. Risk factors for renal cell cancer: the multiethnic cohort. *Am J Epidemiol.* 2007 Oct 15;166(8):932-40.
200. Heath CW Jr, Lally CA, Calle EE, McLaughlin JK, Thun MJ. Hypertension, diuretics, and antihypertensive medications as possible risk factors for renal cell cancer. *Am J Epidemiol.* 1997 Apr 1;145(7):607-13.
201. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF Jr, Järholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med.* 2000 Nov 2;343(18):1305-11.
202. Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control.* 2002 Apr;13(3):287-93.
203. Sharifi N, Farrar WL. Perturbations in hypoxia detection: a shared link between hereditary and sporadic tumor formation? *Med Hypotheses.* 2006;66(4):732-5.
204. Schouten LJ, van Dijk BA, Oosterwijk E, Hulsbergen-van de Kaa CA, Kiemeny LA, Goldbohm RA, Schalken JA, van den Brandt PA. Hypertension, antihypertensives and mutations in the Von Hippel-Lindau gene in renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study. *J Hypertens.* 2005 Nov;23(11):1997-2004.
205. Hes FJ, Slootweg PJ, van Vroonhoven TJ, Hené RJ, Feldberg MA, Zewald RA, Ploos van Amstel JK, Höppener JW, Pearson PL, Lips CJ. Management of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *Eur J Clin Invest.* 1999 Jan;29(1):68-75.
206. Ploussard G, Droupy S, Ferlicot S, Ples R, Rocher L, Richard S, Benoit G. Local recurrence after nephron-sparing surgery in von Hippel-Lindau disease. *Urology.* 2007 Sep;70(3):435-9.
207. Park BK, Kim CK, Park SY, Shen SH. Percutaneous radiofrequency ablation of renal cell carcinomas in patients with von Hippel Lindau disease: indications, techniques, complications, and outcomes. *Acta Radiol.* 2013 Feb 27.

208. Barrisford GW, Singer EA, Rosner IL, Linehan WM, Bratslavsky G. Familial renal cancer: molecular genetics and surgical management. *Int J Surg Oncol.* 2011;2011:658767.
209. Kondo K, Yao M, Yoshida M, Kishida T, Shuin T, Miura T, Moriyama M, Kobayashi K, Sakai N, Kaneko S, Kawakami S, Baba M, Nakaigawa N, Nagashima Y, Nakatani Y, Hosaka M. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 May;34(1):58-68.
210. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, Maher ER, Stanley AJ, Harnden P, Joyce A, Knowles M, Selby PJ. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):2000-11.
211. Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Sánchez-Sánchez F, Lorenzo-Romero JG, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H, Carrión-López P, Escribano-Martínez J, Virseda-Rodríguez JA. VHL protein alterations in sporadic renal cell carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2007 Dec;19(10):784-9.
212. Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol.* 2002 Feb;196(2):186-93.
213. Smits KM, Schouten LJ, van Dijk BA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Wouters KA, Oosterwijk E, van Engeland M, van den Brandt PA. Genetic and epigenetic alterations in the von hippel-lindau gene: the influence on renal cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb 1;14(3):782-7.
214. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010 Apr;7(4):248-9.
215. Masoodi TA, Al Shammari SA, Al-Muammar MN, Alhamdan AA, Talluri VR. Exploration of deleterious single nucleotide polymorphisms in late-onset Alzheimer disease susceptibility genes. *Gene.* 2013 Jan 10;512(2):429-37.
216. Wu Y, Weber JL, Vladutiu GD, Tarnopolsky MA. Six novel mutations in the myophosphorylase gene in patients with McArdle disease and a family with pseudo-dominant inheritance pattern. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec;104(4):587-91.

217. Barbosa RH, Aguiar FC, Silva MF, Costa RA, Vargas FR, Lucena E, Carvalho de Souza M, de Almeida LM, Bittar C, Ashton Prolla P, Bonvicino CR, Seuánez HN. Screening of RB1 Alterations in Brazilian Patients With Retinoblastoma and Relatives With Retinoma: Phenotypic and Genotypic Associations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 May 7;54(5):3184-94.
218. Capuano M, Garcia-Herrero CM, Tinto N, Carluccio C, Capobianco V, Coto I, Cola A, Iafusco D, Franzese A, Zagari A, Navas MA, Sacchetti L. Glucokinase (GCK) mutations and their characterization in MODY2 children of southern Italy. *PLoS One.* 2012;7(6):e38906.
219. Doss C GP. In silico profiling of deleterious amino acid substitutions of potential pathological importance in haemophilia A and haemophilia B. *J Biomed Sci.* 2012 Mar 16;19:30.
220. Chen QH, Deng W, Li XW, Liu XF, Wang JM, Wang LF, Xiao N, He Q, Wang YP, Fan YM. Novel CDH1 germline mutations identified in Chinese gastric cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2013 Feb 14;19(6):909-16.
221. Refsgaard L, Holst AG, Sadjadieh G, Haunsø S, Nielsen JB, Olesen MS. High prevalence of genetic variants previously associated with LQT syndrome in new exome data. *Eur J Hum Genet.* 2012 Aug;20(8):905-8.
222. Zhou Q, Lee GS, Brady J, Datta S, Katan M, Sheikh A, Martins MS, Bunney TD, Santich BH, Moir S, Kuhns DB, Long Priel DA, Ombrello A, Stone D, Ombrello MJ, Khan J, Milner JD, Kastner DL, Aksentijevich I. A hypermorphic missense mutation in *PLCG2*, encoding phospholipase C $\gamma$ 2, causes a dominantly inherited autoinflammatory disease with immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* 2012 Oct 5;91(4):713-20.
223. Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, Parhar RS, Al-Mohanna FA, Meyer BF, Shi Y. Mutation prediction by PolyPhen or functional assay, a detailed comparison of CYP27B1 missense mutations. *Endocrine.* 2011 Aug;40(1):14-20.
224. Di YM, Chan E, Wei MQ, Liu JP, Zhou SF. Prediction of deleterious non-synonymous single-nucleotide polymorphisms of human uridine diphosphate glucuronosyltransferase genes. *AAPS J.* 2009 Sep;11(3):469-80.
225. Gray VE, Kukurba KR, Kumar S. Performance of computational tools in evaluating the functional impact of laboratory-induced amino acid mutations. *Bioinformatics.* 2012 Aug 15;28(16):2093-6.

226. Patard JJ, Fergelot P, Karakiewicz PI, Klatte T, Trinh QD, Rioux-Leclercq N, Said JW, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2008 Jul 15;123(2):395-400.
227. Kroeger N, Klatte T, Chamie K, Rao PN, Birkhäuser FD, Sonn GA, Riss J, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Deletions of chromosomes 3p and 14q molecularly subclassify clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2013 Apr 15;119(8):1547-54.
228. Parker AS, Chevillet JC, Lohse CM, Igel T, Leibovich BC, Blute ML. Loss of expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein associated with improved survival in patients with early-stage clear cell renal cell carcinoma. *Urology*. 2005 Jun;65(6):1090-5.
229. Bastien L, Culine S, Paule B, Ledbai S, Patard JJ, de la Taille A. Targeted therapies in metastatic renal cancer in 2009. *BJU Int*. 2009 May;103(10):1334-42.
230. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
231. Łacko A, Krzemieniecki K. Status KRAS molekularnym wskaźnikiem predykcyjnym korzyści z leczenia przeciwciałami monoklonalnymi blokującymi receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu u chorych na raka jelita grubego. *Onkol. Prak. Klin*. 2009; 5, 1: 9–15
232. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J; Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1273-83.

## **12. Załączniki**

### **Załącznik 1.**

#### **Wzór informacji dla pacjenta oraz zgody pacjenta na udział w badaniu.**

##### **Cel badania**

Rak nerki (ang. *renal cell carcinoma*, RCC) jest nowotworem stanowiącym 2% wszystkich poznanych nowotworów. W większości przypadków rozwój choroby przebiega bezobjawowo i w związku z tym część pacjentów zgłasza się do lekarza w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej. Cechą charakterystyczną, oprócz trudności wykrycia nowotworu, jest jego oporność na chemioterapię czy radioterapię. Należy podkreślić fakt, iż z roku na rok, liczba osób dotkniętych tą chorobą wzrasta. Dokładne przyczyny prowadzące do RCC nie są poznane, jednak wyniki dotychczasowych doświadczeń sugerują, że u większości pacjentów z rakiem nerki obecne są mutacje w genie VHL. Inaktywacja tego genu oraz białka z rodziny STAT, w szczególności białko STAT 3, mogą odgrywać istotną rolę w powstawaniu i progresji raka nerkowokomórkowego. Z tego względu postanowiliśmy szczegółowo zbadać gen VHL oraz białka z rodziny STAT. Wyniki naszej pracy mogą przyczynić się do lepszego poznania raka oraz do rozwoju nowych terapii oraz testów diagnostycznych.

##### **Procedura badania**

Pobrana zostanie od Pani/Pana jednorazowo krew - 4 probówki po 9 ml (ogółem 36 ml). Po zabiegu (wycięcia nerki lub wycięcia guza nerki) pobrany zostanie fragment tkanki guza wielkości 1,5cm x 1,5cm. Materiał wyizolowany z krwi lub tkanki guza (DNA, RNA lub białka) wykorzystywany będzie wyłącznie w celu wykonania badań dotyczących raka nerkowokomórkowego.

##### **Poufność**

Dane zebrane w czasie Pani/Pana uczestnictwa w badaniu, łącznie z Pani/Pana danymi osobowymi, będą traktowane jako poufne. Identyfikacja Pani/Pana danych będzie dokonana poprzez nadanie im numeru ewidencyjnego, co pozwoli na zachowanie ich anonimowości. Weryfikacja Pani/Pana danych osobowych będzie odbywać się tylko



w ośrodku badawczym i będzie dokonana przez lekarza i badacza, pod rygorem zachowania tajemnicy służbowej. Dane te nie będą udostępniane innym podmiotom, bądź osobom. Wyniki badania naukowego, w którym bierze Pani/Pan udział, mogą być publikowane lub prezentowane w trakcie spotkań naukowych, jednakże również w tych przypadkach wszelkie dane dotyczące Pani/Pana osoby pozostaną anonimowe.

**ŚWIADOMA ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIU**

Wyrażam zgodę na udział w badaniu naukowym „Wpływ białek STAT na rozwój i progresję raka nerkowokomórkowego”

Zapoznałam/em się z informacją o badaniu i rozumiem jej treść.

Wyrażam zgodę na przechowywanie i przetwarzanie moich danych osobowych zebranych dla celów badania. Zostałam/em poinformowana/y, że mam prawo do wglądu do moich danych osobowych, do ich poprawiania, uzupełniania bądź wycofania z bazy danych.

Imię i nazwisko:.....

Data:..... Czytelny podpis.....

**Załącznik 2.**

**ANKIETA PACJENTA**

**Imię i nazwisko** .....

**Nr pacjenta** .....

**1. Wiek**

.....

**2. Płeć**

- a. kobieta
- b. mężczyzna

**3. Waga (kg)**

.....

**4. Wzrost (cm)**

.....

**5. Czy występowały w rodzinie choroby nerek?**

- a. TAK
- b. NIE

**6. Jeżeli występowały w rodzinie choroby nerek, proszę podać jakie:**

.....

**7. Proszę podać, kto z najbliższych był dotknięty chorobą nerek?**

- a. Matka
- b. Ojciec
- c. Babcia
- d. Dziadek
- e. Rodzeństwo
- f. Inni (.....)

**8. Czy występowały jakieś objawy rozwoju raka nerkowokomórkowego?**

- a. TAK
- b. NIE

**9. Jeżeli występowały objawy choroby, proszę wskazać jakie:**

- a. Krew w moczu
- b. Bóle okolicy lędźwiowej
- c. Wyczuwalny guz w jamie brzusznej
- d. Utrata wagi
- e. Gorączka
- f. Inne objawy (.....)

**10. Czy u kogoś w rodzinie występował rak nerkowokomórkowy?**

- a. TAK
- b. NIE

**11. Jeżeli występował w rodzinie rak nerkowokomórkowy, proszę wskazać u kogo:**

- a. Matka
- b. Ojciec
- c. Babcia
- d. Dziadek
- e. Rodzeństwo
- f. Inni (.....)

**12. Czy ma Pan/ Pani nadciśnienie tętnicze?**

- a. TAK
- b. NIE

**13. Czy przyjmuje Pan/Pani leki obniżające ciśnienie tętnicze?**

- a. TAK
- b. NIE

**14. Czy choruje Pan/ Pani na cukrzycę?**

- a. Cukrzyca typu 1
- b. Cukrzyca typu 2
- c. NIE

**15. Czy ktoś w rodzinie chorował na cukrzycę typu 1?**

- a. Matka
- b. Ojciec
- c. Babcia
- d. Dziadek
- e. Rodzeństwo
- f. Inni(.....)

**16. Czy ktoś w rodzinie chorował na cukrzycę typu 2?**

- a. Matka
- b. Ojciec
- c. Babcia
- d. Dziadek
- e. Rodzeństwo
- f. Inni (.....)

**17. Czy pali Pan/Pani papierosy?**

- a. TAK
- b. NIE

**18. Kiedy zaczął Pan/Pani palić papierosy? (wiek)**

.....

**19. Kiedy rzucił Pan/Pani palenie? (wiek)**

.....

**20. Czy zdiagnozowano u Pana/Pani wcześniej inny nowotwór niż rak nerkowokomórkowy?**

- a. TAK
- b. NIE

**21. Jeżeli zdiagnozowano u Pana/Pani inny typ nowotworu niż rak nerkowokomórkowy proszę podać, jaki?**

.....

**22. Czy nowotwór inny niż rak nerkowokomórkowy był złośliwy (dotyczy pytania 20)?**

- a. TAK
- b. NIE

**23. Czy w rodzinie ktoś chorowała na nowotwór złośliwy?**

- a. TAK
- b. NIE

**24. Jeżeli występował nowotwór złośliwy w rodzinie to, u kogo?**

- a. Matka
- b. Ojciec
- c. Babcia
- d. Dziadek
- e. Rodzeństwo
- f. Inni-.....

**25. Jaki rodzaj nowotworu złośliwego występował w rodzinie?**

.....

**26. Czy w rodzinie występowały przypadki nowotworów łagodnych?**

- a. TAK
- b. NIE

**27. Jeżeli występował nowotwór łagodny w rodzinie, to u kogo?**

- a. Matka
- b. Ojciec
- c. Babcia
- d. Dziadek
- e. Rodzeństwo
- f. Inni-.....

**28. Jaki rodzaj nowotworu łagodnego występował w rodzinie?**

.....

**29. Czy choruje Pan/Pani na dodatkowe choroby, które nie zostały wymienione w ankiecie?**

**Jeżeli TAK proszę podać, jakie.**

- a. TAK
- b. NIE

.....

**30. Czy bierze Pan/ Pani jakieś dodatkowe leki?**

**Jeżeli TAK proszę wymienić jakie leki i na jakie schorzenie.**

- a. TAK
- b. NIE

.....

**31. Czy jest Pan/Pani obciążony chorobą uwarunkowaną genetycznie?**

**Jeżeli TAK proszę napisać, jaką.**

- a. TAK
- b. NIE

.....