

Lek. Tomasz Milecki

**„Ocena ilościowa oraz jakościowa DNA krążącego we
krwi u pacjentów z nowotworem nerkowokomórkowym.”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotorzy: Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kwias

Prof. dr hab. Joanna Wesoly

Katedra i Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: Dr hab. n. med. Andrzej Antczak

Poznań 2020

Serdeczne podziękowania składam:

Panu Prof. dr hab. Zbigniewowi Kwiasowi

oraz

Pani Prof. dr hab. Joannie Wesoły

*za pomoc, wyrozumiałość i okazane wsparcie
oraz za przekazaną wiedzę i cenne wskazówki merytoryczne*

Mojej Żonie Paulinie i Rodzicom

za wiarę i okazaną pomoc

Koleżankom i Kolegom

za wsparcie, życzliwość i atmosferę pracy.

Spis skrótów użytych w tekście:

- AFP – Alfa fetoproteina płodowa**
- ALU- Sekwencje powtarzalne w obrębie genomu**
- AML - Nowotwór nerki angiomyolipoma**
- ASCO - Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej**
- B-HCG - Gonadotropina kosmówkowa**
- BMI - Wskaźnik masy ciała**
- CAIX - Anhydraza węglanowa IX**
- ccRCC- Rak jasnokomórkowy nerki**
- CEA - Antygen rakowo płodowy**
- cfDNA - krążące wolne DNA**
- CN - Nefrektomia cytoredukcyjna**
- CSS - Przeżycie swoiste dla raka**
- DNA – Kwas deoksyrybonukleinowy**
- ECOG - Skala sprawności według Eastern Cooperative Oncology Group**
- EDTA - Kwas edetynowy**
- EGFR - Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu**
- EPO - Erytropoetyna**
- FDA - Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych**
- MiRNA - Informacyjny kwas rybonukleinowy**
- MMP - Krążąca metaloproteinaza pozakomórkową**
- mac – Przerzutowy rak nerkowkomórkowy**
- MRI – Rezonans magnetyczny**
- M-TOR – Szlak kinazy tyrozynowej**
- NF1 - Nerwiakowłóknikowatość typu 1**
- NGS - Sekwencjonowanie nowej generacji**
- NSS – Nerkooszczędzająca operacja usunięcia guza nerki**
- LDH – Dehydrogenaza mleczanowa**
- LINE – Długie rozproszone elementy jądrowe**
- LOH - Utrata heterozygotyczności**
- LVI - Inwazja naczyń krwionośnych i chłonnych**
- PD-1/PD-L1 - Receptor programowanej śmierci 1**
- P53 - Czynn timer transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego**
- PSA – Antygen swoisty dla gruczołu krokowego**
- RCC – Rak nerkowokomórkowy**
- RECIST – Radiologiczne kryteria odpowiedzi na leczenie guzów litych**

SSIGN – Model prognostyczny dla RCC: stadium, rozmiar, stopień złośliwości, nekroza

SYBR - Barwnik reakcji PCR

TCGA – Atlas genomu raka

TK – Tomografia komputerowa

TNM – Skala zaawansowania - miejscowego, układu chłonnego i przerzutów odległych

UAM - Uniwersytet Adama Mickiewicza

UISS - Nomogram prognostyczny dla RCC

USG - Ultrasonografia

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia

VEGF - Czynn timer wzrostu śródbłnka naczyniowego

VHL - Von Hippel-Lindau

RT-PCR - Reakcja polimerazy łańcuchowej w czasie rzeczywistym

Spis treści:

Spis skrótów użytych w tekście.....	3
1. Wstęp.....	7
1.1. Epidemiologia.....	7
1.2. Czynniki ryzyka.....	7
1.3. Naturalny przebieg choroby.....	7
1.4. Klasyfikacja histopatologiczna.....	8
1.5. Etiologia i podłoże molekularne.....	8
1.6. Klasyfikacja TNM	9
1.7. Diagnostyka obrazowa.....	11
1.8. Biopsja nowotworów nerki.....	12
1.9. Leczenie RCC w stadium zaawansowania miejscowego:.....	12
1.9.1. Leczenie operacyjne.....	12
1.9.2. Metody małoinwazyjne.....	13
1.9.3. Aktywna obserwacja.....	13
1.9.4. Leczenie adjuwantowe.....	14
1.10. Leczenie RCC w stadium zaawansowanym:.....	15
1.10.1. Nefrektomia cytoredukcyjna.....	15
1.10.2. Leczenie systemowe.....	15
1.11. Markery w RCC.....	16
1.12. Biologia i znaczenie krążącego DNA w praktyce klinicznej.....	18
1.12.1. Integralność krążącego DNA.....	20
1.12.2. Zastosowanie krążącego DNA w onkologii.....	22
2. Cel pracy.....	26
3. Materiał i metody.....	27
3.1. Materiał kliniczny.....	27
3.2. Metody.....	30
3.2.1. Pobieranie materiału.....	30
3.2.2. Opracowanie materiału.....	31
3.2.3. Metody statystyczne.....	33
4. Wyniki.....	35
4.1. Wpływ czynników epidemiologicznych na poziom stężenia krążącego DNA i wartość współczynnika integralności DNA.....	35
4.2. Pomiar stężenia krążącego DNA oraz ocena wartości współczynnika integralności DNA w grupach: pacjentów z nowotworem ccRCC, pacjentów z nowotworem oncocytoma oraz w grupie kontroln.....	35

4.3. Analiza regresji czynników predysponujących do wykrycia ccRCC.....	39
4.4. Wpływ stopnia zaawansowania choroby według skali TNM na badane parametry w grupie pacjentów z ccRCC.....	40
4.5. Wpływ stopnia złośliwości histopatologicznej na badane parametry w grupie pacjentów z ccRCC.....	45
4.6. Wpływ średnicy zmiany pierwotnej oraz obecności inwazji naczyniowej na badane parametry w grupie pacjentów z ccRCC.....	49
4.7. Analiza przeżycia specyficznego dla choroby w zależności od wartości badanych parametrów w grupie pacjentów z ccRCC.....	50
4.8. Analiza przeżycia regresji Coxa względem wybranych parametrów klinicznych, patologicznych i stężenia krążącego DNA w grupie pacjentów z ccRCC.....	53
5. Dyskusja.....	57
6. Wnioski.....	69
7. Streszczenie.....	70
8. Streszczenie w języku angielskim.....	74
9. Spis rycin.....	77
10. Spis tabel.....	79
11. Piśmiennictwo.....	81
12. Załączniki.....	91

1. WSTĘP

1.1. EPIDEMIOLOGIA

Rak nerkowokomórkowy (Renal Cell Carcinoma - RCC) jest najczęstszą odmianą nowotworu złośliwego nerki występującą w 90% przypadków zachorowań [1]. Według danych epidemiologicznych nowotwory typu RCC reprezentują 3% ogółu zachorowań na nowotwory złośliwe na świecie [2]. Globalnie w 2018 roku odnotowano 403 tysiące zachorowań oraz stwierdzono 176 tysięcy zgonów. Pod względem zachorowalności RCC został sklasyfikowany na 14 pozycji, natomiast pod względem umieralności na 15 pozycji. Zachorowalność na RCC różni się w zależności od regionu świata. Obserwuje się znacznie wyższe wskaźniki zachorowalności w Ameryce Północnej, Europie i Australii w porównaniu do pozostałych kontynentów [3]. W Polsce według danych krajowego rejestru nowotworów w roku 2017 zarejestrowano 5 tysięcy nowych zachorowań na RCC co stanowiło 3,8% wszystkich nowotworów złośliwych zdiagnozowanych wśród mężczyzn i 2,5% wśród kobiet [4]. Nowotwory złośliwe nerki w Polsce przyczyniły się do wystąpienia zgonu u 2,8% mężczyzn oraz 2,1% kobiet.

1.2. CZYNNIKI RYZYKA

Zachorowalność na nowotwory RCC wzrasta wraz z wiekiem i jest największa w 6 i 7 dekadzie życia [5]. Mężczyźni charakteryzują się 1.5 razy wyższą zachorowalnością niż kobiety i różnica ta jest znamienna bez względu na wiek badanej populacji. Do grupy czynników modyfikowalnych zwiększających ryzyko zachorowania na RCC zalicza się otyłość, nadciśnienie tętnicze, ograniczoną aktywność fizyczną, dietę bogatotłuszczową, palenie tytoniu oraz nadmierne spożywanie alkoholu [6]. Udowodniono również istnienie zwiększonej zachorowalności na RCC w związku z współistnieniem poszczególnych jednostek chorobowych takich jak: cukrzyca typu 2, przewlekła niewydolność nerek i wątroby. Podkreśla się również znaczenie predyspozycji rodzinnych – osoby mające dodatni wywiad rodzinny mają zwiększone dwukrotnie ryzyko zachorowania na RCC [7]. Dziedziczenie rodzinne dotyczy jedynie 2% zachorowań na RCC i przekazywane jest w sposób autosomalny dominujący. W literaturze opisano także szereg zespołów genetycznych takich jak: zespół Von Hippa – Lindau, Dziedziczny Rak Brodawkowy, Wielotorbielowatość nerek, czy też zespół Birt – Hogg Dube, które predysponują do rozwoju RCC [8].

1.3. NATURALNY PRZEBIEG CHOROBY

Wczesny rak nerki najczęściej nie daje objawów klinicznych i wykrywany jest przypadkowo w trakcie przeprowadzanych badań obrazowych, co według danych statystycznych stanowi od 80% do 90% przypadków [9]. Jedynie 10% pacjentów może

manifestować objawy miejscowe zaliczane do tzw. triady, która obejmuje: ból okolicy lędźwiowej, krwiomocz oraz masę guzową wyczuwalną przez powłoki brzuszne. Wśród 30% pacjentów zdiagnozowanych z RCC w momencie rozpoznania stwierdza się obecność przerzutów odległych [10]. W przebiegu zaawansowanego stadium choroby można także zaobserwować zespoły paraneoplastyczne indukowane przez cytokiny wydzielane przez nowotwór, do których zalicza się: hiperkalcemię, erytrocytozę, zespół Stauffera, polineuropatię, amyloidozę, anemię, kacheksję oraz nocne poty [11].

1.4. KLASYFIKACJA HISTOPATOLOGICZNA

W 2016 roku dokonano aktualizacji dotychczasowej wersji klasyfikacji WHO z 2004 [12]. Nowotwory RCC stanowią niejednorodną grupę nowotworów, do której zalicza się co najmniej 10 głównych odmian histopatologicznych. Najczęstszym wariantem RCC jest rak jasnokomórkowy (ang. Clear cell Renal Cell Carcinoma - ccRCC) stwierdzany w 80% przypadków [13]. Pozostałe rzadsze odmiany to rak brodawkowaty stanowiący 10% zachorowań, rak chromofobowy - 5% zachorowań oraz 5% innych odmian dotychczas niesklasyfikowanych pod względem histopatologicznym.

W większości przypadków rozpoznanie odmiany histopatologicznej nowotworu RCC jest możliwe na podstawie czytelnych kryteriów histopatologicznych. Nowotwory RCC, które mają komponentę mieszaną mogą jednak wymagać przeprowadzenia dodatkowych badań obejmujących: precyzyjną ocenę cytologii komórki, ocenę immunohistochemiczną lub ocenę genotypu komórki nowotworowej. W 5% przypadków pomimo przeprowadzenia dodatkowych badań nie można ustalić rozpoznania histopatologicznego i stawia się rozpoznanie niesklasyfikowana odmiana RCC [14].

Oprócz ustalenia odmiany histopatologicznej RCC, ocenie podlega również stopień zróżnicowania histopatologicznego według dedykowanej skali Fuhrmana (1-4), w której ocenia się morfologię jądra komórkowego (wielkość i kształt) oraz obecność jąderek [15]. Skala Fuhrmana stanowi ważny czynnik prognostyczny u pacjentów z RCC.

1.5. ETIOLOGIA I PODŁOŻE MOLEKULARNE

Nowotwory RCC w ponad 95% przypadków występują sporadycznie. Podłoże molekularne nowotworów RCC obejmuje mutacje, metylacje lub utratę heterozygotyczności (LOH) i jest zależne od odmiany histopatologicznej. Wśród pacjentów zdiagnozowanych z ccRCC najczęstszą stwierdzaną aberracją chromosomalną jest utrata ramienia krótkiego chromosomu 3. Przyczynia się ona do LOH genu VHL (ang. von Hippel- Lindau) [16]. Gen VHL koduje białko VHL, którego prawidłowe działanie warunkuje odpowiedź komórki na zmiany stężenia tlenu [17]. W warunkach prawidłowego stężenia tlenu białko VHL przyłącza czynnik HIFa (ang. Hypoxia-inducible factor a), który uległ wcześniej

hydroksylacji. Kompleks VHL - białko HIFa łączy się następnie z ligazą E3 co pozwala na przyłączenie białka ubikwityny do HIFa [18]. Tak powstały kompleks kieruje czynnik transkrypcyjny do proteosomu, co skutkuje jego degradacją [19]. Z kolei w warunkach hipoksji czynnik HIFa łączy się z HIF1b (ang. Hypoxia-inducible factor 1b) i po translokacji do jądra komórkowego doprowadza do transkrypcji genów VEGFA (ang. Vascular endothelial growth factor A), EPO (ang. Erythropoietin), SLC2A1 (ang. Solute Carrier Family 2 Member 1), TGFA (ang. Transforming growth factor alpha) i EGFR (ang. Epidermal growth factor receptor). Powyższe geny odpowiadają za produkcję szeregu białek: proangiogennych – VEGF oraz PDGF-B (ang. Platelet-derived growth factor subunit B), czynnika pobudzającego erytropoezę - EPO i czynnika wzrostowego TGF- α [20]. W przypadku inaktywacji lub mutacji genu VHL w warunkach normoksji dochodzi do nieprawidłowej nadprodukcji powyższych białek co indukuje rozwój nowotworu złośliwego charakteryzujący się bogatym unaczynieniem. Ponieważ gen VHL jest genem supresorowym do jego inaktywacji potrzebne są mutacje obejmujące obydwa allele [21]. Mutacja jedynie jednego z alleli genu VHL predysponuje do rozwoju torbieli w obrębie nerek [22]. Ponadto przeprowadzone badania doświadczalne na modelu mysim dowiodły, że nawet całkowita utrata obydwóch alleli genu VHL jest nadal niewystarczająca do zajścia procesów kancerogenezy i konieczne jest pojawienie się kolejnych mutacji w obrębie innych genów [23]. Przeprowadzone badania obejmujące sekwencjonowanie nowej generacji potwierdziły, że wystąpienie kolejnych zjawisk genetycznych i epigenetycznych w następujących genach supresorowych PBRM1 (ang. Polybromo 1), SETD2 (ang. Set Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase), BAP1 (ang. BRCA1 associated protein-1) i KDM5C (ang. Lysine demethylase 5C) oraz jednym onkogenie MTOR (ang. Mammalian target of rapamycin kinase), przyczynia się ostatecznie do rozwoju nowotworu RCC. Geny PBRM1, SETD2, BAP1 znajdują się na tym samym ramieniu chromosomu 3 co gen VHL wobec czego jego utrata często skutkuje jednoczasową utratą pozostałych czterech genów supresorowych [24]. Z kolei gen KDM5C znajduje się na chromosomie X wobec czego w przypadku płci męskiej wystarczy pojedyncza mutacja, aby doszło do całkowitej LOH, co wyjaśnia zwiększoną zachorowalność na RCC wśród mężczyzn w porównaniu do kobiet (2:1).

1.6. KLASYFIKACJA TNM

Klasyfikacja według skali TNM pozwala wybrać adekwatną metodę leczenia i stanowi ważny czynnik prognostyczny w grupie pacjentów zdiagnozowanych z nowotworem RCC [25].

W skali TNM ocenia się wymiary nowotworu, obecność inwazji na sąsiednie narządy, obecność przerzutów w węzłach chłonnych i przerzutów odległych do innych narządów (Tabela 1).

Tabela 1. Klasyfikacja stopnia zaawansowania raka nerki według skali TNM

T (guz pierwotny)	
Tx	nie można ocenić guza pierwotnego
T0	nie stwierdza się guza pierwotnego
T1	guz o średnicy do 7 cm, ograniczony do mięszu nerki
T1a	guz nie większy niż 4 cm
T1b	guz większy niż 4 cm i nie większy niż 7 cm
T2	guz o średnicy powyżej 7 cm, lecz ograniczony do mięszu nerki
T2a	guz większy niż 7 cm i nie większy niż 10 cm
T2b	guz większy niż 10 cm
T3	guz nacieka główne naczynia żyłne lub tkankę tłuszczową okołonerkową lecz bez przekraczania powięzi Geroty czy naciekania gruczołu nadnerczowego
T3a	guz wrasta w żyłę nerkową lub jej odgałęzienia lub nacieka tkankę tłuszczową okołonerkową bez przekraczania powięzi Geroty, naciekanie układu kielichowo-miedniczkowego
T3b	guz wrasta w żyłę główną dolną poniżej przepony
T3c	guz wrasta w żyłę główną dolną powyżej przepony lub nacieka ścianę żyły głównej dolnej
T4	guz nacieka poza powięź Geroty (w tym naciekanie przez ciągłość gruczołu nadnerczowego)
N (stan regionalnych węzłów chłonnych)	
Nx	nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych
N0	brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1	obecne przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych
M (przerzuty odległe)	
M0	nie stwierdza się obecności przerzutów odległych
M1	stwierdza się przerzuty odległe

W ostatnich latach dokonały się zmiany w sposobie leczenia pacjentów z RCC. W związku z powyższym w 2009 roku pojawiła się nowa wersja skali TNM [26]. Najistotniejsze zmiany obejmowały wydzielenie grupy T2a, czyli zmian mniejszych niż 10cm ze względu na ich coraz częstsze leczenie za pomocą zabiegów NSS. Ponadto w klasyfikacji uwzględniono naciekanie ściany żyły głównej dolnej jako czynnika podwyższającego stopień zaawansowania oraz zakwalifikowano naciekanie nadnercza do stadium T4. Najnowsza wersja skali TNM ukazała się w 2017 roku (Tabela 1).

1.7. DIAGNOSTYKA OBRAZOWA

Według wytycznych towarzystw naukowych w przypadku podejrzenia nowotworu złośliwego nerki oprócz badania klinicznego i podstawowych badań laboratoryjnych (morfologia, biochemia, koagulologia) konieczne jest przeprowadzenie diagnostyki obrazowej. Wstępnym badaniem obrazowym jest przezpłokowe USG, które jest powszechnie dostępne oraz cechuje się brakiem inwazyjności. Badanie USG pozwala odróżnić zmiany lite od torbielowatych, natomiast niewątpliwie jego wadą jest brak zdolności różnicowania w obrębie zmian litych [27].

Złotym standardem w diagnostyce obrazowej nowotworów nerki jest natomiast tomografia komputerowa jamy brzusznej z użyciem kontrastu z trzema fazami (faza bez wzmocnienia, faza wzmacniania, faza nefrograficzna) oraz opcjonalną fazą urograficzną [28]. Badanie TK zapewnia 90% czułość w wykrywaniu nowotworów nerek oraz pozwala określić stopień zaawansowania [39].

Badaniem alternatywnym do tomografii komputerowej jest badanie MRI, które charakteryzuje się podobną czułością i swoistością [30]. W przeciwieństwie do badania TK w badaniu MRI unika się szkodliwej ekspozycji na promieniowanie jonizujące oraz nie używa się jodowych środków wzmacniających, które mogą upośledzać funkcję filtracyjną nerek. W związku z powyższym MRI jest w szczególności zalecane dla pacjentów z alergią na kontrast jodowy, upośledzoną funkcją nerkową i kobiet w ciąży. MRI stanowi także alternatywę dla pacjentów, którzy wymagają okresowej kontroli po zastosowanym leczeniu operacyjnym (np. osoby z zespołami genetycznymi, lub upośledzoną funkcją nerkową).

Ograniczeniem konwencjonalnych badań obrazowych jest niska zdolność w różnicowaniu zmian litych pod względem histopatologicznym [31]. Ma to istotne znaczenie w nowotworach oncocytoma lub ubogotłuszczowym podtypie AML, które są zmianami łagodnymi i w wielu przypadkach nie wymagają leczenia operacyjnego. Powyższe zmiany na podstawie badań obrazowych są diagnozowane jako nowotwór złośliwy. Problem ze zróżnicowaniem odmiany histopatologicznej zmiany (łagodny vs. złośliwy) dotyczy przede

wszystkim nowotworów o średnicy do 4cm, które w 20% przypadków mają charakter łagodny.

1.8. BIOPSJA NOWOTWORÓW NERKI

Biopsja nowotworów nerki stanowi opcjonalne badanie mogące uzupełnić podstawową diagnostykę pacjentów z podejrzeniem RCC. Aktualne wskazania do wykonania biopsji nowotworu nerki są ograniczone i obejmują kwalifikację do aktywnej obserwacji i leczenia małoinwazyjnego oraz kwalifikację do terapii systemowej w stadium przerzutowym choroby [32]. Wyniki dostępnych badań kwestionują jednak wiarygodność biopsji nowotworów nerki. Zgodność stopnia zróżnicowania według skali Fuhrmana pomiędzy bioptatem a wynikiem pooperacyjnym jest niska [33]. Wynika to przede wszystkim z obecności w nowotworach litych zjawiska heterogenności. Polega ono na obecności obszarów w obrębie guza o różnych stopniach złośliwości histopatologicznej lub różnych wariantach genetycznych. Zjawisko heterogenności obecne jest również w nowotworach nerki [34]. W przypadku pacjentów kwalifikowanych do zabiegu usunięcia nowotworu nerki nie ma zatem bezwzględnej konieczności przeprowadzenia przedoperacyjnej biopsji ogniska nowotworowego, ponieważ wynik bioptatu rzadko przekłada się na zmianę decyzji terapeutycznych [35].

1.9. LECZENIE RCC W STADIUM ZAAWANSOWANIA MIEJSCOWEGO

1.9.1. Leczenie operacyjne

W grupie pacjentów z RCC w stadium ograniczonym do narządu metodą leczenia z wyboru jest zabieg operacyjny, którego celem jest usunięcie nowotworu złośliwego. Zaproponowany w 1960 roku przez Robsona schemat radykalnej nefrektomii obejmuje między innymi usunięcie całej nerki wraz z otaczającym tłuszczem, nadnerczem, powięzi Geroty i węzłów chłonnych okołonerkowych [36]. Obecnie ze względu na coraz większą ilość nowotworów wykrywanych we wczesnych stadiach zaawansowania odchodzi się od szerokiego usunięcia nerki zaproponowanego przez Robsona. Przeprowadzone badania kliniczne wykazały, że wykonanie limfadenektomii nie przekłada się na poprawę wyników onkologicznych i nie jest koniecznym etapem operacji [37]. Liczne towarzystwa urologiczne zalecają jednak, aby przeprowadzić limfadenektomię w przypadku zdiagnozowania w badaniach obrazowych limfadenopatii celem potwierdzenia lub wykluczenia inwazji nowotworowej w badaniu histopatologicznym [38]. Również wykonanie adrenalektomii uznają się za konieczne jedynie w przypadku stwierdzenia nieprawidłowości w przedoperacyjnym badaniach obrazowych lub rozległych nowotworach górnego bieguna nerki [39].

Radykalna nefrektomia jest zabiegiem, który może wpłynąć niekorzystnie na stan ogólny pacjenta. W wyniku zabiegu może dojść do pogorszenia stopnia filtracji kłębuszkowej oraz zwiększenia ryzyka wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego [40, 41]. Alternatywą dla zabiegu radykalnej nefrektomii jest zabieg NSS (z ang. Nephron Sparing Surgery), który polega na usunięciu wyłącznie masy nowotworowej z jednoczesnym pozostawieniem zdrowego miąższu nerki. Według wytycznych naukowych towarzystw urologicznych operacja NSS powinna być rozważana w szczególności w przypadku obecności małych nowotworów o średnicy nie większej niż 7cm i dogodnej lokalizacji. Przeprowadzone badania randomizowane nie wykazały różnic w wynikach onkologicznych pomiędzy zabiegiem NSS, a radykalną nefrektomią co stanowi istotny argument przemawiający na korzyść wykonywania zabiegów NSS [42].

Zarówno nefrektomia radykalna jak i zabieg NSS mogą być wykonane metodą otwartą, laparoskopową i robotową. Do niewątpliwych korzyści przemawiających na rzecz dostępu laparoskopowego i robotowego zalicza się: krótszy okres rekonwalescencji, zmniejszone ryzyko krwawienia oraz lepszy efekt kosmetyczny [43]. Należy podkreślić, że w głównej mierze decyzja o zastosowanej technice operacyjnej zależy od doświadczenia zespołu operującego.

1.9.2. Metody małoinwazyjne

Alternatywną opcją terapeutyczną dla pacjentów w miejscowo zaawansowanym stadium RCC mogą być małoinwazyjne metody, które obejmują krioablacje i ablacje falami radiowymi [44]. Przeprowadzone badania prospektywne nierandomizowane wskazują jednak, że ryzyko wznowy miejscowej po zastosowaniu technik małoinwazyjnych jest w porównaniu do zabiegu NSS istotnie wyższe - w przypadku krioablacji 7.4 razy, natomiast w przypadku termoablacji nawet 18.2 [45]. Powyższe techniki leczenia nie są obecnie uznawane przez towarzystwa naukowe jako metoda leczenia z wyboru pacjentów z RCC, ponieważ nie posiadamy wiarygodnych wyników badań randomizowanych oceniających skuteczność onkologiczną. Zgodnie z zaleceniami towarzystw naukowych metody małoinwazyjne można rozważyć jedynie jako alternatywną opcję terapeutyczną u pacjentów w złym stanie ogólnym.

1.9.3. Aktywna obserwacja

Według zaleceń towarzystw urologicznych aktywna obserwacja stanowi jedną z alternatywnych metod postępowania nieoperacyjnego u pacjentów z nowotworem nerki. W wyniku wzrostu dostępności do diagnostyki obrazowej zwiększeniu uległa wykrywalność nowotworów nerki we wczesnych stadiach zaawansowania. Około 20% małych zmian o

średnicy do 4 cm ma charakter łagodny, a spory odsetek cechuje się niskim potencjałem do progresji [46]. W trakcie rocznej obserwacji ryzyko rozwoju choroby przerzutowej u pacjentów z nowotworem nerki o średnicy do 3cm wynosi zaledwie od 1% do 2%, a średni liniowy wzrost średnicy wynosi 0.13 cm w skali roku [47]. W związku z powyższym pacjenci z małym nowotworem nerki i oszacowanym krótkim okresem przeżycia mogą nie odnieść korzyści z leczenia operacyjnego. Kwalifikacja do aktywnej obserwacji obejmuje przeprowadzenie biopsji ogniska nowotworowego, która potwierdza rozpoznanie histopatologiczne. Następnie w trakcie ścisłego nadzoru konieczne jest przeprowadzenie cyklicznych badań obrazowych celem wykluczenia progresji choroby. Ograniczona czułość i specyficzność diagnostyki obrazowej oraz niska wiarygodność biopsji nowotworów nerek sprawia sporo trudności przy kwalifikacji i prowadzeniu pacjenta w trakcie aktywnej obserwacji. Ponadto dotychczas nie ustalono wytycznych wskazujących jakie powinny być interwały czasowe wykonywanych badań kontrolnych oraz wskazań do zaprzestania aktywnej obserwacji i wdrożenia leczenia chirurgicznego. Nie posiadamy również wyników randomizowanych badań prospektywnych porównujących aktywną obserwację z leczeniem operacyjnym. Aktywną obserwację można wobec tego rozważyć jedynie wśród pacjentów z małym nowotworem nerki, którzy nie wyrażają zgody na leczenie zabiegowe.

1.9.4. Leczenie adjuwantowe

W przerzutowym stadium zaawansowania RCC standardem leczenia są leki molekularne ukierunkowane na elementy szlaku kaskady genu VHL. Wprowadzenie ich pozwoliło znacząco poprawić wyniki leczenia względem dotychczasowej terapii opartej o cytokiny - wartości przeżycia całkowitego uległy dwukrotnemu wydłużeniu z 11 miesięcy do 22 miesięcy [48]. Z kolei wśród pacjentów w miejscowo zaawansowanym stadium RCC poddanych operacyjnemu leczeniu miejscowemu, obserwuje się około 30%-owy odsetek progresji choroby związanych z wystąpieniem przerzutów odległych w trakcie obserwacji. W celu uzyskania poprawy wyników leczenia w tej grupie pacjentów podjęto próbę wdrożenia leczenia adjuwantowego z wykorzystaniem leków stosowanych u pacjentów w stadium przerzutowym – w szczególności inhibitorów VEGF. Dotychczas przeprowadzono trzy badania randomizowane oceniające skuteczność terapii adjuwantowej [49]. Jedynie w badaniu S-TRACK porównującym Sunitynib z obserwacją pacjentów uzyskaną poprawę czasu wolnego od progresji choroby. Powyższe badanie było podstawą do zaakceptowania przez agencje FDA terapii adjuwantowej w grupie pacjentów z wysokim ryzykiem progresji choroby. Inne towarzystwa urologiczne nie zdecydowały się jednak na wprowadzenie takiej rekomendacji. Aktualne wskazania dotyczące wdrożenia leczenia adjuwantowego u pacjenta

opierają się wyłącznie na nomogramach rokowniczych wykorzystujących parametry kliniczne i dane pochodzące z raportu patologicznego. Z tego też powodu nadal nie jest możliwa precyzyjna prospektywna ocena prawdopodobieństwa wystąpienia oporności lub uzyskania pozytywnej odpowiedzi u danego pacjenta.

1.10 LECZENIE RCC W STADIUM ZAAWANSOWANYM

1.10.1. Nefrektomia cytoredukcyjna

Nefrektomia cytoredukcyjna (CN) poprzedzająca leczenie systemowe jest jedną z opcji terapeutycznych zarezerwowaną dla wyselekcjonowanej grupy pacjentów spełniających korzystne kryteria prognostyczne [50]. Przeprowadzone przez grupę EORTC i SWOG prospektywne randomizowane badania kliniczne wykazały korzyść w postaci wydłużenia przeżycia całkowitego wśród pacjentów poddanych CN w skojarzeniu z leczeniem systemowym w porównaniu wyłącznie do leczenia systemowego [51, 52, 53]. W okresie, w którym przeprowadzono powyższe badania standardem terapii systemowej była terapia interleukinami - interferonem alfa i interleukiną - 2. Wyników powyższych badań nie można wobec tego bezpośrednio odnieść do wprowadzonych leków nowych generacji. Rola CN jest zatem określana ponownie w prowadzonych badaniach klinicznych. Między innymi w zaprezentowanym na konferencji ASCO w 2018 roku randomizowanym badaniu CARMEN wykazano, że wykonanie CN nie przynosi korzyści onkologicznych u pacjentów, którzy są w dalszej kolejności poddani terapii Sunitynibem [54]. Paradoksalnie badanie CARMEN wykazało, że grupa pacjentów, w której przed leczeniem systemowym wykonano CN uzyskała gorsze wyniki w przeżyciach całkowitych w porównaniu do grupy pacjentów poddanych wyłącznie terapii Sunitynibem. Wyniki powyższego badania prawdopodobnie przyczynią się do zmiany rekomendacji dotyczącej wykonywania CN.

1.10.2. Leczenie systemowe:

Przed 2005 rokiem złotym standardem leczenia pacjentów z mRCC była terapia cytokinami, którą cechowała znacząca toksyczność i ograniczona skuteczność [55]. Pogłębienie wiedzy dotyczącej biologii RCC i szlaków sygnałowych pozwoliło na wprowadzenie leków nowej generacji. Aktualnie terapia mRCC obejmuje wybiórczą blokadę białek szlaku odpowiedzialnego za procesy angiogenezy, inhibitorów kinazy mTOR oraz immunoterapię ukierunkowaną na szlak PD-1/PD-L1 [56]. Pomimo tego, że liczba dostępnych terapii w ostatnich latach znacząco się zwiększyła to nadal efektywność onkologiczna nie jest satysfakcjonująca, gdyż przyczynia się jedynie do stabilizacji zmian chorobowych. Podjęte próby stosowania terapii w sposób sekwencyjny oraz łączony także nie

przekładają się na dalszą znaczącą poprawę wyników. Według zaleceń towarzystw naukowych rodzaj dobieranej terapii do pacjenta uwarunkowany jest czynnikami klinicznymi oraz wybranymi parametrami laboratoryjnymi na podstawie powszechnie stosowanych nomogramów [57]. Powyższe nomogramy były wprowadzone do praktyki klinicznej w erze terapii cytokinami i ich zastosowanie w odniesieniu do leków nowej generacji może być suboptymalne.

1.11. MARKERY W RCC

Okolo 30% pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu z powodu miejscowo zaawansowanego RCC rozwinie chorobę przerzutową. Wiarygodna ocena rokowania w tej grupie pacjentów może wyodrębnić osoby mające podwyższone ryzyko wznowy choroby i mogące odnieść korzyść onkologiczną z wdrożenia leczenia uzupełniającego. Aktualnie w celu oceny rokowania pacjentów w lokalizowanym stadium RCC towarzystwa naukowe rekomendują nomogramy, które wykorzystują algorytmy matematyczne uwzględniające dane patologiczne i kliniczne. Do najczęściej stosowanych zalicza się: nomogram Leibovicha, UISS oraz SSIGN [58, 59, 60].

Powyższe nomogramy nie są jednak wystarczająco czułe i swoiste i poszukiwane są bardziej precyzyjne narzędzia prognostyczne. W ciągu ostatnich lat zbadano szereg potencjalnych białek biorących udział w patogenezie RCC takich jak: HIF-a, VEGF, CAIX, surwiwina, PD-L1, p53, MMP, które mogły mieć znaczenie prognostyczne. Żaden z powyższych czynników nie sprawdził się jednak w praktyce klinicznej i nie jest rekomendowany przez towarzystwa naukowe [61, 62].

Wraz z pojawieniem się nowych technik biologii molekularnej badacze podejmują próby identyfikacji genów, które mogą odgrywać istotniejszą rolę. W 2014 roku Brook i wsp. zaproponowali klasyfikację molekularną nowotworów ccRCC na dwa typy - ccA oraz ccB, na podstawie testu genetycznego ClearCode 34 oceniającego ekspresję 34 genów [63]. Typ molekularny ccB cechuje się istotnie gorszym rokowaniem w porównaniu do typu ccA. Kolejnym przykładem jest badanie z 2016 roku przeprowadzone na grupie 942 pacjentów poddanych nefrektomii. W tkance pobranej z usuniętego nowotworu zidentyfikowano grupę 512 genów, które regulują procesy kancerogeny oraz szlaki metaboliczne [64]. Z grupy powyższych genów do dalszej analizy uwzględniono 11 genów (geny proangiogenne - APOLD1 (ang. Apolipoprotein L domain containing 1), EDNRB (ang. Endothelin receptor type B), NOS3 (ang. Nitric Oxide Synthase 3), PPAP2B (ang. Phosphatidic acid phosphatase type 2B), geny cyklu komórkowego EIF4EBP1 (ang. Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1), TUBB2A (ang. Tubulin Beta 2A Class IIa), LMNB1 (ang. Lamin-B1), geny odpowiedzi immunologicznej - CEACAM1 (ang. Carcinoembryonic antigen-related cell

adhesion molecule 1), CX3CL1 (ang. Fractalkine), CCL5 (ang. C-C motif chemokine ligand 5), gen zapalny - IL-6 (ang. Interleukin 6), które miały najistotniejsze znaczenie prognostyczne. Badacze na podstawie powyższych 11 genów oraz 5 genów referencyjnych stworzyli model prognostyczny oparty na formule matematycznej oceniający ryzyko nawrotu choroby. Zaproponowany algorytm był w stanie zidentyfikować pacjentów wysokiego ryzyka nawrotu niezależnie od stopnia zaawansowania choroby według skali TNM oraz rokowania według klasycznej skali wykorzystującej parametry kliniczne i patologiczne (skali Leibovicza). Oczekiwana jest weryfikacja tego algorytmu w badaniach prospektywnych.

W grupie pacjentów w stadium miejscowo zaawansowanym oprócz potrzeby wdrożenia do praktyki klinicznej biomarkera o znaczeniu prognostycznym istnieje również konieczność wdrożenia biomarkera o znaczeniu diagnostycznym, który będzie w stanie potwierdzić diagnozę nowotworu złośliwego nerki przed podjęciem leczenia. Posiadanie takiego markera pozwoliłoby potwierdzić wskazania do leczenia operacyjnego. Aktualnie nie posiadamy w grupie pacjentów z podejrzeniem nowotworu RCC biomarkera o znaczeniu diagnostycznym.

Ocena rokowania pacjentów z RCC w stadium zaawansowanym stanowi kolejny problem, który wymaga udoskonalenia. Podobnie jak w grupie pacjentów w stadium zlokalizowanym RCC ocena ta oparta jest o nomogramy uwzględniające dane patologiczne, kliniczne oraz poszczególne parametry biochemiczne. Do najczęściej wykorzystywanych nomogramów w praktyce klinicznej zalicza się nomogramy według MSKCC oraz IMDC [57]. Jednak wraz z pojawieniem się wielu nowych wariantów leczenia systemowego pojawił się problem z ich precyzyjnym doбором do konkretnego pacjenta. Aktualnie prowadzone są badania nad markerami molekularnymi o znaczeniu predykcyjnym, które pozwoliłyby rozwiązać ten problem kliniczny. Dotychczas wykazano, że wystąpienie mutacji w obrębie charakterystycznej dla RCC grupy genów: PBRM1, BAP1, SETD2, KDM5C oraz TP53 (ang. Tumor protein 53) może mieć znaczenie predykcyjne dla terapii systemowej z wykorzystaniem inhibitorów receptora VEGF [65].

Istotnym ograniczeniem jest jednak sposób pobrania materiału do badań molekularnych, które potwierdzą obecność powyższych mutacji. W obecnej formie możliwe jest jedynie wykonanie tradycyjnej biopsji narządowej. Biorąc pod uwagę zjawisko heterogenności obecne w nowotworach RCC, to w szczególności w stadium przerzutowym wykonanie biopsji jedynie ogniska pierwotnego może być badaniem suboptymalnym. Poszukiwane są zatem nowe rodzaje markerów, które pozwolą poprawić omawiane kwestie.

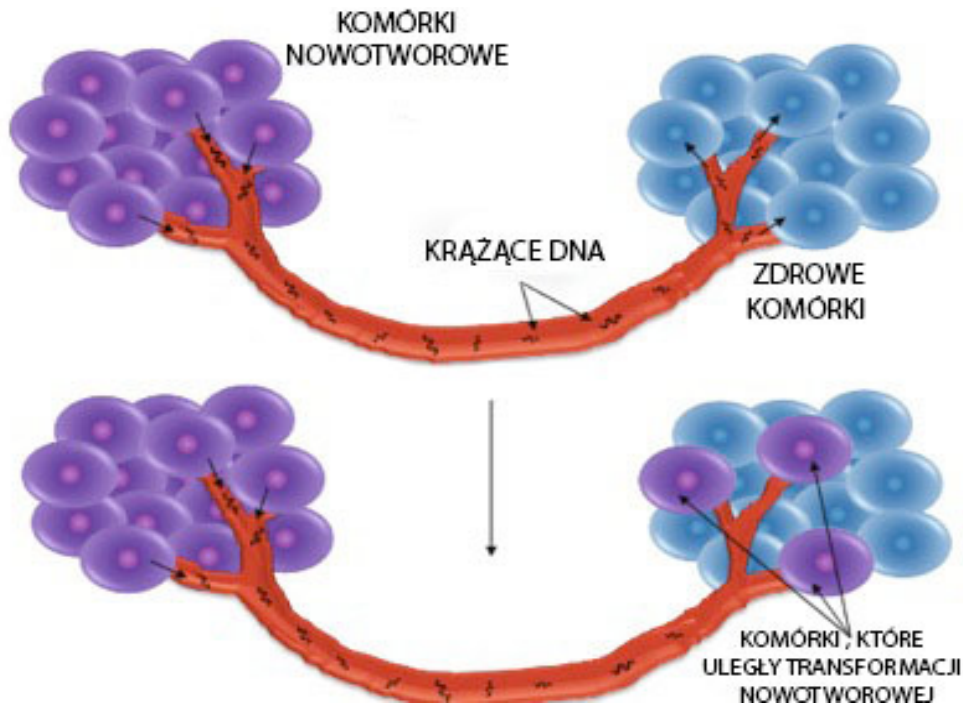
1.12. BIOLOGIA I ZNACZENIE KRĄŻĄCEGO DNA W PRAKTYCE KLINICZNEJ

Aktualnie w uroonkologii prowadzone są intensywne badania nad zastosowaniem biopsji płynnej w praktyce klinicznej [66]. Badanie to polega na izolacji z płynów ustrojowych cząsteczek wydzielanych przez ognisko nowotworowe. Dostępne są różne warianty biopsji płynnej oparte między innymi o izolację krążących komórek nowotworowych, krążącego miRNA oraz krążącego DNA.

DNA zlokalizowane jest w jądrze komórkowym oraz mitochondrium natomiast można je również wyizolować w znacznie mniejszych ilościach z krwi oraz z innych płynów ustrojowych [67]. DNA może być obecne w płynach ustrojowych w różnych formach do których zalicza się: krążące/wolne DNA, DNA związane z kompleksami nukleosomowymi oraz DNA zlokalizowane w pęcherzykach błonowych.

Krążące DNA jest formą niezwiązaną z innymi białkami lub innymi powierzchniami błon. Pierwsze informacje potwierdzające obecność krążącego DNA we krwi podano w latach 40 ubiegłego wieku [68]. Po 30 latach od tamtego odkrycia dowiedziono, że stężenie krążącego DNA w płynach ustrojowych jest znamienne wyższe wśród pacjentów onkologicznych aniżeli u osób zdrowych [69]. Ponadto wykazano, że istotne parametry takie jak lokalizacja, wielkość, odmiana histopatologiczna oraz unaczynienie mają istotny wpływ na stężenie krążącego DNA [70, 71]. Jednym z kolejnych ważnych odkryć było wykrycie w krążącym DNA charakterystycznej mutacji, która dotyczyła genu RAS u pacjentów z rakiem trzustki oraz szeregu charakterystycznych mutacji u pacjentów zdiagnozowanych z nowotworami w innych lokalizacjach [72]. Stanowiło to dowód, że część frakcji krążącego DNA izolowanej z płynów ustrojowych pochodzi bezpośrednio z komórek nowotworowych.

Badania eksperymentalne na szczurach wykazały, że krążące DNA może być wychwytywane przez inne komórki i wstawiane w obręb zdrowego genomu [73]. Dowiedziono także, że krążące DNA może być wychwytywane przez komórki macierzyste, które w rezultacie mogą ulec transformacji w komórki nowotworowe, przyczyniając się do powstania nowych ognisk przerzutowych. To zjawisko opisywane jest w literaturze terminem „genometastasis“ [Rycina1][74].



Rycina 1. Zjawisko Genometastasis.

Według badań doświadczalnych na modelach zwierzęcych szacuje się, że ognisko nowotworowe o masie 100 g zawiera około 3×10^{10} komórek, które uwalniają około 3,3% swojego DNA do płynów ustrojowych każdej doby [75]. W przypadku pacjentów onkologicznych nawet do 90% frakcji krążącego DNA pochodzi z komórek nowotworowych [76]. Według przeprowadzonych badań stężenie krążącego DNA u osób zdrowych nie przekracza 10ng/ml, natomiast u osób z nowotworem złośliwym może wynieść nawet 1000ng/ml [77].

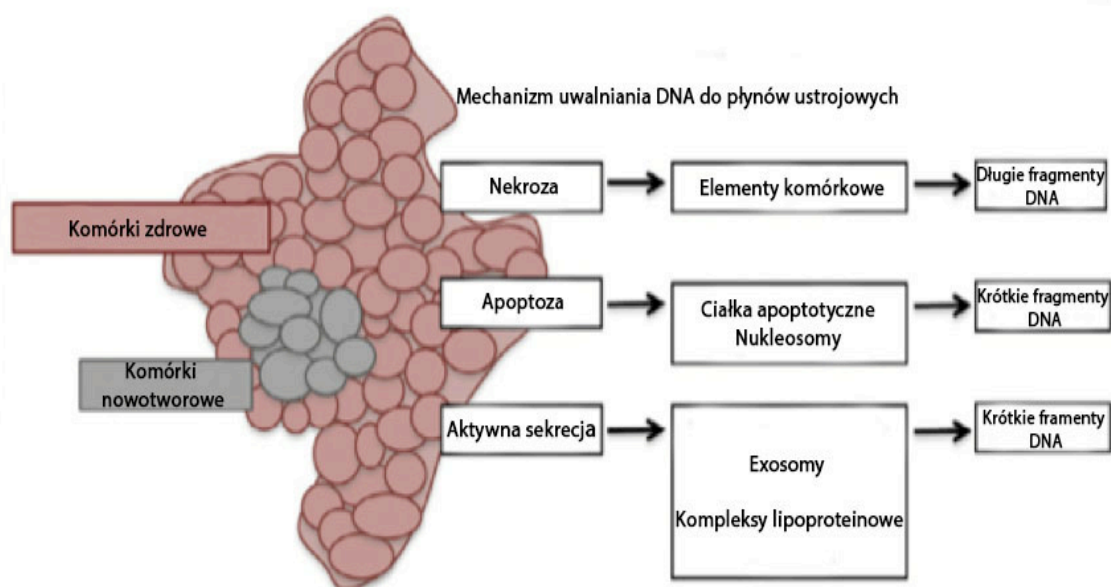
Krążące DNA jest uwalniane z komórek, głównie na drodze dwóch mechanizmów: apoptozy i nekrozy [78]. Możliwe jest również aktywne wydalenie DNA do płynów ustrojowych w procesie aktywnej sekrecji. Regulacja powyższych procesów i mechanizmów nie jest jednak jednoznacznie wyjaśniona [79]. Podwyższone stężenie krążącego DNA u pacjentów onkologicznych wynika z odmiennej biologii komórek nowotworowych, które szybciej przechodzą przez cykl komórkowy, uwalniając większe ilości DNA do płynów ustrojowych [80]. Istotnym czynnikiem jest także objętość ogniska nowotworowego, która wpływa na ilość uwalnianego DNA. Publikacje dotyczące badań na modelach zwierzęcych oraz na materiale klinicznym pochodzącym od pacjentów potwierdzają, że stopień zaawansowania choroby jest istotnym czynnikiem wpływającym na wzrost stężenia krążącego DNA. Możliwe, że wzrost objętości ogniska nowotworowego przyczynia się także do zmniejszenia stopnia utlenowania poszczególnych obszarów w guzie co skutkuje

nasileniem procesów apoptozy i nekrozy. Ponadto w prawidłowych warunkach elementy komórkowe trawione są przez makrofagi.

W przypadku wzrostu objętości ogniska nowotworowego powyższe procesy ulegają upośledzeniu co może stanowić kolejny czynnik skutkujący wzrostem stężenia krążącego DNA w płynach ustrojowych. Wpływ na stężenie krążącego DNA mają również procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie takie jak wydalanie oraz filtracja. Wydalanie krążącego DNA zachodzi w nerkach i wątrobie i jest zależne od wydolności tych narządów [81]. Krążące DNA ulega także samoistnej degradacji. Wykazano, że okres półtrwania jest zazwyczaj krótki i wynosi od 15 minut do kilku godzin [82]. Z kolei za procesy fragmentacji i degradacji DNA we krwi odpowiadają DNAzy [83]. Możliwe, że nie mają one istotnego wpływu, ponieważ krążące DNA jest związane z licznymi kompleksami nukleoprotein, które chronią je przed działaniem endonukleaz, a ponadto u pacjentów onkologicznych aktywność DNAz jest znacząco obniżona [84].

1.12.1. Integralność krążącego DNA

Mechanizm uwalniania DNA do płynów ustrojowych wpływa nie tylko znamienne na stężenie krążącego DNA w płynach ustrojowych, ale także na profil długości uwalnianych fragmentów [Rycina 2].



Rycina 2. Warianty śmierci komórkowej i ich wpływ na długość krążącego DNA uwalnianego do płynów ustrojowych.

Głównym źródłem krążącego DNA u osób zdrowych są prawidłowe komórki, które uwalniają DNA na drodze apoptozy. Apoptoza jest zaprogramowanym i regulowanym procesem śmierci komórkowej, który zapewnia prawidłową homeostazę organizmu. W przypadku procesów apoptozy dochodzi zazwyczaj do uwolnienia krótkich fragmentów o długościach 180 – 200 par zasad [85]. Z kolei w przypadku pacjentów onkologicznych znamieną część frakcji krążącego DNA pochodzi z komórek nowotworowych, które uwalniają swój materiał genetyczny nie tylko w wyniku apoptozy, ale również w wyniku procesów takich jak: nekroza, autofagia i katastrofy mitotycznej. W efekcie do płynów ustrojowych uwalniana jest frakcja krążącego DNA, która charakteryzuje się większą różnorodnością pod względem ilości par zasad. W przypadku procesów nekrozy dochodzi do uwolnienia fragmentów o różnych rozpiętościach w długości DNA wynoszących od 100 par zasad do nawet 10 tysięcy par zasad. Przypuszcza się, że w grupie pacjentów onkologicznych procesy nekrozy przeważają znamienne nad procesami apoptozy skutkując tym samym wzrostem w płynach ustrojowych stężenia krążącego DNA o większej ilości par zasad. Wykorzystanie tych różnic może stanowić podstawę do przeprowadzenia badań nad biomarkerem wykorzystywanym w chorobach nowotworowych. W literaturze ponadto stosuje się współczynnik integralności DNA, który jest stosunkiem stężenia długich fragmentów krążącego DNA do stężenia krótkich fragmentów krążącego DNA [86].

Ocena stężenia fragmentów o poszczególnych długościach może odbyć się z wykorzystaniem różnych metod biologii molekularnej. Metoda RT-PCR jest stosowana w dostępnych publikacjach naukowych. Umożliwia ona ocenę jakościową w próbkach zawierających nawet niewielką ilość DNA. Ocena wybranej sekwencji DNA jest przeprowadzona poprzez zajście reakcji barwnika SYBR z dwuniciową cząsteczką DNA co przyczynia się do emisji sygnału fluorescencyjnego [87]. Oznaczenie współczynnika integralności DNA wymaga oceny co najmniej dwóch genów dla fragmentów DNA o różnych długościach. Powszechnie stosowane w publikacjach są sekwencje ALU i LINE, które występują obficie w obrębie genomu ludzkiego i stanowią odpowiednio 1.2 miliona oraz 0.5 miliona powtórzeń retrospektywnie na genom [88, 89]. Sekwencje te odgrywają rolę w procesach naprawy DNA, transkrypcji i transpozycji. Metoda opracowana przez grupę badawczą Umetani i wsp. oceniająca sekwencje ALU 247 i 115 jest często wykorzystywana w publikacjach naukowych [90]. Fragmenty ALU115 reprezentują krótkie fragmenty DNA, pochodzące z procesów apoptozy od prawidłowych komórek, natomiast ALU 247 stanowią dłuższe fragmenty DNA pochodzenia nekrotycznego reprezentujące komórki nowotworu złośliwego. Stosunek stężeń ALU 247/ALU115 stanowi współczynnik integralności DNA.

1.12.2. Zastosowanie krążącego DNA w onkologii

Od wielu dekad niezmiennie diagnostyka pacjentów onkologicznych obejmuje najczęściej wykonanie biopsji tkankowej nowotworu oraz przeprowadzenia diagnostyki obrazowej. W poszczególnych typach nowotworów złośliwych możliwe jest także uzupełnienie diagnostyki o klasyczne markery takie jak np. PSA w raku prostaty, AFP/ BHCG/ LDH w raku jądra czy też CEA w raku jelita grubego. Klasyczne markery cechuje jednak niska czułość i specyficzność co powoduje, że ich wpływ na decyzje kliniczne jest w wielu przypadkach ograniczony [91]. W związku z powyższym nieustannie prowadzone są badania nad nowymi markerami, które mogą przyczynić się do poprawy diagnostyki i pozwolą lepiej określić rokowanie pacjentów. Izolacja krążąca DNA z płynów ustrojowych obok izolacji krążących komórek nowotworowych i krążącego miRNA wpisuje się w strategię określaną jako biopsja płynna. [92, 93] [Tabela 2].

Tabela 2. Zalety biopsji płynnej względem klasycznej biopsji tkankowej.

Klasyczna biopsja tkankowa	Biopsja płynna
Procedura inwazyjna - ryzyko powikłań	Postępowanie mało inwazyjne
Ograniczona wiarygodność ze względu na heterogenność oraz wieloogniskowość choroby	Lepsza wiarygodność ze względu na brak wrażliwości na heterogenność oraz wieloogniskowość choroby
Obserwacja i monitorowanie pacjenta znacząco utrudnione	Pozwala na dynamiczną ocenę zmian na poziomie DNA w dowolnym punkcie czasowym choroby

Istnieje szereg potencjalnych możliwości wykorzystania krążącego DNA w praktyce onkologicznej [Rycina 3].

Wczesna wykrywalność i profilaktyka nowotworów złośliwych

W pierwszej kolejności ocena krążącego DNA może być wykorzystana w celu identyfikacji nowotworu złośliwego we wczesnym stadium zaawansowania. Aktualnie w celu zwiększenia wykrywalności i jednocześnie ograniczenia umieralności towarzystwa naukowe rekomendują programy profilaktyki wtórnej dla poszczególnych typów nowotworów: płuc, piersi, szyjki macicy oraz jelita grubego. Programy profilaktyczne oparte są między innymi o badania obrazowe, których głównym ograniczeniem jest niemożność zidentyfikowania choroby we wczesnym stadium, w którym nie uformowane zostało jeszcze lite ognisko nowotworowe. Ponadto część populacji może być nosicielami mutacji, które predysponują do rozwoju poszczególnych typów nowotworu złośliwego. Identyfikacja tych osób może stanowić wskazanie do wdrożenia nadzoru onkologicznego. Obecnie prowadzone są badania, których

celem jest opracowanie testu z krwi lub innych płynów ustrojowych umożliwiających kompleksową identyfikację mutacji w krążącym DNA.

W jednym z badań wykazano, że obecnością mutacji KRAS(ang. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) i p53 w krążącym DNA koreluje ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy pęcherza moczowego (OR 4.25) [94].

CancerSeek jest z kolei innym przykładem testu z krwi, którego celem jest także detekcja nowotworu we wczesnym stadium zaawansowania [95]. W teście oceniano obecność 61 specyficznych dla raka mutacji w krążącym DNA oraz uwzględniono również obecność 8 białek uczestniczących w szlakach kancerogenezy. Na grupie ponad 1000 pacjentów z różnymi nowotworami średnia wykrywalność oscylowała w okolicach 70%. W grupie osób zdrowych, która obejmowała 812 osób test był dodatni jedynie w 7 przypadkach co świadczy o bardzo niskim odsetku fałszywie dodatnich wyników.

Powyższe dwa badania wskazują, że jest możliwe wyizolowanie krążącego DNA i poddanie go analizie w następujących celach: 1) w celu wykrycia mutacji zwiększających predyspozycję do rozwoju nowotworu złośliwego lub 2) w celu wykrycia nowotworu złośliwego we wczesnym stadium zaawansowania.

Marker o potencjale diagnostycznym i prognostycznym

W piśmiennictwie dostępne są prace badawcze przeprowadzone na różnych grupach pacjentów onkologicznych, które wskazują, że krążące DNA może mieć znaczenie diagnostyczne. Udowodniono między innymi, że stężenie krążącego DNA w płynach ustrojowych koreluje z objętością i stopniem zaawansowania choroby nowotworowej [96]. Dostępne są również badania porównujące stężenie krążącego DNA z klasycznymi markerami dostępnymi w niektórych typach nowotworów. Przykładowo w jednym z badań przeprowadzonym na grupie pacjentów z przerzutowym rakiem piersi wykazano, że ocena ilościowa krążącego DNA była bardziej czułym i specyficznym markerem korelującym ze stopniem zaawansowania choroby niż klasyczny marker CA 15-3 [97].

W licznych badaniach podjęto również próbę wykorzystania stężenia krążącego DNA jako markera prognostycznego. Jedna z przeprowadzonych metaanaliz wykazała, że wysokie stężenia krążącego DNA wiązały się z gorszymi wynikami przeżycia specyficznego dla raka w grupie pacjentów zdiagnozowanych niedrobnokomórkowym rakiem płuca w III i IV stadium zaawansowania [98]. Podobne wyniki uzyskano także w badaniach dotyczących pacjentów z nowotworami złośliwymi w innych lokalizacjach [99, 100].

Marker do monitorowania przebiegu choroby

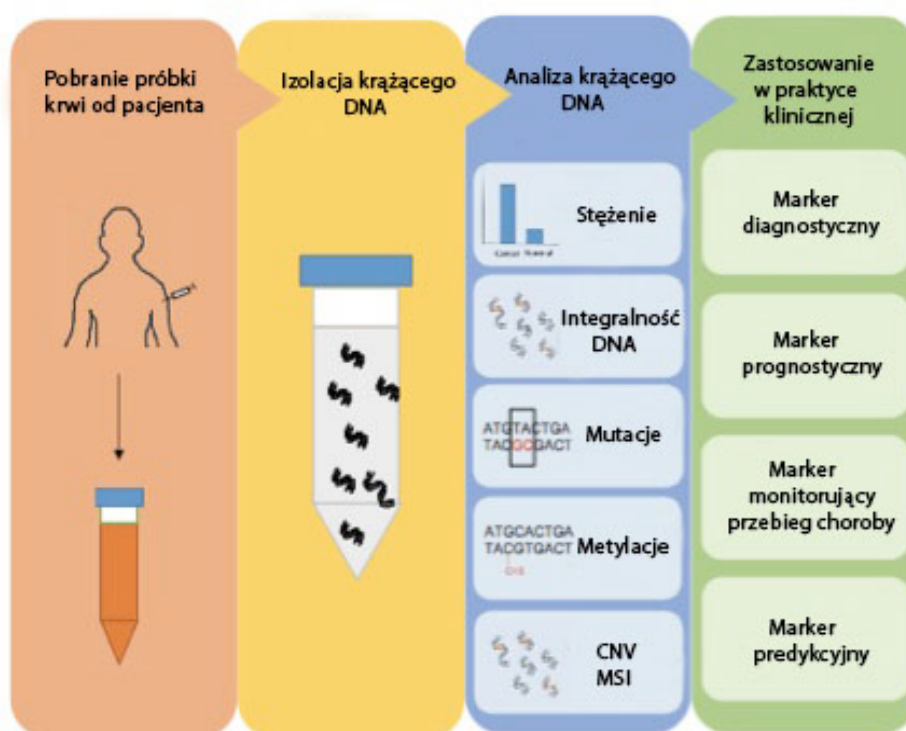
Krążące DNA może być również wykorzystane jako marker służący do monitorowania pacjentów po zastosowanym leczeniu w celu wykrycia progresji choroby. Obecne standardy w

onkologii opierają się na cyklicznym powtarzaniu badań obrazowych, monitorowaniu stężenia klasycznych markerów takich jak np. PSA w raku prostaty czy AFP, B-HCG, LDH w raku jądra oraz w razie konieczności wykonania biopsji ogniska podejrzanego o wznowę procesu nowotworowego. Szacuje się, że ognisko nowotworowe o populacji do 44 milionów komórek jest niewykrywalne w badaniach obrazowych, jednakże może przyczynić się do istotnego zwiększenia stężenia krążącego DNA w płynach ustrojowych [101]. Co więcej w szeregu badań klinicznych wykazano, że stężenie krążącego DNA zmienia się dynamicznie w zależności od przebiegu choroby. W przypadku progresji choroby stężenie krążącego DNA rośnie, natomiast w przypadku remisji maleje. Ponadto zmiany stężenia krążącego DNA mogą wyprzedzać pojawienie się nieprawidłowości świadczących o progresji choroby w badaniach obrazowych. Ze względu na krótki okres półtrwania DNA prosty pomiar ilościowy może być, także bardziej wiarygodny niż aktualnie wykorzystywane klasyczne markery takie jak np. PSA w raku prostaty, którego okres półtrwania jest znacznie dłuższy [102]. Potencjalne zastosowanie krążącego DNA może zatem obejmować monitorowanie zarówno pacjentów z chorobą zlokalizowaną np. po leczeniu operacyjnym w celu wykrycia wznowy choroby (miejscowej lub odległej) a także pacjentów z chorobą zaawansowaną w celu monitorowania efektywności leczenia systemowego.

Marker o charakterze predykcyjny

Krążące DNA może być w dalszej kolejności wykorzystane w praktyce klinicznej jako marker predykcyjny. W zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej standardem leczenia jest terapia systemowa. W wyniku przeprowadzonych w ostatnich latach serii badań genetycznych obejmujących min. sekwencjonowanie DNA nowej generacji poznano w poszczególnych nowotworach mutacje, które mogą warunkować wrażliwość lub oporność na dany typ terapii [103]. W poszczególnych typach nowotworów złośliwych jak np. nowotworze złośliwym płuca wykorzystuje się powyższą wiedzę w celu zastosowania najbardziej optymalnego leku [104]. Taka strategia leczenia określana jest jako terapia celowana i wymaga pobrania materiału tkankowego pochodzącego z ogniska nowotworowego w celu określenia mutacji mających znaczenie kliniczne. Pobranie materiału najczęściej obejmuje wykonanie inwazyjnej biopsji tkankowej. W grupie pacjentów w przerzutowym stadium zaawansowania choroby nowotworowej badanie biopsji tkankowej powinno uwzględniać nie tylko ognisko pierwotne, ale także pozostałe ogniska, które mogą różnić się pod względem potencjału genetycznego od ogniska pierwotnego. W związku z powyższym biopsja tkankowa wyłącznie ogniska pierwotnego lub jednego z ognisk przerzutowych będzie badaniem suboptymalnym, gdyż nie pozwoli na pełne określenie heterogenności i klonalności komórkowej nowotworu.

Ponadto komórki nowotworowe mogą ulegać samoistnej transformacji w bardziej złośliwe klony, a także w mechanizmie uodporniania się na stosowaną terapię co oznaczałoby konieczność powtarzania biopsji wielokrotnie w różnych odstępach czasowych u tego samego pacjenta [105]. W praktyce klinicznej jest to bardzo trudne do wykonania, ponieważ badanie biopsji tkankowej jest procedurą inwazyjną obciążoną powikłaniami. Izolacja krążącego DNA z płynów ustrojowych może potencjalnie umożliwić całościowe śledzenie i ewolucje zmian genetycznych reprezentujących wszystkie ogniska chorobowe w sposób mało inwazyjny w dowolnych punktach czasowych z pominięciem biopsji tkankowej.



Rycina 3. Potencjalne możliwości zastosowania krążącego DNA w praktyce onkologicznej.

2. CELE PRACY

1. Zbadać czy ocena ilościowa krążącego DNA (stężenie krążącego DNA) oraz ocena jakościowa krążącego DNA (wartość współczynnika integralności DNA) we krwi mają znaczenie diagnostyczne w grupie pacjentów z rozpoznaniem nowotworem nerki przed podjęciem leczenia operacyjnego.

2. Ocenic czy badane parametry: stężenie krążącego DNA oraz wartość współczynnika integralności DNA we krwi mają znaczenie prognostyczne w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC przed podjęciem leczenia operacyjnego.

3. Ocenic wpływ obecności klasycznych czynników prognostycznych dla ccRCC tj. stopnia zaawansowania nowotworu w skali TNM, stopnia zróżnicowania nowotworu w skali Fuhrmana, średnicy zmiany pierwotnej i obecności inwazji naczyniowej na stężenie krążącego DNA oraz wartość współczynnika integralności DNA we krwi w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC.

4. Poddać ocenie wpływ występowania objawów klinicznych oraz czynników epidemiologicznych odgrywających rolę w patogenezie RCC (tj.: wiek, płeć, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, współczynnik BMI, palenie tytoniu) na stężenie krążącego DNA oraz wartość współczynnika integralności DNA we krwi.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Materiał kliniczny

Do badania zakwalifikowano 74 pacjentów zdiagnozowanych z nowotworem nerki (z wykorzystaniem technik obrazowych – tomografia komputerowa/rezonans magnetyczny), którzy byli hospitalizowani i operowani w Klinice Urologii i Onkologii Urologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2011-2019. Do dalszych analiz badawczych wyselekcjonowano grupę pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie nowotworem ccRCC (grupa I n=46) oraz grupę pacjentów z nowotworem oncocytoma (grupa II n=7). Z badania wykluczono natomiast pacjentów zdiagnozowanych jako inny nowotwór nerki brodawkowaty (n=4), angiomiolipoma (n=4). Do badania zakwalifikowano, także 17 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną (pacjentów Kliniki Urologii). Wszyscy uczestnicy przed przystąpieniem do badań byli poinformowani o przebiegu i zasadności projektu oraz wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w pracy naukowej (załącznik 1). Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wyraziła zgodę na projekt (Uchwała nr 568/17) (załącznik 2).

Każdy pacjent przy przyjęciu do Kliniki w ramach kwalifikacji do zabiegu był poddany badaniu przedmiotowemu i podmiotowemu (z wykorzystaniem ankiety – załącznik 3), ocenie anestezjologicznej oraz badaniu USG układu moczowego. W ramach badania podmiotowego analizowano występowanie objawów klinicznych choroby oraz czynników ryzyka rozwoju raka nerki: otyłości, palenia tytoniu, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy (tabela 3). W ramach kwalifikacji wykonano również podstawowe badania laboratoryjne obejmujące: morfologię krwi z rozmazem, grupę krwi, INR, APTT, oznaczenie w surowicy krwi stężenia glukozy elektrolitów (Na^+ , K^+) i kreatyniny. Stopień zaawansowania klinicznego choroby został określony na podstawie badań obrazowych obejmujących tomografię komputerową jamy brzusznej i miednicy ze wzmocnieniem kontrastowym oraz badanie obrazowe klatki piersiowej (tomografia komputerowa lub zdjęcie przeglądowe w projekcji AP i bocznej).

Kryteria wykluczenia zostały zweryfikowane w badaniu przedmiotowym i podmiotowym obejmowały: zły stan ogólny (według skali ECOG >1), obciążenie chorobą zapalną, chorobą autoimmunologiczną, niewydolnością nerek i obecnością innej odmiany nowotworu złośliwego.

Zabiegowi usunięcia guza metodą NSS poddanych zostało 9 pacjentów natomiast

nefrektomii radykalnej 44 pacjentów. Wybór metody operacyjnej był uzależniony od wielkości i lokalizacji guza w nerce. Wszystkie preparaty uzyskane podczas operacji były poddane ocenie histopatologicznej w Pracowni Anatomii Patologicznej w Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim im. Józefa Strusia w Poznaniu. W ocenie histopatologicznej uwzględniono odmianę nowotworu według klasyfikacji WHO, stopień zaawansowania według skali TNM, stopień złośliwości histopatologicznej według skali Fuhrmana, rozmiar nowotworu oraz weryfikowano obecność inwazji sieci naczyniowej i martwicy. Charakterystykę patologiczną przedstawiono w tabeli 4.

W celu przeprowadzenia analiz statystycznych pacjentów zdiagnozowanych z ccRCC pogrupowano na podstawie stopnia zaawansowania w skali TNM w następujące podgrupy: pacjentów w stadium miejscowego zaawansowania (n=35) oraz pacjentów w stadium przerzutowym (n=11). Również na podstawie stopnia zróżnicowania histopatologicznego według skali Fuhrmana stworzono dwie podgrupy o niskim stopniu zróżnicowania histopatologicznego G1+G2 (n=30) oraz wysokim stopniu zróżnicowania histopatologicznego G3+G4 (n=16).

Tabela 3. Charakterystyka patologiczna pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu

Charakterystyka	Grupa I – ccRCC N = 46	Grupa II – Oncocytoma N = 7
Rodzaj zabiegu		
Nefrektomia	38	6
NSS	8	1
Stopień zaawansowania patologicznego (TNM)		
T1N0M0	18	4
T2N0M0	2	2
T3N0M0	14	1
T4N0M0	1	
T1-4N0M1	11	
Lokalizacja przerzutu		

Stopień złośliwości histopatologicznej (skala Fuhrmana)		
G1	8	
G2	22	
G3	12	
G4	4	
Średnica guza – największy wymiar (mm)		
Średnia	57	36
Mediana	60	30
Odchylenie std.	29	13
LVI +	13	2
SSIGN		
0-1	16	
2-5	16	
6-9	10	
>9	4	

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna osób biorących udział w badaniu z podziałem na grupy badawcze

Charakterystyka	ccRCC	Oncocytoma	Zdrowi
Wiek			
Średnia	59.8	59.1	51
Mediana	60	59	52
Odchylenie std.	8.5	8.1	17.9
Płeć			
Kobieta	12	4	7
Mężczyzna	34	3	10
BMI			
Norma	13	0	7
Nadwaga	18	3	10

Otyłość	15	4	0
Objawy choroby	21	1	
Krwiomocz	10	0	
Ból	20	1	-
Wyczuwalny guz	6	0	
Utrata wagi	6	0	
Choroby towarzyszące			
Nadciśnienie	30	3	7
Cukrzyca t1.	1	1	0
Cukrzyca t2	7	0	4
Niewydolność nerek	0	0	0
Wywiad onkologiczny	18	0	0
RCC w rodzinie	3	0	0
Inny nowotwór (w rodzinie)	15	0	0
Palacze tytoniu	19	3	0
Ilość paczkołat			
Średnia	29.6	20	0
Mediana	30	20	0
Odchylenie std.	10.5	10	0
Zgon w wyniku progresji choroby nowotworowej	11		
Zgon z innej przyczyny	0		
Sredni czas obserwacji (miesiące)	34	-	-
Mediana czasu obserwacji (miesiące)	24		

3.2. Metody

3.2.1. Pobieranie materiału

Przed zabiegiem operacyjnym od każdego pacjenta pobrano po 9ml krwi do 4 probówek zawierających EDTA. Na sali operacyjnej, tuż po wycięciu nowotworu lub całej

nerki pobrano z części guza dwa wycinki - I z części centralnej, II z części obwodowej oraz wycinek ze zdrowego mięszu nerki w przypadku nefrektomii. Wszystkie te czynności wykonano w warunkach sterylnych. Powyższy materiał tkankowy umieszczono w osobnych probówkach zawierających RNA later i opisano. Probówki z krwią i z materiałem tkankowym przekazano w dniu operacji do PTW w temperaturze 0°C. Próbkę krwi pacjentów zostały natychmiast po przetransportowaniu poddane wirowaniu przy prędkości 400g przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu oddzielenia osocza, które następnie zostało zamrożone w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

3.2.2. Opracowanie materiału

Izolacja krążącego DNA

Krążące DNA zostało wyekstrahowane z osocza metodą kolumnkową przy pomocy kitu QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) według załączonego protokołu. Izolacje przeprowadzono z wykorzystaniem 3ml osocza, które po rozmrożeniu zostało zwirowane (14.000 rpm, 10minut) w temperaturze pokojowej. Do zawieszenia DNA wykorzystano bufor AVE w objętości 25 µL. Wyizolowane DNA przechowywano celem dalszych analiz w temperaturze -20°C.

Materiały: QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN), łaźnia wodna, probówki eppendorf, wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych, pipety półautomatyczne, sprzęt ochrony osobistej, alkohol etylowy 96%,

Ocena ilościowa oraz jakościowa krążącego DNA

Korzystając z metody fluorymetrycznej zmierzono stężenie wyizolowanych produktów w 1µl objętości próbki. Ilość DNA wyrażono w jednostce - ng/µl. W kolejnym etapie wykonano analizę jakościową mającą na celu ocenę długości wyizolowanych fragmentów DNA z użyciem systemu Agilent DNA 1200.

Materiały: Qubit® 2.0 Fluorometer Thermo Fisher Scientific, Agilent DNA 1200, probówki Eppendorf, jednorazowe plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych, pipety półautomatyczne, zestaw odczynników do pomiaru stężenia dwuniciowego DNA (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen) oraz dedykowane probówki polipropylenowe, cienkościenne o objętości 500 µL sprzęt ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary, wirówka.

Pomiar stężenia krążącego DNA i ocena współczynnika integralności DNA metodą RT – PCR

W celu zmierzenia stężenia krążącego DNA przeprowadzono reakcje PCR w czasie rzeczywistym ze starterami komplementarnymi do sekwencji transpozonu LP1A2,

umożliwiający amplifikację fragmentów o długości 90 par zasad oraz o długości 222 par zasad. Transpozon L1PA2 stanowi podrodzinę sekwencji LINE (długie rozproszone elementy jądrowe), które są zlokalizowane w genomowym DNA pochodzenia jądrowego. Rodzina L1 stanowi 17% ludzkiego genomu. Sekwencja LP1A2 jest rozproszona w obrębie genomu w związku z czym jej amplifikacja w trakcie reakcji real time PCR umożliwia pomiar stężenia krążącego DNA z większą dokładnością. Całkowite stężenie krążącego DNA odzwierciedlało stężenia krótkich fragmentów L1PA2 o długości 90 pz. Z kolei ocena współczynnika integralności DNA stanowi iloczyn stężenia LP1A2 222 do LP1A2 90. Ponieważ stężenie LP1A2 90 uwzględnia również fragmenty LP1A2 222 to wartość współczynnika integralności nie powinna być większa niż 1. Na podstawie dostępnej literatury przyjmuje się, że wartość współczynnika integralności DNA powinna być wyższa u osób z nowotworem złośliwym (względem osób zdrowych) oraz wzrastać wraz ze zwiększeniem stanu parametrów świadczących o zaawansowaniu choroby takich jak np. skala TNM lub stopień złośliwości histopatologicznej.

Reakcje RT-PCR przeprowadzono z użyciem barwnika SYBR green (VWR) na systemie CFX96 Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad) w 48 dołkowych płytkach PCR (Cytogen). W tym celu zostały zaprojektowane startery specyficzne do DNA z wykorzystaniem programu Primer 3 (według publikacji Breitbach S. i wsp. – 2014).

Sekwencje primerów:

L1PA2 90 5'-TGCCGCAATAAACATACGTG-3', 5'-GACCCAGCCATCCC ATTAC-3'

LP1A2 222 5'-TGCCGCAATAAACATACGTG-3', 5'-AACAAACAGGTGCTGGAGAGG-3'

Na każdą reakcję wykorzystano mieszaninę o objętości 10 µl w skład, której wchodziły następujące produkty:

Mix Starterów – 1.2µl;

SYBR - 5µl;

Woda – 1.3µl;

Matryca DNA – 2.5 µl.

Warunki reakcji RT-PCR przedstawiono poniżej w tabeli 5.

Tabela 5. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym

ETAP	Liczba cykli/etapów	Czas	Temperatura
Aktywacja polimerazy	1	10min	95°C
Denaturacja	1	10s	95°C
Przyłączenie starterów, elongacja	40	60s	60°C
Analiza topnienia	Etap I	15s	95°C
	Etap II	15s	55°C
	Etap III	15s	95°C

Każda z prób była analizowana w dwóch powtórzeniach technicznych. W celu walidacji wyników przeprowadzono powtórzenia biologiczne na losowo wybranych 12 próbkach (15% badanych próbek) pacjentów, obejmujące ponowną izolację krążącego DNA z osocza, pomiar stężenia DNA (Qbit) oraz reakcje RT - PCR.

Dla każdego z badanych genów przygotowano krzywą wzorcową. Krzywa wzorcowa umożliwiła odczytanie wartości stężenia badanych fragmentów krążącego DNA w próbkach pacjentów oraz określenie wydajności reakcji PCR. Matrycą wykorzystaną do przygotowania krzywej wzorcowej była przygotowana wcześniej próbka zawierająca DNA genomowe. Stężenie DNA genomowego w próbce zostało określone metodą spektrometryczną (Nanodrop). Na podstawie tego wyniku przygotowano serie czterech rozcieńczeń DNA genomowego o ustalonych stężeniach w stosunkach: 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Krzywa wzorcowa była wyznaczona przy każdej reakcji PCR w dwóch powtórzeniach.

3.2.3. Metody statystyczne

Realizacja pierwszego celu pracy zostanie przeprowadzona poprzez porównanie badanych parametrów pomiędzy trzema grupami badawczymi (grupa I – pacjenci zdiagnozowani w badaniu histopatologicznym z nowotworem ccRCC, II- pacjenci zdiagnozowani w badaniu histopatologicznym z nowotworem oncocytoma oraz grupa III – kontrolna stanowiona przez osoby zdrowe).

Analizowane parametry (pomiar stężenia krążącego DNA metodą fluorymetryczną, pomiar stężenia krążącego DNA o długości 90pz i 222pz, współczynnik integralności DNA)

opisane zostaną za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany, wartości minimalnej i maksymalnej. Zgodność z rozkładem normalnym sprawdzona zostanie przy pomocy testu Shapiro-Wilka w każdej z analizowanych grup. W przypadku rozkładu normalnego do porównania dwóch grup stosowany zostanie test t-Studenta w modelu zmiennych niezależnych dla wariancji homogenicznych lub test Welcha dla wariancji heterogenicznych. W razie braku zgodności z rozkładem normalnym stosowany zostanie test nieparametryczny Manna -Whitneya. Do porównania więcej niż dwóch grup badawczych, ponieważ nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym lub wariancje w grupach nie były homogeniczne zastosowany zostanie test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna.

W oparciu o pojęcie czułości i swoistości testu diagnostycznego dla każdej wartości (punktu odcięcia) analizowanych parametrów wyznaczona zostanie krzywa ROC (Receiver Operating Characteristic). Następnie obliczone zostanie pole powierzchni pod krzywą AUC (Area Under Curve) i zbadana jego istotność. Dla parametrów, których AUC będzie istotne, wyznaczony zostanie optymalny punkt odcięcia dla którego czułość i swoistość osiągną wartość optymalną.

W celu zbadania zależności między stężeniem krążącego DNA a wielkością zmiany pierwotnej obliczony zostanie współczynnik korelacji nieparametrycznej Spearmana.

Na podstawie informacji o czasie przeżycia (dla pacjentów zmarłych) i czasie obserwacji (dla pacjentów żyjących) wyznaczone zostaną krzywe Kaplana-Meiera w celu oszacowania prawdopodobieństwa przeżycia względem wartości stężenia całkowitego krążącego DNA oraz wartości współczynnika integralności. Do porównania dwóch krzywych Kaplana-Meiera użyty zostanie testu Log-rank. W celu zbadania względnego wpływu stężenie krążącego DNA i współczynnika integralności DNA na wyniki przeżycia przeprowadzony zostanie model regresji COXA. W modelu regresji COXA uwzględnione zostaną także inne czynniki prognostyczne typowe dla ccRCC w celu wykazania czy badane parametry mogą być uznane jako niezależny czynnik prognostyczny.

Dla czynników ryzyka zwiększających wystąpienie RCC (płeć, wiek, nadciśnienie, cukrzyca, palenie tytoniu, wskaźnik BMI) wyznaczony zostanie ilorazy szans z 95% przedziałami ufności przy pomocy regresji logistycznej. Wyznaczone zostaną modele jednowymiarowe oraz model wielowymiarowy.

Przyjęto poziom istotności $p=0.05$.

Do obliczeń zastosowano pakiet statystyczny SPSS oraz Statistica.

4. WYNIKI

4.1. Wpływ czynników epidemiologicznych na stężenie krążącego DNA oraz na wartość współczynnika integralności DNA

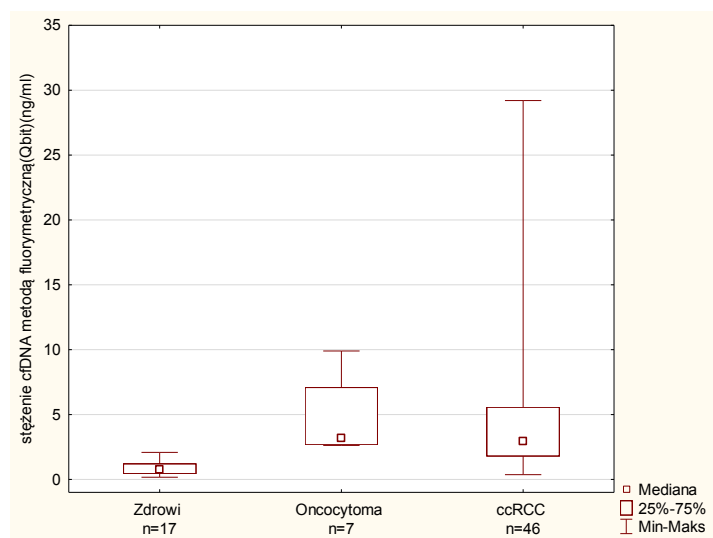
W pierwszej kolejności zweryfikowałem wpływ występowania czynników epidemiologicznych zwiększających ryzyko zachorowania na RCC (wiek, płeć męska, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, poziom współczynnika BMI, palenie tytoniu) oraz obecność objawów klinicznych na badane parametry (stężenie krążącego DNA, współczynnik integralności DNA). Przeprowadzone analizy statystyczne nie wykazały istotnej zależności pomiędzy stężeniem krążącego DNA zmierzonym zarówno metodą fluorometryczną jak i PCR, a występowaniem czynników epidemiologicznych dla RCC oraz obecnością objawów klinicznych choroby w żadnej z badanych grup (test Manna Whitneya, $p > 0.05$). Przeprowadzone analizy statystyczne nie wykazały, także aby wartość współczynnika integralności DNA była w badanych grupach zależna od czynników epidemiologicznych dla RCC ($p > 0.05$, test Manna Whitneya). Wykazałem natomiast, że w grupie pacjentów z ccRCC, osoby palące tytoń (obecnie lub w przeszłości) cechowały się wyższą wartością współczynnika integralności DNA w porównaniu do osób z ccRCC niepalących nigdy (0.24 vs. 0.30, $p < 0.05$, test Manna Whitneya). Również pacjenci z grupy ccRCC, u których stwierdzono objawy kliniczne choroby cechowali się wyższą wartością współczynnika integralności DNA w porównaniu do osób, u których nie stwierdzono objawów klinicznych (0.25 vs. 0.30, $p < 0.05$, test t-Studenta).

4.2. Pomiar stężenia krążącego DNA oraz ocena współczynnika integralności DNA w grupach: pacjentów z nowotworem ccRCC; pacjentów z nowotworem oncocytoma oraz w grupie kontrolnej.

W kolejnych analizach dokonałem porównania stężenia krążącego DNA pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi. Pomiar przeprowadzony metodą fluorometryczną wykazały, że stężenie krążącego DNA było istotnie statystycznie wyższe w grupach pacjentów z nowotworem ccRCC ($n=46$) oraz oncocytomą ($n=7$) względem stężenia krążącego DNA w grupie kontrolnej ($n=17$) ($p < 0.001$, test Kruskala-Wallisa). Stężenie krążącego DNA w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma było wyższe względem stężenia krążącego DNA w grupie pacjentów z ccRCC, jednak różnica wartości nie była istotna statystycznie ($p > 0.05$, test Kruskala-Wallisa) (Tabela 6, Rycina 4).

Tabela 6. Poziomy stężenia krążącego DNA zmierzony metodą fluorymetryczną (ng/ml) w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z ccRCC oraz w grupie pacjentów z oncocytomą.

Parametr	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie std.
Zdrowi n-17	0.91	0.76	0.17	2.08	0.61
Oncocytoma n-7	4.85	3.16	2.62	9.9	2.78
ccRCC n-46	4.87	2.95	0.37	29.1	5.09



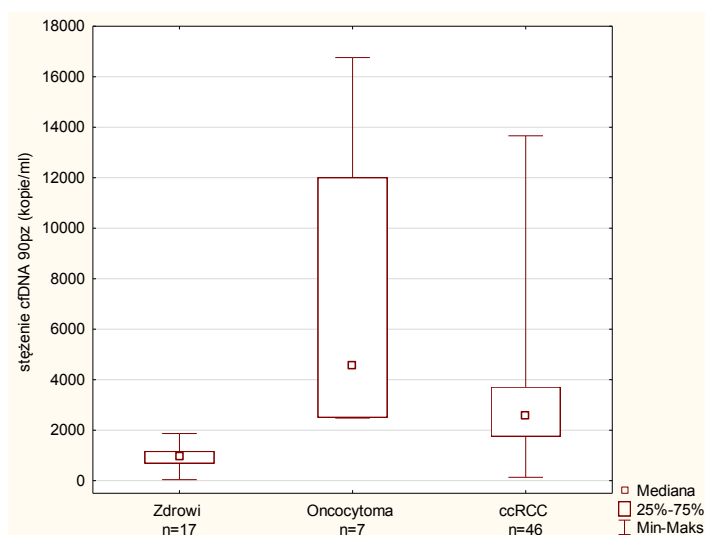
Rycina 4. Pomiar stężenia krążącego DNA metodą fluorymetryczną w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z ccRCC oraz w grupie pacjentów z oncocytomą

Następnie porównałem poziomy stężenie krążącego DNA pomiędzy badanymi grupami, które zostały przeprowadzone metodą PCR. Wykazałem, że poziomy stężenie dla obydwóch frakcji krążącego DNA o długości 90pz i 222pz zmierzone metodą PCR w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.001$, test Kruskala-Wallisa). Poziomy stężenie obydwóch frakcji krążącego DNA o długości 90pz i 222 pz były także wyższe w grupie pacjentów z oncocytomą w porównaniu do grupy pacjentów z ccRCC natomiast, nie wykazałem aby różnica wartości była istotna statystycznie ($p > 0.05$, test Kruskala-Wallisa) (Tabela 7, Rycina 5).

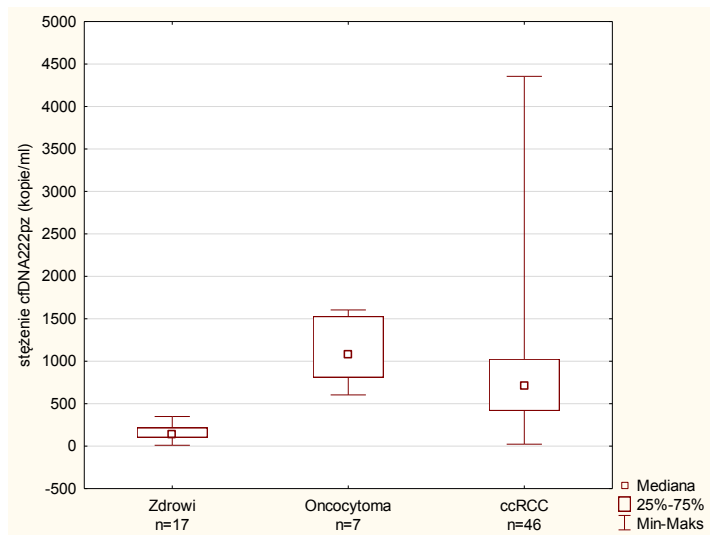
Natępnie porównałem poziom współczynnika integralności DNA pomiędzy badanymi grupami i wykazałem, że w grupie pacjentów z ccRCC był on wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.001$, test Kruskala-Wallisa). Współczynnik integralności DNA w grupie pacjentów z ccRCC był także wyższy w porównaniu do grupy pacjentów z oncocytomą, jednak różnica wartości była nieistotna statystycznie ($p > 0.05$ test Kruskala-Wallisa). Również pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z oncocytomą nie zaobserwowałem różnicy istotnej statystycznie ($p > 0.05$, test Kruskala-Wallisa)(Tabela 7, Rycina 7).

Tabela 7. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma [Me;M/(SD)].

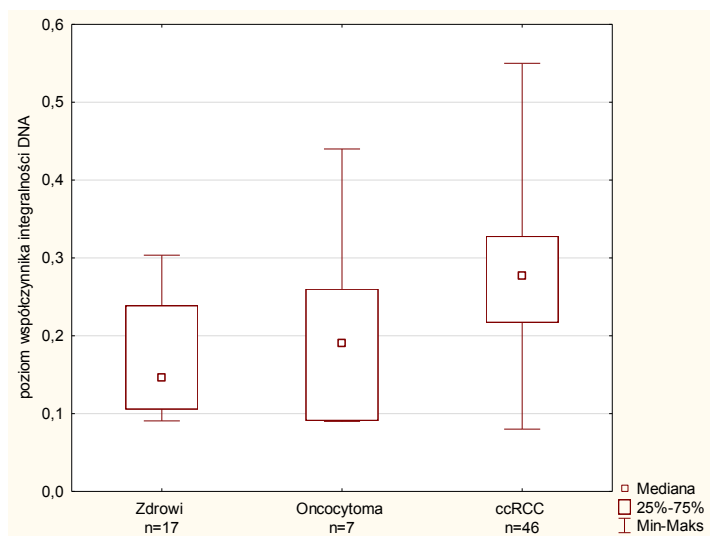
Parametr	cfDNA 90pz kopie/ml	cfDNA 222pz kopie/ml	Integralność
Zdrowi n-17	960; 931 (490)	140; 151 (94)	0.15; 0.17 (0.07)
oncocytoma n-7	4558; 7698 (5601)	1082; 1122 (359)	0.19; 0.20 (0.12)
ccRCC n-46	2588; 3172 (2554)	714; 888 (790)	0.28; 0.28 (0.09)



Rycina 5. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma.

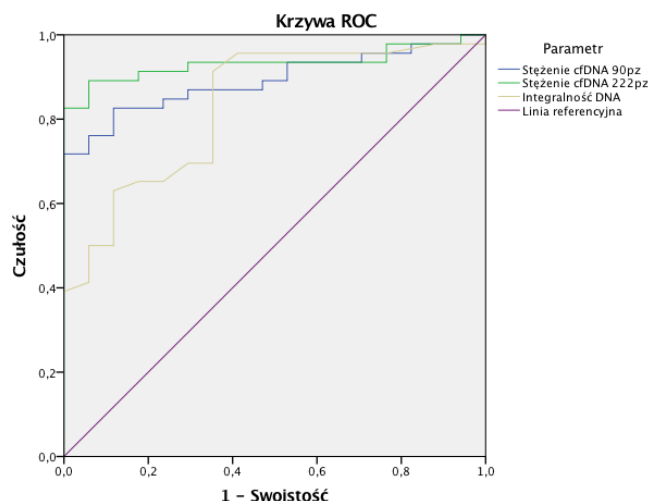


Rycina 6. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 222pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma.



Rycina 7. Wartości współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma.

W celu wyznaczenia optymalnych wartości diagnostycznych oraz określenia czułości i swoistości badanych parametrów przeprowadziłem analize krzywej ROC. Ponieważ nie wykazałem istotnych statystycznie różnic w wartościach badanych parametrów pomiędzy grupą pacjentów z ccRCC a oncocytomą to grupę porównawczą stanowiła grupa kontrolna i grupa pacjentów z ccRCC (Tabela 8, Rycina 8).



Rycina 8. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC od grupy kontrolnej.

Tabela 8. Wartości diagnostyczne oraz czułość, swoistość i AUC badanych parametrów, pozwalające zróżnicować grupę pacjentów z ccRCC od grupy kontrolnej.

	AUC(95%CI)	p	Wartość	Czułość(%)	Swoistość(%)
cfDNA 222pz	0.932(0.869-0.996)	0.000	269 kopie/ml	89	88
cfDNA 90pz	0.891(0.814-0.969)	0.000	1433 kopie/ml	83	88
Integralność	0.831(0.721-0.941)	0.000	0.20	80	65

4.3. Analiza regresji czynników predysponujących do wykrycia ccRCC

W ramach wykonanych obliczeń przeprowadziłem analizę regresji logistycznej czynników predysponujących do wykrycia ccRCC w odniesieniu do grupy kontrolnej. Analiza jednoczynnikowa wykazała, że całkowity poziom stężenia krążącego DNA (frakcja krążącego DNA o długości 90pz) zmierzony metodą PCR, wiek oraz BMI stanowią czynniki zwiększające prawdopodobieństwo wykrycia ccRCC na poziomie istotnym statystycznie ($p < 0.05$). Z kolei dwa inne czynniki: palenie tytoniu oraz nadciśnienie tętnicze były na granicy istotności statystycznej ($p = 0.05-0.1$). W dalszym etapie przeprowadziłem wieloczynnikową analizę logistyczną uwzględniającą wyłącznie istotne statystycznie parametry z analizy jednoczynnikowej. W analizie wieloczynnikowej wykazałem, że przedoperacyjny pomiar całkowitego stężenia krążącego DNA był jedynym niezależnym

czynnikiem zwiększającym prawdopodobieństwo wykrycia ccRCC ($p < 0.05$) (Tabela 9).

Tabela 9. Model regresji logistycznej jednoczynnikowej i wieloczynnikowej parametrów klinicznych predysponujących do wykrycia ccRCC.

Czynnik	Analiza jednoczynnikowa			Analiza wieloczynnikowa		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Wiek	1.061	1.009-1.115	0.02	1.063	0.975-1.158	0.167
Płeć (M)	1.983	0.616-6.382	0.251			
BMI	1.182	1.006-1.389	0.042	1.573	1.008-2.454	0.06
Palenie	3.000	0.754-11.929	0.1			
DM	1.579	0.300-8.310	0.590			
NT	2.679	0.856-8.381	0.1			
St. cfDNA 90pz	1.011	1.004-1.017	0.001	1.016	1.005-1.029	0.008

4.4. Wpływ stopnia zaawansowania choroby według skali TNM na badane parametry w grupie pacjentów z ccRCC

W dalszych analizach oceniłem wpływ zaawansowania choroby według skali TNM na badane parametry (stężenie krążącego DNA zmierzone metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA).

W pierwszym etapie sprawdziłem zależność pomiędzy badanymi parametrami a obecnością przerzutów odległych. W tym celu grupę pacjentów z ccRCC podzieliłem na dwie podgrupy: pacjentów z chorobą miejscowozaawansowaną ($n=35$) oraz pacjentów z chorobą przerzutową ($n=11$).

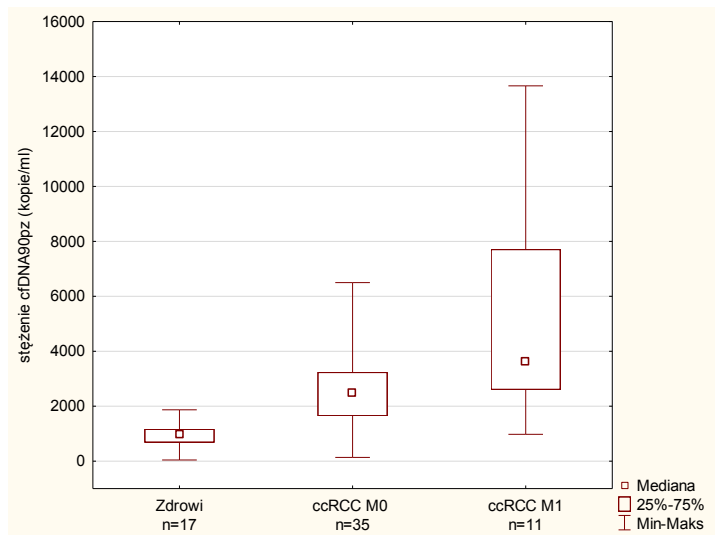
Przeprowadzone analizy wykazały, że poziomy stężenie krążącego DNA o długości 90pz i 222pz zmierzone metodą PCR były wyższe w obydwóch grupach pacjentów z ccRCC (M0 oraz M1) w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.001$, test Kruskala-Wallisa, $p < 0.05$, test Kruskala-Wallisa). Stężenie frakcji krążącego DNA o długości 90 pz było także istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów z przerzutami odległymi (ccRCC M1) w porównaniu do grupy pacjentów bez przerzutów odległych (ccRCC M0) ($p=0.03$, test

Kruskala-Wallis) (Tabela 10, Rycina 9). Wykazałem także wzrost stężenia frakcji krążącego DNA o długości 222pz w grupie pacjentów z przerzutami odległymi (ccRCC M1) względem grupy pacjentów bez przerzutów odległych (ccRCC M0) jednak w przypadku tego pomiaru nie zaobserwowałem istotnej statystycznie różnicy ($p > 0.05$, test Kruskala-Wallis) (Tabela 10, Rycina 10).

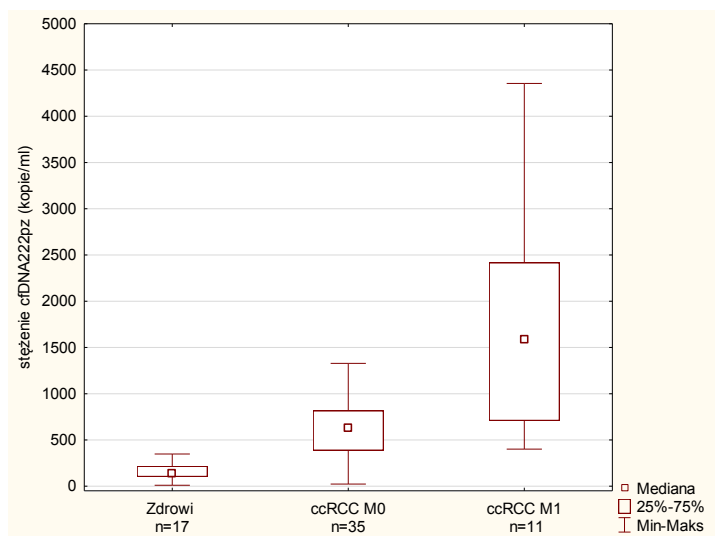
Również wartość współczynnika integralności DNA była zależna od obecności przerzutów odległych. Pomiędzy wszystkimi trzema grupami zaobserwowałem istotną statystycznie różnicę (grupa kontrolna vs. ccRCC M0 – $p < 0.005$, grupa kontrolna vs. ccRCC M1 $p < 0.005$, ccRCC M0 vs. ccRCC M1 $p < 0.05$, test Kruskala-Wallis) (Tabela 10, Rycina 11).

Tabela 10. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania oraz w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium przerzutowym [Me;M/(SD)].

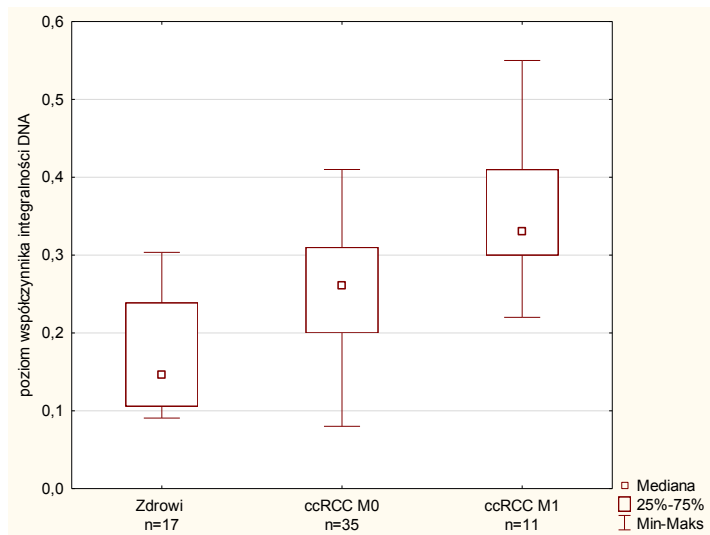
Parametr	cfDNA 90pz kopie/ml	cfDNA 222pz kopie/ml	Integralność DNA
Zdrowi n-17	960; 931 (490)	140; 151 (94)	0.14; 0.17 (0,07)
ccRCC M0 n-35	2473; 2509 (1378)	631; 623 (324)	0.26; 0.26 (0.07)
ccRCC M1 n-11	3619; 5282 (4059)	1583; 1730 (1195)	0.33; 0.36 (0.09)



Rycina 9. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania oraz w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium przerzutowym.

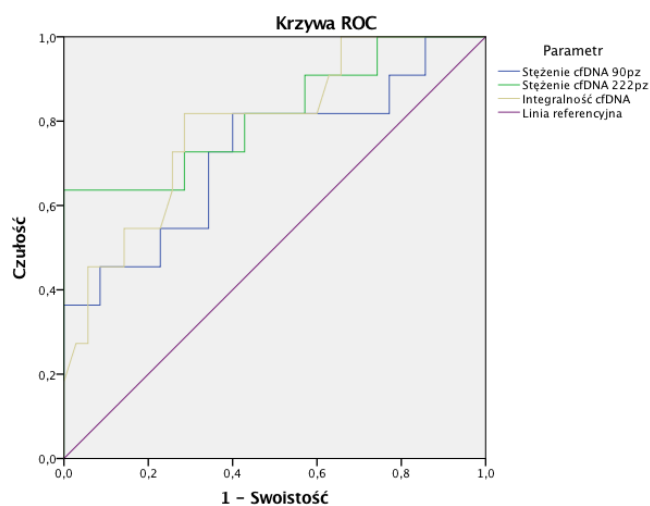


Rycina 10. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 222pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania oraz w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium przerzutowym.



Rycina 11. Pomiar współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania oraz w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium przerzutowym.

W dalszym etapie przeprowadziłem analizę krzywej ROC mającą na celu wyznaczenie optymalnych wartości, czułości i swoistości badanych parametrów umożliwiających diagnozę przerzutów odległych w grupie pacjentów z ccRCC (Tabela 11, Rycina 12).



Rycina 12. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC z przerzutami odległymi od grupy pacjentów z ccRCC bez przerzutów odległych.

Tabela 11. Wartości diagnostyczne, czułość, swoistość, AUC badanych parametrów pozwalające różnicować grupę pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania od grupy pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium przerzutowym.

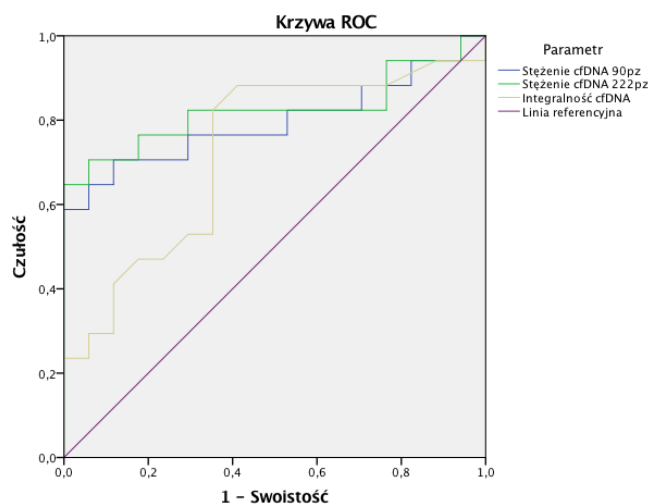
	AUC(95%CI)	p	Wartość	Czułość(%)	Swoistość(%)
cfDNA 222pz	0.816(0.650-0.981)	0.002	796 kopie/ml	73	71
cfDNA 90pz	0.725(0.536-0.913)	0.026	2818 kopie/ml	73	66
Integralność	0.788(0.635-0.880)	0.004	0.30	73	71

W dalszej kolejności na podstawie przeprowadzonych pomiarów wykazałem, że badane parametry (stężenie krążącego DNA zmierzone metodą PCR, współczynnik integralności DNA) były w grupie pacjentów z ccRCC w stadium pierwszego zaawansowania klinicznego (pT1N0M0) istotnie statystycznie wyższe niż w grupie kontrolnej ($p < 0.01$, test t- studenta) (Tabela 12).

Tabela 12. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w I stadium zaawansowania klinicznego [Me;M/(SD)].

Parametr	cfDNA 90pz kopie/ml	cfDNA 222pz kopie/ml	Integralność
Zdrowi	960; 931	140; 151	0.14; 0.17
n-17	(490)	(95)	(0.07)
ccRCC stadium I	2473; 2308	417; 532	0.24; 0.23
n-17	(1584)	(366)	(0.08)

Następnie na podstawie analizy krzywej ROC wyznaczyłem wartości diagnostyczne, czułość i swoistość badanych parametrów pozwalające różnicować osoby zdrowe od osób z nowotworem ccRCC w I stadium zaawansowania klinicznego) (Tabela 13, Rycina 13).



Rycina 13. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC w I stadium zaawansowania klinicznego od grupy kontrolnej.

Tabela 13. Wartości diagnostyczne oraz czułość, swoistość i AUC badanych parametrów pozwalające różnicować grupę kontrolną od grupy pacjentów z ccRCC w I stadium zaawansowania klinicznego

	AUC(95%CI)	p	Wartość	Czułość(%)	Swoistość(%)
cfDNA 222pz	0.824(0.668-0.979)	0.001	191 kopie/ml	82	70,6
cfDNA 90pz	0.796(0.634-0.958)	0.003	1433 kopie/ml	71	88
Integralność	0.725(0.549-0.901)	0.025	0.16	82	65

4.5. Wpływ stopnia złośliwości histopatologicznej w grupie pacjentów z ccRCC na badane parametry

W kolejnym etapie zbadana została zależność pomiędzy pomiarem stężenia krążącego DNA metodą PCR, wartością współczynnika integralności DNA a stopniem

złośliwości histopatologicznej według skali Fuhrmana. W celu przeprowadzenia analiz statystycznych grupa pacjentów z ccRCC została podzielona na dwie podgrupy: pacjentów z niskim stopniem zróżnicowania histopatologicznego (G1+G2) (n=30) oraz pacjentów z wysokim stopniem zróżnicowania histopatologicznego (G3 + G4) (n=16).

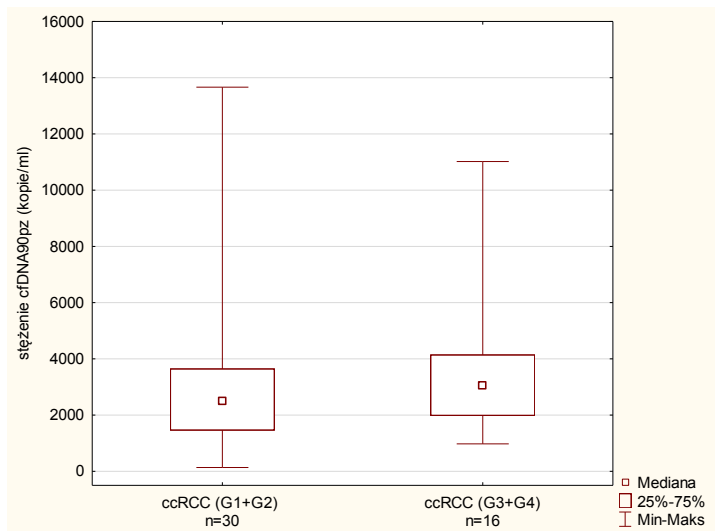
Przeprowadzone obliczenia wykazały, że stężenie krążącego DNA o długości 90pz jest wyższe w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości w porównaniu do grupy pacjentów ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej, natomiast różnica wartości jest na granicy istotności statystycznej ($p=0.09$, test Manna Whitneya) (Tabela 14, Rycina 14).

Wykazałem także istotny statystycznie wzrost stężenia fragmentów krążącego DNA o długości 222pz w grupie pacjentów ccRCC o wyższym stopniu złośliwości względem grupy pacjentów ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej ($p<0.05$, test Manna Whitneya) (Tabela 14, Rycina 15).

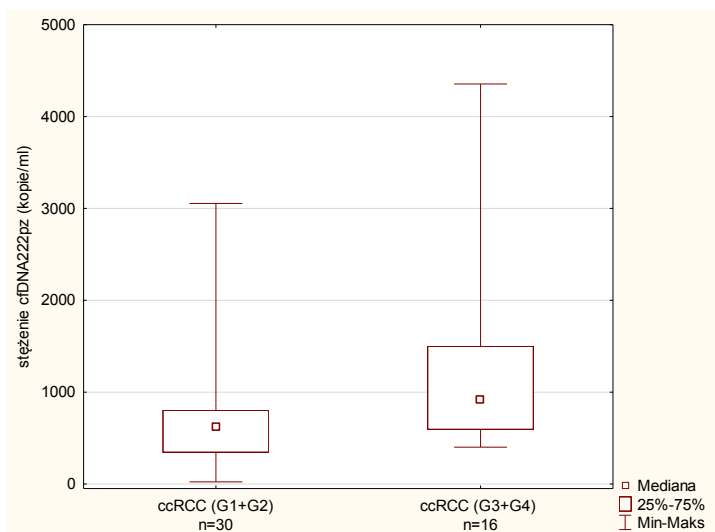
Z kolei wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do grupy pacjentów ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej ($p<0.05$, test Manna Whitneya) (Tabela 14, Rycina 16).

Tabela 14. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej [Me;M/(SD)].

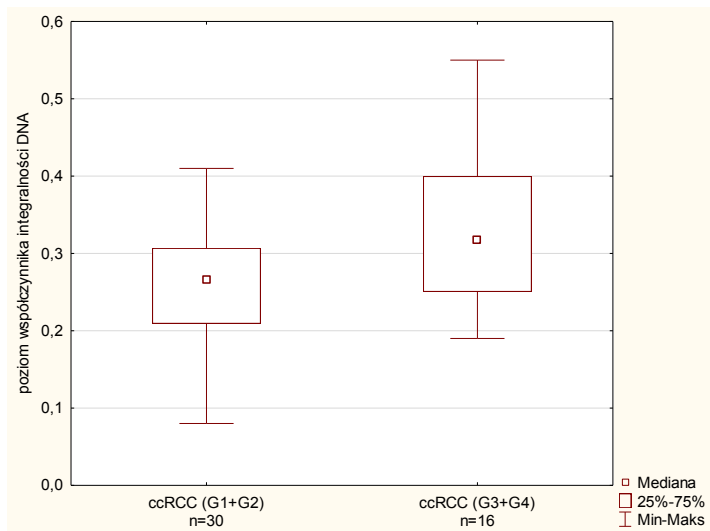
Parametr	cfDNA 90pz kopie/ml	cfDNA 222pz kopie/ml	Integralność DNA
ccRCC (G1+ G2) n-30	2485; 2853 (2512)	616; 707 (324)	0.26; 0.26 (0.07)
ccRCC (G3+G4) n-16	3055; 3771 (2605)	920; 1226 (997)	0.32; 0.33 (0.10)



Rycina 14. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz metodą PCR w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.

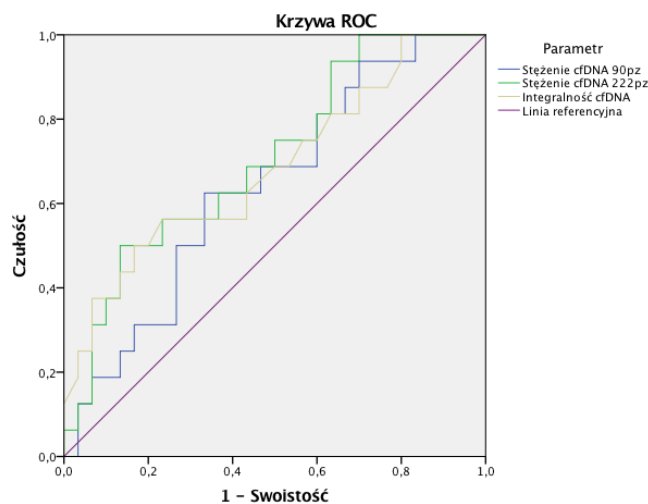


Rycina 15. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 222pz metodą PCR w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.



Rycina 16. Pomiar współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.

Na podstawie analizy krzywej ROC wyznaczyłem wartości diagnostyczne, czułość i swoistość badanych parametrów pozwalające zróżnicować pacjentów z ccRCC o niskim stopniu zróżnicowania histopatologicznego od pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu zróżnicowania histopatologicznego (Tabela 15, Rycina 17).



Rycina 17. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC o niskim stopniu zróżnicowania histopatologicznego od pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu zróżnicowania histopatologicznego.

Tabela 15. Wartości diagnostyczne, czułość, swoistość, AUC, pomiaru stężenia krążącego DNA metodą PCR, współczynnika integralności DNA pozwalające zróżnicować grupę pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej od grupy pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.

	AUC(95%CI)	p	Wartość	Czułość(%)	Swoistość(%)
DNA 222pz	0.706(0.551-0.862)	0.022	727 kopie/ml	63	60
DNA 90pz	0.640(0.476-0.805)	0.1	2818 kopie/ml	63	67
Integralność	0.684(0.518-0.851)	0.041	0.27	63	57

4.6. Wpływ średnicy zmiany pierwotnej oraz obecności inwazji naczyniowej w grupie pacjentów z ccRCC na badane parametry

W przeprowadzonej pracy zweryfikowałem także zależność pomiędzy stężeniem krążącego DNA zmierzonym metodą PCR oraz wartością współczynnika integralności DNA, a wielkością zmiany pierwotnej w grupie pacjentów z ccRCC. Przeprowadzone analizy wykazały, że średnica zmiany pierwotnej koreluje dodatnio z badanymi parametrami (Tabela 16). Przeprowadzone analizy wykazały także, że obecność inwazji naczyniowej wpływa na zwiększenie stężenia krążącego DNA i wzrost współczynnika integralności DNA ($p < 0.05$, test Manna Whitney) (Tabela 17).

Tabela 16. Ocena korelacji pomiędzy średnicą zmiany pierwotnej, a wartością badanych parametrów według współczynnika Spermanna w grupie pacjentów z ccRCC.

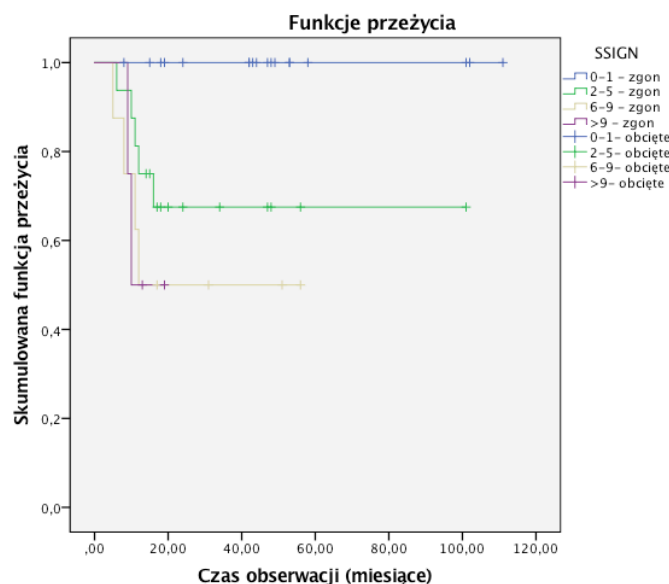
Parametr	Współczynnik Spermanna	t(N-2)	p
DNA 222pz	0.372979	2.666476	0.01
DNA 90pz	0.299535	2.082508	0.04
Integralność	0.300427	2.089321	0.04

Tabela 17. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz zmierzony metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC bez stwierdzonej inwazji naczyniowej oraz w grupie pacjentów ze ccRCC ze stwierdzoną inwazją naczyniową [Me;M/(SD)] .

Parametr	cfDNA 90pz kopie/ml	cfDNA 222pz kopie/ml	Integralność
LVI - n-33	2473; 2801 (2399)	592; 661 (526)	0.26; 0.25 (0.07)
LVI + n-13	2994; 4118 (2787)	1327; 1462 (1051)	0.34; 0.36 (0.08)

4.7. Analiza przeżycia specyficznego dla choroby w zależności od wartości badanych parametrów w grupie pacjentów z ccRCC

Kolejnym celem badania była analiza przeżycia specyficznego dla ccRCC w zależności od wartości przedoperacyjnych badanych parametrów: całkowitego stężenia krążącego DNA zmierzonego metodą PCR oraz wartości współczynnika integralności DNA. Z wykorzystaniem modelu prognostycznego – SSIGN, uniwersalnego dla wszystkich grup zaawansowania ccRCC, przeprowadziłem analize krzywej przeżycia według Kaplana Meiera oraz analize jednoczynnikową COXA, która potwierdziła, że grupa badawcza pacjentów z nowotworem ccRCC była reprezentatywna ($p < 0.001$, HR 1.321, analiza jednoczynnikowa COXa) (Tabela 18, Rycina 18).

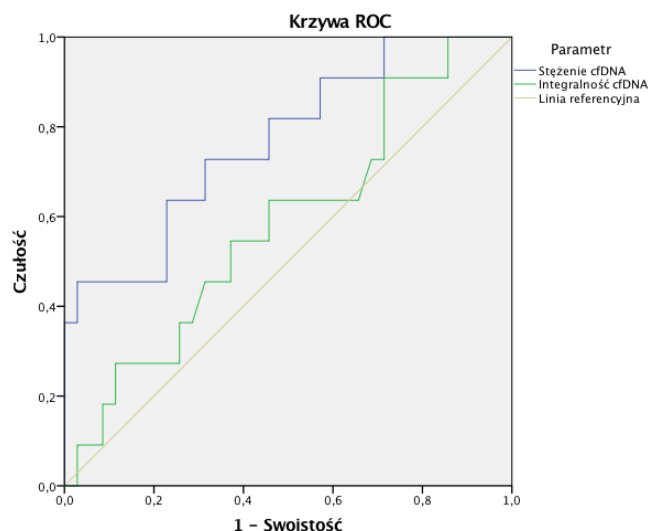


Rycina 18. Analiza przeżycia specyficznego dla choroby w grupie pacjentów z ccRCC w zależności od wyniku nomogramu SSIGN według Kaplaina Meiera.

Tabela 18. Analiza przeżycia COXA względem skali SSIGN dla grupy pacjentów z ccRCC.

	Analiza jednoczynnikowa COXA	
	HR	p
SSIGN	1.321	0.001

Ponieważ nie posiadamy wiedzy odnośnie wartości normatywnych badanych parametrów w związku z powyższym następnym etapem analizy było ich wyznaczenie przy pomocy krzywej ROC. W tym celu pacjenci z grupy ccRCC zostali podzieleni na dwie podgrupy. Pierwszą podgrupę stanowili pacjenci z ccRCC, u których nie doszło do zgonu w trakcie obserwacji (n=35), natomiast drugą podgrupę stanowili pacjenci z ccRCC, u których doszło do zgonu w trakcie obserwacji w wyniku progresji choroby nowotworowej (n=11) (mediana czasu obserwacji - 24 miesiące). Na podstawie analizy krzywej ROC ustalone zostały wartości badanych parametrów, które w analizie przeżycia Kaplaina Meiera rozpatrywane były jako podwyższone lub mieszczące się w granicach normy. W przypadku współczynnika integralności DNA wykazany został brak zdolności zróżnicowania badanych podgrup dlatego nie był on uwzględniony w dalszych analizach. Analiza wartości przedoperacyjnych poziomu całkowitego krążącego DNA wykazała próg odcięcia wynoszący 2913 kopii/ml (Tabela 19, Rycina 19).

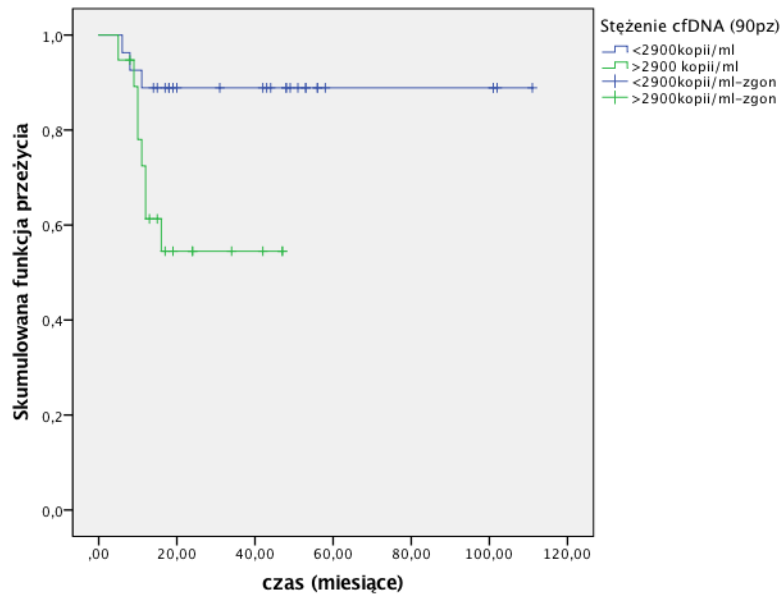


Rycina 19. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów żyjących od grupy pacjentów, u której doszło do zgonu w trakcie obserwacji.

Tabela 19. Wartości diagnostyczne, czułość, swoistość, AUC, badanych parametrów różnicujące grupę pacjentów żyjących z ccRCC od grupy pacjentów z ccRCC, u której doszło do zgonu w trakcie obserwacji.

	AUC(95%CI)	p	Wartość	Czułość(%)	Swoistość(%)
St. cfDNA	0.769(0.606-0.932)	0.02	2913 kopie/ml	73	68
Integralność	0.584(0.393-0.776)	0.4	0.27	64	54

W analizie przeżycia Kaplana Meiera wykazałem, że pacjenci z wysokimi wartościami krążącego DNA tj. powyżej wyznaczonego poziomu 2913kopii/ml, cechowali się gorszym przeżyciem specyficznym dla nowotworu (test Log Rank Mantel-Cox $p = 0.015$ HR – 4.493)(Rycina 20).



Rycina 20. Analiza przeżycia specyficznego dla choroby w grupie pacjentów z ccRCC w zależności od wartości stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz według Kaplaina Meiera.

4.8. Analiza przeżycia Coxa względem wybranych parametrów klinicznych, patologicznych i całkowitego stężenia krążącego DNA w grupie pacjentów z ccRCC

W dalszym etapie przeprowadzona została analiza jednoczynnikowa przeżycia COXA względem wybranych parametrów klinicznych, patologicznych i pomiaru całkowitego stężenia krążącego DNA wykonanego metodą PCR (frakcja 90pz). Analiza jednoczynnikowa wykazała, że pomiar stężenia krążącego DNA metodą PCR, wartość parametrów patologicznych (stopień zaawansowania miejscowego, obecność przerzutów odległych, obecność inwazji naczyniowej, stopień złośliwości histopatologicznej) oraz obecność objawów klinicznych mają istotny statystycznie wpływ na rokowanie pacjentów z ccRCC. Następnie przeprowadziłem analizę wieloczynnikową, w której uwzględniłem parametry patologiczne oraz stężenie całkowite frakcji krążącego DNA. Przeprowadzony model wykazał jednak, że żaden z badanych parametrów nie jest niezależnym czynnikiem prognostycznym dla grupy pacjentów zdiagnozowanych z ccRCC (Tabela 20).

Tabela 20. Analiza jednoczynnikowa i wieloczynnikowa przeżycia COXA względem wybranych parametrów klinicznych, patologicznych i całkowitego stężenia krążącego DNA zmierzonego metodą PCR.

Czynnik	Analiza jednoczynnikowa		Analiza wieloczynnikowa	
	HR	p	HR	p
Wiek	1.010	0.789		
Płeć	0.601	0.416		
BMI	1.032	0.609		
Palenie	1.339	0.630		
DM	0.446	0.442		
NT	0.437	0.172		
Objawy	4.041	0.039		
pT	2.459	0.01		
Fuhrman	2.752	0.004	2.105	0.124
META+	4.529	0.013	3.411	0.367
LVI+	3.401	0.04	0.284	0.369
St. cfDNA	4.493	0.027	2.805	0.210

W związku z powyższym przeprowadzona została analiza wieloczynnikowa przeżycia COXA, względem modelu SSIGN oraz stężenia krążącego DNA zmierzonego metodą PCR. Na tej podstawie model SSIGN został przyrównany do pomiaru stężenia krążącego DNA. Przeprowadzona analiza COXA wykazała, że normogram według SSIGN ma znacząco wyższą skuteczność rokowniczą w porównaniu do pomiaru całkowitego stężenia krążącego DNA metodą PCR (Tabela 21).

Tabela 21. Analiza jednoczynnikowa i wieloczynnikowa przeżycia COXA względem całkowitego stężenia krążącego DNA metodą PCR oraz wartości skali SSIGN.

	Analiza jednoczynnikowa		Analiza wieloczynnikowa	
	HR	p	HR	p
SSIGN	1.321	0.001	1.296	0.002
St. cfDNA	4.493	0.027	3.110	0.1

5. DYSKUSJA

Biopsja płynna jest jedną z metod badawczych mogącą poprawić niedoskonałości związane z diagnostyką i oceną rokowania w grupie pacjentów z nowotworem RCC [106]. Jednym z wariantów biopsji płynnej jest izolacja krążącego DNA i jego dalsza analiza - ilościowa oraz jakościowa. Istnieje szereg potencjalnych możliwości zastosowania klinicznego biopsji płynnej w tym krążącego DNA w grupie pacjentów z RCC. W pierwszej kolejności ocena krążącego DNA może stanowić marker o charakterze diagnostycznym, który pozwoli zróżnicować odmianę histopatologiczną zmiany guzowatej w nerce przed podjęciem leczenia bez konieczności wykonywania inwazyjnej biopsji tkankowej. Ocena krążącego DNA może zatem potencjalnie pomóc rozstrzygnąć czy dany pacjent wymaga leczenia operacyjnego w przypadku potwierdzenia obecności nowotworu złośliwego np. ccRCC, lub odstąpienia od leczenia operacyjnego i wdrożenia aktywnej obserwacji w przypadku potwierdzenia obecności nowotworu łagodnego np. oncocytozy.

W grupie pacjentów z RCC ocena krążącego DNA może być także wykorzystana jako marker prognostyczny, który pozwoli określić rokowanie pacjenta w różnych stadiach zaawansowania. W przypadku pacjentów w stadium miejscowo zaawansowanym RCC ocena ilościowa i jakościowa krążącego DNA może umożliwić wskazanie pacjentów wysokiego ryzyka progresji wymagających leczenia adjuwantowego po przeprowadzonym leczeniu operacyjnym. Z kolei w stadium przerzutowym RCC ocena ilościowa krążącego DNA może mieć znaczenie prognostyczne oraz w przypadku oceny jakościowej opartej o ocenę występowania specyficznych mutacji także predykcyjne. Ocena jakościowa krążącego DNA może zatem stanowić element strategii diagnostycznej wpisującej się w założenia onkologii spersonalizowanej i tym samym wskaże rodzaj terapii, którą powinna się zastosować u danego pacjenta w celu uzyskania optymalnego wyniku onkologicznego

Ocena krążącego DNA może być także zastosowana jako marker do małoinwazyjnego monitorowania pacjentów z RCC po zastosowanym leczeniu celem wykrycia progresji choroby zarówno w stadium miejscowym jak i zaawansowanym, pozwalając tym samym ograniczyć ilość wykonywanych badań kontrolnych takich jak diagnostyka obrazowa czy biopsja tkankowa.

W przeprowadzonej przeze mnie pracy badawczej dokonałem pomiaru stężenia krążącego DNA oraz oceniłem współczynnik integralności DNA w następujących dwóch głównych celach: weryfikacji znaczenia diagnostycznego w grupie pacjentów zdiagnozowanych z nowotworem nerki z zastosowaniem technik obrazowych oraz weryfikacji znaczenia prognostycznego w grupie pacjentów, u których rozpoznano w badaniu histopatologicznym odmianę ccRCC.

Przeprowadzone przeze mnie pomiary wykazały, że przedoperacyjny poziom stężenia krążącego DNA w grupie pacjentów z ccRCC był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do grupy osób zdrowych zarówno przy pomiarze metodą PCR jak i metodą fluorymetryczną. Ponadto wykazałem, że stężenie krążącego DNA jest podwyższone w grupie pacjentów z nowotworem łagodnym (oncocytoza) w porównaniu do grupy osób zdrowych. Nie wykazałem natomiast istotnej różnicy w poziomach stężeń krążącego DNA pomiędzy grupą pacjentów z oncocytozą a grupą pacjentów z ccRCC. Wyniki mojej pracy wskazują zatem, że przedoperacyjna ocena stężenia krążącego DNA nie umożliwia rozstrzygnięcia charakteru zmiany (nowotwór złośliwy vs. nowotwór łagodny) i tym samym nie może być zastosowana w praktyce klinicznej jako marker o charakterze diagnostycznym. W przeprowadzonym przeze mnie badaniu wykazałem natomiast, że w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC stężenie krążącego DNA jest zależne od stanu następujących parametrów: stopnia zaawansowania choroby według skali TNM, stopnia złośliwości według skali Fuhrmana, średnicy zmiany pierwotnej oraz obecności inwazji naczyniowej.

Wyniki te znajdują potwierdzenie w znaczącej części publikacji przedstawionych poniżej w dyskusji [107, 108, 109, 113, 114, 116].

Między innymi w pracy autorstwa Yamamoto Y. i wsp. przeprowadzono pomiar stężenia krążącego DNA metodą RT-PCR z wykorzystaniem primera dla genu ACTB o długości 106 pz [107]. Grupę badaną stanowiły 92 osoby z nowotworem RCC natomiast grupę kontrolną stanowiły 41 osoby zdrowe. W cytowanym badaniu wykazano, że stężenie krążącego DNA było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza krzywej ROC wykazała czułość i swoistość pomiaru stężenia krążącego DNA wynoszącą dla całej grupy badanej odpowiednio 63% i 78%. Z kolei dla nowotworów w stadium T1a analiza krzywej ROC wykazała czułość i swoistość wynoszącą 78% i 58%. W mojej pracy pole krzywej ROC dla stopnia zaawansowania klinicznego I wyniosło - 0.824 natomiast czułość i swoistość wyniosła odpowiednio 82% i 71%. Wyniki cytowanej oraz mojej pracy są zbieżne i dowodzą, że stężenie krążące DNA jest podwyższone w nowotworach RCC nawet o niewielkim stopniu zaawansowania klinicznego. Ponadto autorzy pracy wykazali, że stężenie krążącego DNA jest zależne od stopnia zaawansowania choroby według skali TNM. Potwierdzono także istotny wpływ stopnia złośliwości histopatologicznej według skali Fuhrmana na stężenie krążącego DNA. Pacjenci z nowotworami ze stopniem złośliwości G3+G4 mieli istotnie wyższe stężenie krążącego DNA w porównaniu do pacjentów w stopniu G1+G2. Analiza wieloczynnikowa (uwzględniająca czynniki epidemiologiczne zwiększające ryzyko zachorowania na RCC)

przeprowadzona przez autorów wykazała, że wysokie wartości stężenia krążącego DNA stanowiły niezależny czynnik zwiększający prawdopodobieństwo zdiagnozowania RCC. Wynik tej analizy jest zbieżny z wynikiem mojej analizy, w której uwzględniłem te same czynniki.

W kolejnym badaniu autorstwa Wan J. i wsp. oceniano korelacje pomiędzy stężeniem krążącego DNA we krwi zmierzonym metodą RT-PCR, a ryzykiem wznowy po leczeniu operacyjnym w grupie pacjentów z ccRCC [108]. W badaniu wzięło udział 92 pacjentów oraz 42 zdrowe osoby stanowiące grupę kontrolną. W badaniu również stwierdzono istotną zależność pomiędzy stężeniem krążącego DNA przed podjęciem leczenia a następującymi parametrami: stopniem zaawansowania choroby według skali TNM oraz stopniem zaawansowania histopatologicznego według skali Fuhrmana. Uzyskane w tej pracy wyniki są również zbieżne z poprzednią pracą oraz z wynikami moich badań. W pracy tej ponadto wykazano, że stężenie krążącego DNA maleje po zabiegu, co może wskazywać, że cykliczny pomiar krążącego DNA może posłużyć do monitorowania pacjentów pod kątem wystąpienia wznowy choroby.

W kolejnym badaniu Feng G. i wsp. dokonano cyklicznych pomiarów stężenia krążącego DNA we krwi w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC (n=18) wyłącznie w przerzutowym stadium zaawansowania w trakcie kontynuacji terapii Sorafenibem [109]. Stężenie krążącego DNA zmierzone metodą RT-PCR przed podjęciem leczenia było istotnie wyższe względem grupy kontrolnej składającej się z osób zdrowych (n=10). Również i w tym badaniu stwierdzono istotną zależność pomiędzy poziomem stężenia krążącego DNA a następującymi parametrami: stopniem zaawansowania choroby według skali TNM oraz stopniem zróżnicowania histopatologicznego według skali Fuhrmana. Cykliczne pomiary stężenia krążącego DNA przeprowadzono w 6 punktach czasowych - tydzień przed podjęciem terapii a następnie w kolejnych tygodniach po jej rozpoczęciu tj. w 4, 8, 12, 16, 24. W tych samych punktach czasowych mierzono odpowiedź kliniczną terapii oceniając badanie TK przy użyciu kryteriów radiologicznych RECIST 1.1. Wykazano, że ocena stężenia krążącego DNA korelowała istotnie z odpowiedzią radiologiczną. To badanie wskazuje, że pomiar stężenia krążącego DNA może być również wykorzystany jako biomarker monitorujący w czasie rzeczywistym efektywność terapii systemowej u pacjentów w przerzutowym stadium zaawansowania ccRCC, jako potencjalna alternatywa do badań obrazowych.

Powyższe badania dowodzą, że pomiar stężenia krążącego DNA może mieć potencjał diagnostyczny i pozwoli zróżnicować osoby z nowotworem ccRCC/RCC od osób zdrowych. Należy jednak podkreślić, że autorzy tych badań nie uwzględnili w analizach

pacjentów z nowotworami łagodnymi w związku z powyższym ich wartość kliniczna nie została w pełni zweryfikowana. W odróżnieniu od przytoczonych badań w mojej pracy uwzględniona została grupa, u której w badaniu histopatologicznym rozpoznano nowotwór łagodny oncocytoza. Należy podkreślić, że liczebność mojej grupy jest jednak niewielka (n=7) co może ograniczać wiarygodność pomiaru. Przeprowadzone przeze mnie badanie wykazało jednak, że grupę pacjentów z nowotworem oncocytoza podobnie jak pacjentów z nowotworem ccRCC charakteryzuje znaczące zwiększenie ilości krążącego DNA. Świadczy to o tym, że nowotwory oncocytoza pomimo tego, że mają charakter łagodny to uwalniają do krwi większą ilość krążącego DNA. Jest to ważna informacja, gdyż może stanowić podstawę do przeprowadzenia dalszych analiz genetycznych nad opracowaniem biomarkera o znaczeniu diagnostycznym [110]. Obecnie nie posiadamy jednak markerów diagnostycznych na poziomie DNA mogących różnicować omawiane odmiany nowotworów nerki. Dotychczas przeprowadzone badania na tkance pochodzącej z nowotworu RCC pozwoliły zidentyfikować szereg specyficznych zmian na poziomie DNA mających jednak pewne znaczenie prognostyczne [65]. Wyizolowanie z płynów ustrojowych krążącego DNA pochodzącego z komórek nowotworowych może potwierdzić obecność tych mutacji i pozwoli lepiej określić rokowanie pacjenta. W literaturze dostępne są prace na grupach pacjentów z RCC, gdzie oprócz oceny ilościowej krążącego DNA dokonano także oceny jakościowej obejmującej identyfikację typowych zmian genetycznych.

We wstępnych badaniach wykazano, że charakterystyczne rearanżacje genetyczne takie jak np. niestabilność mikrosatelitarna (MSI) oraz utrata heterozygotyczności (LOH) występują zarówno w DNA pobranym z nowotworu jak i w DNA wyizolowanym z płynów ustrojowych również u pacjentów z rakiem nerki. LOH jest bardzo często odkrywana w nowotworach o różnych lokalizacjach. Wykrycie LOH w DNA wiąże się z większą agresywnością choroby. W przypadku pacjentów z RCC przeprowadzono kilka takich badań. Między innymi w badaniu Gonzalga Ml. i wsp. oceniano wpływ obecności aberracji mikrosatelitarnych na ryzyko nawrotu choroby oraz 2 letnie wyniki śmiertelności u pacjentów poddanych nefrektomii lub operacji usunięcia nowotworu złośliwego [111]. Badaniem objęto grupę 30 pacjentów z czego w 25 przypadkach stwierdzono obecność nowotworu złośliwego natomiast w pozostałych przypadkach zmiany łagodne. Obecność LOH oceniano w materiale DNA wyizolowanym z tkanek nowotworu oraz z krwi pobranej przed zabiegiem. Ocena LOH we krwi istotnie korelowała z 2 letnim gorszym przeżyciem. U 83% pacjentów z nawrotem choroby stwierdzono LOH zarówno we krwi jak i tkance nowotworu. Potwierdza to zależność, że rak nerki przerzutuje drogą krwionośną a obecność

LOH może wiązać się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby. W badaniu Knoblocha R i wsp. uzyskano detekcje aberracji mikrosatelitarnych z DNA wyizolowanego z krwi pacjentów na poziomie 74-87% w zależności od ilości badanych markerów [112].

W kolejnym badaniu Perrego Ra. i wsp. przeprowadzono analizę ilościową krążącego DNA wraz z detekcją LOH u pacjentów z nowotworem RCC (n=54) [113]. W pracy tej wykazano, że stężenie krążącego DNA zmierzone metoda RT – PCR było istotnie wyższe w grupie pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (osoby zdrowe n=41). Nie wykazano natomiast zależności pomiędzy stężeniem krążącego DNA, a parametrami patologicznymi – stopniem zaawansowania według skali TNM oraz stopniem złośliwości według Fuhrmana. Wykazano natomiast istotny spadek stężenia krążącego DNA po zabiegu nefrektomii względem poziomu przedoperacyjnego. Wyniki te jednak nie korelowały z wynikami onkologicznymi tj. czasem wystąpieniem wznowy radiologicznej i czasem przeżycia całkowitego.

Kolejne badania skupiały się na ocenie obecności niestabilności epigenetycznej. Jednym z rodzajów niestabilności epigenetycznej jest zwiększona metylacja fragmentów DNA. Proces ten polega na hypermetylacji wysp CpG regionów sekwencji promotorowych co przekłada się na wyciszenia ekspresji poszczególnych genów supresorowych i mutatorowych. Rola niestabilności epigenetycznej w patogenezie wielu nowotworów została potwierdzona. Zjawisko to predysponuje do kancerogenezy, progresji choroby oraz przerzutowania [114]. W 2012 de Martino M. i wsp. opublikował prace na próbkach krwi pochodzących od 200 pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu z powodu podejrzenia RCC [115]. W badaniu patologicznym przeprowadzonym po zabiegu u 157 pacjentów rozpoznano nowotwór złośliwy natomiast u pozostałych zmiany łagodne. Izolacje krążącego DNA wykonano z krwi od pacjentów przed operacją. Z wykorzystaniem metody RT – PCR dokonano analizy ilościowej krążącego DNA oraz oceny stopnia metylacji kluczowych dla kancerogenezy genów charakterystycznych również dla RCC: RASSF1A, PTGS2, P16 i VHL. Autorzy wykazali istotne zwiększenie stężenia krążącego DNA oraz istotnie zwiększoną metylację regionu wysp genu RASSF1A i VHL w grupie pacjentów z RCC. Analiza krzywej ROC dla pomiaru stężenia krążącego DNA wyniosła – 0.755, metylacji genu RASSF1A - 0.705 oraz genu VHL - 0.694. W przeciwieństwie do mojej pracy wartość stężenia krążącego DNA okazała się być niezależnym czynnikiem prognostycznym. Według autorów badania stężenie krążącego DNA było istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów z mRCC. Przytoczone badanie jest także jedynym dostępnym w literaturze, gdzie grupę kontrolną stanowiły osoby ze zmianami łagodnymi w nerce. W przeciwieństwie do mojego badania wykazano, jednak że stężenie krążącego DNA ma istotną wartość

diagnostyczną. Należy jednak podkreślić, że autorzy badania nie podali szczegółowej charakterystyki grupy ze zmianami łagodnymi. Oznacza to, że w badaniu mogły być uwzględnione inne zmiany łagodne takie jak np. AML, torbiele nerek czy tłuszczaki. W związku z powyższym uzyskany wynik może odbiegać od otrzymanego w moich badaniach, gdzie grupę porównawczą stanowili pacjenci wyłącznie zdiagnozowani z nowotworem oncocytoza.

Z kolei w badaniu Inessa Skrypinki I. i wsp. wykonano analizę 27 próbek krwi i moczu pobranych od pacjentów z RCC przed podjęciem leczenia oraz od 15 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną [116]. Badanie wykazało, że stężenie krążącego DNA w krwi, które zostało ocenione metodą RT-PCR oraz fluorymetryczną było istotnie wyższe w grupie pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej. W badaniu oceniono ponadto częstość metylacji następujących genów: RASSF1, FHIT, APC, LRRC3B, VHL, ITGA9. Wykrywalność metylacji w krążącym DNA była zależna od ilości analizowanych genów oraz różnych wariantów. Przy analizie 3 genów czułość badania wynosiła 77.9–92.3% przy specyficzności mieszczącej się w zakresie od 93.3% do 100%. W badaniu nie wykazano natomiast zależności pomiędzy stężeniem krążącego DNA a następującymi parametrami: stopniem zaawansowania choroby według TNM i stopniem złośliwości histopatologicznej według Fuhrmana. Ograniczeniem tego badania jest jednak mała liczebność badanej grupy.

W przeprowadzonym przeze mnie badaniu oraz w części cytowanych prac wykazano zależność pomiędzy stężeniem krążącego DNA a stanem następujących parametrów: stopniem zaawansowania choroby według skali TNM, stopniem złośliwości według skali Fuhrmana, średnicą zmiany pierwotnej oraz obecnością inwazji naczyniowej. Parametry te odgrywają istotną rolę rokowniczą w nowotworze ccRCC co tym samym stanowi ważną przesłankę świadczącą o tym, że również stężenie krążącego DNA może mieć takowe znaczenie. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadziłem analizę krzywej przeżycia według Kaplana Meirera, która potwierdziła, że wysokie wartości stężenia krążącego DNA (>2900 kopii/ml) zmierzone metodą PCR mają wpływ na przeżycie specyficzne dla raka. Przeprowadzony przeze mnie wieloczynnikowy model regresji COXA uwzględniający tradycyjne czynniki prognostyczne dla ccRCC oraz poziom stężenia krążącego DNA wykazał jednak, że stężenie krążącego DNA nie może być niezależnym czynnikiem prognostycznym. Potwierdza to także następny model Coxa, w którym porównałem jeden z uniwersalnych modeli prognostyczny (SSIGN) dla wszystkich stadiów zaawansowania RCC ze stężeniem krążącego DNA wykazując tym samym, że nomogram SSIGN cechuje się znacząco lepszą precyzją. Znaczenie prognostyczne stężenia krążącego DNA zostało zweryfikowane przez badaczy w poszczególnych pracach [108, 115]. W

cytowanej już przeze mnie wcześniej pracy autora de Martino i wsp. wykazano, że wysokie wartości stężenia krążącego DNA (powyżej 2400 kopii/ml) wpływały negatywnie na czas przeżycia specyficznego dla raka na podstawie przeprowadzonej analizy Krzywej Kaplaina Meira. W kolejnej także cytowanej już w dyskusji pracy autorstwa Wan i wsp. wykazano z kolei, że wysokie wartości stężenia krążącego DNA mają istotny wpływ na czas wystąpienia wznowy choroby. Wyniki te wymagają jednak weryfikacji na większych grupach pacjentów i uwzględnienia dłuższego czasu obserwacji.

Pomimo tego, że zarówno moje jak i przytoczone w dyskusji badania wskazują, że pomiar stężenia krążącego DNA może być wykorzystany jako biomarker w różnych celach (diagnostycznych, prognostycznych lub monitorowania przebiegu choroby) to istnieje jednak szereg ograniczeń, które wymagają komentarza.

Z racji faktu, że nowotwory RCC charakteryzują się bogatym unaczynieniem przyjęto, że krew pobrana od pacjentów będzie stanowić najlepsze źródło krążącego DNA. W różnych badaniach dowiedziono jednak, że proces obróbki próbki krwi ma istotne znaczenie [117]. Kluczowym etapem wpływającym na jakość materiału i krążącego DNA ma faza przed analityczna związana między innymi z pobieraniem materiału do badań, warunkami przechowywania (temperatura, czas) a następnie parametrami wstępnej obróbki [118,119]. Przyjmuje się, że okres pomiędzy pobraniem próbki od pacjenta a procedurą oddzielenia osocza nie powinien przekraczać 24h [120]. W większości przypadków próbki krwi pobierane są do probówek EDTA lub specjalnych probówek dedykowanych do krążącego DNA. Obydwa rodzaje probówek zawierają antykoagulant - kwas K3EDTA, natomiast probówki dedykowane do przechowywania DNA zawierają także dodatkowe substancje zapobiegające lizie komórek i uwolnieniu DNA genomowego [121]. Probówki dedykowane pozwalają utrzymać jakość materiału nawet przez 5 dni w temperaturze pokojowej w porównaniu do jedynie kilku godzin w przypadku probówek standardowych. Po przygotowaniu materiału następnym etapem jest izolacja krążącego DNA. Według danych literaturowych bardziej preferowanym źródłem krążących kwasów nukleinowych jest osocze a nie surowica [122]. Wynika to z faktu, że część DNA w surowicy pochodzi z lizy krwinek białych co może fałszywie zawyżać wynik stężenia krążącego DNA.

Dostępne są również inne technologie izolacji, które cechują się różną skutecznością. Najbardziej powszechną metodą izolacji krążącego DNA jest metoda kolumnkowa, która cechuje się wysoką skutecznością [123]. Na rynku dostępne są zestawy komercyjne np. firmy Qiagen, z którego korzystałem w swojej pracy, będący jednocześnie najczęściej stosowanym w omawianych publikacjach.

Po wyizolowaniu DNA ważną kwestią są także warunki przechowywania [124]. Próbkę powinny być zamrożone w temperaturze od -20°C do -80°C i należy unikać wielokrotnego rozmrażania, które powoduje fragmentację DNA.

Istotną kwestią jest ostatecznie wybór metody służącej do pomiaru stężenia krążącego DNA. Najbardziej powszechną metodą jest pomiar metodą RT – PCR. Pomiar metodą fluorymetryczną jest również stosowany w niektórych opracowaniach. Należy podkreślić jednak, że obydwie metody obarczone są błędem, ponieważ mierzą całkowitą ilość krążącego DNA w płynach ustrojowych tj. frakcje pochodzącą zarówno z komórek zdrowych jak i nowotworowych. W przypadku metody RT – PCR wybiera się gen/produkt, który będzie podlegał amplifikacji i na jego podstawie mierzy się stężenie krążącego DNA. Wybór genu do reakcji PCR również różni się pomiędzy poszczególnymi opracowaniami. Obecnie nie ma wystandaryzowanych procedur a jakiegokolwiek różnice, mogą niewątpliwie wpływać na otrzymywane wyniki.

Kolejnym ograniczeniem jest fakt, że podwyższone stężenie krążącego DNA może wystąpić w grupie pacjentów nieonkologicznych z innymi chorobami współistniejącymi [125]. Do grupy tej zalicza się pacjentów np. po zawale serca, urazie fizycznym lub z chorobami układowymi [126, 127, 128].

Powyższe ograniczenia zostały uwzględnione w przeprowadzonej przeze mnie pracy badawczej w przyjętych kryteriach wykluczenia. Ponadto w przeprowadzonym przeze mnie badaniu wykazałem, że czynniki epidemiologiczne zwiększające ryzyko zachorowania na ccRCC nie mają istotnego wpływu na stężenie krążącego DNA. Należy jednak podkreślić, że obecna jest obszerna ilość czynników, które mimo wszystko wpływają na stężenie krążącego DNA co powoduje, że wiarygodność i praktyczność testu może być znacząco ograniczona. Ponadto wszystkie te kwestie utrudniają interpretację wyników i bezpośrednie porównywanie poszczególnych prac naukowych.

Potencjalnie bardziej precyzyjnym markerem względem pomiaru stężenia krążącego może być współczynnik integralności DNA, który stanowi wariant oceny jakościowej krążącego DNA. Współczynnik integralności DNA jest iloczynem stężenia długich fragmentów pozakomórkowego DNA do krótkich fragmentów pozakomórkowego DNA. Długość DNA uwalnianego do płynów ustrojowych uwarunkowana jest przez mechanizm w jakim komórka ulega śmierci [129]. W przypadku zdrowych komórek przeważają procesy apoptozy, które stanowią kontrolowany i zaprogramowany proces śmierci komórki. W związku z powyższym fragmenty DNA uwalniane do płynów ustrojowych są krótsze i bardziej jednorodne pod względem długości. Z kolei DNA nowotworowe jest uwalniane z komórek, gdzie przeważają głównie niekontrolowane

procesy min. nekroza. Krążące DNA pochodzenia nowotworowego cechuje się zatem większą długością oraz rozpiętością fragmentów. W związku z powyższym zakłada się, że współczynnik integralności DNA powinien wzrastać w grupie osób z nowotworem złośliwym względem osób zdrowych. Wartość współczynnik integralności DNA powinna zwiększać się również wraz ze wzrostem stadium zaawansowania według skali TNM lub stopniem złośliwości histopatologicznej.

W przeprowadzonej przeze mnie pracy oceniłem znaczenie diagnostyczne i prognostyczne współczynnika integralności DNA. W tym celu oceniłem stężenia fragmentów DNA o długościach 90 par zasad i 222 par zasad metodą PCR a następnie wyznaczyłem współczynnik integralności DNA, który stanowił stosunek stężeń fragmentów DNA 222 par zasad do 90 par zasad.

W mojej pracy wykazałem wzrost współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z ccRCC w porównaniu do grupy kontrolnej. Wzrost współczynnika integralności DNA był wynikiem znacznego wzrostu stężenia długich fragmentów krążącego DNA w grupie pacjentów z ccRCC. Zwiększenie stężenia fragmentów DNA o charakterze nekrotycznym wpisuje się w hipotezę opisywaną w publikacjach naukowych stanowiącą, że komórki nowotworowe uwalniają znacząco dłuższe fragmenty DNA do płynów ustrojowych [130]. Zjawisko to uzasadnia również wzrost współczynnika integralności DNA w grupie osób z nowotworem złośliwym względem grupy kontrolnej. Wyniki te znajdują odzwierciedlenie w pracach przeprowadzonych na pacjentach zdiagnozowanych również z nowotworami w innych lokalizacjach[138].

W mojej pracy wykazałem także, że wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z ccRCC wzrastała istotnie statystycznie wraz ze stopniem zaawansowania według skali TNM, stopniem złośliwości histopatologicznej, średnicą zmiany pierwotnej oraz obecnością inwazji naczyniowej. W piśmiennictwie dostępne są trzy prace badawcze oceniające wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z RCC, do których przyrównałem swoje wyniki [131, 132, 1313].

W pierwszym badaniu Hausera S. i wsp. zbadano współczynnik integralności DNA u 34 pacjentów z RCC natomiast grupę kontrolną stanowiły 54 zdrowe osoby [131]. W badaniu wykorzystano reakcje RT-PCR z wykorzystaniem dwóch primerów do wykrywania: krótkich fragmentów pozakomórkowego DNA pochodzących z apoptozy(ACTB 106) oraz długich fragmentów DNA pochodzących z nekrozy (ACTB 384). Współczynnik integralności DNA w tej pracy stanowił iloczyn wartości ACTB384 do wartości ACTB 106. Autorzy pracy wykazali znamienne podwyższenie współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (1.07 vs. 0.72

p=0.04). Wykazano również, że w grupie pacjentów z RCC stężenie zarówno krótkich jak i długich fragmentów DNA było 2-3 krotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (ACTB-1.77 vs. 0.61ng/ml, p=0.0003; ACTB-106: 1.31ng/ml vs. 0.77 ng/ml p=0.003). Pomimo tego, że w pracy zastosowano inne primery do pomiaru stężeń krążącego DNA i wyznaczenia współczynnika integralności DNA to wyniki te są zbieżne z wynikami mojej pracy.

Innym badaniem oceniającym współczynnik integralności DNA w grupie pacjentów z RCC było badanie Ganga F. i wsp. [132]. W badaniu wzięło udział 78 pacjentów z RCC natomiast grupę kontrolną stanowiły 42 zdrowe osoby. Z krwi pobranej dwukrotnie – przed zabiegiem oraz po zabiegu izolowano krążące DNA. Przy użyciu reakcji PCR zmierzono stężenie fragmentów o następujących długościach: 109, 193, 397 oraz 456 par zasad. W grupie pacjentów z RCC przed zabiegiem wykryte zostały wszystkie badane długości DNA, natomiast w grupie kontrolnej jedynie fragmenty krótsze czyli o długości 109 oraz 193 par zasad. W badaniu wykazano, że współczynnik integralności DNA jest podwyższony w grupie pacjentów zdiagnozowanych z RCC. Dowiedziono również, że integralność DNA wzrasta wraz ze stadium zaawansowania choroby. W przeciwieństwie jednak do mojego badania nie wykazano zależności pomiędzy poziomem integralności DNA a stopniem złośliwości histopatologicznej według skali Fuhrmana. Analiza próbek pobranych po zabiegu wykazała natomiast zmniejszenie wykrywalności długich fragmentów DNA w stosunku do próbek pobranych przed zabiegiem – dla DNA 397 - 68% vs. 32% oraz DNA 457 - 81.8% vs. 13.6%. Powyższa informacja może stanowić potwierdzenie tezy, że długie fragmenty krążącego DNA uwalniane do płynów ustrojowych mają charakter nekrotyczny i po usunięciu ogniska pierwotnego ich ilość maleje.

W badaniu autorstwa Liu H. i wsp. zmierzono współczynnik integralności DNA z próbek krwi w trzech grupach 1) pacjenci z ccRCC w miejscowym stadium zaawansowania (n=145) 2) pacjenci z ccRCC w stadium przerzutowym (n=84) oraz 3) grupa kontrolna – osoby zdrowe (n=40) [133]. Z wykorzystaniem reakcji PCR określono stężenie 7 fragmentów DNA o długościach od 67 do 306 par zasad. Badanie to wykazało, że stężenie krótkich fragmentów DNA wzrastało wraz wzrostem stopnia zaawansowania co paradoksalnie wpłynęło na zmniejszenie współczynnika integralności DNA. Otrzymane wyniki nie są zgodne z moimi rezultatami oraz z poprzednich badań Hasuera S. i Ganga F. Różnica ta wynika zapewne z pomiaru stężeń innych frakcji krążącego DNA - przede wszystkim znacznie krótszej niż 100 par zasad. Warto podkreślić, że u pacjentów z nowotworami w innych lokalizacjach, gdzie dokonano podobnych pomiarów krótszych fragmentów krążącego DNA, także wykazano że współczynnik integralności DNA może

maleć. Niemniej autorzy omawianej publikacji wykorzystując kombinację zmierzonych wartości krążącego DNA i współczynnika integralności DNA stworzyli różne warianty modeli diagnostycznych, które pozwalają różnicować od siebie badane grupy (AUC 0.84 czułość 70% specyficzność 88%). Powyższe badanie stanowi kolejny dowód na to że, określenie współczynnika integralności DNA może mieć znaczenie diagnostyczne w grupie pacjentów z RCC pomimo tego, że otrzymany wynik jest odmienny od mojego i dwóch wcześniejszych publikacji Hausera S. i Ganga F.

Praca autorstwa Liu H i wsp. jest także jedyną dostępną w literaturze, w której zbadano znaczenie prognostyczne współczynnika integralności DNA. W analizie wieloczynnikowej COXA autorzy wykazali, że różne warianty współczynnika integralności DNA mają wpływ na czas wystąpienia wznowy choroby w grupie pacjentów w stadium zlokalizowanym. W mojej pracy nie wykazałem, aby współczynnik integralności DNA miał znaczenie prognostyczne. Różnica może wynikać z mniejszej grupy badawczej w moim badaniu (132 pacjentów vs. 46 pacjentów) oraz krótszego czasu obserwacji (70 miesięcy vs. 24 miesiące). Ponadto w mojej pracy grupa pacjentów była niejednorodna, ponieważ uwzględniała osoby zdiagnozowane również w stadium przerzutowym. Istotne różnice obecne były także w metodologiach, ponieważ w przytoczonej pracy badano odmienne frakcje krążącego DNA, które posłużyły do wyznaczenia współczynnika integralności DNA.

Wartym podkreślenia jest również fakt, że żadne z powyższych badań nie uwzględniło pacjentów ze zmianami łagodnymi. Grupy kontrolne w tych badaniach stanowione były wyłącznie przez osoby zdrowe. W moim badaniu, w którym uwzględniłem grupę pacjentów z nowotworem oncocytoza wykazałem, że przedoperacyjny poziom współczynnika integralności DNA jest wyższy w grupie pacjentów z ccRCC w porównaniu do grupy pacjentów z nowotworem oncocytoza, ale wyniki te nie są istotne statystycznie. W związku z powyższym współczynnik integralności DNA nie pozwala różnicować pacjentów z nowotworem oncocytoza od pacjentów z nowotworem ccRCC i na tej podstawie nie może być uznany jako marker o charakterze diagnostycznym.

Istotnym zagadnieniem wymagającym odrębnego komentarza w nawiązaniu do tematu mojej pracy badawczej jest rola krążącego DNA w grupie pacjentów zdiagnozowanych w przerzutowym stadium zaawansowania RCC. Według aktualnych standardów postępowania pacjenci w stadium zaawansowanym RCC kwalifikowani są do leczenia systemowego z wykorzystaniem leków, które w sposób celowany blokują poszczególne etapy szlaku kancerogenezy. Dostępnych jest szereg leków mających punkt uchwytu w ścieżkach sygnałowych min. szlaku M-TOR lub receptora VEGF. Dobór tych

leków do pacjenta nie jest jednak uwarunkowany profilem genetycznym choroby lecz wynikami badań randomizowanych porównujących poszczególne leki przede wszystkim z uwzględnieniem najważniejszych wyników onkologicznych oraz nomogramów uwzględniającymi klasyczne czynniki prognostyczne. W raku jasnokomórkowym nerki najczęstsze mutacje dotyczą genu VHL (90% pacjentów) a następnie genów PBRM1, BAP1, SETD2 i KDM5C. Analiza poszczególnych mutacji będących potencjalnym biomarkerem o znaczeniu rokowniczym w przerzutowym stadium raka nerki podlega ocenie w badaniach klinicznych z wykorzystaniem leków najnowszych generacji. Między innymi w jednym z nich - w badaniu RECORD - 3 rekrutującym pacjentów w przerzutowym stadium zaawansowania raka nerki do terapii evorolimusem lub sunitynibem wykazano, że obecność mutacji PBRM1, BAP1 i KDM5C potwierdzonej w tkance nowotworowej może stanowić jeden z istotnych czynników predykcyjnych [134]. Co istotne w badaniu przeprowadzonym na niewielkiej próbie 30 pacjentów w zlokalizowanym stadium zaawansowania RCC, którzy zostali zakwalifikowani do leczenia operacyjnego dokonano analizy jakościowej krążącego DNA z wykorzystaniem metody NGS [1135]. Analiza wykazała obecność przynajmniej jednej z badanych mutacji punktowych, które mają znaczenie rokownicze w przerzutowym stadium RCC. Badanie to udowadnia, że nawet w niskim stopniu zaawansowania choroby możliwe jest wykrycie mutacji w krążącym DNA charakterystycznych dla RCC. W związku z powyższym ich wykrywalność w stadium zaawansowanym jest tym bardziej prawdopodobna i uzasadnione jest prowadzenie badań w tym kierunku. Potwierdzeniem tej tezy jest badanie Pal Sk. i wsp. gdzie zmierzono częstość mutacji genomowych w krążącym DNA wyizolowanym z próbek krwi pacjentów w przerzutowym stadium zaawansowania RCC [136]. Próbkę krwi zostały pobrane od pacjentów w trakcie pierwszego cyklu terapii systemowej oraz w trakcie następnego cyklu terapii. Obecnie jest to największe badanie obejmujące grupę 224 pacjentów i jego celem było zbadanie hipotezy, że na podstawie krążącego DNA można wykryć mutacje genomowe charakterystyczne dla RCC i, że częstość tych mutacji zmieni się pod wpływem kolejnych linii terapii. Wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji metodą Hiseq 2500 porównano próbki krwi pacjentów po pierwszym cyklu terapii systemowej z próbkami pacjentów po drugim cyklu terapii systemowej. W badaniu wykazano, że badane próbki pomiędzy kolejnymi cyklami leczenia różniły się częstością występowania poszczególnych mutacji w następujących genach: TP53 (49% vs. 24%), VHL (29% vs. 18%), NF1 (20% vs. 8%), EGFR (15% vs. 8%), PIK3CA (ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) (17% vs. 8%). Sugeruje się, że zmiana częstość występowania mutacji może być wynikiem leczenia systemowego a krążące DNA może umożliwić

dynamiczne śledzenie zmian genetycznych w trakcie leczenia systemowego. W badaniu nie wykazano jednak wpływu otrzymanych wyników na wyniki onkologiczne. Co istotne wyniki tego badania wskazują, że częstość poszczególnych mutacji genomowych w stadium przerzutowym może odbiegać od danych, które pochodzą z atlasu TCGA, który bazuje na materiale pobranym od pacjentów w zlokalizowanym stadium zaawansowania choroby i wskazują, że ogniska przerzutowe RCC mogą mieć zgoła inny potencjał genetyczny niż ognisko pierwotne.

Uzyskane wyniki powyższego badania mogą być tłumaczone przez obecność zjawiska określanego terminem heterogenność. Nowotwory złośliwe są niejednorodne co oznacza, że składają się z wielu ognisk o różnym stopniu złośliwości i mogą mieć odmienną charakterystykę molekularną. Heterogenność w przerzutowym stadium zaawansowania choroby nowotworowej dotyczy oprócz ogniska pierwotnego również ognisk przerzutowych. Ma to istotne znaczenie w praktyce klinicznej i ogranicza wiarygodność klasycznej biopsji tkankowej, ponieważ pojedynczy wycinek z ogniska choroby nie pozwoli wiarygodnie oznaczyć spektrum wszystkich mutacji oraz rearanżacji genetycznych u danego pacjenta. Z kolei wykonanie wielokrotnej biopsji tej samej zmiany i dodatkowo biopsji ognisk przerzutowych jest niepraktyczne i obarczone zwiększonym ryzykiem powikłań (krwawienie, rozsiew choroby). Rozwiązaniem tego problemu może być potencjalnie biopsja płynna z wykorzystaniem krążącego DNA, która może być źródłem informacji komplementarnej do wyniku biopsji tkankowej. Dotychczas przeprowadzono jedno badanie na grupie pacjentów z mRCC porównujące częstość mutacji genomowych odpowiedzialnych za proces kancerogenezy pomiędzy tkanką nowotworu a krążącym DNA z wykorzystaniem metody NGS [137]. Na próbie 19 pacjentów z mRCC wykazano podobną ilość mutacji genomowych pomiędzy tkanką nowotworu a krążącym DNA, ale zgodność jedynie na poziomie 8,6%. Ograniczeniem badania jest przede wszystkim niewielka próba badawcza oraz to, że materiał pochodzący z tkanki nowotworu i z krwi nie był pobrany jednocześnie co mogło skutkować ewolucją poszczególnych zmian genetycznych. To badanie wpisuje się jednak w wyniki innych analogicznych badań, które dowodzą, że krążące DNA stanowi ważne źródło wszelkich mutacji oraz rearanżacji genetycznych oraz może także potwierdzać hipotezę, że biopsja płynna z wykorzystaniem krążącego DNA może również stanowić w przyszłości substytut badania histopatologicznego.

6. WNIOSKI

1. Pacjenci z nowotworem ccRCC oraz pacjenci z nowotworem oncocytoma cechują się istotnie wyższym stężeniem krążącego DNA oraz wyższą wartością współczynnika integralności DNA w porównaniu do osób zdrowych. Z kolei różnice w badanych parametrach pomiędzy pacjentami z nowotworem ccRCC a pacjentami z nowotworem oncocytoma są nieistotne statystycznie w związku z powyższym badane parametry nie mogą być wykorzystane jako marker diagnozujący odmianę histopatologiczną nowotworu nerki przed podjęciem leczenia.
2. Badane parametry tj. poziom stężenia krążącego DNA zmierzone metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA są istotnie statystycznie zależne od klasycznych czynników rokowniczych dla ccRCC tj. stopnia zaawansowania w skali TNM, stopnia złośliwości histopatologicznej, obecności inwazji naczyniowej oraz korelują dodatnio ze średnicą zmiany pierwotnej.
3. Analiza przeżycia Kaplaina Meiera wykazała, że podwyższone wartości całkowitego stężenia krążącego DNA zmierzone metodą PCR mają negatywny wpływ na przeżycie specyficzne dla choroby. Wieloczynnikowy model regresji COXA wykazał jednak, że pomiar całkowitego stężenia krążącego DNA zmierzony metodą PCR nie jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w grupie pacjentów z ccRCC. Nie wykazano, także aby współczynnik integralności DNA miał istotne znaczenie rokownicze.
4. Czynniki epidemiologiczne zwiększające ryzyko zachorowania dla RCC (wiek, płeć, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, poziom współczynnika BMI) nie mają wpływu na stężenie krążącego DNA oraz wartość współczynnika integralności DNA. Stwierdzono jedynie istotnie wyższy poziom współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów ccRCC w przypadku obecności objawów klinicznych choroby oraz nałogu tytoniowego w wywiadzie.

7. STRESZCZENIE

WPROWADZENIE

Corocznie w Polsce zdiagnozowanych zostaje 5 tysięcy pacjentów z nowotworem RCC. Wśród kilku odmian RCC najczęściej występującym jest rak jasnokomórkowy nerki (ccRCC) wywodzący się z komórek nabłonkowych kanalika proksymalnego nefronu.

Diagnostyka pacjentów z nowotworem nerki niezależnie od stadium zaawansowania i etapu leczenia oparta jest o dwa główne badania – konwencjonalne badania obrazowe oraz klasyczną biopsję tkankową. Powyższe badania nie pozwalają jednak na precyzyjną diagnostykę i zróżnicowanie morfologii zmiany przed podjęciem leczenia.

Również określenie rokowania w grupie pacjentów z RCC wymaga poprawy, gdyż aktualnie w tym celu wykorzystywane są nomogramy, które uwzględniają klasyczne czynniki prognostyczne w RCC. Prowadzone są intensywne badania nad markerami w grupie pacjentów z RCC, które pozwoliłyby poprawić zarówno diagnostykę pierwotną jak i lepiej określić rokowanie przed podjęciem leczenia. Izolacja z płynów ustrojowych pacjenta krążącego DNA a następnie jego dalsza analiza stanowi jedno z potencjalnych narzędzi mogących mieć istotne znaczenie diagnostyczne oraz prognostyczne w grupie pacjentów z RCC. Badanie krążącego DNA stanowi jeden z wariantów biopsji płynnej, która wpisuje się w założenia współczesnej onkologii.

CEL PRACY

Pierwszym celem pracy było zbadanie czy ocena ilościowa (pomiar stężenia krążącego DNA we krwi) oraz ocena jakościowa (ocena współczynnika integralności DNA) ma znaczenie diagnostyczne w grupie pacjentów zdiagnozowanych z nowotworem nerki przed podjęciem leczenia operacyjnego.

Drugim celem pracy było zbadanie czy ocena ilościowa oraz jakościowa ma znaczenie prognostyczne w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC.

Trzecim celem pracy jest ocena wpływu obecności klasycznych czynników prognostycznych dla ccRCC tj. stopnia zaawansowania nowotworu w skali TNM, stopnia zróżnicowania nowotworu w skali Fuhrmana, średnicy zmiany pierwotnej i obecności inwazji naczyniowej na stężenie krążącego DNA we krwi oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC.

Czwarty celem pracy jest ocena wpływu występowania objawów klinicznych oraz czynników epidemiologicznych odgrywających rolę w patogenezie RCC (tj.: wiek, płeć, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, współczynnik BMI, palenie tytoniu) na stężenie krążącego DNA we krwi oraz wartość współczynnika integralności DNA.

MATERIAŁ I METODY

Do badania zakwalifikowano pacjentów z podejrzeniem nowotworu złośliwego nerki. Z pacjentów poddanych operacji wyodrębniono grupę badawczą osób zdiagnozowanych (w badaniu histopatologicznym) z nowotworem ccRCC oraz grupę badawczą osób zdiagnozowanych z nowotworem łagodnym oncocytoma. Grupę kontrolną w badaniu stanowiły osoby zdrowe.

W ramach przeprowadzonych badań przed zabiegiem operacyjnym pobrano krew pełną od pacjentów z podejrzeniem nowotworu złośliwego nerki do probówek z EDTA. Metodą kolumnkową z wykorzystaniem zestawu firmy Qiagen przeprowadzono izolacje krążącego DNA. Stężenie krążącego DNA zmierzono metodą fluorymetryczną (Bit). Następnie metodą RT-PCR zmierzono stężenie fragmentów o długościach 90pz i 222pz. Całkowite stężenie krążącego DNA odzwierciedlała frakcja krążącego DNA o długości 90pz. Wyznaczono współczynnik integralności DNA stanowiący stosunek stężeń krążącego DNA o długościach 90pz i 222pz .

Zgodność z rozkładem normalnym sprawdzono przy pomocy testu Shapiro-Wilka w każdej z analizowanych grup. W przypadku rozkładu normalnego do porównania dwóch grup stosowano test t-Studenta w modelu zmiennych niezależnych dla wariancji homogenicznych. W razie braku zgodności z rozkładem normalnym stosowano test nieparametryczny Manna-Whitneya. Do porównania trzech grup, ponieważ nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym lub wariancje w grupach nie były homogeniczne zastosowano test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna.

W oparciu o pojęcie czułości i swoistości testu diagnostycznego dla każdej wartości (punktu odcięcia) analizowanych parametrów wyznaczono krzywą ROC (Receiver Operating Characteristic). Następnie obliczono pole powierzchni pod krzywą AUC (Area Under Curve) i zbadano jego istotność. Dla parametrów, których AUC było istotne, wyznaczono optymalny punkt odcięcia dla którego czułość i swoistość osiągają wartość optymalną.

W celu oszacowania prawdopodobieństwa przeżycia wyznaczono krzywe Kaplana-Meiera natomiast do porównania dwóch krzywych użyto testu Log-rank.

Dla czynników ryzyka zwiększających wystąpienie RCC wyznaczono ilorazy szans z 95% przedziałami ufności przy pomocy regresji logistycznej. Wyznaczono modele jednowymiarowe oraz model wielowymiarowy.

Przyjęto poziom istotności $p=0.05$.

WYNIKI

1. Pomiar przeprowadzone metodą fluorymetryczną oraz PCR wykazały, że stężenie krążącego DNA było istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów z ccRCC i oncocytomą w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.05$). Zaobserwowałem istotny statystycznie wzrost współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z ccRCC, w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.001$). Nie zaobserwowałem natomiast istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą pacjentów z onocytomą, a grupą pacjentów z ccRCC względem żadnego z badanych parametrów. W analizie wieloczynnikowej wykazałem, że wysokie wartości stężenia krążącego DNA zmierzone metodą PCR były niezależnym czynnikiem zwiększającym prawdopodobieństwo wykrycia ccRCC.

2. W grupie pacjentów z ccRCC wykazałem, że całkowite stężenie krążącego DNA było zależne od stopnia zaawansowania choroby według skali TNM, stopnia złośliwości histopatologicznej, inwazji naczyniowej oraz wielkości zmiany pierwotnej.

3. Na podstawie analizy krzywej ROC ustalone zostały wartości badanych parametrów, które w analizie Kaplana Meiera rozpatrywane były jako podwyższone lub mieszczące się w granicach normy. W przypadku współczynnika integralności DNA wykazany został brak zdolności zróżnicowania badanych grup dlatego nie był on uwzględniony w dalszych analizach. Próg odcięcia dla frakcji DNA o długości 90pz wyniósł 2913 kopie/ml. W analizie Kaplana Meiera wykazałem, że pacjenci z wartościami krążącego DNA powyżej 2913 kopii/ml cechowali się istotnie statystycznie gorszym przeżyciem specyficznym dla raka (test Log Rank Mantel-Cox $p = 0.025$).

4. Analiza jednoczynnikowa COXA wykazała, że pomiar całkowitego stężenia krążącego DNA, status parametrów histopatologicznych (stopień zaawansowania miejscowego, obecność przerzutów odległych, obecność inwazji naczyniowej, stopień złośliwości histopatologicznej, średnica zmiany pierwotnej) oraz obecność objawów klinicznych mają istotny statystycznie wpływ na rokowanie pacjentów z RCC. W modelu analizy wieloczynnikowej COXA uwzględniającej parametry patologiczne oraz całkowite stężenie krążącego DNA wykazałem, że żaden z badanych parametrów nie jest niezależnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów z RCC. W analizie COXA potwierdziłem, że model SSIGN ma znacząco wyższą skuteczność rokowniczą w porównaniu do pomiaru stężenia krążącego DNA o długości 90pz.

WNIOSKI

1. Pacjenci z nowotworem ccRCC oraz pacjenci z nowotworem oncocytoma cechują się istotnie wyższym stężeniem krążącego DNA oraz wyższą wartością współczynnika integralności DNA w porównaniu do osób zdrowych. Z kolei różnice w badanych parametrach pomiędzy pacjentami z nowotworem ccRCC a pacjentami z nowotworem oncocytoma są nieistotne statystycznie w związku z powyższym badane parametry nie

mogą być wykorzystane jako marker diagnozujący rodzaj histopatologiczny nowotworu nerki przed podjęciem leczenia.

2. Badane parametry tj. poziom stężenia krążącego DNA zmierzone metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA są istotnie statystycznie zależne od klasycznych czynników rokowniczych dla ccRCC tj. stopnia zaawansowania w skali TNM, stopnia złośliwości histopatologicznej, obecności inwazji naczyniowej oraz korelują dodatnio ze średnicą zmiany pierwotnej.

3. Analiza przeżycia Kaplaina Meiera wykazała, że podwyższone wartości całkowitego stężenia krążącego DNA zmierzone metodą PCR mają negatywny wpływ na przeżycie specyficzne dla choroby. Wieloczynnikowy model regresji COXA wykazał jednak, że pomiar całkowitego stężenia krążącego DNA zmierzony metodą PCR nie jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w grupie pacjentów z ccRCC. Nie wykazano, także aby współczynnik integralności DNA miał istotne znaczenie rokownicze.

4. Czynniki epidemiologiczne zwiększające ryzyko zachorowania dla RCC (wiek, płeć, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, poziom współczynnika BMI) nie mają wpływu na stężenie krążącego DNA oraz wartość współczynnika integralności DNA. Stwierdzono jedynie istotnie wyższy poziom współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów ccRCC w przypadku obecności objawów klinicznych choroby oraz nałogu tytoniowego w wywiadzie.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

INTRODUCTION

Every year 5000 patients in Poland are diagnosed with RCC. The most common type of RCC is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), which originates from renal proximal tubular epithelial cells.

The diagnostics of patients with renal cancer, regardless of the stage of the disease and advancement of treatment is based on two main examinations – conventional imaging and classic tissue biopsy. However, the above-mentioned examinations do not allow for precise diagnostics and differentiation of lesion morphology before starting treatment.

The determination of prognosis in the group of patients with RCC requires improvement as well, as it is currently based on nomograms including classic prognostic factors for RCC. Intensive research is being carried out on markers in the group of patients with RCC, which would improve primary diagnostics and help more effectively establish prognoses before starting treatment. The extraction of circulating DNA from the body fluids of a patient followed by its further analysis is one of the potential tools that may have significant diagnostic and prognostic significance in the group of patients with RCC. The analysis of circulating DNA is one of the variants of liquid biopsy, which remains in line with the principles of modern oncology.

AIM OF THE STUDY

The aim of the study was to establish whether quantitative (measurement of circulating DNA concentration in the blood) and qualitative assessment (assessment of the DNA integrity index) has diagnostic significance in the group of patients diagnosed with renal cancer before starting surgical treatment.

Another aim of the study was to establish whether quantitative and qualitative assessment has prognostic significance in the group of patients with ccRCC.

Moreover, the impact of clinical symptoms and epidemiological factors playing a role in the pathogenesis of RCC (i.e. age, sex, hypertension, type 2 diabetes, BMI, smoking) on the studied parameters was examined as well.

MATERIAL AND METHODS

The study included patients with suspected malignant renal tumors. Two study groups were established from all patients who underwent surgery: a groups of patients diagnosed (in histopathological examination) with ccRCC and a group of patients diagnosed with benign oncocytoma. Healthy individuals constituted the control group of the study.

As part of the examinations performed before surgery, whole blood was collected to EDTA tubes from the patients with suspected malignant renal tumors. Qiagen kits were used to extract circulating DNA with the spin-column procedure. Circulating DNA

concentration was measured with the fluorometric method (Bit). Subsequently, the concentration of 90bp and 222bp fragments was measured by RT-PCR. Total circulating DNA concentration was reflected by the circulating 90bp DNA fraction. The DNA integrity index, i.e. the ratio of circulating 90bp and 222bp DNA concentrations, was also determined.

Normality of distribution was verified using the Shapiro-Wilk test in each of the analyzed groups. In the case of normal distribution, the t-Student test in the model of independent variables for homogeneous variances was used to compare the two groups. In the case of non-normal distribution, the non-parametric Mann-Whitney test was applied. The Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison was used to compare the three groups, as normality of distribution was not confirmed or variances in the groups were not homogeneous.

Based on the notions of the sensitivity and specificity of diagnostic tests, an ROC (Receiver Operating Characteristic) curve was determined for each value (cut-off point) of the analyzed parameters. The AUC (Area Under Curve) was subsequently calculated and its significance was analyzed. Optimal cut-off points, for which sensitivity and specificity reach optimal values, were determined for the parameters whose AUC proved significant.

The Kaplan-Meier curves were established to estimate the likelihood of survival, while the Log-rank test was used to compare the two curves.

Odds ratios with 95% confidence intervals were determined using logistic regression for the risk factors increasing the incidence of RCC. One-dimensional models and a multidimensional model were established.

The assumed significance level was $\alpha=0.05$.

RESULTS

1. Fluorometric and PCR measurements showed that the concentration of circulating DNA was statistically significantly higher in the group of patients with ccRCC and oncocytoma compared to the control group ($p < 0.05$). A statistically significant increase in the DNA integrity index in the ccRCC patient group was observed compared to the control group ($p < 0.001$). However, no statistically significant difference was found between the group of patients with oncocytoma and the group of patients with ccRCC with respect to any of the studied parameters. It was demonstrated in multivariate analysis that high values of circulating DNA concentration measured with PCR were an independent factor increasing the likelihood of ccRCC detection.

2. It was determined that in the group of patients with ccRCC the total concentration of circulating DNA was dependent on the stage of the disease according to the TNM scale, the grade of histopathological malignancy, vascular invasion, and the size of the primary lesion.

3. ROC curve analysis was used to establish the values of the studied parameters which were considered elevated or within the norm in the Kaplan-Meier analysis. The DNA integrity index was demonstrated to be incapable of differentiating between the studied groups, which is why it was not included in further analyzes. The cut-off threshold for the 90 bp DNA fraction was 2913 copies/ml. In the Kaplan-Meier analysis it was demonstrated that patients with circulating DNA values above 2913 copies/ml had statistically significantly worse cancer-specific survival (Log Rank Mantel-Cox test $p=0.025$).

4. Univariate Cox analysis revealed that the measurement of total circulating DNA concentration, the status of histopathological parameters (local stage, presence of distant metastases, presence of vascular invasion, grade of histopathological malignancy, primary lesion diameter), and the presence of clinical symptoms have a statistically significant impact on the prognosis of patients with RCC. In the multivariate Cox analysis model, taking into account pathological parameters and total circulating DNA concentration, it was demonstrated that none of the studied parameters is an independent prognostic factor for patients with RCC. Using the Cox analysis it was confirmed that the SSIGN model has a significantly higher prognostic value compared to the measurement of circulating 90bp DNA concentration.

CONCLUSIONS

1. Based on the research conducted, it was demonstrated that preoperative measurement of circulating DNA concentration and DNA integrity index assessment are not capable of differentiating between patients with benign oncocytoma and patients with ccRCC, so they cannot be used as a biomarker with diagnostic significance.

2. It was not determined that the following epidemiological factors increasing the risk of developing RCC: age, gender, hypertension, type 2 diabetes, or BMI level, have a significant impact on circulating DNA concentration and DNA integrity index value. Only in the group of patients with ccRCC, where clinical symptoms of the disease were present and tobacco addiction was confirmed, a significantly higher level of DNA integrity index was found.

3. It was demonstrated that circulating DNA concentration in the group of patients with ccRCC depends on the classic prognostic factors for ccRCC (TNM scale, Fuhrman scale, LVI presence, and size of the primary lesion).

4. It was demonstrated that high values of circulating DNA concentration before surgery have prognostic significance for disease-specific survival in the group of patients with ccRCC, based on a survival curve according to Kaplan-Meier. The Cox multivariate analysis model, however, indicates that the measurement of circulating DNA concentration cannot be considered as an independent prognostic factor for ccRCC.

9. SPIS RYCIN

1. Zjawisko genometastasis.....	19
2. Warianty śmierci komórkowej i ich wpływ na długość krążącego DNA uwalnianego do płynów ustrojowych.....	20
3. Warianty oceny i możliwości wykorzystania krążącego DNA w praktyce klinicznej.....	25
4. Pomiar stężenia krążącego DNA metodą fluorymetryczną w grupie: kontrolnej, w grupie pacjentów z ccRCC oraz w grupie pacjentów z oncocytoma.....	37
5. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma.....	38
6. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 222pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma.....	39
7. Wartości współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma.....	39
8. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC od grupy kontrolnej.....	40
9. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania oraz w w stadium przerzutowym.....	43
10. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 222pz metodą PCR w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania oraz w stadium przerzutowym.....	43
11. Wartości współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC oraz w grupie pacjentów z nowotworem oncocytoma.....	44
12. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC z przerzutami odległymi od grupy pacjentów z ccRCC bez przerzutów odległych.....	44
13. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC w I stadium zaawansowania klinicznego od grupy kontrolnej.....	46
14. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz metodą PCR w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.....	48
15. Pomiar stężenia frakcji krążącego DNA o długości 222pz metodą PCR w grupie	

pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.....	48
16. Pomiar współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.....	49
17. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów z ccRCC o niskim stopniu zróżnicowania histopatologicznego od pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu zróżnicowania histopatologicznego.....	49
18. Analiza przeżycia specyficznego dla choroby w grupie pacjentów z ccRCC w zależności od wyniku nomogramu SSIGN według Kaplaina-Meiera.....	51
19. Krzywa ROC w odniesieniu do wartości badanych parametrów przed zabiegiem, różnicująca grupę pacjentów żyjących od grupy pacjenów, u której doszło do zgonu w trakcie obserwacji.....	53
20. Analiza przeżycia specyficznego dla choroby w grupie pacjentów z ccRCC w zależności od wartości stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz według Kaplaina-Meiera.....	54

10. SPIS TABEL

1. Klasyfikacja TNM w nowotworach RCC.....	10
2. Zalety biopsji płynnej w odniesieniu do klasycznej biopsji tkankowej.....	22
3. Charakterystyka patologiczna pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu w badaniu.....	29
4. Charakterystyka kliniczna osób biorących udział w badaniu z podziałem na grupy badawcze.....	30
5. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	34
6. Poziom stężenia krążącego DNA zmierzony metodą fluorymetryczną w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z ccRCC oraz w grupie pacjentów z oncocytomą.....	37
7. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z nowotworem.ccRCC.oraz.w.grupie.pacjentów.z.nowotworem.oncocytoma.....	38
8. Wartości diagnostyczne oraz czułość, swoistość i AUC badanych parametrów pozwalające różnicować grupę pacjentów z ccRCC od grupy kontrolnej.....	40
9. Model regresji logistycznej jednoczynnikowej i wieloczynnikowej parametrów klinicznych predysponujących do wykrycia ccRCC.....	41
10. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z przerzutowym nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania oraz w stadium przerzutowym.....	42
11. Wartości diagnostyczne, czułość, swoistość i AUC badanych parametrów pozwalające różnicować grupę pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium miejscowego zaawansowania od grupy pacjentów z nowotworem ccRCC w stadium przerzutowym.....	44
12. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z.nowotworem ccRCC w I stadium zaawansowania.klinicznego.....	45
13. Wartości diagnostyczne oraz czułość, swoistość i AUC badanych parametrów pozwalające różnicować grupę kontrolną od grupy pacjentów z ccRCC w I stadium zaawansowania klinicznego.....	46
14. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej oraz w grupie pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.....	47

15. Wartości diagnostyczne, czułość, swoistość, AUC, pomiaru stężenia krążącego DNA metodą PCR, współczynnika integralności DNA pozwalające różnicować grupę pacjentów z nowotworem ccRCC o niskim stopniu złośliwości histopatologicznej od grupy pacjentów z ccRCC o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.....50
16. Ocena korelacji pomiędzy średnicą zmiany pierwotnej, a wartością badanych parametrów według współczynnika Spermanna w grupie pacjentów z ccRCC.....50
17. Poziom stężenia frakcji krążącego DNA o długości 90pz, 222pz zmierzony metodą PCR oraz wartość współczynnika integralności DNA w grupie pacjentów z nowotworem ccRCC bez stwierdzonej inwazji naczyniowej oraz w grupie pacjentów ze ccRCC ze stwierdzoną inwazją naczyniową.....51
18. Analiza przeżycia COXA względem skali SSIGN dla grupy pacjentów z ccRC.....52
19. Wartości diagnostyczne, czułość, swoistość, AUC, badanych parametrów różnicujące grupę pacjentów żyjących z ccRCC od grupy pacjentów z ccRCC, u której doszło do zgonu w trakcie obserwacji.....53
20. Analiza jednoczynnikowa i wieloczynnikowa przeżycia COXA względem wybranych parametrów klinicznych, patologicznych i całkowitego stężenia krążącego DNA zmierzonego metodą PCR.....55
21. Analiza jednoczynnikowa i wieloczynnikowa przeżycia COXA względem stężenia frakcji krążącego DNA 90 pz metodą PCR oraz wartości skali SSIGN.....56

11. PIŚMIENNICTWO

1. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S i wsp. Renal Cell Carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17009.
2. Capitanio U, Bensalah K, Bex A i wsp. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2019;75:74-84.
3. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M i wsp. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol* 2015;67:519–530.
4. Krajowy Rejestr Nowotworów strona internetowa: <http://epid.coi.pl/KRN/>
5. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 2010;7:245–257.
6. Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL i wsp. Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *J Urol* 2013;190:1657–1651.
7. Clague J, Lin J, Cassidy A i wsp. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:801–807.
8. Maher ER. Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol* 2018;36:1891-1898
9. Gibbons RP, Monte JE, Correa RJ Jr, Mason JT. Manifestations of renal cell carcinoma. *Urology* 1976;8:201–206.
10. Li P, Wong YN, Armstrong K i wsp. Survival among patients with advanced renal cell carcinoma in the pretargeted versus targeted therapy eras. *Cancer Med* 2016;5:169–181.
11. Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J. Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. *Rev Urol* 2002;4:163–170.
12. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA i wsp. The 2016 WHO Classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol* 2016;70:93–105.
13. Reuter VE, Tickoo SK. Differential diagnosis of renal tumours with clear cell histology. *Pathology* 2010;42:374–383.
14. Chen YB, Xu J, Skanderup AJ i wsp. Molecular analysis of aggressive renal cell carcinoma with unclassified histology reveals distinct subsets *Nat Commun.* 2016;7:13131.
15. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 1982;6:655–663.
16. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499:43-49.
17. Zbar B, Brauch H, Talmadge C i wsp. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 1987;1:721-724.

18. Shen C, Beroukhi R, Schumacher SE i wsp. Genetic and functional studies implicate HIF1a as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov* 2011;1:222-235.
19. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Masson D i wsp. Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer* 2009;101:1417-1424.
20. Ohh M, Park CW, Ivan M i wsp. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel–Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000; 2:423-427.
21. Hakimi AA, Chen YB, Wren J i wsp. Clinical and pathologic impact of select chromatin-modulating tumor suppressors in clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2013;63:848–854.
22. Kapitsinou PP, Haase VH. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* 2008;15:650–659.
23. Wei EY, Hsieh JJ. A river model to map convergent cancer evolution and guide therapy in RCC. *Nat Rev Urol* 2015;12:706–712.
24. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y i wsp. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013;45:860–867.
25. Ficarra V, Novara G, Galfano A i wsp. Application of TNM, 2002 version, in localized renal cell carcinoma: is it able to predict different cancer-specific survival probability? *Urology* 2004;63:1050-1054.
26. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C i wsp. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell. 2009:255-257.
27. Jinzaki M, Ohkuma K, Tanimoto A i wsp. Small solid renal lesions: usefulness of power Doppler US. *Radiology* 1998;209:543–550.
28. amis-Dow CA, Choyke PL, Jennings SB i wsp. Small (< or 1/4 3-cm) renal masses: detection with CT versus US and pathologic correlation. *Radiology* 1996;198:785–788.
29. Kopka L, Fischer U, Zoeller G i wsp. Dual-phase helical CT of the kidney: value of the corticomedullary and nephrographic phase for evaluation of renal lesions and preoperative staging of renal cell carcinoma. *AJR* 1997;169:1573–1578.
30. van Oostenbrugge TJ, Fütterer JJ, Mulders PFA. Diagnostic Imaging for Solid Renal Tumors: A Pictorial Review. *Kidney Cancer* 2018;2:79–93.
31. Wang ZJ, Westphalen AC, Zagoria RJ. CT and MRI of small renal masses. *Br J Radiol* 2018;91:20180131.
32. Sahni VA, Silverman SG. Biopsy of renal masses: when and why. *Cancer Imaging* 2009;9:44–55.
33. Marconi L, Dabestani S, Lam TB i wsp. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *Eur Urol* 2016;69:660-673.

34. Beksac AT, Paulucci DJ, Blum KA i wsp. Heterogeneity in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:507-515.
35. Volpe A, Finelli A, Gill IS i wsp. Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. *Eur Urol* 2012;62:491–504.
36. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969;101:297-301.
37. Blom JH, van Poppel H, Maréchal JM i wsp. 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;55:28-34.
38. Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F i wsp. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes: role of lymph node dissection. *J Urol* 2003;169:2076–2083.
39. Kuczyk M, Münch T, Machtens S i wsp. The need for routine adrenalectomy during surgical treatment for renal cell cancer: the Hannover experience. *BJU Int* 2002;89:517-522.
40. Huang WC, Elkin EB, Levey AS i wsp. Partial nephrectomy versus radical nephrectomy in patients with small renal tumors—is there a difference in mortality and cardiovascular outcomes? *J Urol* 2009;181:55–61.
41. Ellis RJ. Chronic kidney disease after nephrectomy: a clinically-significant entity? *Transl Androl Urol* 2019;8:166–174.
42. Van Poppel H, Da Pozzo L, Albrecht W i wsp. A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2011;59:543–552.
43. Aboumarzouk OM, Stein RJ, Eyraud R i wsp. Robotic versus laparoscopic partial nephrectomy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2012;62:1023–1033.
44. Almassi N, Gill BC, Rini B i wsp. Management of the small renal mass. *Transl Androl Urol* 2017;6:923–930.
45. Kunkle DA, Egleston BL, Uzzo RG. Excise, ablate or observe: the small renal mass dilemma—a meta-analysis and review. *J Urol*. 2008; 179:1227-1233.
46. Prudhomme M. Active Surveillance for Prostate Cancer and Small Renal Masses: New Evidences and Criticisms. *Anticancer Agents Med Chem* 2018;18:924.
47. Jewett MA, Mattar K, Basiuk J i wsp. Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer. *Eur Urol* 2011;60:39–44.
48. Logan JE, Rampersaud EN, Sonn GA i wsp. Systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma: a review and update. *Rev Urol* 2012;14:65–78.

49. Martinez Chanza N, Tripathi A, Harshman LC. Adjuvant Therapy Options in Renal Cell Carcinoma: Where Do We Stand? *Curr Treat Options Oncol* 2019;20:44.
50. Graham J, Bhindi B, Heng DY. The evolving role of cytoreductive nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2019;29:507-512.
51. Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R i wsp. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol* 2004;171:1071–1076.
52. Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA i wsp. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med* 2001;345:1655–1659.
53. Mickisch GH, Garin A, van Poppel H i wsp. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:966–970.
54. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S i wsp. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2018;379:417-427.
55. Mollica V, Nunno V, Gatto L i wsp. Resistance to Systemic Agents in Renal Cell Carcinoma Predict and Overcome Genomic Strategies Adopted by Tumor. *Cancers (Basel)* 2019;11:830.
56. Osawa T, Takeuchi A, Kojima T i wsp. Overview of current and future systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2019;49:395-403.
57. Graham J, Dudani S, Heng DY. Prognostication in Kidney Cancer: Recent Advances and Future Directions. *J Clin Oncol* 2018;JCO2018790147.
58. Frank I, Blute ML, Cheville JC i wsp. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: The SSIGN score. *J Urol* 2002;168:2395-2400.
59. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC i wsp. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: A stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer* 2003;97:1663-1671.
60. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J i wsp. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:4559-4566.
61. Sun M, Shariat SF, Cheng C i wsp. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: A contemporary review. *Eur Urol* 2011;60:644-661.
62. Ngo TC, Wood CG, Karam JA. Biomarkers of renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2014;32:243-251.
63. Brooks SA, Brannon AR, Parker JS, i wsp. ClearCode34: A Prognostic Risk Predictor for Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2014;66:77–84.

64. Rini B, Goddard A, Knezevic D i wsp. A 16-gene assay to predict recurrence after surgery in localised renal cell carcinoma: Development and validation studies. *Lancet Oncol* 2015;16:676-685.
65. Mitchell TJ, Rossi SH, Klatter T. Genomics and clinical correlates of renal cell carcinoma. *World J Urol* 2018;36:1899–1911.
66. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y i wsp. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer* 2017;16:80.
67. Chan AK, Chiu RW, Lo YM. Clinical Sciences Reviews Committee of the Association of Clinical Biochemists. Cell-free nucleic acids in plasma, serum, and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem* 2003;40:122-130.
68. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241-243.
69. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646–650.
70. Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U i wsp. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther* 2016;9:6549–6559.
71. Kohler C, Barekati Z, Radpour R i wsp. Cell-free DNA in the circulation as a potential cancer biomarker. *Anticancer Res* 2011;31:2623–2628.
72. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH i wsp. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:67–71.
73. Garcia-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, Garcia-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. *Histol Histopathol* 2004;19:575–583.
74. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:265–275.
75. Diehl F, Li M, Dressman D i wsp. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16368–16373.
76. Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J* 2018;16:370–378.
77. Lanman RB. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLOS One* 2015;10:e0140712.
78. Jahr S, Hentze H, Englisch S i wsp. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659–1665.

79. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C i wsp. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313:139–142.
80. Volik S, Alcaide M, Morin RD i wsp. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. *Mol Cancer Res* 2016;14:898–908.
81. Lo YM, Zhang J, Leung TN i wsp. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218–224.
82. Emlen W, Mannik M. Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clin Exp Immunol* 1984;56:185-192.
83. Napirei M, Ludwig S, Mezrhah J i wsp. Murine serum nucleases: contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like3 (DNase113). *Febs J* 2009; 276:1059-1073.
84. Cherepanova AV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE i wsp. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Ann NY Acad Sci* 2008;1137:218–221.
85. Jiang P, Lo YMD i wsp. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet* 2016;32:360-371.
86. Vizza E, Corrado G, De Angeli M i wsp. Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37:35.
87. Bustin SA, Benes V, Garson JA i wsp. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–622.
88. Sunami E, Vu AT, Nguyen SL i wsp. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137: 171–174.
89. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002;3:370–379.
90. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S i wsp. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006;52:1062–1069.
91. Cohen JD, Li L, Wang Y i wsp. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359:926–930.
92. Bergerot PG, Hahn AW, Bergerot CD i wsp. The role of circulating tumor DNA in renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2018;19:10.
93. Bluemke K, Bilkenroth U, Meye A i wsp. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:2190-2194.

94. Gormally E, Vineis P, Matullo G i wsp. Tp53 and kras2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: A prospective study. *Cancer Res* 2006;66:6871–6876.
95. Stewart CM, Tsui DWY. Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Genet* 2018;228-229:169–179.
96. Valpione S, Gremel G, Mundra P i wsp. Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients. *Eur J Cancer* 2018;88:1–9.
97. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M i wsp. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1199–1209.
98. Ai B, Liu H, Huang Y i wsp. Circulating cell-free DNA as a prognostic and predictive biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;7:44583– 44595.
99. No JH, Kim K, Park KH i wsp. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2012;32:3467–3471.
100. Tan G, Chu C, Gui X i wsp. The prognostic value of circulating cell-free DNA in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018;97:e0197.
101. Diaz LA, Williams R, Wu J i wsp. Vogelstein, The molecular evolution of acquired resistance to targeted egfr blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486:537–540.
102. Bryce AH, Alumkal JJ, Armstrong A i wsp. Radiographic progression with nonrising PSA in metastatic castration-resistant prostate cancer: Post hoc analysis of prevail. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2017;20:221–227.
103. Hux A, Lewis A, Sachwitz D i wsp. Clinical utility of next-generation sequencing in precision oncology. *JAAPA* 2019;32:35-39.
104. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS i wsp. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (azd9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:3375–3382.
105. Housman G, Byler S, Heerboth S i wsp. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers* 2014;6:1769–1792.
106. Cimadamore A, Gasparrini S, Massari F i wsp. Emerging Molecular Technologies in Renal Cell Carcinoma: Liquid Biopsy. *Cancers (Basel)* 2019;11:196.
107. Yamamoto Y, Uemura M, Nakano K i wsp. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2018;9:20467-20475.
108. Wan J, Zhu L, Jiang Z i wsp. Monitoring of plasma cell-free DNA in predicting postoperative recurrence of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Int* 2013;91:273-288.

109. Feng G, Ye X, Fang F i wsp. Quantification of plasma cell-free DNA in predicting therapeutic efficacy of sorafenib on metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Dis Markers* 2013;34:105–111.
110. Yusenko MV. Molecular pathology of renal oncocytoma: A review. *International Journal of Urology* 2010;17:602-612.
111. Gonzalgo ML, Eisenberger CF, Lee SM i wsp. Prognostic significance of preoperative molecular serum analysis in renal cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1878–1881.
112. von Knobloch R, Hegele A, Brandt H i wsp. High frequency of serum DNA alterations in renal cell carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int J Cancer* 2002;98:889–994.
113. Perego RA, Corizzato M, Brambilla P i wsp. Concentration and microsatellite status of plasma DNA for monitoring patients with renal carcinoma. *Eur J Cancer* 2008;44:1039–1047.
114. Shenoy N, Vallumsetla N, Zou Y i wsp. Role of DNA methylation in renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2018;9:20467-20475.
115. de Martino M, Klatte T, Haitel A i wsp. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker. *Cancer* 2012;118:82–90.
116. Skrypkina I, Tsyba L, Onyshchenko K i wsp. Concentration and methylation of cell-free DNA from blood plasma as diagnostic markers of renal cancer. *Disease Markers* 2016:3693096.
117. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta* 2015;450:243–253.
118. Markus H, Contente-Cuomo T, Farooq M i wsp. Evaluation of pre-analytical factors affecting plasma DNA analysis. *Scie Rep* 2018;8:7375.
119. Hidestrand M, Stokowski R, Song K i wsp. Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther* 2012;31:122–128.
120. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M i wsp. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem* 2003;49:1028– 1029.
121. Norton SE, Luna KK, Lechner JM i wsp. A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device. *J Clin Lab Anal* 2013; 27:305–311.
122. Jen J, Wu L, Sidransky D. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann NY Acad Sci* 2000;906:8–12.
123. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A i wsp. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: Controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bional Chem* 2014;406:6499– 6512.

124. Chan KC, Yeung SW, Lui WB i wsp. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem* 2005;51:781–784.
125. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB i wsp. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35:347-376
126. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426–437.
127. Tug S, Helmig S, Deichmann ER i wsp. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exerc Immunol Rev* 2015;21:164–173.
128. O’Connell GC, Petrone AB, Tennant CS i wsp. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Brain Inj* 2017;31:1369–1375.
129. Van der Vaart M, Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin. Chem* 2007;53:2215.
130. Cheng J, Tang Q, Cao X i wsp. Cell-Free Circulating DNA Integrity Based on Peripheral Blood as a Biomarker for Diagnosis of Cancer: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26:1595-1602.
131. Hauser S, Zahalka T, Ellinger J i wsp. Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer. *Anticancer Res* 2010;30:2785–2789.
132. Gang F, Guorong L, An Z i wsp. Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum. *Urology* 2010;75:262–265.
133. Lu H, Busch J, Jung M i wsp. Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients. *Clin Chim Acta* 2016;452:109-119.
134. Hsieh JJ, Chen D, Wang PI i wsp. Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2017;71:405–414.
135. https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2017.35.6_suppl.521
136. Pal SK, Sonpavde G, Agarwal N i wsp. Evolution of circulating tumor DNA profile from first-line to subsequent therapy in meta-static renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2017;72:557–564.
137. Hahn AW, Gill DM, Maughan B i wsp. Correlation of genomic alterations assessed by next-generation sequencing (NGS) of tumor tissue DNA and circulating tumor DNA (ctDNA) in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): potential clinical implications. *Oncotarget* 2017;8:33614–33620

12. Załączniki

Załącznik 1.

Informacje o badaniu: „Wpływ białek STAT na rozwój i progresję raka nerkowokomórkowego”

Cel badania

Rak nerkowokomórkowy (ang. *renal cell carcinoma*, RCC) jest nowotworem stanowiącym 2% wszystkich poznanych nowotworów. W większości przypadków rozwój choroby przebiega bezobjawowo i w związku z tym pacjenci zgłaszają się do lekarza w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej. Cechą charakterystyczną oprócz trudności wykrycia nowotworu, jest jego oporność na konwencjonalne metody leczenia takie jak: chemioterapia czy radioterapia. 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, iż białka z rodziny STAT, w szczególności białko STAT 3, może mieć istotny wpływ na rozwój i progresję raka nerkowokomórkowego. Z tego względu postanowiliśmy objąć to białko oraz inne białka z tej rodziny, szczegółowym badaniem. Wyniki naszej pracy mogą przyczynić się do zdefiniowania populacji komórek służących do monitorowania przebiegu choroby, ponadto białka STAT lub geny, które białka STAT regulują (bądź przez które są regulowane) mogą okazać się interesującym celem dla rozwoju nowych terapii oraz testów diagnostycznych.

Procedura badania

Pobrana zostanie od Pani/Pana jednorazowo krew - 4 próbki 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.....



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 568/17

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentyści (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania wniosków przedkladowych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkladowych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz.U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkladowych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu wiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 11 maja 2017 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu i główny badacz: prof. dr hab. Joanna Wesoły

w sprawie prowadzenia badań w

**Pracownia Technologii Wysokoprzepustowych i Zakład Genetyki
Molekularnej Człowieka UAM w Poznaniu oraz Klinika Urologii oraz
Onkologii Urologicznej UMP**

Członkowie zespołu

**badawczego: prof. dr hab. Zbigniew Kwias, lek. med. Agnieszka Ida,
dr hab. Andrzej Antczak, dr Katarzyna Kluzek, dr Arkadiusz Kajdasz, dr
Natalia Derebecka, mgr Hanna Nowicka, mgr Weronika Majer, lek.
Tomasz Milecki, lek. Jacek Sobkowiak**

**Temat badań: "Całogenomowe analizy sekwencji DNA, transkryptomu,
metylomu oraz proteomu w kontekście rozwoju i progresji
jasnokomórkowego raka nerki".**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu
powyższego badania, polegających na wydzieleniu poniższego tematu rozprawy doktorskiej
lek. med. Tomasza Mileckiego „Ocena ilościowa oraz jakościowa DNA krążącego we krwi u
pacjentów z nowotworem nerkowokomórkowym”, zgodnie z Aneks nr 2 z dnia
11.05.2017r. do Uchwały Komisji Bioetycznej Uchwały Komisji Bioetycznej nr 1124/12 z dnia
06.12.2012r. (Aneks nr 1 – Uchwała 303/17 z dnia 02.03.2017r.)**

Metodyka pozostaje bez zmian.

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Załącznik 3. Akieta badania przedmiotowego.

Nr pacjenta.....

1. Wiek

.....

Płeć

- a. kobieta
- b. mężczyzna

2. Waga (kg)

.....

3. Wzrost (cm)

.....

4. Czy występowały w rodzinie choroby nerek?

- a. TAK
- b. NIE

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

.....

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

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

7. Czy występowały jakieś objawy rozwoju raka nerkowokomórkowego?

- a. TAK
- b. NIE

8. 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 (.....)

9.Czy u kogoś w rodzinie występował rak nerkowokomórkowy?

- a. TAK
- b. NIE

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

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

11.Czy ma Pan/ Pani nadciśnienie tętnicze?

- a. TAK
- b. NIE

12.Czy przyjmuje Pan/Pani leki obniżające ciśnienie tętnicze?

- a. TAK
- b. NIE

13.Czy choruje Pan/ Pani na cukrzycę?

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

14.Czy ktoś w rodzinie chorował na cukrzycę typu 1?

- a. Matka
- b. Ojciec
- c. Babcia

- d. Dziadek
- e. Rodzeństwo
- f. Inni(.....)

15.Czy ktoś w rodzinie chorował na cukrzycę typu 2?

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

16.Czy pali Pan/Pani papierosy?

- a. TAK
- b. NIE

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

.....

18.Kiedy rzucił Pan/Pani palenie? (wiek)

.....

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

- a. TAK
- b. NIE

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

.....

21.Czy nowotwór inny niż rak nerkowokomórkowy był złośliwy(dotyczy pyt. 20)?

- a. TAK
- b. NIE

22.Czy w rodzinie występowały przypadki nowotworów złośliwych?

a. TAK

b. NIE

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

a. Matka

b. Ojciec

c. Babcia

d. Dziadek

e. Rodzeństwo

f. Inni-.....

24. Jaki rodzaj nowotworu złośliwego występował w rodzinie?

.....

25. Czy w rodzinie występowały przypadki nowotworów łagodnych?

a. TAK

b. NIE

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

a. Matka

b. Ojciec

c. Babcia

d. Dziadek

e. Rodzeństwo

f. Inni-.....

27. Jaki rodzaj nowotworu łagodnego występował w rodzinie?

.....

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

Jeżeli TAK proszę podać, jakie.

a. TAK

b. NIE

.....

29. Czy bierze Pan/ Pani jakieś dodatkowe leki?

Jeżeli TAK proszę wymienić jakie leki i na jakie schorzenie.

a. TAK

b. NIE

.....

30. Czy jest Pan/Pani obciążony choroba uwarunkowaną genetycznie?

Jeżeli TAK proszę napisać, jaką.

a. TAK

b. NIE

