

---

lek. Sumit Sharma

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

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

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

Klinika Urologii Ogólnej, Onkologicznej i Czynnościowej Warszawskiego  
Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2026 r.

---

**Słowa kluczowe:**

Rak nerki, czop nowotworowy w układzie żylnym, mikrośrodowisko guza, rak nerkowokomórkowy, czop nowotworowy w żyłę nerkowej, stymulator genów interferonu, ligand-1 glikoproteiny P-selektyny, biomarker.

**Keywords:**

Renal cancer, venous tumor thrombus, tumor microenvironment, renal cell carcinoma; renal tumor thrombus, stimulator of interferon genes, P-selectin glycoprotein ligand-1, biomarker.

---

*Pracę dedykuję mojej Żonie oraz mojemu przyjacielowi, Łukaszowi.*

---

## Wykaz spójnego tematycznie cyklu publikacji, stanowiących pracę doktorską:

- 1. Sumit Sharma**, Michał Kunc, Mieszko Czaplinski, Weronika Łyzinska, Rafał Pęksa, Le Qu, Piotr Radziszewski, Łukasz Zapała.  
*Biology of renal cancer tumor thrombus - towards the personalized approach.*  
Critical Reviews in Oncology/Hematology; 2025; 211 (104731): 1-9  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104731>

Współczynnik oddziaływania (IF) 5.6; punktacja MNISW 100

- 2. Rafał Pęksa\***, **Sumit Sharma\* (equal first)**, Michał Kunc, Marta Popęda, Le Qu, Mikołaj Frankiewicz, Marcin Folwarski, Piotr Radziszewski, Łukasz Zapała.  
*P-selectin glycoprotein ligand-1 is diversely expressed in the primary tumour and venous thrombus of clear cell renal cancer and correlates with poor overall survival.*  
\* These authors contributed equally to this work.  
Contemporary Oncology, 2024; 28 (3): 253–259  
DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2024.144225>

Współczynnik oddziaływania (IF) 1.3; punktacja MNISW 70

- 3. Sumit Sharma\***, Michał Kunc, Rafał Pęksa, Aleksandra Ciarka, Weronika Łyzińska, Le Qu, Piotr Radziszewski, Łukasz Zapała.  
*Increased immunohistochemical expression of stimulator of interferon genes (STING) in renal cancer with venous tumor thrombus is associated with worse prognosis.*  
\* corresponding author  
Biomedicines 2025; 13 (2674) 1-12  
DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines13112674>

Współczynnik oddziaływania (IF) 3.9; punktacja MNISW 100

---

## Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów .....	6
Streszczenie w języku polskim .....	8
Streszczenie w języku angielskim.....	12
Wstęp .....	16
Założenia i cele pracy.....	28
Kopie opublikowanych prac .....	30
Podsumowanie .....	58
Wnioski .....	62
Opinia Komisji Bioetycznej .....	69
Oświadczenia współautorów publikacji .....	70

---

## Wykaz stosowanych skrótów:

- BAP1 - białko związane z BRCA1-1 (ang. BRCA1 Associated Protein 1)
- ccRCC - rak jasnokomórkowy nerki (ang. Clear Cell Renal Cell Carcinoma)
- CHDH - dehydrogenaza choliny (ang. Choline dehydrogenase)
- CSS - przeżycie swoiste dla nowotworu (ang. Cancer Specific Survival)
- DOAC - bezpośrednie doustne antykoagulanty (ang. Direct Oral Anticoagulant)
- ECM - macierz zewnątrzkomórkowa (ang. Extracellular Matrix)
- HIF - czynnik indukowany hipoksją (ang. Hypoxia-Inducible Factor)
- IEGs - geny wczesnej odpowiedzi (ang. Immediate Early Genes)
- ISUP - Międzynarodowe Towarzystwo Patologii Urologicznej (ang. International Society of Urological Pathology)
- IVC - żyła główna dolna (ang. Inferior Vena Cava)
- LMR - stosunek limfocytów do monocytów (ang. Lymphocyte-to-Monocyte Ratio)
- LMWH - heparyna drobnocząsteczkowa (ang. Low Molecular Weight Heparin)
- miRNA - mikroRNA
- MVP - średnia objętość płytki krwi (ang. Mean Platelet Volume)
- NADPH - fosforan nikotynamidoadeninowy (ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
- NLR - stosunek neutrofilów do limfocytów (ang. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio)
- Nox4 - oksydaza 4 (ang. Oxidase-4, Nox4)
- OS - przeżycie całkowite (ang. Overall Survival)
- PD-L1 - ligand receptora programowanej śmierci 1 (ang. Programmed Death-Ligand 1)
- PLR - stosunek płytek krwi do limfocytów (ang. Platelets-to-Lymphocyte Ratio)
- pRCC - brodawkowaty rak nerkowokomórkowy (ang. Papillary Renal Cell Carcinoma)
- PSGL-1 - ligand-1 glikoproteiny P-selektyny (ang. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1)
- PSMA - antygen błonowy swoisty dla prostaty (ang. Prostate-Specific Membrane Antigen)
- RBP - białko wiążące retinol (ang. Retinol-Binding Protein)

---

PBRM1 - białko kodujące BAF180, polibromo-1 (ang. Polybromo-1, encoding BAF180 protein)

PHYHD1 - domena zawierająca fitanol-CoA dioksygenazę 1 (ang. Phytanol-CoA dioxygenase domain containing 1)

RCC - rak nerwowokomórkowy (ang. Renal Cell Carcinoma)

ROS - reaktywne formy tlenu (ang. Reactive Oxygen Species)

sCNAs - somatyczne zmiany liczby kopii (ang. Somatic copy number alterations)

SETD2 - domena zawierająca SET 2 (ang. SET domain-containing 2)

STING - stymulator genów interferonu (ang. Stimulator of Interferon Genes)

TAIC - komórki odpornościowe związane z guzem (ang. Tumor Associated Immune Cells)

TC - komórki guza (ang. Tumor Cells)

TF - czynnik tkankowy (ang. Tissue Factor)

TILs - leukocyty naciekające nowotwór (ang. Tumor Infiltrating Leukocytes)

TMA - mikromacierze tkankowe (ang. Tissue Microarrays)

TME - mikrośrodowisko guza (ang. Tumor Microenvironment)

TNF - czynnik martwicy nowotworów (ang. Tumor Necrosis Factor)

tPA - tkankowy aktywator plazminogenu (ang. Tissue-type Plasminogen Activator)

uPA - aktywator plazminogenu typu urokinazy (ang. Urokinase-type Plasminogen Activator)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR - receptor naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (ang. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

VISTA - supresor aktywacji komórek T z domeną V (ang. V-domain Ig Suppressor of T-cell Activation)

VTT - nowotworowy czop w układzie żylnym (ang. Venous Tumor Thrombus)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

---

## Streszczenie w języku polskim

### Wstęp

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

### Materiały i metody

#### Kohorta

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

---

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

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

### **Mikromacierze tkankowe i immunohistochemia**

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

---

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

## **Statystyka**

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

## **Wyniki**

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

---

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

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

## **Wnioski**

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

---

## **Streszczenie w języku angielskim**

### **Analysis of the prognostic value of molecular markers in renal cell carcinoma with venous tumor thrombus.**

#### **Introduction**

A venous tumor thrombus (VTT) associated with renal cell carcinoma (RCC), represents a distinct compartment within the cancer, located in the frontline of contact with the bloodstream that remains with the continuous interaction with host blood cells. Various immune cells of the host blood may potentially interplay with VTT influencing its biology. While many authors have reviewed the current state-of-art of the management of VTT, its biology and microenvironment have not been comprehensively reviewed to date. In this thesis, I have described current concepts regarding the formation of thrombus, its histopathology, immune microenvironment, genetic and molecular features with potential impact on prognostication and tailored therapy. Although it is the sophisticated and challenging surgery that remains the primary modality in the management of RCC with VTT, recent advances in the research on cancer biology and microenvironment shed some light on the numerous future perspectives. The formation of tumor thrombus is a complex process, understanding of which may trigger onset of novel therapies leading to the improvement of not only the oncological results but also patient's safety in these life-threatening conditions. In my dissertation, I focused also on the assessment of the expression of novel immune marker, P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and cytoplasmic stimulator of interferon genes (STING) in the cohort of patients with primary RCC with VTT, in conjunction with the evaluation of tumor infiltrating leukocytes (TILs) in two compartments, i.e. the primary tumor and the venous tumor thrombus. In parallel, the co-expressions of other immune-related markers, including V-domain Ig suppressor of T-cell activation (VISTA) and programmed death-ligand 1 (PD-L1), were also analyzed.

#### **Materials and Methods**

##### **Study Cohort**

The study cohort consisted of 82 patients with primary clear cell renal carcinoma (ccRCC) and venous tumor thrombus (clinical stage cT3a or higher), who underwent surgical treatment between 2012 and 2019 at two tertiary urological centers. Surgical management comprised radical nephrectomy with thrombectomy, and cavotomy, when indicated. No neoadjuvant therapy was administered prior to surgery. All procedures were performed using open

---

approach via laparotomy or lumpectomy. The study group also included patients with clinically positive regional lymph nodes (cN1), in whom lymphadenectomy was performed. Patients with distant metastases were treated primarily with surgery, either with the intention of complete tumor removal or by means of cytoreductive nephrectomy. The following data were collected: age, sex, tumor stage based on computed tomography or magnetic resonance imaging of the chest, abdomen, and pelvis according to the 2017 Tumor-Node-Metastasis (TNM) classification system (AJCC version) [1], preoperative hematological parameters (counts of neutrophils, platelets, lymphocytes, and monocytes, as well as derived ratios: neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR), and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR)) obtained from certified local laboratories (FACS, Sysmex XM200, Sysmex Poland, Poland), pathological findings, follow-up and survival data retrieved from institutional database. In case of missing data, telemedicine visits were arranged to complete the records.

The study was approved by the Bioethics Committee of Medical University of Warsaw (approval no AKBE/72/2021). Written informed consent was obtained from all participants.

### **Tissue Microarrays and Immunohistochemistry**

Hematoxylin and eosin-stained ccRCC specimens obtained from the primary tumor and venous thrombus were reviewed by two pathologists (R.P. and M.K). Sarcomatoid/rhabdoid differentiation and tumor necrosis were assessed using binary scoring systems (present vs absent). All cases were evaluated for the presence of tumor associated immune cells, including mainly leucocytes (tumor infiltrating leucocytes, TILs). Representative areas containing tumor cells and TILs were selected. Tissue microrarrays (TMAs) comprising representative samples of the primary tumor mass and venous tumor thrombus from 82 ccRCC cases were constructed using a manual Tissue Arrayer MTA-1 (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA) with 1,5mm diameter needles. Three cores were obtained from each compartment (two peripheral and one central core from the thrombus and three cores from the primary tumor) [2]. TMA blocks were cut into 5 µm thick sections for immunohistochemical analysis [2, 3]. Subsequently, the constructed TMAs were stained with antibody against PSGL-1 (clone KPL-1, dilution 1:200, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-VISTA antibody (clone D5L5T, dilution 1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and/or PD-L1 antibody (clone 22C3, dilution 1:50, DAKO, Agilent, CA, USA). PSGL-1 expression was evaluated separately in tumor cells (TC) and TILs in both tumor compartments. Subsequently, the prepared tissue microarrays were stained with anti-STING antibody (OTI4E12, product no. MA5-26032, dilution 1:100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PD-L1 and VISTA expressions were evaluated as previously described [3, 4]. Tonsils and placenta tissues served as positive controls, whereas liver samples were used as negative controls [5]. Cytoplasmic and membranous STING expression in tumor cells was quantified using H-score method (range: 0-300), calculated by multiplying the percentage of positive cells (0-100%) by staining intensity (0, 1+, 2+, 3+), as previously proposed [6]. Cytoplasmic staining of tumor cells was quantified,

---

with immune and endothelial cells serving as internal positive controls. A cutoff value of H-score >100 was applied to define high STING expression, corresponding to the 75<sup>th</sup> percentile of STING expression in venous tumor thrombus. TILs were assessed dichotomously as present ( $\geq 1\%$  stromal leukocytes) or absent ( $\leq 1\%$ ), based on practical considerations to ensure reproducibility. The percentage of positive cells was independently evaluated by two pathologists experienced in uropathology (R.P. and M.K). Discrepancies were resolved by consensus after joint review.

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Statistica version 13.3 (TIBCO, Palo Alto, CA, USA; license granted to the Medical University of Gdansk) and the R statistical environment [7]. Association between categorical variables and PSGL-1 expression were assessed using the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous variables were analyzed using the Wilcoxon test, Kruskal-Wallis test or Spearman's rank correlation, depending on data distribution. Kaplan-Meier survival curves were generated using the "survminer" package and compared with the log-rank test [8]. Hazard ratios were calculated using Cox proportional hazards regression models. Overall survival (OS) was defined as the interval between diagnosis and death from any cause. Univariate survival analysis for STING expression was performed using Kaplan-Meier curves and the log-rank test. Multivariate survival analysis was conducted using Cox proportional hazards regression with variance inflation factor (VIF) analysis to assess collinearity. Data visualization was performed using the ggplot2 and survminer packages in R [8]. All statistical tests were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## Results

PSGL-1 expression varied between tumor compartments, with higher prevalence in tumor cells (TC) located within VTT, and TILs stained in primary tumor. PSGL-1 positive TC correlated with high-grade histology, while PSGL-1 positive TILs were associated with tumor necrosis. Univariate analysis identified PSGL-1 positivity in TC within thrombus as indicator of poorer overall survival.

The frequency of STING expression in both analyzed compartments was similar ( $p=0.18$ ). Its presence correlated with no clinicopathological features but for necrosis in VTT only ( $p=0.0023$ ). PD-L1 expression in the primary tumor was associated with STING in TC in the same compartment ( $p=0.02$ ). On the contrary, VISTA expression was correlated with the presence of STING in VTT. TILs presence was associated with positive PD-L1 ( $p=0.008$ ) and STING ( $p<0.05$ ) expression in the primary tumor. Strong STING expression in VTT was associated with inferior overall survival (OS) ( $p=0.0061$ ). TILs presence emerged as a robust prognostic factor for OS in both primary tumor ( $p=0.021$ ) and VTT ( $p=0.034$ ).

---

## **Conclusions**

The increased expression of PSGL-1 in venous thrombus suggests its potential role in facilitating TC interactions with platelets and endothelium, potentially contributing to metastatic spread and worse outcomes. Additionally, this study demonstrates for the first time the prognostic values of STING in contemporary cohort of RCC patients with VTT. STING expression in VTT showed prognostic potential, while TILs assessment proved to be a particularly valuable prognostic tool that can be readily implemented in routine pathological evaluation. The use of biomarkers analyzed in this work may help develop new therapeutic strategies and personalize treatment methods for patients with RCC with concomitant VTT.

---

## Wstęp

Rak nerkowokomórkowy, który odpowiada za około 2-3% wszystkich nowotworów złośliwych u dorosłych, z wyraźną przewagą zachorowań u mężczyzn, pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej urologii onkologicznej. Stanowi niejednorodną grupę nowotworów wywodzących się z nabłonka kanalików nerkowych. Jego najczęstszym podtypem histologicznym jest jasnokomórkowy rak nerki (ang. clear cell Renal Cell Carcinoma, ccRCC), który cechuje się znaczną heterogenicznością biologiczną oraz zmiennym przebiegiem klinicznym [4, 9]. Typowo jest dobrze ograniczony, często z pseudotorebką, o charakterystycznym złocisto-żółtym przekroju z ogniskami krwotoku i martwicy [10-12]. Potwierdzone czynniki ryzyka zachorowania to przede wszystkim palenie tytoniu, otyłość oraz nadciśnienie tętnicze, ale istotną rolę przypisuje się także zespołowi metabolicznemu. Wpływ innych elementów (dieta, ekspozycje zawodowe) bywa sugerowany, jednak bez wystarczającego potwierdzenia na poziomie wysokiej jakości dowodów [12-15]. Współcześnie większość guzów nerki wykrywana jest przypadkowo w badaniach obrazowych wykonywanych z innych wskazań. Klasyczna triada objawów (ból okolicy lędźwiowej, krwimocz makroskopowy, wyczuwalny guz w jamie brzusznej) występuje rzadko i stanowi ułamek przypadków. Objawowe nowotwory częściej wiążą się z bardziej agresywną histologią, bardziej zaawansowanym stadium i gorszym rokowaniem. Zwraca się też uwagę na zespoły paranowotworowe, które mogą towarzyszyć RCC i u części chorych ustępują po wykonaniu radykalnej nefrektomii [12, 16-18]. W badaniu przedmiotowym ograniczoną, ale praktyczną wartość mają cechy sugerujące zajęcie układu żylnego (np. nieustępujące żyłaki powróżka nasiennego, obrzęk kończyn dolnych), które powinny stanowić wskazanie do pogłębionej diagnostyki obrazowej [12, 16].

Szczególnością postacią tej choroby, wymagającą złożonego podejścia interdyscyplinarnego, jest nowotwór z towarzyszącym czopem w układzie żylnym, obejmujący żyłę nerkową lub niekiedy propagujący do żyły głównej dolnej, sięgający nawet jam serca w najbardziej zaawansowanych przypadkach [15, 19, 20]. Głównymi czynnikami sprzyjającymi rozwojowi ccRCC są zmiany w genie *VHL*, które powodują zaburzenia regulacji szlaku czynnika indukowanego niedotlenieniem (ang. Hipoxia-Inductible Factor, HIF), sprzyjającego angiogenezie i przeprogramowaniu metabolicznemu [15]. W konsekwencji nowotwory nerkowe często cechują się bogatym unaczynieniem. Szczególną cechą ccRCC, jaką jest jego skłonność do wrastania do żył nerkowych i tworzenia się czopów żylnych, stanowi wyróżniający ten nowotwór element w klasyfikacji TNM raka nerki (stadium T3a i wyżej) i ma istotne znaczenie dla strategii leczenia pacjentów. Częstość występowania żylnego czopa nowotworowego w raku nerki szacuje się na 4-25% przypadków, przy czym jego obecność wiąże się z wyższym ryzykiem przerzutów odległych oraz z gorszym przeżyciem całkowitym [19, 21-23].

Z urologicznego punktu widzenia obecność czopa nowotworowego stanowi przede wszystkim istotne wyzwanie chirurgiczne, determinując zakres i złożoność leczenia operacyjnego, konieczność zastosowania zaawansowanych technik naczyniowych oraz zwiększone ryzyko powikłań okołoperacyjnych oraz jest jednym z kluczowych czynników rokowniczych [24, 25]. Przez lata koncentrowano się na doskonaleniu technik chirurgicznych, klasyfikacji zasięgu

---

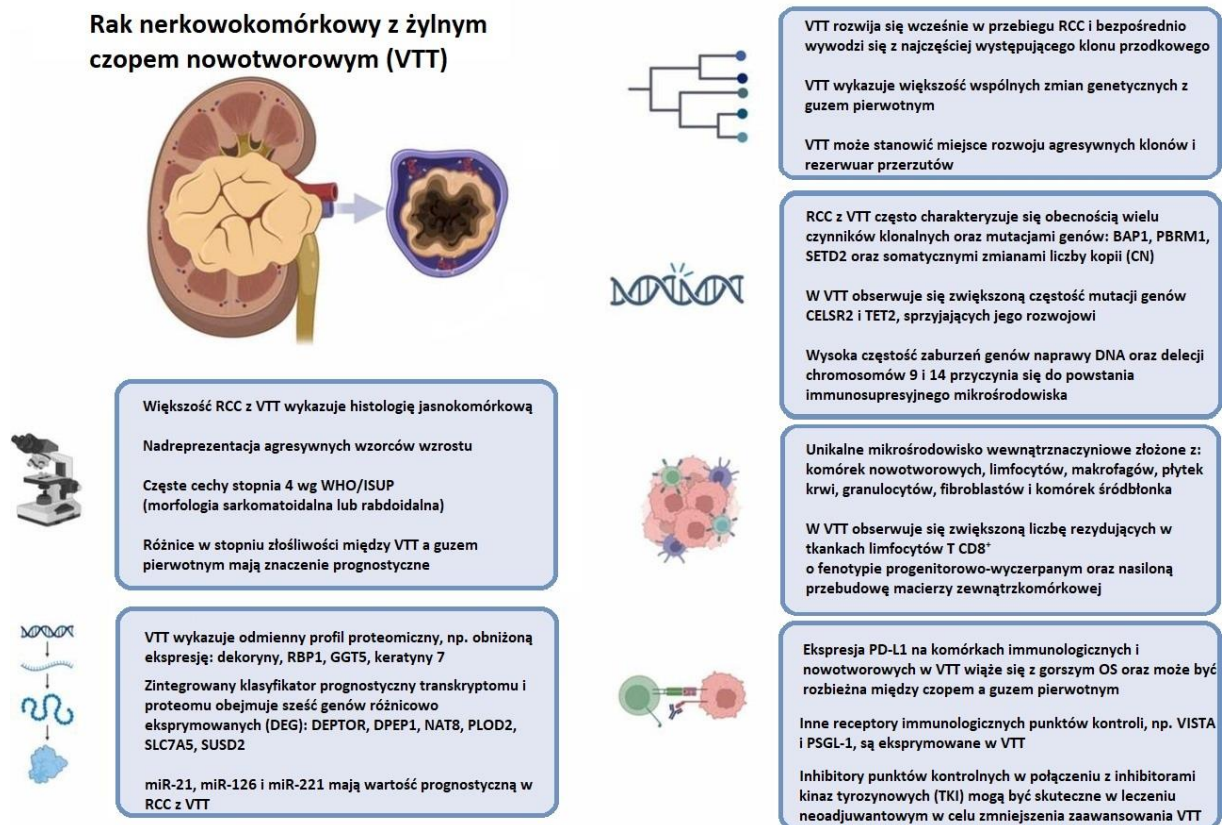
czopa oraz optymalizacji postępowania okołoperacyjnego. Biologiczne podłoże tego zjawiska pozostawało na dalszym planie. W ostatnich latach obserwuje się jednak wyraźne przesunięcie trendu badań nad rakiem nerki, od podejścia czysto anatomiczno-klinicznego w stronę pogłębionej analizy biologii nowotworu, jego mikrośrodowiska oraz mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Zmiana ta pozostaje w ścisłym związku z rozwojem terapii celowanych oraz immunoterapii, które istotnie wpłynęły na wyniki leczenia systemowego chorych na raka nerki [26-28].

Na tym tle rak nerki z żylnym czopem nowotworowym stanowi szczególnie interesujący model biologiczny. Czop nowotworowy rozwija się w środowisku naczyniowym, podlegając ciągłym oddziaływaniom sił hemodynamicznych, pozostając w bezpośrednim kontakcie z komórkami krwi, w tym komórkami układu odpornościowego, płytkami krwi, czy komórkami śródbłonna gospodarza. Coraz więcej danych wskazuje, że nie jest on jedynie biernym przedłużeniem guza pierwotnego, lecz oddzielnym kompartmentem nowotworu, charakteryzującym się swoistymi cechami histopatologicznymi, molekularnymi i immunologicznymi, mogącymi pełnić aktywną rolę w progresji choroby i rozsiewie nowotworowym [29-31]. Chociaż wielu autorów dokonało przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat leczenia VTT, jego biologia i mikrośrodowisko nie zostały kompleksowo zbadane. Ponadto, terapie neoadjuwantowe, w tym oparte o inhibitory VEGFR lub mTOR wykazały zmienną skuteczność w redukowaniu zasięgu czopów nowotworowych (tzw. downstaging) i ułatwianiu wykonania trombektomii [32-34]. Zrozumienie różnic molekularnych między VTT a nowotworami pierwotnymi ma zatem kluczowe znaczenie dla opracowania lepszych markerów prognostycznych i metod leczenia.

Cykl publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej wpisuje się w ten nowy nurt badań, koncentrując się na biologii i mikrośrodowisku raka jasnokomórkowego nerki z żylnym czopem nowotworowym, ze szczególnym uwzględnieniem aspektów immunologicznych. Prace te łączy wspólna koncepcja badawcza, polegająca na analizie czopa nowotworowego jako autonomicznej struktury biologicznej, której cechy mogą mieć niezależne znaczenie prognostyczne i potencjalnie terapeutyczne.

Pierwszym elementem cyklu jest praca przeglądowa, poświęcona biologii czopa nowotworowego, która porządkuje dotychczasową wiedzę dotyczącą jego histopatologii, cech molekularnych oraz mikrośrodowiska immunologicznego (Praca nr 1). Publikacja ta stanowi punkt wyjścia do dalszych badań, wskazując także na luki w aktualnym stanie wiedzy i uzasadniając potrzebę pogłębionej analizy markerów biologicznych w tym szczególnym kompartmentcie nowotworu (Rycina 1). Zwrócono w niej uwagę, że mikrośrodowisko immunologiczne czopa nowotworowego może istotnie różnić się od mikrośrodowiska guza pierwotnego. W czopie nowotworowym obserwuje się zróżnicowaną obecność nacieków komórkowych, w tym złożonych z populacji takich jak limfocyty T i makrofagi, oraz innych komórek układu odpornościowego, których skład ilościowy i jakościowy może wpływać na przebieg choroby [29]. Jednocześnie wykazano, że ekspresja cząsteczek immunoregulacyjnych w czopie nowotworowym bywa odmienna niż w guzie pierwotnym, co wskazuje na regionalną heterogenność odpowiedzi immunologicznej. Pomimo rosnącej liczby badań nad immunoterapią w raku nerki, dane dotyczące skuteczności leczenia systemowego w obecności

czopa nowotworowego pozostają ograniczone, a rola biomarkerów predykcyjnych w tej grupie chorych nie została jednoznacznie określona [29, 35]. Wskazuje to na potrzebę dalszych badań nad mikrośrodowiskiem czopa oraz identyfikacji markerów biologicznych, które mogłyby pomóc w personalizacji leczenia.



**Rycina 1. Podsumowanie kluczowych cech biologicznych, molekularnych i immunologicznych raka nerkowokomórkowego z żylnym czopem nowotworowym (RCC z VTT) (zmodyfikowane z Sharma S. i wsp. ([9], Praca nr 1).**

### Charakterystyka VTT z punktu widzenia podstawowej histopatologii

Pierwotna masa RCC wykazuje zazwyczaj trzy wzorce wzrostu. Mniejsze guzy mają przeważnie zwartą budowę gniazdową, podczas gdy większe wykazują większą różnorodność cytoarchitektoniczną z budową beleczkową, wyspową i litą [24, 36, 37]. Z drugiej strony stwierdzono, że VTT charakteryzuje się głównie jednym lub dwoma wzorcami wzrostu, z wyraźną przewagą agresywnych morfologii, zwłaszcza litych, i nigdy nie rozwija wzorca mikrocystycznego [37]. Ponadto VTT często wykazuje cechy sarkomatoidalne i rabdoidalne [38]. Oba są klasyfikowane jako stopień 4 zgodnie z systemem Światowej Organizacji Zdrowia i Międzynarodowego Towarzystwa Patologii Urologicznej (ang. World Health Organization/International Society of Urological Pathology, WHO/ISUP) [39]. Obecność tych

---

cech jest związana z gorszym przeżyciem swoistym dla nowotworu (ang. Cancer Specific Survival, CSS) [40] oraz szybszym wzrostem czopów [41]. Warto zauważyć, że w dwóch dużych badaniach kohortowych dotyczących nieprzerzutowego RCC z VTT zbadano znaczenie prognostyczne klasyfikacji czopów żylnych. Wykazano w nich, że uwzględnienie klasyfikacji patologicznej czopa w modelu przewidywania ryzyka wykazało lepszą zdolność różnicującą w porównaniu z poprzednimi modelami stosowanymi w ocenie ryzyka [42]. Rozbieżność w stopniu złośliwości (gradingu) między VTT a guzem pierwotnym uzasadnia ponadto konieczność odrębnego raportowania stopnia złośliwości dla obu kompartmentów [43]. Najlepszy model prognostyczny uwzględnia połączenie stopnia złośliwości guza pierwotnego i rozbieżności stopni złośliwości między kompartmentami [43]. Co ciekawe, nie zawsze najbardziej agresywny klon o najwyższym stopniu złośliwości inicjuje powstawanie VTT [44]. W związku z tym, aby określić zdolność do przerzutów, ważniejsza jest ocena stopnia złośliwości klonu inicjującego VTT niż ogólny stopień złośliwości guza. Odkrycia te mogą zmienić istniejący paradygmat, który opiera się na ocenie obszaru o najwyższym stopniu złośliwości obserwowanym w guzie pierwotnym w celu określenia ogólnego stopnia złośliwości guza. Rutynowe raportowanie stopnia złośliwości czopa żylnego w odniesieniu do guza pierwotnego można łatwo wdrożyć w praktyce i może ono dostarczyć ważnych informacji, które pomogą w dalszym leczeniu pacjenta.

Zajęcie naczyń żylnych nie jest wyłącznie charakterystyczne dla ccRCC. Częstość występowania histologii innych niż ccRCC w tym przypadku wynosi 7-20% [45, 46], przy czym najczęstszym typem jest pRCC (brodawkowaty rak nerkowokomórkowy, ang. papillary Renal Cell Carcinoma, pRCC). Z drugiej strony częstość występowania VTT w pRCC wynosiła 8,2% w porównaniu z 23,6% w ccRCC [47, 48]. Rozprzestrzenianie się czopa nowotworowego w pRCC wiąże się z gorszymi wynikami CSS w porównaniu z ccRCC [47]. Nowotwory inne niż ccRCC z współwystępującym VTT częściej wykazują niekorzystne cechy patologiczne (większy rozmiar, wyższy stopień złośliwości, przerzuty do węzłów chłonnych, różnicowanie sarkomatoidalne), więc histologia guza nie jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w przypadku RCC z VTT [45]. Pacjenci z histopatologią inną niż ccRCC są także bardziej narażeni na przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych ( $p=0,037$ , 42,9% vs 20,7%) [48].

Wreszcie, VTT może występować pod postacią swobodnie balotującego guza w świetle naczyń lub może naciekać jego ścianę. Ma to duże znaczenie z punktu widzenia chirurgicznego i patologicznej oceny marginesów resekowanych naczyń. Co ważne, inwazję ściany naczyń można w pewnym stopniu przewidzieć na podstawie pomiarów obrazowych średnicy żyły głównej dolnej i ujścia żyły nerkowej [49]. Wzrost średnicy żyły głównej dolnej wiąże się z większym prawdopodobieństwem inwazji jej ściany [50]. Znaczenie kliniczne dodatniego marginesu chirurgicznego naczyń w przypadku balotującego czopa wydaje się minimalne, ponieważ ryzyko nawrotu w takich przypadkach zależy głównie od stopnia inwazji czopa naczyniowego [51]. Z drugiej strony, mikroskopijna inwazja żył, zdefiniowana jako miejscowe zniszczenie i inwazja śródbłonna przez nowotwór jest związana z niekorzystnymi cechami kliniczno-patologicznymi i stanowi niezależny czynnik prognostyczny dla CSS [46]. Proces inwazji ściany naczyń może być kierowany przez oś L1CAM-CXCL5, która kształtuje niszę okołonaczyniową guza i pośredniczy w migracji RCC w kierunku komórek śródbłonna

---

[52]. Dlatego regulacja tego układu może stać się kolejnym potencjalnym celem terapeutycznym w RCC.

## **Molekularne aspekty żylnego czopa nowotworowego**

### **1. Zmiany genetyczne i filogenetyka w RCC z VTT**

Nowotwory złośliwe nerek zazwyczaj charakteryzują się niewielką liczbą mutacji klonalnych. Większość subklonalnych somatycznych mutacji punktowych i zmian liczby kopii występuje z różną częstotliwością w całym guzie [28]. W sporadycznym ccRCC ponad 90% przypadków wykazuje mechanizm podwójnego uderzenia (ang. dual-hit) charakteryzujący się utratą ramienia chromosomu 3p, w którym znajduje się gen *VHL*, oraz jego inaktywacją spowodowaną mutacjami lub metylacją regionu promotora w drugim allelu *VHL* [38]. To podwójne zaburzenie prowadzi do funkcjonalnej inaktywacji białka VHL, upośledzając jego zdolność do regulowania stabilności H1F1A. Trzy geny zlokalizowane na ramieniu chromosomu 3p wraz z *VHL*, tj. *BAP1* (białko związane z BRCA1, ang. BRCA1-associated protein), *SETD2* (domena zawierająca SET 2, ang. SET domain-containing 2) i *PBRM1* (białko kodujące BAF180, polibromo-1, ang. Polybromo-1, encoding BAF180 protein) należą do genów często mutowanych w ccRCC i kształtują jego biologię [53, 54]. *BAP1* jest supresorem nowotworowym zaangażowanym w regulację chromatyny i naprawę DNA, a jego inaktywacja jest powiązana z agresywnymi fenotypami ccRCC z predyspozycją do tworzenia VTT [53]. Geny *PBRM1* i geny z rodziny *SET* kodujące enzymy odpowiedzialne są za metylacje histonów [55]. Obecność mutacji *PBRM1* wiązała się z tendencją do dłuższego przeżycia wolnego od nawrotu w porównaniu z guzami z mutacją *BAP1*, co może wskazywać na odmienny fenotyp biologiczny tych nowotworów. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu mutacji *SETD2* na przeżycie całkowite [55]. Zidentyfikowany został związek między utratą *BAP1* w RCC a zmianami w mikrośrodowisku guza [56]. Z kolei mutacje somatyczne w *PRMB1* były związane ze zwiększonym potencjałem angiogenezy, podczas gdy guzy sarkomatoidalne wykazują mniejszą częstość występowania mutacji *PBRM1* i markerów angiogenezy [57]. Przypadki z wieloma mutacjami klonalnymi, tj. jednoczesnymi nieprawidłowościami w genach *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* i *PTEN* charakteryzują się wysoką niestabilnością genetyczną i mają tendencję do większego potencjału przerzutowego [58].

Mutacje w VTT zazwyczaj różnią się od dominującego krajobrazu genetycznego pierwotnego guza. Mimo, że mutacje *BAP1*, *SETD2*, *TSC1/2*, *TP53* w guzie pierwotnym wiążą się z wyższym stopniem złośliwości guza, agresywnością choroby i niską przeżywalnością, nie zaobserwowano większej częstotliwości występowania takich mutacji w VTT [44]. Ponadto w VTT znaleziono zarówno klony o wysokim, jak i niskim stopniu złośliwości [44]. VTT wykazywał wyższą częstość występowania mutacji w genie *CELSR2* (kodującym białko biorące udział w komunikacji międzykomórkowej, a także w rozwoju nerek) oraz w genie *TET2* (enzym biorący udział w demetylacji DNA) [53]. Chociaż dokładne implikacje tych zmian są nieznane, prawdopodobnie przyczyniają się one do rozwoju czopa. Wysoka częstość występowania zmian w genach odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA w VTT wskazuje także na niestabilność genomową [53]. Ponadto często wykrywa się utratę liczby kopii w

---

chromosomach 9 i 14, co koreluje z fenotypem immunosupresyjnym czopa, z większą liczbą komórek Treg i mniejszą liczbą komórek pamięci i komórek cytotoksycznych [53]. Tego rodzaju mikrośrodowisko ogranicza skuteczność terapii ukierunkowanej na PD-L1, a tym samym wiąże się z gorszym rokowaniem [57]. W badaniu TRACERx przeanalizowano czopy i guzy pierwotne oraz opracowano model klonalnej promocji RCC, wyjaśniając mutacje prowadzące do tworzenia czopów i przerzutów [28]. Delecje 9p i 14q uznano za cechy charakterystyczne przerzutów w RCC. Wszystkie klony przerzutowe wykazywały wysoką ekspresję Ki-67 [28]. Sam RCC został podzielony na siedem podtypów w oparciu o wspólne mutacje, przy czym trzy z siedmiu powodują przerzuty i korelują ze złym rokowaniem, w tym mutacje *BAP1*, „*VHL*-wildtype” i „multiple clonal drivers” [28]. Mutacje *PBRM1* powodują ewolucję klonalną, w wyniku której różne klony pochodzą od wspólnego przodka, a następnie nabywają odrębne cechy molekularne, np. aktywacje PI3K, utratę *SETD2* lub różne somatyczne zmiany liczby kopii (ang. Somatic copy number alternations, sCNAs), które stanowią cele dla terapii spersonalizowanej [54]. Spośród 33 przypadków z VTT tylko jeden przypadek został sklasyfikowany jako molekularnie „monodriver *VHL*”, 6 miało wiele klonalnych czynników napędzających, 4 były napędzane przez *BAP1*, 4 były typu „*VHL*-wildtype”, 7 miało zmiany w *PBRM1*, a 11 należało do podtypu bez czynników napędzających [28]. Warto zauważyć, że w 10 przypadkach czop nowotworowy wywodził się bezpośrednio z klonu stanowiącego ostatniego wspólnego przodka wszystkich subklonów guza (ang. most recent common ancestor), co wskazuje, że naciekanie światła naczynia i rozwój komponenty śródnaczyniowej nastąpiły na bardzo wczesnym etapie ewolucji nowotworu. W pozostałych przypadkach VTT pochodził z bardziej zaawansowanych subklonów w guzie pierwotnym z dodatkowymi zmianami sterującymi, takimi jak utrata 9p. Podczas gdy guzy pierwotne wykazywały ciągłą ewolucję, VTT miał ograniczoną liczbę dodatkowych mutacji, dzieląc 94,9% zdarzeń z guzem pierwotnym, potencjalnie z powodu ograniczonej presji selekcji w środowisku wewnątrznaczyniowym. Badanie TRACERx wykazało również, że VTT może być miejscem rozwoju agresywnego klonu późniejszego rozsiewu do innych miejsc, np. węzłów chłonnych [28].

## 2. Transkryptomika i proteomika RCC z VTT

W przeprowadzonej analizie proteomicznej RCC z VTT wykazano, że liczne białka ulegają obniżonej ekspresji w porównaniu z prawidłową tkanką nerki, a w części przypadków również w porównaniu z guzem pierwotnym, co wskazuje na postępującą deregulację wybranych szlaków molekularnych w obrębie czopa nowotworowego. Sekwencyjny spadek ekspresji wybranych białek sugeruje, że czop nowotworowy nie stanowi jedynie biernego przedłużenia guza, lecz wykazuje własny, pogłębiony profil molekularnej deregulacji [59]. Należą do nich m.in. białko wiążące retinol (ang. Retinol-Binding Protein, RBP), dekoryna (dekoryna zwykle blokuje szlak VEGF; gdy jej poziom spada, szlak działa wydajniej, sprzyjając angiogenezie), keratyna 7 (zwykle obecna w pRCC i chRCC, ale ujemna w większości przypadków ccRCC), domena zawierająca fitanol-CoA dioksygenazę 1 (ang. Phytanol-CoA Dioxygenase Domain containing 1, PHYHD1) i dehydrogenaza choliny (ang. Choline Dehydrogenase, CHDH).

---

Podejrzewano, że dwa ostatnie białka mają wartość prognostyczną, ponieważ niższy poziom ich mRNA korelował z gorszym przeżyciem pacjentów [59]. Inne geny, które okazały się być regulowane w dół, to *RAB25* (zaangażowany w transport wewnątrzkomórkowy), *NAT8* i *GGT5* (oba związane z metabolizmem glutationu), natomiast *SLC7A5* (odpowiedzialny za pobieranie aminokwasów ze środowiska), *E2F1* (kodujący czynnik transkrypcyjny związany z centralnym katabolizmem węglowym), *PYCR1* (zaangażowany w syntezę proliny, która jest niezbędna dla przeżycia i proliferacji komórek nowotworowych), *VEGFA* i *EGFR* są regulowane w górę [59]. MikroRNA (miRNA) to małe niekodujące cząsteczki RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Ich rola jako biomarkerów i czynników prognostycznych różnych nowotworów, w tym RCC, jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Panel pięciu miRNA: miR-21, miR-143, miR-200c, miR-210, miR-126 pozwala dokładnie rozróżnić prawidłową tkankę nerkową od próbek ccRCC z 100% czułością i swoistością [60]. Na przykład, miR-21, znany z częstej regulacji w górę w nowotworach, wywiera swoje działanie poprzez celowanie w różne supresory nowotworów, takie jak *BCL2* i *PTEN* [61], zaś miR-126, który działa podobnie, z kolei celuje w *ROCK1* i *VEGFA* [62]. Nowotwory o bardziej agresywnym przebiegu wykazywały obniżenie ekspresji miR-221, czemu towarzyszyła nadekspresja *VEGFR2*, co korelowało z krótszym czasem przeżycia wolnego od progresji. Taki układ zależności wskazuje, że utrata ekspresji miR-221 może sprzyjać deregulacji szlaku *VEGFR2* i nasileniu fenotypu proangiogenego w nowotworach wysokiego ryzyka [63]. Badania *in vitro* wykazały, że ekspozycja komórek raka na sunitynib prowadzi do istotnego wzrostu ekspresji miR-221. Zjawisko to nie ma charakteru przypadkowego, lecz wpisuje się w adaptacyjną odpowiedź komórki na zahamowanie sygnalizacji *VEGFR2* [63]. Zatem miR-221 pełni podwójną rolę biologiczną. Z jednej strony jego obniżona ekspresja w tkance guza może stanowić marker agresywnego przebiegu choroby. Z drugiej strony jego indukcja w trakcie leczenia antyangiogenego może sprzyjać adaptacji komórek nowotworowych i ograniczać skuteczność terapii ukierunkowanej na *VEGFR2*. Taki dwutorowy charakter działania podkreśla złożoność regulacji angiogenezy w raku oraz konieczność interpretowania ekspresji miR-221 w ścisłym odniesieniu do kontekstu biologicznego i terapeutycznego [63]. Co ciekawe, niektóre miRNA wykazują istotne różnice w ekspresji między nowotworami z czopami a nowotworami bez czopów, np. miRNA-210, miRNA-483-5p i miRNA-200c [64]. Ponadto ekspresja miR-126 koreluje z potencjałem przerzutowym guza i obserwowano ją w wyższych stężeniach w guzach, które dały przerzuty [60]. Z drugiej strony wykazano, że pacjenci z wyższą ekspresją miRNA (miR-21 i miR-126) mieli ogólnie lepsze rokowania [60].

### 3. Inne wybrane aspekty molekularne RCC z VTT

W przypadku ccRCC mutacja genu *VHL* powoduje wzrost stężenia HIF, który jest częścią szlaku Nox/ROS/HIF/VEGF [55]. Zjawisko to ułatwia angiogenezę i zaburza homeostazę tkankową. Podwyższony poziom HIF i niedotlenienie wpływają na wiele procesów, od stanu zapalnego po krzepnięcie. Cały proces jest czasami wspomagany przez nieprawidłowości na wcześniejszych etapach szlaku niedotlenienia, np. przez wysoką ekspresję oksydazy 4 (ang. Oxidase-4, Nox4) fosforanu nikotynamidoadeninowego (ang. Nicotinamide Adenine

---

Dinucleotide Phosphate, NADPH) [55]. Enzym ten reguluje aktywność HIF-2 $\alpha$ , a tym samym produkcję wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS), powodując oksydacyjne uszkodzenia DNA i liczne sCNA [65]. Sugeruje się, że translokacja Nox4 z cytoplazmy do jądra komórkowego jest związana z progresją RCC, zwłaszcza u pacjentów z wewnątrznaczyniowym rozprzestrzenieniem się RCC [66]. Odnotowano kilka różnic w ekspresji różnych białek powierzchniowych między komórkami w czopie a komórkami w głównej części guza. Jednym z nich jest antygen błonowy specyficzny dla prostaty (ang. Prostate-Specific Membrane Antigen, PSMA), który występuje w prawidłowych komórkach nabłonkowych proksymalnych kanalików nerkowych (ale nie w naczyniach nerkowych), a także na powierzchni komórek RCC [67]. Jego ekspresja była znacznie wyższa w VTT w porównaniu z guzem pierwotnym [67]. Zaobserwowano również dodatnią korelację między tym zjawiskiem, a tworzeniem się naczyń na obrzeżach nowotworu złośliwego [67]. Jest to zgodne z założeniem, że PSMA odgrywa rolę w neowaskularyzacji nowotworu [68]. W konsekwencji, zwiększona ekspresja PSMA wydaje się ułatwiać angiogenezę nowotworu, zwiększając w ten sposób dostępność składników odżywczych. Obecnie prowadzonych jest wiele badań poświęconych PSMA jako potencjalnemu celowi nowoczesnych form immunoterapii komórkowej [69]. Dotyczą one przede wszystkim raka prostaty, ale mogą zyskać potencjalne zastosowanie u pacjentów z VTT w przyszłości.

### **Specyfika mikrośrodowiska immunologicznego VTT**

Mikrośrodowisko guza (ang. Tumor Microenvironment, TME) składa się z elementów komórkowych i macierzy zewnątrzkomórkowej, tworząc prawdziwie heterogeniczną i dynamiczną sieć [17]. Wewnątrz tej sieci ekspansja guza jest regulowana przez interakcje komórkowe miofibroblastów, fibroblastów, komórek neuroendokrynych, komórek tłuszczowych, komórek immunologiczno-zapalnych, a także śródbłonna, które razem inicjują wzrost guza, inwazję i tworzenie przerzutów. Ponieważ RCC jest nowotworem wysoce immunogennym i proangiogennym, w ostatnich latach w kilku badaniach scharakteryzowano różne szczególne subpopulacje komórek w mikrośrodowisku RCC. Pierwotny RCC jest wysoce heterogeniczny, podobnie jak sam czop [21]. Ten ostatni może mieć znacznie inne cechy swojego TME niż reszta guza [29]. Wydaje się, że także odpowiedź immunologiczna jest w pewnym zakresie odmienna w przypadku guza pierwotnego i czopa żylnego [30].

Przykładowo, białko B7x należy do rodziny ligandów kostymulujących B7-CD28 i zwykle pełni rolę immunomodulującą (wyzwała sygnalizację hamującą komórek T) [70]. Stwierdzono jego wyższą ekspresję w RCC w takich obszarach jak czop, przerzuty do węzłów chłonnych i w zaawansowanych stadiach nowotworu, ponieważ hamuje ono odpowiedzi immunologiczne poprzez negatywną kostymulację [71, 72]. Pacjenci z RCC nie tylko mieli wykrywalny sB7x w przeciwieństwie do osób z grupy kontrolnej, ale także podwyższenie poziomu sB7x korelowało z odpowiednim zaawansowaniem choroby [72].

Ligand receptora programowanej śmierci komórkowej 1 (ang. Programmed Cell Death Receptor Ligand 1, PD-L1) może być ekspresjonowany przez komórki nowotworowe i niektóre komórki odpornościowe, w tym limfocyty i makrofagi [31]. Komórki nowotworowe

---

wykorzystują sygnalizację PD-L1/PD-1 do hamowania odpowiedzi immunologicznej zależnej od komórek T [70]. Ostatnie badania wykazały, że nie wszyscy pacjenci odnoszą korzyści z blokady PD-1/PD-L1 z powodu różnych mechanizmów, np. regionalnej heterogenności molekularnej RCC [73, 74]. Opisany został statystycznie istotny spadek ekspresji PD-L1 w kompartmentie VTT w porównaniu z guzem pierwotnym ( $p < 0,0001$ ) [75]. Częstotliwość ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych i komórkach odpornościowych infiltrujących czop różni się w zależności od badanego kompartmentu i jest zależna od zastosowanego klonu przeciwciała [2]. Ponadto ekspresja PD-L1 na komórkach odpornościowych związanych z guzem i komórkach nowotworowych w VTT jest związana z krótszym czasem przeżycia całkowitego [2]. Inni autorzy potwierdzili obserwację, że czop jest głównym kompartmentem wykazującym ekspresję PD-L1 [2]. Fakt ten ma istotne konsekwencje, np. biopsja guza może nie dać wiarygodnego wyniku PD-L1, podczas gdy czop może stanowić czynnik determinujący obecność PD-L1 [2, 22]. To z kolei może być powiązane z ryzykiem przeżycia i potencjalnie ograniczać skuteczność immunoterapii. Ponieważ czopy nowotworowe wykazują różną ekspresję cząsteczek immunologicznych punktów kontrolnych, terapia skojarzona polegająca na blokowaniu PD1 i NKG2A okazała się skuteczniejsza w przywracaniu funkcji efektorowych komórek T CD8+ [76]. Co ciekawe, w jednym z badań postawiono hipotezę, że mikrobiom jamy ustnej może zwiększać tempo ekspresji PD-L1 w czopach związanych z RCC poprzez wytwarzanie cząsteczek wpływających na sygnalizację epigenetyczną, a także poprzez wzmacnianie przywileju immunologicznego [77]. Proces ten ma być analogiczny do zjawiska najlepiej zbadanego w przypadku *Fusobacterium nucleatum*, o którym wiadomo, że indukuje ekspresję białka CCL20, a tym samym stymuluje aktywację i migrację makrofagów w raku jelita grubego [78].

Wśród nowych inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego jednym z potencjalnie istotnych klinicznie jest supresor aktywacji komórek T z domeną V (VISTA) [35, 79]. Uważa się, że VISTA hamuje populację komórek T w warunkach fizjologicznych, ale zwiększona ekspresja VISTA u pacjentów z nowotworami może być markerem pojawiającej się oporności na inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych [80]. Ostatnie postępy w zrozumieniu zjawisk mających miejsce w TME wzbudziły także zainteresowanie białkiem HMG BOX związanym z selekcją tymocytów, markerem wyczerpania komórek T [81]. Ekspresja TOX jest odwrotnie skorelowana z powodzeniem immunoterapii opartej na blokadzie PD-1 [82]. W VTT można znaleźć zarówno komórki odpornościowe VISTA-dodatnie, jak i TOX-dodatnie [3]. Co ciekawe, zwiększony poziom komórek odpornościowych z dodatnią ekspresją VISTA w kompartmentie VTT koreluje z gorszym przeżyciem [3]. Obecność TILs pozytywnych pod względem VISTA w czopach (ale nie w guzach pierwotnych) jest także związana z obecnością odległych przerzutów i martwicą guza [3]. VISTA stymuluje syntezę TOX, który hamuje funkcję limfocytów poprzez zmniejszanie produkcji cytokin i zwiększenie liczby receptorów hamujących, tj. PD-1, TIM-3, CTLA-4 i LAG-3 [3, 17, 83]. Wynikiem tego jest spadek populacji komórek efektorowych i unikanie odpowiedzi immunologicznej przez nowotwory złośliwe. Ligand-1 glikoproteiny P-selektyny (PSGL-1), poza swoją rolą ligandu P-selektyny, może działać jako receptor dla cząsteczki immunologicznego punktu kontrolnego VISTA, a ich interakcja indukuje supresję odpowiedzi limfocytów T [84]. Pacjenci z komórkami nowotworowymi

---

PSGL-1-dodatnimi zlokalizowanymi w guzie pierwotnym i komórkami odpornościowymi z ekspresją PSGL-1 w VTT wykazywali gorsze przeżycie całkowite (ang. overall survival, OS) [4]. Ponieważ ekspresja PSGL-1 występuje głównie w komórkach nowotworowych w VTT, to podwyższona ekspresja PSGL-1 może odpowiadać za interakcje komórek nowotworowych z płytkami krwi i śródbłonkiem [4].

Zbadany został ponadto profil samego VTT, jeśli chodzi o zasiedlające go subpopulacje komórkowe, co umożliwiło dalsze scharakteryzowanie jego mikrośrodowiska. Jeżeli chodzi o komórki odpornościowe dominują w nim limfocyty CD8+, a następnie wykrywanych jest wiele subpopulacji limfocytów CD4+ (tj. m.in. limfocyty pomocnicze T, czy limfocyty Treg) [85]. Komórki nowotworowe tworzące VTT nie unoszą się swobodnie w świetle naczyń krwionośnych, ale muszą wytworzyć sieć macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. Extracellular Matrix, ECM) we współpracy z komórkami odpornościowymi i komórkami zrębu, aby promować wzrost czopa nowotworowego. Dlatego też ukierunkowanie inicjatyw badawczych na określenie inicjatorów przebudowy macierzy może zaowocować odkryciem skutecznych środków do zastosowania u pacjentów z VTT. Makrofagi zasiedlające czop przebudowują ECM, co z kolei prowadzi do rozprzestrzeniania się komórek i neoangiogenezy [17]. Miofibroblasty funkcjonują jako główna populacja komórek wytwarzających ECM, pełniąc rolę zarówno w guzie pierwotnym, jak i czopie nowotworowym, ale w tym ostatnim przypadku ich tempo produkcji jest znacznie wyższe niż w guzie pierwotnym [85]. Prozapalne makrofagi M1 w VTT są liczniejsze niż w guzach pierwotnych [22]. Stosunek neutrofilii do limfocytów (ang. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, NLR) jest zaburzony w przypadku RCC, ze zwiększonym odsetkiem neutrofilii i spadkiem liczby limfocytów, co wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentów [86-88]. Niższy stosunek limfocytów do monocytów (ang. Lymphocyte-to-Monocyte Ratio, LMR) jest związany z obecnością martwicy guza i krótszym czasem przeżycia całkowitego (OS) u pacjentów z VTT [88]. Spadek liczby limfocytów jest negatywnym czynnikiem prognostycznym ze względu na ograniczenie reakcji przeciwnowotworowej układu odpornościowego [89]. Kolejną unikalną właściwością neutrofilii, która ma znaczenie w kontekście przebiegu RCC, są ich pułapki pozakomórkowe [89]. Uważa się, że NEToza umożliwia nowotworowi wychwytywanie krążących komórek nowotworowych i grupowanie ich, sprzyjając w ten sposób tworzeniu większych przerzutów [90, 91]. NEToza może być również wywołana przez aktywowane płytki krwi za pomocą HMGB1 (ang. High-mobility group box 1). Zjawisko to zaobserwowano u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową, której mechanizm może być podobny do powstawania RCC w VTT [92]. Wykazano jednak, że poszczególne populacje komórek układu odpornościowego różnią się stopniem reprezentacji w obrębie nowotworów, a zjawisko to może być wykorzystane do różnicowania podtypów raka oraz oceny rokowania [93].

### **Czop nowotworowy w układzie żylnym a krzepnięcie**

Komórki nowotworowe mogą wpływać na proces hemostazy na wiele sposobów, począwszy od ich aktywności prozakrzepowej, poprzez aktywność fibrynolityczną, wydzielanie cytokin, aż po bezpośrednią interakcje z komórkami krwi i elementami komórkowymi układu krzepnięcia

---

[94]. RCC sprzyja odkładaniu się fibryny w TME, częściowo poprzez wykorzystanie zewnętrznej ścieżki krzepnięcia z udziałem czynnika krzepnięcia VII w surowicy [95]. Sugeruje się, że fibryna odgrywa rolę w przerzutach, a komórki nowotworowe częściej osadzają się w miejscach, w których już występowały jej złoże [96]. Innym mechanizmem prozakrzepowym obserwowanym w wielu nowotworach jest wzrost czynnika tkankowego (ang. Tissue Factor, TF), który stymuluje zakrzepicę, ale odgrywa również rolę w sygnalizacji komórkowej, aktywując płytki krwi poprzez receptory PAR-1 i PAR-2 [97]. Istnieją jednak sprzeczne opinie na temat tego, czy mechanizm ten ma zastosowanie w przypadku RCC. Z jednej strony nie odnotowano występowania TF w masie guza litego [98], ale z drugiej strony zauważono, że po operacji usunięcia RCC nastąpił znaczny spadek TF, a zatem może on działać jako marker skuteczności terapii [99, 100]. Podczas gdy w warunkach fizjologicznych ekspresja TF jest indukowana na żądanie, komórki nowotworowe wydają się wykazywać konstytutywną ekspresję TF na swojej powierzchni, niezależnie od warunków zewnętrznych [94].

Układ fibrynolityczny oddziałuje na wiele sposobów z nowotworami i odgrywa istotną rolę w procesach hemostatycznych [101]. Brak funkcjonalnych aktywatorów plazminogenu hamuje progresję nowotworów i ich przerzuty [102]. Aktywator plazminogenu typu urokinazy (ang. Urokinase-type Plasminogen Activator, uPA) oddziałuje z szlakami ERK/MAP, JAK/STAT i PI3K/AKT, które często ulegają zaburzeniom w RCC, a zmiany w ich funkcjonowaniu sprzyjają kancerogenezie [103, 104]. Fibrynoliza stymuluje również angiogenezę, np. tkankowy aktywator plazminogenu (ang. Tissue-type Plasminogen Activator, tPA) aktywuje metaloproteinazy macierzy poprzez plazminę, podczas gdy enzymy te z kolei rozszczepiają związane ligandy, a wolna aktywna forma powstałych składników stymuluje komórki progenitorowe śródbłonna, co prowadzi do neoangiogenezy [105]. Fakt, że wzrost guza opiera się na neoangiogenezie, wyraźnie wskazuje, że opisany powyżej mechanizm ułatwia proliferację komórek RCC, inwazję i prawdopodobnie bierze udział w tworzeniu VTT. Wiele nowotworów (w tym RCC) rozprzestrzenia swoje komórki do krwiobiegu, a tym samym wolne komórki nowotworowe dostają się do krążenia i często wchodzi w interakcje z płytkami krwi [106]. Płytki krwi przechowują w swoich ziarnistościach różne czynniki wzrostu, z których niektóre mają udowodnione oddziaływanie na nowotwory (np. TGF- $\beta$  i VEGF) [107]. Komórki nowotworowe otoczone płytkami krwi są chronione przed rozpoznaniem i neutralizacją przez komórki odpornościowe krążące we krwi [107]. Co więcej, niska średnia objętość płytek krwi (ang. Mean Platelet Volume, MVP) w stanie wyjściowym koreluje z większym rozmiarem guza, niekorzystnymi cechami histologicznymi (np. wysokim stopniem Fuhrmana, cechami sarkomatoidalnymi, martwicą i inwazją naczyniową) i dlatego jest uważana za negatywny czynnik prognostyczny u pacjentów z nieprzerzutowym RCC, w tym za czynnik zwiększający ryzyko nawrotu [108]. Co ciekawe, jak wspomniano powyżej, niskie wartości stosunku limfocytów do monocytów (LMR) były związane z gorszym OS u pacjentów z RCC z VTT, ale nie stwierdzono takiej korelacji w przypadku stosunku płytek krwi do limfocytów (PLR) [88].

Kolejne dwie prace (Praca nr 2 i Praca nr 3) mają charakter badań oryginalnych, osadzonych na styku urologii, patomorfologii i immunologii onkologicznej. Skupiają się one na ocenie roli ekspresji wybranych markerów immunologicznych, takich jak PSGL-1 oraz STING,

---

analizowanych zarówno w guzie pierwotnym, jak i w czopie nowotworowym. Wybór tych markerów nie był przypadkowy, gdyż oba białka odgrywają istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, interakcjach komórek nowotworowych z układem odpornościowym oraz w procesach adhezji i migracji komórkowej.

PSGL-1, cząsteczka adhezyjna uczestnicząca w migracji leukocytów oraz biorąca udział w interakcjach z płytkami krwi i śródbłonkiem, może odgrywać kluczową rolę w wewnątrznaczyniowym wzroście nowotworu oraz potencjalnym rozsiewie nowotworowym [109-111]. Z kolei szlak STING bierze udział w aktywacji reakcji zapalnej w odpowiedzi na obecność DNA w cytoplazmie, stąd jest przedmiotem rosnącego zainteresowania jako czynnik prognostyczny w onkologii [57, 84, 112]. Jego rola w nowotworach jest złożona i zależna od kontekstu biologicznego, gdyż zarówno jego aktywacja, jak i przewlekła stymulacja mogą prowadzić do odmiennych efektów biologicznych. Analiza szlaku STING w raku nerki z czopem nowotworowym podkreśla złożoną, niejednoznaczną rolę procesów immunologicznych w progresji nowotworów. Czop nowotworowy w raku jasnokomórkowym nerki jest bowiem biologicznie aktywnym mikrośrodowiskiem, którego ocena może dostarczyć dodatkowych informacji prognostycznych, wykraczających poza klasyczne parametry kliniczne i patomorfologiczne.

---

## Założenia i cele pracy

Punktem wyjścia niniejszej rozprawy doktorskiej było założenie, że rak jasnokomórkowy z towarzyszącym żylnym czopem nowotworowym stanowi biologicznie odmienną postać choroby nowotworowej, której przebieg kliniczny i rokowanie nie mogą być w pełni wyjaśnione wyłącznie na podstawie klasycznych parametrów anatomicznych i chirurgicznych oraz podstawowych czynników rokowniczych stosowanych w histopatologii. Z perspektywy urologicznej czop nowotworowy postrzegany jest jako czynnik determinujący stopień trudności leczenia operacyjnego oraz ryzyko okołoperacyjne. Coraz więcej danych jednak wskazuje, że jego obecność odzwierciedla również specyficzne cechy biologiczne nowotworu, mogące wpływać na dalszy przebieg choroby.

Drugim istotnym założeniem pracy było przyjęcie tezy, że czop nowotworowy nie jest jedynie biernym przedłużeniem guza pierwotnego, lecz stanowi odrębny kompartment nowotworu, funkcjonujący w unikalnym mikrośrodkowisku. Stały kontakt z komórkami krwi oraz komórkami układu odpornościowego, a także odmienne warunki hemodynamiczne mogą wpływać na fenotyp komórek nowotworowych oraz ich interakcje z mikrośrodkowiskiem immunologicznym. W konsekwencji czop nowotworowy może wykazywać cechy biologicznie różniące się od guza pierwotnego, co do tej pory było przedmiotem ograniczonej liczby badań. Kolejnym założeniem rozprawy była hipoteza, że mechanizmy immunologiczne odgrywają kluczową rolę w biologii raka nerki z żylnym czopem nowotworowym. Rak nerki jest nowotworem o wysokiej immunogenności, a rozwój i propagacja czopa nowotworowego zachodzą w środowisku szczególnie bogatym w elementy układu odpornościowego. W dobie dynamicznego rozwoju immunoterapii zasadnym wydaje się poszukiwanie markerów biologicznych, które mogłyby odzwierciedlać lokalne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, a tym samym pomagać w ocenie rokowania i potencjalnie w kwalifikacji chorych do leczenia systemowego.

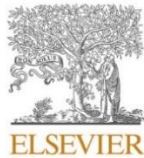
Na tej podstawie sformułowano główny cel rozprawy, którym była charakterystyka biologii i mikrośrodkowiska raka jasnokomórkowego nerki z żylnym czopem nowotworowym, ze szczególnym uwzględnieniem różnic pomiędzy guzem pierwotnym, a czopem oraz ich znaczenia klinicznego w odniesieniu do rokowania onkologicznego.

Cele pracy obejmowały:

1. Usystematyzowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego biologii czopa nowotworowego w raku nerki, w tym jego histopatologii, uwarunkowań molekularnych oraz mikrośrodkowiska immunologicznego, w kontekście możliwości dalszego rozwoju spersonalizowanych strategii leczenia.
2. Ocenę ekspresji PSGL-1 w komórkach nowotworowych i komórkach układu odpornościowego w obu kompartmentach nowotworu, w celu analizy jej możliwej roli rokowniczej.

- 
3. Ocenę ekspresji wybranych innych markerów immunologicznych, w szczególności STING, w guzie pierwotnym oraz w czopie nowotworowym oraz ich potencjalnego związku z agresywnym przebiegiem choroby.
  4. Porównanie profilu immunologicznego guza pierwotnego i czopa nowotworowego, ze zwróceniem uwagi na potencjalne różnice, które mogłyby tłumaczyć obserwowaną heterogeniczność kliniczną chorych z podobnym zaawansowaniem choroby.
  5. Ocenę znaczenia prognostycznego badanych markerów w odniesieniu do przeżycia całkowitego chorych, z perspektywy ich możliwej użyteczności w codziennej praktyce klinicznej.

Realizacja powyższych celów miała na celu pogłębienie rozumienia biologii raka nerki z żylnym czopem nowotworowym. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad czynnikami prognostycznymi oraz do rozwoju bardziej zindywidualizowanego podejścia terapeutycznego u chorych leczonych z powodu tej szczególnie wymagającej postaci raka nerki.



Contents lists available at ScienceDirect

## Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/critrevonc](http://www.elsevier.com/locate/critrevonc)

## Biology of renal cancer tumor thrombus - towards the personalized approach

Sumit Sharma<sup>a</sup>, Michał Kunc<sup>b,\*</sup>, Mieszko Czapliński<sup>c</sup>, Weronika Łyzińska<sup>c</sup>, Rafał Pęksa<sup>b</sup>, Le Qu<sup>d</sup>, Piotr Radziszewski<sup>a</sup>, Łukasz Zapala<sup>a,\*\*</sup><sup>a</sup> Clinic of General Oncological and Functional Urology Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland<sup>b</sup> Department of Pathomorphology Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland<sup>c</sup> ED Scientific Circle of Pathomorphology, Medical University of Gdańsk, Poland<sup>d</sup> Department of Urology Jinling Hospital Affiliated Hospital of Medical School Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, China

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Renal cancer  
Venous tumor thrombus  
Tumor microenvironment

## ABSTRACT

Renal cell carcinoma - related thrombus arising within venous system (venous tumor thrombus, VTT) represents a distinct compartment within cancer, situated at the frontline with the continual interaction with host blood cells. Various host immune blood cells may possibly interact with VTT influencing its biology. While many authors have reviewed the current state-of-the-art of the management of VTT, its biology and microenvironment has not been comprehensively reviewed to date. In this narrative review, we described the current concepts on formation of thrombus, its histopathology, immune microenvironment, genetic and molecular features with potential impact on prognostication and tailored therapy. Although it is the sophisticated and challenging surgery that remains the primary modality in the management of RCC with VTT, recent advances in the research on cancer biology and microenvironment shed some light on the numerous future perspectives. The formation of tumor thrombus is a complex process, understanding of which may trigger onset of novel therapies leading to the improvement of not only oncological results but also patients' safety in these life-threatening conditions.

## 1. Introduction

The most common renal neoplasia in adults is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) which constitutes over 70 % of all RCC cases, followed by papillary RCC (pRCC) (Cirillo et al., 2024). Prognosis and patients' management is primarily dictated by stage and histological features of the tumour. Patients with non-metastatic disease are treated with either partial or radical nephrectomy, whereas combination of immunotherapy and antiangiogenic agents is now the first line of treatment for patients with disseminated disease (Powles et al., 2021). The effectiveness of therapies targeted against vascular endothelial growth factor (VEGF), such as sunitinib or sorafenib in ccRCC may be explained by its molecular background. The main drivers of ccRCC development are alterations in *VHL* gene and result in the dysregulation of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway promoting angiogenesis and metabolic reprogramming (N. Cancer Genome Atlas Research, 2013). In consequence, renal cancers frequently display rich vasculature. The close relationship between ccRCC and blood vessels is further

emphasised by its predilection for renal vein invasion and intravenous thrombus formation. This feature stands as a defining characteristic within the T3 denominator of renal cancer TNM staging, holding significant implications for patient treatment strategies.

About 4 % up to 15 % of RCC cases are associated with venous tumour thrombus (further referred to as VTT) (Liss et al., 2019; Martini et al., 2021; Neves and Zincke, 1987). Most of VTT are located in renal veins, but they might show preposterous intravenous supra-diaphragmatic growth or even reach the right atrium or ventricle (Neves and Zincke, 1987). VTT predominantly involves only renal vein or proximal inferior vena cava (IVC), and this phenomenon may be attributed to the fact that clot blocking IVC makes the otherwise occult disease symptomatic (Blute et al., 2004; Bertini et al., 2011). The level of thrombus is usually graded according to the Mayo Clinic classification (Table 1) (Blute et al., 2004; Hatakeyama et al., 2013). The scale originally invented in 2004 remains of high clinical relevance, as it correlates with survival. In patients without VTT 5-year overall survival (OS) was as high as 49.1 %, compared to 37 % by patients with 4 level

\* Correspondence to: Department of Pathomorphology, Medical University of Gdańsk, Gdańsk 80-214, Poland.

\*\* Correspondence to: Clinic of General, Oncological and Functional Urology, Medical University of Warsaw, Lindleya 4, Warsaw 02-005, Poland.

E-mail addresses: [michal.kunc@gumed.edu.pl](mailto:michal.kunc@gumed.edu.pl) (M. Kunc), [lukasz.zapala@wum.edu.pl](mailto:lukasz.zapala@wum.edu.pl) (Ł. Zapala).<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104731>

Received 5 December 2024; Received in revised form 1 April 2025; Accepted 10 April 2025

Available online 13 April 2025

1040-8428/© 2025 Elsevier B.V. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

**Table 1**

The Mayo-Clinic scale of RCC-related thrombus assessment, after Blute et al (Blute et al., 2004). and Hatakeyama et al (Hatakeyama et al., 2013), modified. VTT – venous tumor thrombus.

Level of the VTT	Description of the stage
0	Tumor thrombus extending to the renal vein only
I	Tumor thrombus either at the entry of the renal vein or within the inferior vena cava (IVC) < 2 cm from the confluence of the renal vein and the IVC
II	Thrombus within the IVC > 2 cm above the confluence of the renal vein and IVC, but below the hepatic veins
III	Thrombus involves the intrahepatic IVC
IV	Thrombus extends above the diaphragm or into the right atrium

thrombus (Blute et al., 2004). The more developed the thrombus is, the more advanced and aggressive treatment techniques must be implemented, which in turn might affect the mortality (Berczi et al., 2017). A novel tool for the classification of inferior vena cava thrombus in RCC was recently proposed, and could define the need for cardiopulmonary or venovenous bypass (Mandhani et al., 2015). It is noteworthy then that the size of thrombus affects survival more than other qualities (Mandhani et al., 2015; Mastoraki et al., 2017). Thrombi can have different consistency, i.e. solid or friable, yet in the light of current research the thrombus consistency seems to not affect the survival (Jia et al., 2023), although making the surgery more challenging (Choi et al., 2017).

RCC-related thrombi usually contain viable tumour cells, and it is possible to determine the tumour type in the thrombus specimen (Warsow et al., 2018). VTT represents a distinct compartment within cancer, situated at the frontline with the continual interaction with host blood cells. It is thought to elicit the potential to seed tumour particles, serving as a possible origin for metastatic dissemination or embolism out of the common routes of metastases (Barashi et al., 2024). On the other hand, various host immune blood cells may possibly interact with VTT influencing its biology (Basu et al., 2019). While many authors have reviewed the current state-of-the-art of the management of VTT, its biology and microenvironment has not been comprehensively reviewed to date. Neoadjuvant therapies, including VEGFR or mTOR inhibitors, have shown variable efficacy in reducing tumor thrombus and facilitating thrombectomy. Understanding the molecular differences between VTT and primary tumors is crucial to develop better predictive markers and treatments. Thus, in this narrative review, we aimed to describe the current concepts on formation of thrombus, its histopathology, immune microenvironment, genetic and molecular features with potential impact on prognostication and tailored therapy.

## 2. Distinct features of VTT from the point of basic histopathology

The primary RCC mass typically exhibits approximately three growth patterns. Smaller tumours tend to display compact nest patterns, while larger ones demonstrate greater cytoarchitectural diversity with trabecular, insular, and solid sheet patterns (Gu et al., 2018; Klatte et al., 2007; Cai et al., 2020). On the other hand, VTT was found to predominantly feature one or two growth patterns, with a notable overrepresentation of the aggressive morphologies, especially solid, and it never develops microcystic pattern (Cai et al., 2020). Moreover, VTT frequently display sarcomatoid and rhabdoid features (Warsow et al., 2018). Both are classified as grade 4 according to the World Health Organization International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) system (Powles et al., 2018). Yang et al. reported that their presence was associated with inferior cancer-specific survival (CSS) in RCC with vena cava tumour thrombus (Yang et al., 2020). Furthermore, Barashi and colleagues have observed faster growth of such thrombi (average 0.63 mm per day vs. 0.3 mm per day in RCCs of other

histopathological characteristics) (Barashi et al., 2024).

Of note, two large cohort studies on non-metastatic VTT investigated the prognostic significance of venous thrombus grading. We recently reported with Qu et al. that the inclusion of pathological grading of thrombus in a risk predicting model displayed better discriminatory ability compared to previous models used in the risk assessment (Qu et al., 2023). Another study explored the grade discrepancy between VTT and primary tumour and demonstrated that VTT upgrading is linked to poorer survival, emphasising the necessity to report grading for both compartments independently (Wu et al., 2024). The authors concluded that the best prediction model incorporated a combination of primary tumour grade and grade discrepancy, rather than solely relied on the highest grade detected in either compartment (Wu et al., 2024). Kim et al. found that the most aggressive clone with the highest grade does not always initiate the VTT (Kim et al., 2021). As a consequence, to determine a metastatic competence it is more important to assess the grade of the clone seeding the VTT than overall tumor grade. These findings may change the existing paradigm, which relies on the highest-grade area observed within the primary tumour to determine the overall tumour grade. Routine reporting of venous tumour grade in relation to primary tumour can be easily implemented in practice and may provide important information further guiding patient management.

Vascular extension is not unique to ccRCC, yet. The frequency of non-ccRCC histology in this setting is about 7–20 % (Kaushik et al., 2013; Rodriguez Faba et al., 2018), with pRCC being the most common type. On the other hand, the frequency of VTT in pRCC was reported as 8.2 %, compared to 23.6 % in ccRCC (Kim et al., 2012; Rabinowitz et al., 2022). Interestingly, some authors reported tumor thrombus extension in pRCC to be associated with worse CSS outcomes, when compared to the latter one (Kim et al., 2012). Similar association with non-clear cell histology and worse survival is supported by results of other studies (Ciancio et al., 2010). A matched cohort analysis demonstrated that non-ccRCC more frequently showed adverse pathologic features (larger size, higher grade, lymph node metastases, sarcomatoid differentiation), so tumour histology is not an independent prognostic factor in RCC with VTT (Kaushik et al., 2013). Other recent contemporary cohort analysis found that individuals with non-RCC histopathology were at greater risk to have regional lymph node metastases ( $p = 0.037$ , 42.9 % vs 20.7 %), while no differences in perioperative outcomes were noted (Rabinowitz et al., 2022). However, another study, although limited by small sample size, did not demonstrate significant differences between ccRCC and non-ccRCC in terms of clinicopathological features and survival (Kim et al., 2012). In their cohort of 74 patients with RCC with VTT, Kim et al. identified 12 patients with pRCC (Kim et al., 2012). Of note, after the review of the findings, all 12 cases were reclassified as “type II” papillary RCC, and this histology was found to be an independent predictor of CSS (Kim et al., 2012). With the current WHO classification abandoning the category of type II pRCCs and proposing several new entities that might have been previously classified as such, future studies should delve into their association with VTT formation.

VTT may either produce free-floating tumour into the venous lumen or may invade the vascular wall. It is of great importance in terms of surgical approach and pathological assessment of margins of the resected vessels. Importantly, wall invasion may be predicted by the imaging measurements of inferior vena cava and renal vein ostium diameter (Zini et al., 2008). The standard preoperative magnetic resonance imaging can be implemented, evaluating morphologic features, such as the complete occlusion of the IVC lumen or vessel breach. Then, an increase in IVC diameter was found to be associated with a higher probability of IVC wall invasion (Adams et al., 2018). The clinical significance of positive vascular surgical margin in case of “free-floating” thrombus appears to be minimal, as the risk of relapse in such cases is predominantly influenced by the extent of vascular thrombus invasion (Liu et al., 2016). On the other hand, in a large prospective cohort of 1023 RCC with VTT patients, it was found that microscopic vein invasion, defined

as local destruction and invasion of the endothelium by the tumour, was associated with adverse clinicopathological characteristics and was an independent predictor of CSS (Rodríguez Faba et al., 2018). The process of vascular wall invasion may be directed by L1CAM-CXCL5 axis that shapes the perivascular tumor niche and mediates migration of RCC toward endothelial cells (Wu et al., 2023). Therefore, the regulation of this system may become the potential therapeutic target in RCC.

### 3. Molecular aspects of venous tumor thrombus

#### 3.1. Genetic alterations and phylogenetics in RCC with VTT

Renal malignancies typically carry only few clonal mutations. The majority of subclonal somatic point mutations and copy number alterations occur with varying frequency throughout the tumour (Turajlic et al., 2018). In sporadic ccRCC, over 90 % of cases demonstrate a dual-hit mechanism characterised by the loss of chromosome arm 3p, housing the *VHL* gene, and its inactivation due to mutations or methylation of the promoter region in the second *VHL* allele (Warsow et al., 2018). This double disruption leads to the functional inactivation of the *VHL* protein, impairing its ability to regulate HIF1A stability. Three genes located on chromosome arm 3p along with *VHL*, *BAP1* (BRCA1-associated protein 1), *SETD2* (SET domain-containing 2), and *PBRM1* (polybromo-1, encoding BAF180 protein) are among the genes frequently mutated in ccRCC and shaping its biology (Niu et al., 2021; Tumkur Sitaram et al., 2021). *BAP1* is a tumour suppressor involved in chromatin regulation and DNA repair, and its inactivation has been linked to aggressive ccRCC phenotypes with predisposition to VTT formation (Niu et al., 2021). *PBRM1* genes and SET family genes encode enzymes responsible for histone methylation (Gossage et al., 2014). *PBRM1* and *SETD2* mutations usually contribute to better outcomes and favourable response to anti-angiogenic treatment (Gossage et al., 2014). While combination of sunitinib with bevacizumab+atezolizumab in cohorts with high angiogenesis is successful, it is thought that bevacizumab with atezolizumab can be also effective in cases with high T-effector and/or cell-cycle transcription (Motzer et al., 2020). Recent paper by Wang et al. identified the association between *BAP1* loss in RCC and tumor microenvironment (Wang et al., 2018). The authors provided a division of the tumors into noninflamed and inflamed subtypes, the latter being rich in *BAP1* mutations. Interestingly, non-inflamed cases were highly positive for angiogenesis-related genes, which may enforce the clinicians for better selection between treatments based on immune checkpoint and angiogenesis inhibitors. Furthermore, *BAP1* mutations are thought to characterize tumors that are radiosensitive, but more clinical research is necessary to confirm this phenomenon (Piva et al., 2015). Then, as *BAP1* loss increases the potential of the PARP inhibitor, olaparib, recent interest lead to the imitation of the trials in advanced RCC refractory to standard therapy (Piva et al., 2015).

Somatic mutations in *PRMB1* were associated with increased angiogenesis potential, whereas sarcomatoid tumors exhibit lower prevalence of *PBRM1* mutations and angiogenesis markers (Motzer et al., 2020). Finally, cases with multiple clonal mutations, i.e., simultaneous abnormalities in *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* and *PTEN*, are characterised by the high genetic instability and tend to have greater metastatic potential (Carril-Ajuria et al., 2019).

Mutations in the VTT typically differ from the dominant genetic landscape of the primary growth. Kim et al. found that although *BAP1*, *SETD2*, *TSC1/2*, *TP53* mutations relate to higher tumor grade, disease aggressiveness, and poor survival in primary tumor, no enrichment of such mutations was observed in VTT (Kim et al., 2021). Furthermore, both high- and low-grade clones were found in VTT (Kim et al., 2021). In the research conducted by Niu and colleagues, the VTT had higher prevalence of mutations in the *CELSR2* gene (encoding protein involved in contact-mediated intercellular communication, as well as in kidney development) and *TET2* gene (enzyme involved in DNA demethylation) (Niu et al., 2021). While the exact implications of these changes are

unknown, it is likely that they aid in the development of the thrombus. The same study found a high prevalence of DNA damage repair gene alterations in VTT, being indicative of genomic instability (Niu et al., 2021). Moreover, the copy number losses in chromosomes 9 and 14 are often detected, which correlate with immunosuppressive phenotype of thrombus, with more Tregs and less memory cells and cytotoxic cells (Niu et al., 2021). This kind of microenvironment restricts the efficiency of PD-L1 directed therapy and, thus, is associated with worse prognosis (Motzer et al., 2020). Interestingly, Kim et al. found an increase in immediate early genes (IEGs) that were found in invasive intravascular RCC (Kim et al., 2021), as an adaptation to fluid shear stress during intravascular invasion (Schwachtgen et al., 1998).

Then, Cai et al. aimed to systematise RCCs according to phenotypic features and analysed e.g. layout of cells, organisation of tumor tissue, differentiation types, inflammation and necrosis features (Cai et al., 2020). Based on these features the authors proposed a unique taxonomy together with subclassification of ccRCCs resistant to tyrosine kinase inhibitors-based treatment (Cai et al., 2020).

The TRACERx renal study analysed this problem further. The study analysed the thrombi and the primary tumours and established a model of clonal promotion for RCCs, unravelling the mutations leading to thrombus creation and metastases (Turajlic et al., 2018). The deletions of 9p and 14q were deemed as hallmarks of metastasis in RCC. Three models of metastatic progression were established and the comparison of them is presented in Table 2. All metastasising clones showed high Ki-67 expression (Turajlic et al., 2018).

The RCC itself was divided into seven subtypes, based on the common mutations, while three out of seven are proven to cause metastases and correlate with poor prognosis, including *BAP1* mutants, '*VHL*-wildtype' and 'multiple clonal drivers' (Turajlic et al., 2018). The *PBRM1* mutants give rise to clonal evolution, with various clones diverging from common ancestor and then acquiring distinct molecular features, e.g. activation of PI3K, loss of *SETD2* or various somatic copy number alteration (sCNAs), which all represent targets for personalised therapy (Tumkur Sitaram et al., 2021). Amongst 33 cases with VTT only one case was molecularly classified as a '*VHL* monodriver', 6 had multiple clonal drivers, 4 were *BAP1*-driven, 4 were *VHL*-wildtype, 7 had *PBRM1* alterations and 11 were of non-driver subtype. Of note, VTT were directly seeded by the most recent common ancestor clone in 10 cases, suggesting early intravascular growth. In other cases, VTT originated from more advanced subclones in the primary tumour with additional driver alterations, such as 9p loss. While primary tumours showed ongoing evolution, VTT had limited additional mutations, sharing 94.9 % of events with the primary tumour, potentially due to limited selective pressure in the intravascular environment. TRACERx study also revealed that VTT may be a site of aggressive clone

**Table 2**

Models of RCC evolution and metastases according to TRACERx study, after Turajlic et al (Turajlic et al., 2018). Abbreviations: IVC – inferior vena cava; sCNA – somatic copy number alterations.

	"Punctuated evolution"	"Branched Evolution"	"Linear evolution"
Pace of progression	rapid	attenuated	indolent
main places of metastases	adrenal glands, IVC, lungs, liver	bones, lungs	-
Mutations involved	<i>BAP1</i> , <i>VHL</i> , 9p or 14q del, clones losing <i>PBRM1</i> and <i>SETD2</i>	<i>PBRM1</i> → <i>SETD2</i> <i>PBRM1</i> → sCNA <i>PBRM1</i> → <i>PI3K</i>	<i>VHL</i> loss
Chromosomal complexity	high	medium	low
Intratumoral heterogeneity	low	high	low

development later seeding other sites, e.g. lymph nodes (Turajlic et al., 2018).

### 3.2. Transcriptomics and proteomics of RCC with VTT

Zhou and colleagues carried out proteomic analysis of RCC with VTT and found many proteins to be downregulated (Zhou et al., 2021). This included retinol binding protein (RBP), decorin (decorin normally blocks VEGF pathway; when it decreases, pathway works more efficiently, promoting angiogenesis), keratin 7 (usually present in pRCC and chRCC but negative in the majority of ccRCC cases), phytyl-CoA dioxygenase domain containing 1 (PHYHD1) and choline dehydrogenase (CHDH). The last two proteins were suspected to have prognostic value, since lower levels of their mRNA correlated with poorer survival of the patients (Zhou et al., 2021). Other genes proven to be down-regulated include *RAB25* (involved in intracellular transport), *NAT8* and *GGT5* (both associated with glutathione metabolism), while *SLC7A5* (responsible for uptaking aminoacids from the environment), *E2F1* (encoding transcription factor associated with central carbon catabolism), *PYCR1* (involved in the synthesis of proline, which is essential for the survival and proliferation of cancer cells), *VEGFA* and *EGFR* are up-regulated (Zhou et al., 2021). The changes in primary tumor are more important for the survival rate than those in the tumour thrombi, suggesting thrombus impact is predetermined by features of the primary tumor (Shi et al., 2023).

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules, which regulate gene expression posttranscriptionally. Their role as biomarkers and prognostic factors of various cancers, including RCC, is currently a subject of rigorous investigation. A panel of five miRNAs: miR-21, miR-143, miR-200c, miR-210 and miR-126 accurately distinguish normal kidney tissue and ccRCC samples with 100 % sensitivity and specificity (Vergho et al., 2014). For instance, miR-21, known for its frequent upregulation in cancer, exerts its effects by targeting various tumor suppressors, such as *BCL2* and *PTEN* (Zhu et al., 2008). MiR-126, which targets *ROCK1* and *VEGFA*, functions as a tumor suppressor within cancerous tissue (Liu et al., 2009). Additionally, miR-221, implicated in modulating the response to sunitinib via *VEGFR* regulation, displays distinct expression patterns (Krebs et al., 2020). Interestingly, certain miRNAs show clear differences in expression between tumors with thrombi and those without, e.g. miRNA-210, miRNA-483-5p, miRNA-455 and miRNA-200c (Gilyazova et al., 2023). Moreover, miR-126 expression correlates with metastasing potential of the tumor and was observed in higher concentration in tumors that have metastasised (Vergho et al., 2014). On the other hand, it was revealed that patients with higher miRNA expression (miR-21 and miR-126) generally had better prognosis (Vergho et al., 2014).

### 3.3. Other molecular aspects of RCC with VTT biology

In ccRCC, the mutation of *VHL* gene causes an increase in concentration of HIF, which is a part of the Nox4/ROS/HIF/VEGF pathway (Gossage et al., 2014). This event facilitates angiogenesis and dysregulates the tissue homeostasis. Increased HIF levels and hypoxia affect numerous processes, from inflammation to coagulation. The whole process is sometimes aided by the abnormalities on earlier stages of the hypoxic pathway, e.g. by high expression of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-4 (Nox4) (Gossage et al., 2014). This enzyme regulates HIF-2 $\alpha$  activity and, thus, the production of intracellular reactive oxygen species (ROS), causing oxidative DNA damage and multiple sCNA (Wilcox et al., 2011). It is suggested that the Nox4's translocation from the cytoplasm to the nucleus is associated with RCC progression especially in patients with renal intravascular tumor extension (Kaushik et al., 2020).

Several differences in the expression of various surface proteins between cells in the thrombus and in the main body of the tumor are reported. One of them is prostate-specific membrane antigen (PSMA),

which is known to be present in normal kidney proximal tubular epithelial cells (but not in the regular renal vessels), as well as on RCC cells' surface (Morgantetti et al., 2019). Its expression was significantly higher in VTT compared to primary tumor within the kidney (Morgantetti et al., 2019). A positive correlation between this phenomenon and formation of vessels on the periphery of the malignant mass was also observed (Morgantetti et al., 2019). This is consistent with the assumption that PSMA plays a role in tumor neovascularization (Wang et al., 2015). Consequently, upregulation of PSMA appears to facilitate tumor angiogenesis, thereby enhancing the expansion of the nutrients supply. There is currently a great amount of research dedicated to PSMA as a potential target for modern therapies, e.g. radioligand therapies, antibody-drug conjugates and cellular immunotherapies (Wang et al., 2022). These primarily concern prostate cancer, but are of the potential use in patients with VTT.

## 4. Specifics of the immune microenvironment of VTT

The tumor microenvironment (TME) consists of several cellular and extracellular matrix components, representing a truly heterogeneous and dynamic network (Vuong et al., 2019). Inside this net, tumor expansion is set by cellular interactions of myofibroblasts, fibroblasts, neuroendocrine cells, adipose cells, immune-inflammatory cells, as well as endothelial cells to initiate tumor growth, invasion and formation of metastatic growth. As RCC is a highly immunogenic and pro-angiogenic tumor, recently several studies have characterized various cell populations inside the RCC microenvironment, making the possible association between the components of the tumor and clinical outcome. RCCs are also highly heterogeneous and the same concerns the thrombus (Agochukwu and Shuch, 2014). It can have markedly different characteristics of TME than the rest of the tumor (Kim et al., 2021). Following the analysis of the factors that can contribute to the formation of VTT and the ways that are used by cancer cells to disrupt hemostasis and promote procoagulative processes, the next step is to examine the distinct microenvironment of VTT.

The immune response seems to be diversified against the primary tumour and the venocaval thrombus (Jilaveanu et al., 2014). B7x protein is a member of the B7-CD28 family of costimulatory ligands and normally has an immunomodulating role (triggers inhibitory T-cell signalling) (Cha et al., 2019). It was found to be expressed more intensively in RCC within the compartments such as the thrombus, lymph node metastases and at the advanced tumor stages, as it suppresses the immune responses via negative costimulation (Errarte et al., 2020; Thompson et al., 2008). There are attempts to use soluble B7x as a serum marker of RCC. Thompson et al. found that RCC patients not only had detectable sB7x in contrast with control individuals, but also the elevation of sB7x level corresponded with advanced disease (Thompson et al., 2008).

Programmed cell death 1 receptor ligand (PD-L1) may be expressed by tumor cells and some of the immune cells, including lymphocytes and macrophages (Zak et al., 2015). Cancer cells utilize PD-L1/PD-1 signaling to inhibit T-cell dependent immune response (Cha et al., 2019). Yet, recent studies revealed that not all patients benefit from PD-1/PD-L1 blockade due to various mechanisms, e.g. regional molecular heterogeneity of RCC (Ilie et al., 2016; Mikami et al., 2019). Lopez et al. described a statistically significant decrease in PD-L1 expression in the renal VTT faction compared to a primary tumor ( $p < 0.0001$ ) (Lopez et al., 2018). Our group reported that the frequency of PD-L1 expression on tumor cells and immune cells infiltrating the thrombus varied between the compartments and was dependent on the antibody clone implemented (Zapala et al., 2022). Moreover, the expression of PD-L1 on tumor-associated immune cells (TAICs) and tumor cells in VTT was associated with shorter OS (Zapala et al., 2022). Other authors confirmed that PD-L1 is not expressed evenly, and the thrombus is a major compartment displaying PD-L1 expression (Zapala et al., 2022). This fact has significant implications, e.g. a tumor biopsy may not give

reliable result of PD-L1, while the thrombus could serve as a determinant of PD-L1 presence (Liss et al., 2019; Zapala et al., 2022). This, in turn, may be linked to survival risk and potentially limits immunotherapy. As tumor thrombus infiltrates display various expression of checkpoint molecules, the combination therapy of blockade of PD1 and NKG2A proved to improved efficacy in restoring CD8 + T cell effector functions (Qiu et al., 2024a). Interestingly, one study postulated oral microbiome can augment the rate of PD-L1 expression in RCC-related thrombi by producing molecules affecting epigenetic signaling, as well as by enhancing immune privilege (Liss et al., 2020). This process is supposed to be analogous to the most thoroughly studied *Fusobacterium nucleatum*, which is known to induce CCL20 protein expression and, thus, to stimulate macrophage activation and migration in colorectal cancer (Zhang et al., 2023a).

Among novel immune checkpoints inhibitors one of potentially clinical relevance is V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA) (Qin et al., 2019; Franzin et al., 2020). VISTA is thought to inhibit the T-cell population under physiological conditions, but increased expression of VISTA in cancer patients may be a marker of arising resistance to checkpoint inhibitors (Hong et al., 2022). Recent advances in the understanding of TME initiated interest in thymocyte selection-associated HMGB BOX (TOX), the T cell exhaustion marker (Kawashima et al., 2020). TOX expression was found to be inversely correlated with the success of immunotherapy based on PD-1 blockade (Wang et al., 2019). Both VISTA- and TOX-positive immune cells can be found in the VTT (Zapala et al., 2023). Interestingly, the increased levels of immune cells with the positive expression of VISTA within VTT compartment correlated with poorer survival (Zapala et al., 2023). VISTA stimulates synthesis of TOX, that suppresses the function of lymphocytes due to the lower production of cytokines and increase in inhibitory receptors, i.e., PD-1, TIM-3, CTLA-4 and LAG-3 (Vuong et al., 2019; Zapala et al., 2023; Lavacchi et al., 2020). The result is a decline of lymphocytic cell populations and potentially contribution to immune evasion in malignancy. The presence of VISTA-positive TAICs in thrombus (but not in primary tumors) was found to be associated with the presence of distant metastases and tumor necrosis (Zapala et al., 2023). P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), which is the high-affinity receptor for P-selectin expressed among others by stimulated lymphocytes T, is thought to bind to the immune checkpoint receptor VISTA, initiating suppression of T cells (Johnston et al., 2019). Recently, we found that patients with PSGL-1-positive tumor cells located in the primary tumor and immune cells with the PSGL-1 expression within VTT demonstrated poorer OS (Pęksa et al., 2024). As the PSGL-1 expression is mainly found on tumor cells in VTT, the acquisition of PSGL-1 expression may trigger the interplay of tumor cells with platelets and endothelium (Pęksa et al., 2024).

Shi et al. examined the mRNA profile of the VTT that indirectly enabled to characterize its microenvironment (Shi et al., 2022). Regarding immune cells, CD8 + lymphocytes predominated, followed by many subpopulations of CD4 + lymphocytes (i.e. T helpers, naïve lymphocytes, and Tregs) (Shi et al., 2022). The authors hypothesized that tumor cells forming VTTs are not freely floating in the lumen of the blood vessels but need to produce an extracellular matrix (ECM) network in cooperation with immune cells and stroma cells to promote tumor thrombus growth. Therefore, targeting matrix remodeling initiators might lead to effective counter-measurements in VTTs' patients. Macrophages inhabiting the thrombus were thought to remodel the ECM, which in turn lead to cell spreading and neoangiogenesis (Vuong et al., 2019). Myofibroblasts function as a major cell population that produces ECM, serving in both primary tumor and tumor thrombus, but in the latter their production rate is much higher than in the primary tumor (Shi et al., 2022). Another study pinpointed the VTT proinflammatory M1 macrophages were more abundant than in primary tumors (Liss et al., 2019).

It was reported that the ratio of neutrophils to lymphocytes (NLR) is distorted in RCC, with expansion of neutrophils and decrease of

lymphocytes, which is associated with the poorer prognosis in patients (Shang et al., 2021; Peyton et al., 2020; Zapala et al., 2021). We also investigated this phenomenon, but did not observe its correlation with the stage, instead we found that lower lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) was associated with the presence of tumor necrosis and shorter OS in patients with VTT (Zapala et al., 2021). The decrease of lymphocytes is known to be a negative prognostic factor due to the restriction of antitumor reaction of the immune system (Khagi et al., 2017).

Another unique property of neutrophils, which is important in the context of the course of RCC are their extracellular traps (Khagi et al., 2017). NETosis is supposed to allow the tumor to catch circulating tumor cells and group them together, thus promoting building of larger metastases (Cools-Lartigue et al., 2013; Hu et al., 2023). NETosis can also be triggered by activated platelets by means of high-mobility group box 1 protein (HMGB1). This phenomenon was observed in patients with venous thromboembolic disease, which mechanism may be similar to RCC formation to VTT (Nakazawa et al., 2018). One noted, though, that different populations of immune cells vary in the degree of presentation within the tumors and this finding may be implemented to distinguish between subtypes of tumor and in the determination of the prognosis (Yang et al., 2023).

Finally, Zhang et al. analyzed TME of both primary tumor and VTT in a small cohort receiving neoadjuvant combination therapy (pembrolizumab plus axitinib) (Zhang et al., 2024). They found that in responders there was an increase in infiltrating T cells and NK cells, while in non-responders neutrophils and plasma cells numbers were elevated. Interestingly, responders also showed up-regulated apoptosis, VEGF signaling, PD-1 signaling, chemokine signal axis, TCR signaling and B cell receptor signaling (Zhang et al., 2024).

## 5. Renal venous tumor thrombus and coagulation

Tumor cells can affect the process of haemostasis in multiple ways, starting from their procoagulant activity, through their fibrinolytic activity, cytokine secretion, to direct interaction with blood cells and cellular elements of clotting (Caine et al., 2002). RCC was proven to promote fibrin deposition in the TME, partly by using extrinsic clotting pathway with serum clotting factor VII (Lima and Monteiro, 2013). Fibrin is suggested to play a role in metastases, and tumor cells are more likely to settle in spots, where fibrin deposits were already present (Kolodziejczyk and Ponczek, 2013). Another procoagulant mechanism observed in many tumors is an increase in levels of tissue factor (TF), which stimulates thrombosis, but also plays a role in cellular signalling, activating platelets via PAR-1 and PAR-2 receptors (Mackman and Taubman, 2009). There are, however, conflicting views on whether this mechanism applies to RCC. On one hand the TF was not reported to occur in solid tumor mass of RCC (Callander et al., 1992), but on the other hand one noted that after surgery of RCC there was a significant decrease of TF, and therefore it may act as the marker of the effectiveness of the therapy (Silva et al., 2018, 2014). While under physiological conditions expression of TF is induced on demand, tumor cells seem to have constitutive expression of TF on their surface, irrespective of external conditions (Caine et al., 2002).

The fibrinolytic system interacts in multiple ways with tumors and plays a vital role in haemostatic processes (John et al., 2017). One study showed that lack of functional plasminogen activators inhibits progression of tumors and their metastasis (Shapiro et al., 1996). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) interacts with ERK/MAP, JAK/STAT, and PI3K/AKT pathways, which are often dysregulated in RCC and changes in their functions facilitate cancerogenesis (Burysek et al., 2002; Chandrasekar et al., 2003). Fibrinolysis also stimulates angiogenesis e.g. tissue-type plasminogen activator (tPA) activates matrix metalloproteinases through plasmin, while those enzymes in turn cleave kit-ligand and the free active form of kit stimulates progenitor endothelial cells, which leads to neoangiogenesis (Ismail et al., 2021).

The fact that tumor growth relies on angiogenesis strongly suggests that the above-described mechanism facilitates RCC cells proliferation, invasion and, possibly, are involved in the formation of VTT.

Many tumors (including RCC) spread their cells into the bloodstream and, thus, free tumor cells enter circulation and often interact with platelets (Ward et al., 2021). Platelets store various growth factors in their granules, some of them already proven to interact with tumors (e.g. TGF- $\beta$ , and VEGF) (Yan et al., 2014). Tumor cells surrounded by platelets are protected from recognition and neutralisation by immune cells circulating the blood (Yan et al., 2014). What is more, low baseline mean platelet volume (MVP) correlates with larger tumor size, poor histology features (e.g. high Fuhrman grade, sarcomatoid components, necrosis and vascular invasion) and is, therefore, considered a negative prognostic factor in patients with non-metastatic RCC, including higher risk of recurrence (Hsu and Balzer-Haas, 2022). Interestingly, as stated above, low values of lymphocyte to monocyte ratio (LMR) were associated with poorer OS in patients with RCC with VTT, but no such a correlation was found, as for platelet to lymphocyte ratio (PLR) in the multicentre contemporary cohort (Zapala et al., 2021).

Feng et al. developed a tumor thrombosis coagulation-related risk signature (TTCRRS), tailored specifically for RCC patients. The methodology of the study was based on leveraging a comprehensive set of coagulation-related genes (CRGs) ( $n = 10$ ), and implementing a machine learning algorithms to construct the signature that complements the traditional anatomic TNM staging and Mayo systems (Feng et al., 2024). Moreover, they identified two clusters with distinct outcomes, with more aggressive cluster 2 enriched in immune signalling pathways, including those for T cell and B cell receptor activation, as well as primary immunodeficiency pathways. This suggests a heightened immune response potentially linked to tumour immune evasion and resistance, possibly making these patients more responsive to immunotherapy. This study identified a hub gene and potential therapeutic target, *CYP51A1*, that is down-regulated in tumour compared to adjacent tissues, positively correlates with CD8 + T-cells infiltration and hypoxia. Another study by Qiu et al. found that the key gene *MMP9* was significantly correlated with some subpopulation of lymphocytes, and may promote the progression of RCC by influencing immune infiltration of CD8 +T cells and Treg (Qiu et al., 2024b). Subsequently, the authors developed a coagulation-related risk score prognostic model in the Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort to be used as a prognostic marker (Qiu et al., 2024b).

## 6. From bench to bedside

While first stages of the disease can be usually addressed by surgery with good outcomes, disseminated and/or more advanced stages require addition of other therapeutic modalities. The work by Hsu et al. pinpoints the specific need for adequate anticoagulation in patients suffering from VTT in order to diminish the risk of thrombotic incidents, using low-molecular-weight heparin (LMWH) or direct oral anticoagulants (DOAC) for that purpose (Hsu and Balzer-Haas, 2022). There is an ongoing debate on the rationale for a neoadjuvant targeted molecular therapy in advanced stage RCC with VTT. Limited evidence coming from mainly case reports or case series suggests it may improve outcomes by downstaging the disease and, in turn, facilitate the surgery and lower the risk of perioperative complications (Peng et al., 2018; Zhang et al., 2023b; Okamura et al., 2019). In the study by Cost et al. ( $n = 25$  cases) the only, but still minimal, effect in downstaging of the tumor thrombus was observed in sunitinib arm (when compared to alternative targeted molecular therapies) (Cost et al., 2011). Some authors suggest that the effect exerted by tyrosine kinase inhibitors affects mostly the thrombus and metastases, while are less effective against the primary tumor (Beltagy et al., 2019). Due to the advantages of immunotherapy-based combinations, checkpoint inhibitors became the first line of treatment of the advanced RCC. Combinations of checkpoint inhibitors, i.e. nivolumab and ipilimumab were proposed for this reason, as well (Master

et al., 2023). The therapy often includes also an antiangiogenic agent (Tabbara et al., 2023). In the RENOTORCH study Yan et al. analysed intermediate-/poor-risk unresectable or metastatic RCC cases randomized to receive toripalimab plus axitinib or sunitinib and proved significantly longer PFS and higher ORR in the former arm (Yan et al., 2024). Similar results were obtained by theNEOTAX study that found toripalimab in combination with axitinib is an option for better down-staging rate than tyrosine kinase inhibitor alone (Gu et al., 2024). The authors observed the median decrease in TT length to be 2.3 cm, while in 61.9% it led to modifications in the initial surgical strategy (e.g. avoidance of the incision of right atrium, avoidance of the cardiopulmonary bypass, avoidance of the hepatic artery occlusion, less extensive liver mobilization) (Gu et al., 2024). Then, the results of ongoing clinical trials on RCC with inferior vena cava tumor thrombus are awaited, eg. NCT05969496 (neoadjuvant pembrolizumab and axitinib, NEOPAX), or NCT05319015 (neoadjuvant lenvatinib and pembrolizumab) (Lakritz et al., 2024; Marandino et al., 2024). Yet, cytoreductive surgery remains an option in this specific clinical scenario of RCC. It is also worth emphasising that perioperative transfusion of allogenic blood products, which is often necessary in patients with Mayo-level III-IV, who may experience life-threatening intraoperative bleeding, might be associated with higher risk of recurrence due to transfusion-related immunomodulation (Zhang et al., 2021). It is then important to try to avoid this procedure, e.g. by performing intraoperative cell salvage and leukocyte-depleted filter (IOCS-LDF) technique (Zhang et al., 2021). It is also crucial to maintain holistic and personalized approach, when treating such patients, and to address as many spheres of their unique medical condition as possible.

## 7. Conclusions

Although it is the surgery that remains the primary modality in the management of RCC with VTT, recent advances in the research on cancer biology and microenvironment shed some light on the numerous future perspectives. The formation of tumor thrombus is a complex process, understanding of which may trigger onset of novel therapies, leading to the improvement of not only oncological results but also patients' safety in these life-threatening conditions.

## Author contributions

Conceptualization, S.S., M.K. and Ł.Z.; methodology, S.S., M.K. and Ł.Z.; software, S.S., M.K. and Ł.Z.; validation, S.S., M.K. and Ł.Z.; formal analysis, S.S., M.K. and Ł.Z.; investigation, S.S., M.K., M. Cz., W. Ł., R. P., L. Q, and Ł.Z.; resources, S.S., M.K. and Ł.Z.; data curation, S.S., M.K. and Ł.Z. writing— S.S., M.K., M. Cz., W. Ł. and Ł.Z.; writing and re-editing— S.S., M.K. and Ł.Z.; visualization, M. K. Ł.Z.; supervision, P.R, Ł.Z.; project administration, M. K. .; funding acquisition, N/A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

None

## References

- Adams, L.C., Ralla, B., Bender, Y.Y., Bressen, K., Hamm, B., Busch, J., Fuller, F., Makowski, M.R., 2018. Renal cell carcinoma with venous extension: prediction of inferior vena cava wall invasion by MRI. *Cancer Imaging* 18 (1), 17.
- Agochukwu, N., Shuch, B., 2014. Clinical management of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *World J. Urol.* 32 (3), 581–589.

- Barashi, N.S., Friedman, D., Shiang, A., Pickersgill, N., Vetter, J., Suresh, T., Ippolito, J. E., Smith, Z.L., 2024. Growth kinetics of venous tumor thrombus in patients with renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* 42 (2), 31 e17-31 e23.
- Basu, A., Yearley, J.H., Annamalai, L., Prybycyn, C., Rini, B., 2019. Association of PD-L1, PD-L2, and immune response markers in matched renal clear cell carcinoma primary and metastatic tissue specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 151 (2), 217-225.
- Beltagy, A., Ismail, A., Elmansy, H., Shahrou, W., Prowse, O., Kotb, A., 2019. Sunitinib cause delayed complete response on metastatic RCC and extensive IVC thrombus, but not to the kidney tumor: a case report and review of literature. *J. Surg. Case Rep.* 2019 (11), rjz326.
- Berzi, A., Flasko, T., Szerafin, T., Thomas, B., Bacso, Z., Berzsi, C., 2017. Surgical management and outcome of renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus. *Urol. Int* 99 (3), 267-271.
- Bertini, R., Roscigno, M., Freschi, M., Strada, E., Angiolilli, D., Petralia, G., Matloob, R., Sozzi, F., Capitanio, U., Da Pozzo, L.F., Colombo, R., Guazzoni, G., Cremonini, A., Montorsi, F., Rigatti, P., 2011. Impact of venous tumour thrombus consistency (solid vs friable) on cancer-specific survival in patients with renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 60 (2), 358-365.
- Blute, M.L., Leibovich, B.C., Lohse, C.M., Cheville, J.C., Zincke, H., 2004. The Mayo Clinic experience with surgical management, complications and outcome for patients with renal cell carcinoma and venous tumour thrombus. *BJU Int* 94 (1), 33-41.
- Burysek, L., Syrovets, T., Simmet, T., 2002. The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 277 (36), 33509-33517.
- Cai, Q., Christie, A., Rajaram, S., Zhou, Q., Araj, E., Chintalapati, S., Cadeddu, J., Margulis, V., Pedrosa, I., Rakheja, D., McKay, R.M., Brugarolas, J., Kapur, P., 2020. Ontological analyses reveal clinically-significant clear cell renal cell carcinoma subtypes with convergent evolutionary trajectories into an aggressive type. *EBioMedicine* 51, 102526.
- Caine, G.J., Stonelake, P.S., Lip, G.Y., Kehoe, S.T., 2002. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia* 4 (6), 465-473.
- Callander, N.S., Varki, N., Rao, L.V., 1992. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 70 (5), 1194-1201.
- Carril-Ajuria, L., Santos, M., Roldan-Romero, J.M., Rodriguez-Antona, C., de Velasco, G., 2019. Prognostic and predictive value of PBRM1 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancers* 12 (1).
- Cha, J.H., Chan, L.C., Li, C.W., Hsu, J.L., Hung, M.C., 2019. Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer. *Mol. Cell* 76 (3), 359-370.
- Chandrasekar, N., Mohanam, S., Gujrati, M., Olivero, W.C., Dinh, D.H., Rao, J.S., 2003. Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells. *Oncogene* 22 (3), 392-400.
- Choi, D.K., Jeon, H.G., Jeong, C.W., Kwak, C., Song, C., Chung, J., Hong, S.K., Hong, S. H., Seo, S.I., 2017. G. Korean Renal Cancer Study, Surgical treatment of renal cell carcinoma: can morphological features of inferior vena cava tumor thrombus on computed tomography or magnetic resonance imaging be a prognostic factor? *Int J. Urol.* 24 (2), 102-109.
- Ciancio, G., Manoharan, M., Katkoo, D., De Los Santos, R., Soloway, M.S., 2010. Long-term survival in patients undergoing radical nephrectomy and inferior vena cava thrombectomy: single-center experience. *Eur. Urol.* 57 (4), 667-672.
- Cirillo, L., Innocenti, S., Becherucci, F., 2024. Global epidemiology of kidney cancer. *Nephrol. Dial. Transpl.* 39 (6), 920-928.
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., Ferri, L., 2013. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest* 123 (8), 3446-3458.
- Cost, N.G., Delacroix Jr., S.E., Sleeper, J.P., Smith, P.J., Youssef, R.F., Chapin, B.F., Karam, J.A., Culp, S., Abel, E.J., Brugarolas, J., Raj, G.V., Sagalowsky, A.L., Wood, C. G., Margulis, V., 2011. The impact of targeted molecular therapies on the level of renal cell carcinoma vena caval tumor thrombus. *Eur. Urol.* 59 (6), 912-918.
- Errarte, P., Larrinaga, G., Lopez, J.I., 2020. The role of cancer-associated fibroblasts in renal cell carcinoma. An example of tumor modulation through tumor/non-tumor cell interactions. *J. Adv. Res* 21, 103-108.
- Feng, T., Wang, Y., Zhang, W., Cai, T., Tian, X., Su, J., Zhang, Z., Zheng, S., Ye, S., Dai, B., Wang, Z., Zhu, Y., Zhang, H., Chang, K., Ye, D., 2024. Machine learning-based framework develops a tumor thrombus coagulation signature in multicenter cohorts for renal cancer. *Int J. Biol. Sci.* 20 (9), 3590-3620.
- Franzini, R., Netti, G.S., Spadaccino, F., Porta, C., Gesualdo, L., Stallone, G., Castellano, G., Ranieri, E., 2020. The use of immune checkpoint inhibitors in oncology and the occurrence of AKI: where do we stand? *Front Immunol.* 11, 574271.
- Gilyazova, I., Ivanova, E., Izmailov, A., Sharifgaliev, I., Karunas, A., Pudova, E., Kobelyatskaya, A., Gilyazova, G., Izmailova, A., Pavlov, V., Khusnutdinova, E., 2023. MicroRNA Expression signatures in clear cell renal cell carcinoma: high-throughput searching for key miRNA markers in patients from the volga-ural region of eurasian continent. *Int J. Mol. Sci.* 24 (8).
- Gossage, L., Murtaza, M., Slatter, A.F., Lichtenstein, C.P., Warren, A., Haynes, B., Marass, F., Roberts, I., Shanahan, S.J., Claas, A., Dunham, A., May, A.P., Rosenfeld, N., Forshew, T., Eisen, T., 2014. Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 53 (1), 38-51.
- Gu, L., Li, H., Wang, Z., Wang, B., Huang, Q., Lyu, X., Shen, D., Gao, Y., Fan, Y., Li, X., Xie, Y., Du, S., Liu, K., Tang, L., Peng, C., Ma, X., Zhang, X., 2018. A systematic review and meta-analysis of clinicopathologic factors linked to oncologic outcomes for renal cell carcinoma with tumor thrombus treated by radical nephrectomy with thrombectomy. *Cancer Treat. Rev.* 69, 112-120.
- Gu, L., Peng, C., Liang, Q., Huang, Q., Lv, D., Zhao, H., Zhang, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Li, S., Xu, J., Chen, L., Xie, Y., Li, J., Guo, G., Zhang, X., Wang, B., Ma, X., 2024. Neoadjuvant toripalimab plus axitinib for clear cell renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus: NEOTAX, a phase 2 study. *Signal Transduct. Target Ther.* 9 (1), 264.
- Hatakeyama, S., Yoneyama, T., Hamano, I., Murasawa, H., Narita, T., Oikawa, M., Hagiwara, K., Noro, D., Tanaka, T., Tanaka, Y., Hashimoto, Y., Koie, T., Ohyama, C., 2013. Prognostic benefit of surgical management in renal cell carcinoma patients with thrombus extending to the renal vein and inferior vena cava: 17-year experience at a single center. *BMC Urol.* 13, 47.
- Hong, S., Yuan, Q., Xia, H., Dou, Y., Sun, T., Xie, T., Zhang, Z., He, W., Dong, C., Lu, J., Guo, L., Ni, L., 2022. Establishment of an ex vivo tissue culture model for evaluation of antitumor efficacy in clear cell renal cell carcinoma. *Front Oncol.* 12, 851191.
- Hsu, M., Balzer-Haas, N., 2022. When clot is tumor: a roadmap to anticoagulation in renal cell carcinoma with tumor thrombus. *JACC CardioOncol* 4 (4), 532-534.
- Hu, W., Lee, S.M.L., Bazhin, A.V., Guba, M., Werner, J., Niess, H., 2023. Neutrophil extracellular traps facilitate cancer metastasis: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 149 (5), 2191-2210.
- Ilie, M., Long-Mira, E., Bence, C., Butori, C., Lassalle, S., Bouhuel, L., Fazzalari, L., Zahaf, K., Lalvee, S., Washetine, K., Mouroux, J., Venissac, N., Poudenx, M., Otto, J., Sabourin, J.C., Marquette, C.H., Hofman, V., Hofman, P., 2016. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann. Oncol.* 27 (1), 147-153.
- Ismail, A.A., Shaker, B.T., Bajou, K., 2021. The plasminogen-activator plasmin system in physiological and pathophysiological angiogenesis. *Int J. Mol. Sci.* 23 (1).
- Jia, Z., Tang, L., Liu, K., Guo, A., Huang, Q., Peng, C., Ding, X., Zhang, L., Liu, G., Yang, G., Wang, B., Li, H., Zhang, X., Ma, X., 2023. Venous tumor thrombus consistency: is it a prognostic factor of survival for patients with renal cell carcinoma? *Updates Surg.* 75 (7), 2033-2038.
- Jilaveanu, L.B., Shuch, B., Zito, C.R., Parisi, F., Barr, M., Kluger, Y., Chen, L., Kluger, H. M., 2014. PD-L1 expression in clear cell renal cell carcinoma: an analysis of nephrectomy and sites of metastases. *J. Cancer* 5 (3), 166-172.
- John, A., Gorzelanny, C., Bauer, A.T., Schneider, S.W., Bolenz, C., 2017. Role of the coagulation system in genitourinary cancers: review. *Clin. Genitourin. Cancer.*
- Johnston, R.J., Su, L.J., Pinckney, J., Critton, D., Boyer, E., Krishnakumar, A., Corbett, M., Rankin, A.L., Dibella, R., Campbell, L., Martin, G.H., Lemar, H., Cayton, T., Huang, R.Y., Deng, X., Nayeem, A., Chen, H., Ergel, B., Kizzo, J.M., Yanniuk, A.P., Dutta, S., Ngo, J., Shorts, A.O., Ramakrishnan, R., Kozhich, A., Holloway, J., Fang, H., Wang, Y.K., Yang, Z., Thiam, K., Rakestraw, G., Rajpal, A., Sheppard, P., Quigley, M., Bahjat, K.S., Korman, A.J., 2019. VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature* 574 (7779), 565-570.
- Kaushik, D., Ashcraft, K.A., Wang, H., Shanmugasundaram, K., Shah, P.K., Gonzalez, G., Nazarullah, A., Tye, C.B., Liss, M.A., Pruthi, D.K., Mansour, A.M., Chowdhury, W., Bacich, D., Zhang, H., Watson, A.L., Block, K., O'Keefe, D., Rodriguez, R., 2020. Nuclear NADPH oxidase-4 associated with disease progression in renal cell carcinoma. *Transl. Res* 223, 1-14.
- Kaushik, D., Linder, B.J., Thompson, R.H., Eisenberg, M.S., Lohse, C.M., Cheville, J.C., Leibovich, B.C., Boorjian, S.A., 2013. The impact of histology on clinicopathologic outcomes for patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus: a matched cohort analysis. *Urology* 82 (1), 136-141.
- Kawashima, A., Kanazawa, T., Kidani, Y., Yoshida, T., Hirata, M., Nishida, K., Nojima, S., Yamamoto, Y., Kato, T., Hatano, K., Ujiike, T., Nagahara, A., Fujita, K., Morimoto-Okazawa, A., Iwahori, K., Uemura, M., Imamura, R., Ohkura, N., Morii, E., Sakaguchi, S., Wada, H., Nonomura, N., 2020. Tumour grade significantly correlates with total dysfunction of tumour tissue-infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma. *Sci. Rep.* 10 (1), 6220.
- Khagi, Y., Kurzrock, R., Patel, S.P., 2017. Next generation predictive biomarkers for immune checkpoint inhibition. *Cancer Metastasis - Rev.* 36 (1), 179-190.
- Kim, K.H., You, D., Jeong, I.G., Kwon, T.W., Cho, Y.M., Hong, J.H., Ahn, H., Kim, C.S., 2012. Type II papillary histology predicts poor outcome in patients with renal cell carcinoma and vena cava thrombus. *BJU Int* 110 (11 Pt B), E673-E678.
- Kim, K., Zhou, Q., Christie, A., Stevens, C., Ma, Y., Onabolu, O., Chintalapati, S., McKenzie, T., Tcheuyap, V.T., Woolford, L., Zhang, H., Singla, N., Parida, P.K., Marquez-Palencia, M., Pedrosa, I., Margulis, V., Sagalowsky, A., Xie, Z., Wang, T., Durinck, S., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Kapur, P., Brugarolas, J., Malladi, S., 2021. Determinants of renal cell carcinoma invasion and metastatic competence. *Nat. Commun.* 12 (1), 5760.
- Klatte, T., Pantuck, A.J., Riggs, S.B., Kleid, M.D., Shuch, B., Zomorodian, N., Kabbani, F.F., Belldegrun, A.S., 2007. Prognostic factors for renal cell carcinoma with tumor thrombus extension. *J. Urol.* 178 (4 Pt 1), 1189-1195 discussion 1195.
- Kolodziejczyk, J., Ponczek, M.B., 2013. The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. *Conte Oncol. (Pozn.)* 17 (2), 113-119.
- Krebs, M., Solimando, A.G., Kalogirou, C., Marquardt, A., Frank, T., Sokolakis, I., Hatzichristodoulou, G., Kneitz, S., Bargou, R., Kubler, H., Schilling, B., Spahn, M., Kneitz, B., 2020. miR-221-3p regulates VEGFR2 expression in high-risk prostate cancer and represents an escape mechanism from sunitinib in vitro. *J. Clin. Med* 9 (3).
- Lakritz, S., Candelario, N., Nicklawsky, A., Kim, S., Kessler, E., 2024. Neoadjuvant pembrolizumab (PEMBRO) and axitinib (AXI) in renal cell carcinoma with associated inferior vena cava tumor thrombus (NEOPAX). *J. Clin. Oncol.* 42, 1.
- Lavacchi, D., Pellegrini, E., Palmieri, V.E., Doni, L., Mela, M.M., Di Maida, F., Amedei, A., Pillozzi, S., Carini, M., Antonuzzo, L., 2020. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of renal cancer: current state and future perspective. *Int J. Mol. Sci.* 21 (13).

- Lima, L.G., Monteiro, R.Q., 2013. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Biosci. Rep.* 33 (5).
- Liss, M.A., Chen, Y., Rodriguez, R., Pruthi, D., Johnson-Pais, T., Wang, H., Mansour, A., Kaushik, D., 2019. Immunogenic heterogeneity of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *Urology* 124, 168–173.
- Liss, M.A., Chen, Y., Rodriguez, R., Pruthi, D., Johnson-Pais, T., Wang, H., Mansour, A., White, J.R., Kaushik, D., 2020. Microbiome within primary tumor tissue from renal cell carcinoma may be associated with PD-L1 expression of the venous tumor thrombus. *Adv. Urol.* 2020, 9068068.
- Liu, B., Peng, X.C., Zheng, X.L., Wang, J., Qin, Y.W., 2009. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer* 66 (2), 169–175.
- Liu, N.W., Wren, J.D., Vertosick, E., Lee, J.K., Power, N.E., Benfante, N.E., Kimm, S.Y., Bains, M.S., Sjoberg, D.D., Russo, P., Coleman, J.A., 2016. The prognostic impact of a positive vascular margin on pT3 clear cell renal cell carcinoma. *J. Urol.* 195 (2), 264–269.
- Lopez, J.I., Pulido, R., Lawrie, C.H., Angulo, J.C., 2018. Loss of PD-L1 (SP-142) expression characterizes renal vein tumor thrombus microenvironment in clear cell renal cell carcinoma. *Ann. Diagn. Pathol.* 34, 89–93.
- Mackman, N., Taubman, M., 2009. Tissue factor: past, present, and future. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (12), 1986–1988.
- Mandhani, A., Patidar, N., Aga, P., Pande, S., Tewari, P., 2015. A new classification of inferior vena cava thrombus in renal cell carcinoma could define the need for cardiopulmonary or venovenous bypass. *Indian J. Urol.* 31 (4), 327–332.
- Marandino, L., Campi, R., Amparore, D., Tippu, Z., Albiges, L., Capitanio, U., Giles, R.H., Gillissen, S., Kutikov, A., Larkin, J., Motzer, R.J., Pierorazio, P.M., Powles, T., Roupret, M., Stewart, G.D., Turajlic, S., Bex, A., 2024. Neoadjuvant and adjuvant immune-based approach for renal cell carcinoma: pros, cons, and future directions. *Eur. Urol. Oncol.*
- Martini, A., Fallara, G., Pellegrino, F., Cirulli, G.O., Larcher, A., Necchi, A., Montorsi, F., Capitanio, U., 2021. Neoadjuvant and adjuvant immunotherapy in renal cell carcinoma. *World J. Urol.* 39 (5), 1369–1376.
- Master, V.A., Schmeusser, B.N., Osunkoya, A.O., Palacios, A.R., Midenberg, E., Yantorni, L., Ogan, K., Bilien, M.A., 2023. Neoadjuvant nivolumab and ipilimumab for nonmetastatic renal cell carcinoma with tumor thrombus. *J. Immunother. Precis. Oncol.* 6 (1), 50–55.
- Mastoraki, A., Mastoraki, S., Tsikalas-Vafea, M., Papanikolaou, I.S., Lazaris, A., Smyrniotis, V., Arkadopoulos, N., 2017. Prognostic benefit of surgical management of renal cell carcinoma invading the inferior vena cava. *Indian J. Surg. Oncol.* 8 (1), 14–18.
- Mikami, S., Mizuno, R., Kondo, T., Shinohara, N., Nonomura, N., Ozono, S., Eto, M., Tatsugami, K., Takayama, T., Matsuyama, H., Kishida, T., Oya, M., 2019. C. Japanese Society of Renal, Clinical significance of programmed death-1 and programmed death-ligand 1 expression in the tumor microenvironment of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 110 (6), 1820–1828.
- Morgantetti, G., Ng, K.L., Samarantunga, H., Rhee, H., Gobe, G.C., Wood, S.T., 2019. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in vena cava tumour thrombi of clear cell renal cell carcinoma suggests a role for PSMA-driven tumour neoangiogenesis. *Transl. Androl. Urol.* 8 (2), S147–S155.
- Motzer, R.J., Banchereau, R., Hamidi, H., Powles, T., McDermott, D., Atkins, M.B., Escudier, B., Liu, L.F., Leng, N., Abbas, A.R., Fan, J., Koeppen, H., Lin, J., Carroll, S., Hashimoto, K., Mariathasan, S., Green, M., Tayama, D., Hegde, P.S., Schiff, C., Huseni, M.A., Rini, B., 2020. Molecular subsets in renal cancer determine outcome to checkpoint and angiogenesis blockade. *Cancer Cell* 38 (6), 803–817 e4.
- N. Cancer Genome Atlas Research, 2013. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499 (7456), 43–49.
- Nakazawa, D., Desai, J., Steiger, S., Muller, S., Devarapu, S.K., Mulay, S.R., Iwakura, T., Anders, H.J., 2018. Activated platelets induce MLKL-driven neutrophil necroptosis and release of neutrophil extracellular traps in venous thrombosis. *Cell Death Discov.* 4, 6.
- Neves, R.J., Zincke, H., 1987. Surgical treatment of renal cancer with vena cava extension. *Br. J. Urol.* 59 (5), 390–395.
- Niu, S., Liu, K., Xu, Y., Peng, C., Yu, Y., Huang, Q., Wu, S., Cui, B., Huang, Y., Ma, X., Zhang, X., Wang, B., 2021. Genomic landscape of chinese clear cell renal cell carcinoma patients with venous tumor thrombus identifies chromosome 9 and 14 deletions and related immunosuppressive microenvironment. *Front Oncol.* 11, 646338.
- Okamura, Y., Terakawa, T., Sakamoto, M., Bando, Y., Suzuki, K., Hara, T., Furukawa, J., Harada, K., Hinata, N., Nakano, Y., Fujisawa, M., 2019. Presurgical pazopanib improves surgical outcomes for renal cell carcinoma with high-level IVC tumor thrombosis. *Vivo* 33 (6), 2013–2019.
- Peksa, R., Sharma, S., Kunc, M., Popeda, M., Qu, L., Frankiewicz, M., Folwarski, M., Radziszewski, P., Zapala, 2024. P-selectin glycoprotein ligand-1 is diversely expressed in the primary tumour and venous thrombus of clear cell renal cancer and correlates with poor overall survival. *Conte Oncol.* 28 (3), 253–259.
- Peng, C., Gu, L., Wang, L., Huang, Q., Wang, B., Guo, G., Fan, Y., Gao, Y., Ma, X., Zhang, X., 2018. Role of pre-diagnostic targeted molecular therapy in renal cell carcinoma with an inferior vena cava tumor thrombus. *Oncotargets Ther.* 11, 1997–2005.
- Peyton, C.C., Abel, E.J., Chipollini, J., Boulware, D.C., Azizi, M., Karam, J.A., Margulis, V., Master, V.A., Matin, S.F., Raman, J.D., Sexton, W.J., Wood, C.G., Spiess, P.E., 2020. The value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients undergoing cytoreductive nephrectomy with thrombectomy. *Eur. Urol. Focus* 6 (1), 104–111.
- Piva, F., Santoni, M., Matrana, M.R., Satti, S., Giulietti, M., Occhipinti, G., Massari, F., Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Principato, G., Cascinu, S., Montironi, R., 2015. BAP1, PBRM1 and SETD2 in clear-cell renal cell carcinoma: molecular diagnostics and possible targets for personalized therapies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15 (9), 1201–1210.
- Powles, T., Albiges, L., Bex, A., Grunwald, V., Porta, C., Procopio, G., Schmidinger, M., Suarez, C., de Velasco, G., 2021. E.G.C.E.a. clinicalguidelines@esmo.org, ESMO Clinical Practice Guideline update on the use of immunotherapy in early stage and advanced renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 32 (12), 1511–1519.
- Powles, T., Albiges, L., Stahler, M., Bensalah, K., Dabestani, S., Giles, R.H., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M.A., Lam, T.B., Marconi, L., Merseburger, A.S., Fernandez-Pello, S., Tahbaz, R., Volpe, A., Ljungberg, B., Bex, A., 2018. Updated European association of urology guidelines: recommendations for the treatment of first-line metastatic clear cell renal cancer. *Eur. Urol.* 73 (3), 311–315.
- Qin, S., Xu, L., Yi, M., Yu, S., Wu, K., Luo, S., 2019. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol. Cancer* 18 (1), 155.
- Qiu, Y., Liao, Y., Zhang, J., Ye, Y., Zhang, Z., Jiang, Z., Zhang, J., Xin, J., Lv, S., Peng, H., 2024b. Exploring the role of coagulation-related genes in renal cell carcinoma: Implications for tumor microenvironment and prognostic biomarkers. *Comput. Biol. Chem.* 110, 108082.
- Qiu, Y., Liu, L., Jiang, W., Xu, Z., Wang, J., Dai, S., Guo, J., Xu, J., 2024a. NKG2A(+)-CD8(+) T cells infiltration determines immunosuppressive contexture and inferior response to immunotherapy in clear cell renal cell carcinoma. *J. Immunother. Cancer* 12 (1).
- Qu, L., Chen, H., Chen, Q., Ge, S., Jiang, A., Yu, N., Zhou, Y., Kunc, M., Zhou, Y., Feng, X., Zhai, W., Wu, Z., He, M., Li, Y., Chen, R., Han, B., Zeng, X., Fu, Y., Ji, C., Fan, X., Zhang, G., Zhao, C., Jing, T., Feng, C., Zhao, H., Sun, D., Wang, L., Tai, S., Zhang, C., Chen, S., Liu, Y., Wang, H., Gao, J., Gu, Y., Miao, H., Zhao, T., Yi, X., Tang, C., Fu, D., He, H., Rao, Q., Zhou, W., Xu, N., Wang, G., Liang, C., Liu, Z., Xia, D., Zu, X., Chen, M., Guo, H., Qin, W., Wang, Z., Xue, W., Shi, B., Wang, S., Zheng, J., Chen, C., Zapala, L., Ge, J., Wang, L., 2023. Development and validation of a prognostic model incorporating tumor thrombus grading for nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus: a multicohort study. *MedComm* (2020) 4 (4), e300.
- Rabinowitz, M.J., Esfandiary, T., Cheaib, J., Patel, S.H., Alam, R., Metcalf, M., Enikeev, D., Pierorazio, P.M., Ged, Y.M.A., Allaf, M.E., Singla, N., 2022. Characterizing tumor thrombus arising from non-clear cell renal cell carcinoma. *Eur. Urol. Open Sci.* 43, 28–34.
- Rodriguez Faba, O., Linares, E., Tilki, D., Capitanio, U., Evans, C.P., Montorsi, F., Martinez-Salamanca, J.I., Libertino, J., Gontero, P., Palou, J., 2018. Impact of microscopic wall invasion of the renal vein or inferior vena cava on cancer-specific survival in patients with renal cell carcinoma and tumor thrombus: a multi-institutional analysis from the international renal cell carcinoma-venous thrombus consortium. *Eur. Urol. Focus* 4 (3), 435–441.
- Schwachtgen, J.L., Houston, P., Campbell, C., Sukhatme, V., Braddock, M., 1998. Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Clin. Invest.* 101 (11), 2540–2549.
- Shang, B., Guo, L., Shen, R., Cao, C., Xie, R., Jiang, W., Wen, L., Bi, X., Shi, H., Zheng, S., Li, C., Ma, J., Zhang, K., Feng, L., Shou, J., 2021. Prognostic significance of NLR above NETosis and lymphocytes perturbations in localized renal cell carcinoma with tumor thrombus. *Front Oncol.* 11, 771545.
- Shapiro, R.L., Duquette, J.G., Roses, D.F., Nunes, I., Harris, M.N., Kamino, H., Wilson, E. L., Rifkin, D.B., 1996. Induction of primary cutaneous melanocytic neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild-type mice: cellular blue nevi invade but do not progress to malignant melanoma in uPA-deficient animals. *Cancer Res* 56 (15), 3597–3604.
- Shi, X., Pang, Q., Nian, X., Jiang, A., Shi, H., Liu, W., Gan, X., Gao, Y., Yang, Y., Ji, J., Tan, X., Xiao, C., Zhang, W., 2023. Integrative transcriptome and proteome analyses of clear cell renal cell carcinoma develop a prognostic classifier associated with thrombus. *Sci. Rep.* 13 (1), 9778.
- Shi, Y., Zhang, Q., Bi, H., Lu, M., Tan, Y., Zou, D., Ge, L., Chen, Z., Liu, C., Ci, W., Ma, L., 2022. Decoding the multicellular ecosystem of vena caval tumor thrombus in clear cell renal cell carcinoma by single-cell RNA sequencing. *Genome Biol.* 23 (1), 87.
- Silva, D.D., Noronha, J.A.P., da Costa, B.E.P., Zandonata, P.C.E., Carvalho, G.F., 2018. Serum tissue factor as a biomarker for renal clear cell carcinoma. *Int Braz. J. Urol.* 44 (1), 38–44.
- Silva, D.D., Noronha, J.A., Silva, V.D., Carvalho, G.F., 2014. Increased tissue factor expression is an independent predictor of mortality in clear cell carcinoma of the kidney. *Int Braz. J. Urol.* 40 (4), 499–506.
- Tabbara, M.M., Gonzalez, J., Martucci, M., Ciancio, G., 2023. Current approaches in surgical and immunotherapy-based management of renal cell carcinoma with tumor thrombus. *Biomedicines* 11 (1).
- Thompson, R.H., Zang, X., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Slovin, S.F., Reuter, V.E., Chevillet, J.C., Blute, M.L., Russo, P., Kwon, E.D., Allison, J.P., 2008. Serum-soluble B7x is elevated in renal cell carcinoma patients and is associated with advanced stage. *Cancer Res* 68 (15), 6054–6058.
- Tumkur Sitaram, R., Landstrom, M., Roos, G., Ljungberg, B., 2021. Significance of PI3K signalling pathway in clear cell renal cell carcinoma in relation to VHL and HIF status. *J. Clin. Pathol.* 74 (4), 216–222.
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Chambers, T., Lopez, J.I., Nicol, D., O'Brien, T., Larkin, J., Horswell, S., Stares, M., Au, L., Jamal-Hanjani, M., Challaoune, B., Chandra, A., Hazell, S., Eichler-Jonsson, C., Soultati, A., Chowdhury, S., Rudman, S., Lynch, J., Fernando, A., Stamp, G., Nye, E., Jabbar, F., Spain, L., Lall, S., Guarch, R., Falzon, M., Proctor, I., Pickering, L., Gore, M., Watkins, T.B.K., Ward, S., Stewart, A., DiNatale, R., Becerra, M.F., Reznik, E., Hsieh, J.J., Richmond, T.A., Mayhew, G.F., Hill, S.M., McNally, C.D., Jones, C., Rosenbaum, H., Stanislaw, S., Burgess, D.L., Alexander, N.R., Swanton, C., 2018.

- Peace, T.R.R. Consortium, tracking cancer evolution reveals constrained routes to metastases: TRACERx Renal. *Cell* 173 (3), 581–594 e12.
- Vergho, D.C., Kneitz, S., Kalogirou, C., Burger, M., Krebs, M., Rosenwald, A., Spahn, M., Loser, A., Kocot, A., Riedmiller, H., Kneitz, B., 2014. Impact of miR-21, miR-126 and miR-221 as prognostic factors of clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus of the inferior vena cava. *PLoS One* 9 (10), e109877.
- Vuong, L., Kotecha, R.R., Voss, M.H., Hakimi, A.A., 2019. Tumor microenvironment dynamics in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Discov.* 9 (10), 1349–1357.
- Wang, X., He, Q., Shen, H., Xia, A., Tian, W., Yu, W., Sun, B., 2019. TOX promotes the exhaustion of antitumor CD8(+) T cells by preventing PDI degradation in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 71 (4), 731–741.
- Wang, F., Li, Z., Feng, X., Yang, D., Lin, M., 2022. Advances in PSMA-targeted therapy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 25 (1), 11–26.
- Wang, T., Lu, R., Kapur, P., Jaiswal, B.S., Hannan, R., Zhang, Z., Pedrosa, I., Luke, J.J., Zhang, H., Goldstein, L.D., Yousuf, Q., Gu, Y.F., McKenzie, T., Joyce, A., Kim, M.S., Wang, X., Luo, D., Onabolu, O., Stevens, C., Xie, Z., Chen, M., Filatenkov, A., Torrealba, J., Luo, X., Guo, W., He, J., Stawiski, E., Modrusan, Z., Durinck, S., Seshagiri, S., Brugarolas, J., 2018. An empirical approach leveraging tumorgrafts to dissect the tumor microenvironment in renal cell carcinoma identifies missing link to prognostic inflammatory factors. *Cancer Discov.* 8 (9), 1142–1155.
- Wang, H.L., Wang, S.S., Song, W.H., Pan, Y., Yu, H.P., Si, T.G., Liu, Y., Cui, X.N., Guo, Z., 2015. Expression of prostate-specific membrane antigen in lung cancer cells and tumor neovasculature endothelial cells and its clinical significance. *PLoS One* 10 (5), e0125924.
- Ward, M.P., E.K. L., A.N. L., Mohamed, B.M., Kelly, T., Bates, M., Clarke, A., Brady, N., Martin, C.M., Brooks, R.D., Brooks, D.A., Selemidis, S., Hanniffy, S., Dixon, E.P., A.O. T. S., J.O.L. J., 2021. Platelets, immune cells and the coagulation cascade: friend or foe of the circulating tumour cell? *Mol. Cancer* 20 (1), 59.
- Warsow, G., Hubschmann, D., Kleinheinz, K., Nientiedt, C., Heller, M., Van Coile, L., Tolstov, Y., Trennheuser, L., Wiecek, K., Pecqueux, C., Gasch, C., Kuru, T., Nyarangi-Dix, J., Hatiboglu, G., Teber, D., Perner, S., Stenzinger, A., Roth, W., Hadaschik, B., Pahernik, S., Jager, D., Grulich, C., Duensing, A., Eils, R., Schlesner, M., Sultmann, H., Hohenfellner, M., Duensing, S., 2018. Genomic features of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *Sci. Rep.* 8 (1), 7477.
- Wilcox, I., Chan, K.H., Lattimore, J.D., 2011. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* 364 (20), 1976–1977 author reply 1977.
- Wu, Z., Chen, H., Chen, Q., Ge, S., Yu, N., Campi, R., Gomez Rivas, J., Autorino, R., Roupert, M., Psutka, S.P., Mehrazin, R., Porpiglia, F., Bensalah, K., Black, P.C., Mir, M.C., Minervini, A., Djaladat, H., Margulis, V., Bertolo, R., Calio, A., Carbonara, U., Amparore, D., Borregales, L.D., Ciccarese, C., Diana, P., Erdem, S., Marandino, L., Marchioni, M., Muselaers, C.H.J., Palumbo, C., Pavan, N., Pecoraro, A., Roussel, E., Warren, H., Pandolfo, S.D., Chen, R., Zhou, W., Zhai, W., He, M., Li, Y., Han, B., Wan, J., Zeng, X., Yan, J., Fu, Y., Ji, C., Fan, X., Zhang, G., Zhao, C., Jing, T., Wang, A., Feng, C., Zhao, H., Sun, D., Wang, L., Tai, S., Zhang, C., Chen, S., Liu, Y., Xu, Z., Wang, H., Gao, J., Wang, F., Cheng, J., Miao, H., Rao, Q., Wang, J., Xu, N., Wang, G., Liang, C., Liu, Z., Xia, D., Jiang, J., Zu, X., Chen, M., Guo, H., Qin, W., Wang, Z., Xue, W., Shi, B., Zhou, X., Wang, S., Zheng, J., Ge, J., Feng, X., Li, M., Chen, C., Qu, L., Wang, L., Consortium, R., 2024. G. the European Association of Urology Young Academic Urologists Renal Cancer Working. Prognostic significance of grade discrepancy between primary tumor and venous thrombus in nonmetastatic clear-cell renal cell carcinoma: analysis of the remember registry and implications for adjuvant therapy. *Eur. Urol. Oncol.* 7 (1), 112–121.
- Wu, Z., Wu, Y., Liu, Z., Song, Y., Ge, L., Du, T., Liu, Y., Liu, L., Liu, C., Ma, L., 2023. L1CAM deployed perivascular tumor niche promotes vessel wall invasion of tumor thrombus and metastasis of renal cell carcinoma. *Cell Death Discov.* 9 (1), 112.
- Yan, M., Lesyk, G., Radziwon-Balicka, A., Jurasz, P., 2014. Pharmacological regulation of platelet factors that influence tumor angiogenesis. *Semin Oncol.* 41 (3), 370–377.
- Yan, X.Q., Ye, M.J., Zou, Q., Chen, P., He, Z.S., Wu, B., He, D.L., He, C.H., Xue, X.Y., Ji, Z. G., Chen, H., Zhang, S., Liu, Y.P., Zhang, X.D., Fu, C., Xu, D.F., Qiu, M.X., Lv, J.J., Huang, J., Ren, X.B., Cheng, Y., Qin, W.J., Zhang, X., Zhou, F.J., Ma, L.L., Guo, J.M., Ding, D.G., Wei, S.Z., He, Y., Guo, H.Q., Shi, B.K., Liu, L., Liu, F., Hu, Z.Q., Jin, X.M., Yang, L., Zhu, S.X., Liu, J.H., Huang, Y.H., Xu, T., Liu, B., Sun, T., Wang, Z.J., Jiang, H.W., Yu, D.X., Zhou, A.P., Jiang, J., Luan, G.D., Jin, C.L., Xu, J., Hu, J.X., Huang, Y.R., Guo, J., Zhai, W., Sheng, X.N., 2024. Toripalimab plus axitinib versus sunitinib as first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: RENOTORCH, a randomized, open-label, phase III study. *Ann. Oncol.* 35 (2), 190–199.
- Yang, L., Liu, J., Li, S., Liu, X., Zheng, F., Xu, S., Fu, B., Xiong, J., 2023. Based on disulfidptosis, revealing the prognostic and immunological characteristics of renal cell carcinoma with tumor thrombus of vena cava and identifying potential therapeutic target AJAP1. *J. Cancer Res Clin. Oncol.* 149 (12), 9787–9804.
- Yang, B., Xia, H., Xu, C., Lu, M., Zhang, S., Wang, G., Ma, L., 2020. Impact of sarcomatoid differentiation and rhabdoid differentiation on prognosis for renal cell carcinoma with vena caval tumour thrombus treated surgically. *BMC Urol.* 20 (1), 14.
- Zak, K.M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Domling, A., Dubin, G., Holak, T.A., 2015. Structure of the complex of human programmed death 1, PD-1, and its ligand PD-L1. *Structure* 23 (12), 2341–2348.
- Zapala, L., Kunc, M., Sharma, S., Biernat, W., Radziszewski, P., 2021. Low lymphocyte-to-monocyte ratio is the potential indicator of worse overall survival in patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus. *Diagn. (Basel)* 11 (11).
- Zapala, L., Kunc, M., Sharma, S., Peksa, R., Popeda, M., Biernat, W., Radziszewski, P., 2022. Evaluation of PD-L1 (E1L3N, 22C3) expression in venous tumor thrombus is superior to its assessment in renal tumor in predicting overall survival in renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* 40 (5), 200 e1–200 e10.
- Zapala, L., Kunc, M., Sharma, S., Peksa, R., Popeda, M., Biernat, W., Radziszewski, P., 2023. Immune checkpoint receptor VISTA on immune cells is associated with expression of T-cell exhaustion marker TOX and worse prognosis in renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *J. Cancer Res Clin. Oncol.* 149 (7), 4131–4139.
- Zhang, Y., Bi, H., Yan, Y., Liu, Z., Wang, G., Song, Y., Zhang, S., Liu, C., Ma, L., 2023b. Comparative analysis of surgical and oncologic outcomes of robotic, laparoscopic and open radical nephrectomy with venous thrombectomy: a propensity-matched cohort study. *Int. J. Clin. Oncol.* 28 (1), 145–154.
- Zhang, X., Guo, X., Zong, Y., Xu, C., Wang, J., Zhang, B., Liu, C., Gong, Y., Xue, L., Ma, L., Zhang, S., Li, Y., Zeng, H., 2021. CTCs detection from intraoperative salvaged blood in RCC-IVC thrombus patients by negative enrichment and iFISH identification: a preliminary study. *BMC Urol.* 21 (1), 89.
- Zhang, Y., Lu, M., L.L. Ma, 2024. MP10-03 analyses of tumor microenvironment changes of clear cell renal cell carcinoma with inferior vena cava thrombus following neoadjuvant anti-PD-1 and tyrosine kinase inhibitor combination therapy. *J. Urol.*
- Zhang, M., Wang, Y., Yu, L., Zhang, Y., Wang, Y., Shang, Z., Xin, Y., Li, X., Ning, N., Zhang, Y., Zhang, X., 2023a. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer metastasis by excretion of miR-122-5p from cells via exosomes. *iScience* 26 (9), 107686.
- Zhou, J., Song, Y., Xing, T., Ge, L., Ma, L., Lu, M., Zhong, L., 2021. Proteomic analysis reveals distinctive protein expression patterns of thrombus in clear cell renal cell carcinoma. *Transl. Oncol.* 14 (1), 100895.
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., Mo, Y.Y., 2008. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 18 (3), 350–359.
- Zini, L., Destrieux-Garnier, L., Leroy, X., Villers, A., Haulon, S., Lemaitre, L., Koussa, M., 2008. Renal vein ostium wall invasion of renal cell carcinoma with an inferior vena cava tumor thrombus: prediction by renal and vena caval vein diameters and prognostic significance. *J. Urol.* 179 (2), 450–454 discussion 454.

**Sumit Sharma, M.D., Ph.D.** candidate, urologist with the experience in clinical and laboratory projects with a high number of publication aimed at renal cell carcinoma. The main ongoing research projects are specifically focused on the cases with venous tumor thrombus.

**Michał Kunc, M.D., Ph.D.**, is a doctor and researcher experienced in surgical pathology. The main research projects focus on the tumor microenvironment and novel prognostic biomarkers.

**Mieszko Czapliński, M.D.** student at the Medical University of Gdańsk. The main research interests include pathophysiology and applications of AI-powered solutions in pathological diagnostics.

**Weronika Łyzynska, M.D.** student at the Medical University of Gdańsk. The main research projects involve pathology and pediatric oncology

**Rafał Pęksa, M.D., Ph.D., D.Sc.**, is a Senior Consultant at the Department of Pathomorphology, Medical University of Gdańsk, Poland. A distinguished researcher with numerous peer-reviewed publications, he has established himself through significant national and international collaborations, including notable projects with the National Cancer Institute in Bethesda, USA. His current research focuses on immune checkpoint protein expression in solid tumors, with particular emphasis on gastrointestinal, genitourinary, and head and neck cancers. Dr. Pęksa's work contributes valuable insights to the evolving field of tumor immunology and has implications for the development of targeted cancer therapies

**Le Qu, Prof., M.D., Ph.D.**, after receiving his Bachelor's, Master's and Doctor's degrees in Naval Medical University, Prof. Qu obtained membership of Chinese Urology Association (CUA), membership of Jiangsu Anti-cancer Association-Genitourinary Cancer Committee (JSACA-GU), and editorships of International Journal of Urology and Clinical Genitourinary Cancer. He was awarded the Changjiang Young Scholar of China's Ministry of Education and the Outstanding Youth Fund of Jiangsu Province for his consistent and prominent works.

**Piotr Radziszewski, Prof., M.D., Ph.D., FEBU**, is a Chair at Medical University of Warsaw and distinguished urologist and professor of medical sciences. He is specialized in reconstructive, oncologic and functional urology. Throughout his career, he has been actively involved in various international organizations, including serving as a board member of the European Association of Urology's Section of Female and Functional Urology since 2004 and participating in the International Continence Society's committees on education and neuro-urology. He has also contributed to the development of urological guidelines and research initiatives. Prof. Radziszewski is a prolific author, with over 250 scientific articles and several chapters in national and international textbooks. He serves as a reviewer and editorial board member for numerous journals, such as European Urology, Urologia Internationalis, and the Central European Journal of Urology. In recognition of his contributions to medical science and education, he was awarded an honorary doctorate from the Carol Davila University of Medicine and Pharmacy in Bucharest on June 3, 2016. Additionally, he has been honored with the Gold Cross of Merit in 2011 and the Knight's Cross of the Order of Polonia Restituta in 2024.

**Łukasz Zapala, M.D., Ph.D., D.Sc., FEBU**, is the Vice Chief of the Department of General, Oncological, and Functional Urology at the Medical University of Warsaw. He has been a team member in international projects focused on urologic oncology, which has successfully resulted in well-recognized publications. He continues this broad collaboration, with his main research interests centered on renal, bladder, and prostate cancer.

**Introduction:** In clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), intravascular extension often results in neoplastic thrombus formation, impacting patient outcomes.

**Material and methods:** We assessed P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) expression in the primary tumours and thrombi of 82 ccRCC patients.

**Results:** Notably, PSGL-1 expression varied between tumour compartments, with higher prevalence in thrombus tumour cells (TC) and primary tumour-associated immune cells (TAIC). Positive TC PSGL-1 correlated with high-grade histology, while TAIC PSGL-1 was associated with tumour necrosis. Univariate survival analysis identified PSGL-1 positivity in TC of primary tumours and TAIC in thrombi as indicators of poorer overall survival. These findings suggest a potential role for PSGL-1 in the mediation of tumour thrombus formation, highlighting its relevance in biology of ccRCC.

**Conclusions:** The increased expression of PSGL-1 in venous thrombi suggests its potential role in facilitating TC interactions with platelets and endothelium, potentially contributing to metastatic spread and worse outcomes. Understanding these expression patterns may aid in the development of novel therapeutic strategies and personalised treatment approaches for ccRCC patients.

**Key words:** renal cell cancer, tumour thrombus, P-selectin glycoprotein ligand-1, biomarker.

Contemp Oncol (Pozn) 2024; 28 (3): 253–259  
DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2024.144225>

## P-selectin glycoprotein ligand-1 is diversely expressed in the primary tumour and venous thrombus of clear cell renal cancer and correlates with poor overall survival

Rafał Pęksa<sup>1\*</sup>, Sumit Sharma<sup>2\*</sup>, Michał Kunc<sup>1</sup>, Marta Popęda<sup>1</sup>, Le Qu<sup>3,4</sup>, Mikołaj Frankiewicz<sup>5</sup>, Marcin Folwarski<sup>6,7</sup>, Piotr Radziszewski<sup>2</sup>, Łukasz Zapata<sup>2</sup>

\* These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Department of Pathomorphology, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>2</sup>Clinic of General, Oncological and Functional Urology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>3</sup>Department of Urology Jinling Hospital Affiliated Hospital of Medical School Nanjing University, Nanjing Jiangsu, China

<sup>4</sup>Department of Urology Jinling Hospital Jinling School of Clinical Medicine Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu, China

<sup>5</sup>Department of Urology, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>6</sup>Department of Clinical Nutrition and Dietetics, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>7</sup>Home Enteral and Parenteral Nutrition Unit, General Surgery Department, Nicolaus Copernicus Hospital, Gdańsk, Poland

### Introduction

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) exhibits a tendency for intravascular growth, and it occasionally presents with neoplastic thrombus expanding into the renal vein or even further to vena cava [1]. This phenomenon correlates with a higher risk of metastatic spread and inferior overall survival (OS), but multiple additional factors influence the final outcomes in this clinical scenario [2]. The risk stratification is crucial to personalise the pre- and/or post-surgical management of these patients [3]. Recent advances in the treatment of renal cancer have initiated changes in the landscape of the available modalities [4]. As novel immunotherapy has already proven its place in this setting, there is a growing need for biomarkers to be implemented in the phase of patients' qualification for systemic treatment or monitoring during follow-up [5]. Interestingly, the primary tumour and its thrombus may display distinct biological features and microenvironments. A recent multicentre study showed that novel immune markers (PD-L1, VISTA, TOX) expressed by tumour cells (TC) and tumour-associated immune cells (TAIC) in the primary renal tumour mass and venous thrombus are associated with OS [6, 7]. Moreover, their expression correlates with markers of systemic inflammation derived from complete blood count, which are potentially useful prognostic factors in RCC with venous thrombus. VISTA [6] represents the next generation of immune checkpoints inhibitors [8]. Interestingly, up-regulation of VISTA on cancer cells may be attributed to the immunotherapy used, being the sign of immune escape mechanism [9]. The abundance of VISTA-positive TAIC in venous tumour thrombus corresponds with poorer survival in ccRCC [6].

VISTA is thought to be an acidic pH-selective target for P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) [10]. P-selectin glycoprotein ligand-1 major function is based on the regulative functions of leukocyte trafficking and adhesive features of the endothelium [11]. As a promising candidate for

becoming a future biomarker, PSGL-1 is commonly expressed by myeloid cells and activated lymphocytes T, and, occasionally, TC [12]. Hence, we hypothesised that its expression may differ within various compartments, i.e. the primary tumour and tumour thrombus, and may be of prognostic significance. In the current study, we investigated the clinicopathological correlates and prognostic value of PSGL-1 in ccRCC with venous tumour thrombus.

## Material and methods

### Patient cohort

Eighty-two patients with primary ccRCC and venous tumour thrombus treated surgically upfront with nephrectomy with/without cavotomy and subsequent thrombectomy in the years 2012–2019 in 2 tertiary urological departments were enrolled. No additional treatment was managed prior to the definite surgery. Surgical procedures were performed in a standardised manner through laparotomy. We collected the following data from patients: age, gender, tumour stage based on computed tomography or magnetic resonance imaging scans of thorax, abdomen, and pelvis according to 2017 TNM (tumour-node-metastasis) classification system (AJCC version) [13], preoperative haematological data (number of neutrophils, platelets, lymphocytes, monocytes together with respective ratios: neutrophil to lymphocyte ratio, lymphocyte to monocyte ratio, platelet to lymphocyte ratio) retrieved from local certified laboratories (FACS, Sysmex XM200, Sysmex Poland, Poland), the results of pathological examination, as well as the last follow-up and survival outcomes from local institutional databases. Telemedicine visits were established if necessary to incorporate any missing data.

The study was performed under local Ethics Committee approval AKBE/72/2021 of the Medical University of Warsaw. Informed consent was collected from all the patients involved in the study.

### Tissue microarrays and immunohistochemistry

Haematoxylin and eosin-stained ccRCC specimens from the renal tumour mass and venous tumour thrombus were reviewed by 2 pathologists (R.P. and M.K.). All cases were examined for the presence of TAIC, i.e. tumoral/peritumoral lymphocytes and macrophages. Representative areas containing cancer cells and TAIC were selected. Tissue microarrays (TMA), containing representative samples of the primary tumour mass and venous thrombus of 82 ccRCC cases, were created using 1.5 mm needles, with 3 cores sampled from both the venous thrombus (2 peripheral, one central) and the renal tumour. Smaller thrombi had fewer cores. Control samples from tonsil, placenta, and liver were included. Tissue microarrays were sliced into 5  $\mu$ m sections for immunohistochemistry [6, 7]. Subsequently, obtained TMA were stained with anti-PSGL-1 antibody (clone KPL-1, mouse monoclonal, dilution 1 : 200, Sigma Aldrich), anti-VISTA (clone D5L5T, dilution 1 : 300, Cell Signaling), and/or anti-PD-L1 antibody – 22c3 mouse monoclonal, dilution 1:50 (DAKO, Agilent, CA, USA). PSGL-1 expression was assessed separately in TC and TAIC in both tumour compartments. Cores containing tonsil

and placenta tissue served as positive controls, whereas liver samples served as negative controls [14]. The membranous and cytoplasmic reaction were considered positive, and the percentage of positive cells of each type was scored by 2 pathologists with experience in uropathology (RP and MK). The differences in scoring between the 2 pathologists were noted, and the final consensus scores were obtained after discussion.

### Statistics

Statistical analyses were performed using the Statistica 13.3 (TIBCO, Palo Alto, CA, USA; licensed to the Medical University of Gdańsk) and R statistical environment [15]. Associations between categorical variables were assessed with the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test when applicable. Continuous variables were analysed using the Wilcoxon test, Kruskal-Wallis test, or Spearman correlation, as appropriate. Kaplan-Meier curves were plotted using the "survminer" package and compared with the log-rank test [16]. Hazard ratios were calculated with the Cox proportional hazard regression. All tests were considered statistically significant as  $p \leq 0.05$ .

## Results

### Basic characteristics of the studied cohort

Four cases were excluded from the analysis due to the loss of cores in TMA, leaving 78 cases for further analysis. In this group median follow-up was 29 months (Table 1). The 2-year OS during follow-up reached 74.6%. The summary of the cohort is presented in Table 1.

### The expression of P-selectin glycoprotein ligand-1 on tumour cells and tumour-associated immune cells in different compartments

Representative examples of PSGL-1 staining in primary RCC and venous tumor thrombus were presented in Figure 1. In primary tumors, PSGL-1 was expressed on TC and TAIC in 29 (37.2%) and 61 (78.2%) cases, respectively. In venous thrombus, any expression of PSGL-1 was observed on TC and TAIC in 46 (59%) and 38 (48.7%) cases, respectively (Fig. 2, Table 2). Expression of PSGL-1 on TC was significantly more common in venous thrombus ( $p < 0.0001$ ). On the other hand, the percentage of PSGL-1 expressing TAIC was significantly higher in the primary tumour ( $p < 0.0001$ ) (Table 2).

### The association between P-selectin glycoprotein ligand-1 expression and clinicopathological variables

Several positive correlations were noted between PSGL-1 expression in different compartments/cells and clinicopathological findings (Table 3). Cancers expressing PSGL-1 on TC in tumour thrombus more commonly demonstrated, among others, high-grade histology ( $p = 0.017$ ), whereas expression on TAIC correlated with the presence of necrosis ( $p = 0.014$ ). Recently, we focused on the expression of VISTA in TC and TAIC in RCC with tumour thrombus [6]. Because no expression of VISTA was found in TC, we con-

tinued analysis in TAIC and found positive correlation with the presence of VISTA and PSGL-1 on TAIC (Fig. 3).

**Survival analysis**

Patients with PSGL-1-positive TAIC in venous thrombus (Fig. 4 A) and PSGL-1-positive TC in the primary tumour (Fig. 4 B) had significantly shorter OS (respectively, HR 2.27, 95% CI: 1.06–4.84,  $p = 0.032$ , and HR 3.42, 95% CI: 1.45–8.05,  $p = 0.004$ , univariate Cox) (Table 4). Conversely, PSGL-1 expression on TC in thrombus and on TAIC in primary tumours had no significant impact on the oncological outcomes (univariate Cox) (Table 4). To further explore the prognostic impact of PSGL-1, we performed multivariate Cox regression analysis (Table 5), but PSGL-1 did not retain its prognostic value in the model controlled by nodal status, distant metastases, grade, and necrosis.

**Discussion**

In this study, we explored the expression of PSGL-1 in primary tumours and venous thrombi of ccRCC and its correlation with clinicopathological features and OS. We revealed significant differences in the expression of PSGL-1 between tumour compartments, with the higher prevalence of PSGL-1-positive TC in venous thrombi, and PSGL-1-positive TAIC in primary tumour.

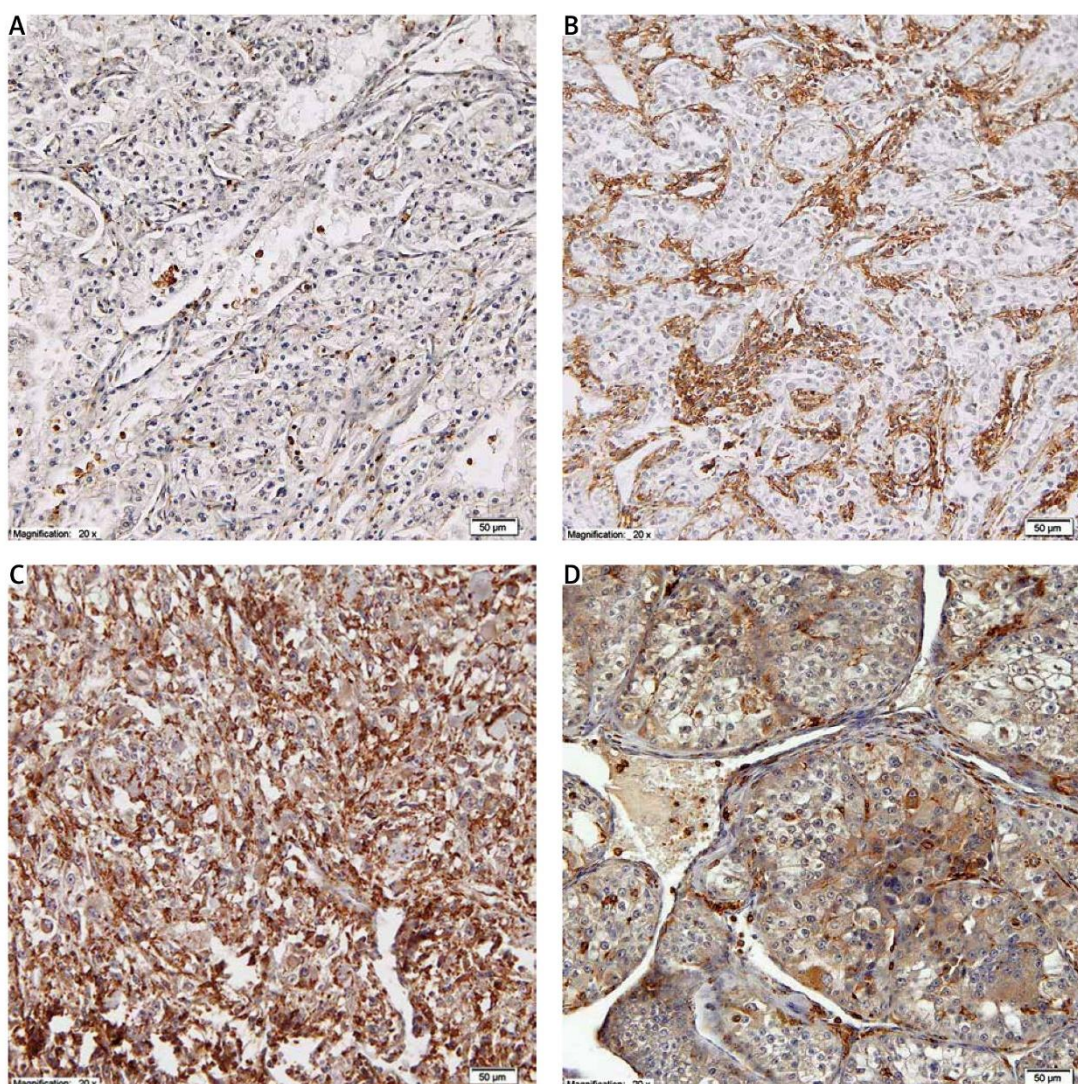
Relatively more common expression of PSGL-1 on TC in venous thrombi may suggest its role in mediating TC interactions with platelets and the endothelium, which may facilitate metastatic dissemination [10]. This is consistent with previous studies indicating that PSGL-1, primarily known for its role in leukocyte trafficking and endothelial adhesion, may contribute to the metastatic potential of cancer cells by enhancing their adhesion properties under shear stress conditions found in the bloodstream [17]. In contrast, the study by Yamaoka *et al.* suggests that PSGL-1 plays a role in promoting immune cell infiltration and suppressing primary tumour growth in a murine model [18]. This discrepancy underscores the complex and context-dependent roles of PSGL-1 in tumour biology. Further research is needed to elucidate the mechanisms by which PSGL-1 influences tumour progression and to understand the differences observed between murine models and human cancers [18]. Interestingly, our analysis identified that PSGL-1 positivity in primary tumour TC and venous thrombi TAIC correlated with inferior OS. However, this prognostic significance did not retain significance in multivariate analysis controlled for by well-established prognostic factors (nodal status, distant metastases, tumour grade, necrosis).

The association of PSGL-1 expression with high-grade histology in both primary tumours and thrombi may further support its role in promoting tumour aggressiveness. Moreover, the presence of PSGL-1-positive TAIC in venous thrombi correlated with tumour necrosis, another adverse prognostic factor in ccRCC. These findings emphasise the complexity of the tumour microenvironment and the multifaceted role of PSGL-1 in general cancer biology. Another study supports our hypotheses based on the findings coming from the studies on cervical cancer, i.e. PSGL-1 mRNA expression was strongly related with the higher

**Table 1.** Basic characteristics of the study group

Feature	N (%)
<b>Gender</b>	
Male	43 (55.1)
Female	35 (44.9)
<b>Age</b>	
	Median: (IQR years) 66 (60–72)
<b>Grade</b>	
G2	25 (32.1)
G3	39 (50)
G4	14 (17.9)
<b>Sarcomatoid features in PT</b>	
No	72 (92.3)
Yes	6 (7.7)
<b>Rhabdoid features in PT</b>	
No	73 (93.6)
Yes	5 (6.4)
<b>Sarcomatoid features in VT</b>	
No	73 (93.6)
Yes	5 (6.4)
<b>Rhabdoid features in VT</b>	
No	65 (83.3)
Yes	13 (16.7)
<b>T</b>	
3a	76 (97.4)
3b	1 (1.3)
3c	–
4	1 (1.3)
<b>N</b>	
0	64 (82)
1	14 (18)
<b>M</b>	
0	56 (71.8)
1	22 (28.2)
<b>Tumour necrosis</b>	
Present	36 (46.2)
Absent	42 (53.8)
<b>Death during follow-up</b>	
No	50 (64.1)
Yes	28 (35.9)

*M* – metastasis, *N* – node, *PT* – primary tumour, *T* – tumour, *VT* – venous tumour thrombus



**Fig. 1.** Representative examples of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) staining in immune cells infiltrating clear cell renal cell carcinoma. PSGL-1-negative TC and a few (5%) -positive tumour-associated immune cells (TAIC) in thrombus (A), negative TC and 90% positive TAIC in tumour (B), strongly positive TC and TAIC in thrombus (C), moderately positive TC and negative TAIC in tumour (D)

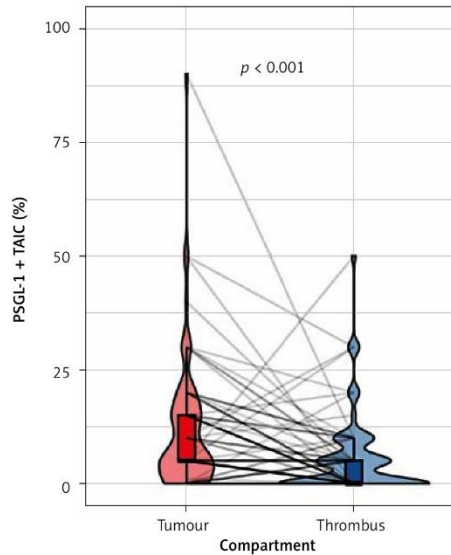
*PSGL-1 – P-selectin glycoprotein ligand-1, TAIC – tumour-associated immune cells, TC – tumour cells*

grade in the cervical high-grade squamous lesions. Despite this, it was found to be a good prognostic factor in cervical cancer [19]. It seems that specific tumour and organ microenvironment context may influence the prognostic significance of immune-related proteins like PSGL-1. Likewise, expression of PD-L1 shows divergent effects on outcomes in various tumours and organs.

The differential expression patterns of PSGL-1 also highlight the need for compartment-specific analysis when evaluating biomarkers in ccRCC. The distinct biological features and microenvironments of primary tumours and their associated thrombi necessitate a nuanced approach to biomarker assessment [20]. Our study suggests

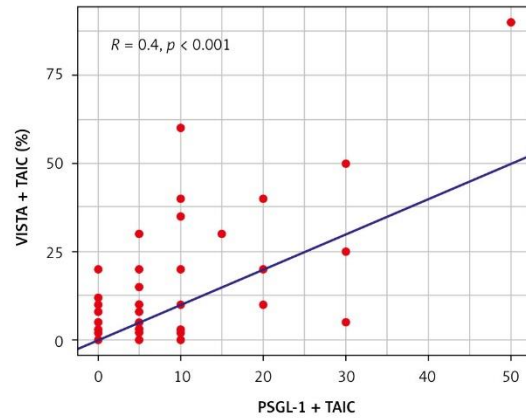
that PSGL-1 evaluation in venous thrombi, in addition to primary tumours, could provide a more comprehensive prognostic picture and potentially guide therapeutic strategies.

Lastly, one should consider some of the limitations of our retrospective study when interpreting the results. The specific cohort that was analysed comprised predominantly patients with T3a stage with better expected outcomes when compared to more locally advanced cases. Additionally, no subanalyses of the populations of TAIC were available. The study was performed on TMA, and their assessment may not adequately reflect the whole tumour microenvironment.



**Fig. 2.** Expression of P-selectin glycoprotein ligand-1 on tumour-associated immune cells in venous tumour thrombus and primary tumour (renal cell carcinoma)

PSGL-1 – P-selectin glycoprotein ligand-1, TAIC – tumour-associated immune cells  
The associations were estimated with paired Wilcoxon test.



**Fig. 3.** The correlation between VISTA and P-selectin glycoprotein ligand-1 expression on tumour-associated immune cells

PSGL-1 – P-selectin glycoprotein ligand-1, TAIC – tumour-associated immune cells

### Conclusions

In the current study we found that PSGL-1 was more commonly expressed by TC in the venous thrombus than

in the main renal mass of ccRCC. It suggests that the acquisition of PSGL-1 expression in the tumour thrombus enables interactions of TC with platelets and endothelium. Then, PSGL-1 expression on TC was proven to have prognostic value only in the tumour compartment. Interestingly, the presence of PSGL-1-positive TAIC in venous thrombus was also associated with worse outcomes. Thus, the assessment of prognostic biomarkers in ccRCC should take into consideration the unique environment of various compartments.

**Table 2.** The comparison of P-selectin glycoprotein ligand-1 expression between the primary tumour and venous thrombus, concerning the type of PD-L1 expressing cells

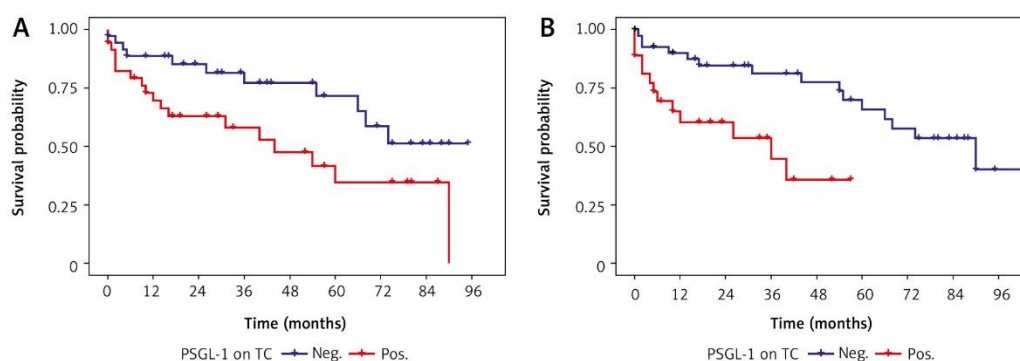
PSGL-1	Primary tumour		Venous thrombus	
	TC	TAIC	TC	TAIC
Positive, n (%)	29 (37.2)	61 (78.2)	46 (59)	38 (48.7)
Negative, n (%)	49 (62.8)	17 (21.8)	31 (39.7)	39 (50)
Missing, n (%)			1 (1.3)	1 (1.3)

PSGL-1 – P-selectin glycoprotein ligand-1, TAIC – tumour-associated immune cells, TC – tumour cells  
In the TC – 0 = completely negative, 1 – weak expression, 2 – strong expression (score 1–2 = positive expression). In the TAIC – percentage of positive cells – any % of positive cells = positive expression.

**Table 3.** The association between P-selectin glycoprotein ligand-1 expression in different compartment/cells and clinicopathological findings (all  $\chi^2$ , positive until stated otherwise)

Feature	Clinicopathological findings			
PSGL-1 TC VT	PSGL-1 TC PT (+) ( $p = 0.006$ )	NLR ( $p = 0.039$ )	Rhabdoid features in VT ( $p = 0.009$ )	High-grade ( $p = 0.017$ )
PSGL-1 TAIC VT	Necrosis ( $p = 0.014$ )			
PSGL-1 TC PT	PD-L1+ in PT ( $p = 0.03$ )	LMR ( $p = 0.01$ ) (negative/ association)		
	Rhabdoid features in PT ( $p = 0.04$ )	Rhabdoid features in VT ( $p = 0.008$ )	PLR ( $p = 0.009$ )	
	PSGL-1 TC in VT ( $p = 0.006$ )			
PSGL-1 TAIC PT	PD-L1+ in PT ( $p = 0.028$ )			

LMR – lymphocyte to monocyte ratio, NLR – neutrophil to lymphocyte ratio, PLR – platelet to lymphocyte ratio, PSGL-1 – P-selectin glycoprotein ligand-1, PT – primary tumour, TC – tumour cells, TAIC – tumour-associated immune cells, VT – tumour venous thrombus



**Fig. 4.** Kaplan-Meier curves for overall survival according to P-selectin glycoprotein ligand-1 expression on tumour-associated immune cells in venous tumour thrombus (A) and tumour cells in primary tumour (B)

*neg* – negative expression, *pos* – positive expression, *PSGL-1* – P-selectin glycoprotein ligand-1, *TAIC* – tumour-associated immune cells, *TC* – tumour cells  
*p*-values were calculated with the log-rank test

**Table 4.** Univariate Cox proportional hazard regression analysis of the association between P-selectin glycoprotein ligand-1 expression in the primary tumour and venous tumour thrombus, concerning tumour-associated immune cells and tumour cells, and overall survival

Feature	HR	<i>p</i> -value
PSGL1 TC PT (+)	3.42 (1.45–8.05)	0.004
PSGL1 TAIC PT (+)	0.73 (0.31–1.74)	ns
PSGL1 TC VT (+)	1.12 (0.53–2.41)	ns
PSGL1 TAIC VT (+)	2.27 (1.06–4.84)	0.032

*ns* – non-significant, *PSGL-1* – P-selectin glycoprotein ligand-1, *TAIC* – tumour-associated immune cells, *TC* – tumour cells

**Table 5.** Multivariate Cox proportional hazard regression analysis of the associations between P-selectin glycoprotein ligand-1 expression, clinicopathological variables (N, M, necrosis, grade), and overall survival

Feature	HR	<i>p</i> -value
PSGL1 TC PT (+) vs. (–)	1.74 (0.69–4.34)	ns
PSGL1 TAIC VT (+) vs. (–)	1.93 (0.85–4.33)	ns
N0 vs. N1	0.18 (0.06–0.52)	0.001
M0 vs. M1	0.62 (0.06–0.25)	ns
Grade 4 vs. 2–3	3.58 (1.24–10.33)	0.017
Necrosis absent vs. present	0.51 (0.22–1.17)	ns

*CI* – confidence interval, *HR* – hazard ratio, *ns* – non-significant, *PSGL-1* – P-selectin glycoprotein ligand-1, *TAIC* – tumour-associated immune cells, *TC* – tumour cells

## Disclosures

1. Institutional review board statement: Not applicable.
2. Assistance with the article: None.
3. This work was part of Harvard Medical School's Polish Clinical Scholars Research Training Program, organised by the Medical Research Agency.
4. Conflicts of interest: None.

## References

1. Antonelli A, Sodano M, Sandri M, et al. Venous tumor thrombus consistency is not predictive of survival in patients with renal cell carcinoma: a retrospective study of 147 patients. *Int J Urol* 2015; 22: 534-539.
2. Berczi A, Flasko T, Szerafin T, Thomas B, Bacso Z, Berczi C. Surgical management and outcome of renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus. *Urol Int* 2017; 99: 267-271.
3. Borregales LD, Adibi M, Thomas AZ, Wood CG, Karam JA. The role of neoadjuvant therapy in the management of locally advanced renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol* 2016; 8: 130-141.
4. Carretero-Gonzalez A, Lora D, Martin Sobrino I, et al. The value of PD-L1 expression as predictive biomarker in metastatic renal cell carcinoma patients: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 1945.
5. Lavacchi D, Pellegrini E, Palmieri VE, et al. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of renal cancer: current state and future perspective. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 4691.

6. Zapala L, Kunc M, Sharma S, et al. Immune checkpoint receptor VISTA on immune cells is associated with expression of T-cell exhaustion marker TOX and worse prognosis in renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2023; 149: 4131-4139.
7. Zapala L, Kunc M, Sharma S, et al. Evaluation of PD-L1 (E1L3N, 22C3) expression in venous tumor thrombus is superior to its assessment in renal tumor in predicting overall survival in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2022; 40: 200 e1- e10.
8. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer* 2019; 18: 155.
9. Hong S, Yuan Q, Xia H, et al. Establishment of an ex vivo tissue culture model for evaluation of antitumor efficacy in clear cell renal cell carcinoma. *Front Oncol* 2022; 12: 851191.
10. Johnston RJ, Su LJ, Pinckney J, et al. VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature* 2019; 574: 565-570.
11. Russo HM, Wickenheiser KJ, Luo W, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 regulates adhesive properties of the endothelium and leukocyte trafficking into adipose tissue. *Circ Res* 2010; 107: 388-397.
12. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 2014; 346: 1234-1238.
13. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumors*, ed. U.I.U.A., Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA 2009, 7.

14. Koppel C, Schwellenbach H, Zielinski D, et al. Optimization and validation of PD-L1 immunohistochemistry staining protocols using the antibody clone 28-8 on different staining platforms. *Mod Pathol* 2018; 31: 1630-1644.
15. Team RC. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2020.
16. Kassambara AK, Biecek M, Surminer P. Drawing survival curves using "ggplot2". R Package Version 048 2020. 2020.
17. Kappelmayer J, Nagy B Jr. The interaction of selectins and PSGL-1 as a key component in thrombus formation and cancer progression. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 6138145.
18. Yamaoka T, Fujimoto M, Ogawa F, et al. The roles of P- and E-selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in primary and metastatic mouse melanomas. *J Dermatol Sci* 2011; 64: 99-107.
19. Lin Y, Huang S, Qi Y, et al. PSGL-1 is a novel tumor microenvironment prognostic biomarker with cervical high-grade squamous lesions and more. *Front Oncol* 2023; 13: 1052201.
20. Ramos-Sevillano E, Yuste J. Novel therapeutic strategies against cancer and chronic infection by targeting P-selectin glycoprotein ligand-1 as an immune T cells response regulator. *Translat Cancer Res* 2016; 5: s868-71.

**Address for correspondence**

**Rafal Pęksa**

Department of Pathomorphology

Medical University of Gdańsk

Gdańsk, Poland

e-mail: rafal.peksa@gumed.edu.pl

**Submitted:** 10.09.2024

**Accepted:** 27.09.2024

Article

# Increased Immunohistochemical Expression of Stimulator of Interferon Genes (STING) in Renal Cancer with Venous Tumor Thrombus Is Associated with Worse Prognosis

Sumit Sharma <sup>1,\*</sup>, Michał Kunc <sup>2</sup>, Rafał Pęksa <sup>2</sup>, Aleksandra Ciarka <sup>2</sup>, Weronika Łyzińska <sup>3</sup>, Le Qu <sup>4</sup>, Piotr Radziszewski <sup>1</sup> and Łukasz Zapala <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Clinic of General, Oncological and Functional Urology, Medical University of Warsaw, Lindleya 4, 02-005 Warsaw, Poland; sumit.sharma29.06.91@gmail.com (S.S.); piotr.radziszewski@wum.edu.pl (P.R.)
  - <sup>2</sup> Department of Pathomorphology, Medical University of Gdansk, 80-214 Gdańsk, Poland; michal.kunc@gumed.edu.pl (M.K.); rafal.peksa@gumed.edu.pl (R.P.); aleksandra.ciarka@gumed.edu.pl (A.C.)
  - <sup>3</sup> Scientific Circle of Pathomorphology, Medical University of Gdańsk, 80-214 Gdańsk, Poland; weronika.lyzinska@gumed.edu.pl
  - <sup>4</sup> Department of Urology, Jinling Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210000, China; septsoul@hotmail.com
- \* Correspondence: sumit.sharma29.06.91@gmail.com (S.S.); lukasz.zapala@wum.edu.pl (Ł.Z.)

## Abstract

**Background/Objectives:** We focused on the expression of a novel immune marker, cytoplasmic stimulator of interferon genes (STING), in the cohort of primary renal cell cancer (RCC) with venous tumor thrombus (VTT), in conjunction with the assessment of tumor-infiltrating leucocytes (TILs). **Methods:** The study group comprised 82 patients with clear cell RCC and VTT, operated on in the years 2012–2019 in two university urological centers. Tissue microarrays were constructed, and respective antibodies were used for staining purposes. The biomarkers were analyzed in primary RCC and VTT. **Results:** The frequency of STING expression in both analyzed compartments was similar ( $p = 0.18$ ). Its presence correlated with no clinicopathological features but for necrosis in VTT only ( $p = 0.0023$ ). PD-L1 expression in the primary tumor was associated with STING in tumor cells in the same compartment ( $p = 0.02$ ). On the contrary, VISTA expression was correlated with the presence of STING in VTT. TIL presence was associated with positive PD-L1 ( $p = 0.008$ ) and STING ( $p < 0.05$ ) expression in the primary tumor. Strong STING expression in VTT was associated with inferior overall survival (OS) ( $p = 0.0061$ ). TIL presence emerged as a robust prognostic factor for OS in both primary tumor ( $p = 0.021$ ) and VTT ( $p = 0.034$ ). **Conclusions:** We presented for the first time the prognostic values of STING in a contemporary cohort of RCC patients with VTT. STING expression in VTT showed prognostic potential, while TIL assessment proved to be a particularly valuable prognostic tool that can be readily implemented in routine pathological evaluation.

**Keywords:** renal cell carcinoma; renal tumor thrombus; tumor microenvironment; STING

Academic Editor: Silvio Maringhini

Received: 21 September 2025

Revised: 21 October 2025

Accepted: 29 October 2025

Published: 30 October 2025

**Citation:** Sharma, S.; Kunc, M.; Pęksa, R.; Ciarka, A.; Łyzińska, W.; Qu, L.; Radziszewski, P.; Zapala, Ł. Increased Immunohistochemical Expression of Stimulator of Interferon Genes (STING) in Renal Cancer with Venous Tumor Thrombus Is Associated with Worse Prognosis. *Biomedicines* **2025**, *13*, 2674. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13112674>

**Copyright:** © 2025 by the author.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Nowadays, there is a growing interest in identifying novel predictive and prognostic biomarkers for renal cell carcinoma (RCC) [1]. As RCC represents a truly heterogeneous disease, trends towards personalization of the treatment based on individuals' cancer

profiles may become the pillars of future immunotherapy concepts. In this setting, cases with coexisting venous tumor thrombus (VTT) pose not only a challenge for the clinicians but may require completely different systemic management [2].

The cytoplasmic stimulator of interferon genes (STING) pathway serves as a key activator of the immune response to intracellular double-stranded DNA fragments [3,4]. Its stimulation triggers upregulation of several inflammatory genes, such as tumor necrosis factor (TNF), or interferons  $\alpha$  and  $\beta$  (IFN  $\alpha$  and  $\beta$ ) [3,5]. Corrales et al. found that intra-tumoral injections of STING agonists initiated regression of established tumors in mice via IFN-dependent pathways [6]. Moreover, upregulation of STING resulted in the promotion of chemokines, such as CXCL9-11 and CCL5, facilitating T cell trafficking to the primary tumor and its microenvironment [6,7]. Additionally, STING can reverse immunosuppressive conditions by reprogramming myeloid-derived suppressor cells into antigen-presenting cells [8,9] and polarizing tumor-promoting M2 macrophages toward the anti-tumor M1 phenotype [10].

At the early stages, STING activation ceases the onset of tumor, while chronic stimulation of the STING pathway can promote inflammation-driven carcinogenesis. This dual nature of STING, as both a potential tumor suppressor and promoter, highlights the complexity of its role in cancer biology. While STING expression has been predominantly studied in T lymphocytes and macrophages [5], its role in tumor microenvironments varies across malignancies. In colon adenocarcinoma and breast cancer, STING functions as a tumor suppressor [11,12]. However, limited studies examined STING expression in RCC subtypes, including MiT family translocation RCCs [13], fumarate hydratase-deficient RCC [14], or medullary RCC [15], though sample sizes were relatively small.

Interestingly, the assessment of tumor-infiltrating immune cells (TAICs) or lymphocytes (TILs) has emerged as a valuable prognostic tool in various malignancies, particularly breast cancer, in which it can even aid estimation of the effects of planned chemotherapy and immunotherapy [16]. Preliminary reports raised this issue in RCC, emphasizing the possible link between the subpopulations of TAICs and clinicopathological characteristics, though this remains an area requiring further investigation [17].

We have previously characterized immune biomarkers in RCC patients with VTT, including immune checkpoint molecules (PD-L1 and VISTA), and demonstrated their compartment-specific expression patterns and prognostic significance [18]. The present study aimed to evaluate STING expression in both RCC and VTT compartments and assess its prognostic value in conjunction with TIL analysis. We hypothesized that STING expression patterns would differ between compartments and provide prognostic information in this challenging RCC presentation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. The Cohort

We analyzed consecutive patients diagnosed with clear cell renal carcinoma (ccRCC) with concomitant venous tumor thrombus staged cT3a or higher, in whom either nephrectomy with or without cavotomy and thrombectomy was performed. The cohort was treated in the years 2012–2019 in the two academic urological departments. The study group also comprised cN1 cases, in whom lymph node dissection was performed as well, while metastatic cases were treated with a surgical approach upfront, either with an attempt at complete resection of all tumor lesions or as a cytoreductive nephrectomy. The utilized approaches were lumbotomy or laparotomy. No neoadjuvant treatment was administered in any of the individuals enrolled. Clinical data were collected from the local hospital in- and out-patients' registries, including tumor advancement assessment based on CT or MRI imaging (2017 TNM classification system [19]) and pathological analyses (based on WHO/ISUP classifications), and were supplemented with telemedicine patients'

consultations, if needed for the purpose of the details of the follow-up and further statistical analyses. The scoring systems used for the evaluation of sarcomatoid/rhabdoid features and tumor necrosis were binary (present vs. absent). Patients ( $n = 8$ ) with incomplete clinicopathological data or survival data were excluded from further analysis. Informed consent was collected from all the patients included in the study. The study was carried out after the agreement granted by the local ethics committee, vote No. AKBE/72/2021 (Medical University of Warsaw).

## 2.2. Tissue Microarrays

Tissue microarrays (TMAs) with representative samples of matched primary renal tumor and venous tumor thrombus were constructed, as described elsewhere, with manual Tissue Arrayer MTA-1 (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA) using 1.5 mm core needles [20]. The respective  $n = 3$  cores (one from the central and two from the peripheral areas) from both VTT and the main primary lesion were sampled, as described previously [20]. Then, the prepared sections were stained with anti-STING antibody (OTI4E12; product #MA5-26032, dilution at 1:100, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). PD-L1 and VISTA expression were evaluated, as reported previously [18,21]. Respective negative (liver samples) and positive controls (tonsil, placenta) were included in TMAs [21]. The stainings were assessed by 2 pathologists experienced in uropathology (MK and RP). The expressions of the above-mentioned markers were assessed in tumor cells in two different compartments, i.e., in the tumor mass and tumor thrombus. Cytoplasmic and membranous STING expression in tumor cells (TCs) was assessed by calculating an H-score (ranging from 0 to 300), derived from multiplying the percentage of positive cells (0–100%) by the staining intensity (scored as 0, 1+, 2+, or 3+), as proposed previously [22]. Cytoplasmic staining of tumor cells was quantified, with immune and endothelial cells serving as internal positive controls. The STING expression cutoff of H-score  $> 100$  (high vs. low) was used, as it was noted to be a 75-percentile value for STING expression in the VTT compartment. Moreover, the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) was assessed dichotomously as present (at least 1% of stromal TILs) or absent (less than 1% of stromal TILs). The 1% cutoff was implemented due to practical reasons, as it dichotomously differentiates tumors with no lymphocytes and those with at least some lymphocytic infiltration, resulting in satisfactory reproducibility.

## 2.3. Statistics

Overall survival (OS) was determined as the interval between diagnosis and death due to any cause. For statistical purposes Statistica 13 (RRID:SCR\_014213, Tibco, Palo Alto, CA, USA; licensed to Medical University of Gdańsk) and the R statistical environment (R Core Team: Vienna, Austria) were utilized [23]. Continuous and categorical variables were compared using the Wilcoxon rank-sum test and Chi-square test, respectively. Univariate survival analysis was conducted with Kaplan–Meier curves and compared using the log-rank test. Multivariate survival analysis was performed using Cox proportional hazards regression and Variance Inflation Factor (VIF) analysis of collinearity. Data visualization was carried out with the ggplot2 and survminer packages in R [24]. A  $p$ -value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Patients

The studied cohort comprised 82 patients (female  $n = 37$ , male  $n = 45$ ) with a median age of 66 (age range 60–72). The basic pathological features are presented in Table 1. Of note, these were mainly T3a cases, but in 27% N+ and in 28% M+ cases were observed,

respectively. Mean follow-up was 35.3 months (median 27, range 1–109), and 3-year overall survival reached 70%.

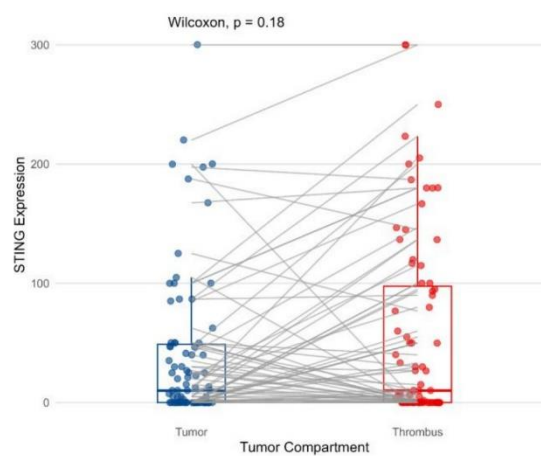
**Table 1.** Basic pathological features of the studied group.

Feature		<i>n</i> (Percentage,%)
Grade	G2-G3	55 (67)
	G4	27 (33)
	3a	79 (96.5)
	3b	1 (1.5)
	3c	-
Tumor	4	1 (1.5)
	0	67 (73)
Nodes	1	15 (27)
	0	59 (72)
Metastases	1	23 (28)
	absent	76 (93)
Sarcomatoid features	present	6 (7)
	present	73 (89)
Rhabdoid features	absent	9 (11)
	present	38 (46)
Tumor necrosis	absent	44 (54)

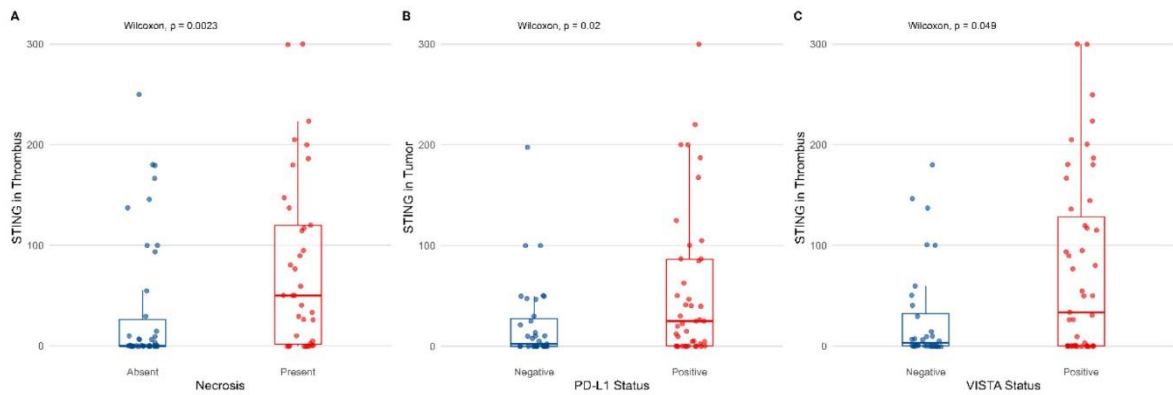
### 3.2. Cytoplasmic Expression of STING on Tumor Cells and Its Correlations with Pathological Features

The frequency of STING in both the analyzed compartments was similar, with no statistically significant differences noted for the membranous and cytoplasmic staining ( $p = 0.18$ , Wilcoxon test, Figure 1). Then, cytoplasmic STING expression was not significantly associated with most clinicopathological variables (tumor diameter, presence of nodal or distant metastases, and tumor grade) when analyzed in both primary tumor and VTT (please refer to Table S1 in the Supplementary Materials). However, STING expression in VTT was positively correlated with necrosis ( $p = 0.0023$ , Wilcoxon test, Figure 2A).

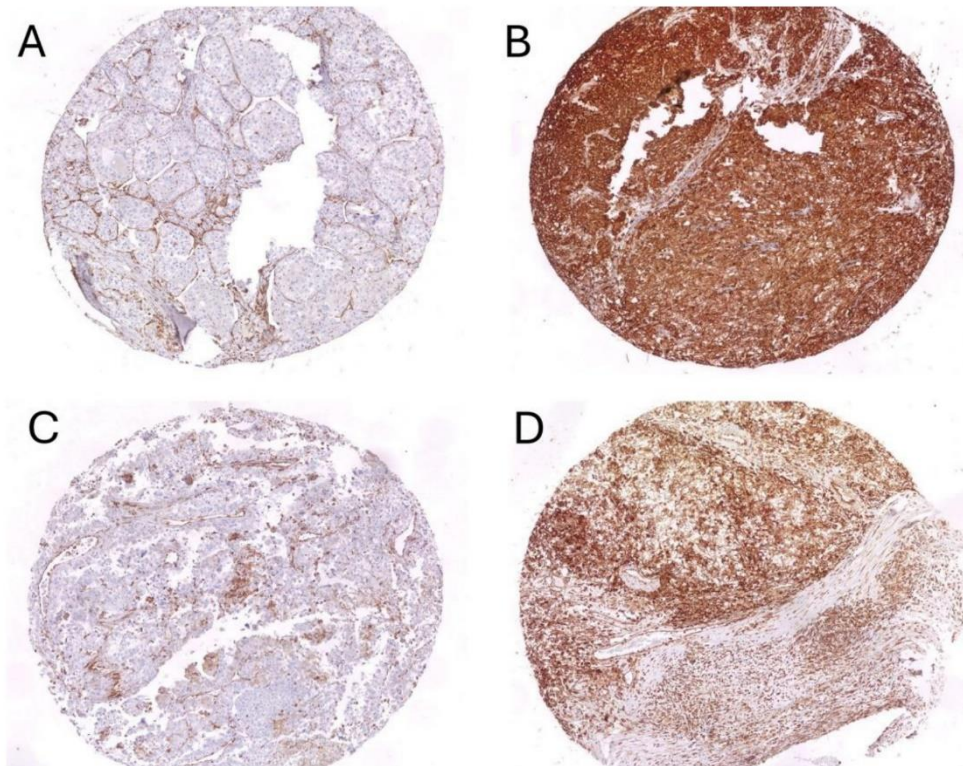
Median H-score values for STING in tumor thrombus were 10, and for STING in tumor—10, as well. Representative examples of STING staining in primary RCC and venous tumor thrombus were presented in Figure 3.



**Figure 1.** Cytoplasmic expression of STING in primary tumor and venous tumor thrombus. The associations were estimated with the Wilcoxon test.



**Figure 2.** Cytoplasmic expression of STING in venous tumor thrombus (A,C) or primary tumor (B) according to necrosis ( $p < 0.01$ ), PD-L1 ( $p < 0.05$ ), and VISTA ( $p < 0.05$ ). The associations were estimated with the Wilcoxon test.



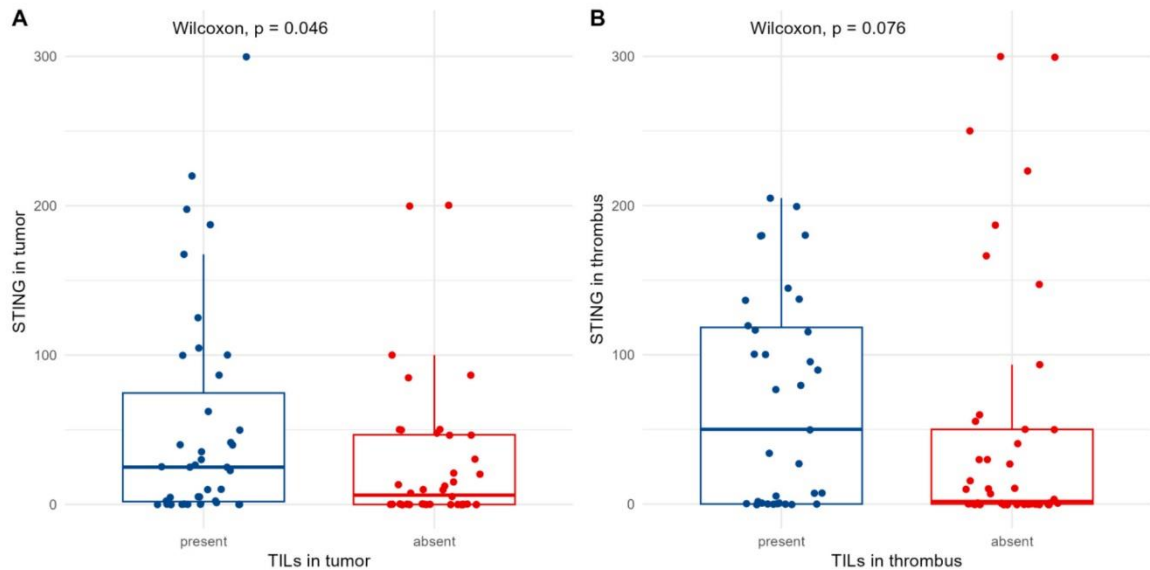
**Figure 3.** Representative examples of STING staining in tumor (A,B) and thrombus (C,D). Negative reaction in tumor cells with positive control in immune and endothelial cells (A,C) and strong diffuse positive staining in tumor cells (B,D).

### 3.3. Association Between STING Expression and Markers of Inflammatory Response

As for immune checkpoint inhibitors, PD-L1 in the primary tumor was positively correlated with STING in TCs in the same compartment ( $p = 0.02$ , Wilcoxon test), but not in the tumor thrombus (Figure 2B). On the contrary, VISTA expression was associated with the presence of cytoplasmic STING in VTT ( $p = 0.049$ , Wilcoxon test, Figure 2C).

### 3.4. Association Between TILs and Clinicopathological Variables in Different Compartments

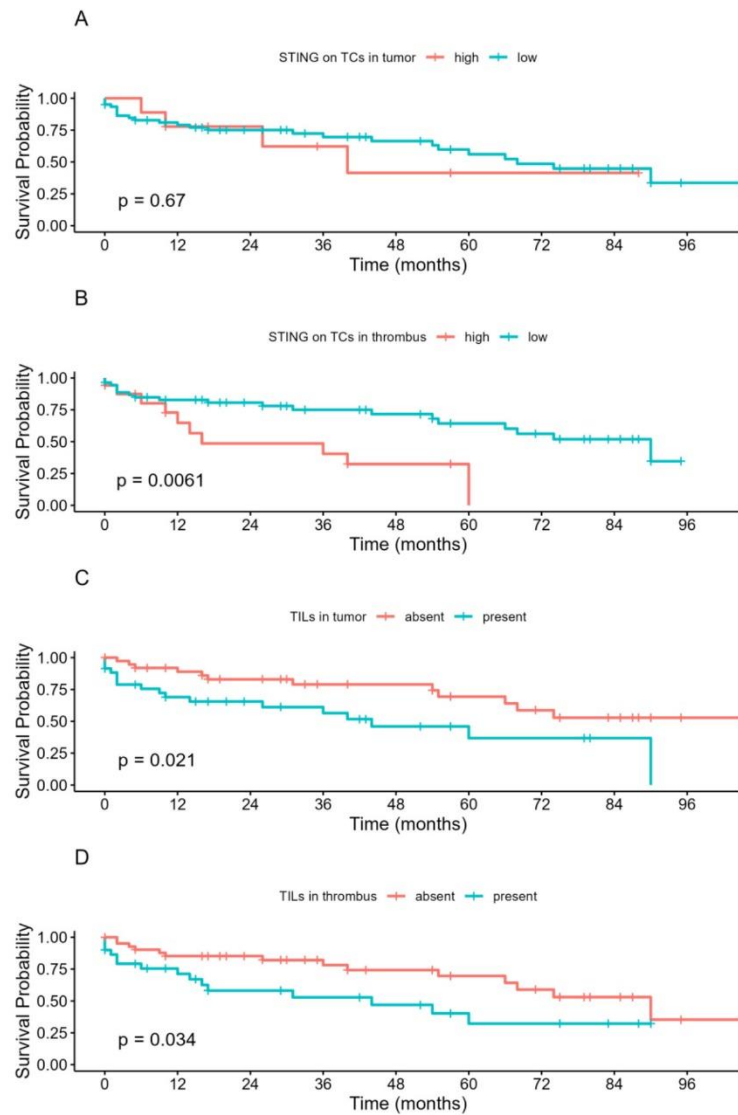
TILs were present in 39 primary tumors (47.6%) and 35 venous thrombi (42.7%). Their presence was associated with positive PD-L1 expression in the tumor ( $p = 0.008$ , Chi-square). Moreover, we observed a positive correlation between the STING expression and TIL presence in the primary tumor only (Figure 4A,B) ( $p < 0.05$ ). No statistically significant correlations with other clinicopathological variables were observed.



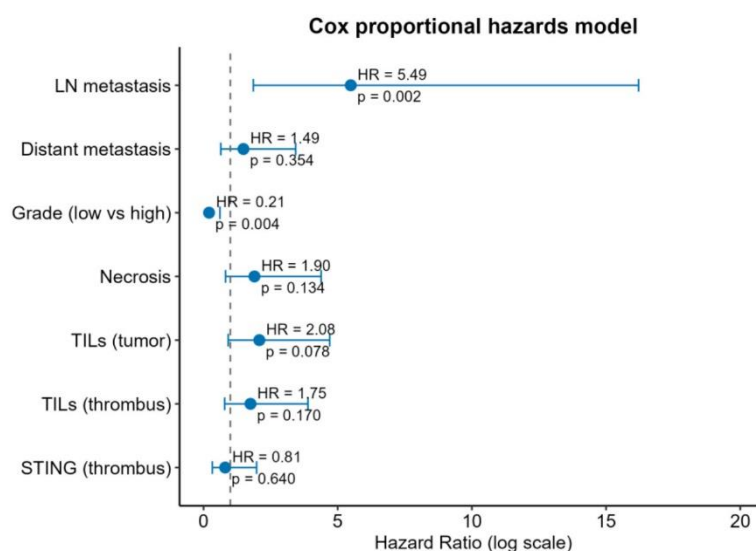
**Figure 4.** Cytoplasmic expression of STING and presence of TILs in primary tumor (A) and venous tumor thrombus (B).

### 3.5. The Prognostic Value of STING and TILs in the Studied Cohort

Then, we focused on the survival differences determined by the STING expression and the presence of TILs. STING expression in primary tumor cells was not associated with any differences in OS (Figure 5A). On the other hand, strong positive STING expression (H-score  $> 100$ ) in VTT was associated with inferior OS ( $p = 0.0061$ ) (Figure 5B). Finally, the presence of TILs proved to be a prognostic factor of OS when analyzed in both primary tumor ( $p = 0.021$ ) and venous tumor thrombus ( $p = 0.034$ , Figure 5C,D). However, in multivariate analysis, only tumor grade and nodal metastases retained statistical significance (Figure 6), with low multicollinearity found in regression models (please refer to Supplementary Materials, Table S2).



**Figure 5.** Kaplan–Meier curves for overall survival according to cytoplasmic STING expression on tumor cells in the tumor mass (A), and venous tumor thrombus (B), and the presence of TILs in both compartments analyzed separately (C,D). *p*-values were calculated with the log-rank test. Abbreviations: low—negative expression; high—positive expression.



**Figure 6.** Cox proportional hazards model for prediction of overall survival. Abbreviations: LN—lymph nodes; TILs—tumor-infiltrating leucocytes; STING—stimulator of interferon genes; HR—hazard ratio.

#### 4. Discussion

This study presents the first analysis of STING expression pattern and its prognostic value in the contemporary cohort of RCC patients with VTT. We demonstrated compartment-specific differences in STING correlations with respective clinicopathological features and identified TILs as a promising prognostic marker. These findings provide insights into the distinct tumor microenvironments of primary RCC and VTT, with potential implications for treatment stratification.

The dual perspective of STING function, as far as the anticancer response is considered, exists with context-dependent pro- and anti-tumor effects [25]. In a mouse model of adenocarcinoma, Hu et al. demonstrated that systemic administration of STING agonists eradicates dormant metastasis, being a specific checkpoint against the progression [26]. Interestingly, the authors reported that upregulation of STING may decrease sensitivity to genotoxic treatment in breast cancer models [4]. As a further example, Chen et al. observed that cancer cells may activate STING signaling via cGAMP transfer and, in turn, produce the inflammatory cytokines, i.e., IFN- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  [27], while other authors reported that STING activation may upregulate immunosuppressive cytokines, such as IL-10 and subsequently activate inhibitory regulatory T cells [28]. Interestingly, it was reported that STING is highly expressed in some cases of RCC [25,29] and may be associated conversely with TIL presence and poor prognosis [22,29]. Our findings partially align with this observation, as STING expression in VTT correlated with inferior overall survival, while primary tumor STING expression showed no prognostic significance. This compartment-specific difference suggests distinct biological processes governing STING function in different tumor sites. The correlation between STING expression and necrosis observed exclusively in the VTT compartment supports previous findings by Marletta et al., who hypothesized that elevated STING is a marker of aggressive RCC [22]. They proposed it to be the future biomarker candidate of great prognostic value, especially when combined with tumor size, grading, and necrosis [22]. In RCC specifically, STING appears to promote tumor growth through innate immune processes, including mitochondrial reactive oxygen species (ROS) maintenance [30]. This association may reflect oxidative stress-

induced cellular damage, which could be more pronounced in the hypoxic VTT environment compared to primary tumors with established vascular supply [31].

Therapeutic approaches targeting STING have shown promise, with Nakamura et al. demonstrating preliminary findings on STING agonist-loaded lipid nanoparticles (STING-LNPs) in the treatment of lung metastatic RCC [32]. Together with the assessment of tumor inflammatory subpopulations, STING was also found to be a prognostic tool significantly associated with tumor necrosis, sarcomatoid dedifferentiation, and distant metastasis in RCC [22]. Hence, the STING pathway may shape tumor microenvironment via multimodal proinflammatory axes, leading to tumor growth and metastases on one hand, and the necessity to implement multidrug therapies in conjunction with STING agonist on the other. Therefore, STING targeting only was proved to have minimal anti-cancer efficacy in clinical trials [25,33]. It was found that activation of STING may reinforce the expression of checkpoint ligands, as well [34]. In the present study, we found interesting correlations between STING and immune checkpoint markers in different compartments of RCC with VTT. Thus, PD-L1 in the primary tumor was associated with the positive STING in TCs in the same compartment, while VISTA expression was correlated with the STING staining in VTT. STING activation can upregulate checkpoint ligand expression, with Fu et al. demonstrating that STING stimulation with cyclic dinucleotides resulted in anti-tumor activity and PD-L1 upregulation, possibly through NF- $\kappa$ B signaling [35,36]. The combination of STING agonists with PD-1 blockade may overcome resistance to immune checkpoint monotherapy, supporting the rationale for combination therapeutic approaches [35].

Although the observation of TIL presence in RCC was reported, its value in the assessment of prognosis remains uncertain. TIL assessment emerged as a particularly valuable finding in our study, showing prognostic significance in both compartments. Unlike STING immunohistochemistry, TIL evaluation requires no additional staining and can be readily incorporated into routine pathological assessment. This practical advantage, combined with its promising prognostic value, makes TIL assessment an attractive biomarker for clinical implementation. Previous studies examining TIL subpopulations in RCC showed variable correlations with STING expression. It is worth emphasizing that possible interactions with TIL presence and immune checkpoint markers may exist, as in RCC tumors with PD-1-positive TILs are thought to possess more aggressive clinical characteristics [37]. Here, we found that TILs were associated with positive PD-L1 and STING expression in the tumor compartment only. Some authors focused on the analyses of subpopulations, indicating that there was no correlation between STING and elevated levels of CD8+ T cells in the tumor infiltrates [22]. Xu et al. reported on the link between the M1 macrophage subpopulation together with neutrophils and basic tumor characteristics, i.e., staging and grading (the increased M1 and decreased neutrophil levels from G1 to G4 grading) [17]. The authors also observed that M0 cases and N+ patients were found to have increased M1 levels. Furthermore, these were mainly the M1 fraction and neutrophils that were significantly associated with OS in RCC individuals ( $n = 533$  cases diagnosed with clear RCC recorded in Cancer Genome Atlas, in years 2004–2015) [17]. Then, some latest findings impose the idea of modification of the subpopulations of TILs via the exposition to hypoxic conditions, which, in turn, enhances effector functions, leading to formation of tissue-resident memory-like CD8+ T cells [38].

Several limitations of the study warrant consideration. The retrospective design introduces potential selection bias. The use of tissue microarrays, while standardized, may not capture intratumoral heterogeneity present in whole tissue sections. The absence of TIL subpopulation analysis limits mechanistic insights. Additionally, the loss of STING prognostic significance in multivariate analysis suggests that its clinical utility may be limited compared to established prognostic factors. Future studies should include larger

cohorts, validation in independent datasets, and functional analyses to clarify the mechanistic basis for compartment-specific STING behavior.

## 5. Conclusions

This study demonstrates compartment-specific STING expression patterns in RCC patients with VTT, with prognostic significance limited to the VTT compartment in univariate analysis. However, TIL assessment emerged as a more robust prognostic tool, shaping the immune response to RCC with VTT. The practical advantage of TIL evaluation, requiring no additional staining, combined with its prognostic reliability, supports its potential implementation in routine pathological practice. The distinct correlations between STING and immune checkpoint markers in different compartments suggest complex immune regulatory mechanisms that warrant further investigation. While STING represents an interesting research target, TIL assessment appears more immediately applicable for clinical prognostication in RCC patients with VTT.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines13112674/s1>. Table S1: Cytoplasmic expression of STING on tumor cells and its correlations with pathological features. The associations were estimated with the Wilcoxon test; Table S2: VIF analysis of collinearity of the clinicopathological data. Abbreviations: LN—lymph nodes, VTT—venous tumor thrombus, VIF—Variance Inflation Factor.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.S. and M.K.; methodology, M.K. and R.P.; software, M.K. and R.P.; validation, S.S., Ł.Z., and M.K.; formal analysis, S.S., Ł.Z., R.P., and M.K.; investigation, S.S., A.C., R.P., and M.K.; resources, Ł.Z., M.K., A.C., W.L., and S.S.; data curation, S.S. and M.K.; writing—original draft preparation, S.S. and Ł.Z.; writing—review and editing, S.S., Ł.Z., and M.K.; visualization, S.S., Ł.Z. and M.K.; supervision, Ł.Z., L.Q., and P.R.; project administration, S.S.; funding acquisition, M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partially funded by an internal grant from the Medical University of Gdansk (01-0395/08/643 granted to Michał Kunc).

**Institutional Review Board Statement:** The study was performed under the local ethics committee vote No. AKBE/72/2021 approved on 19.04.2021 (Medical University of Warsaw).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Khagi, Y.; Kurzrock, R.; Patel, S.P. Next generation predictive biomarkers for immune checkpoint inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 179–190. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9652-y>.
2. Heng, D.Y.; Kollmannsberger, C.; Chi, K.N. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma: Current treatment and future directions. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2010**, *2*, 39–49. <https://doi.org/10.1177/1758834009352498>.
3. Motwani, M.; Pesiridis, S.; Fitzgerald, K.A. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 657–674. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0151-1>.
4. Cheradame, L.; Guerrero, I.C.; Gaston, J.; Schmitt, A.; Jung, V.; Goudin, N.; Pouillard, M.; Radosevic-Robin, N.; Modesti, M.; Judde, J.G.; et al. STING protects breast cancer cells from intrinsic and genotoxic-induced DNA instability via a non-canonical, cell-autonomous pathway. *Oncogene* **2021**, *40*, 6627–6640. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02037-4>.

5. Ishikawa, H.; Ma, Z.; Barber, G.N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **2009**, *461*, 788–792. <https://doi.org/10.1038/nature08476>.
6. Corrales, L.; Glickman, L.H.; McWhirter, S.M.; Kanne, D.B.; Sivick, K.E.; Katibah, G.E.; Woo, S.R.; Lemmens, E.; Banda, T.; Leong, J.J.; et al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1018–1030. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.031>.
7. Ohkuri, T.; Kosaka, A.; Ishibashi, K.; Kumai, T.; Hirata, Y.; Ohara, K.; Nagato, T.; Oikawa, K.; Aoki, N.; Harabuchi, Y.; et al. Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site. *Cancer Immunol. Immunother.* **2017**, *66*, 705–716. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1975-1>.
8. Mohamed, E.; Sierra, R.A.; Trillo-Tinoco, J.; Cao, Y.; Innamarato, P.; Payne, K.K.; de Mingo Pulido, A.; Mandula, J.; Zhang, S.; Thevenot, P.; et al. The Unfolded Protein Response Mediator PERK Governs Myeloid Cell-Driven Immunosuppression in Tumors through Inhibition of STING Signaling. *Immunity* **2020**, *52*, 668–682.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.004>.
9. Ager, C.R.; Boda, A.; Rajapakshe, K.; Lea, S.T.; Di Francesco, M.E.; Jayaprakash, P.; Slay, R.B.; Morrow, B.; Prasad, R.; Dean, M.A.; et al. High potency STING agonists engage unique myeloid pathways to reverse pancreatic cancer immune privilege. *J. Immunother. Cancer* **2021**, *9*. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003246>.
10. Miao, L.; Qi, J.; Zhao, Q.; Wu, Q.N.; Wei, D.L.; Wei, X.L.; Liu, J.; Chen, J.; Zeng, Z.L.; Ju, H.Q.; et al. Targeting the STING pathway in tumor-associated macrophages regulates innate immune sensing of gastric cancer cells. *Theranostics* **2020**, *10*, 498–515. <https://doi.org/10.7150/thno.37745>.
11. Wei, B.; Xu, L.; Guo, W.; Wang, Y.; Wu, J.; Li, X.; Cai, X.; Hu, J.; Wang, M.; Xu, Q.; et al. SHP2-Mediated Inhibition of DNA Repair Contributes to cGAS-STING Activation and Chemotherapeutic Sensitivity in Colon Cancer. *Cancer Res.* **2021**, *81*, 3215–3228. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3738>.
12. Gilmore, E.; McCabe, N.; Kennedy, R.D.; Parkes, E.E. DNA Repair Deficiency in Breast Cancer: Opportunities for Immunotherapy. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 4325105. <https://doi.org/10.1155/2019/4325105>.
13. Calio, A.; Brunelli, M.; Gobbo, S.; Pedron, S.; Segala, D.; Argani, P.; Martignoni, G. Stimulator of interferon genes (STING) immunohistochemical expression in the spectrum of perivascular epithelioid cell (PEC) lesions of the kidney. *Pathology* **2021**, *53*, 579–585. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.09.025>.
14. Marletta, S.; Marcolini, L.; Calio, A.; Pedron, S.; Antonini, P.; Martelli, F.M.; Stefanizzi, L.; Martignoni, G. Stimulator of interferon genes (STING) immunohistochemical expression in fumarate hydratase-deficient renal cell carcinoma: Biological and potential predictive implications. *Virchows Arch.* **2025**. <https://doi.org/10.1007/s00428-025-04041-5>.
15. Msaouel, P.; Malouf, G.G.; Su, X.; Yao, H.; Tripathi, D.N.; Soeung, M.; Gao, J.; Rao, P.; Coarfa, C.; Creighton, C.J.; et al. Comprehensive Molecular Characterization Identifies Distinct Genomic and Immune Hallmarks of Renal Medullary Carcinoma. *Cancer Cell* **2020**, *37*, 720–734.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.002>.
16. Valenza, C.; Taurelli Salimbeni, B.; Santoro, C.; Trapani, D.; Antonarelli, G.; Curigliano, G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers* **2023**, *15*, 767. <https://doi.org/10.3390/cancers15030767>.
17. Xu, W.; Jiang, X.; Guan, C.; Gu, M. The prognostic and predictive value of tumor infiltrating Macrophage and Neutrophil in patient with clear cell renal cell carcinoma: Tumor infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma. *Medicine* **2020**, *99*, e23181. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023181>.
18. Zapala, L.; Kunc, M.; Sharma, S.; Peksa, R.; Popeda, M.; Biernat, W.; Radziszewski, P. Immune checkpoint receptor VISTA on immune cells is associated with expression of T-cell exhaustion marker TOX and worse prognosis in renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2023**, *149*, 4131–4139. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04329-y>.
19. UICC International Union Against Cancer. *TNM Classification of Malignant Tumors*; Sobin, L., Wittekind, C., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2009; p.7.
20. Zapala, L.; Kunc, M.; Sharma, S.; Peksa, R.; Popeda, M.; Biernat, W.; Radziszewski, P. Evaluation of PD-L1 (E1L3N, 22C3) expression in venous tumor thrombus is superior to its assessment in renal tumor in predicting overall survival in renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* **2022**, *40*, 200.e1–200.e10. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2022.02.001>.
21. Peksa, R.; Sharma, S.; Kunc, M.; Popeda, M.; Qu, L.; Frankiewicz, M.; Folwarski, M.; Radziszewski, P.; Zapala, L. P-selectin glycoprotein ligand-1 is diversely expressed in the primary tumour and venous thrombus of clear cell renal cancer and correlates with poor overall survival. *Contemp. Oncol.* **2024**, *28*, 253–259. <https://doi.org/10.5114/wo.2024.144225>.
22. Marletta, S.; Calio, A.; Bogina, G.; Rizzo, M.; Brunelli, M.; Pedron, S.; Marcolini, L.; Stefanizzi, L.; Gobbo, S.; Princiotta, A.; et al. STING is a prognostic factor related to tumor necrosis, sarcomatoid dedifferentiation, and distant metastasis in clear cell renal cell carcinoma. *Virchows Arch.* **2023**, *483*, 87–96. <https://doi.org/10.1007/s00428-023-03549-y>.

23. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Core Team: Vienna, Austria, 2013; p. 201.
24. Kassambara, A.K.; Biecek, M.; Survmminer, P. Drawing Survival Curves Using “ggplot2”. R Package Version 0.4.8. 2020. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer> (accessed on 1 June 2025).
25. Zhao, K.; Huang, J.; Zhao, Y.; Wang, S.; Xu, J.; Yin, K. Targeting STING in cancer: Challenges and emerging opportunities. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2023**, *1878*, 188983. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188983>.
26. Hu, J.; Sanchez-Rivera, F.J.; Wang, Z.; Johnson, G.N.; Ho, Y.J.; Ganesh, K.; Umeda, S.; Gan, S.; Mujal, A.M.; Delconte, R.B.; et al. STING inhibits the reactivation of dormant metastasis in lung adenocarcinoma. *Nature* **2023**, *616*, 806–813. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05880-5>.
27. Chen, Q.; Boire, A.; Jin, X.; Valiente, M.; Er, E.E.; Lopez-Soto, A.; Jacob, L.; Patwa, R.; Shah, H.; Xu, K.; et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* **2016**, *533*, 493–498. <https://doi.org/10.1038/nature18268>.
28. Field, C.S.; Baixauli, F.; Kyle, R.L.; Puleston, D.J.; Cameron, A.M.; Sanin, D.E.; Hippen, K.L.; Loschi, M.; Thangavelu, G.; Corrado, M.; et al. Mitochondrial Integrity Regulated by Lipid Metabolism Is a Cell-Intrinsic Checkpoint for Treg Suppressive Function. *Cell Metab.* **2020**, *31*, 422–437.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.021>.
29. An, X.; Zhu, Y.; Zheng, T.; Wang, G.; Zhang, M.; Li, J.; Ji, H.; Li, S.; Yang, S.; Xu, D.; et al. An Analysis of the Expression and Association with Immune Cell Infiltration of the cGAS/STING Pathway in Pan-Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *14*, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.11.003>.
30. Zhu, Z.; Zhou, X.; Du, H.; Cloer, E.W.; Zhang, J.; Mei, L.; Wang, Y.; Tan, X.; Hepperla, A.J.; Simon, J.M.; et al. STING Suppresses Mitochondrial VDAC2 to Govern RCC Growth Independent of Innate Immunity. *Adv. Sci.* **2023**, *10*, e2203718. <https://doi.org/10.1002/advs.202203718>.
31. Wang, X.; Xu, H.; Guo, M.; Shen, Y.; Li, P.; Wang, Z.; Zhan, M. The use of an oxidative stress scoring system in prognostic prediction for kidney renal clear cell carcinoma. *Cancer Commun.* **2021**, *41*, 354–357. <https://doi.org/10.1002/cac2.12152>.
32. Nakamura, T.; Sasaki, S.; Sato, Y.; Harashima, H. Cancer Immunotherapy with Lipid Nanoparticles Loaded with a Stimulator of Interferon Genes Agonist against Renal Tumor Lung Metastasis. *Pharmaceutics* **2023**, *16*, 31. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010031>.
33. Song, H.; Chen, L.; Pan, X.; Shen, Y.; Ye, M.; Wang, G.; Cui, C.; Zhou, Q.; Tseng, Y.; Gong, Z.; et al. Targeting tumor monocyte-intrinsic PD-L1 by rewiring STING signaling and enhancing STING agonist therapy. *Cancer Cell* **2025**, *43*, 503–518.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2025.02.014>.
34. Zhu, Y.; An, X.; Zhang, X.; Qiao, Y.; Zheng, T.; Li, X. STING: A master regulator in the cancer-immunity cycle. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 152.
35. Fu, J.; Kanne, D.B.; Leong, M.; Glickman, L.H.; McWhirter, S.M.; Lemmens, E.; Mechette, K.; Leong, J.J.; Lauer, P.; Liu, W.; et al. STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 283ra52. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4306>.
36. Cai, H.; Yan, L.; Liu, N.; Xu, M.; Cai, H. IFI16 promotes cervical cancer progression by upregulating PD-L1 in immunomicroenvironment through STING-TBK1-NF- $\kappa$ B pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *123*, 109790. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109790>.
37. Gonzalez-Garza, R.; Gutierrez-Gonzalez, A.; Salinas-Carmona, M.C.; Mejia-Torres, M. Biomarkers for evaluating the clinical response to immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma (Review). *Oncol. Rep.* **2024**, *52*, 164. <https://doi.org/10.3892/or.2024.8823>.
38. Chahoud, J.; Potez, M.; Guske, C.; Miller, J.; Ali, J.; Carter, M.; Khambati, F.; Johnson, J.; Fazili, A.; Gullapalli, K.; et al. Optimizing clear cell renal cell carcinoma tumor-infiltrating lymphocytes under controlled hypoxic conditions. *J. Clin. Oncol.* **2025**, *43*, 581. [https://doi.org/10.1200/JCO.2025.43.5\\_suppl.581](https://doi.org/10.1200/JCO.2025.43.5_suppl.581).

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

---

## Podsumowanie

Przedstawiony cykl publikacji dostarcza nowego obrazu biologii raka jasnokomórkowego nerki z czopem nowotworowym w układzie żylnym, ukazując tę postać choroby jako znacznie bardziej złożoną niż wynikałoby to z jej klasycznego, anatomiczno-chirurgicznego opisu. Wyniki badań potwierdzają, że obecność czopa nowotworowego nie jest jedyną manifestacją miejscowego zaawansowania choroby, lecz odzwierciedla specyficzne cechy biologiczne nowotworu, w szczególności związane z jego mikrośrodowiskiem immunologicznym. Stały kontakt z krwią oraz komórkami układu odpornościowego sprzyja powstawaniu swoistego mikrośrodowiska, które może wpływać na fenotyp komórek nowotworowych, ich zdolność do przeżycia w krążeniu oraz potencjalny rozsiew choroby.

Podczas gdy pierwsze stadia choroby można zazwyczaj leczyć chirurgicznie z dobrymi wynikami, rozsiane i/lub bardziej zaawansowane stadia wymagają zastosowania dodatkowych metod terapeutycznych. Trwa debata na temat zasadności stosowania neoadjuwantowej terapii molekularnej w zaawansowanym RCC z VTT. Ograniczone dowody pochodzące z opisów przypadków lub serii przypadków sugerują, że może ona poprawić wyniki poprzez obniżenie stopnia zaawansowania choroby, a tym samym ułatwić przeprowadzenie zabiegu i zmniejszyć ryzyko powikłań okołoperacyjnych [113-115]. Przykładowo, w niewielkim badaniu (n=25 przypadków) jedyny, ale nadal minimalny efekt zmniejszenia stopnia zaawansowania czopa nowotworowego zaobserwowano w grupie otrzymującej sunitynib (w porównaniu z alternatywnymi celowanymi terapiami molekularnymi) [116]. Niektórzy autorzy sugerują, że działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej wpływa głównie na czop i przerzuty, natomiast jest mniej skuteczne w przypadku guza pierwotnego [117]. Ze względu na zalety kombinacji opartych na immunoterapii, inhibitory punktów kontrolnych stały się pierwszą linią leczenia zaawansowanego RCC. Z tego powodu zaproponowano również kombinacje inhibitorów punktów kontrolnych [118], w tym z inhibitorami kinazy tyrozynowej [119]. Dotychczas nie wykazano klinicznego wpływu tej formy immunoterapii na ograniczenie zasięgu czopa nowotworowego. Stanowi to przesłankę do poszukiwania nowych punktów uchwytu terapeutycznego oraz potencjalnych biomarkerów.

Przedstawione w niniejszej pracy różnice pomiędzy guzem pierwotnym a czopem nowotworowym potwierdzają zasadność ich niezależnej oceny biologicznej. W badaniach immunohistochemicznych wykazano m.in., że ekspresja wybranych markerów immunologicznych różni się pomiędzy guzem pierwotnym a czopem nowotworowym oraz posiada znaczenie prognostyczne. W pracy nr 2 wykazano, że guzy cechujące się ekspresją PSGL-1 na komórkach nowotworowych w czopie nowotworowym cechowały się między innymi wysokim stopniem złośliwości histologicznej ( $p=0,017$ ), natomiast ekspresja PSGL-1 na TILs korelowała z obecnością martwicy ( $p=0,014$ ) [4]. Zaobserwowano ponadto dodatnią korelację z obecnością VISTA i PSGL-1 w TILs. Pacjenci z PSGL-1-dodatnimi TILs w czopie i PSGL-1-dodatnimi komórkami nowotworowymi w guzie pierwotnym mieli znacznie krótszy czas przeżycia całkowitego (odpowiednio HR 2,27, 95% CI: 1,06-4,84,  $p=0,032$  oraz HR 3,42, 95% CI: 1,45-8,05,  $p=0,004$ , analiza jednoczynnikowa Coxa) [4]. Natomiast ekspresja PSGL-1 na komórkach nowotworowych w czopie i na TILs w guzach pierwotnych nie miała istotnego

---

wpływu na wyniki onkologiczne (analiza jednoczynnikowa Coxa). Co ciekawe, nasza analiza wykazała, że dodatni PSGL-1 na komórkach nowotworowych w guzie pierwotnym i na TILs w żylnym czopie nowotworowym korelowały z gorszym OS. Aby lepiej zbadać wpływ PSGL-1 na rokowanie, przeprowadziliśmy wielowymiarową analizę regresji Coxa, ale PSGL-1 nie zachował swojej wartości prognostycznej w modelu kontrolowanym przez stan węzłów chłonnych, przerzuty odległe, stopień złośliwości i martwicę [4]. Przeprowadzona analiza ekspresji PSGL-1 dostarcza danych sugerujących udział mechanizmów adhezyjnych w rozwoju czopa nowotworowego oraz jego potencjalnej roli w rozsiewie choroby. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami wskazującymi, że PSGL-1, znany przede wszystkim ze swojej roli w transporcie leukocytów i adhezji śródbłonkowej, może przyczyniać się do potencjału przerzutowego komórek nowotworowych poprzez wzmacnianie ich właściwości adhezyjnych w warunkach naprężeń ścinających (ang. shear stress) występujących w krwiobiegu [120]. Natomiast w innym badaniu sugerowano, że PSGL-1 odgrywa rolę w promowaniu infiltracji komórek odpornościowych i hamowaniu wzrostu guza pierwotnego w modelu mysim [121]. Ta rozbieżność podkreśla złożoną w zależności od kontekstu rolę PSGL-1 w biologii nowotworów. Związek ekspresji PSGL-1 z wysokim stopniem złośliwości zarówno guzów pierwotnych, jak i czopów może dodatkowo potwierdzać jego rolę w zwiększaniu agresywności nowotworu. Ponadto obecność TILs PSGL-1-dodatnich w czopach korelowała z martwicą guza, która jest kolejnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w przypadku ccRCC. Zróżnicowanie ekspresji tego markera pomiędzy guzem pierwotnym a czopem żylnym wzmacnia koncepcję odrębności biologicznej tych dwóch kompartmentów i wskazuje na możliwe kierunki badań w zakresie personalizacji leczenia. Prezentowane wyniki sugerują, że dodatkowa ocena PSGL-1 w czopach żylnych, oprócz guzów pierwotnych, może zapewnić bardziej kompleksowy obraz prognostyczny i potencjalnie pomóc w wyborze strategii terapeutycznych.

W pracy nr 3 wykazano, że częstotliwość występowania STING w obu analizowanych kompartmentach była podobna oraz nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w barwieniu błonowym i cytoplazmatycznym tego białka ( $p=0,18$ , test Wilcoxon). Następnie, ekspresja STING w cytoplazmie nie była istotnie związana z większością zmiennych kliniczno-patologicznych (średnica guza, obecność przerzutów do węzłów chłonnych lub odległych oraz stopień złośliwości guza) podczas analizy zarówno guza pierwotnego, jak i VTT. Jednak ekspresja STING w VTT była dodatnio skorelowana z martwicą ( $p=0,0023$ , test Wilcoxon) [19]. W badaniach wskazano, że ekspresja PD-L1 w raku nerki może korelować z bardziej agresywnym przebiegiem choroby, a jej obecność w czopie nowotworowym może mieć odmienne znaczenie prognostyczne niż w guzie pierwotnym [74, 75]. Szczególne znaczenie w kontekście rokowniczym przypisuje się cząsteczkom immunologicznych punktów kontroli, takim jak PD-L1 oraz VISTA i w tym aspekcie ocena ko-ekspresji tych biomarkerów została zestawiona w pracy nr 3 z ekspresją STING. PD-L1 w guzie pierwotnym był dodatnio skorelowany z STING w komórkach nowotworowych w tym samym kompartmentcie ( $p=0,02$ , test Wilcoxon), ale już nie w samym czopie nowotworowym [19]. VISTA, uznawana za jeden z tzw. „checkpointów nowej generacji”, jest cząsteczką szczególnie interesującą w kontekście czopa nowotworowego, gdyż jej ekspresja na komórkach układu odpornościowego może

---

sprzyjać lokalnej immunosupresji i ułatwiać progresję choroby [2, 3]. W pracy nr 3 ekspresja VISTA była związana z obecnością cytoplazmatycznego STING wyłącznie w VTT ( $p=0,049$ , test Wilcozona) [19]. Jeśli chodzi o komórki naciekające guz, obecność TILs była związana z dodatnią ekspresją PD-L1 w guzie pierwotnym ( $p=0,008$ , chi-kwadrat). Ponadto, zaobserwowano dodatnią korelację między ekspresją STING a obecnością TILs, ale tylko w guzie pierwotnym ( $p<0,05$ ) [19]. Odkrycia te zapewniają wgląd w odrębne mikrośrodowiska nowotworowe pierwotnego RCC i VTT, co może mieć potencjalnie znaczenie dla planowania nowych strategii leczenia.

Autorzy donoszą o istnieniu podwójnej roli STING, jeżeli chodzi o odpowiedź przeciwnowotworową i, zależne od kontekstu, efekty pro- i przeciwnowotworowe [122]. W mysim modelu gruczolaka wykazano, że ogólnoustrojowe podawanie agonistów STING eliminuje „uśpione” przerzuty (ang. dormant metastasis), stanowiąc specyficzny punkt kontrolny przeciwko progresji [123]. W kolejnym badaniu zaobserwowano, że komórki nowotworowe mogą aktywować sygnalizację STING poprzez transfer cGAMP, a to z kolei powoduje produkcję cytokin zapalnych, tj. IFN- $\alpha$  i TNF- $\alpha$  [124], podczas gdy inni autorzy donoszą, że aktywacja może regulować w górę cytokiny immunosupresyjne, takie jak IL-10, a następnie aktywować hamujące limfocyty T regulatorowe [125]. Co ciekawe, doniesiono, że STING jest silnie ekspresjonowany w niektórych przypadkach RCC [122, 126] i może być odwrotnie związany z obecnością TILs i złym rokowaniem [6, 126]. Powyższe wyniki z pracy nr 3 częściowo pokrywają się z tą obserwacją, ponieważ ekspresja STING w VTT korelowała z gorszym czasem przeżycia, podczas gdy ekspresja STING w guzie pierwotnym nie miała znaczenia prognostycznego. Ta specyficzna dla danego kompartmentu różnica sugeruje odrębne procesy biologiczne regulujące STING w różnych lokalizacjach nowotworów. Korelacja między ekspresją STING a martwicą obserwowaną wyłącznie w przedziale VTT potwierdza wcześniejszą hipotezę, że podwyższony poziom STING jest markerem agresywnego RCC [6]. Podejścia terapeutyczne ukierunkowane na STING okazały się obiecujące, a wstępne wyniki badań nad nanocząsteczkami lipidowymi zawierającymi agonistę STING (STING-LNP) w leczeniu RCC z przerzutami płucnymi zostały już przedstawione [127]. Wraz z oceną podgrup rokowniczych nowotworu stwierdzono również, że STING jest narzędziem prognostycznym istotnie związanym z martwicą nowotworu, zróżnicowaniem sarkomatoidalnym i odległymi przerzutami w RCC [6]. W związku z tym szlak STING może kształtować mikrośrodowisko nowotworu poprzez multimodalne osie prozapalne, prowadząc z jednej strony do wzrostu guza i przerzutów, a z drugiej strony do konieczności stosowania terapii wielolekowych w połączeniu z agonistą STING. W badaniach klinicznych wykazano, że samo ukierunkowanie na STING może indukować ekspresję ligandów punktów kontrolnych [128]. Połączenie agonistów STING z blokadą PD-1 może z kolei przezwyciężyć oporność na monoterapię blokady immunologicznych punktów kontrolnych, co stanowi uzasadnienie dla stosowania terapii skojarzonych [110].

Chociaż odnotowano obecność TILs w RCC, ich wartość w ocenie rokowania pozostaje niepewna. Wartość prognostyczna TILs okazała się szczególnie cennym odkryciem w naszym badaniu nad RCC z VTT (praca nr 3), wykazując znaczenie co do rokowania w obu kompartmentach. W przeciwieństwie do immunohistochemii potrzebnej do barwienia PSGL-

---

1 czy STING, ocena TILs nie wymaga dodatkowych odczynników i może być łatwo włączona do rutynowej oceny histopatologicznej. Ta praktyczna zaleta w połączeniu z obiecującą wartością prognostyczną sprawia, że ocena TILs jest atrakcyjnym predyktorem do zastosowania klinicznego. Warto podkreślić, że mogą istnieć możliwe interakcje między obecnością TILs a markerami immunologicznych punktów kontrolnych, ponieważ uważa się, że guzy RCC z PD-1-dodatnimi TILs wykazują bardziej agresywne cechy kliniczne [129]. W naszym badaniu stwierdziliśmy, że TILs były związane z dodatnią ekspresją PD-L1 i STING wyłącznie w kompartmentach guza pierwotnego.

W pracach nr 2 i 3 wykazano istotne znaczenie mikrośrodowiska immunologicznego czopa nowotworowego, w szczególności obecności i charakteru nacieków komórkowych. Ocena leukocytarna okazała się prostym, powtarzalnym i możliwym do wdrożenia w rutynowej praktyce patomorfologicznej czynnikiem prognostycznym, zarówno w guzie pierwotnym, jak i w czopie nowotworowym. Wyniki te podkreślają rolę lokalnej odpowiedzi immunologicznej jako jednego z kluczowych elementów determinujących przebieg choroby. Łącznie wyniki przedstawionych prac prowadzą do wniosku, że rak jasnokomórkowy nerki z żylnym czopem nowotworowym powinien być postrzegany jako choroba o szczególnej biologii, w której czop nowotworowy stanowi istotny komponent determinujący rokowanie. Uzyskane dane wskazują, że uwzględnienie biologicznych i immunologicznych cech czopa nowotworowego może dostarczyć dodatkowych informacji prognostycznych, wykraczających poza klasyczne parametry kliniczne i anatomiczne stosowane w urologii. Wnioski płynące z niniejszego cyklu publikacji mają potencjalne znaczenie praktyczne. Wskazują one na zasadność dalszych badań nad wykorzystaniem markerów immunologicznych oraz oceny mikrośrodowiska czopa nowotworowego w procesie stratyfikacji ryzyka i podejmowania decyzji terapeutycznych u chorych na raka nerki. Przesunięcie akcentu wyłącznie chirurgicznego postrzegania czopa nowotworowego w stronę jego biologicznej interpretacji może w przyszłości przyczynić się do rozwoju bardziej zindywidualizowanego podejścia do leczenia tej szczególnie wymagającej grupy pacjentów.

Interpretując wyniki prac numer 2 i 3, należy wziąć pod uwagę pewne ograniczenia badań retrospektywnych i związane z nimi potencjalne błędy selekcji. Analizowana grupa pacjentów składała się głównie z chorych w stadium T3a, u których oczekiwane są lepsze wyniki w porównaniu z przypadkami bardziej zaawansowanymi lokalnie. Ponadto nie były dostępne subanalizy populacji TILs. Badanie przeprowadzono na TMA, a ich ocena może nie odzwierciedlać w pełni całego mikrośrodowiska guza. Przyszłe badania powinny obejmować większe kohorty, walidację w niezależnych zestawach danych oraz analizy funkcjonalne w celu wyjaśnienia przyczyn podstaw zachowania omawianych biomarkerów w poszczególnych kompartmentach.

---

## Wnioski

1. Chociaż leczenie chirurgiczne pozostaje podstawową metodą leczenia RCC z żylnym czopem nowotworowym, ostatnie postępy w badaniach nad biologią nowotworów i ich mikrośrodowiskiem rzucają nieco światła na perspektywy na przyszłość. Powstawanie czopa nowotworowego jest złożonym procesem, którego zrozumienie może doprowadzić do powstania nowych terapii, przyczyniających się nie tylko do poprawy wyników onkologicznych, ale także bezpieczeństwa pacjentów w tych zagrażających życiu stanach. Może umożliwić też wdrożenie leczenia neoadjuwantowego, ukierunkowanego na downstaging guza i ograniczenie zakresu operacji.

2. Zwiększona ekspresja PSGL-1 w żylnych czopach nowotworowych sugeruje jego potencjalną rolę w ułatwianiu interakcji komórek nowotworowych z płytkami krwi i śródbłonkiem, co może przyczyniać się do szerzenia się przerzutów oraz gorszych wyników leczenia. Chociaż PSGL-1 częściej ulega ekspresji w komórkach nowotworowych czopa niż w komórkach guza pierwotnego, jego wartość prognostyczna dotyczy wyłącznie kompartmentu guza pierwotnego.

3. W niniejszej rozprawie wykazano specyficzne dla kompartmentów wzorce ekspresji STING u pacjentów z RCC z żylnym czopem nowotworowym, przy czym znaczenie prognostyczne ograniczone było do kompartmentu czopa.

4. Wyraźne korelacje między STING a markerami punktów kontrolnych układu odpornościowego w różnych przedziałach sugerują istnienie złożonych mechanizmów regulacji immunologicznej, które wymagają dalszych badań.

5. Ocena występowania TILs okazała się istotnym narzędziem prognostycznym, stąd praktyczna ocena TILs, niewymagająca dodatkowego barwienia, przemawia za jej potencjalnym wdrożeniem w rutynowej praktyce patologicznej.

6. Ocena biomarkerów prognostycznych w ccRCC powinna uwzględniać specyficzne środowiska różnych kompartmentów choroby.

---

## Bibliografia

1. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, *TNM classification of malignant tumors, ed. U.I.U.A.*, Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA 2009. **7**.
2. Zapala, L., et al., *Evaluation of PD-L1 (E1L3N, 22C3) expression in venous tumor thrombus is superior to its assessment in renal tumor in predicting overall survival in renal cell carcinoma.* Urol Oncol, 2022. **40**(5): p. 200 e1-200 e10.
3. Zapala, L., et al., *Immune checkpoint receptor VISTA on immune cells is associated with expression of T-cell exhaustion marker TOX and worse prognosis in renal cell carcinoma with venous tumor thrombus.* J Cancer Res Clin Oncol, 2023. **149**(7): p. 4131-4139.
4. Peksa, R., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is diversely expressed in the primary tumour and venous thrombus of clear cell renal cancer and correlates with poor overall survival.* Contemp Oncol (Pozn), 2024. **28**(3): p. 253-259.
5. Koppel, C., et al., *Optimization and validation of PD-L1 immunohistochemistry staining protocols using the antibody clone 28-8 on different staining platforms.* Mod Pathol, 2018. **31**(11): p. 1630-1644.
6. Marletta, S., et al., *STING is a prognostic factor related to tumor necrosis, sarcomatoid dedifferentiation, and distant metastasis in clear cell renal cell carcinoma.* Virchows Arch, 2023. **483**(1): p. 87-96.
7. Team, R.C., *A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020.
8. Kassambara, A.K., M.; Biecek, P. *Survminer, Drawing Survival Curves Using "ggplot2".* R Package Version 0.4.8. 2020, 2020.
9. Sharma, S., et al., *Biology of renal cancer tumor thrombus - towards the personalized approach.* Crit Rev Oncol Hematol, 2025. **211**: p. 104731.
10. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* CA Cancer J Clin, 2024. **74**(3): p. 229-263.
11. Mohanty, S.K., A. Lobo, and L. Cheng, *The 2022 revision of the World Health Organization classification of tumors of the urinary system and male genital organs: advances and challenges.* Hum Pathol, 2023. **136**: p. 123-143.
12. Bex A., et al. *EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma 2025.*
13. Escudier, B., et al., *Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†.* Ann Oncol, 2019. **30**(5): p. 706-720.
14. Linehan, W.M., et al., *The Metabolic Basis of Kidney Cancer.* Cancer Discov, 2019. **9**(8): p. 1006-1021.
15. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma.* Nature, 2013. **499**(7456): p. 43-9.
16. Hakimi, A.A., C.G. Pham, and J.J. Hsieh, *A clear picture of renal cell carcinoma.* Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 849-50.
17. Vuong, L., et al., *Tumor Microenvironment Dynamics in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma.* Cancer Discov, 2019. **9**(10): p. 1349-1357.
18. Motzer, R.J., et al., *Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma.* N Engl J Med, 2015. **373**(19): p. 1803-13.
19. Sharma, S., et al., *Increased Immunohistochemical Expression of Stimulator of Interferon Genes (STING) in Renal Cancer with Venous Tumor Thrombus Is Associated with Worse Prognosis.* Biomedicines, 2025. **13**(11).
20. Powles, T., et al., *ESMO Clinical Practice Guideline update on the use of immunotherapy in early stage and advanced renal cell carcinoma.* Ann Oncol, 2021.
21. Agochukwu, N. and B. Shuch, *Clinical management of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus.* World J Urol, 2014. **32**(3): p. 581-9.

22. Liss, M.A., et al., *Immunogenic Heterogeneity of Renal Cell Carcinoma With Venous Tumor Thrombus*. *Urology*, 2019. **124**: p. 168-173.
23. Martini, A., et al., *Neoadjuvant and adjuvant immunotherapy in renal cell carcinoma*. *World J Urol*, 2021. **39**(5): p. 1369-1376.
24. Gu, L., et al., *A systematic review and meta-analysis of clinicopathologic factors linked to oncologic outcomes for renal cell carcinoma with tumor thrombus treated by radical nephrectomy with thrombectomy*. *Cancer Treat Rev*, 2018. **69**: p. 112-120.
25. Neves, R.J. and H. Zincke, *Surgical treatment of renal cancer with vena cava extension*. *Br J Urol*, 1987. **59**(5): p. 390-5.
26. Blute, M.L., et al., *The Mayo Clinic experience with surgical management, complications and outcome for patients with renal cell carcinoma and venous tumour thrombus*. *BJU Int*, 2004. **94**(1): p. 33-41.
27. Hatakeyama, S., et al., *Prognostic benefit of surgical management in renal cell carcinoma patients with thrombus extending to the renal vein and inferior vena cava: 17-year experience at a single center*. *BMC Urol*, 2013. **13**: p. 47.
28. Turajlic, S., et al., *Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal*. *Cell*, 2018. **173**(3): p. 581-594.e12.
29. Kim, K., et al., *Determinants of renal cell carcinoma invasion and metastatic competence*. *Nature Communications*, 2021. **12**(1): p. 5760.
30. Jilaveanu, L.B., et al., *PD-L1 Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: An Analysis of Nephrectomy and Sites of Metastases*. *J Cancer*, 2014. **5**(3): p. 166-72.
31. Zak, K.M., et al., *Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1*. *Structure*, 2015. **23**(12): p. 2341-2348.
32. Gu, L., et al., *Neoadjuvant therapy in renal cell carcinoma with tumor thrombus: A systematic review and meta-analysis*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2024. **196**: p. 104316.
33. Ng, C., et al., *Clinical Outcomes and Safety Profile of Neoadjuvant PD-1 Inhibitors Combined With VEGFR-TKI Versus VEGFR-TKI in Nonmetastatic Renal Cell Carcinoma*. *Clin Genitourin Cancer*, 2025. **23**(4): p. 102353.
34. Pereira, J., et al., *Perioperative Systemic Therapy in Localized Renal Cell Carcinoma: Current Evidence and Future Directions*. *Cureus*, 2025. **17**(12): p. e99211.
35. Qin, S., et al., *Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4*. *Mol Cancer*, 2019. **18**(1): p. 155.
36. Klatte, T., et al., *Prognostic factors for renal cell carcinoma with tumor thrombus extension*. *J Urol*, 2007. **178**(4 Pt 1): p. 1189-95; discussion 1195.
37. Cai, Q., et al., *Ontological analyses reveal clinically-significant clear cell renal cell carcinoma subtypes with convergent evolutionary trajectories into an aggressive type*. *EBioMedicine*, 2020. **51**: p. 102526.
38. Warsow, G., et al., *Genomic features of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 7477.
39. Powles, T., et al., *Updated European Association of Urology Guidelines: Recommendations for the Treatment of First-line Metastatic Clear Cell Renal Cancer*. *Eur Urol*, 2018. **73**(3): p. 311-315.
40. Yang, B., et al., *Impact of sarcomatoid differentiation and rhabdoid differentiation on prognosis for renal cell carcinoma with vena caval tumour thrombus treated surgically*. *BMC Urol*, 2020. **20**(1): p. 14.
41. Barashi, N.S., et al., *Growth kinetics of venous tumor thrombus in patients with renal cell carcinoma*. *Urol Oncol*, 2024. **42**(2): p. 31.e17-31.e23.
42. Qu, L., et al., *Development and validation of a prognostic model incorporating tumor thrombus grading for nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus: A multicohort study*. *MedComm (2020)*, 2023. **4**(4): p. e300.
43. Wu, Z., et al., *Prognostic Significance of Grade Discrepancy Between Primary Tumor and Venous Thrombus in Nonmetastatic Clear-cell Renal Cell Carcinoma: Analysis of the*

- 
- REMEMBER Registry and Implications for Adjuvant Therapy. Eur Urol Oncol, 2024. 7(1): p. 112-121.*
44. Kim, K., et al., *Determinants of renal cell carcinoma invasion and metastatic competence. Nat Commun, 2021. 12(1): p. 5760.*
  45. Kaushik, D., et al., *The impact of histology on clinicopathologic outcomes for patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus: a matched cohort analysis. Urology, 2013. 82(1): p. 136-41.*
  46. Rodriguez Faba, O., et al., *Impact of Microscopic Wall Invasion of the Renal Vein or Inferior Vena Cava on Cancer-specific Survival in Patients with Renal Cell Carcinoma and Tumor Thrombus: A Multi-institutional Analysis from the International Renal Cell Carcinoma-Venous Thrombus Consortium. Eur Urol Focus, 2018. 4(3): p. 435-441.*
  47. Kim, K.H., et al., *Type II papillary histology predicts poor outcome in patients with renal cell carcinoma and vena cava thrombus. BJU Int, 2012. 110(11 Pt B): p. E673-8.*
  48. Rabinowitz, M.J., et al., *Characterizing Tumor Thrombus Arising from Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Eur Urol Open Sci, 2022. 43: p. 28-34.*
  49. Zini, L., et al., *Renal vein ostium wall invasion of renal cell carcinoma with an inferior vena cava tumor thrombus: prediction by renal and vena caval vein diameters and prognostic significance. J Urol, 2008. 179(2): p. 450-4; discussion 454.*
  50. Adams, L.C., et al., *Renal cell carcinoma with venous extension: prediction of inferior vena cava wall invasion by MRI. Cancer Imaging, 2018. 18(1): p. 17.*
  51. Liu, N.W., et al., *The Prognostic Impact of a Positive Vascular Margin on pT3 Clear Cell Renal Cell Carcinoma. J Urol, 2016. 195(2): p. 264-9.*
  52. Wu, Z., et al., *L1CAM deployed perivascular tumor niche promotes vessel wall invasion of tumor thrombus and metastasis of renal cell carcinoma. Cell Death Discov, 2023. 9(1): p. 112.*
  53. Niu, S., et al., *Genomic Landscape of Chinese Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients With Venous Tumor Thrombus Identifies Chromosome 9 and 14 Deletions and Related Immunosuppressive Microenvironment. Front Oncol, 2021. 11: p. 646338.*
  54. Tumkur Sitaram, R., et al., *Significance of PI3K signalling pathway in clear cell renal cell carcinoma in relation to VHL and HIF status. J Clin Pathol, 2021. 74(4): p. 216-222.*
  55. Gossage, L., et al., *Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer, 2014. 53(1): p. 38-51.*
  56. Wang, T., et al., *An Empirical Approach Leveraging Tumorgrafts to Dissect the Tumor Microenvironment in Renal Cell Carcinoma Identifies Missing Link to Prognostic Inflammatory Factors. Cancer Discovery, 2018. 8(9): p. 1142-1155.*
  57. Motzer, R.J., et al., *Molecular Subsets in Renal Cancer Determine Outcome to Checkpoint and Angiogenesis Blockade. Cancer Cell, 2020. 38(6): p. 803-817.e4.*
  58. Carril-Ajuria, L., et al., *Prognostic and Predictive Value of PBRM1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Cancers (Basel), 2019. 12(1).*
  59. Zhou, J., et al., *Proteomic analysis reveals distinctive protein expression patterns of thrombus in clear cell renal cell carcinoma. Transl Oncol, 2021. 14(1): p. 100895.*
  60. Verghe, D.C., et al., *Impact of miR-21, miR-126 and miR-221 as prognostic factors of clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus of the inferior vena cava. PLoS One, 2014. 9(10): p. e109877.*
  61. Zhu, S., et al., *MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. Cell Res, 2008. 18(3): p. 350-9.*
  62. Liu, B., et al., *MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. Lung Cancer, 2009. 66(2): p. 169-75.*
  63. Krebs, M., et al., *miR-221-3p Regulates VEGFR2 Expression in High-Risk Prostate Cancer and Represents an Escape Mechanism from Sunitinib In Vitro. J Clin Med, 2020. 9(3).*
  64. Gilyazova, I., et al., *MicroRNA Expression Signatures in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: High-Throughput Searching for Key miRNA Markers in Patients from the Volga-Ural Region of Eurasian Continent. Int J Mol Sci, 2023. 24(8).*

- 
65. Wilcox, I., K.H. Chan, and J.D. Lattimore, *Hypoxia and inflammation*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1976-7; author reply 1977.
  66. Kaushik, D., et al., *Nuclear NADPH oxidase-4 associated with disease progression in renal cell carcinoma*. Transl Res, 2020. **223**: p. 1-14.
  67. Morgantetti, G., et al., *Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in vena cava tumour thrombi of clear cell renal cell carcinoma suggests a role for PSMA-driven tumour neoangiogenesis*. Transl Androl Urol, 2019. **8**(Suppl 2): p. S147-s155.
  68. Wang, H.L., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen in lung cancer cells and tumor neovasculature endothelial cells and its clinical significance*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125924.
  69. Wang, F., et al., *Advances in PSMA-targeted therapy for prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2022. **25**(1): p. 11-26.
  70. Cha, J.H., et al., *Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer*. Mol Cell, 2019. **76**(3): p. 359-370.
  71. Errarte, P., G. Larrinaga, and J.I. López, *The role of cancer-associated fibroblasts in renal cell carcinoma. An example of tumor modulation through tumor/non-tumor cell interactions*. J Adv Res, 2020. **21**: p. 103-108.
  72. Thompson, R.H., et al., *Serum-soluble B7x is elevated in renal cell carcinoma patients and is associated with advanced stage*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6054-8.
  73. Ilie, M., et al., *Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies*. Ann Oncol, 2016. **27**(1): p. 147-53.
  74. Mikami, S., et al., *Clinical significance of programmed death-1 and programmed death-ligand 1 expression in the tumor microenvironment of clear cell renal cell carcinoma*. Cancer Sci, 2019. **110**(6): p. 1820-1828.
  75. Lopez, J.I., et al., *Loss of PD-L1 (SP-142) expression characterizes renal vein tumor thrombus microenvironment in clear cell renal cell carcinoma*. Ann Diagn Pathol, 2018. **34**: p. 89-93.
  76. Qiu, Y., et al., *NKG2A(+)CD8(+) T cells infiltration determines immunosuppressive contexture and inferior response to immunotherapy in clear cell renal cell carcinoma*. J Immunother Cancer, 2024. **12**(1).
  77. Liss, M.A., et al., *Microbiome within Primary Tumor Tissue from Renal Cell Carcinoma May Be Associated with PD-L1 Expression of the Venous Tumor Thrombus*. Adv Urol, 2020. **2020**: p. 9068068.
  78. Zhang, M., et al., *Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer metastasis by excretion of miR-122-5p from cells via exosomes*. iScience, 2023. **26**(9): p. 107686.
  79. Franzin, R., et al., *The Use of Immune Checkpoint Inhibitors in Oncology and the Occurrence of AKI: Where Do We Stand?* Front Immunol, 2020. **11**: p. 574271.
  80. Hong, S., et al., *Establishment of an Ex Vivo Tissue Culture Model for Evaluation of Antitumor Efficacy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 851191.
  81. Kawashima, A., et al., *Tumour grade significantly correlates with total dysfunction of tumour tissue-infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 6220.
  82. Wang, X., et al., *TOX promotes the exhaustion of antitumor CD8(+) T cells by preventing PD1 degradation in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2019. **71**(4): p. 731-741.
  83. Lavacchi, D., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Renal Cancer: Current State and Future Perspective*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(13).
  84. Johnston, R.J., et al., *VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1*. Nature, 2019. **574**(7779): p. 565-570.
  85. Shi, Y., et al., *Decoding the multicellular ecosystem of vena caval tumor thrombus in clear cell renal cell carcinoma by single-cell RNA sequencing*. Genome Biol, 2022. **23**(1): p. 87.
  86. Shang, B., et al., *Prognostic Significance of NLR About NETosis and Lymphocytes Perturbations in Localized Renal Cell Carcinoma With Tumor Thrombus*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 771545.

- 
87. Peyton, C.C., et al., *The Value of Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Patients Undergoing Cytoreductive Nephrectomy with Thrombectomy*. Eur Urol Focus, 2020. **6**(1): p. 104-111.
  88. Zapala, L., et al., *Low Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Is the Potential Indicator of Worse Overall Survival in Patients with Renal Cell Carcinoma and Venous Tumor Thrombus*. Diagnostics (Basel), 2021. **11**(11).
  89. Khagi, Y., R. Kurzrock, and S.P. Patel, *Next generation predictive biomarkers for immune checkpoint inhibition*. Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(1): p. 179-190.
  90. Cools-Lartigue, J., et al., *Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis*. J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3446-58.
  91. Hu, W., et al., *Neutrophil extracellular traps facilitate cancer metastasis: cellular mechanisms and therapeutic strategies*. J Cancer Res Clin Oncol, 2023. **149**(5): p. 2191-2210.
  92. Nakazawa, D., et al., *Activated platelets induce MLKL-driven neutrophil necroptosis and release of neutrophil extracellular traps in venous thrombosis*. Cell Death Discovery, 2018. **4**(1): p. 71.
  93. Yang, L., et al., *Based on disulfidptosis, revealing the prognostic and immunological characteristics of renal cell carcinoma with tumor thrombus of vena cava and identifying potential therapeutic target AJAP1*. J Cancer Res Clin Oncol, 2023. **149**(12): p. 9787-9804.
  94. Caine, G.J., et al., *The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate*. Neoplasia, 2002. **4**(6): p. 465-73.
  95. Lima, L.G. and R.Q. Monteiro, *Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression*. Biosci Rep, 2013. **33**(5).
  96. Kołodziejczyk, J. and M.B. Ponczek, *The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression*. Contemp Oncol (Pozn), 2013. **17**(2): p. 113-9.
  97. Mackman, N. and M. Taubman, *Tissue factor: past, present, and future*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(12): p. 1986-8.
  98. Callander, N.S., N. Varki, and L.V. Rao, *Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors*. Cancer, 1992. **70**(5): p. 1194-201.
  99. Silva, D.D., et al., *Increased tissue factor expression is an independent predictor of mortality in clear cell carcinoma of the kidney*. Int Braz J Urol, 2014. **40**(4): p. 499-506.
  100. Silva, D.D., et al., *Serum tissue factor as a biomarker for renal clear cell carcinoma*. Int Braz J Urol, 2018. **44**(1): p. 38-44.
  101. John, A., et al., *Role of the Coagulation System in Genitourinary Cancers: Review*. Clin Genitourin Cancer, 2017.
  102. Shapiro, R.L., et al., *Induction of primary cutaneous melanocytic neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild-type mice: cellular blue nevi invade but do not progress to malignant melanoma in uPA-deficient animals*. Cancer Res, 1996. **56**(15): p. 3597-604.
  103. Burysek, L., T. Syrovets, and T. Simmet, *The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33509-17.
  104. Chandrasekar, N., et al., *Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells*. Oncogene, 2003. **22**(3): p. 392-400.
  105. Ismail, A.A., B.T. Shaker, and K. Bajou, *The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis*. Int J Mol Sci, 2021. **23**(1).
  106. Ward, M.P., et al., *Platelets, immune cells and the coagulation cascade; friend or foe of the circulating tumour cell?* Mol Cancer, 2021. **20**(1): p. 59.
  107. Yan, X.Q., et al., *Toripalimab plus axitinib versus sunitinib as first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: RENOTORCH, a randomized, open-label, phase III study*. Ann Oncol, 2024. **35**(2): p. 190-199.
  108. Hsu, M. and N. Balzer-Haas, *When Clot Is Tumor: A Roadmap to Anticoagulation in Renal Cell Carcinoma With Tumor Thrombus*. JACC CardioOncol, 2022. **4**(4): p. 532-534.
  109. Zhu, Y., et al., *STING: a master regulator in the cancer-immunity cycle*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 152.

- 
110. Fu, J., et al., *STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(283): p. 283ra52.
  111. Calìò, A., et al., *Stimulator of interferon genes (STING) immunohistochemical expression in the spectrum of perivascular epithelioid cell (PEC) lesions of the kidney*. *Pathology*, 2021. **53**(5): p. 579-585.
  112. Russo, H.M., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 regulates adhesive properties of the endothelium and leukocyte trafficking into adipose tissue*. *Circ Res*, 2010. **107**(3): p. 388-97.
  113. Peng, C., et al., *Role of presurgical targeted molecular therapy in renal cell carcinoma with an inferior vena cava tumor thrombus*. *Onco Targets Ther*, 2018. **11**: p. 1997-2005.
  114. Zhang, Y., et al., *Comparative analysis of surgical and oncologic outcomes of robotic, laparoscopic and open radical nephrectomy with venous thrombectomy: a propensity-matched cohort study*. *Int J Clin Oncol*, 2023. **28**(1): p. 145-154.
  115. Okamura, Y., et al., *Presurgical Pazopanib Improves Surgical Outcomes for Renal Cell Carcinoma With High-level IVC Tumor Thrombosis*. *In Vivo*, 2019. **33**(6): p. 2013-2019.
  116. Cost, N.G., et al., *The impact of targeted molecular therapies on the level of renal cell carcinoma vena caval tumor thrombus*. *Eur Urol*, 2011. **59**(6): p. 912-8.
  117. Beltagy, A., et al., *Sunitinib cause delayed complete response on metastatic RCC and extensive IVC thrombus, but not to the kidney tumor: a case report and review of literature*. *J Surg Case Rep*, 2019. **2019**(11): p. rjz326.
  118. Master, V.A., et al., *Neoadjuvant Nivolumab and Ipilimumab for Nonmetastatic Renal Cell Carcinoma with Tumor Thrombus*. *J Immunother Precis Oncol*, 2023. **6**(1): p. 50-55.
  119. Tabbara, M.M., et al., *Current Approaches in Surgical and Immunotherapy-Based Management of Renal Cell Carcinoma with Tumor Thrombus*. *Biomedicines*, 2023. **11**(1).
  120. Kappelmayer, J. and B. Nagy, Jr., *The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 6138145.
  121. Yamaoka, T., et al., *The roles of P- and E-selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in primary and metastatic mouse melanomas*. *J Dermatol Sci*, 2011. **64**(2): p. 99-107.
  122. Zhao, K., et al., *Targeting STING in cancer: Challenges and emerging opportunities*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023. **1878**(6): p. 188983.
  123. Hu, J., et al., *STING inhibits the reactivation of dormant metastasis in lung adenocarcinoma*. *Nature*, 2023. **616**(7958): p. 806-813.
  124. Chen, Q., et al., *Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer*. *Nature*, 2016. **533**(7604): p. 493-498.
  125. Field, C.S., et al., *Mitochondrial Integrity Regulated by Lipid Metabolism Is a Cell-Intrinsic Checkpoint for Treg Suppressive Function*. *Cell Metab*, 2020. **31**(2): p. 422-437.e5.
  126. An, X., et al., *An Analysis of the Expression and Association with Immune Cell Infiltration of the cGAS/STING Pathway in Pan-Cancer*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019. **14**: p. 80-89.
  127. Nakamura, T., et al., *Cancer Immunotherapy with Lipid Nanoparticles Loaded with a Stimulator of Interferon Genes Agonist against Renal Tumor Lung Metastasis*. *Pharmaceutics*, 2023. **16**(1).
  128. Song, H., et al., *Targeting tumor monocyte-intrinsic PD-L1 by rewiring STING signaling and enhancing STING agonist therapy*. *Cancer Cell*, 2025. **43**(3): p. 503-518.e10.
  129. González-Garza, R., et al., *Biomarkers for evaluating the clinical response to immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma (Review)*. *Oncol Rep*, 2024. **52**(6).

## Opinia Komisji Bioetycznej



### Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

Warszawa, dnia 19 kwietnia 2021r.

AKBE/ 72 / 2021

Dr n.med. Łukasz Zapała  
Katedra i Klinika Urologii Ogólnej  
Onkologicznej i Czynnościowej ,  
ul. Lindleya 4,  
02-005 Warszawa

### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w dniu 19 kwietnia 2021 r. przyjęła do wiadomości informację na temat badania pt. " Analiza wieloczynnikowa przeżycia chorych z rakiem nerki, z współwystępującym czopem nowotworowym( pT3a-cNxMx),poddanych leczeniu zabiegowemu." Przedstawione badanie nie stanowi eksperymentu medycznego w rozumieniu art. 21 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry(Dz.U. z 2018 r. poz. 617) i nie wymaga uzyskania opinii Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, o której mowa w art. 29 ust. 1 ww. ustawy.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz

## Oświadczenia współautorów publikacji

Warszawa, 10.11.2025 r.

### Oświadczenie współautorów publikacji (1)

Niniejszym podaję merytoryczny oraz procentowy wkład autorski w publikację pt. :

*Biology of renal cancer tumor thrombus - towards the personalized approach.*

Critical Reviews in Oncology/Hematology, Jul 2025.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104731>

**Sumit Sharma**, Michał Kunc, Mieszko Czaplinski, Weronika Łyzinska, Rafał Pęksa, Le Qu, Piotr Radziszewski, Lukasz Zapala

SS: opracowanie założeń badania, zaplanowanie badania, zebranie materiałów źródłowych, analiza danych, interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu

MK, MC, WL: opracowanie założeń badania, zaplanowanie badania, zebranie materiałów źródłowych, pisanie oraz edycja manuskryptu

RP, LQ, PR, LZ: zaplanowanie badania, interpretacja uzyskanych wyników, nadzór nad pisanem oraz edycją manuskryptu

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Podpis współautora
Sumit Sharma	65%	Sumit Sharma
Michał Kunc	5%	Michał Kunc
Mieszko Czaplinski	5%	Mieszko Czaplinski
Weronika Łyzinska	5%	Weronika Łyzinska
Rafał Pęksa	5%	Rafał Pęksa
Le Qu	5%	Le Qu 卞乐
Piotr Radziszewski	5%	Piotr Radziszewski
Lukasz Zapala	5%	Lukasz Zapala

Warszawa, 10.11.2025 r.

### Oświadczenie współautorów publikacji (2)

Niniejszym podaję merytoryczny oraz procentowy wkład autorski w publikację pt. :

*P-selectin glycoprotein ligand-1 is diversely expressed in the primary tumour and venous thrombus of clear cell renal cancer and correlates with poor overall survival.*

Contemp Oncology, Oct 2024. DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2024.144225>



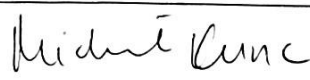


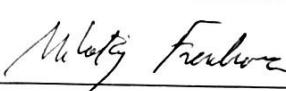
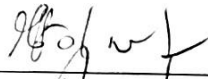


Rafał Pęksa\*, **Sumit Sharma\***, Michał Kunc, Marta Popęda, Le Qu, Mikołaj Frankiewicz, Marcin Folwarski, Piotr Radziszewski, Łukasz Zapala.

\* These authors contributed equally to this work.

RP, SS: opracowanie założeń badania, zaplanowanie badania, zebranie materiałów źródłowych, analiza danych, interpretacja uzyskanych wyników, pisanie manuskryptu

MK, MP, LQ, MF: zebranie materiałów źródłowych, interpretacja uzyskanych wyników, pisanie manuskryptu

RP, PR, LZ: zaplanowanie badania, interpretacja uzyskanych wyników, nadzór nad pisaniem oraz edycją manuskryptu

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Podpis współautora
Rafał Pęksa	40%	
Sumit Sharma	40%	
Michał Kunc	3%	
Marta Popęda	3%	
Le Qu	3%	
<del>Mikołaj</del> Michał Frankiewicz	3%	
Marcin Folwarski	3%	
Piotr Radziszewski	2%	
Łukasz Zapala	3%	

Warszawa, 10.11.2025 r.

### Oświadczenie współautorów publikacji (3)

Niniejszym podaję merytoryczny oraz procentowy wkład autorski w publikację pt. :

*Increased immunohistochemical expression of stimulator of interferon genes (STING) in renal cancer with venous tumor thrombus is associated with worse prognosis.*


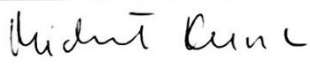


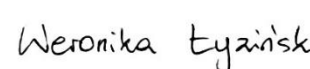
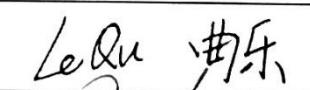
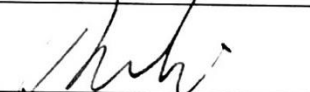
Biomedicines 2025, 13(11). DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines13112674>

**Sumit Sharma**, Michał Kunc, Rafał Pęksa, Aleksandra Ciarka, Weronika Łyzińska, Le Qu, Piotr Radziszewski, Łukasz Zapala

SS: opracowanie założeń pracy, zaplanowanie pracy, analiza materiałów źródłowych, interpretacja uzyskanych wyników, pisanie manuskryptu

MK, RP, AC, WL: zebranie materiałów źródłowych, interpretacja uzyskanych wyników, pisanie manuskryptu

LQ, PR, LZ: zaplanowanie badania, interpretacja uzyskanych wyników, nadzór nad pisaniem oraz edycją manuskryptu

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Podpis współautora
Sumit Sharma	65%	
Michał Kunc	5%	
Rafał Pęksa	5%	
Aleksandra Ciarka	5%	
Weronika Łyzińska	5%	
Le Qu	5%	
Piotr Radziszewski	5%	
Łukasz Zapala	5%	