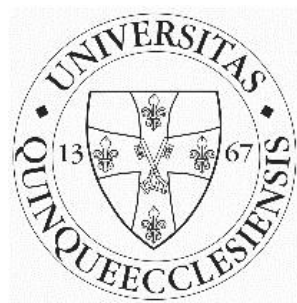


Embryonális eredetű vesetumorok molekuláris pathológiája

Doktori (PhD) értekezés tézisei

dr. Bányai Daniel

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ
Urológiai Klinika



Pécs, 2018

Doktori iskolavezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula

1. Bevezetés

A tézisben elvégzett vizsgálatok alapját Cohnheim 1882-ben felállított hipotézise képezte: “Die Hauptsache ist und bleibt immer, dass es ein Fehler, eine Unregelmässigkeit der embryonalen Anlage ist in der die eigentliche Ursache der späteren Geschwulst gesucht werden muss. Aber was wir als angeboren verlangen, ist ja nicht die Geschwulst, sondern lediglich die Anlage dazu, d.h. nach der von uns proponierten Formulierung die Existenz desjenigen über das physiologische Mass hinaus produzierten Zellenquantum, aus dem eine Geschwulst sich entwickeln kann“. Azaz olyan embrionális sejtekből, amelyek nem vesznek részt a normál szövetek képzésében, a későbbiek során tumor alakulhat ki. Ez nem azt jelenti, hogy az újszülöttek tumorról jönnek a világra, hanem egy „Anlage”, azaz a szövetek-szervek kialakulásához fölöslegben termelt sejtek csoportja az, amelyből később tumor fejlődése indulhat ki.

A vese fejlődése egy rendkívül összetett molekuláris biológiai folyamat, amelyben számos jelátviteli rendszer vesz részt. Ezeknek az időbeni és térbeni kifejeződése, a fehérjék szöveti gradiensének változása szabályozza a nefron kialakulását, és az ezt felépítő mintegy 25, működésében és citológiai megjelenésében különböző sejt kialakulását. Figyelembe véve a sejtek proliferációját és differenciálódását szabályozó jelátviteli rendszerek finoman összehangolt kölcsönhatását, nem meglepetés, hogy bármelyik gén időbeni és térbeni kifejeződésében bekövetkező változás felboríthatja az egyensúlyt, elősegítheti a sejtek proliferációját, gátolhatja a sejtek differenciálódását, vagy fordítva.

A differenciálódási zavar egyik következménye lehet a vese veleszületett rendellenessége, az ún. CAKUT (congenital anomalies of the kidney and urinary tract). Nem véletlen, hogy a vesebetegségben szenvedő gyerekek 40%-ában CAKUT fordul elő. Összefüggés lehet a vese működési zavarai és a tumormegelőző állapotok között is, ami a vese fejlődési zavarok összetettségére utalhat. Gyakori következménye a vese fejlődése zavarainak a gyermekkori tumorok, mint pl. a Wilms tumor (WT), a clear cell sarcoma of the kidney (CCSK), vagy a rhabdoid tumour of the kidney (RTK) kiindulása. A WT már hosszabb ideje elfogadott modell a tumorok embrionális maradvány sejtekből való kiindulásának vizsgálatára. A maradvány embrionális sejtek és sejtcsoportok, amelyek nem vesznek részt a vese végső formájának kialakításában, és nem, vagy csak részben differenciálódtak, azaz úgynevezett nefrogén maradványok (nephrogenic rest, NR) és a WT tumor közötti összefüggés az irodalomban jól dokumentált.

Csaknem 25 évvel ezelőtt történt már utalás arra, hogy a felnőttkori papilláris vesetumor (PRCT) is nagy valószínűséggel az élet folyamán fennmaradó embrionális maradványokból indul ki. A doktori tézis kidolgozása során elvégzett részletes szövettani vizsgálatok egy másik felnőttkori daganathoz - a mucinózus, tubuláris és orsósejtes karcinómához (mucinous tubular and spindle cell carcinoma, MTSCC) – társuló, embrionális maradványhoz hasonló elváltozásokat mutattak ki. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a vese embrionális fejlődésében bekövetkezett differenciálódási

zavar nem csak gyermekkori tumorok, hanem felnőtt korban előforduló tumorok kialakulásában is szerepet játszhat. Egy ritka, felnőttkorban jelentkező, éretlen sejtekből álló tumor, a metanephrogen adenóma (MA) eredete még nem bizonyított.

Az irodalomban jól dokumentált, hogy fenti tumorok egy részében hasonló szövettani formák fordulhatnak elő. A WT kis epitheliális sejtekből álló, szolid- tubuláris, vagy tubuláris-papilláris formája differenciál-diagnosztikai nehézséget okozhat, különösen, ha fiatalokban vagy felnőtt korban fordul elő. A nem "típusos" MA is megjelenhet hasonló formában, és így néha felnőttkori WT-nak diagnosztizálják. Bár az MTSCC a leírás szerint típusos sejtformációkból áll, amelyek mucinózus strómába vannak ágyazva, sokszor hiányzik a mucinózus stróma, és a szövettani kép is a fentebb leírt szolid-tubuláris-papilláris felépítést mutatja. A PRCT kis sejtjes formája gyakran mutat szolid, tubuláris növekedést. Így nem típusos esetekben a négy tumor differenciális diagnózisa nem egyszerű. Bár a genomikus elváltozások egyértelműen elkülönítik az egyes tumorokat, patológusok inkább az immunhisztológiát kedvelik. A genetikai vizsgálatokon kívül jelenleg nincs olyan immunhisztológiai marker (vagy markerek), amelyek ezen tumorok differenciális diagnózisában segítséget nyújtanának.

2. Célkitűzések

Az irodalomban egyértelműen elfogadott, hogy a Wilms' tumor nefrogén maradványokból indul ki, amelyek kialakulása a vese differenciálódási zavarára vezethető vissza.

Az MA, az MTSCC és a PRCT eredete az irodalomban vitatott, eltérő nézetek ismertek ezeknek a tumoroknak a különböző vese csatorna szakaszokhoz való hasonlósága és esetleges eredete közt.

Ennek tisztázására megvizsgáltunk

- 2.1. A Wilms' tumor és a kapcsolódó nefrogén maradványok immunhisztológiáját;
- 2.2. Genomikus DNS vizsgálattal egyértelműen azonosított MA szövettani változatait és ezek immunhisztológiai jellemzőit;
- 2.3. Genomikus DNS vizsgálattal egyértelműen diagnosztizált MTSCC, valamint az ehhez társuló prekursor léziók immunhisztológiai jellemzőit;
- 2.4. Genomikus DNS vizsgálattal diagnosztizált sporadikus és *MET*-mutációhoz kötött papilláris vesetumorok és prekursor léziók immunhisztológiai jellemzőit;
- 2.5. A főtális vesefejlődés során időben és térben kifejeződött géneket.

3. Anyag és módszer

3.1. Vizsgálati anyag

Mivel viszonylag ritka előfordulású tumorokról van szó, a vizsgálati anyagot évek során következő intézetekből gyűjtöttük össze: Pathologisches Institut, Ruprecht-Karls-Universitaet Heidelberg; Pathológiai Intézet, Általános Orvosi Kar, PTE, Pécs. Az anyag másik részét a témavezetőmhöz konzíliumba küldött esetekből választottuk ki. A WT-k között trifázisos- és bifázisos tumorok, valamint tiszta epitheliális és blasztémás típusú tumorok is előfordulnak. Rutin szövettani feldolgozás során makroszkóposan felismerhető nefrogén maradványokat külön paraffin blokkba ágyazták. Az MA, valamint az MTSCC esetek között számos típusos és atipusos szövettani megjelenésű tumor van. Az egyik betegből az MTSCC miatt eltávolított vese mellett bonctermi

anyagként a másik vese is elérhető volt. Mindkét vesét teljes egészében 47 és 67 paraffin blokkba ágyazták be, amelyek kiértékelése során számos prekursor lézió került felismerésre. Az immunhisztológiai vizsgálatokba bevont 76 papilláris vesetumor közt 18 eset szolid, vagy szolid-tubuláris növekedésű szövettani megjelenést mutatott. A PRCT-hez társuló prekursor léziókat a vese szövettani feldolgozásával azonosítottuk. Fötális vesék abortusz után, illetve az idősebb terhességből származók a fötuszok bonctermi vizsgálata során kerültek kivágásra és beágyazásra. A felnőttkori vese minták a nefrektomia során eltávolított veséből, a tumorról ellentétes pólusból lettek kivágva és beágyazva. A szövetszövetminták gyűjtését és feldolgozását a Ruprecht-Karls-Universität és a PTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyének birtokában végeztük el.

3.2. DNS kivonása

Nagy molekulású DNS kivonása fagyasztott szövetből proteináz K emésztés után fenol/kloroform módszerrel történt. Formalinban fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) mintákból DNS kivonása a már korábban leírt módszerrel történt.

3.3. Mikroszatellita vizsgálat:

Normál- és tumoros szövetből nyert genomikus DNS-ből a mikroszatellita lokuszok vizsgálata PCR alapú amplifikációval történt. Az összes lokusz vizsgálatára négy multiplex reakcióban került sor. A fluoreszcens módszerrel jelölt PCR termékek elektroforézise és értékelése a LI-COR 4300 DNS szekvenáló automatán történt.

3.4. Array CGH (DNS alapú összehasonlító genomikus hibridizáció)

Nagy molekulájú genomikus DNS hibridizálása a 105 k (105 000 DNS fragmentumot tartalmazó) mikroarray platformon, míg a formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetekből extrahált DNS hibridizálása a 44 k mikroarray platformon történt, a forgalmazó által javasolt protokoll szerint (Agilent Technologies, 5,0-ös verzió) (Szponar és mtsai, 2010). Az eredmények leolvasása az Agilent DNA Microarray Scanner (Agilent) felhasználásával történt, a használati útmutató szerint (2.0 vagy 5.0 változat). Az Agilent Scanner Control Software 7.0 változata 5 µm felbontásban, 100% foto-elektron sokszorozóval dolgozik mindkét csatornán. A nyers mikroarray képekből az AMADID 014950 (105k) és AMADID 014950 (44k) rács sablon segítségével a Feature Extraction Software 9.5 változatának felhasználásával nyertük ki az adatokat. A mikro array és a fragmentek kromoszómális elhelyezkedésének elemzése az Agilent CGH Analytics Software felhasználásával történt. A végső kiértékelést az ADM 2 algoritmus végezte, amelynek küszöbértéke 6,0 volt, a szűrő feltétel alapértelmezése szerint minimum 3 minta különbség volt a vizsgált régióban.

3.5. Tissue microarray (TMA) készítése

A vizsgálat során fötális és felnőtt egészséges veseszövetet, valamint különféle típusú vesetumort tartalmazó paraffin blokkokat használtunk fel TMA készítéséhez. A tumoros blokkokból készített hematoxilin-eozin festett metszetek áttekintése során jelöltük ki a reprezentatív területet, ez lett a mintavétel helye. Ezt követően a kijelölt területnek megfelelően a paraffinba ágyazott szövetblokkból a Manual Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments Inc. Sun Prairie, CA, USA) készülék segítségével 0.6 mm átmérőjű szövethengereket emeltünk ki. Különböző szövetszöveti megjelenésű, vagy

különböző nukleáris gráddal rendelkező tumorokból több (2-4) mintát vettünk. Az így kapott szövethengereket az MTA1 készülék segítségével egy egységes paraffin blokkba ágyasztuk be, így lehetőség volt 100-150 különböző minta egy metszeten történő egyidejű vizsgálatára. Az antitest festődés ellenőrzése céljából a TMA készítésekor egészséges főtális- és felnőtt vese mintákat is beépítettünk.

3.6. Immunhisztológia

A 4 µm vastag metszeteket hosszabb tárolásra paraffinba mártottuk. Az immunhisztológiai vizsgálat előtt a paraffinba mártott metszeteket legalább egy óráig xylolban egy 42C-os termosztátban inkubáltuk. A paraffin réteg eltávolítása után kétszer 10 perc tiszta xilol, 2x 10 perc 100 isopropyl alkohol következett, majd leszálló etanol sorban rehidráltuk a metszeteket. (2 x 100%, 96%, és 70%, egyenként 5-5 percig). A metszeteket pH7.4-es foszfát pufferben 2x5 percig kezeltük. Ezt követően az antigén feltárást pH6 illetve pH9 pufferben való forralással értük el, amit a 2100-Retriever (Pick-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia) készülékben végeztünk el. A nem specifikus kötőhelyek és az endogén peroxidáz blokkolása 1% normál ló szérumot tartalmazó 3%-os hidrogénperoxidban történt, szobahőmérsékleten, 10 percig. Ezt követően a metszeteket éjszakán át nedves kamrában 4°C-on inkubáltuk. A KRT7, AMACR, CD57 és WT1 antitestek vizsgálatát a BOND-MAX Automatikus IHC/ISH Stainer (Leica Biosystems) segítségével végeztük el, és a reakciót DAB (DAKO) segítségével tettük láthatóvá.

A metszetek kiértékelése a Leica LaborluxS mikroszkóppal történt, a fotókat a Leitz DMRBE mikroszkópra helyezett ProgRes C14 kamerával készítettük.

A következő antitesteket használtuk:

- **nyúl polyklonális anti-MET antitest** (sc-12, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 1:100 hígításban;
- **nyúl polyklonális anti-HNF1B antitest** (HPA-002083, Sigma Aldrich, Inc.), 1:100 hígításban;
- **egér monoklonális anti-KRT7 antitest** (OV-TL, M7018, DAKO) 1:3000 hígításban;
- **nyúl poliklonális anti-p504S/AMACR antitest** (13H4, RM-9130-A, Thermo-Scientific) 1:150 hígításban;
- **egér monoklonális anti-CD57 antitest** (NCL-NK1, Leica Novocastra) 1:100 hígításban;
- **egér monoklonális anti-WT1 antitest** (6F-H2, M3561, DAKO) 1:100 hígításban;
- **nyúl poliklonális anti-IRX1 antitest** (NBP1-83090, Novus Biologicals) 1:200 hígításban;
- **nyúl poliklonális anti-POU3F3 antitest** (18999-1-AP, Proteintech) 1:200 hígításban.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. Az embrionális eredetű vesetumorok differenciáldiagnózisa

A WT megismétli a vesefejlődés során kialakuló szöveti elemek differenciálatlan formáit. Esetenként egész tumor, vagy annak egy részlete kis-közepes nagyságú epitheliális sejtekből épülhet fel, amelyek szolid, tubuláris, vagy papilláris szerkezetet

mutatnak, amelynek alapján hasonlíthatnak az MA nem típusos formájához. A típusos “tankönyvi” MTSCC párhuzamosan elhelyezkedő, összenyomott tubuláris szerkezetet mutat, a sejtek a Henle-kacs sejteire emlékeztetnek, de időnként tágult tubuláris és papilláris megjelenés is látható. A papilláris növekedés miatt tartották az MTSCC-t a papilláris vesetumor szubtypusának. A papilláris vesetumor az élet során perzisztáló, különböző differenciáltságú PNL-ekből indul ki, és a kis “kék” sejtektől a nagy, differenciálódott eozinofil epitheliális sejtekig minden sejtforma megjelenhet, amelyek szolid, tubuláris, és papilláris növekedést mutathatnak. Amint a fentiekből látható, időnként a kevés citoplazmával rendelkező kis sejtek szolid, tubuláris esetleg papilláris növekedése, amely az MA-ra jellemző, előfordulhat WT-ben, MTSCC-ben és PRCT-ben is. Az átfedő szövettani kép egyes esetekben differenciális diagnosztikus nehézséget okozhat.

A PhD munkában megvizsgáltuk a fentebb tárgyalt embryonális eredetű epitheliális vesetumorkban és ezek prekursor lézióiban 5 gén expresszióját. Az immunhisztológia kiértékeléséhez hozzáadtuk az egy korábban elvégzett munka során SCEL immunhisztokémiával kapott adatokat is. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményét a 2. Táblázatban foglaltuk össze.

1. Táblázat. A WT, MA, MTSCC és PRCT és társuló prekursor léziók immunhisztológiája.

Antitest	WT		MA	MTSCC		PRCT	
	PL-NR	T		PNL	T	PNL	T
CD57	9/9	12/15	10/10	4/4	7/9	10/10	56/76
KRT7	0/9	0/15	0/10	3/4	6/9	7/10	57/76
AMACR	0/9	0/15	0/10	2/4	8/9	7/10	74/76
SCEL	0/9	0/15	0/10	0/4	0/9	13/19	87/114
WT-1	9/9	12/15	10/10	0/4	0/9	0/10	0/76
CDH17	9/9	0/15	9/10	0/4	0/9	0/10	2/76

PL-NR, perilobar nephrogenic rest; T, tumour; PNL, pre-neoplastic lesion;

A *B3GAT1* gént, amely a CD57 fehérjét kódolja, több szerző MA specifikus markernek írta le. Valóban, a CD57 minden MA-ban kifejeződik, de a 15 WT-ből 12-ben, különösen az MA szerű szövettani képet mutató tumorokban pozitív reakciót kaptunk. Az MTSCC 78%-a, és a papilláris vesetumorkok 74%-a adott pozitív reakciót a CD57 antitesttel. Eredményünk ellentétben áll az International Society of Urological Pathology (ISUP) ajánlással, és azzal az adattal, amely szerint 15 papilláris vesetumorból csak egy volt pozitív a CD57 antitestre. Eredményünket, hogy a *CD57* WT-ben és papilláris vesetumorban is kifejeződik, már mások is leírták, mi ezeket az adatokat fogadjuk el. Úgy gondoljuk, hogy a CD57 antitestnek nincs differenciális diagnosztikai értéke.

A KRT7 valamint az AMACR immunhisztokémia egyértelműen elkülönített két tumorcsoportot. Az egyik csoportba a WT és az MA tartozik, amelyek a vese korai differenciálódási zavarának felelnek meg. Mind a WT, mind az MA negatív eredményt adott az AMACR és a KRT7 antitestekkel. A WT-t és az MA-t a WT1 gén kifejeződése is megkülönbözteti az MTSCC-től és a papilláris vesetumortól, mert míg az előzőek pozitívan festődnek, az utóbbiak mindegyike negatív reakciót adott. A második csoport az MTSCC és a PRCT, amelyek – a vesefejlődés későbbi szakaszának megfelelően –

epitheliális differenciálódásra elkötelezett sejtekből indulnak ki. Mind az MTSCC mind a PRCT pozitív immunreakciót mutatott az AMACR és KRT7 antitesttel.

Az első csoportban, bár mind a WT, mind az MA pozitívan festődik a WT1 antitesttel, a CDH17 antitest kizárólag az MA-ban ad pozitív reakciót, és sem a WT, sem az MTSCC, sem a PRCT nem festődik. Az átfedő szövettani megjelenésű WT és az MA egyértelműen elkülöníthető a WT1 és CDH17 immunhisztológiával.

A második csoporton belül az SCEL immunhisztológiának van megkülönböztető diagnosztikus jelentősége. Az MTSCC és a PRCT pozitív mind AMACR, mind KRT7 antitesttel, de az SCEL kizárólag PRCT-ben fejeződik ki. A fent említett tumormarkerek segítségével az úgynevezett szolid-tubuláris szövettani megjelenésű WT, az MA, az MTSCC és a PRCT egyértelműen elkülöníthetőek.

Ezzel kapcsolatban meg kell említenünk, hogy a DNS-alapú tumor diagnosztika továbbra is a legmegbízhatóbb ezeknek a tumoroknak az elkülönítésére. A WT-re a kromoszóma 1q, 7q és 12 duplikációja, valamint a kromoszóma 11 és 16 vesztese jellemző. Az MTSCC-ben a kromoszóma 1, 4, 6, 9, 13, 14, 15 és 22 monoszómiájának van diagnosztikus értéke, míg PRCT-re a kromoszóma 7, 17, 8, 12, 16 és 20 duplikációja jellemző. A BRAF V600E mutációja kizárólag MA-ban fordul elő, ami szintén felhasználható az MA diagnózisának megerősítésére.

4.2. A WT, az MTSCC és a PRCT prekursor léziói

A tumorok kialakulásának megértéséhez fontos megfigyelés volt, hogy a tumorokhoz társuló prekursor léziók a tumorról azonos immunreakciót mutattak. A WT1 immunhisztológia mind a WT-ben, mind a hozzá kapcsolódó PL-NR-ben pozitív volt. Hasonlóan, a KRT7 és az AMACR gének nemcsak az MTSCC-ben és a papilláris vesetumorban, hanem az ezekhez társuló PNL-ben is kifejeződtek. Ezek az adatok megerősítik a prekursor léziók és a tumorok közti kapcsolatot, azaz a feltevést, hogy a WT, az MTSCC és a PRCT embryonális eredetű prekursor léziókból indul ki.

Sajnos nem állt módunkban MA-t tartalmazó egész vese feldolgozása, hogy az MA-hoz esetlegesen társuló prekursor léziókat megtaláljuk. Ehelyett egy nem várt eredmény segített. Amint fentebb már ismertettük, az MA - függetlenül a szöveti szerkezettől - pozitív reakciót adott a CDH17 antitesttel. Meglepetésünkre mind a 9 WT-hoz társuló PL-NR - a hyperplastikus területek kivételével - pozitív immunreakciót adott a CDH17 antitesttel. Hasonló szöveti szerkezetű PL-NR, ahogy ez várható volt, erős sejtmagfestést adott a WT1 antitesttel. Ugyanakkor egyetlen WT sem mutatott pozitív CDH17 immunreakciót. A szöveti hasonlóság, valamint a PL-NR és az MA közös CDH17 antigén profilja arra utal, hogy az MA a perzisztáló PL-NR-ből indul ki.

4.3. Az MA és a PL-NR közötti összefüggés

Ez a nem várt eredmény készítetett bennünket arra, hogy megvizsgáljuk a CDH17 és WT1 kifejeződését főtális vesében. A 11. gesztációs hétből származó vesékben a Bowman-tok parietális epitheliuma pozitív festődést mutatott a CDH17 antitesttel, de a proximális tubulus sejtszelektái már nem fejezték ki a CDH17 fehérjét. A 3-6 hónapos újszülöttek és a felnőttek veséje teljesen negatív volt. A szintén a 11. gesztációs hétből származó vesében a WT1 antitesttel pozitív immunreakció volt megfigyelhető a

glomerulus podocitákban és a Bowman-tok parietális sejtjeiben. Felnőttkori vesében erős nukleáris pozitivitás állt fenn a podociták 50-70%-ában.

Az immunhisztológiai vizsgálatok talán legérdekesebb eredménye a PL-NR és az MA közötti szoros összefüggés megvilágítása. Az összes PL-NR, valamint egy kivételével az összes MA pozitív reakciót mutatott a CDH17 antitesttel. PL-NR többnyire részben differenciált, tubulárisan növekedő epitheliális sejtekből épül fel, míg a legtöbb WT a különböző magasságú epitheliális sejtek mellett blastémális, stromális, valamint glomeruloid léziókat tartalmaz. Az a lehetőség, hogy a rosszindulatú WT a sejtek differenciálódása révén egy jóindulatú tumor, azaz MA kialakulásához vezet, amint azt többen felvetették, nem valószínű. Vizsgálatainkban a WT-ben talált MA-szerű szövettani részletek nem adtak pozitív reakciót a CDH17 antitesttel, ami kizárja annak a lehetőségét, hogy az "aktív" (rosszindulatú) WT egy "inaktív" azaz jóindulatú tumorrá differenciálódik.

Az embryonális fejlődés során a WT1 többek közt az S-forma proximális doménjében fejeződik ki, ahol a sejtek már elköteleződtek a podocyták, valamint a Bowman-tok parietális sejtjeinek formálására. Ezeknek a sejteknek a differenciálódási zavara vezethet a PL-NR kifejlődéséhez a WT spektrumon belül. Megfigyelésünk, hogy a CDH17 specifikusan az MA-ban, PL-NR-ben és a főtálcis vese Bowman-tokjának parietális sejtjeiben fejeződik ki, alátámasztja feltételezésünket. Egy csírasejtes WT génmutációt hordozó és progresszív vesebetegségben szenvedő fiataloknál "embryonal hyperplasia of the Bowman capsular epithelium" (EHBCE) elnevezésű elváltozást írtak le. EHBCE és MA közös előfordulását is közölték. Idült veseelégtelenségben a vese átépülésével kapcsolatban is megfigyeltek EHBCE-szerű sejtproliferációt. Itt érdemes megjegyezni, hogy a Bowman-kapszula őssejtre jellemző CD24 és CD133 pozitív sejtjei képesek felnőtt korban is podocalyxin pozitív podocitává differenciálódni, és a glomerulusba vándorolni. Ez arra utal, hogy ezek a CMM eredetű sejtek felnőtt korban is megőrzik a plaszticitásukat, és képesek a podociták regenerációjára. Az átépült vesében felnőtt korban kialakult EHBCE valószínűleg ezekből a sejtekből indul ki.

4.4. Hypotézis az embryonális eredetű vesetumorok kialakulására

Cohnheim feltételezését, hogy az embryonális szervfejlődés során *nem differenciálódott sejtcsoportokból* vagy a *pluripotens sejtek „túltermeléséből”* a későbbi években tumor alakulhat ki, a WT széleskörű szövettani és molekuláris vizsgálatával igazolták. Elfogadott, hogy a WT a proliferációs képességgel rendelkező, nem, vagy csak részben differenciálódott sejtcsoportokból, PL-NR-ből vagy IL-NR-ből indul ki.

A PL-NR többnyire epitheliálisan differenciálódott sejtekből épül fel. Ezekben a léziókban a néha előforduló hyperplasztikus, anaplasztikus növekedés az úgynevezett hyperplasztikus NR kialakulásához vezet, amely további proliferáció révén WT-t eredményezhet. Vizsgálatunk arra utal, hogy a tisztán epitheliálisan differenciálódó, időnként glomerulus-szerű képleteket mutató PL-NR lassú proliferációjával MA alakulhat ki. Ezt nemcsak az immunhisztológiai vizsgálatok eredménye, de a hasonló szövettani megjelenés is támogatja. A PL-NR és az MA többnyire éles határral különül el a normál vese parenchymától.

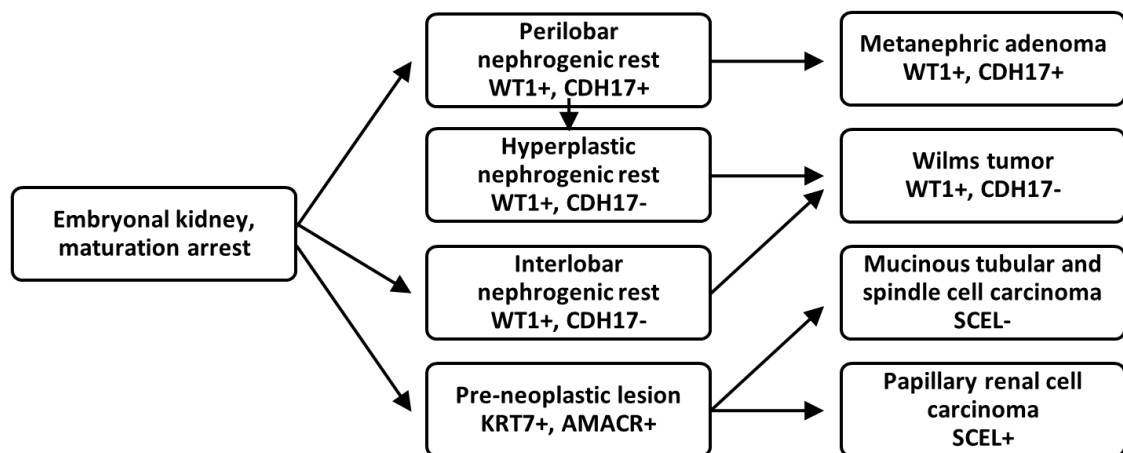
Az IL-NR nem éles határú, a normál veseszövettel összefüggően proliferál, és a legtöbb esetben stromális sejteket is tartalmaz. Ez arra utal, hogy a legtöbb trifázisos, jelentős

fibroblasztos, vagy időnként heterológ szöveteket - mint simaizmot, myoblastot tartalmazó - WT valószínűleg az IL-NR-ből indul ki. Az NR szöveti differenciálódása nagy fokban meghatározza a belőle kialakuló WT szöveti szerkezetét is.

A papilláris vesetumorhoz, valamint az MTSCC-hez társuló PNL ritkán tartalmaz éretlen, blasztéma szerű sejteket, többnyire szolid, tubuláris felépítésű, de néha csztikus-papilláris növekedést mutat. Ezek a PNL-k immunhisztológiai vizsgálattal megkülönböztethetők a WT-hez társuló PL-NR-től és IL-NR-től. Amíg a PL-NR és az IL-NR az anti-WT1 antitesttel pozitívan festődik, a papilláris vesetumorhoz és az MTSCC-hez társuló PNL-ek kivétel nélkül negatív immunreakciót mutatnak a WT1-gyel. A KRT7 immunhisztológia ennek az ellenkezőjét mutatja. Mind a papilláris vesetumorhoz, mind az MTSCC-hez társuló PNL pozitív festődést ad az anti-KRT7 antitesttel, míg a PL-NR és az IL-NR minden esetben negatív.

A jelen munka eredményeinek és az előzetes irodalmi adatoknak a figyelembevételével arra a következtetésre jutottunk, hogy a vese embryonális fejlődésének egy korai szakaszában bekövetkezett differenciálódási zavara miatt PL-NR és IL-NR alakul ki, amely epitheliális illetve epitheliális, blasztémális, és strómális sejtekből épülhet fel. Amennyiben a differenciálódási zavar a nefron kialakulásának későbbi fázisában, azaz a sejtek epitheliális elkötelezettsége után jön létre, akkor ez az MTSCC-t és a PRCT-t megelőző PNL kialakulásához vezethet. A PRCT-hez társuló PNL-ek egy részéből felnőttkorban papilláris adenoma és karcinóma fejlődhet ki.

Hypotézisünket a 2. ábrán foglaltuk össze:



2. ábra. Az embryonális eredetű vesetumороk kialakulásának feltételezett folyamata.

5. Következtetések

1993-ban, majd 1997-ben paradigma változás következett be a vese tumorainak osztályozásában, amennyiben a korábbi szövettani osztályozást egy kromoszómális, DNS elváltozásokon nyugvó, teljesen új szemléletű vesetumor osztályozás, a Heidelbergi Klasszifikáció váltotta fel. Ehhez később számos ritkán, vagy rendkívül ritkán előforduló vesetumort csatlakoztattak. Ezeknek a ritkán előforduló tumoroknak - mint a metanefrogén adenoma (MA) és mucinózus tubuláris és orsósejtes karcinóma (MTSCC) - nem volt tisztázott a pontos eredete, természete. A PRCT korábban javasolt

embryonális eredetét sem fogadta el a WHO és az ISUP (International Society of Urological Pathologist) körébe tartozó patológusok csoportja.

Munkámban a nemzetközi szinten széles körben vizsgált Wilms tumort vettem alapnak, és ennek a felhasználásával megpróbáltam az MA, az MTSCC és a PRCT eredetét tisztázni. Kidolgoztam a korábban kromoszóma- és DNS-array segítségével egyértelműen azonosított, de átfedő szövettani képet mutató tumorok felhasználásával egy immunhisztokémián alapuló megkülönböztető kórismézést, amely egyúttal a tumorok embryonális eredetét is figyelembe veszi. A következtetések röviden:

A. A nemzetközi standardnak megfelelően megerősítettük a WT és a nefrogén maradványok (NR) közötti összefüggést;

B. Elsőként felismertük az MTSCC kialakulása és a pre-neoplasztikus léziók (PNL) közötti összefüggést;

C. Először mutattunk rá a perilobuláris NR és az MA közötti immunhisztológiai hasonlóságra, és ennek alapján arra hogy az MA a perzisztáló PL-NR-ből indul ki;

D. Szövettani vizsgálattal igazoltuk a PRCT-hez társuló PNL-ek jelenlétét, amely minden kétséget kizárva arra utal, hogy a WT-hez hasonlóan a PRCT eredete is embryonális differenciálódási zavarra vezethető vissza;

E. Kidolgoztunk egy immunhisztológiai panelt, amelynek alkalmazásával az átfedő morfológiájú WT, MA, MTSCC és PRCT egyértelműen elkülöníthető;

F. Figyelembe véve a saját adatainkat, javasoltunk egy modellt a WT, az MA, az MTSCC és a PRCT embryonális differenciálatlan maradványokból (NR és PNL) való kiindulásának leírására.

6. Rövidítések

aCGH	array CGH
Array CGH	DNS alapú összehasonlító genomikus hibridizáció
CAKUT	congenital anomalies of the kidney and urinary tract
CDC	collecting duct carcinoma
CGH	comparative genomic hybridisation
CMM	cap metanephric mesenchyme
CSB	comma-shaped body
CCSK	clear cell sarcoma of the kidney
FFPE	formalinban fixált és paraffinba ágyazott
IL-NR	intralobuláris nefrogén maradvány
ISUP	International Society of Urological Pathology
kCGH	kromoszomális CGH
KRO	kromoszóma vizsgálat
MA	metanephrogen adenóma
MET	mesenchymális-epitheliális tranzíció
MM	metanefrogén mesenchyma
MS	PCR-alapú mikroszatellita analízis
MTSCC	mucinózus tubuláris és orsósejtes karcinóma
NR	nephrogenic rest
PA	pretubuláris aggregát
PCR	polimerase chain reaction
PL-NR	perilobuláris nefrogén maradvány

7. A szerző közleményei/Publications of the author

7.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények/Original research publication related to the thesis

1. Nagy A, Banyai D, Semjen D, Beothe T, Kovacs G. Sciellin is a marker for papillary renal cell tumours.
Virchows Arch 467:695-700, 2015 **IF: 2.8**
2. Nina Kaerger Billfeldt*, Daniel Banyai*, Gyula Kovacs. Absence of canonical WNT signaling in adult renal cell tumors of embryonal origin.
Anticancer Res 36:2169-2173. 2016. **IF: 1.8**
3. Daniel Banyai, Fanni Vastag, Maria Yussenko, Peter Bugert, Gyula Kovacs. Embryonal origin of MTSCC of kidney explains its morphological heterogeneity: diagnostic impact of genetic analysis.
Anticancer Res 37:1185-1189, 2017. **IF:1.9**
4. Daniel Banyai, Peter Sarlos, Anetta Nagy, Gyula Kovacs. Recalling Cohnheim's theory: Papillary renal cell tumor as a model of tumorigenesis from impaired embryonal development to malignant tumors in adults.
Int J Biol Sci _ 14:784-790, 2018 **IF:3.8.**
5. Donat Peter Sarlos, Daniel Banyai, Lehel Peterfi, Arpad Szanto, Gyula Kovacs. Embryonal origin of metanephric adenoma and its differential diagnosis.
Anticancer Res, (in press) **IF: 1.9**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora / Impact factor of the publication related to the thesis: **12.2**

Kumulatív impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül) /Cumulative impact factor (without abstracts) : **24.3**

7.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények / Publications not related to the thesis

Zemplenyi AT, Kalo Z, Kovacs G, Farkas R, Beothe T, Banyai D, Sebestyen Z , Endrei D , Boncz I , Mangel L. Cost-effectiveness analysis of intensity-modulated radiation therapy with normal and hypofractionated schemes for the treatment of localised prostate cancer.
Eur J Cancer Care, e12430. 2018 **IF: 2.1**

Gyula Kovacs, Nina Kaerger Billfeldt, Timea Dergez, Nelli Farkas, Andras Javorhazy, Daniel Banyai, Csaba Pusztai, Arpad Szanto. Cytoplasmic expression of the β -catenin is an independent prognostic factor of conventional renal cell carcinoma: a simple immunostaining score.
Histopathol;70:273-280 2017. **IF: 3.1**

Tamas A , Javorhazy A , Reglodi D , Sarlos DP , Banyai D , SemjenD, Nemeth J , Lelesz B , Fulop DB , Szanto Z. Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples.
J Mol Neurosci. 59:177-183, 2016 **IF:2.229**

Fariborz Bagheri, Csaba Pusztai, Árpád Szántó, Endre Holman, Zsolt Juhász, Tamás Beöthe, Dániel Bányai, and László Farkas. Laparoscopic repair of circumcaval ureter: one-year follow-up of three patients and literature review. Urology. 74: 148–153, 2009. **IF: 2.242**

Bagi E, Fekete E, Bányai D, Lenard L. Effects of angiotensin II and III microinjections into the zona incerta after intra - and extracellular fluid loss. Brain Res. 1002:110-119, 2004 **IF: 2.398**

Pusztai Cs, Bányai D, Jávornágyi A, Kenyeres B, Sarlós P, Szántó Á Laparoszko­pos parciális nephrectomia a technikailag komplex vesetumorok sebészi ellátásában Magyar Urológia | 2008 | 20. ÉVFOLYAM 2. SZÁM 27 : 4 pp. 148-153. (2015)

Bányai D, Pusztai Cs, Jávornágyi A, Szántó Á, Vecsei A.,²Bagheri F Vesemedence plasztika – Az urológiai laparoszko­pia tanulásának és oktatásának (egy lehetséges) modellje Magyar Urológia | 2015 | 27. évfolyam 2. szám

Pusztai Cs, Bányai D, Sarlós D, Farkas L, Szántó Á, Semjén D Laparoszko­pia szerepe a vese angiomyolipomák sebészi kezelésében Magyar Urológia 27 : 1 pp. 2-6. , 5 p. (2015)

Pusztai Cs, Bagheri F, Bányai D, Benkő T, Farkas L, Laparoszko­pos parciális nephrectomia – A pécsi módszer Magyar Urológia | 2013 | 25. évfolyam 1. szám

Pusztai Cs, Bagheri F, Jávornágyi A, Bányai D, Farkas L Korai hilus ellátás bal oldali laparoszko­pos radikális nephrectomia során Magyar Urológia | 2008 | 20. évfolyam 2. szám

Könyv fejezetek:

A medencefenék sebészete. In: Bódis J (szerk.). Endoscopos és minimálisan invazív nőgyógyászati sebészet. MNET, Kecskemét, Bányai D, Koppán M 2009:167–173.

8. Köszönetnyilvánítás

A doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkát a PTE KK Urológiai Klinikán végeztem. Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kovács Gyula professzor úrnak, hogy lehetővé tette a téma kutatásába történő bekapcsolódásomat, tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította. Hálával tartozom az Urológiai Klinika igazgatójának, Dr. Szántó Árpád tanár úrnak, mert megteremtette a kutatás háttérét, mindvégig biztatott, és lehetővé tette, hogy betegellátási- és oktatási feladataim mellett a kutatómunkára is tudjak időt szakítani. Köszönettel tartozom a Heidelbergi Egyetem Molekuláris Onkológiai Labor

munkatársainak, Dr. Nagy Anettának és Prof Peter Bugertnek az előzetes vizsgálatok elvégzéséért és az eredmények átengedéséért. Köszönet illeti a Pathologiai Intézet munkatársait, Halas Zsuzsannát és Szilágyi Imréné Juditot a metszetek elkészítéséért. Ezúton is szeretném megköszönni a Magyar Urológus Társaságnak a munkám elvégzéséhez nyújtott anyagi támogatását.

Végezetül köszönöm családom megértő türelmét és támogatását, hogy szeretetükkel biztosították számomra a nyugodt háttérrel.