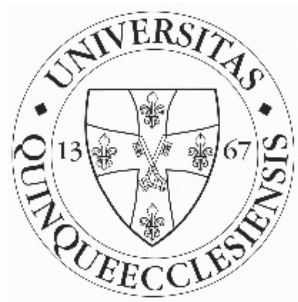


A gyulladássos jelátvitel szerepe a konvencionális vese rák progressziójában

Doktori (PhD) értekezés

Szerző: Dr. Péterfi Lehel

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ
Urológiai Klinika



Pécs, 2019

Doktori iskolavezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
1.1. Vese tumorokról általában	4
1.2. Vese tumorok korábbi osztályozása	5
1.3. A vese tumorok modern osztályozása és klinikai jelentősége	6
1.4. Konvencionális veserák	8
1.4.1 Konvencionális veserák molekuláris patológiája	9
1.4.2. A TNM-G klasszifikáció	11
1.4.3. A vesetumor klinikai prognosztikai faktora:	13
1.4.4. A veserák kezelése	14
1.5. A gyulladós mikro környezet szerepe a tumorok keletkezésében	15
1.6. A gyulladós mikro környezet és a tumorok progressziója	17
1.7. Előzetes vizsgálatok (HD)	21
1.7.1. Affymetrix array analízis	21
1.7.2. A konvencionális veserák progressziójához társuló génelváltozások kiválasztása	22
2. KÉRDÉS FELVETÉSE	24
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	25
3.1. Betegek és szövetminták	25
3.2. Tissue microarray	26
3.3. Immunhisztokémia	27
3.4. Statisztikai analízis	28
4. EREDMÉNYEK	29
4.1.1. Gade	29
4.1.2. Tumorok mérete	30
4.1.3. T-stadium	31
4.1.4. Stage.	32
4.1. LBP	34

4.1.1. Az LBP kifejeződése normal vesében és konvencionális veserákban	34
4.1.2. Az LBP expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel	36
4.1.3. Az LBP expresszió és a túlélési adatok közötti összefüggés	37
4.2. RARRES1	38
4.2.1. A RARRES1 RNS kifejeződése a gyors progressziót mutató konvencionális veserákban	38
4.2.2. A RARRES1 kifejeződésének megerősítése immunhisztológiával	39
4.2.3. A RARRES1 expresszió és a klinikai-patológiai paraméterek kapcsolata.	41
4.2.4. A RARRES1 expresszió és a tumormentes túlélés	41
4.2.5. RARRES1 lokalizációja és magas recidiva kockázat.	42
4.3. Az AGBL2 expressziója konvencionális veserákban	44
4.3.1. Az AGBL2 vizsgálata immunhisztológiával	44
4.3.2. Az AGBL2 expresszió és a tumormentes túlélés	44
4.4. A RARRES1 és AGBL2 ko-expressziója	45
4.5. Az AXL	47
4.5.1. Az AXL kifejeződése konvencionális veserákban	47
4.5.2. Az AXL expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel	48
4.5.3. Az AXL expresszió és a túlélési adatok közötti összefüggés	49
5. MEGBESZÉLÉS	50
5.1. LBP	50
5.2. RARRES1 és AGBL2	52
5.3. AXL	55
6. KÖVETKEZTETÉSEK	59
7. IRODALOM	60
8. KÖZLEMÉNYEK	67
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	68

1. BEVEZETÉS

1.1. Vese tumorokról általában

A veserák az összes daganatos megbetegedés 2-3 %-át teszi ki és az összes daganatos halálozás 2 %-áért felelős (European Network of Cancer Registries 2001). A fejlettebb iparú nyugati országokban a veserák incidenciája magasabb. Az utóbbi két évtizedben a veserák incidenciája világszerte 2%-os növekedést mutat, de Skandináviában (Dánia, Svédország) folyamatos csökkenés figyelhető meg (Lindblad, 2004). Az Európai Unióban 2012-ben körülbelül 84400 új veserák eset fordult elő, amelyek közül 34700 a betegek halálát okozta (Ferlay et al. 2013). Európában a veserák okozta halálozások száma a '90-es évek elejéig növekedett, majd csökkenni kezdett. A skandináv országokban már a '80-as évektől csökkenni kezdett a veserák okozta halálozás, Franciaországban, Németországban, Ausztriában és Hollandiában ez a tendencia a '90-es évek elejétől jelentkezik. Ezzel szemben néhány európai országban (Horvátország, Észtország, Görögország, Írország, Szlovákia) a veserák okozta halálozás továbbra is növekvő tendenciát mutat (Levi et al. 2008). A széles körben bevezetett képalkotó eljárásoknak köszönhetően egyre több véletlenül felfedezett kisméretű a vesére korlátozott veserák kerül felismerésre. Ennek ellenére, ezeknek körülbelül 10-15%-a a követés során progressziót mutat és a betegek halálához vezet. Az áttétet adó veserák rezisztens a citotoxikus vagy radiációs terápiára és az újabb target terápiák is csak meghosszabbítják a beteg életét, de nem érnek el gyógyulást. A betegség férfiaknál gyakrabban jelentkezik (1,5:1), életkor szerint az incidencia a legmagasabb a 7. évtizedben. Etiológiai tényezőként a dohányzás, az obezitás és a magas vérnyomás szerepel (Zeegers és mtsai, 2000; Calle és Kaaks, 2004; Weikert és mtsai. 2007). A dohányzás mellőzése és a túlsúly kerülése hatékony profilaxist jelent.

1.2. Vese tumorok korábbi osztályozása

A vese tumorok nem képeznek biológiai és morfológiai egységet, különböző rosszindulatú és jóindulatú tumort különíthetünk el. A vese tumorok osztályozásának jelentős szerepe van a betegség lefolyásának megítélésében és a betegek kezelésében. 1886-ban Grawitz a vese tumorok keletkezését az eltévedt mellékvese szigetektől vezette le, amelyek viszonylag gyakran láthatók a vese tokja alatt. Vese tumort sokáig a feltételezett mellékvese eredetre hivatkozva hypernephromának vagy leirója után Grawitz tumornak nevezték. Az ötvenes években a vese tumor és normál vese elektronmikroszkópos vizsgálatával hasonlóságot találtak a tumorsejtek és a proximális vesecsatornák hámja között és az amerikai irodalomban a vese tumorokat ettől kezdve egységesen adenocarcinomának nevezték el. Később az AFIP (Armed Force Institute of Pathology) által kiadott hivatalos klasszifikációk megkülönböztettek világos sejtes, granulár sejtes és kevert sejtes vesekarcinómát és a tumorok leírásában utaltak azok növekedési formájára, mint trabekuláris, tubuláris, papilláris és solid formák (Bennington és Beckwith, 1975). Bannasch és mtsai elektronmikroszkópos és enzymlisztokémiai vizsgálatok alapján a kísérletes patkánytumороkat kromofil (azaz jól festődő) és kromofob (alig, vagy nem festődő) karcinómákra osztották (Bannasch és mtsai, 1986). Ezt a klaszifikációt Thoenes a humán vesetumorokra alkalmazta és megkülönböztett világossejtes, kromofil (basofil és eosinofil) és kromofób vese tumort, ami a Mainz-klasszifikáció néven került be az irodalomba (Thoenes és mtsai, 1986). Thoenes és mtsai érdeme, hogy leírták a kromofób veserákot mint új morfológiai egységet. A probléma a mainzi felosztással, csak úgy mint a korábbi osztályozásokkal az volt, hogy a tumorok fenotípusára, azaz a szövettani megjelenésére alapozta. Azonban a vese karcinómák jelentős hányada kifejezett heterogenitást mutat, azaz kevert világossejtes és eosinofil, kromofób és kromofil, kromofil és világossejtes formák

fordulnak elő, ami megnehezítette az osztályozás alkalmazását a rutin szövettani vizsgálatban. Más szóval, a tumorok citológiai megjelenése nem jelöl egyértelműen biológiai entitást. A különböző növekedési formák, mint szolid, trabekuláris, tubuláris, papilláris etc. között is jelentős átfedés van.

Az áttörést a nyolcvanas évek végén Kovacs és mtsai által elkezdett kromoszóma vizsgálatok hozták meg. A jellemző cytogenetikai elváltozások, mint a 7-es, 17-es valamint a 8-as, 12-es, 16-os és 20-as kromoszómák jellemző triszómiája és az Y kromoszóma vesztese alapján a papilláris vesetumort mint genetikai és biológiai entitást különítették el (Kovacs, 1989; Kovács és mtsai 1991). A nefrektómia során eltávolított vesék részletes szövettani vizsgálatával a papilláris vesetumor eredetét a vese korai differenciálódási zavarából visszamaradt tumor megelőző léziókra vezették vissza (Kovacs és Kovacs, 1993; Bányai és mtsai, 2018). Később a jellemző kromoszóma eltérések alapján, megkülönböztettek papilláris adenomát és karcinómát (Szponar és mtsai, 2009). Ezzel ellentétben az akkor nem-papilláris mai nomenklaturával konvencionális veseráknak nevezett tumorok több mint 95%-ában a 3-as kromoszóma deleciját irták le (Kovacs és mtsai 1987; Kovacs és mtsai, 1988; Kovacs és Frisch, 1989). A Thoenes által a human vesetumorok közt elsőként említett kromofób veserákban a cytogenetikai vizsgálatok jellemző kromoszóma vesztesét, mint az 1-es, 2-es, 6-os, 10-es, 17-es és 21-es kromoszómák monoszómiáját fedték fel (Kovacs, Speicher és mtsai 1994; Bugert és mtsai, 1997). A vese negyedik leggyakoribb tumora, a jóindulatu vese onkocytóma jellemző kromoszómális elváltozásai is ekkor kerültek először leírásra (Kovacs és mtsai, 1987, 1989).

1.3. A vese tumorok modern osztályozása és klinikai jelentősége

A fentebb említett kromoszóma és későbbi DNS vizsgálatok alapján egy alapvetően új vese tumor osztályozás született meg. A részletes kromoszóma és DNS vizsgálatok a különböző vesetumorok egyértelmű diagnózisát tették lehetővé (Kovacs, 1993, a b). Az új osztályozási rendszer a Heidelbergben 1996-ban szűk körben megtartott nemzetközi vese tumor megbeszélésen történt megegyezéssel, mint a „Heidelberg Classification of Renal Cell Tumors” került közlésre (Kovacs és mtsai. 1997). Az új osztályozás előnye, hogy a főbb vese tumorok a kromoszómális és DNS ujjlenyomatuk alapján egyértelműen kórismézhetők, így kiküszöböli az átfedő citológiai és szövettani jellemzők által okozott kórismézési nehézségeket (1. táblázat, 1. ábra). Ezt az osztályozást az amerikai Mayo Klinikán 1997-ben az UICC (Union Internationale Contre le Cancer) és az AJCC (American Joint Committee on Cancer) nevében tartott ad hoc konferencia egy az egyben plagizálta (Storkel és mtsai 1997). Később ismét amerikai patológusok vezetése alatt a WHO és ISUP (International Society of Urological Pathologists) is egy az egyben átvette a Heidelbergi osztályozást, sajnálatos módon ismét bevezette a világossejtes veserák megnevezést, és az osztályozást kiegészítette az összes vesetumor mintegy 2%-át kitevő rendkívül ritka tumorok katalógusával.

Az osztályozásnak, azaz a diagnózisnak önmagában prognosztikai jelentősége van. A rendkívül ritka kivezető csatorna rák prognózisa rossz, a betegek halálozási aránya magas. Ezt követi a konvencionális veserák, amely a betegek 40-50 százalékában, még a mai korai felismerés és operálás esetén is, áttétet ad és előbb vagy utóbb a beteg halálához vezet. A kromofób veserákok mintegy 5%-nak van halálos kimenetele. Külön figyelmet érdemel a papilláris vesetumor, ahol az esetek egy részében nehéz az

adenoma és karcinóma között különbséget tenni. Az összes operált papilláris tumor mintegy 5-8%-a vezet végzetes kimentelű betegséghez.

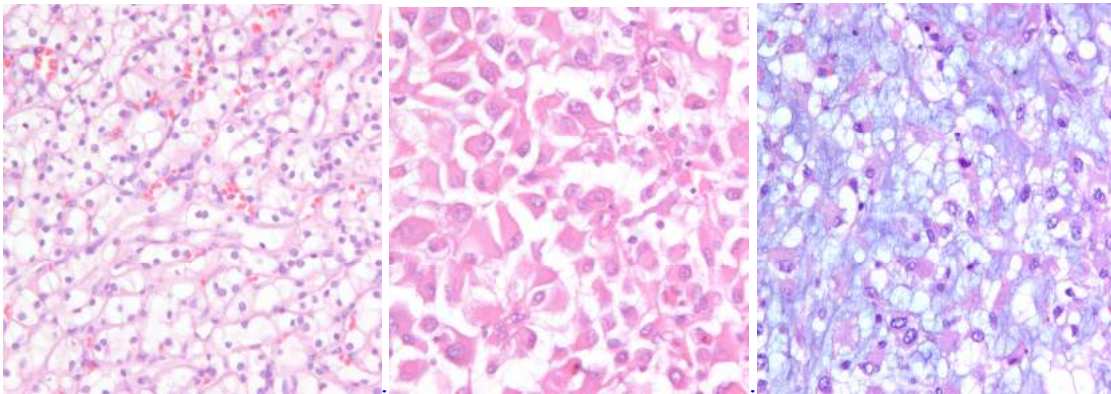
1. Táblázat. Vese tumorok fontosabb genetikai és klinikai jellemzői

Tumor	Gyakoriság (%)	Genomikus jellemzők	Gén mutáció	5 éves túlélés (%)
cRCC	70-75	-3p, -6q, -8p, -9p, -14q	<i>VHL</i> (50%) <i>PBRM1</i> (35%)	50-60
pRCC	8-10	+7, +17, +8, +12, +16, +20,	<i>MET</i> (5%)	~90-95
chRCC	5-7	-1, -2, -6, -10, -13, -17, -21	<i>TP53</i> (25%)	~95
RO	5-7	-1, -14q vagy t(11q:?)	?	100
ucRCC	3	mint cRCC, pRCC, chRCC,	?	~20
CDC				
CDC	<1	?	?	30
MTSCC	<1	-1, -4, -6, -9, -13, -14, -15, -22	?	100
MA	<1	nincs	?	100

cRCC-konvencionális veserák, pRCC-papilláris veserák, chRCC-kromofób veserák, RO-vese onkocitóma, ucRCC-nem osztályozható RCC, CDC-kivezető csatorna karcinóma, MTSCC-„mucinous tubular and spindle cell carcinoma”, MA-metanefrikus adenoma. *VHL* – von Hippel Lindau gén; *PBRM1*- polybromol; *MET* – MET proto-oncogene (*HGF*-receptor); *TP53* – tumor protein 53.

1.4. Konvencionális veserák

A konvencionális veserák az összes rosszindulatú vesetumor 80-90%-át teszi ki. Az amerikai irodalomban világos sejtes veseráknak nevezik, ami félrevezető, hiszen az esetek mintegy 30%-ában a tumor granuláris vagy eozinofil citoplasmájú sejtekből épül fel (1. ábra). A növekedési mintázat lehet szolid, trabekuláris, tubuláris és cisztikus. Egyes esetekben fokális vagy az egész tumorra kiterjedő papilláris növekedés is előfordulhat, amit a nem kellő gyakorlattal bíró patológus egy „úgynevezett 2-es típusú” papilláris veseráknak ítélhet meg.



1. Ábra. Egy adott konvencionális vese rák változatos szövettani képe. A, típusos „Grawitz” tumor, azaz trabekuláris szerkezetű üres cytoplasmájú világossejtes tumor képe. B, Ugyanaz a tumor másik részlete eosinofil sejtes formát mutat. C, A tumor egyes területei mucinózus strómába ágyazott eosinofil sejteket mutatnak (A,B és C azonos nagyítással).

1.4.1. Konvencionális veserák molekuláris pathológiája

A Heidelbergi vesetumor osztályozás a vesetumorerő 70-80%-át kitevő „Grawitz tumor, világossejtes, kevert világossejtes-granulárisejtes, kevert világossejtes-eozinofil, vagy néha csak granulárisejtes vagy eozinofil tumorok” megjelölésére a témavezetőm ajánlatára a konvencionális veserák elnevezést ajánlotta (Kovacs és mtsai, 1997). Függetlenül a szöveti megjelenési formától, a konvencionális veserák alatt kizárólag

azokat a vesetumorokat értjük, amelyekben (nagyon ritka kivételtől eltekintve) a 3-as kromoszóma rövid karjának a deléciója fordul elő.

Egy ritka öröklődő szindrómában, a von Hippel-Lindau betegségben számos más eltérés mellett, mint szem hemangiómája, pheokromocytoma, mellékhere adenoma, vese cysta és konvencionális veserák gyakori előfordulását figyelték meg (Schmidt és mtsai, 1994). A VHL-szindrómához társuló vesetumorok a sporadikus vesetumorokkal azonos kromoszóma eltérést mutattak, amely megerősítette a kromoszóma 3 szerepét a VHL-szindrómában és a hozzá társult vese tumorokban (Kovacs és mtsai, 1991). Linkage analízissel a klinikai tünetek átvitelét a 3-as kromoszóma rövid karjához kötötték majd restriktio-fragment polymorphismus vizsgálatokkal azonosították a VHL-gén pontos helyét és klónozták a gént (Latif és mtsai, 1994). Később a legkisebb átfedő kromoszóma 3p delécióban lokalizált *PBRM1* és *BAP1* gének mutációját írták le (Varela és mtsai, 2011; Pena-Llopis és mtsai, 2012). A VHL gén csirasejtes mutációjának kimutatása a genetikai tanácsadás szempontjából fontos, azonban figyelembe véve, hogy a sporadikus vesetumoroknak csak 45-55%-ában fordul elő, nem alkalmas a konvencionális veserákok pontos diagnózisára.

A korai kromoszóma vizsgálatok a 3-as kromoszóma elváltozása mellett leírták a 8-as, 9-es, és 14-es kromoszómák gyakori delecióját (Schullerus és mtsai, 1997; Herbers és mtsai, 1997). Ezeknek a kromoszómáknak a vesztese a tumorok gradusával és így közvetve azok progressziójával hozható összefüggésbe. A legtöbb patológiai intézetben csak a FISH vizsgálat áll rendelkezésre, amely a leukémiák diagnózisában rendkívül hasznos, de nem alkalmas a konvencionális és egyéb vesetumorokban előforduló kromoszóma-DNS eltérések egyértelmű megállapítására. Ennek következtében, valamint az új génexpressziós array-k bevezetése miatt, a prognosztikai kromoszómális elváltozások és a tumorok biológiai viselkedése közötti összefüggések nem kerültek

tovább vizsgálatra. A témavezetőm által a vesetumorok diagnosizására alkalmazott mikroszatellita majd DNA-array technika, hasonló okok miatt nem került be a rutin patológiai vizsgálatokba (Bugert és Kovacs, 1996; Wilhelm és mtsai, 2002). Ehhez hozzájárult, hogy az amerikai patológusok és hozzájuk csatlakozó európai patológusok (ISUP) visszatértek a vesetumorok régi sejtmorfológián alapuló diagnózisához.

1.4.2. A TNM-G klasszifikáció

Az Union Internationale Contre le Cancer (UICC) és az American Joint Committee on Cancer (AJCC) által kidolgozott TNM klasszifikációs rendszer a vesetumorok patológiai jellemzőit, mint a tumor méret, véna invázió, zsíros tok invázió, mellékvese érintettség, nyirokcsomó érintettség, illetve a klinikailag igazolt távoli metasztázis foglalja magába. A TNM rendszer 2016-ben módosított kiadása az előző 2012-es változathoz képest több módosítást tartalmaz (Brierly és mtsai 2016). A ma érvényes formát a 2. és 3. Táblázat mutatja.

Valójában a TNM rendszer a vesedaganatok növekedését határozza meg a korai, jól differenciált tumortól a klonálisan progrediáló, magasabb metasztázis képességű tumorokig. Ezért TNM rendszer önmagában is prognosztikai értékű. Egy nagylétszámú betegcsoporton végzett tanulmány szerint az 5 éves daganatspecifikus túlélés pT1a esetén 94,9%, pT1b esetén 92,6%, pT2a esetén 85,4%, pT2b esetén 70%, pT3a esetén 64,7%, pT3b esetén 54,7%, pT3c esetén 17,9%, pT4 esetén 27.1% volt (Kim és mtsai. 2011; Novara és mtsai. 2010). Hogy a daganatspecifikus halálozás kockázata nyirokcsomó pozitivitás esetén több mint kétszeres és távoli metasztázis esetén több mint négyszeres a megfelelő gyógyszeres kezelés hiányában magától értendő. A TNM és a tumor gradus tulajdonképpen egy a műtét idején meglévő keresztmetszetet mutat be a daganat progresszió állapotáról, de nem ad felvilágosítást a tumor biológiai

tulajdonságáról, amely azonos keresztmetszet mellett döntő lehet a beteg további sorsát illetően.

2. Táblázat. Vesetumorok TNM klasszifikációs rendszere [Wittekind 2012]

T: primer tumor	
Tx	Primer tumor nem ítéhető meg
T0	Primer tumor nem mutatható ki
T1	A tumor a vese anatómiai határain belül helyezkedik el, a legnagyobb dimenziójában
T1a	4 cm-es vagy kisebb tumor
T1b	4 cm-nél nagyobb, 7 cm-nél nem nagyobb tumor
T2a	A tumor a vese anatómiai határain belül helyezkedik el, a legnagyobb dimenziójában meghaladja a 7 cm-t, de 10 cm-nél nem nagyobb
T2b	A tumor 10 cm-nél nagyobb, de a vese anatómiai határait nem haladja meg.
T3	A tumor ráterjed a nagyobb vénákra (vena renális (ok)), vagy közvetlenül infiltrálja a mellékvesét vagy a perirenalis szöveteket, de nem terjed túl a Gerota-fascián
T3a	A daganat szabad szemmel látható módon a v. renalis-ba, vagy annak nagy szegmentális (izmos falú) ágaiba terjed, vagy a perirenalis és/vagy a sinus zsírszövetbe terjed
T3b	A daganat szabad szemmel észlelhetően beterjed a v. cava-ba, de a növedék nem haladja meg a rekeszizom szintjét
T3c	A daganat szabad szemmel észlelhetően beterjed a v. cava-ba, és a növedék a rekeszizom vonalát meghaladja, vagy a tumor beszűri a v. cava falát
T4	A tumor túlterjed a Gerota-fascián vagy folyamatos terjedés révén beszűri a mellékvesét
N: Regionális nyirokcsomók	
NX	Regionális nyirokcsomóáttét nem igazolható
N0	Nincs regionális nyirokcsomóáttét
N1	Metastasis szoliter regionális nyirokcsomóban
N2	Metastasis egynél több regionális nyirokcsomóban
M: távoli áttétek	
M0	Távoli áttét nincs
M1	Távoli áttét(ek)

3. Táblázat. TNM stádium besorolás [Sobin et al. 2009]

I. stádium	T1 N0 M0
II. stádium	T2 N0 M0
III. stádium	T3 N0 M0 T1-3 N1 M0
IV. stádium	T4 N1-2 M0 T1-4 N0-2 M1

1.4.3. A vesetumor klinikai prognosztikai jellemzői:

Közismert, hogy az egyik legjobb és legerősebb prognosztikai jellemző a TNM besoroláson alapuló stádium beosztás, ez alapján az egyes stádiumba kerülő betegek túlélése 92% körüli, míg a kettes és hármas stádiumban lévő betegek daganatmentes ötéves túlélése 40% alatti. A vesetumrok megfigyelésében, utánkövetésében és kezelésében fontos szerepe van a prognosztikai jellemzőknek. A Mayo Klinikán a vesetumrok pontosabb prognosztikai megítélésére kidolgozták a Leibovitz scorenak nevezett SSIGN besorolást, mely alacsony, közepes és magas kockázati csoportot különít el a TNM stádium, a tumor méret, a sejtmag grádusa és nekrozis jelenléte alapján (Parker és mtsai 2017). Egy másik prognosztikai score az UISS (University of California Los Angeles integrated staging system), ami ugyancsak alacsony, közepes és magas kockázati csoportba sorolja a betegeket a TNM stádium, a Fuhrman sejtmag grádus és ECOG score alapján (Ficarra és mtsai, 2009; Young és mtsai 2015). Ez utóbbi már úgy szervre lokalizált vesetumorban, mint metasztatizáló vesetumor esetén is használható.

1.4.4. A veserák kezelése

A szervre lokalizált vesetumor elsődleges kezelése sebészi, a tumor nagyságától és elhelyezkedésétől függően nephrectomia vagy partialis nephrectomia végzendő. A

metasztatizáló veserák esetén is van szerepe a sebészeti beavatkozásnak. A citoreduktív nephrectomia javítja a túlélést, a teljes túlélést, főleg kombinált kezelés esetén, azonban a máj és retroperitonealis nyirokcsomó áttét határozottan rossz prognózist jelent Gratzke és mtsai, 2009; Mejean és mtsai, 2018).

A metasztatikus veserák kezelésében több jelátvivő rendszer gátlását okozó készítményekkel kísérleteznek, változó eredménnyel. Az mTOR (mammalian target of Rapamycin) egy jel átvivő rendszer a vesesejt citoplazmájában, mely a membrán receptoron keresztül stimulálható. Az mTOR rendszer működésének következtében stimulálódik a sejtmag RNS termelése, mely egyenes következménye az endothel növekedési faktorok termelése. Ezen endothel növekedési faktorok kijutva az intracelluláris térbe, kötődnek az endothel sejtfelszínén található receptorokhoz, stimulálva annak növekedését.

A második stimuláló út, az a HIF rendszer (Hypoxia indukáló faktorok) túlszaporodása a citoplazmában. A hypoxia indukáló faktorok túlsúlyba kerülésének megakadályozására működik a von Hippel Lindau gén, ami egy tumor suppressor gén, aminek helyes működése megakadályozza ezen faktorok túlszaporodását. Amennyiben ezen gén két allélje vagy mutáció vagy delécio miatt károsodik, úgy a hypoxia indukáló faktorok ugyanazt a növekedési és stimuláló hatást fogják kiváltani a sejtmagban, melynek eredménye az endothel és a platelet növekedési faktorok túltermelése (Patard és mtsai, 2006).

A jelenleg ismert, célzott terápia, a fent említett rendszerek gátlásán alapul. A Temsirolimus és az Everolimus az mTOR jelátvivő rendszert gátolja. A Bevacizumab a VEGF és a PDGF működését gátolja. Az Axitinib, a Cabozantinib, a Lenvatinib, a

Pazopanib, a Sorafenib és a Sunitinib az endothel sejtek receptorának működését gátolja (Motzer és mtsai 2012, és 2013).

Harmadikként megemlíthetjük, hogy jelenleg új útvonalak feltérképezésén dolgozunk, melyek szerepet játszhatnak a vesetumor patogenezisében, ezek például: a MET és az AXL tirozin-protein-kináz receptorokhoz köthető útvonalak (Choueiri és mtsai, 2016).

Újdonságok a veserák kezelésében: Kísérleteznek vakcinával, aminek kísérleti neve IMA 901, egyelőre még kétséges eredményekkel. A dendritikus sejtek működésén keresztül próbálnak immun választ kiváltani, az egyik ilyen szer a rocapuldeucel-T, aminek a kísérleti neve AGS003-as, erre létrehozott vizsgálat az ADAPT vizsgálat, AGS003+Sunitinib kezelés eredményességét vizsgálja.

Immunoterápia a CTLA4, ami a T-limfocitákat stimulálja melynek eredményeként PD1 receptorok expresszálódnak a limfociták felszínén. Az immunterápia, az immunrendszer aktiválása a tumorsejtek ellen, ezt kombinálva angiogenezisgátlók adásával szinergista hatást lehet elérni (Brahmer és mtsai, 2012).

Újdonság továbbá az új VEGFR gátlók ez az Axitinib, ami 50-től 450x nagyobb affinitást mutat az első generációs készítményekhez képest. És ugyancsak új szerek a nivolumab , cabozantinib , levatinib (Hutson és mtsai, 2013).

Újdonság továbbá, hogy kiderült, az angiogenezisgátlók kezelése hatására fokozódik a MET és az AXL aktivitás, így felmerül annak a lehetősége, hogy ezek működésének gátlása további klinikai előnyökkel járna a vesetumor kezelésében.

1.5. A gyulladáson mikrokörnyezet és a tumorok progressziója

A tumorok és ezek stromájában előforduló gyulladás közötti összefüggésre Rudolf Virchow már 1863-ban felhívta a figyelmet, aki a neoplasztikus szövetekben "lymphoreticularis infiltrátum"-ot írt le (Virchow, 1863). Az elmúlt két évtizedben a gyulladáson mikrokörnyezet és tumor progressziójának vizsgálata számos új megfigyeléshez vezetett. Ezek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a tumor sejtekben létrejött gén elváltozások a gyulladáson mikrokörnyezet formálásával elősegítik a tumorok progresszióját (Balkwill és Mantovani 2001; Mantovani és mtsai, 2008; Allavena 2010.). A már kialakult tumorok progressziójában a tumorsejtek által kifejezett gyulladást fenntartó és fokozó géneknek jelentős szerepe van. A tumor sejtek a különböző jelátviteli rendszereken keresztül, mint az NFkB, STAT3, HIF-1a fokozzák a gyulladást elősegítő gének, mint a citokinek, kemokinek termelését. A tumorsejtek által szekretált kemokinek és citokinek a tumor környezetében újabb gyulladáson sejtek toborzásához vezetnek, amelyek transzkripciós faktorokat termelnek, amelyek ismét a kemokinek és citokinek termeléséhez vezetnek és így a gyulladáson folyamat amplifikációja jön létre. Ez a tumorhoz kapcsolódó gyulladás végül is a tumorokra jellemző korlátlan sejtproliferációhoz, a daganatsejtek fokozott túléléséhez, angiogenezishez, tumorsejt-migrációhoz, invázióhoz, metasztázishoz, az adaptív immunreakció gátlásához és a tumorsejtek hormonokra és kemoterápiás szerekre adott megváltozott válaszához vezet (Mantovani, 2008).

A már Virchow által megfigyelt „limforeticuláris infiltrátum” nagy részét kitevő sejtek tulajdonképpen tumorhoz társult makrofágoknak felelnek meg (tumour-associated macrophages, TAM). A TAM-ok a monocita-makrofág vonalból származó sejtek, amelyeket a tumor által termelt citokinek, főképpen a TNF α és IL6 toboroznak a tumor gyulladáson mikrokörnyezetébe (Balkwill és Mantovani 2001). Itt kettős potenciállal

rendelkeznek; részt vehetnek a daganat ellenes valamint a daganatok proliferációját elősegítő folyamatokban. Ha megfelelően aktiválódik, a TAM elpusztítja a tumorsejteket és károsítja az endothel sejteket. Másrészt, a TAM kifejezhet növekedési és angiogén faktorokat, valamint az extracelluláris mátrixokat degradáló metalloproteináz enzimeket, amelyek mindegyike elősegíti tumorsejtek invázióját és a metasztázis képzését (Blackwill és Mantovani 2001). A TAM pleiotropikus funkciója, az úgynevezett "makrofág egyensúly" ("the macrophage balance") mindkét irányban befolyásolhatja a daganat biológiai tulajdonságát. (Mantovani és mtsai, 2008).

A neutrofilek a tumor mikrokörnyezetében a gyulladós sejtinfiltrátum jelentős részét teszik ki. Bár a neutrofileket hagyományosan a bakteriális fertőzések összefüggésében vizsgálják, egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy a tumorhoz kapcsolódó neutrofilek, az u.n. tumour-associated neutrophils (TAN) fontos szerepet játszanak a tumorok biológiai viselkedésében (Piccard és mtsai 2012; Mantovani és mtsai 2011). A tumor mikrokörnyezetében számos sejt által kifejezett specifikus kemokinek, citokinek és sejt adhéziós molekulák vesznek részt a TAN toborzásában. A TAN a neutrofilek különálló populációját képezi, amely a tumor sejtek által közvetített jelek (pl. TGF- β) befolyása alatt olyan pro-tumorigenikus (N2) fenotípust vesznek fel, amely képes a tumor növekedésének támogatására és az antitumor immunválasz elnyomására (Friedlander és Albelda 2012).

A számos daganat citokinhálózata gazdag gyulladós citokinekben, növekedési faktorokban és kemokinekben, de általában a mikrokörnyezetből hiányoznak a specifikus és tartós immunválaszban szerepet játszó citokinek (Burke és mtsai 1996). Jelenleg bizonyítottnak tekinthető, hogy a tumorsejtek és a tumorokhoz társuló leukociták és vérlemezkék által termelt gyulladós citokinek és kemokinek közvetlenül hozzájárulnak a malignus progresszióhoz. Számos gyulladós citokin és kemokin

fokozott kifejeződése a tumor-mikrokörnyezet hypoxiás állapotára vezethető vissza, amely a fiziológiás különbség a tumor és a normál szövet között.

A kemotaktikus citokinek, kemokinek kis 8-10 kDa fehérjék, amelyek fontos szerepet játszanak az immunsejtek toborzásában és így befolyásolhatják a daganat sejtek túlélését, szerepet játszhatnak az angiogenezis szabályozásában és az áttétek kialakulásában (Allavena és mtsai 2010). Tumorsejtekben előforduló génmutáció vagy onkogén aktiválás a kemokinek fokozott kifejeződéséhez vezethet. Például a VHL gén inaktiválása génmutáció vagy promotor metyláció útján a HIF-1alpha fehérje fokozott kifejeződéséhez vezet. Normál körülmények között a vad típusu VHL-nek jelentős szerepe van HIF-1alpha degradációjában. A HIF-1alpha számos gén expresszióját szabályozza, amelyek a sejtek hypoxiához való alkalmazkodását segítik elő. A hypoxia a HIF1alphán keresztül fokozza a CXC-kemokin receptor 4 (CXCR4) megjelenését különböző sejttypusokban, például fagocitákban, endothelsejtekben és daganat sejtekben (Schioppa és mtsai, 2003). A CXCR4 expresszálódik az endothelsejteken, és aktivált állapotban endothelsejt-migrációt és proliferációt okoz, ami a tumor fokozott vaszkularizációjához vezet (Allavena és mtsai, 2010).

A tumor invazív képessége nagymértékben attól függ, hogy képes-e lebontani az extracelluláris matrixot és ezzel lehetővé tegye a terjeszkedését. A gyulladásoos citokinek aktiválják a TAM sejtek által termelt mátrix metalloproteázokat (MMP), amelyek a tumort körülvevő extracelluláris mátrix emésztésével megnyitják az utat az invázióhoz.

A tumor mikrokörnyezetében megfigyelt dendritikus sejteknek, u.n. tumour-associated dendritic cells (TADC) is jelentős szerepe van a tumorok növekedésében. Normal körülmények közt a dendritikus sejtek a veleszületett és az adoptív immunreakció

közötti kapcsolatot biztosítják, de a TADC-k éretlenek és nem képesek megfelelően stimulálni a T-sejteket. Ha a T-sejteknek nem ismerik fel a tumor antigéneket, ezekre az antigénekre nem lesz hatékony immunválasz.

A tumor nekrozis faktor (TNF) az IL6 mellett gyulladás egyik fő közvetítője, amelynek szerepe van a szövetek megsemmisítésében valamint a regenerációjában és gyógyulásában. Pl. sebgyógyulás esetén a gyulladás helyén már sérült sejtek apoptózisa és az erek destrukciója mellett a TNF stimulálja a fibroblasztok növekedését, és az angiogén faktorok kifejeződését (Kollias és mtsai, 1999). A rosszindulatú tumorok mikrokörnyezetében a nagymértékben kifejezett TNF szelektíven elpusztítja a tumorsejteket, de folyamatos alacsonyabb szintű termelődés esetén endogén tumor promoterként működhet, hozzájárulva a tumor növekedéséhez és terjedéséhez szükséges mikrokörnyezet és tumor stroma átalakuláshoz.

Összefoglalva, azok a többnyire acut fázisú gyulladások, amelyek a daganatok invazív és metasztatikus növekedését támogatják elkülönítendőek azoktól a kronikus gyulladásos folyamatoktól, amelyek a daganatok kialakulását segítik elő. Az elsősorban heveny fázisú gyulladásos folyamat a tumorsejtekben végbement gén elváltozások következménye, amely a gyulladás további fokozásához és a tumor növekedéséhez és terjedéséhez vezet. A munka során a gyulladásos folyamatban résztvevő és a tumorsejtek proliferációjához és metasztatikus képességéhez társuló gének elváltozásával foglalkoztam.

1.7. Előzetes vizsgálatok (HD)

A munka során olyan gének expresszióját vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel, melyek kifejeződésének mértéke a Heidelbergben végzett előzetes vizsgálatok alapján összefüggésbe hozható a konvencionális veserák agresszív viselkedésével és metasztatikus képességével. A vizsgálati anyag előkészítése és az adatok kiértékelése a Heidelbergi Ruprecht-Karls-Egyetemen Prof. Kovács Gyula vezetésével működő Molekuláris Onkológiai Laboratóriumban történt. A hybridizációt a szintén Heidelbergben működő EMBL (European Molecular Biology Laboratory) Core Facility részlegén végezték el a Molekuláris Onkológiai Labor munkatársai. A tézisben tárgyalt biomarkerek kiválasztása a progrediáló és nem progrediáló konvencionális veserák mintákon elvégzett globális génexpresszió analízis (Affymetrix) eredményeinek figyelembe vételével történt meg. Az Affymetrix vizsgálatokhoz felhasznált friss veserák és normál vese szövetminták gyűjtése a Heidelbergi Ruprecht-Karls-Egyetem Urológiai Klinikáján 1995-1996-ban operált betegektől történt. Közvetlenül a műtétet követően a tumorból vett homogén szövetminta folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztását végezték, majd a mintákat további feldolgozásig -80°C hőmérsékleten tárolták. A műtéti preparátumot 4%-os formaldehidben fixálták, majd szövettani vizsgálatra küldték. A szövetminták felhasználását a Heidelbergi Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte.

1.7.1. Affymetrix array analysis

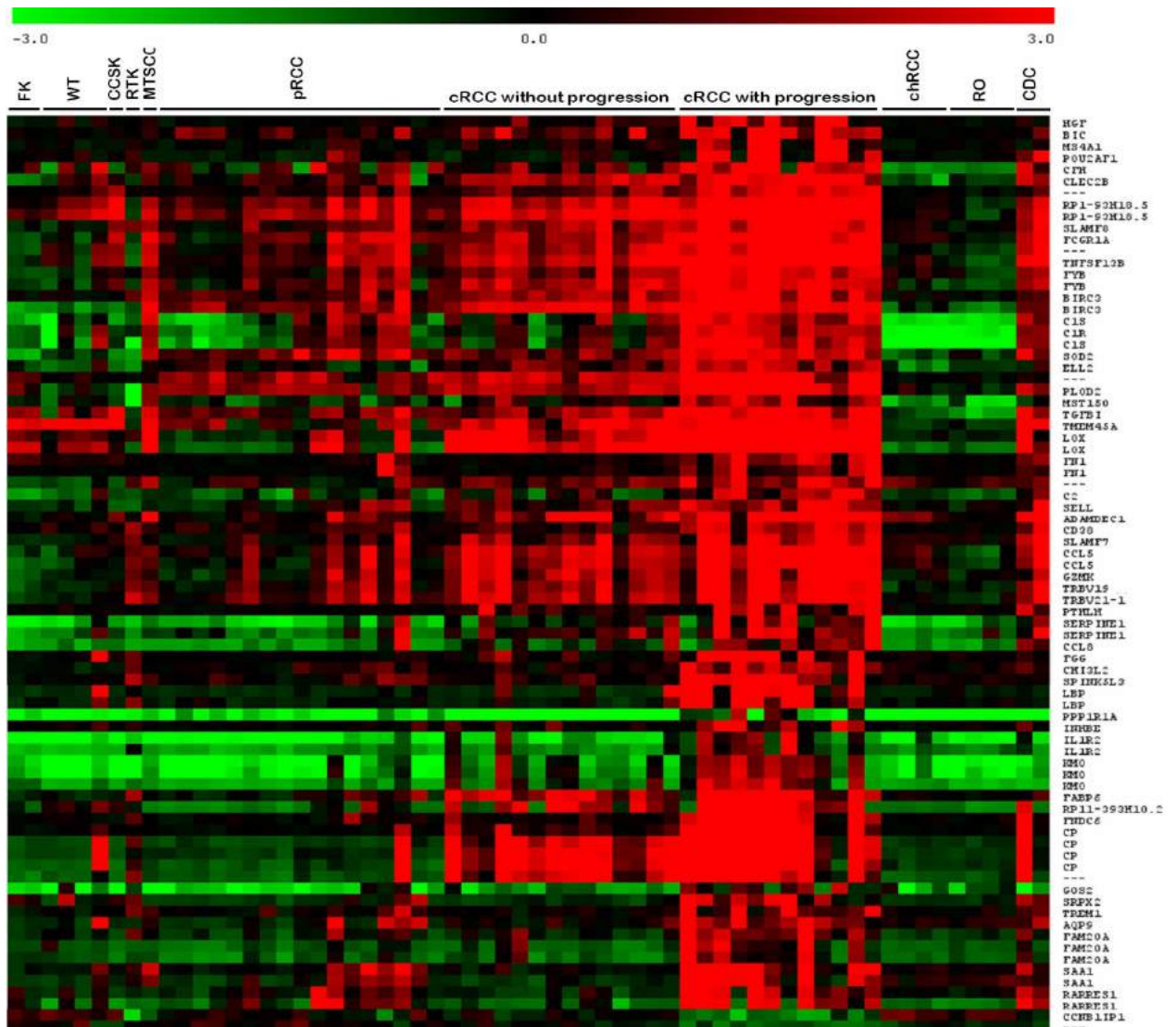
A ribonukleázmentes pufferrel lefedett fagyasztott szövetminták felengedését követően a mintákból a sejteket csipeszek segítségével kinyomták, a visszamaradó stróma nem került felhasználásra. Rövid centrifugálás után a sejteket Trisol oldattal fedték le. Ezt követően az RNS kivonása a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország)

segítségével történt. A további lépésekhez 100 ng RNS-t használtak fel. A cDNS szintézis és jelzés a Molekuláris Onkológiai Laborban, a hibridizáció az EMBL-ben (Core Facility, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) történt az Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA) használatával, mely 54675 humán gén szekvencia vizsgálatára alkalmas. A normalizáció a Bioconductor által biztosított R algoritmus alkalmazásával zajlott. A különböző mértékben kifejeződött gének azonosítása a GSEA (www.broad.mit.edu/gsea) szoftver segítségével történt. Röviden, az expressziós adatokat 2-es alapú logaritmus szerint folyamatos változókká alakították, ezáltal lehetővé téve a fokozott és csökkent kifejeződést mutató gének összehasonlítását. A génhalmaz mérete maximum 500 és minimum 10 gén között lett rögzítve. A vizsgálat során 1000 random minta permutációt hajtottak végre. A gének kiértékelése és rangsorolása a T-teszt segítségével történt. Az expressziós vizsgálat adatai az NCBI Gene Expression Omnibus adattárba a GSE11151 csatlakozási kóddal kerültek feltöltésre.

1.7.2. A konvencionális veserák progressiójához társuló génelváltozások kiválasztása

A globális gén expresszió vizsgálata során összehasonlításra került 14 olyan konvencionális veserák expressziós ujjlenyomata, amelyek 8 évi követés után sem adtak áttétet 12 olyan konvencionális veserák génextpressziós ujjlenyomával, amelyek 3 éven belül a betegek tumor okozta halálához vezettek. A GSEA szoftver azonosította a progrediáló konvencionális veserák mintákon legjobban kifejeződő géneket (2. ábra). Megfigyelhető volt, hogy számos gén nemcsak a progrediáló, de kisebb mértékben és

számban a nem progrediáló tumorcsoportban is kifejeződött. A legjobbnak ígérkező markerek között számos gyulladással kapcsolatos gén, mint pl. *LBP*, *RARRES1*, *TREMI*, *SAAI* volt található. A tézis témájának az *LBP*, *RARRES1* és az utóbbival kapcsolatban az *AGBL2* és *AXL* géneket választottuk ki.



2. Ábra. Heat Map: Affymetrix globalis génexpresszió vizsgálat során a progressziót mutató vese tumor mintákon leginkább kifejeződő gének színekkel ábrázolva. A vörös szín a fokozott expressziót, a zöld szín az expresszió hiányát jelöli. (FK – foetal kidney; WT – Wilms’ tumor; CCSK – clear cell sarcoma of kidney; RTK – rhabdoid tumor of kidney; MTSCC – mucinous tubular and spindle cell carcinoma; pRCC – papillary RCC; cRCC – conventional RCC; chRCC – chromophobe RCC; RO – renal oncocytoma; CDC – collecting duct carcinoma)

2. KÉRDÉS FELVETÉSE

Az utóbbi időben egyre több olyan véletlenszerűen felfedezett pT1, pT2 vagy pT3 stádiumú veserák kerül felismerésre és műtetre, amelyek a vesére korlátozottak és amelyek esetekben a rendelkezésre álló vizsgálati módszerekkel még nem tudunk progressziót kimutatni. Ezeknek az eseteknek mintegy 15-20%-a a kedvező kiindulási paraméterek ellenére progressziót mutat és a műtét utáni követés során áttétek kialakulásához vezet. A TNM klasszifikáció, különösen a pT1 és pT2 tumorok esetében nem ad információt az egyes tumorok várható progressziójáról. Bár az Affymetrix vizsgálatokból egyes gének kifejeződése és a tumor progressziója közötti összefüggésre lehetett következtetni, az Affymetrix array a gének kifejeződését csak az RNS szinten adja meg, amely sok esetben nem egyezik meg a biológiailag aktív fehérje kifejeződésével. Az előzetes RNS adatok megerősítésére a tumor szövetek immunhisztológiai vizsgálatát végeztük el.

A, A tézis témájául először egy acut fázis fehérjét, az **LBP** gént választottuk ki. A kérdésünk az volt, hogy van-e összefüggés az LBP tumorsejtekben való kifejeződése és a tumorok progressziója között?

B, A másik gén, a **RARRES1** egy karboxypeptidáze gátló, amely az **AGBL2** karboxypeptidáze génnel komplexumot képezve befolyásolja a mikrotubulusok funkcióját és így a tumorok progresszióját.

C, Az **AXL** gént a **RARRES1**-el való összefüggése, de elsősorban a legújabb **AXL** gátló therapias eljárások figyelembevételével választottuk ki.

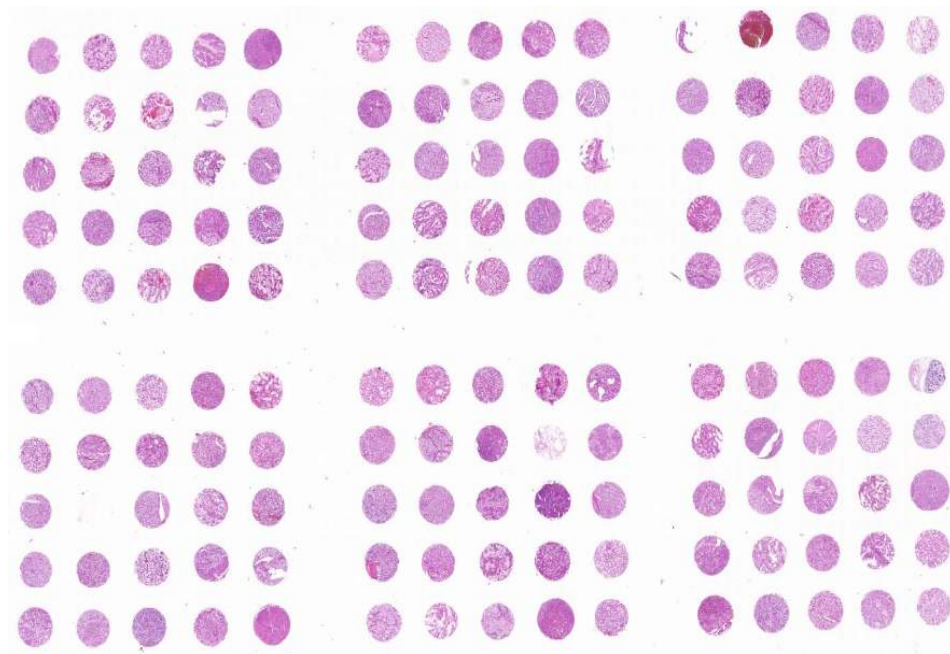
3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Betegek és szövetminták

A Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikáján 2000. január és 2013. december között konvencionális veserák miatt radikális vagy parciális nefrektómián átesett betegek közül a jó nyomonkövetési adatokkal rendelkező esetek retrospektív módon kerültek beválasztásra. A nyomonkövetési és halálozási adatokat a PTE Urológiai Klinika dokumentációs rendszereiből (Betegregiszter, Intramed, eMedSol) nyertük. Nyomonkövetési időnek a műtéttől az utolsó dokumentált kontrol vizsgálatig vagy a beteg veserák következtében bekövetkezett haláláig eltelt időt tekintettük. A vesetumortól független okból kifolyólag elhunyt betegeket a nyomonkövetési idő kiszámításánál nem vettük figyelembe. Staging céljából a műtét előtt minden esetben mellkas RTG, has és kismedencei CT vizsgálat történt. Agyi vagy csont metasztázis jelenlétére utaló klinikai tünetek fennállása esetén csontscintigráfia és koponya CT vizsgálatot is végeztünk. Nyirokcsomó érintettség megállapításánál a szövettani eredményt, távoli áttéteknél a képalkotó vizsgálatok eredményeit vettük alapul. A műtétet követő nyomonkövetés során hathavonta végeztünk hasi ultrahang vizsgálatot, mellkas röntgent és laborvizsgálatot, évente hasi és kismedence CT vizsgálatot. A szövettani diagnózis minden esetben a témavezetőm által került felülvizsgálatra a Heidelbergi Klasszifikációnak megfelelően [Kovacs és mtsai. 1997]. A TNM stádium megállapítását a 2016-os TNM klasszifikáció [Brierly és mtsai, 2016] szerint végeztük. A nukleáris grádus meghatározása a témavezető által több mint 30 éve használt háromfokozatú rendszer alkalmazásával történt. A szövetminták gyűjtését és feldolgozását a PTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyének birtokában végeztük (Etikai engedély száma: 5343/2014).

3.2. Tissue microarray

A vizsgálat során főtális és felnőtt egészséges veseszövetet, valamint konvencionális veserákot tartalmazó paraffin blokkokat használtunk fel tissue microarray (TMA) készítéséhez. A tumoros blokkokból készített hematoxin-eozin festett metszetek áttekintése során került kijelölésre a mintavétel helye. Ezt követően a kijelölt területnek megfelelően a paraffinba ágyazott szövetblokkból Manual Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, Michigan, USA) készülék segítségével 0.6 mm átmérőjű szövethengereket emeltünk ki. Különböző szöveti megjelenésű vagy grádusú területekkel rendelkező tumorokból több (2-4) mintát vettünk. Az így nyert szövethengereket az MTA1 készülék segítségével egy közös paraffin blokkba ágyasztuk be, lehetővé téve 150 minta egy metszeten történő egyidejű vizsgálatát. Az antitest festődés ellenőrzése céljából és a TMA jelzésére egészséges főtális és felnőtt vese mintákat is beépítettünk (4. ábra).



3. Ábra. Representative tissue microarray 150 tumor mintával. Technikai okok miatt általában 1-3 biopsziás minta került vesztesre, amely nem befolyásolta az immunhisztológia kiértékelését.

3.3. Immunhisztokémia

A TMA-kból készített 4 µm vastagságú metszetekből a paraffint xilol segítségével eltávolítottuk, majd a metszeteket leszálló alkohol sorozatban rehidráltuk. Ezt követően az antigén feltárást 10 µM natrium-citrát pufferben (pH 6,0) és TE pufferben (pH 9,0) a 2100-Retriever (PICK-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia) készülékben végeztünk el.

Az endogen peroxidáz és a nem specifikus kötőhelyek blokkolása 1% normal ló szérumot tartalmazó 0,3%-os hidrogénperoxidban történt szobahőmérsékleten 10 percig. A lemezeket lefedtük az előre kipróbált hígítású antitesttel majd a lemezeket éjszakán át nedves kamrában 4°C-on inkubáltuk. A következő antitesteket használtuk fel: LBP, RARRES1, AGLB2 és AXL:

polyklonális nyúl anti-LBP antitest (HPA 001508, Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden) 1:250 hígításban;

polyklonális nyúl anti- RARRES1 antitest (HPA 001508, Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden) 1:250 hígításban;

polyklonális nyúl anti-CCP2 (AGLB2) antitest (PA5-22310, Thermo Fisher Scientific, Budapest, Hungary), 1:200 hígításban;

polyklonális nyúl anti-AXL antitest (PA5-39124, Thermo Fisher, Budapest, Hungary) 1:200 hígításban.

Harminc percig történő HRP conjugált anti-nyúl másodlagos antitest (MACH4 Universal HRP-Polymer, Biocare Medical, Concord, USA) alkalmazását követően az előhívás AEC szubsztrát és DAB (DAKO, Glostrup, Denmark) segítségével történt, majd a metszeteket Mayer hematoxilinnel festettük. Végül a metszetek különböző időpontban történő kétszeres kiértékelése történt a klinikai adatok ismerete nélkül.

3.4. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai feldolgozása az SPSS Statistics szoftver 23.0 verzió (IBM,35 Armonk, NY, USA) segítségével történt. A vizsgált gének expressziója és a klinikopatológiai paraméterek közti összefüggéseket a khi-négyzet próba alkalmazásával elemeztük. A különböző változók (életkor, nem, tumor méret, TNM klasszifikáció, nukleáris grád, stádium, metasztázis jelenléte és a vizsgált gén expressziója) túlélési időre gyakorolt hatását Kaplan-Meier analízis segítségével mértük fel, a túlélési görbék összehasonlítását log-rank teszt alkalmazásával végeztük. A túlélésre gyakorolt hatás egyváltozós és többváltozós analizise a Cox regressziós modell segítségével történt. A vizsgálat lezárultakor életben lévő és tumormentes betegeket cenzoráltuk. A különbséget 0,05-nél kisebb p érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

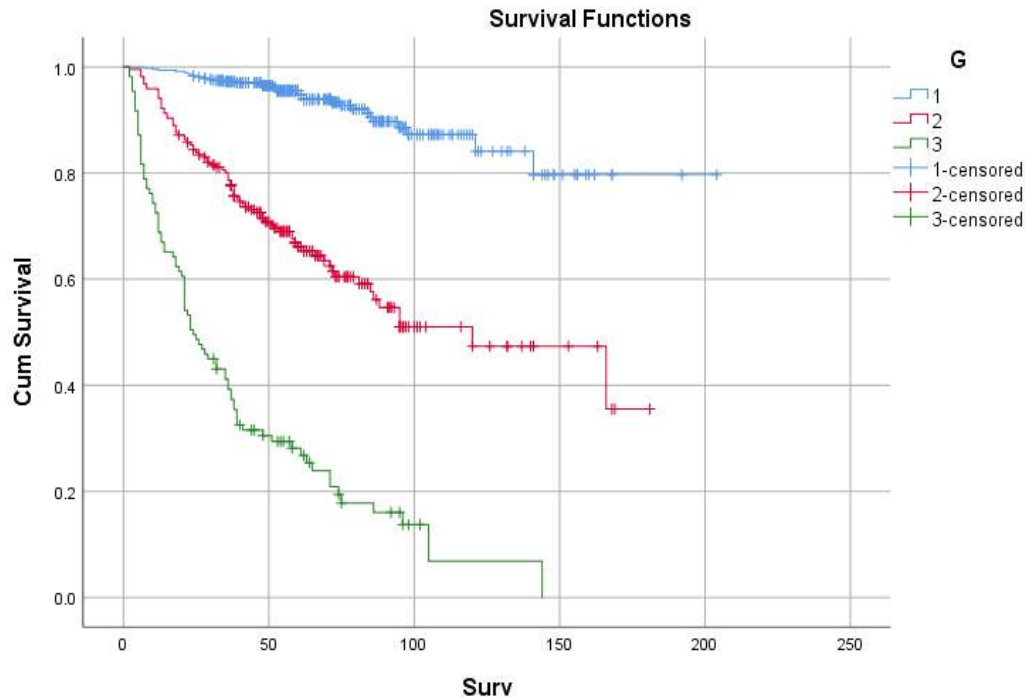
4. EREDMÉNYEK

A biomarkerek értékelése nemzetközi szinten egy meghatározott klinikai és morfológiai beosztáshoz igazodik. Mi nem követjük a vese rák grádusának megítélésére nemzetközileg használt, elavult 4 grádusú Fuhrman szisztémát, hanem az évek óta általunk használt 3 grádusú beosztást. Ezenkívül meghatároztuk a tumor méret, T stádium és Staging jelentőségét a klinikai lefolyás megítélésében.

4.1.1. Gade

Az irodalomban alkalmazott Fuhrman gradus helyett, az általunk már évtizedek óta használt 3 grádusú beosztást alkalmaztuk. Ennek az alapja, hogy azokat az eseteket tekintettük grade 1-es tumornak, amelyekben a sejt magok alakja, nagysága hasonló a normális vese szövetben is megfigyelhető minimális variációval. A grade 3 kritériuma gyakorlatilag a nagyfokú sejtmag polymorfia, a sejtek változatos nagysága, valamint a szarkómás átalakulás. Gade 2 pedig a kettő között van. Ez a gradus beosztás ugyan szubjektív, nagy gyakorlatot igényel, de amint a Kaplan-Meier görbe is mutatja, a gyakorlatban jobban használható, mint a Fuhrmann grade, ahol az 1-es és 2-es gradus megkülönböztetésének nincs semmilyen jelentősége.

A patológusok törekvése az objective gradus megállapítására gyakorlatilag nem megoldható, hiszen a morfológiai jelek G1-től a G3-ig nem ugrásszerűen, hanem fokozatosan változnak. Így nagy gyakorlattal viszonylag jó eredményt lehet elérni, a mikrométeres sejtmagvacskák mérése csak a tapasztalatlan patológus lelkiismeretének megnyugtató szolgálya. Ezenkívül figyelembe kell venni, hogy a szövettani diagnosis nem az élő tumort, hanem a fixálás és feldolgozás során bekövetkezett artefaktot vizsgálja.

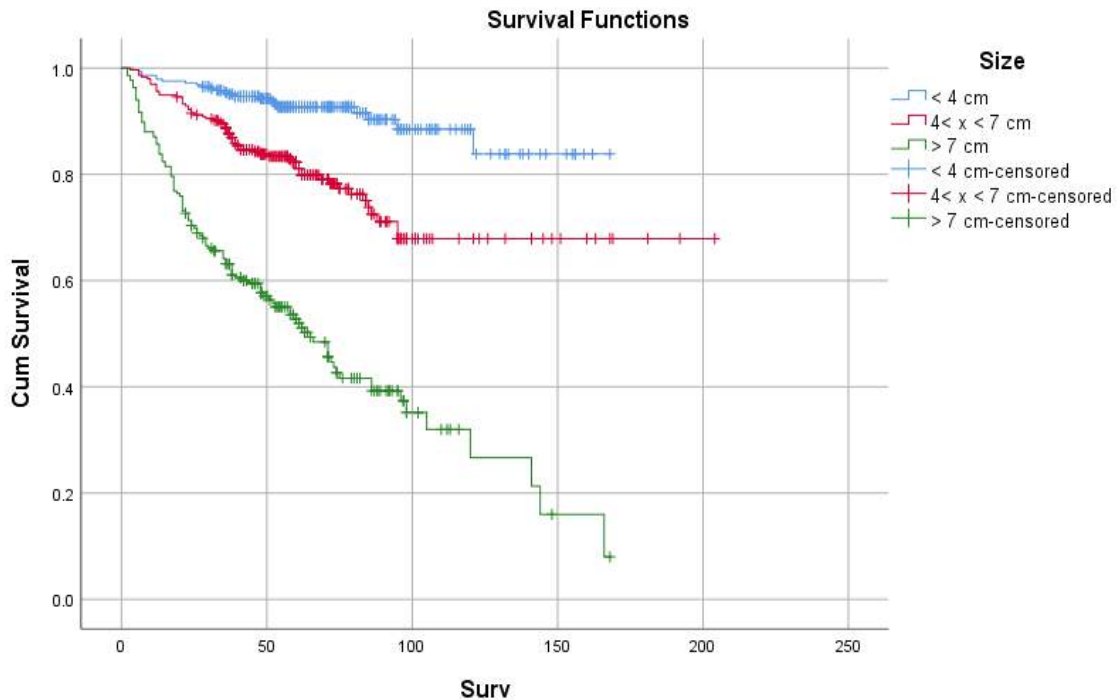


4. Ábra. A 3-as grádusú beosztás szerint elvégzett Cox regressziós értékelés szerint a tumor ilyen jellegű megítélésének jelentősége van a tumorok progressziójának megítélésében. A G1-es tumorok 95%-a tumormentes volt az öt éves követés alatt, míg a G2-es tumoroknak csak 68%-a és végül a G3-as tumoroknak csak 29%-a.

4.1.2. Tumorok mérete

A T1 stádiumot két alcsoportra osztják be és megkülönböztetnek 4 cm-nél kisebb (T1a) valamint 4 és 7 cm közötti (T1b) átmérőjű tumorokat. A T2 stádiumban szintén két alcsoport található, amelyeket szintén a tumor mérete alapján különböztetnek meg: a T2a (7-10 cm) valamint T2b (nagyobb mint 10 cm). Mi a gyakorlati szempontok figyelembevételével, mint parciális nefrektómia és műtéti technika, a pT2 tumorokat egy csoportba osztottuk be. A Kaplan-Meier regressziós analízis szignifikáns különbséget mutatott ki a tumorok mérete és a betegek túlélése közt (5. Ábra). A 4 cm-nél kisebb daganatok esetében az 5 éves túlélés 95% volt, a pT1b tumoros betegek túlélése 84% volt, míg a 7 cm-nél nagyobb tumoroké csak 55%. Természetesen, ebben a kiértékelésben kizárólag a tumor átmérője volt figyelembe véve. Itt kell megjegyezni,

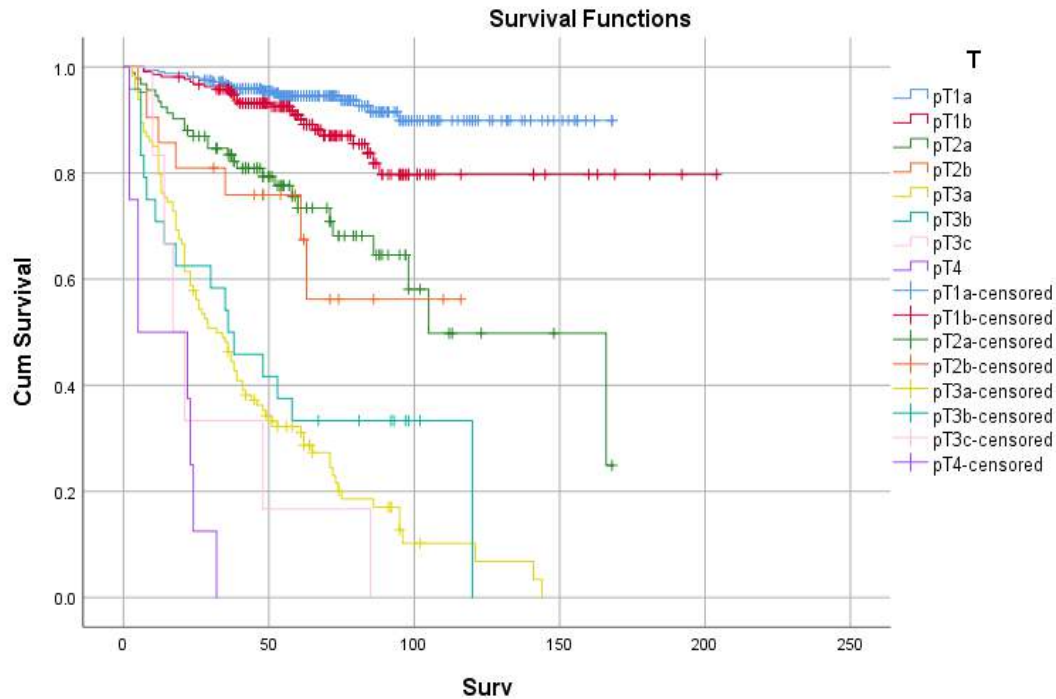
hogy a 4 és 7 cm közötti tumorok között előfordulnak olyan esetek, amelyek a pT3a kategóriába tartoznak vagy a tumor magas grádusú, azaz G3. Tehát a tumorok méretének elsősorban az operatív beavatkozás megválasztásának szempontjából van jelentősége. De amint az 5. ábra mutatja, a klinikai patológiai gyakorlatban általánosan használt tumor méret kategóriáknak is van prognosztikai jelentősége.



5. ábra. A tumorok mérete és progressziója közötti összefüggés. Az öt éves tumor specifikus túlélés a 4 cm-nél kisebb tumorok esetében 95%, a 4 és 7 cm közötti tumoroké 85% még a 7 cm-nél nagyobb átmérőjű tumorok esetében csak 57%.

4.1.3. T-stadium

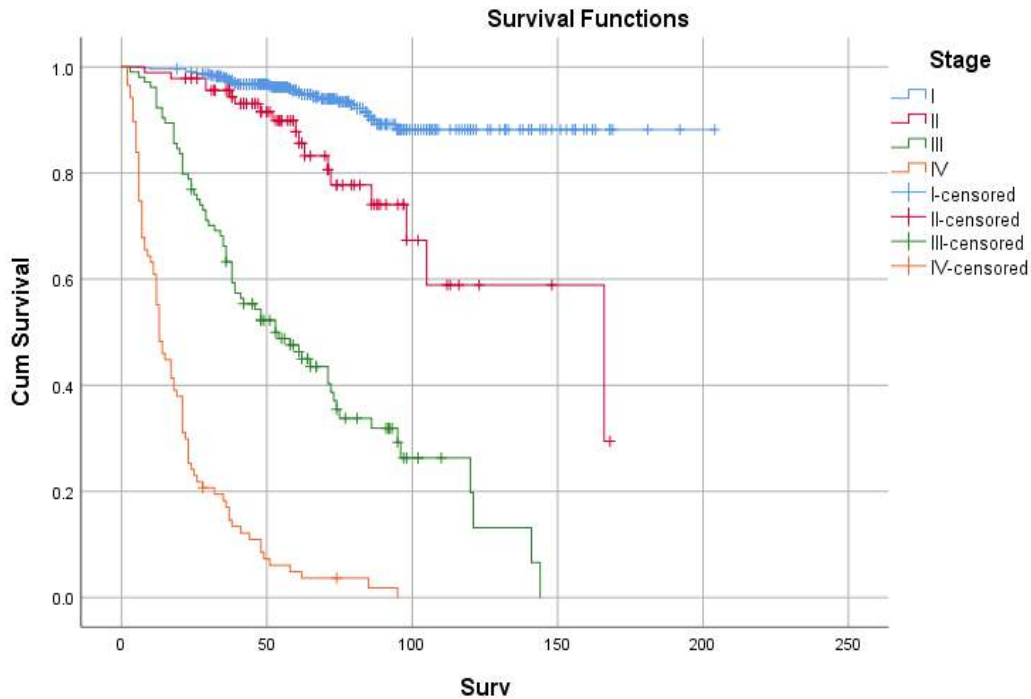
Valójában minimális különbséget találtunk a T1a és T1b stádiumú tumorok között az öt éves követés során, de az olló kinyílt a későbbi években. A pT3a és pT3b csoport között is minimális a különbség, míg a pT3c és pT4 rossz prognózist jelent (6. Ábra).



6. ábra. A konvencionális veserák progressziója és a T-stádium közötti összefüggés.

4.1.4. Stage.

A Kaplan-Meier görbe alapján az I-es stádiumú tumorok progressziója kb. 8 éves túlélés után nem várható, ezek a betegek ebben az időben gyakorlatilag gyógyultnak tekinthetők. Ugyanakkor, amint az várható volt, a II-as és IV-es stádiumú tumorok esetében folyamatos progresszió figyelhető meg. Véleményünk szerint a Staging, amely figyelembe veszi a műtét idején már mérhető tumor progressziót is, használható legjobban a betegség lefolyásának megítélésére a hagyományos paraméterek figyelembe vételével (7. Ábra). Ha azonban a vesére lokalizált 7 cm-nél kisebb tumorokat vesszük figyelembe, amelyek túlnyomó részében a műtét idején nincs progresszióra utaló jel, akkor a staging sem segít a pT1/stage I esetekben egy magasabb risikójú betegcsoport meghatározásában.



7 Ábra A stage I tumorok 95%-a stage II tumorok 91%-a volt életben az 5 éves követés során míg a stage III betegeknek csak 51%-a és a stage IV tumoroknak csak 5%-a.

Mivel a kérdésünk az volt, hogy mennyiben tudjuk a vizsgált biomarkerek segítségével a postoperatív progresszió rizikóját megállapítani ezért vizsgálatunkban kizárólag azokat az eseteket vettük figyelembe, amelyeknél a műtét idején nem volt kimutatható áttét. A különböző klinikai-patológiai paraméterekkel való kiértékelésben a fentebb említett szempontokat vettük figyelembe. A 691 betegből 407 (60%) volt férfi míg 285 (40%) nő. Az átlagos életkor 61.1 ± 11.4 év volt (20–88 év). Az átlagos tumor méret 54.5 ± 30.4 mm volt. Az átlagos követési idő 60.6 ± 33.2 hónap alatt 107 betegben alakult ki metasztatikus tumor.

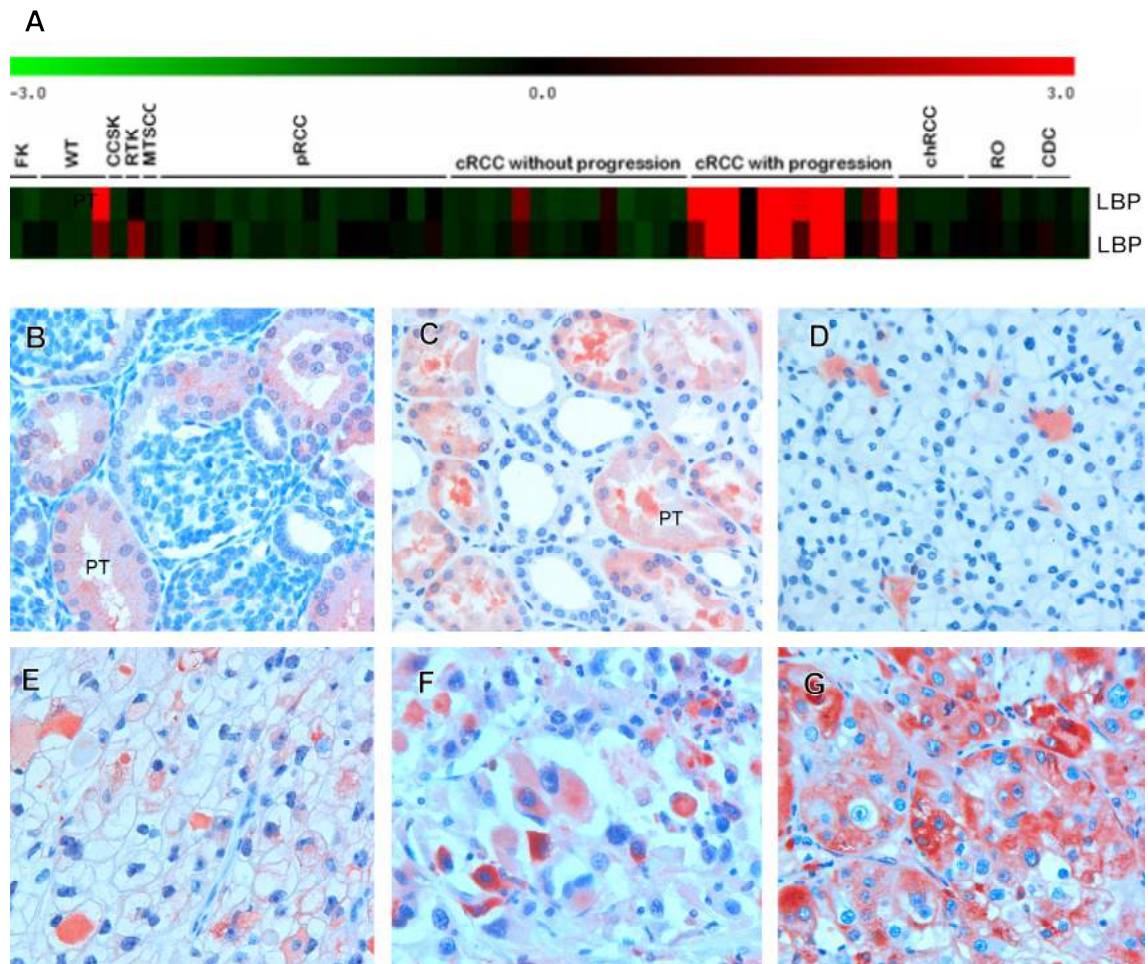
4.1. LBP (lipopolysaccharide binding protein)

4.1.1. Az LBP kifejeződése normal vesében és konvencionális veserákban

Az Affymetrix array az LBP fokozott kifejeződését két gyermekkori daganat kivételével kizárólag a progressziót mutató konvencionális vesetumorokban jelezte (8. Ábra, A). Érdekes megjegyezni, hogy vizsgálatba bevont köztudottan rendkívül agresszív növekedésű, ebben az esetben már áttétet adó Bellini gyűjtőcsatorna karcinóma nem mutatott fokozott LBP expressziót.

Az immunhisztológiai vizsgálat során az LBP protein kifejeződését a főtalis vesében kizárólag a kialakuló proximális tubulus sejtszövetekben észleltük (8. Ábra, B). Hasonlóan, az LBP protein felnőtt vesében is csak a proximális tubulus sejtszövetekben fejeződött ki (8. Ábra, C). Más nefron szakaszokban nem találtunk LBP pozitív reakciót sem a főtalis sem a felnőttkori vesében. Az immunhisztokémiai vizsgálat nem mutatott pozitív reakciót az LBP antitesttel 588 (85%) konvencionális veserákban, míg 103 (15%) tumorban különböző erősségű LBP pozitív reakció fordult elő (8. ábra D-G). Mivel az LBP kifejeződése a tumor progressiójával mutatott összefüggést, azokban az esetekben, ahol a multiplex biopsziák közül egy-egy negatív, de a harmadik biopszia pozitív volt vagy ha az azonos tumorból származó biopsziák között különböző intenzitású LBP festődést észleltünk, minden esetben a legerőteljesebb kifejeződést mutató biopsziát vettük figyelembe. Az előzetes Kaplan Meier analysis során nem találtunk jelentős különbséget a gyenge és erős immunhisztológiai szignált mutató tumorok és a betegek túlélése közt, ezért a gyenge valamint erős festődést egyaránt mint pozitív eredményt értékeltük ki. A negatív esetekben gyakran észleltünk pozitív festődést a kapillárisokat kitöltő szérumban. Egyes tumorokban, különösen a rhabdoid megjelenésű

konvencionális veserákok citoplasmájában “zárványszerű” erős pozitívítás volt látható. Számos esetben az összes tumorsejt cytoplasmája erőteljes immunreakciót mutatott.



8. Ábra. Az LBP expressziója konvencionális veserákban és normal vesében. **A** A “heat map” kiválasztott része, amelyik az LBP mRNS kifejeződését jelzi a nem progrediáló és gyors progressziót mutató konvencionális veserákokban. Az LBP fokozott kifejeződését progrediáló veserákokban a piros szín jelzi. (FK-foetal kidney, WT-Wilms tumour, CCSK-clear cell sarcoma of the kidney, RTK-rhabdoid tumour of the kidney, MTSCC-mucinous tubular and spindle cell carcinoma, pRCC-papillary RCC, cRCC-conventional RCC, chRCC-chromophobe RCC, RO-renal oncocytoma, CDC-collecting duct carcinoma). **B** LBP pozitívítás főtalis vese proximális tubulusokban (PT). **C** Immunhisztologiai vizsgálat felnőttkori vesében is kizárólag a proximális tubulus (PT) sejteiben mutatott pozitív LBP reakciót. **D** Az LBP protein hiánya egy konvencionális veserákban. A pozitív reakció a strómális szinuszokban lévő szérumot jelzi. **E-G** Gyenge, közepes intenzitású és kifejezett LBP immunreakció konvencionális veserákokban (Kovacs és mtsai, 2017).

4.1.2. Az LBP expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel

Az LBP expresszió és a klinikai-patológiai mutatók, mint a daganatspecifikus halálozás, a tumor mérete, a nukleáris grádusa és a T-stádiuma közötti viszony statisztikai elemzése során mindegyik paraméter tekintetében szignifikáns összefüggés volt kimutatható ($p < 0,001$) (4. táblázat).

4. Táblázat. A klinikai és patológiai paraméterek és az LBP kifejeződése közötti összefüggés

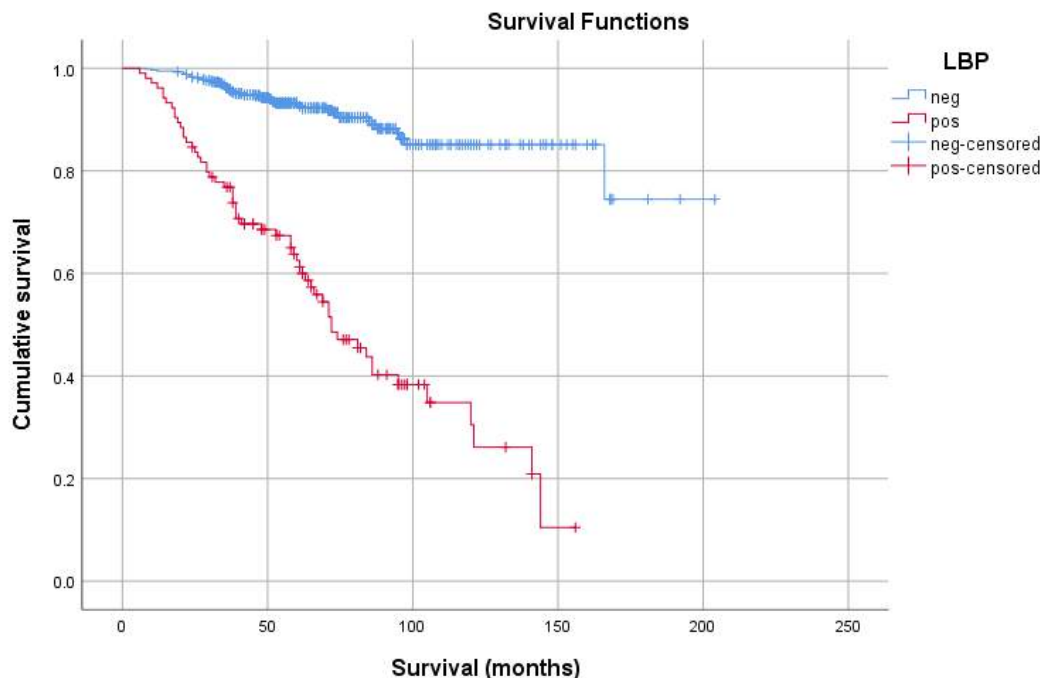
		Nr of cases (691)	LBP expression		p-value
			neg (588)	pos (103)	
Gender	male	407	337	70	0.056
	female	285	251	34	
Status	AWD	584	538	46	<0.001
	DOD	107	50	58	
Size	< 4 cm	272	259	13	<0.001
	4< x < 7 cm	269	231	38	
	> 7 cm	151	98	53	
T	pT1	511	475	36	<0.001
	pT2	94	75	19	
	pT3	86	37	49	
Grade	G1	458	430	28	<0.001
	G2	180	138	42	
	G3	54	20	34	
Stage	I+II	596	541	55	<0.001
	III	96	47	49	

AWD – az utolsó kontrol idején életben van a betegség progressziója nélkül

DOD – a követés során a betegség progressziója következtében meghalt

4.1.3. Az LBP expresszió és a túlélési adatok közötti összefüggés

A log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélési analízis az LBP antitesttel pozitívan festődő tumorok esetén lényegesen rövidebb daganatspecifikus túlélést mutatott ki azokban az esetekben, amelyekben a műtét során még nem volt metasztázis kimutatható (9. ábra). Az 5-éves tumor specifikus túlélési idő az LBP negatív tumorú betegek esetében 92.6%, míg az LBP pozitív tumorú betegek esetében csak 62.5% volt. Az átlagos túlélés pozitív esetekben 83 (72-93) \pm 6 hónap, negatív esetekben 179 (169-188) \pm 5 volt, míg a teljes túlélés 158 (148-168) \pm 5 volt.



9. Ábra. Log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis LBP negatív (kék görbe) és LBP pozitív (piros görbe) tumorral operált betegek esetén, a teljes beteganyagon (n=691). A Kaplan-Meier vizsgálat az LBP pozitívítás prognosztikai értéket mutatta ($p > 0.001$).

Egyváltozós analízis alapján a T-stadium, tumor grade, tumor stage és a tumour mérete, valamint LBP pozitívítás szignifikáns összefüggést mutattak ($p < 0.001$). Az LBP pozitív esetekben a daganatspecifikus halálozás kockázata szignifikánsan magasabb volt (RR 7.287 95% CI – 4.97-10.66; < 0.001). Az LBP pozitívítás független prognosztikai

értékének meghatározása érdekében elvégeztük a többváltozós analízist az ismert klinikopatológiai prognosztikai változókat figyelembe véve (5. táblázat). Többváltozós analízis során az LBP expresszió - a nukleáris grádus mellett - független prognosztikai faktornak bizonyult (RR-2.37; 95% CI- 1.50-3.73; $p>0,001$).

5. Táblázat. A klinikai és patológiai paraméterek és az LBP expresszió összefüggése a daganatspecifikus túléléssel Cox regressziós analízis alapján

Parameters	Multivariate analysis			p-value
	RR	Relative risk (95% CI)		
		lower	upper	
Age	1.011	0.993	1.029	0.224
Sex male female	0.837	0.557	1.259	0.394
Size < 4 cm				0.109
4< x < 7 cm	1.459	0.738	2.884	0.277
> 7 cm	0.871	0.386	1.969	0.741
T T1				0.001
T2	5.217	0.470	57.933	0.179
T3	2.516	0.327	19.348	0.375
Grade G1				0.004
G2	2.068	1.223	3.496	0.007
G3	2.800	1.512	5.186	0.001
Stage I				0.082
II	0.680	0.059	7.790	0.757
III	3.011	0.400	22.688	0.285
LBP pos	2.372	1.506	3.736	<0.001

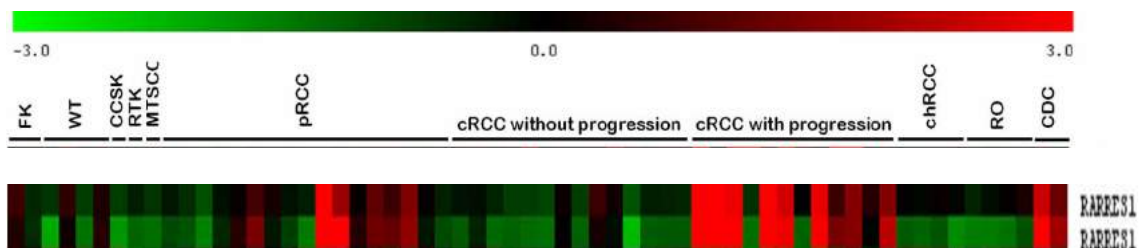
RR, relatív rizikó; P-érték <0.05 kiemelt.

4.2. RARRES1

4.2.1. A RARRES1 RNS kifejeződése a gyors progressziót mutató konvencionális veserákban

Egy korábban a Heidelbergi Molekuláris Onkológián elvégzett 12 gyors progressziót mutató konvencionális veserák (minden beteg daganatos progresszió miatt három éven

belül meghalt), valamint nyolc éven belül nem progrediáló 12 veserák összehasonlító globális gén expressziós vizsgálatából kiemeltük a RARRES1 génre vonatkozó eredményeket. Az Affymetrix génextpressziós array a RARRES1 fokozott kifejeződését mutatta a gyors progressziójú konventionális veserákok legnagyobb részében (10. ábra). Ezenkívül kifejezetten pozitív szignál volt látható a két Bellini duktus karzinómában valamint az invázív növekedést vagy áttétet mutató papilláris vesetumorokban.

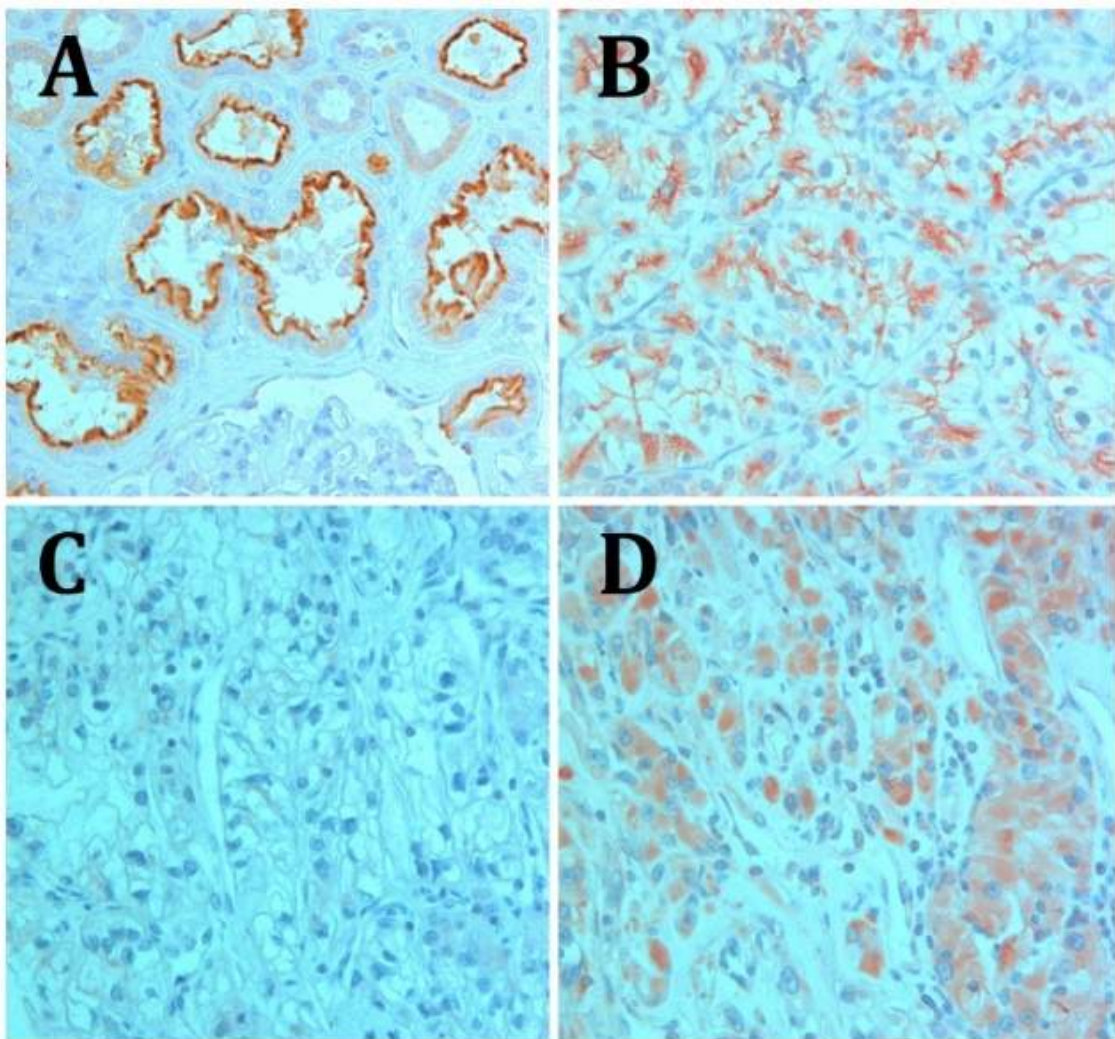


10. Ábra. A heat map kiemelt része a RARRES1 gén expressziójával. A 12 konventionális veserák közül 9 esetben a RARRES1 fokozott kifejeződését figyeltük meg. A felső skálán a fokozott génextpresszió piros színnel, míg a csökkent génextpresszió világos zöld színnel van jelölve. (FK-foetal kidney, WT-Wilms tumour, CCSK-clear cell sarcoma of the kidney, RTK-rhabdoid tumour of the kidney, MTSCC-mucinous tubular and spindle cell carcinoma, pRCC-papillary RCC, cRCC-conventional RCC, chRCC-chromophobe RCC, RO-renal oncocyoma, CDC-collecting duct carcinoma).

4.2.2. A RARRES1 kifejeződésének megerősítése immunhisztológiával

Az immunhisztológiai vizsgálat során a RARRES1 fehérje a főtális és felnőttkori vesében kizárólag a proximális tubulus sejteinek lumenáris felszínén volt kimutatható (11. Ábra A). Más nefron szakaszokban nem találtunk RARRES1 pozitívítást sem a főtális sem a felnőttkori vesében. A konventionális veserákok közül 454 tubuláris-trabekuláris növekedést mutató tumorban a normal proximális tubulusokhoz hasonlóan tubuláris felszínen vagy az annak megfelelő membrán területén láttunk RARRES1 pozitívítást (11. Ábra B). Az immunhisztokémiai vizsgálat nem mutatott pozitív reakciót a RARRES1 antitesttel 106 konventionális veserákban (11. ábra C). A normál vese tubulusoktól és a tumorok egy részétől eltérően, 131 tumorban intenzív

cytoplasmikus RARRES1 reakciót figyeltünk meg (11. ábra D). Így a továbbiakban megkülönböztettünk membránhoz kötött és cytoplasmikus pozitivitást valamint negatív festődést. Az ennek alapján elvégzett Kaplan-Meier analysis jóval rövidebb túlélést mutatott azokban az esetekben, ahol a pozitív reakció a cytoplasmában volt látható. Ezért azokat az eseteket, ahol a multiplex biopsziák közül legalább egy cytoplasmikus reakciót mutatott, cytoplasmikus pozitív tumornak értékeltük ki.



11. Ábra. Az anti-RARRES1 antitest sejtstruktúrához kötött kifejeződése konvencionális vese tumorokban. A, Normalis felnőttkori vese proximális tubulusok lumen felületén kifejezett RARRES1 immunreakció. A distális tubulusok nem festődtek. B, Hasonló elhelyezkedésű immunreakció konvencionális veserákban. C, Hiányzó immunreakció egy konvencionális veserákban a RARRES1 antitesttel. D, Globuláris jellegű citoplazma festődés egy invázív növekedésű konvencionális veserákban.

4.2.3. A RARRES1 expresszió és a klinikai-patológiai paraméterek kapcsolata.

A 11. Ábrán jelzett különböző megjelenésű RARRES1 immunreakciót 691 konvencionális veserákban értékeltük ki. A RARRES1 sejtsztruktúrához kötött kifejeződése és a klinikai-patológiai paraméterek közötti összefüggést a 6. táblázatban mutatjuk be. A cytoplasmatikus RARRES1 pozitivitás valamint a tumorok mérete, grádusa, T klasszifikációja és staging valamint a tumor specifikus túlélés között szignifikáns összefüggést találtunk (mind $p < 0.001$).

6. Táblázat. A RARRES1 kifejeződése és a klinikai-patológiai paraméterek közötti összefüggés.

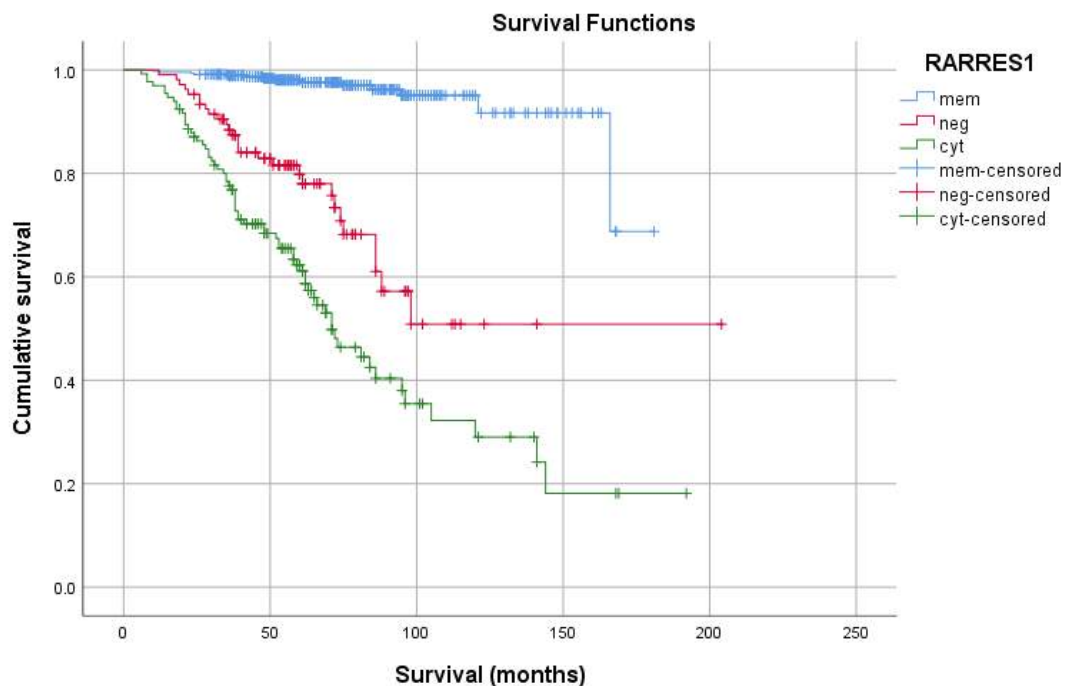
		Nr of cases (691)	RARRES1 expression			p-value
			neg (106)	memb (454)	cyt (131)	
Gender	male	407	74	243	90	<0.001
	female	285	32	211	42	
Status	AWD	584	78	440	66	<0.001
	DOD	107	28	14	66	
Size	< 4 cm	272	30	227	15	<0.001
	4 < x < 7 cm	269	50	163	56	
	> 7 cm	151	26	64	61	
T	pT1a	308	37	252	19	<0.001
	pT1b	203	34	134	35	
	pT2	94	17	53	24	
	pT3	86	18	15	53	
Grade	G1	458	69	363	26	<0.001
	G2	180	27	85	68	
	G3	54	10	6	38	
Stage	I+II	596	88	433	75	<0.001
	III	96	18	21	57	

AWD – az utolsó kontrol idején életben van a betegség progressziója nélkül.

DOD – a követés során a betegség progressziója következtében meghalt.

4.2.4. A RARRES1 expresszió és a tumormentes túlélés

Szignifikáns összefüggést találtunk a RARRES1 gén sejten belüli kifejeződésének változatai és a betegség progressziója között (12. ábra). Az 5 éves túlélés a RARRES1 membránhoz kötött, negatív és cytoplazmatikus kifejeződése esetén 97.6%, 79.8% and 61.6% volt.



12. Ábra. A RARRES1 expresszió és a tumoros betegek túlélése közötti összefüggés eredménye a Kaplan-Meier regressziós vizsgálattal (Kaplan-Meier görbe (Log rank (Mantel-Cox), $p < 0.001$))

4.2.5. RARRES1 lokalizációja és magas recidiva kockázat közötti összefüggés.

Egyváltozós analízis alapján a tumor mérete, tumor grádus, T-stadium és tumor stage valamint RARRES1 különböző sejtstruktúrákon észlelt pozitivitás között szignifikáns összefüggés volt (RR 10.391, 95% CI – 5.466-19.753; < 0.001 ill. RR 20.688, 95% CI – 11.607-36.871; < 0.001). A RARRES1 negatív ill. cytoplazmatikus pozitív esetekben a postoperatív tumor progresszió és így a daganatspecifikus halálozás kockázata

szignifikánsan magasabb volt. A RARRES1 kifejeződés független prognosztikai értékének meghatározására elvégeztük a többváltozós analízist az ismert klinikopatológiai prognosztikai változókat figyelembe véve (7. Táblázat). Többváltozós analízis során a a RARRES1 expresszió hiánya ill cytoplasmatikus expressziója - a nukleáris grádus mellett - független prognosztikai faktornak bizonyult (RR-8.402; 95% CI- 4.245-16.631; $p>0,001$, ill. RR-7.570; 95% CI- 3.880-14.772; $p>0,001$).

7. Táblázat. A klinikai-patológiai mutatók és RARRES1 expresszió multivariáns analízise

Paraméterek	Multivariate analysis (n=691)			
	RR	Relative risk (95% CI)		p-value
		lower	upper	
Age	1.012	0.994	1.030	0.196
Sex male female	0.938	0.619	1.423	0.765
Size < 4 cm 4 < x < 7 cm > 7 cm	0.909 0.734	0.450 0.318	1.835 1.694	0.686 0.790 0.469
T T1 T2 T3	7.398 1.874	0.651 0.247	84.045 14.246	0.004 0.107 0.544
Grade G1 G2 G3	1.787 2.133	1.044 1.150	3.061 3.955	0.045 0.034 0.016
Stage I II III	0.365 3.119	0.030 0.411	4.481 23.674	0.013 0.431 0.271
RARRES1 membrane negatív cytoplasm	8.402 7.570	4.245 3.880	16.631 14.772	<0.001 < 0.001 < 0.001

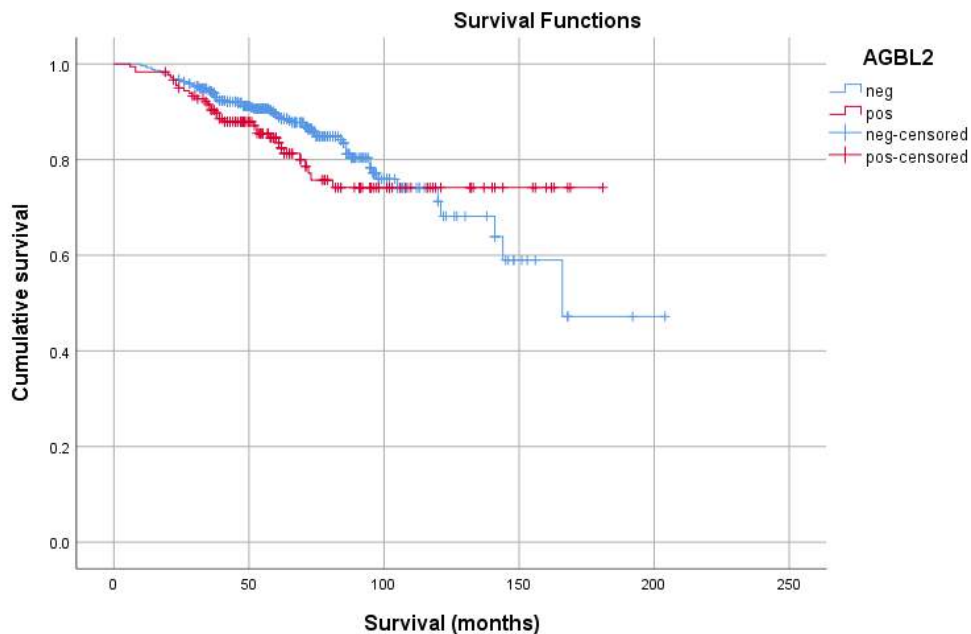
4.3. Az AGLB2 kifejeződése konvencionális veserákban

4.3.1 Az AGLB2 vizsgálata immunhisztológiával

Az immunhisztológiai vizsgálat során az AGLB2 expressziója csak a citoplasmában volt megfigyelhető vagy nem kaptunk pozitív reakciót. Pozitív reakció esetén az összes tumor sejt pozitív volt. A 691 tumor közül 215-ben figyeltünk meg a tumorsejtek cytoplasmájában pozitív reakciót, míg 572 tumor még a multiplex biopsziákban sem mutatott AGLB2 immunreakciót. A klinikai és patológiai paraméterek és AGLB2 pozitivitás összehasonlítása során csak a tumor gradussal ($p=0.007$) és a tumor stádiummal ($p=0.033$) találtunk szignifikáns összefüggést. A konvencionális veserákok mérete és az AGLB2 kifejeződése között nem volt szignifikáns összefüggés ($p=0.082$).

4.3.2. Az AGLB2 expresszió és a tumormentes túlélés

Kaplan-Meier vizsgálat (Log rank (Mantel-Cox)) nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegség progressziója és AGLB2 pozitív immunhisztológia között (13. Ábra). Az 5 éves túlélés az AGLB2 negatív tumorok esetén $153 (139-167) \pm 7$ hónap, míg az AGLB2 pozitív tumorok esetén $147 (136-157) \pm 6$ hónap volt. A többváltozós vizsgálat szerint csak a tumor gradus mutatott szignifikáns összefüggést ($p<0.001$) az AGLB2 pozitivitással. Az AGLB2 pozitív tumorok és postoperative progresszió között nem találtunk szignifikáns összefüggést (RR=1.081 (0.700-1.669) $p=0.726$).



13. Ábra. Az AGBL2 expresszió és a tumoros betegek túlélése közötti összefüggés eredménye Kaplan-Meier regressziós vizsgálattal (Log rank (Mantel-Cox)).

4.4. A RARRES1 és AGBL2 ko-expressziója

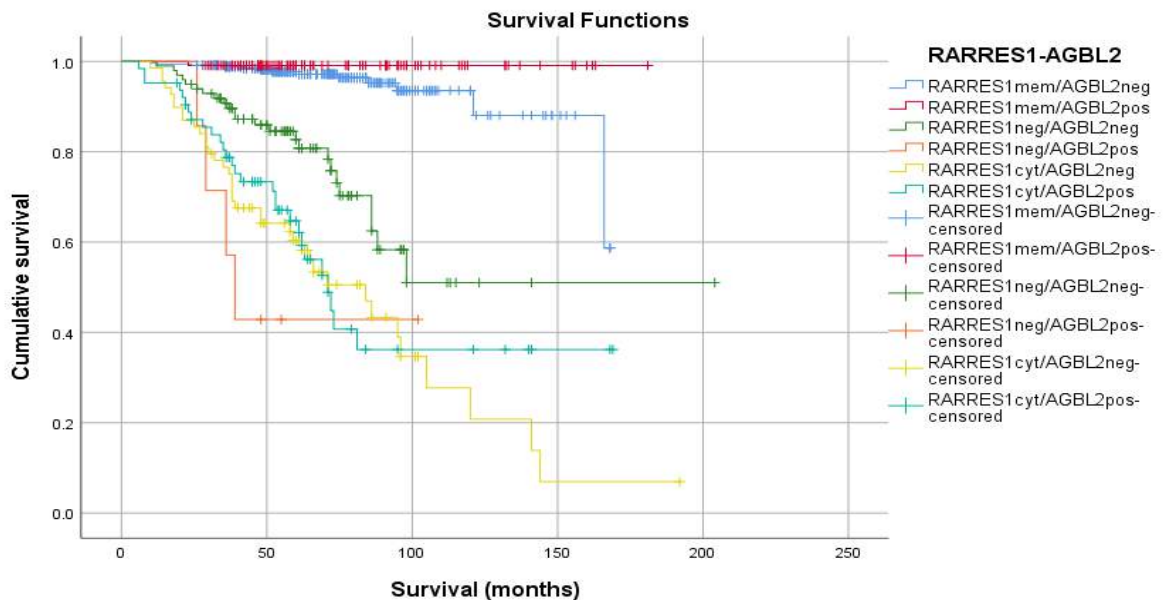
Meghatároztuk a RARRES1 expresszió különböző formái valamint az AGBL2 kifejeződése közötti összefüggést. A 691 tumorból 454 (66%) mutatott RARRES1 membrán pozitivitást, ezek közül 110 tumorban az AGBL2 is pozitív volt ami az AGBL2 pozitív esetek 61%-át teszi ki. A 106 RARRES1 negatív tumorból csak 7 tumor mutatott AGBL2 immunreakciót, míg a 132 RARRES1 cytoplamatikus pozitív esetből 63 tumorban találtunk AGBL2 pozitivitást is (8. Táblázat).

8. Táblázat. A RARRES1 és az AGLB2 expresszió közötti összefüggés.

		Eset szám (691)	RARRES1 expresszió			p-value
			membrán (454)	negatív (106)	cytoplasma (132)	
AGBL2	negatív	512	344	99	69	<0.001
	pozitív	180	110	7	63	

(Pearson Chi-Square test (p<0.001))

Meghatároztuk a RARRES1 és AGLB2 kifejeződésének különböző megjelenési formája és a tumorok progressziója közötti összefüggést Kaplan-Meier analízis segítségével (14. Ábra). Talán a legfontosabb megfigyelés, amit a Kaplan-Meier mutat, hogy a 110 RARRES1 membrán pozitív és egyúttal AGLB2 pozitív eset közül mindössze egyetlen betegben fordult elő posztoperatív tumor progresszió az átlagosan 60 hónapos utánkövetés során.

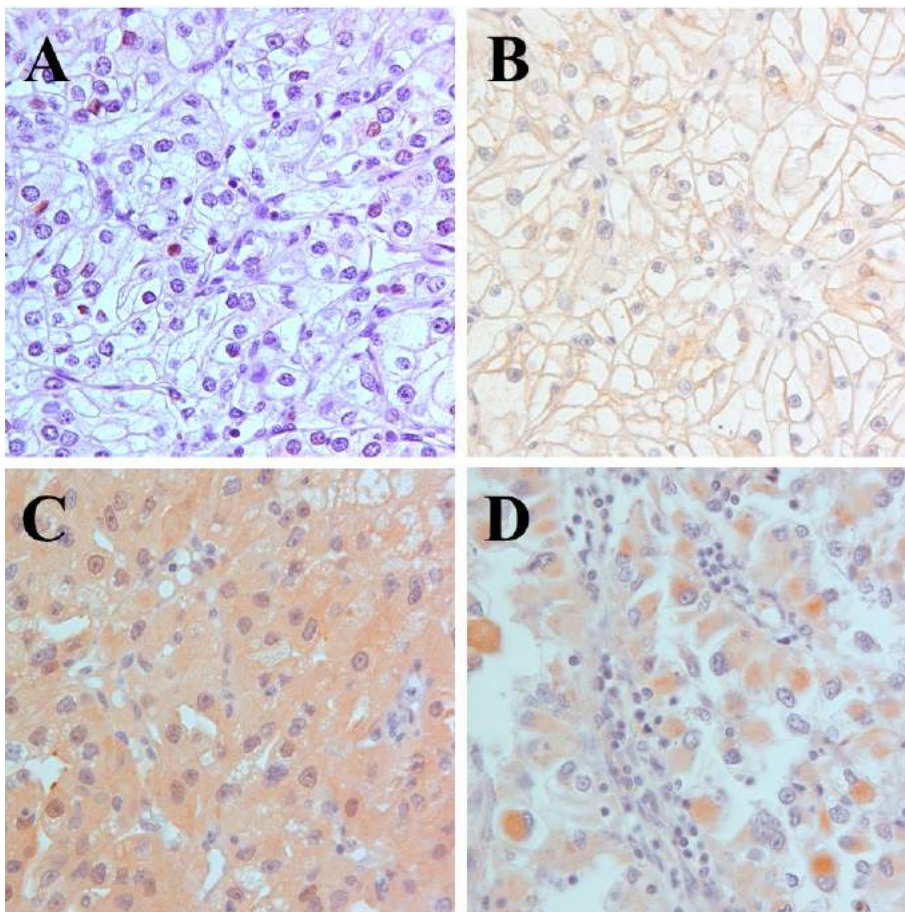


14. Ábra A tumoros betegek túlélési mutatói a Kaplan-Meier analízis és a log-rank (Mantel-Cox) test szerint (p<0.001).

4.5. Az AXL

4.5.1. Az AXL kifejeződése konvencionális veserákban

Az AXL gén immunhisztológiai vizsgálata 4 különböző korú főtalis vesében (11-23 hét) és 4 felnőttkori vesében sem adott pozitív reakciót. Membránhoz kötött immunreakció fordult elő 327 (41%) konvencionális veserákban (15. Ábra, B), míg 218 (27.4%) tumorban a cytoplasmában figyeltünk meg RARRES1 pozitív reakciót (15. Ábra, B-D). A konvencionális veserákok közül 252-ben (31.6%) nem találtunk pozitív festődést egyetlen biopsziás anyagban sem (15. Ábra, A).



15 Ábra. AXL expresszió konvencionális veserákban. **A,** A RARRES1 immunreakció hiánya egy “világossejtes” konvencionális veserákban. **B,** Kifejezett membránhoz kötött immunreakció. **C** Diffúz RARRES1 festődés az összes tumorsejt cytoplasmájában. **D,** Globularis megjelenésű RARRES1 fehérje rhabdoid elváltozást mutató konvencionális veserákban. A membránhoz kötött reakció specifikitására utal, hogy azonos szöveti szerkezetű és nukleáris grádusú tumorok között membrán negativitás és pozitivitás is előfordult (A és B)

4.5.2. Az AXL expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel

Az AXL immunreakció és klinikai illetve patológiai paraméterek közötti összefüggést az 9. Táblázatban foglaltuk össze. A különböző sejtkomponensekben észlelt illetve negatív AXL expresszió és a daganatspecifikus halálozás, a tumor mérete, a nukleáris grádusa és a T-stádiuma közötti viszony statisztikai elemzése során mindegyik paraméter tekintetében szignifikáns összefüggés volt kimutatható ($p < 0,001$).

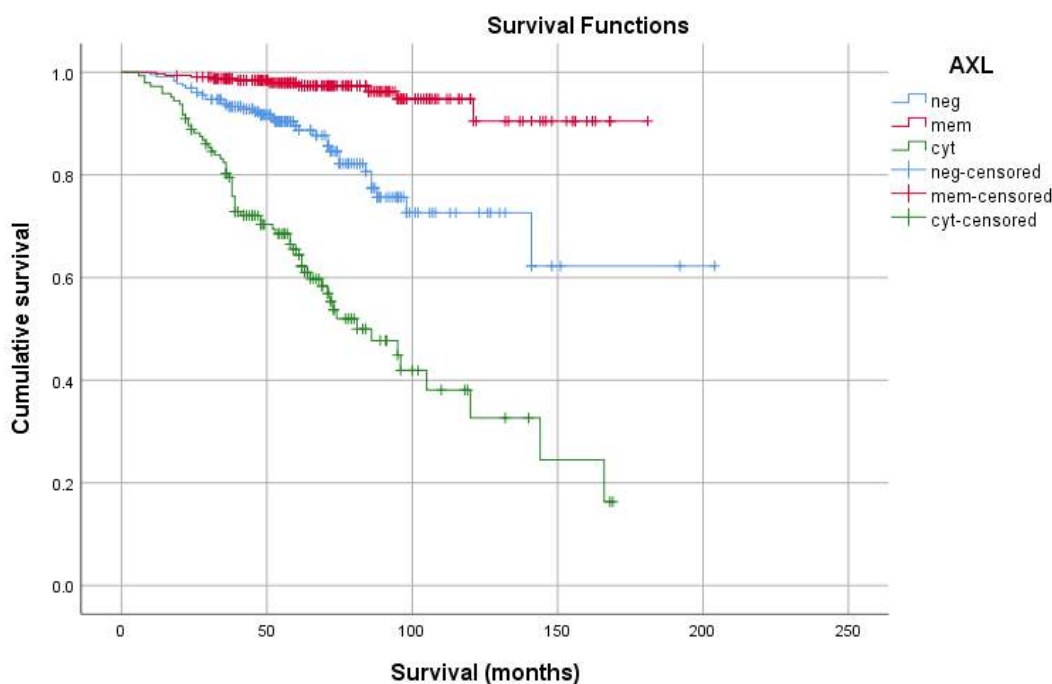
9. Táblázat. A különböző sejti megjelenésű AXL pozitivitás és a klinikai-patológiai paraméterek közötti összefüggés.

		Eset szám (691)	AXL expresszió			p-value
			membrán	negatív	cytoplasma	
Nem	férfi	407	184	129	94	0.207
	nő	284	137	98	49	
Állapot	nincs progr	584	311	193	80	<0.001
	progresszió	107	10	34	63	
Méret	< 4 cm	272	153	93	26	<0.001
	4 < x < 7 cm	269	125	86	58	
	> 7 cm	150	43	48	59	
T stádium	pT1	511	273	173	65	<0.001
	pT2	94	38	29	27	
	pT3	86	10	25	51	
Gradus	G1	458	264	164	30	<0.001
	G2	180	51	57	72	
	G3	53	6	6	41	
Stage	I+II	596	309	199	88	<0.001
	III	95	12	28	55	

nincs prog. – nincs postoperative tumor progresszio; progresszió – a postoperatív követési idő alatt metasztázis fejlődött ki.

4.5.3. Az AXL expresszió és a túlélési adatok közötti összefüggés

A log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélési analízis az AXL antitesttel pozitívan festődő tumorok esetén lényegesen rövidebb daganatspecifikus túlélést mutatott ki (16. ábra). A számított median túlélési idő az AXL pozitív tumorú betegeknél 74 hónap (33-82, 95% CI), míg az általános túlélési idő 142 hónap volt.



16. Ábra. A 691 beteg log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélési analízis az AXL membránhoz kötött pozitív (piros görbe), AXL negatív (kék görbe) és AXL cytoplasmatikus pozitív (zöld görbe) tumorral operált betegek esetén, a teljes beteganyagban. kumulatív túlélés/túlélési idő (hónap). A kiértékelés a cytoplasmatikus AXL expresszió prognosztikus jelentőségét mutatta (log rank teszt $p > 0.001$).

Egyváltozós analízis alapján a T-stadium, tumor gradus, tumor stage és a tumor mérete, valamint a cytoplasmatikus AXL pozitivitás szignifikáns összefüggést mutattak (mind $p < 0.001$). Az AXL cytoplasma pozitív esetekben a daganatspecifikus halálozás kockázata szignifikánsan magasabb volt (RR 7,8 95% CI – 4.90-12.42; < 0.001). A különböző cellularis AXL kifejeződés független prognosztikai értékének meghatározása érdekében elvégeztük a többváltozós analízist az ismert klinikai patológiai

prognosztikai változókat figyelembe véve. Többváltozós analízis során a cytoplasmikus AXL expresszió - a T-stádium és a tumor grádus mellett - független negatív prognosztikai faktornak bizonyult, az AXL pozitív tumorok esetében a betegeknek közel négyszeres rizikója volt a daganat specifikus elhalálásra (RR=3.60; 95% CI=2.64-4.92; $p<0.001$). Az átlagosan 60 hónapos követési idő alatt membrán pozitív esetekben a betegek 96,6% volt életben, az AXL negatív tumorok esetén a betegek 77,4%-a míg az cytoplasmikus AXL kifejeződés esetén a betegeknek csak 38.1%-a volt életben.

5.MEGBESZÉLÉS

5.1. LBP

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az LBP gén expressiója szignifikáns összefüggést mutat a konvencionális veserák postoperatív progressziójával. Az LBP az akut-fázis fehérjék csoportjába tartozik és fontos szerepe van az endotoxinokra adott immunválasz szabályozásában (Schumann és mtsai, 1990). Normál körülmények közt az LBP a májsejtekben fiziológiás szinten képződik, de akut-fázis reakciókban a makrofágok és monocyták által szekretált IL-1 és IL-6 jelentős mértékben fokozhatja az LBP szintézisét (Schumann és mtsai, 1996). Normál konstitutív koncentrációban az LBP megköti a különböző bakteriális komponenseket mint lipopolyszacharidokat (LPS) és peptidoglykánokat és a CD14 valamint TLR4 receptor komplexen keresztül a pro-inflammációs citokinek, mint az IL-6 fokozott kifejeződéséhez vezet, amely viszont az LBP szintézisét fokozza (Faure és mtsai, 2000; Kitchens és mtsai 2005). A TLR4 az exogén bakteriális komponenseken kívül endogen ligandokat is felismer, mint pl. heat-shock proteineket, valamint szövetsérülés során megjelenő extracelluláris matrix (ECM) komponenseket, mint fibronectin és heparinszulfát (Akira és Takeda, 2000).

Mai tudásunk szerint a konvencionális veserák a proximális tubulus sejtjeiből indul ki. Az LBP fehérje kizárólag a főtális és felnőttkori vesék proximális tubulus sejtjeiben fejeződik ki. A proximális tubulus sejtjei különösen érzékenyek hypoxiás és toxicus ártalmakra és akut tubuláris sérülés esetén gyulladáskeltő citokinek és kemokinek szekreciónak, így jelentős szerepük van a vese bármilyen jellegű hypoxemiás, metabolikus, toxicus sérülését kísérő gyulladások kialakulásában (Daha és van Kooten, 2000).

Az LPS-LBP-CD14-TLR4 jelátvivő rendszer fontos szerepet játszik a beteg immunszisztémájának és a konvencionális veserák mikrokörnyezetének megváltoztatásában. A TLR aktiválás által a tumor sejtek cytokineket szekernálnak, ezáltal újabb immunsejteket toboroznak amelyek képesek cytokineket, pro-angiogén és növekedési faktorokat kibocsátani és így tovább erősítik a megváltoztatott mikrokörnyezetben a tumor sejtek proliferációját (Sato és mtsai, 2009). A TLR4 stimulációja az LBP-CD14 komplex által az NF-kB-függő metalloproteináz-2 és beta-integrin fokozott kifejeződését és ezáltal a tumor sejtek invazív növekedését is elősegíti (Harmey és mtsai, 2002). A tumor mikrokörnyezetének megváltozott immunreakciója hozzájárul a tumorsejtek proliferációjához, a fokozott angiogenezishez, áttétképződéshez és terapia rezisztenciához is (Huang és mtsai, 2005; Mantovani és mtsai 2008).

Korábban összefüggést találtak több acute fázis protein (APP) szekréciónja és a tumor progresszió közt (Orr és mtsai, 2011). A C-reaktív fehérje és az SAA1 gén fokozott expressziója és a tumoros betegek túlélése közötti megfigyelést több közleményben leírták (Wood és mtsai, 2010; Engwegen és mtsai, 2007; Jagdev és mtsai, 2010). Azonban az APP serum koncentrációja nem specifikus egy adott tumor típusra és bakteriális infekció vagy bármilyen más gyulladás esetében is emelkedett lehet. Leírták veserák progresszióját előre jelző emelkedett neutrophil-lymfocita arányt, de a neutrofilia mögött bármilyen gyulladásos folyamat is előfordulhat (Fox és mtsai, 2013). Viszont egy korábbi közlemény csak úgy mint a jelen munka egyértelműen azonosította a konvencionális veserákok egy csoportját, ahol maguk a tumorsejtek fejeznek ki APP-t, azaz SAA1 és LBP proteineket (Paret és mtsai, 2010). Mind az SAA1 és LBP fokozott kifejeződése a konvencionális veserákok postoperative progressziójának magas rizikójával áll összefüggésben.

5.2. RARRES1 és AGLB2

Annak ellenére, hogy a vizsgálatokba bevont 691 vesére lokalizált konventionális veserákok közül 511 a pT1a ill. pT1b stádiumhoz tartozott, 107 tumor progressziót mutatott a postoperative követési idő alatt és így a target terápás kezelés ellenére a beteg halálához vezetett ill. fog vezetni. A Kaplan-Meier vizsgálat szerint a RARRES1 fehérje kifejeződése tumor sejtek felszínén meghatározott egy alacsony risikójú csoportot a betegség rendkívül kedvező lefolyásával. A RARRES1 cytoplasmikus kifejeződése valamint a protein teljes hiánya viszont egy rossz prognózisú betegcsoportot azonosított. A RARRES1 (retinoic acid receptor responder 1) gént először Tazarotene kezelt sejtekben írták le, innen a másik szokásos neve TIG1 (Tazarotene-induced gene 1) (Nagpal et al. 1996). RARRES1 6 exonból áll, és két alternatív splice variánsa ismert amelyek a 3' regioban különböznek. Az aminosav szekvencia alapján a RARRES1 gént transzmembrán fehérjének tartják amely egy nagy extraelluláris régióból, "single pass" transzmembrán régióból és egy rövid N-terminális intracelluláris régióból áll. Összehasonlító kristályszerkezete alapján feltételezik, hogy a TIG1 membránhoz kötött (Aagaard és mtsai, 2005). Ezenkívül feltételezik, hogy a RARRES1 más membránon is lokalizálódik, mint pl. a Golgi-apparátus vagy az endoplasmás reticulum felszínén, amely magyarázatot adhat a konvencionális veserákok egy részében megfigyelt citoplazmatikus expresszióra. RARRES1-el transzfektált PC3 sejtek frakcionálása során a RARRES1 proteint csak a cytoplazmatikus de nem a sejtmembrán frakcióban találták meg (Oldridge és mtsai, 2013). Egy másik frakcionálási kísérlet a teljes hosszúságú 38 kDa RARRES1 izoformát a sejtmembránhoz lokalizálta (Shahab és mtsai, 2011). Ugyanezek a szerzők a sejt-mag-cytosol debris poolban egy kb 50 kDa RARRES1 proteint azonosítottak. Shahab és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a

RARRES1 C-terminális régiója a glikolizációs szignállal cytoplasmikus elhelyezkedésű és így a RARRES1 egy III típusú transzmembrán protein.

RARRES1 különböző normál szövetekben, mint prosztata, tüdő, máj, szív és vastagbél is kifejeződik. Mi immunhisztológiai vizsgálattal mind a főtáls mind a felnőttkori vesében a sejtek lumináris membránján figyeltünk meg pozitív RARRES1 immunreakciót. A RARRES1 csökkent kifejeződését vagy hiányát a promotor régió hypermetilációja miatt nemcsak különböző sejtvonalakban, hanem a prosztata, endometrium, fej-nyaki régió, vastagbél és gyomor tumor szövetben is leírták (Jing et al. 2002; Zhang et al. 2004; Takai et al., 2005; Tokumaru et al. 2005; Kwong et al. 2005; Kwok et al. 2009; Peng et al. 2013; Son et al. 2009). Ennek alapján a RARRES1 génnek tumor szuppresszor funkciót tulajdonítottak (Jing és mtsai, 2002; Takai és mtsai 2005). Másrészt, a gyulladásos emlőrákban a RARRES1 kifejezett expressziója a betegek rövidebb tumormentes túlélésével társult. In vitro körülmények között a RARRES1 gén deplációja csökkent sejtproliferációval, migrációs és invazios képességgel társult és in vivo csökkentette a xenograft tumorok növekedést (Wang és mtsai, 2013).

RARRES1 annak a protein komplexnek az egyik tagja, amely a tubulus tyrozinációs ciklust szabályozza és ebben a komplexben a RARRES1-nek gátló hatása van. Yeast two-hybrid technika alkalmazásával kimutatták, hogy a RARRES1 kötődik a transzmembrán fehérje 192-vel (TMEM192) és a RARRES1 expressziója a TMEM192 kötődés útján a sejtek autofágiájához vezet (Shyu és mtsai, 2014). A TMEM192 számos szövetben köztük a vesében is kifejeződik. In vitro kísérlet során a RARRES1 fokozott kifejeződése prostata karcinóma sejtekben a beclin és ATG3 genekhez kötődő autofágiát okoz (Roy és mtsai 2017)

A RARRES1 funkciója a különböző típusú tumorokban csakúgy mint a konvencionális veserákban nem ismert. A RARRES1 C-terminális régiója 30% hasonlóságot mutat a latexinnel, amely ismert karboxypeptidáz inhibitor. A RARRES1 szintén karboxypeptidáz inhibitor, amelyik kötődik az ATP/GTP binding protein-like 2 (AGBL2)-höz (Sahab és mtsai, 2015). Az AGBL2 gén az α -tubulin detyrozinációjában vesz részt és ilyen módon segíti a tumor kialakulását és progresszióját. Májrákban az AGBL2 fokozott expressziója a tumorok méretével, és az előrehaladott klinikai stádiummal mutatott szignifikáns korrelációt. Az AGBL2 szabályozza az autofágiát, a TPX2 és az Aurora A aktivitását és így elősegíti a májrák progresszióját.

Az AGBL2 szerepe a konvencionális veserákban még nem ismert, a legtöbb klinikai és patológiai paraméterrel gyakorlatilag nem lehetett összefüggést kimutatni, az AGBL2 kifejeződése csak a tumor gradussal mutatott korrelációt. Az AGBL2 pozitív esetek viszonylagos rizikója a postoperative progresszióra rendkívül alacsonynak bizonyult (RR=1.081 (0.700-1.669) p=0.726). Viszont érdekes megfigyelést tettünk a RARRES1 és az AGBL2 ko-expresszió közötti összefüggésről, amelynek a molekuláris hátterét még nem ismerjük. A RARRES1 membránhoz kötött kifejeződése az AGBL2 egyidejű kifejeződésével a konvencionális veserákok rendkívül kedvező lefolyásával társult, amennyiben ebben a tumorcsoportban csak egyetlen tumor progrediált.

5.3. AXL

Wang és mtsai (2013) experimentális vizsgálatuk alapján utaltak arra, hogy RARRES1 valószínűleg szerepet játszik a tumor sejtek invazív növekedésében az AXL szignálátvivő rendszerén keresztül. Ezért úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk az AXL gén expressziója és a konvencionális veserák progressziója közötti összefüggést.

Az AXL, a Tyro3-Axl-Mer (TAM) receptor tyrozin kináz (RTK) enzim csoport tagja. Az AXL kifejeződését számos tumorban, mint myeloid leukemia, glioblastoma, prosztata, tüdő, vastagbél, gyomor, pankréász és emlő rákban, leírták (Gjedrum és mtsai, 2010; Hattori és mtsai, 2016; Hutterer és mtsai, 2008; Paccez és mtsai, 2013; Chung és mtsai, 2003; Gustaffson és mtsai 2009). Az AXL kifejeződése a leírt esetekben a tumorok invazív növekedésével és metasztázis képzésével mutatott összefüggést. Az AXL expresszió jelentősége konvencionális veserákokban még nem ismert. Az RT-PCR technikával korábban elvégzett két tanulmány két különböző eredményt adott (Chung és mtsai, 2003; Gustaffson és mtsai 2009). Az eddig leírt egyetlen immunhisztokémiai vizsgálat nem különböztette meg az AXL kifejeződését a különböző celluláris lokalizációban és nem hasonlította össze a tumorok progresziójával sem (Yu és mtsai, 2015). Vizsgálatunk először mutatta ki immunhisztológiai módszerrel, amellyel a tumorsejtekben és a stromális sejtekben való kifejeződés egyértelműen elkülöníthető, hogy az AXL protein kifejeződése a tumorsejtekben a tumor progresziójával szoros összefüggést mutat. Az AXL protein kifejeződése és tumorsejten belüli lokalizációja alapján megkülönböztettünk három tumor csoportot: membránhoz kötött és citoplazmatikus AXL pozitív és AXL negatív tumorok. A Kaplan-Meier vizsgálat szerint az AXL membránhoz kötött kifejeződése kedvező prognosztikai jelnek tekinthető. Azok a betegek, amelyek tumorában az AXL protein a citoplasmában jelenik meg, közel négyszeres a rizikója a postoperatív tumor progresszióra. Egy korábbi vizsgálatban a glioma sejteiben csak membránhoz kötött AXL expressziót írtak le, míg a többi közleményben a reakció erősségét, a pozitív sejtek számát írták le vagy csak egyszerűen, a celluláris lokalizáció megjelölése nélkül pozitív és negatív tumorcsoportot írtak le (Paccez és mtsai 2013; Xe és mtsai, 2010; Jin és mtsai, 2017; Ishikawa és mtsai, 2013, Hattori és mtsai, 2013).

Az AXL gen által kódolt fehérje az N-terminális végén két immunoglobulin-szerű, két fibronectin III-típusú motivumból, egy single pass transzmembrán doménből és citoplazmatikus tyrosin kináz doménből áll [Lemke, 2013]. A TAM proteinek számos különböző biológiai folyamatban játszanak szerepet. Az AXL aktiválása különböző onkogén jelátvivő rendszerek útján elősegíti a sejtek proliferációját, túlélését, migrációját és invázióját (Corno és mtsai, 2016). Az AXL protein extracelluláris immunoglobulin és fibronectin motivuma az immunoglobulin és cadherin adhéziós molekulák integrált motivuma, ami arra utal, hogy az AXL a sejtadhéziót is szabályozhatja (Xe és mtsai, 2010). A 786-O konvencionális veserák sejtvonal túlélése az AXL protein expressziójához kötött (Yu és mtsai, 2015). Az AXL a tumort infiltráló makrofágok és dendritikus sejtek felszínén is kifejeződik és akadályozza az immunválaszt (Rothlin 2007). Az AXL jelátvivés blokkolása a gyulladáshoz vezető citokinek fokozott kifejeződéséhez vezet, míg az AXL fokozott kifejeződése a tumorsejtek rezisztenciáját fokozza a terápiás drogok ellen (Wu és mtsai, 2018). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az AXL aktiválása a sejtek széleskörű funkcióját befolyásolja.

Az AXL aktiválásában számos mechanizmus vesz részt. A "growth arrest-specific 6" (Gas6) kötődése az AXL-hez a receptor AXL dimerizációjához, tyrosin-foszforilációjához vezet és így a jelátvitel útján aktiválja az AXL alá rendelt gének expresszióját (Lemke, 2013). Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) kötődése az AXL-hez aktiválja az AKT kinázt (protein B kináz) amely központi helyet foglal el a növekedési faktorok, gyulladást előidéző citokinek és egyéb sejt folyamatok szabályozásában (Wu és mtsai, 2018). A Fra-1 (Fos-szerű antigén 1) húgyhólyag tumor sejtekben az AXL direkt transzkripcionális aktivátora (Konishi és mtsai, 2004). A 786-O konvencionális veserák sejtvonal túlélése az AXL protein expressziójához kötött, de a

sejtvonal nem fejezi ki az AXL ligand Gas6-ot (Yu és mtsai, 2015). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az AXL a ligand hiányában is közvetíti a jelátvitelt. A ligandtól független AXL aktiválást vagy Mer vagy Tyro3 vagy nem-TAM fehérjék heterofil aktiválást is leírtak (Lemke és Rothlin, 2008; Ruan és Kazlauskas, 2012; Bellosta és mtsai, 1995). Az AXL protein felépítéséből adódóan előfordul a ligandtól független AXL aktiválás homofil sejtheadhézió útján, amely magasfokú AXL kináz aktivitáshoz vezet (Zhang és mtsai, 2008; Rankin és mtsai, 2010).

Figyelembe véve az AXL aktiválás szerepét a különböző tumorer biológiájában, különösen a rezisztencia kialakulásában, számos terápiás lehetőséget dolgoztak ki az AXL jelátvitel gátlására. Az új módszerek megpróbálják az AXL aktivitást az AXL ellenes antitestekkel, szolubilis AXL ektodomén molekulákkal, és inhibitorokkal akadályozni (Yu és mtsai, 2015; Ye és mtsai, 2010; Zhang és mtsai, 2008; Holland és mtsai, 2010; Rankin és mtsai, 2010). Legújabban kináz gátlók már klinikai kipróbálásra kerültek (Sheridan, 2013). A METEOR nevű klinikai vizsgálat szerint a Cabozantinib, egy AXL, MET és VEGFR2 gátló az áttétes veserák progressziójának lassulásához vezetett és összehasonlítva az everolimussal jobb eredményt adott (Ye és mtsai, 2010). Ennek alapján bevezették a cabozantinib terápiát az áttétes vesetumorer kezelésébe. Itt érdemes megemlíteni, hogy METEOR vizsgálatban nem találtak összefüggést egy másik tirozin kináz, a MET expressziója és a klinikai eredmények közt. Az AXL tumorszefikus kifejeződését nem vizsgálták meg.

Az AXL jelátvitel blokkolása gyulladásoos cytokinek fokozott kifejeződéséhez vezet. Egy újabb vizsgálat kimutatta, hogy az Axl és Mer deléciója egerekben gyulladást keltő anyagokkal vastagbél rák kialakulásához vezetett (Bosurgi és mtsai, 2013). Ez a kísérlet arra utal, hogy az AXL expresszió blokkolása szefikus gátlók alkalmazásával nem a kívánt, hanem ellentétes hatással is lehet és a gyulladásoos mikroörszefet fokozásával a

tumor progressziójához, ritka esetben még gyulladáshoz társuló daganat kialakulásához vezethet. A mi vizsgálatunk arra utal, hogy az AXL sejtben elfoglalt pozíciója jelentős szerepet játszik az AXL protein adott funkciójában. A membránhoz kötött AXL blokkolása az AXL negatív tumorokhoz hasonló állapotot idézne elő, amelynek a prognózisa jelentősen rosszabb, mint a membránhoz kötött AXL esetében. Az irodalmi adatokat és saját eredményünket összefoglalva, szükséges az AXL funkcióját minden egyes tumor típusban egyenként megvizsgálni, mielőtt az AXL gátló kezelést adják. Ez különösen érvényes a konvencionális veserákra, ahol az AXL gén kifejeződés lokalizációjának komoly prognosztikai jelentősége van.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk vizsgált a műtét során csak a vesére korlátozott konvencionális veserák progresszióját TNM osztályozás az általunk használt hármás grádusú beosztás segítségével jól meghatározott rizikócsoporthoz osztja, de egy-egy csoporton belül szükség van a rizikó pontosítására újabb biomarkerekre. Erre utal az a megfigyelés is, hogy bár a 691 tumor jelentős része a pT1a és pT1b stádiumba tartozott, 107 tumor progressziót mutatott, áttétet adott az átlagosan 60 hónap postoperatív követés alatt. Ennek érdekében, a már elkezdett prognosztika marker kutatás folytatásával három újabb gén kifejeződését és a tumoros betegség lefolyását vizsgáltuk meg.

1. Az LBP protein cytoplasmikus kifejeződése szignifikans összefüggést mutatott ezen tumorok postoperatív progressziójával és így meghatározott egy rizikó csoportot. Az LBP immunhisztológia alkalmas egy magas és alacsony rizikójú betegcsoport elkülönítésére.
2. A RARRES1 gén sejtmembránhoz kötött kifejeződése a konvencionális veserákok rendkívül jó prognózisával függ össze. Azoknak a betegeknek, amelyeknek a tumorából hiányzik a RARRES1 expresszió vagy citoplazmatikus expresszió figyelhető meg, a postoperative progresszió rizikója 7-8-szor magasabb, mint azoknak, akiknek a tumorában a RARRES1 a sejtmembránon fejeződik ki. Bár az AGBL2 pozitivitás önmagában nem mutat összefüggést a tumorok postoperative progressziójával, a membránhoz kötött RARRES1 expresszió és AGBL2 ko-expresszió a 691 tumorból egy olyan betegcsoportot jelölt meg, amelyek az átlag 60 hónapos postoperatív megfigyelés során nem mutattak progressziót. A RARRES1 és AGBL2 ilyen kombinációjú kifejeződése alkalmas arra, hogy egy rendkívül jó

prognózisú csoportot határoljunk el, ahol nem kell a poszoperatív tumor progresszióval számolni. A RARRES1 hiánya ill. citoplazmatikus kifejeződése viszont a posztoperatív tumor progresszió 7-8-szoros rizikóját jelenti.

3. Hasonlóan a RARRES1 génhez, konvencionális veserákban az AXL is membránhoz kötött, negatív és citoplazmatikus expressziót mutatott. A progresszió megítélése szempontjából a cytoplazmatikus AXL expresszióknak van jelentősége, amennyiben a posztoperatív tumor áttét rizikója közel négyszeres ebben a betegcsoportban. Az AXL pozitivitás sejten belüli elhelyezkedésének a megállapítása a tumoros betegek AXL kináz gátló kezelésének meghatározásában is jelentősége lehet.

Összefoglalva, három olyan biomarkert sikerült azonosítani, amelyek immunhisztológiai vizsgálatával egy magas illetve alacsony rizikójú betegcsoport elkülönítésére van lehetőség.

7. IRODALOM

Aagaard A, Listwan P, Cowieson N et al. Inflammatory role for mammalian carboxypeptidase inhibitor latexin: relationship to cystatins and tumor suppressor TIG1. *Structure* 2005;13:309-317.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.

Allavena P, Germano G, Marchesi F, et al. Chemokines in cancer related inflammation. *Exp Cell Res* 2010;317:664–673.

Anetta Nagy, Eva Walter, Dmitry Zubakov, et al. High risk of development of renal cell tumor in end stage kidney disease: the role of microenvironment. *Tumor Biol* 2016;37:9511-9519.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer : back to Virchow ? 2001;357:539–545.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. 2004;4:540–550.

Bannasch P, Zerban H. Renal cell adenoma and carcinoma, rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD (eds) *Monographs on pathology of laboratory animals; urinary system.* Springer, Berlin Heidelberg New York, 1986. pp 112–139

Banyai D, Sarlos P, Nagy A, et al. 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* 2018;14:784-790.

Bellosta P, M Costa, DA Lin, et al. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol. Cell Biol.* 1995;15:614-625

Bennington JL, Beckwith JB. Tumors of the kidney, renal pelvis, and ureter. *Atlas of Tumor pathology, 2nd Series, Fascicle 12,* Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1975.

Bosurgi L, Bernink JH, Cueves VD, et al. Paradoxical role of the proto-oncogene Axl and Mer receptor tyrosine kinases in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2013;110:13091-13096

Brahmer JR, Tykodi SS, Laura QM et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*; 2012. 366: 2455.

Brierly J, Gospodarowicz MK, Wittekind (Ed), et al. *TNM Classification of Malignant tumours.* John Wiley and Sons, 2016.

Bugert P, Gaul C, Weber K et al. Specific genetic changes of diagnostic importance in chromophobe renal cell carcinomas. *Lab Invest* 1997;76:203-208.

- Bugert P, Kovacs G et al. Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis. *Am J Pathol* 1996;149:2081-2088.
- Burke F, Relf M, Negus R, et al. A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine* 1996;8:578–585.
- Calle EE, Kaaks R. Overweight, et al. Obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4:579–91.
- Choueiri TK, Escudier B, Powles T et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2016; 17: 917.
- Chung BI, SB Malkowicz, TB Nguyen, et al. Expression of the proto-oncogene Axl in renal carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2003;22,553-540
- Corno C, L Gatti, C Lanzi, et al. Role of the receptor tyrosine kinase Axl and its targeting in cancer cells. *Curr. Med. Chem.* 2016;23,1496-1512
- Daha MR, C. van Kooten, et al. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol. Dial. Transplant. Suppl* 2000;6,41-43
- Eble JN, Sauter G, I. Epstein J, Sesterhenn IA. (Ed) *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Heal Organ Classif Tumours.* 2004
- Engwegen JY, Mehra N, J.B. Haanen JB et al. Validation of SELDI-TOF MS serum protein profiles for renal cell carcinoma in new populations. *Lab. Invest.* 2007;87,161-172
- Faure E, O. Equils, P.A. Sieling, et al. Bacterial lipopolysacchride activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000;275,11058-11063
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-1403,.
- Ficarra V, Novara G, Galfano A et al. The stage, size, grade and necrosis score is more accurate than the University of California Los Angeles integrated staging system for predicting cancer-specific survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2009; 103: 165-170.
- Fox P, M. Hudson, C. Brown, et al. Markers of systemic inflammation predict survival in patients with advanced renal cell cancer. *Br. J. Cancer* 2013;109, 147-153
- Fridlender ZG, Albelda SM. et al. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *2012;33(5):949–55.*

Gjedrum C, C Tiron, T Hoiby, et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107, 1124-1129

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genet* 1994; 7:85-89.

Gratzke C, Seitz M, Bayrle F et al. Quality of life and perioperative outcomes after retroperitoneoscopic radical nephrectomy (RN), open RN and nephron-sparing surgery in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int* 2009; 104: 470.

Gustaffson A, D Martuszevska, M Johansson, et al. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin. Cancer Res.* 2009;15, 4742-4749

Harmey JH, C.D. Bucana, W. Lu, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int. J. Cancer* 2002;101, 415-422

Hattori S, E Kikuchi, T Kosaka, et al. Relationship between increased expression of the Axl/Gas6 signal cascade and prognosis of patients with upper tract urothelial carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2016;23,663-670

Herbers J, Schullerus D, Chudek J et al, Lack of genetic changes at specific genomic sites separates renal oncocytomas from renal cell carcinomas. *J Pathol* 1998; 184:58-62.

Herbers J, Schullerus D, Müller H, et al. Significance of chromosome 14q loss in nonpapillary renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes & Cancer* 1997;19:29-35.

Holland SJ, A Pan, C Franci, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70:1544-1554

Huang B, J. Zhao, H. Li, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 2005;65:5009-5014

Hutson TE, Lesovoy V, Al-Shukri S, et al. Axitinib versus sorafenib as first-line therapy in patients with metastatic renal-cell carcinoma: a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2013; 14: 1287.

Hutterer M, P Knyazev, A Abate, et al. Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res.* 2008;14, 130-138

Ishikawa M, M Sonobe, E Nakayama, et al. Higher expression of receptor tyrosine kinase Axl, and differential expression of its ligand, Gas6, predict poor survival in lung adenocarcinoma patients. *Ann. Surg. Oncol.* 2013;20: S467-S476

Jagdev SP, W. Gregory, N.S. Vasudev, P. Harnden, S. Sim, D. Thompson, J. Cartledge, P.J. Selby, R.E. Banks, et al. Improving the accuracy of preoperative survival prediction in renal cell carcinoma with C-reactive protein. *Br. J. Cancer* 2010;103:1649-1656

Jin G, Z Whang, J Wang, et al. Expression of Axl and its prognostic significance in human breast cancer. *Oncol. Letters* 2017;13: 621-628

Jing C, El-Ghany MA, Beesley C, et al. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity. *J Natl Cancer Int* 2002;94:482-490.

Kim SP, Alt AL, Weight CJ, et al. Independent validation of the 2010 American Joint Committee on Cancer TNM classification for renal cell carcinoma: results from a large, single institution cohort. *J Urol* 2011;185:2035-2039.

Kitchens RL, P.A. Thompson, et al. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J. Endotoxin Res.* 2005;11:225-229

Kollias G, Douni E, Kassiotis G, et al. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation , rheumatoid arthritis , multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. 1999;(Suppl I).

Konishi A, T Aizawa, A Mohan, et al. Hydrogen peroxidase activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279:28766-28770

Kovacs G Molecular differential pathology of renal cell tumours. A review. *Histopathology* 1993;22:1-8.

Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997;183:131-133.

Kovacs G, Emanuel A, Neumann HPH et al. Cytogenetics of renal cell carcinomas associated with von Hippel-Lindau disease. *Genes Chromosomes & Cancer* 1991;3:256-262.

Kovacs G, Erlandsson R, Boldog F, et al. Consistent 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1591-1595.

Kovacs G, Frisch S. Clonal chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1989;49:651-659.

Kovacs G, Füzesi L, Emanuel A, et al. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes & Cancer* 1991;3:249-255.

Kovacs G, Kovacs A, Parenchymal abnormalities associated with papillary renal cell tumors. *J. Urol. Pathol* 1993;1:301-312.

Kovacs G, Szücs S, DeRiese W, et al. Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1987;40:171-178.

- Kovacs G, Szücs S, Eichner W, et al. Renal oncocytoma: A cytogenetic and morphologic study. *Cancer* 1987;59:2071-2077.
- Kovacs G, Welter C, Wilkens L, et al. Renal oncocytoma: A phenotypic and genotypic entity of renal parenchymal tumors. *Am J Pathol* 1989;134:967-971.
- Kovacs G, Wilkens L, Papp T, et al. Differentiation between papillary and nonpapillary renal cell carcinomas by DNA analysis. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:527-530
- Kovacs G. Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* 1993;62:89-124.
- Kovacs G. Papillary renal cell carcinoma: A morphologic and cytogenetic study of 11 cases. *Am J Pathol* 1989;134:27-34.
- Kwong J, Lo KW, Chow LS, et al. Silencing of retinoid response gene TIG1 by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2005;113:386-392.
- Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317-1320.
- Lemke G, CV Rothlin. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:327-336
- Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2013;5:009-076
- Levi F, J. Ferlay, C. Galeone, F. et al. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int.* 2008;101, 949-958
- Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scand J Surg.* 2004;93:88–96.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. 2008 July;454.
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, et al. The origin and function of tumor-associated macrophages receptor-responsive gene in skin. *Invest Dermatol* 1996;106:269-274.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:519–31.
- Mejean A, Ravaud A, Thezenas S, et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2018; 379: 417.
- Motzer RJ, Hutson TE, Olsen MR et al. Randomized phase II trial of sunitinib on an intermittent versus continuous dosing schedule as first-line therapy for advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2012; 30: 1371.
- Motzer RJ, Thomas EH, David C et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 2013; 369: 722.

Nagpal S, Patel S, Asano AT et al. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1), a novel retinoic acid receptor-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol* 1996;106:269-274.

Novara G, Ficarra V, Antonelli A, et al; SATURN Project-LUNA Foundation. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Eur Urol* 2010;58:588-95

Oldridge EE, Walker HF, Simms MS et al. Retinoic acid represses invasion and stem cell phenotype by induction of metastasis suppressors RARRES1 and LXN. *Oncogenesis* 2013;2:e45.

Orr WS, L.H. Malkas, R.J. Hickey et al. Acute Phase Proteins as Cancer Biomarkers, Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases, Prof. Francisco Veas (Ed.). 2011

Pacez JD, GJ Vasques, RG Correa, et al. The receptor tyrosine kinase Axl is an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represent a new therapeutic target. *Oncogene* 2013;32,689-698

Paret C, Schön Z, Szponar A, et al. Inflammatory protein serum amyloid A1 marks a subset of conventional renal cell carcinomas with fatal outcome. *Eur. Urol.* 2010;57,859-866

Parker WP, Cheville JC, Frank I et al. Application of the stage, size, grade and necrosis (SSIGN) score for clear cell renal cell carcinoma in contemporary patients. *Eur Urol* 2017; 71: 665-673.

Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. et al. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2006; 49: 633.

Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44):751-9.

Peng H, Long F, Wu Z, et al. Downregulation of TIG1 gene by promotor methylation during primary colorectal cancer progression. *Biomed Res Int* 2013;2013:181384.

Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. et al. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;82:296–309.

Rankin EB, KC Fuh, TE Taylor, et al. AXL is an essential factor and herapeutic targe for metastatic ovarian cancer. *Cancer Res.* 2010;70,7570-7579

Rothlin CV, S Ghosh, EI Zuniga, et al. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate imune response. *Cell* 2007;11,1124-1136

Roy A, Ramaling M, Kim OJ et al. Multiple roles of RARRES1 in prostatic cancer: autophagy inductuion and angiogenesis inhibition. *PLOS ONE* 2017;12:0180344

Ruan GX, A Kazlauskas. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J.* 2012;31,1692-1703

Sarlos DP, Peterfi L, Szanto A, et al. Shift of keratin expression profile in end stage kidney increases the risk of tumor development. *Anticancer Res* September 2018;38:5217-5222

Sato Y, Goto N, Narita D, et al. Cancer cells expressing Toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2009;2,205-214

Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, et al. Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia *The Journal of Experimental Medicine.* 2003;198-9.

Schullerus D, Herbers J, Chudek J, et al. Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p and 14q is associated with stage and grade of nonpapillary renal cell carcinomas. *J Pathol* 1997;183:151-155.

Schumann RR S.R. Leong, G.W. Flaggs, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990;249,1429–1431

Schumann RR, C.J. Kirschning, A. Unbehauen, et al. The lipopolysaccharide binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol. Cell Biol.* 1996;16,3490–3503

Shahab ZJ, Hall MD, Sung YM, et al. Tumor suppressor RARRES1 interacts with cytoplasmic carboxypeptidase AGBL2 to regulate the alpha-tubulin tyrosination cycle. *Cancer Res* 2011;71:1219-1228

Sheridan C, First Axl inhibitor enters clinical trials. *Nat. Biotechnol.* 2013;31,775-776

Shyu RY, Wang CH, Wu CC et al. Tazarotene-induced gene 1 enhanced cervical cell autophagy through transmembran protein 192. *Mol Cells* 2016;39:877-887.

Son MS, Kang MJ, Park HC, et al. Expression and mutation analysis of TIG1 (tazarotene induced gene 1) in humna gastric cncer. *Oncol Res* 2009;17:571-580.

Speicher M, Schoel B, duManoir S, et al. Loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridisation. *Am J Pathol* 1994;145:356-364.

Storkel S, Eble JN, Adlakha K, et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80:987–989.

Szponar A, Zubakov D, Pawlak J, et al. Three genetic developmental stages of papillary renal cell tumours: Duplication of chromosome 1q marks fatal progression. *Int J Cancer* 2009;124:2071-2076.

- Takai N, Kawamata N, Walsh CS, et al.. Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer. *Mol Cancer Res* 2005;3:261-269.
- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt J. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenoma, oncocytomas and carcinomas): the basic cytological and histopathological elements and their use for diagnosis. *Path Res Pract* 1986; 181: 125-143.
- Tokumaru Y, Yahata Y, Fujii M. et al. Aberrant promotor hypermethylation of tazarotene induced gene 1 (TIG1) in head and neck cancer. *Nippon Jibinkoka Gakkai Kaiho* 2005;108:1152-1157.
- Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*. 2011 Jan 27;469(7331):539-42.
- Virchow R, *Die krankhafte Geschwülste (Dreissig Vorlesungen, gehalten während des Wintersemesters 1862-1863) Band I.* August Hirschwald, 1862, Berlin.
- Wang X, Saso H, Iwamoto T, et al. TIG1 promotes the development and progression of inflammatory breast cancer through activation of Axl kinase. *Cancer Res* 2013;73:6516-6525.
- Weikert S, Boeing H, Pischon T, et al. Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Epidemiol* . 2007;167:438–46.
- Wilhelm M, Veltman JA, Olshen A, et al. Array based CGH for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res* 2002;62:957-960.
- Wood SL, M. Rogers, D.A. Cairns et al. Association of serum amyloid A protein and peptide fragments with prognosis in renal cancer. *Br. J. Cancer* 2010;103,101-111
- Wu G, Z Ma, Y Cheng, et al. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. *Mol. Cancer* 2018;17,20
- Ye X, Y Li, S Stawicki, et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene* 2010;29,5254-5264
- Young J, Badgery-Parker T, Dobbins T et al. Comparison of ECOG/WHO performance status and ASA score as a measure of functional status. *J Pain Symptom Manage* 2015; 49: 258-264.
- Yu H, R Liu, B Ma, et al. Axl receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in renal cell carcinoma. *Brit. J. Cancer* 2015;113, 616-625
- Yu H, R Liu, B Ma, et al. Axl receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in renal cell carcinoma. *Brit. J. Cancer* 2015;113,616-625

Zeegers M, Tan F, Dorant E, et al. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*. 2000;89:630–9.

Zhang H, Ren Y, Pang D et al. Clinical implications of AGL2 expression and its inhibitor latexin in breast cancer. *World J Surg Oncol* 2014;12:142.

Zhang YX, PG Knyazev, YV Cheburkin, et al. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression *Cancer Res*. 2008; 68,1905-1915.

8. KÖZLEMÉNYEK

8.1. A értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Gyula Kovacs, **Lehel Peterfi**, Nelli Farkas, Andras Javorhazy, Csaba Pusztai, Arpad Szanto. Inflammatory lipopolysaccharide binding protein (LBP) is an independent predictor of conventional renal cell carcinoma progression. Cell Oncol 2017; 40:651-656. doi: 10.1007/s13402-017-0346-4 **IF:4.77**
 2. Donat P. Sarlos, **Lehel Peterfi**, Arpad Szanto, Gyula Kovacs: Shift of keratin expression profile in end stage kidney increases the risk of tumor development. Anticancer Res 2018;38:5217-5222. doi: 10.21873/anticancerres.12845. **IF: 1.97**
 3. **Lehel Peterfi**, Maria Yusenko, Gyula Kovacs: IL6 shapes an inflammatory microenvironment and triggers the development of unique types of cancer in end stage kidney. Anticancer Res 2019;39:1869-1874. doi: 10.21873/anticancerres.13294. **IF: 1.85**
 4. **Lehel Peterfi**, Thea Bjercke, Maria Yusenko, Donat Peter Sarlos, Daniel Banyai, Arpad Szanto, Gyula Kovacs: Cytoplasmic expression of AXL and its prognostic significance conventional RCC. Int J Oncol (submitted)
 5. Donat Peter Sarlos, Maria V Yusenko, **Lehel Peterfi**, Anna Csenge Horvath, Arpad Szanto, Gyula Kovacs. Multiple roles of KRT17 indicate distinct natural history of renal cell tumours. J of Cancer (submitted)
- Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: **8.59**
- Kumulatív impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül): **8.59**

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ez úton is szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kovács Gyulának, témavezetőmnek, hogy egy új szintre emelte érdeklődésemet és elmélyülésemet a tudományos kutatás világába, és mivel a tudomány az élet megismerése, nem feledkezhetek meg arról, hogy beszélgetéseim és vitáink során nem csak a tudomány, de az élet minden területén új észrevételekre és megfigyelésekre hívta fel a figyelmemet, ezzel minden téren tágítva érdeklődési körömet és tudásomat. Köszönet illeti a Heidelbergi Molekuláris Biológiai Labor munkatársait, kiknek munkái ezen dolgozat kiindulópontját képezik.

Szeretnék köszönetet mondani Doc. Dr. Szántó Árpádnak, munkahelyi vezetőmnek, hogy megteremtete a lehetőséget a tudományos kutatáshoz, illetve támogatta is annak kiteljesedését. Köszönettel tartozom Adj. Dr. Pytel Ákosnak, aki elindított a tudományos kutatás útján.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom feleségemnek és családomnak türelmükért, mivel gyakran tőlük vettem el azt az időt, melyet jelen eredményes tevékenység végzésébe fojtottam.