

Végstádiumú vese: modell a progresszív gyulladáshoz mikrokörnyezet és tumorgenezis kapcsolatára

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Dócs János

NDZ7HG

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

Urológiai Klinika



Pécs, 2021

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés.....	4
1.1 A végstádiumú vesebetegség (ESRD) és annak jelentősége.....	4
1.2 Az ESRD vese szövettani vonatkozásai.....	5
1.3 A vese cisztás elváltozásai, a szerzett cisztás vesebetegség (ACRD).....	6
1.4 Vesesejtes tumorok (RCC) ESRD/ACRD vonatkozásában.....	7
1.5 Az ESRD/ACRD vesetumor-genom jellemzői.....	9
1.6 A ESRD és ACRD kialakulása és a daganat patogenezise.....	9
1.7 A mikrokörnyezet szerepe az ESRD/ACRD asszociált tumorok esetében.....	11
2. Célkitűzések.....	13
3. Anyagok és módszerek.....	14
3.1 Vizsgált anyag.....	14
3.2 Tissue microarray (TMA).....	15
3.3 Immunohisztokémia.....	15
4. Eredmények.....	18
4.1 Az ESRD/ACRD vese szövettana.....	18
4.2 Az ESRD/ACRD vese prekursor léziók és tumorok szövettana.....	21
4.3 A gyulladásos mikrokörnyezet kialakulásában részt vevő gének vizsgálata.....	22
4.3.1 A citokinek kifejeződése ESRD/ACRD vesében.....	22
4.3.2 A fibrotikus stroma kialakításában részt vevő gének.....	24
4.3.3 Matrix metalloproteinázok (MMP) kifejeződése ESRD/ACRD vesében.....	27
4.4 A TXNIP, TXN jelátvitel ESRD-ben.....	28
4.4.1 A TXNIP, TXN expressziója normál vesében.....	28
4.4.2 A TXNIP, TXN kifejeződése ESRD/ACRD vesében.....	29

4.4.3 A TXNIP, TXN, HIF1 α kifejeződése ESRD/ACRD tumorokban	33
4.5 A D-vitamin jelátvitel ESRD vesében és tumorokban	35
4.5.1 A VDR, CYP24A1, CYP27B1 kifejeződése normál vesében	35
4.5.2 A VDR, CYP24A1, CYP27B1 kifejeződése ESRD/ACRD vesében	38
4.5.3 A VDR, CYP24A1, CYP27B1 kifejeződése ESRD/ACRD vesetumorokban	38
5. Megbeszélés	39
5.1 A proximális tubuláris sejtek szerepe a CKD kialakulásában.....	40
5.2 A citokinek szerepe a gyulladásos amplifikációs folyamatban	41
5.3 Aktivált miofibroblasztok.....	43
5.4 Oxidatív stressz és genetikai instabilitás	45
5.5 Extracelluláris mátrix (ECM)	48
5.6 A D-vitamin jelátvitel ESRD vesében és tumorok kialakulásában	50
5.7 Epiteliális sejtek plaszticitása, az epitheliális-mesenchimális tranzíció (EMT).....	52
5.8 ESRD vese és fokozott tumorigenezis.....	53
6. Következtetések	57
7. Irodalomjegyzék.....	60
8. Közlemények.....	71
9. Köszönetnyilvánítás	73
10. Rövidítések jegyzéke.....	74

1. BEVEZETÉS

1.1 A végstádiumú vesebetegség (ESRD) és annak jelentősége

A krónikus vesebetegség (CKD) napjainkban népbetegségnek számít. A betegek száma 2017-re világviszonylatban elérte a 700 milliót. 1,2 millió beteg halálát okozta, ami a következő évtizedekben az előjelzések alapján tovább fog emelkedni, 2040-re elérheti akár az évi 4 millió halálesetet is (1, 2). A végstádiumú vesebetegség (ESRD) a vesebetegség utolsó (ötödik) stádiuma, ami a GFR értéke 15ml/perc/1,73 testfelszín m² alatti értéknél mondható ki. Az ESRD arra az irreverzibilis klinikai folyamatra utal, amikor az érintett személy folyamatos vesepótló kezelésre (dialízis, vesetranszplantáció) szorulhat az életveszélyes urémiás állapot elkerülésének céljából. Az Amerikai Egyesült Államokban 2020-ban több mint 500.000 végstádiumú veseelégtelen beteget tartottak számon (3). Az ESRD incidenciája és prevalenciája folyamatos növekedést mutat (2, 4-6). A US Renal Data System adatai szerint évente 20000-rel nő az ESRD betegek száma az Amerikai Egyesült Államokban.

Az ESRD multifaktoriális eredetű. A betegek számának folyamatos növekedése számos etiológiai tényezőre vezethető vissza. Évtizedekkel korábban a glomerulonefritis volt az egyik vezető oka a betegség kialakulásának. Napjainkban a fertőzőes eredetű ESRD betegek száma jelentősen csökken különösen a fejlett országokban, azonban a fejlődő országokban még mindig fontos etiológiai tényező. A legfrissebb tanulmányok a magas vérnyomást és a cukorbetegséget nevezik meg a két legfőbb etiológiai faktorként (2, 4). Az okok között fontos még megemlíteni a policisztás vesebetegséget, a húgyúti rendszerben hosszasan fennálló obstrukciót (az obstrukció pontos kiváltó okától függetlenül), a vesico-ureterális refluxot, a gyakori visszatérő pielonefritist és egyes gyógyszereket, mint például a nem-szteroid gyulladáscsökkentőket (NSAID), a kalcinurin-inhibitorokat és az antiretrovirális

gyógyszereket (3). Az emberek születéskor várható élettartama folyamatosan nő. Az életkor növekedése is rizikófaktor a veseelégtelenség kialakulásának szempontjából, a fejlődő orvostudománynak köszönhetően egyre több krónikus vesebeteg jut az ESRD stádiumába. Vesepótló kezelést világszerte 2,5 millió beteg kap, azonban az előbb részletezett okok miatt számuk 2030-ra elérheti az 5,4 milliót (1).

A CKD csupán 2 %-a progrediál ESRD-be, azonban ennek a betegpopulációnak az ellátása is jelentős terhet ró az egészségügyi rendszerekre (2). 2001-ben az ESRD betegek kezelése világszerte 70\$-75\$ milliárdos költséggel járt, a vesetranszplantáció költségeit nem számítva (1). Az adatok jól mutatják, hogy nem csupán egészségügyi, hanem komoly gazdasági kihívással állunk szemben, melynek kezelése, elsősorban megelőzése kulcsfontosságú a jövőt tekintve.

1.2 Az ESRD vese szövettani vonatkozásai

A CKD előbb vagy utóbb a vese megkisebbedéséhez, úgynevezett zsugorvese kialakulásához vezet. Szövettani vizsgálat ezekben a vesékben a nefron tubuláris atrófiáját, a fibrotikus stroma kifejezett gyulladását, valamint az artériák, arteriolák és glomerulusok súlyos szklerózisát mutatja. Ezek a szöveti elváltozások direkt és indirekt módon megbontják a veseműködés és a veseszerkezet egységét, amelyek a nefron súlyos károsodásához vezetnek. CKD-ben, különösen az urémia kialakulásának idején, a vese szövettani jellemzői a kiindulási betegségtől függetlenül hasonlóan nézhetnek ki, megnehezítve ezzel az eredeti betegség felismerését. Dializált betegek esetén kifejezettebb a szöveti eltérés (7, 8).

Heptinstall már korábban felhívta a figyelmet az ESRD vesében látható olyan progresszív struktúrális elváltozásokra, mint a nagymértékű, főleg kalcium-tartalmú kristályokból álló lerakódások és az artéria intima rétegének megvastagodása (7).

Hammes 1995-ben leírta, hogy a vese epiteliális sejtjei fokozott proliferációval válaszolnak a kalcium-oxalát kristályok hatására (9). Az ESRD vesére jellemző szövettani elváltozásokat Hughson és mtsai több közleményben már 40 évvel korábban részletesen ismertették (10-13). Leírták a simaizom sejtek proliferációját és az artériák, arteriolák falában lejátszódó nekrotikus folyamatokat, az artériák intimájának megvastagodását, a simaizom és endotel sejtek fokozott proliferációját. Megfigyelték az ESRD vesében a tubulusok elváltozásait, amelyeket klasszikus atrofias tubulusokra, tiroidizáción átment tubulusokra, endokrin tubulusokra és szuper tubulusokra osztottak fel. Annak ellenére, hogy az ESRD vese atrofias, hegesedett, igen jelentős sejtproliferációt mutat, főleg a klasszikus és szupertubulusok epitheliumában.

1.3 A vese cisztás elváltozásai, a szerzett cisztás vesebetegség (ACRD)

A hosszantartó dialízis hatására, de néha nélküle is mindkét vesében kialakuló cisztás elváltozásokat már korábban leírták (8). Szerzett cisztás vesebetegség (ACRD) esetén a normál szöveti szerkezet felbomlik és helyét az idült gyulladás, valamint a fibrotikus átrendeződés veszi át, amelyben a megmaradt tubulusok egy része proliferál és cisztikus átalakuláson megy keresztül. A ciszták növekedése végül az egész vese cisztikus átalakulásához és számos esetben a vese megnagyobbodásához vezet. Ilyen esetekben szerzett cisztás vesebetegségről (acquired cystic renal disease, ACRD) beszélünk. Évekig dializált betegeknél gyakran találkozhatunk az ACRD szövettani képével, amelyben kifejezett sejtproliferáció figyelhető meg pre-neoplázias léziókkal és ritka szövettani és genetikai elváltozást mutató veserákkal (8, 10). A nagyobb ciszták falából szolid vagy papilláris növekedésű hámproliferáció indulhat ki, amely időnként kitölti az egész cisztát és végül tumor kialakulásához vezethet.

Az ACRD diagnózisához az örökletes cisztás vesebetegségek kizárása, legalább három nagyobb ciszta jelenléte és mindkét vese parenchimájának legalább 25%-os érintettsége szükséges. A ciszták többsége főleg a vese kortikális részében alakul ki, de a veseparenchima bárhol érintett lehet (8). A nagyobb ciszták falában fokozott sejtproliferáció figyelhető meg.

Az ACRD-ben a sejtek proliferációja sokkal fokozottabb, mint az ESRD zsugorvesében. Ezt a proliferációs készséget a dialízis időtartama egyértelműen befolyásolja és növeli az ACRD kialakulásának valószínűségét. Tíz éves dialízis esetén a betegség kialakulásának valószínűsége 100% (14). Az ACRD jelentősége az általa okozott számos szövődményhez köthető. A leggyakoribb a ciszták rupturájából, fertőződéséből eredő hematuria, mely jelentkezhet mikro- és makrohematuria képében is. Habár a vesesejtes daganat kialakulása nem a leggyakoribb elváltozás a szerzett vesecisztás betegek körében, mégis a beteg és a klinikus szempontjából ez a legfontosabb.

1.4. Vesesejtes tumorok (RCC) ESRD/ACRD vonatkozásában

A vesepótló kezelések, mint a peritoneális dialízis és vesetranszplantáció javítják a betegek életminőségét és meghosszabbítják várható élettartamukat. Azonban a hosszú dialízis kezelés alatt a megmaradt és cisztikusan tágult tubulusokban, valamint a gyulladással fibrotikus strómába ágyazott kis epiteliális sejtcsoportokban fokozott sejtproliferáció jön létre. Ilyen cisztikus elváltozást az ESRD-hez vezető elsődleges betegségben nem lehet látni, ez egyértelműen a dialízissel függ össze. Dunnill már a 70-es években összefüggést látott az ACRD és a különböző benignus és malignus vesetumorok kialakulása között. A hosszútávon dializált betegek veséjében a kifejezett sejtproliferációhoz társuló pre-neopláziás léziókat, valamint igen ritka vesetumor

típusokat írtak le (8,10). Nemcsak a kialakult tumorok szövettani típusa különböző, hanem a daganatok keletkezése is jóval gyakoribb ESRD-ben és ACRD-ben szenvedő betegeknél, mint az átlagpopulációban. Prospektív vizsgálat során a vesetranszplantációra váró betegek körében a klinikailag igazolt vesesejtes daganatok (RCC) előfordulása 3,8% volt (15). Ez jóval magasabb, mint az RCC 0,04%-os rizikója az átlagpopulációban (16).

Különösen dializált betegekben magasabb az RCC kockázata az átlagpopulációhoz viszonyítva (14). A daganat prevalenciája dializált betegek esetében 1,4-1,7% (17, 18). Az RCC 5-7-szer gyakoribb férfiakban, mint nőkben. Az ACRD-vel társultan előforduló RCC-k időben korábban alakulnak ki, az esetek 10%-ban kétoldaliak és az esetek harmadában multifokálisak (8,10,18). Bár a daganat gyakran multifokális vagy kétoldali, nagyon ritkán ad tüneteket, mérete is ritkán haladja meg a 3 cm-t és így nem veszélyezteti közvetlenül a betegek életét.

ESRD-ben a papilláris daganatok aránya jóval nagyobb, mint az átlagpopulációban. Az esetek csaknem felében figyeltek meg papilláris típusú vesetumort, amely szövettanilag megegyezik az általános populációban előforduló papilláris vesetumorról. Viszont az átlagpopuláció rosszindulatú vesedanatainak csak 10%-a felel meg papilláris veseráknak, míg a gyakori konvencionális veserák az esetek 85%-t teszi ki (19). Ritkán előfordulhat kalcium-oxalát lerakódást mutató eozinofil vesetumor, amelyik egyértelműen az ESRD veséhez köthető. Szintén csaknem kizárólag az ESRD vesében látható az úgynevezett eozinofil vakuolákat mutató tumor. Nagyon ritkán világossejtes papilláris vesetumort is megfigyeltek (20-23).

1.5. Az ESRD/ACRD vesetumor-genom jellemzői

Kromoszóma és DNS vizsgálatok alapján az ESRD/ACRD vesében megjelenő konventionális és papilláris veserákok genomikus változásai megegyeznek az átlagpopulációban előforduló hasonló szövettani megjelenésű RCC-k jellemzőivel, míg az eozinofil vakuolákat mutató tumorok nem mutatnak visszatérő, jellemző kromoszóma-változásokat (24-26). Szokatlan szövettani kép esetén az ESRD/ACRD-vel összefüggő tumorok némelyikének diagnózisa még a molekuláris jellemzés után is bizonytalan. A rendelkezésre álló adatok alapján nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy az ESRD/ACRD-vel összefüggő RCC-k egy részének kialakulása eltér az átlagpopulációban előforduló tumorok onkogenezisétől és megkülönböztető, de nem egységes genetikai elváltozásokat mutat (27).

1.6. Az ESRD és ACRD kialakulása és a daganat patogenezise

A szövettani és molekuláris genetikai vizsgálatok ellenére az ESRD/ACRD vesék parenhimális és intersticiális sejtjeihez kapcsolható biológiai folyamatok, valamint a többszörös ciszták kialakulásához, a veseparenhima átalakulásához és a ritka daganatok kialakulásához vezető pontos molekuláris mechanizmusok jelenleg még ismeretlenek. Az ESRD során a vese szerkezeti és működési egysége megbomlik, először a krónikus gyulladás okozta hegesedés határozza meg a mikroszkópos képet, melyet a nefronok károsodása követ. Az ESRD vesében az atrófiás tubulosok sejtjeiben és a strómasejtekben nagyon intenzív sejtproliferáció látható (28).

A hosszantartó dialízis során kialakuló veseciszták többsége egyrétegű köbhámmal bélelt (23). ESRD vesékben a cisztát bélelő epitélium és a tubulusok sejtjei fokozott növekedést mutatnak. A hiperplázia az atípusos cisztákban a legkifejezettebb, a legtöbb ciszta falát proliferáló sejtek alkotják, melyek gyakran papillárisan növekvő

rákmegelőző elváltozásokat képeznek (23, 29). A ciszták bennéke víztiszta, szalmasárga, esetleg cisztaruptura vagy fertőzéshez köthető vérzés következtében vöröses, barnás árnyalatú folyadék. A ciszták valószínűleg a tubulusok kitágulásából jönnek létre, kialakulásukat a tubulus sejtek fokozott proliferációjával és a tubulus proximális és disztális részének záródásával magyarázzák (29). A ciszták és a később kialakuló tumorok jelentős része a proximális tubulusokból, de sok esetben a már nem meghatározható eredetű sejtekből alakulnak ki (28, 30).

A veseszerkezet átalakulásának pontos molekuláris mechanizmusát még nem tudjuk, de számos, a folyamatban fontos szerepet játszó tényező már ismert. A vese kiválasztó működésének elégtelensége miatt kialakult urémiában a szervezetben felszaporodnak olyan toxikus anyagok, melyek egészséges emberben a vizelettel távoznak. Az urémia az összes szervre hatással van. A megnövekedett mennyiségű mérgező anyagok a sejtekben található örökítőanyagot, azaz a DNS-t károsítják. Cengiz 1988-ban leírta az urémiához köthető testvérkromatida kicserélődés gyakoriságát és a sejthalálhoz köthető mikronukleuszok kialakulását ESRD vesékben (31). A DNS repair mechanizmusok hatékonysága urémiás betegekben az egészséges egyéneknél észlelhető érték 60%-ra csökken, mely a vesepótló kezelésekkel normál szintre javulhat (32).

Az urémiás betegekben kialakuló toxikus hatások súlyos mitokondriális károsodást okozhatnak (33). A mitokondriális örökítőanyag sokkal érzékenyebb a genotoxikus hatásokra és ezért gyakrabban fordul elő benne mutáció. A gyakoribb mutációt a különböző protektív és repair mechanizmusok hiánya is elősegíti. A mitokondriális DNS mutáció az elektron transzport lánc defektusa miatt intracelluláris reaktív oxigéngyökök (ROS) fokozott termelődéséhez vezet (34). Az emelkedett ROS szint a DNS további károsításával szintén elősegíti a daganat létrejöttét.

Az ESRD vesékben kialakuló tumorok egy része mind genetikai, mind a szövettani jellemzőiben jelentősen eltér az átlagpopulációban előforduló tumoroktól (20). Genetikai vizsgálatok során olyan kromoszomális és DNS eltéréseket azonosítottak, amelyek az átlagpopulációban előforduló vesedaganatokban nem mutathatók ki (10, 20, 25). A rákmegelőző léziók gyakorisága, a szokatlan szövettani és genetikai jellemzők arra utalnak, hogy a fibrotikus, krónikus gyulladással járó mikroökönyezetnek van szerepe az ESRD/ACRD-ben látható tumorok kialakulásában (27).

1.7. A mikroökönyezet szerepe az ESRD/ACRD asszociált tumorok kialakulásában

Urémiában a mérgező vegyületek mennyisége megnövekedett, melyek toxikus és metabolikus stressz alatt tartják a nefron sejtjeit. Ezenkívül a növekedési faktorok, mint a hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor, HGF), a hepatocita növekedési faktor receptor (hepatocyte growth factor receptor, MET) és az inzulinszerű növekedési faktor (insuline-like growth factor, IGF-1) fokozott expressziója is hozzájárul a vesesejtek fokozott proliferációjához és így a vese átépüléséhez (35). Más tanulmányok a hipoxia által indukálható faktor-2 (HIF-2) és a hipoxia által indukálható faktor-1 α (HIF-1 α) szerepének jelentőségét hangsúlyozzák, amelyek a vesék neovaszkularizációjához vezethetnek (36). A gyulladással okozta oxidatív stressz karcinogén hatású már régóta ismert tény (37,38). A sejtekre gyakorolt oxidatív és metabolikus stressz és a különböző citokinek, köztük az interleukin 6 (IL-6) hatására létrejövő ROS a hipoxia által indukálható faktor-1 (HIF-1) emelkedett kifejeződéséhez vezetnek (39). A HIF-1 a nuclear factor kappa béta (NF κ B) útvonalon a különböző gyulladást elősegítő fehérjék szintéziséhez vezet, amelyeknek jelentős szerepe van az ESRD és ACRD vesékben kialakult gyulladással járó kaszkádban (36). A normál sejtekben a thioredoxin-interacting fehérje (TXNIP) és thioredoxin (TXN) szabályozza a

sejtműködéshez szükséges megfelelő ROS szintet. A TXNIP fokozott kifejeződése elősegíti az intracellularis ROS képződését azáltal, hogy gátolja a TXN működését.

Beszámoltak a proto-onkogének megváltozott expressziójáról, a c-erbB-2 amplifikációjáról, a c-jun aktiválódásáról és a connexin 32 hipermetilációjáról (40). Leírták a citokinek, például az IL-6, az interleukin-8 (IL-8) és a vascular endothelial growth factor (VEGF) fokozott expresszióját ESRD/ACRD vesékben (41-43). Diabétesz miatt kialakult nefropátiában (DNP) a proximális tubulusok sérülése a Toll-like receptor 2 (TLR2) és a Toll-like receptor 4 (TLR4) kifejeződéséhez és gyulladásozó folyamat elindításához vezet (55). Egy globális génexpressziós vizsgálattal az ESRD/ACRD vesékre jellemző specifikus génexpressziós ujjlenyomatot írtak le, amelyben funkcionálisan egymással összekapcsolódó gének, mint citokinek és kemokinek, valamint keratinok fordultak elő (41). Ezenkívül számos, a sejtek proliferációjával összefüggő gén került felismerésre. A real-time polimerase chain reaction (RT-PCR) valamint immunhisztológiai vizsgálat megerősítette, hogy a gének jelentős része valóban csak ESRD/ACRD vesékben fejeződik ki.

ESRD-ben szenvedőknél a vérben keringő 1,25-(OH)₂D₃ (D-vitamin) szintje alacsonyabb. A sejtproliferáció szabályozásában a D-vitaminnak jelentős szerepet tulajdonítanak és tumorelles hatását is igazolták (12-15). A keringő D-vitamin szintjét a vesében két hidroxiláz szabályozza. Az 1 α -hydroxylase (CYP27B1) a D-vitamin biológiailag aktív formájának szintéziséért felelős, míg a 24-hydroxylase (CYP24A1) a D-vitamin katabolizmusát szabályozza (14). Kísérletes munkák utaltak arra, hogy a D-vitamin metabolizmusának zavara összefüggésben állhat a karcinogenezissel (18-20).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az eddigi irodalmi adatok alapján ismert, hogy az ESRD vesében gyakrabban keletkezik vesetumor, amelynek szövettani és genetikai jellemzői különböznek a normál populáció daganataitól. Egy korábbi feltételezés alapján az ESRD vesében kialakult mikrokörnyezetnek lehet ebben szerepe. Ennek megerősítésére megvizsgáltuk a gyulladásszerű mikrokörnyezet kialakulásában szerepet játszó gének expresszióját immunhisztológiával:

a, meghatároztuk a citokinek, mint az IL-6, a Colony stimulating factor 2 (CSF2), a Transforming growth factor β (TGF β), és az Interleukin 1 β (IL1 β) sejtekhez kötött expresszióját

b, megvizsgáltuk a fibrotikus stróma kialakulásában és a vese átépülésében szerepet játszó gének kifejeződését, mint az α smooth muscle actin (α SMA), a Fibronectin 1 (FN1), a Laminin subunit α 3 (LAMA3), a Laminin subunit β 3 (LAMB3), a Laminin subunit γ 2 (LAMC2).

c, megvizsgáltuk a vese szerkezet átrendeződéséhez és a tumorok keletkezéséhez szükséges metalloproteinázok, mint a Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) és a Matrix metalloproteinase 12 (MMP12) kifejeződését.

d, összefüggést keresünk az ESRD vesében jelentősen csökkent számú tubulusok és a D-vitamin receptor, valamint a CYP24A1 és CYP27B1 szöveti kifejeződése között.

e, megvizsgáltuk a gyulladás okozta oxidatív stressz hatására létrejövő ROS szabályozásában szerepet játszó TXNIP-TXN redox rendszer hatását.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Vizsgált anyag

Ebben a vizsgálatban 12 ESRD/ACRD vesét használtunk fel, amelyeket vesedaganat megjelenése miatt távolítottak el. Ezek a minták a Heidelbergi Egyetem Urológiájáról, a Bad-Hersfeldi Kórházból (Németország), a Cambridge-i Radcliffe Kórházból (Egyesült Királyság), és a Ljubljani Egyetem Patológiai Intézetéből (Szlovénia) származtak. Hat zsugorvese ESRD-nek és hat vese a kifejezett cisztikus elváltozások miatt ACRD-nek felelt meg. Minden esetben radikális nefrektómia történt. A mintákat a nefrektómiát követően azonnal feldolgoztuk.

A veséket 4%-os formaldehid oldatban fixáltuk. Minden veséből a vese nagyságának megfelelően 43-137 paraffin blokkba ágyazott minta készült. A hematoxilín és eozin festett metszetekben az epiteliális elváltozásokat különböző csoportokba osztottuk: szolid epiteliális sejtcsoport lumen nélkül, ciszta, prekursor lézió és tumor. A cisztákat két csoportba osztottuk: egyszerű ciszta, amelyeket egy köbhám vagy lapos sejtek béleltek, vagy proliferáló ciszta, amelyek lumenébe papilláris növekedést mutató atípusos sejtek helyezkedtek el. A tumorokat a Heidelbergi klasszifikáció szerint és Tickoo közleménye alapján értékeltük (45,22). A szövettani vizsgálat alapján öt tumort papilláris vesesejtes daganatnak (pRCC), hat tumort pedig konvencionális vesesejtes carcinomának (cRCC) kórisméztünk. Ezen kívül egy vese onkocitoma, két ACRD-hez társuló eozinofil-vakuolizált tumor (evRCC), két kromofób-szerű tumor (chlRCC), és egy világossejtes pRCC fordult elő a tizenkét ESRD/ACRD vesében. Az anyag felhasználását a Heidelbergi és a Pécsi Egyetemek Etikai bizottsága engedélyezte. (No. 5343/2014) Az embrionális vesék a Pécsi Tudományi Egyetem Nőgyógyászati osztályáról, engedélyezett abortusz kapcsán kerültek feldolgozásra.

3.2 Tissue microarray (TMA)

A vizsgálat során tumor szövetet tartalmazó paraffin blokkokat használtuk fel szöveti mikrochip (TMA) készítéséhez. A hematoxinin és eozin festett metszetekben megjelöltük a tumor részleteket és a paraffinba ágyazott szövetblokkból egy ebben a technikában gyakorlott patológus (Prof. Kovács) a Manual Tissue Arrayer (MTA 1, Beecher Instruments, Inc. Sun Prairie, USA) segítségével elkészítette a TMA-t. Minden tumorból legalább két, 0,6 mm átmérőjű szövethengert vittünk át a TMA-ba.

3.3 Immunohisztokémia

Immunohisztokémiai vizsgálatra 16 paraffinba ágyazott reprezentatív ESRD/ACRD vese blokkot választottuk ki. Ezekből sorozat metszeteket készítettünk, hogy a különböző antitestekkel kapott eredményeket össze tudjuk hasonlítani. A vizsgálat során felnőtt és főtális vesékben is meghatároztuk az antitestek kifejeződését.

A 4%-os formaldehydhen fixált és paraffinba ágyazott szövetmintákból 4um-es metszeteket készítettünk, amelyeket alacsony forrásponú paraffinba mártottunk az epitópok megőrzésére. Felhasználás előtt a paraffint xylollal oldottuk le 42°C termosztátban és kétszeri friss xylol csere után a metszeteket rehidráltuk leszálló etanol sorban (100-96-70%-os alkohol). A rehidrálás után a metszeteket desztillált vízben leöblítettük és kétszer öt percig EnVision FLEX WASH BUFFER-ben (DAKO, Glostrup, Denmark) tartottuk. Ezután, az antitestnek megfelelően vagy 10 mM citrát bufferben (pH 6,0) vagy EnVision FLEX Target Retrieval oldatban (pH 9,0) 2100-Retriever-ben (Pick-Cell Laboratories, Amsterdam, The Netherlands) inkubáltuk 121°C-on 3 percig. Ezt követően a metszeteket WASH bufferben öblítettük. Az endogén peroxidázt az Envision FLEX Peroxydase Blocking Reagent-tel (DAKO) blokkoltuk 10 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően a metszeteket lefedtük a primer antitestekkel

és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Negatív kontrollokban az elsődleges antitestet elhagytuk.

1. **Táblázat.** Felhasznált antitestek

Antitest	Gyártó	Hígítás
anti-VDR, ab134826	Abcam, Cambridge, UK	1:200
anti-CYP27B1, EPR20271	Abcam, Cambridge UK	1:2000
anti-CYP24A1, HPA022261	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA	1:200
anti IL6 PA1-26811	Thermo Fisher, Budapest, Hungary	1:400
anti-CSF2, TA808009	Origene, Rockville, MD, USA	1:150
anti-TGF β , PA1-26811	Thermo Fisher, Budapest, Hungary	1:400
anti- α SMA, ab124964	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
anti FAPa ab207178	Abcam, Cambridge, UK	1:200
anti-FN1, ab32419	Abcam, Cambridge, UK	1:250
anti-MMP12, NBP1-31225	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:250
anti-LAMA3 HPA009309	Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary	1:50
anti-LAMB3 HPA008069	Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary	1:200
anti-LAMC2 HPA024638	Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary	1:1000
anti-TXN, HPA055752	Atlas Antibodies, Bromma, Sweden	1:500
anti-TXNIP, EPR14774	Abcam, Cambridge, UK	1:200
anti HIF1a ab51608	Abcam, Cambridge, UK	1:600

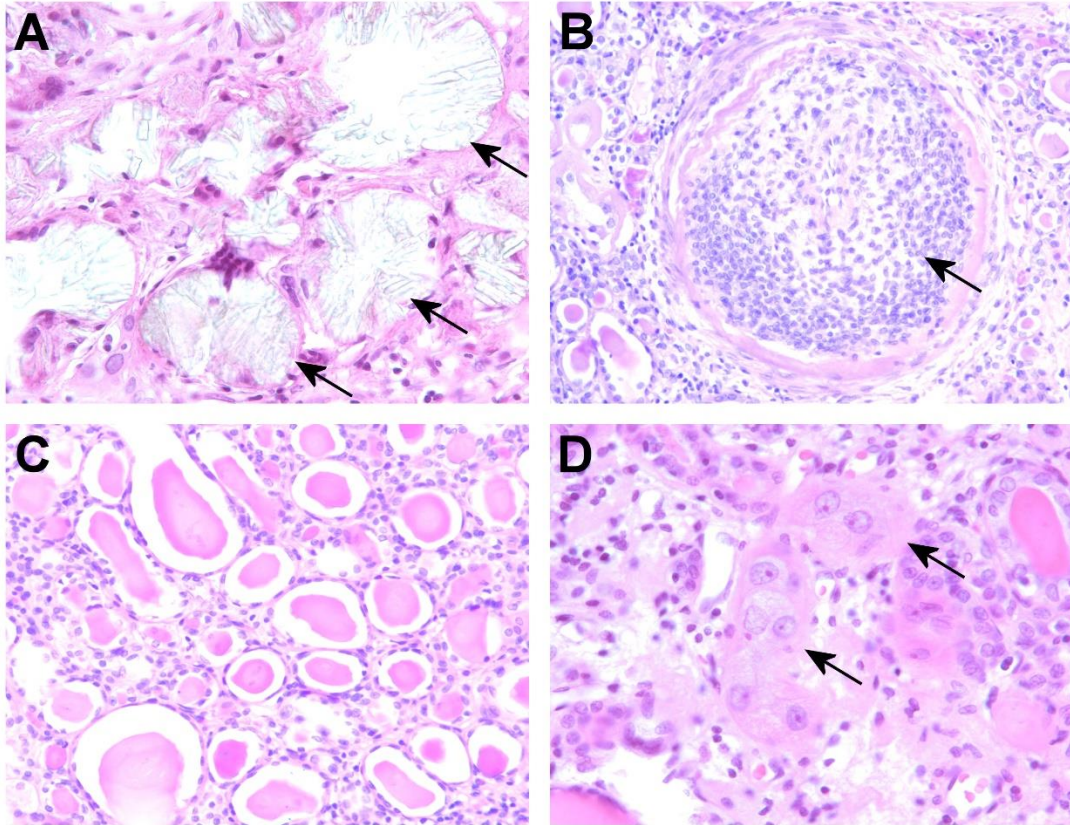
A következő lépésben a metszeteket HRP konjugált szekunder antitesttel fedtük le (DAKO) és 30 percig szobahőn inkubáltuk. A szignálok előhívása amino-ethyl-carbazol-lal (DAKO) vagy AEC-vel (DAKO) történt mikroszkópos kontroll mellett, majd a reakciót desztillált vízben gátoltuk. A metszeteket Mayer's hematoxillinnel

(Lillie's modification, DAKO) festettük. Tíz másodpercig kékítést végeztünk 2,5/1000 ml ammóniumhidroxidban, majd a metszeteket GlycerGel Mounting Mediummal (DAKO) lefedtük. A mikroszkópos kiértékelést Leica DMRBE mikroszkóppal végeztük, a fotó dokumentációt a ProgRes C14 kamera segítségével végeztük el.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az ESRD/ACRD vese szövettana

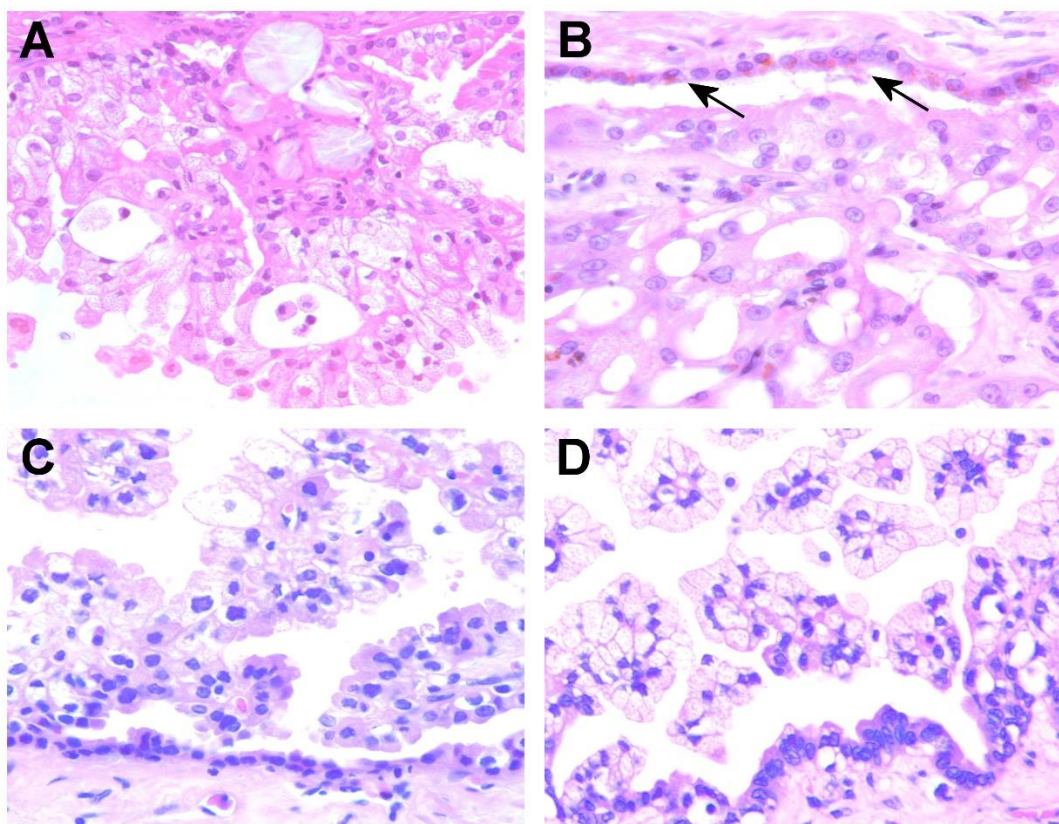
A hat ESRD veséből négy esetben fordult elő az irodalomban leírt gyulladással fibrotikus szövetbe ágyazott kalcium-oxalát kristály, amelyet néha többmagvú óriássejtek vettek körül (1. Ábra A). A metszetekben atrófiás tubulusok mellett körülírt területeken hipertrófiás tubulusokat is megfigyeltünk. Ez utóbbiakat köbhám vagy magas világos és eozinofil citoplazmájú epiteliális sejtek bélelték. A hipertrófiás tubulusok, amelyek a proximális tubulusok sejtjeire emlékeztettek, fibrotikus strómába ágyazott körülírt sejtcsoportokat alkottak. Feltűnő volt az artériák és arteriolák endoteliális és simaizomsejtjeinek, valamint a pericitáknak az erős proliferációja, amely a nagyobb erek csaknem teljes elzáródásához vezetett (1. Ábra B). Az ESRD vesék túlnyomó részében a fibrotikus strómában erőteljes gyulladás jeleit figyeltük meg. Az immunsejtek jelentős része limfocitának felelt meg, de körülírt területeken plazmasejtes infiltráció is előfordult. Ezenkívül vagy csak egy-egy területen, vagy a vesék jelentős területét elfoglaló pajzsmirigyszerű elváltozást észleltünk, ahol a tágult tubulusok lelapult hámsejtekkel voltak bélelve és a lument eozinofil folyadék töltötte ki (1. Ábra C). Az ESRD vesék fibrotikus gyulladással stromájában számos különálló sejtet vagy lazán kapcsolódó különálló hámsejtcsoportokat figyeltünk meg. Ezeknél fénymikroszkóppal nem tudtunk bazális membránt azonosítani (1. Ábra D). Fontos megjegyezni, hogy ezek a sejtcsoportok erőteljes proliferációra utaló sejtmagelváltozást és megnagyobbodott sejtmagvacskát tartalmaztak. Ezeknek a sejteknek az eredete a fénymikroszkópos megjelenés alapján nem volt megállapítható. Összefoglalva, az ESRD vesére elsősorban a jelentős fibrotikus átalakulás, kifejezett gyulladással infiltráció és a kis, valamint a nagyobb erek falában előforduló intenzív miofibroblaszt és endotel sejt proliferáció volt jellemző.



1. Ábra. A végstádiumú vese néhány jellegzetes szövettani képe. A. Részben kioldódott kalcium-oxalát kristályok fibrotikus és gyulladással körülvett környezetben. B. Erőteljesen gyulladással körülvett stromába ágyazott vastagfalú erek az intima és a miofibroblastok proliferációjával, amely a lumen végleges elzáródásához vezetett. C. Típusos pajzsmirigy szerű szövettani kép. D. Gyulladással körülvett mikroenvironmentben bazális membrán nélküli szolid sejtszövetek, proliferációra utaló sejtmagok, amelyek prominens eozinofil sejtmagvacskát tartalmaznak.

AZ ACRD vesékben a fokozott cisztás átalakulás mellett a strómában ugyanolyan gyulladással körülvett sejtes infiltrációt figyeltünk meg, mint az ESRD vesékben. A kisebb és nagyobb erek elváltozása is hasonló volt az ESRD vesékben látottakhoz. A legtöbb cisztát egyrétegű köbhámsejt bélelte, de számos cisztában körülírt szolid vagy papilláris sejt proliferáció fordult elő (2. Ábra). A proliferáló sejtek a legtöbb esetben a cisztát

bélelő sejteknek megfelelően eozinofil citoplazmát mutattak. Azonban számos cisztában világos citoplazmájú sejtek papilláris proliferációja volt megfigyelhető. Az ACRD vesékben megfigyeltünk olyan cisztákat is, amelyekben az egyrétegű köbhám fokozatosan magas eozinofil sejtjes átalakulást mutatott, majd a nagy vakuolizált eozinofil sejtekből álló szolid, papilláris sejtgyógyulat csaknem az egész cisztát kitöltötte. Ezek már tumort megelőző állapotnak tekinthetők (2. Ábra A-D).

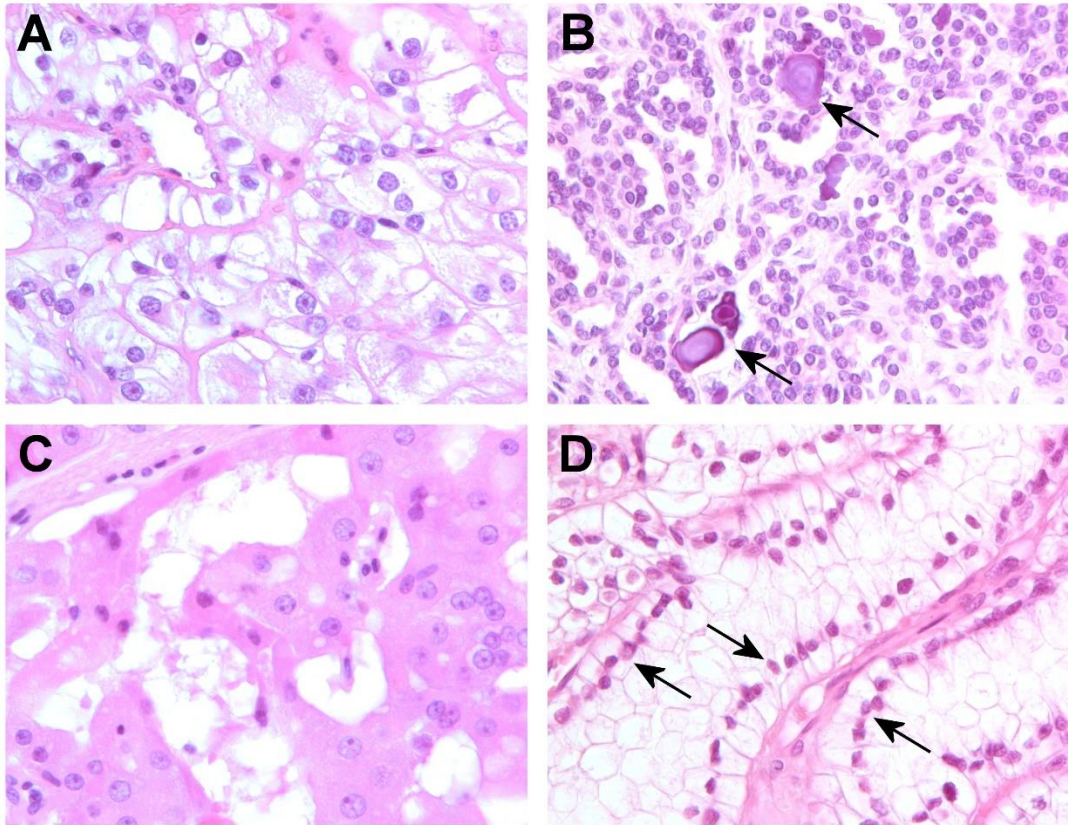


2. Ábra. A szerzett cisztás vesebetegségben kialakult proliferáló ciszták jellemző szövettani képe. A. A cisztafalban, valamint a cisztába növekvő szolid szerkezetű szövetben koleszterin kristályok láthatók. B. Alacsony köbhámmal bélelt ciszta (nyíl) csaknem teljesen kitöltő proliferáló eozinofil vakuolizált sejtekkel, amelyek az eozinofil vakuolizált veserák megelőző állapotának felel meg. C. Hialinizált, vastag falú ciszta világos és eozinofil sejtek papilláris proliferációjával. D. Fokozott világossejtjes

papilláris sejtproliferáció, amely a végstádiumú vesében előforduló világossejtes papilláris tumor prekursor léziójának tekinthető.

4.2. Az ESRD/ACRD vese prekursor léziók és tumorok szövettana

A tizenkét vesében összesen 65 papilláris, 42 kromofób-szerű és 24 eozinofil vakuolizált tumort megelőző léziót azonosítottunk. A hat veséből négy esetben a cRCC mellett 3-4 mikroszkópikus méretű világos sejtes prekursor lézió fordult elő. A legtöbb ESRD/ACRD vesében megfigyelt daganat vagy cRCC vagy pRCC, melyek szövettanilag megegyeznek az átlagpopulációban előforduló tumorok szövettani jellemzőivel (3. Ábra A és B). Összességében öt pRCC, hat cRCC, egy vese onkocitóma, három evRCC, négy chlRCC és egy világossejtes pRCC fordult elő a 12 vesében. Három vesében az ACRD-hez társuló evRCC fordult elő, amely nagyméretű eozinofil vakuolizált sejtekből épül fel (3. Ábra C). Az eozinofil sejtek szolid-tubuláris, néha papilláris növekedést mutattak. Érdekes módon az evRCC némelyikében a pRCC-hez hasonló kis-közepes méretű eozinofil sejtek fokális papilláris növekedését figyeltük meg, amely fokozatosan átment evRCC-ba. Egyetlen esetben kórisméztünk egy úgynevezett világossejtes pRCC-t, amely szintén az ESRD vesére jellemző tumor (3. Ábra D).



4. ábra. A végstádiumú vesére jellemző daganatok szövettani képe. A. Konvencionális veserák szövettani képe ESRD veséből. B. Kis bazofil sejtes papilláris vesetumor ESRD-ben. A papilláris vesetumorra jellemző pszammoma testek is megfigyelhetők voltak (nyíl). C. Kizárólag ACRD-ben előforduló vakuolizált eozinofil sejtes tumor. D. Világossejtes papilláris tumour ESRD-ből. A daganatsejtek nem bazálisan, hanem a sejtek felszínén jelennek meg (nyíl).

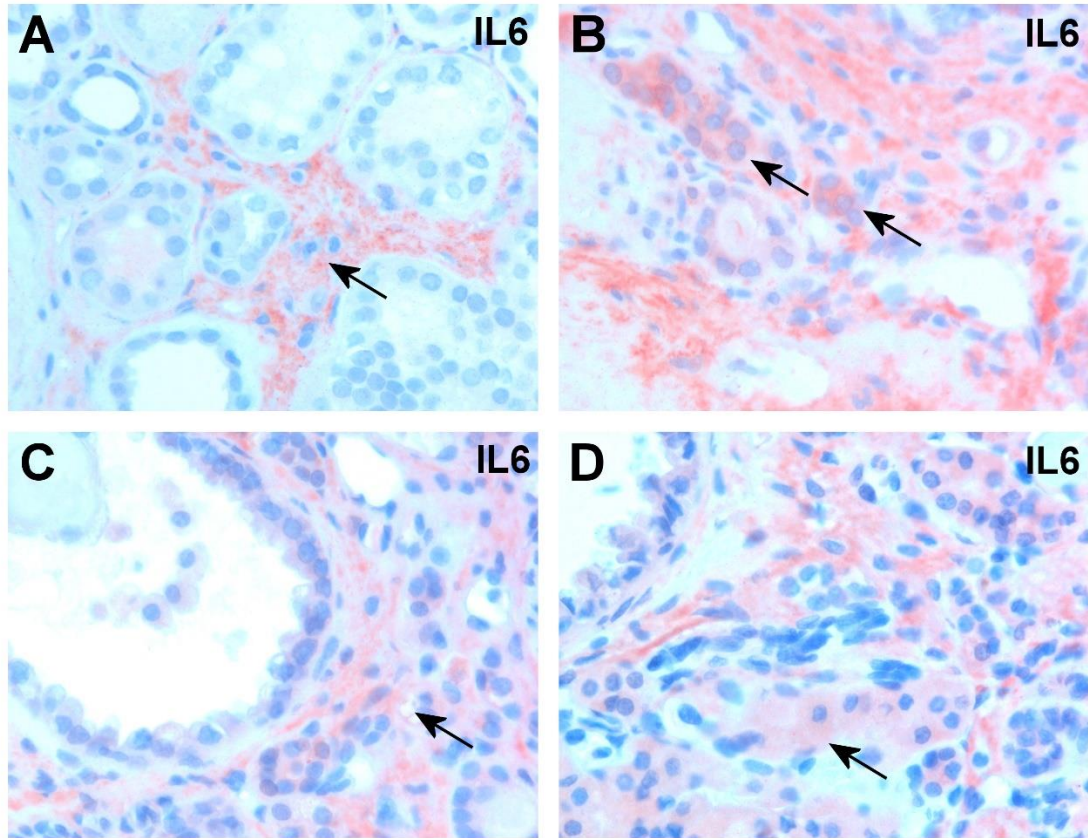
4.3. A gyulladós mikrokörnyezet kialakulásában részt vevő gének vizsgálata

4.3.1. A citokinek kifejeződése ESRD/ACRD vesében

Bár a laboratórium nemrég közölte az IL-6 expresszióját ESRD/ACRD vesében, a vizsgálatot megismételtük a metszeteken, amelyeket ebben a tanulmányban használtunk fel. Az összes ESRD vesében erős IL-6 expressziót észleltünk a tubuláris epitel sejteket körülvevő stroma fibroblasztjaiban (4. ábra A-C). Hasonlóan kifejezett IL-6 expressziót

figyeltünk meg az ACRD vesében, ahol a stroma fibroblasztok mellett különösen a kisebb-nagyobb ciszták körül elhelyezkedő fibroblasztok mutattak pozitív immunreakciót az IL-6 antitesttel (4. Ábra C). Azokban a kitágult tubulusokban, amelyekben az epiteliális sejtek papilláris növekedést mutattak, gyenge IL-6 immunfestést észleltünk. A kis atrófiás, valamint dilatált tubulusokban, amelyeket lapos epiteliális sejtek béleltek, csak néhány sejt mutatott pozitív IL-6 festést. A daganat képződés szempontjából talán a legfontosabb megfigyelés volt, hogy számos gyulladásszerű és IL-6 pozitív strómába ágyazott szabálytalan epiteliális sejt vagy ezek csoportja szintén IL-6 pozitív reakciót mutatott (4. Ábra B és D).

A CSF2 az artériák vagy arteriolák endoteliális és simaizomsejtjeiben fejeződött ki. Továbbá erőteljes CSF2 immunreakciót láttunk a hialinizált strómába ágyazott szabálytalan kis tubulusok sejtjeiben, különálló epiteliális sejtekben és szabálytalan kis csoportokba szerveződött proliferáló epiteliális sejtekben is. TGF β expressziót elsősorban a kis artériák körül proliferáló pericitákban és miofibroblasztokban figyeltünk meg. Ezekívül egy-egy bazális membrán nélküli epiteliális sejtcsoport is pozitív festődést mutatott a TGF β antitesttel. Az ACRD vesék kisebb-nagyobb cisztáinak falát bélelő sejtek, valamint a proliferációt mutató eozinofil-vakuolizált sejtek erős TGF β expressziót mutattak.

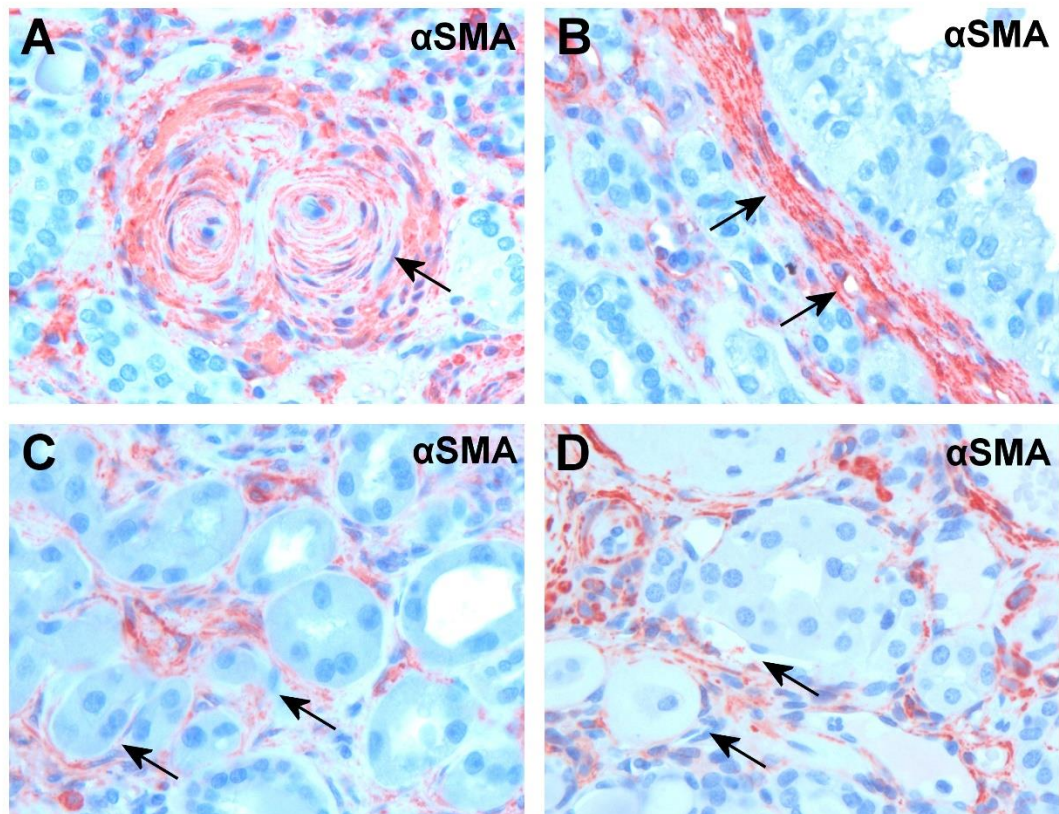


5. ábra. IL-6 expresszió végstádiumú vesében. A. Intenzív immunreakció az IL-6 antitesttel a fibrotikus strómában, amely szabálytalan szerkezetű tubulusokat vesz körül (nyíl). A tubulusok epiteliális sejtjei nem mutatnak IL-6 expressziót. B. Gyulladásos, erősen IL-6 pozitív strómában epiteliális sejtek szabálytalan csoportjai erős citoplazmatikus IL-6 festődést mutatnak (nyíl). C. Cisztikusan tágult tubulust körülvevő fibrotikus stroma erőteljes IL-6 pozitivitást, míg a cisztát béleelő hámsejtek gyenge immunreakciót mutatnak. D. Az erősen fibrotikus, gyulladásos, hialinizált strómába ágyazott szabálytalan tubulusok hámsejtjei intenzív IL-6 expressziót mutatnak.

4.3.2. A fibrotikus stroma kialakításában részt vevő gének

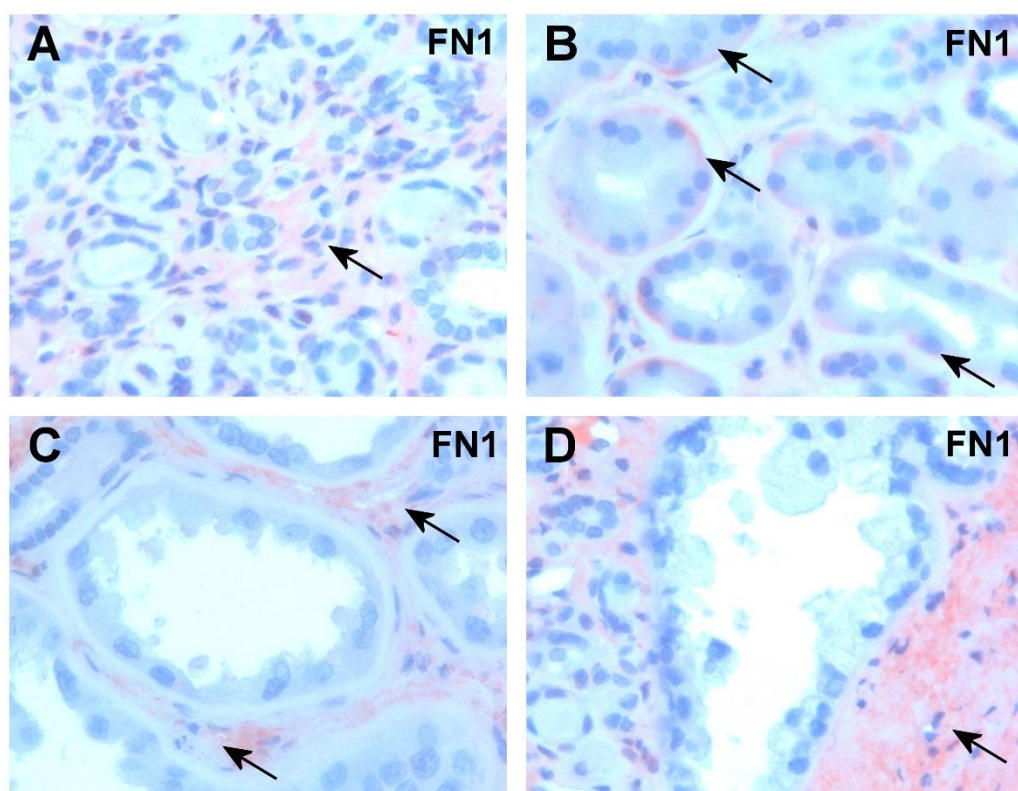
Az α SMA az aktivált fibroblasztokban, az úgynevezett miofibroblasztokban fejeződik ki. Erős α SMA expressziót kizárólag az ESRD vese szklerotikus strómájában lévő fibroblasztokban találtunk, az epitel sejtek nem festődtek α SMA antitesttel. Az

arteriák falát megvastagító és a lument elzáró miofibroblasztok és mioendoteliális sejtek erős immunreakciót adtak az α SMA antitesttel (6. Ábra A). ACRD vesékben a ciszták körül jelentősen felszaporodott miofibroblasztok szintén erős pozitivitást mutattak (6. Ábra B). Proliferáló tubuláris sejtcsoportok, valamint az egyedülálló epiteliális sejteket is α SMA pozitív miofibroblasztok vették körül (6. Ábra C és D).



6. ábra. Az α SMA kifejeződése végstádiumú vesében. A. Intenzív α SMA festődés az erek falát megvastagító aktivált myo-fibroblasztokban. B. Cisztikusan átalakult, kitágult tubulusok körüli strómában az α SMA expresszió jelzi az aktivált fibroblasztok jelenlétét. C. Aktivált fibroblasztokat tartalmazó, α SMA pozitív stromába ágyazott különálló tubulusok. D. A fibrotikus, de nem hialinizált stroma pozitív festődést mutat a FN1 antitesttel. E. Hasonló szöveti struktúrákban kaptunk pozitivitást a LAMA3 antitesttel. F. A LAMC2 antitest elsősorban a fibrotikus strómába ágyazott, szabálytalan tubulusok hámsejtjeiben mutatott pozitív festődést.

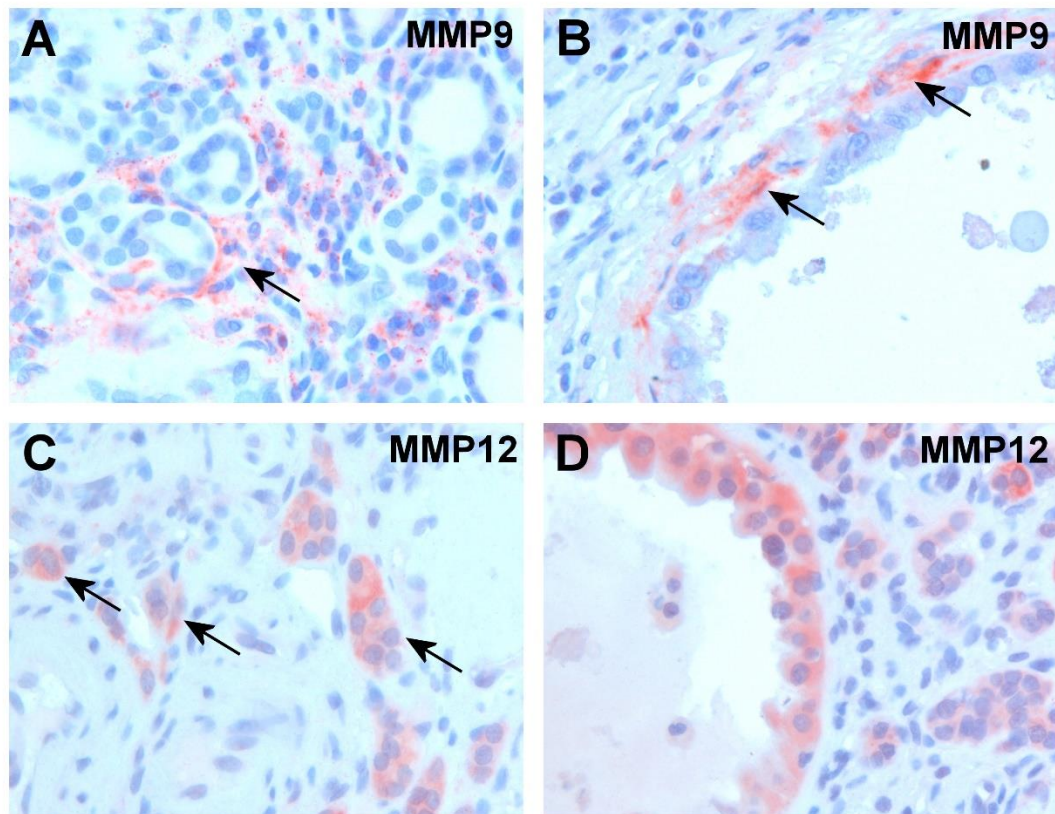
Az FN1 pozitív sejtek gyakorlatilag megfeleltek az α SMA pozitív miofibroblasztoknak. FN1 festődést elsősorban fibrotikus szklerotizáló stromában elhelyekedő fibroblasztokban észleltünk (7. Ábra A). Elvértve egy-egy strómába ágyazott, különálló epiteliális sejtben vagy szabálytalan sejtcsoportban is megfigyeltük enyhe FN1 pozitivitást, elsősorban az epiteliális sejtek bazális pólusán (7. Ábra B). Cisztikusan tágult tubulusok körül finom FN1 pozitív fibroblaszt hálózat, vagy hegszerű nagyfokú FN1 felszaporodás fordult elő (7. Ábra C, D). A laminin332 mindhárom összetevője pozitív reakciót mutatott az ESRD/ACRD vesében. A LAMA3 és LAMB3 kis hámszerű sejtcsoportokban és extracellulárisan a strómában fejeződött ki, míg a LAMC2 expresszió elsősorban a hámsejtekben volt megfigyelhető.



7. Ábra. Fibronectin (FN1) immunreakció végstádiumú vesében. A. Diffúz FN1 festődés a fibrotikus stróma sejtjeiben (nyíl). B. Gyenge FN1 festődés figyelhető meg a tubuláris sejtek bazális membránján (nyíl). C. A tágult tubulusokat határoló, enyhén fibrotikus stroma sejtjei pozitív reakciót adnak az FN1 antitesttel. D. Egy tisztikusan tágult tubulus hialinizált, FN1 pozitív strómában.

4.3.3. Matrix metalloproteinázok (MMP) kifejeződése ESRD/ACRD vesében

Mivel a metalloproteinázoknak (MMP) jelentős szerepe van a szöveti szerkezetek átépülésében, megvizsgáltuk az MMP9 és MMP12 kifejeződését is ESRD/ACRD vesékben. ESRD vesékben a stromális fibroblasztok, különösen a tubulusok körül jelentős MMP9 immunreakciót mutattak (8. Ábra A). Az ACRD vesékben a kisebb-nagyobb ciszták falában szintén jelentős MMP9 festődés volt kimutatható (8. Ábra B). Az MMP9 kizárólag a stróma sejtjeiben fejeződött ki, a hámsejtben nem figyeltünk meg MMP9 pozitivitást. Ezzel ellentétben az MMP12 antitest erős citoplazmatikus festődést mutatott a kitágult tubulusokban, valamint az ACRD vese cisztáinak sejtjeiben (8. Ábra D). Ezen kívül, egyes különálló hámsejtben és a fibrotikus strómával elválasztott sejtcsoportban is erős festődést is tapasztaltunk. Viszont az MMP12 nem expresszáldott a stróma fibroblasztjaiban.



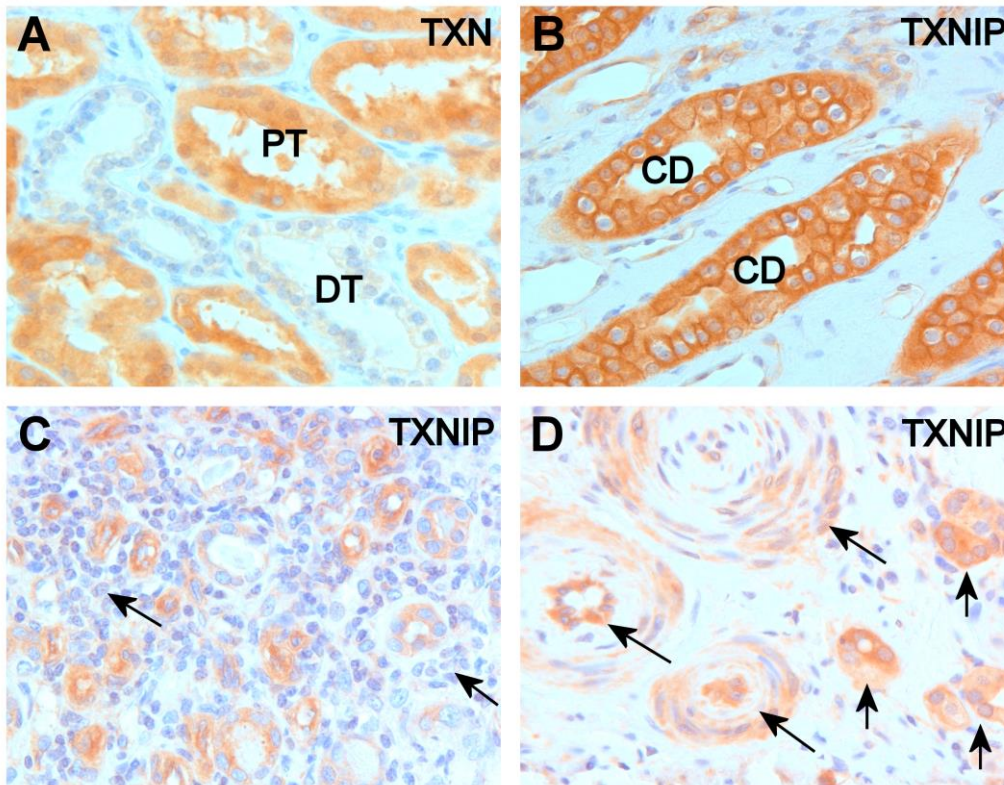
8. ábra. Metalloproteinázok kifejeződése végstádiumú vesében. A. Kötőszövetbe ágyazott szabálytalan tubulusok körüli stroma sejtjeinek egy részében MMP9 expresszió figyelhető meg (nyíl). B. Erőteljes MMP9 festődés cisztikusan kitégült tubulus falában (nyíl). C. MMP12 immunreakció a kis szabálytalan elrendezésű epiteliális sejtekben (nyíl). D. Az atrófiás tubulusok sejtjei mellett a cisztafalban proliferáló epiteliális sejtek is erős immunreakciót mutattak az MMP12 antitesttel.

4.4. A TXNIP, TXN jelátvitel ESRD vesében

4.4.1 A TXNIP, TXN expressziója normál vesében

A TXN citoplazmatikus expressziója kizárólag felnőtt vese proximális tubulus sejtjeiben fordult elő (9. Ábra A). Néhány sejt nukleáris TXN pozitívását észleltünk. A TXNIP erős expressziót mutatott a kortikális és medulláris gyűjtőcsatorna sejtjeiben,

a kis artériák miofibroblasztjaiban és a kis erek endotel sejtjeiben, valamint gyenge pozitivitást mutatott a proximális tubulus sejtjeinek lumen felületén (9. Ábra B). Egészséges felnőtt vesében a TXNIP nukleáris expressziója nem igazolódott.

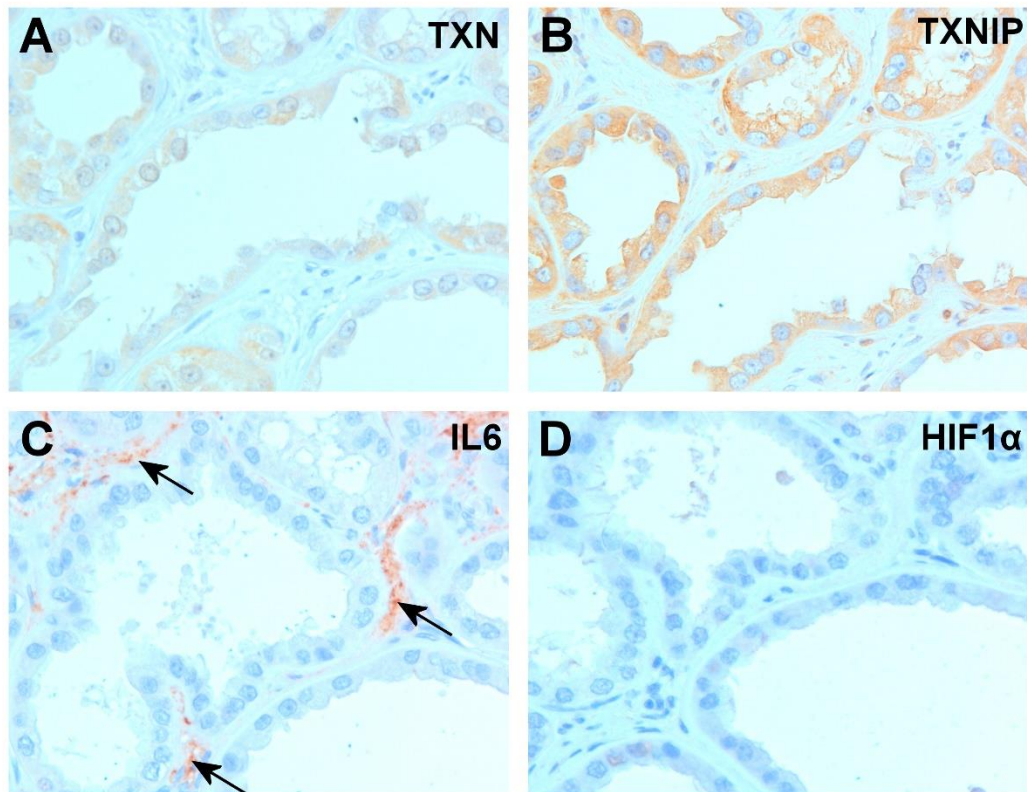


9. Ábra. A TXN a vese proximális tubulusaiban fejeződik ki. B. Ezzel ellentétben a TXNIP kizárólag a kivezető csatornák sejtjeiben figyelhető meg. C. A gyulladástól (nyilak) ágyazott tubulusok egyedül álló epitheliális sejtjeiben erőteljes TXNIP kifejeződése látható. D. A nagyobb artériák miofibroblasztjaiban és endotel sejtjeiben a TXNIP antitest erőteljes expressziója látható (nyilak), hasonlóan az epitheliális sejtekhez (rövid nyilak).

4.4.2. A TXNIP, TXN kifejeződése ESRD/ACRD vesében

A TXNIP és TXN különböző erősségű expressziót mutatott az ESRD/ACRD vesékben. Amint a normál felnőttkori vesében megfigyeltük, az ESRD/ACRD vesékben is erős TXNIP expresszió fordult elő a kis erek falában a proliferáló

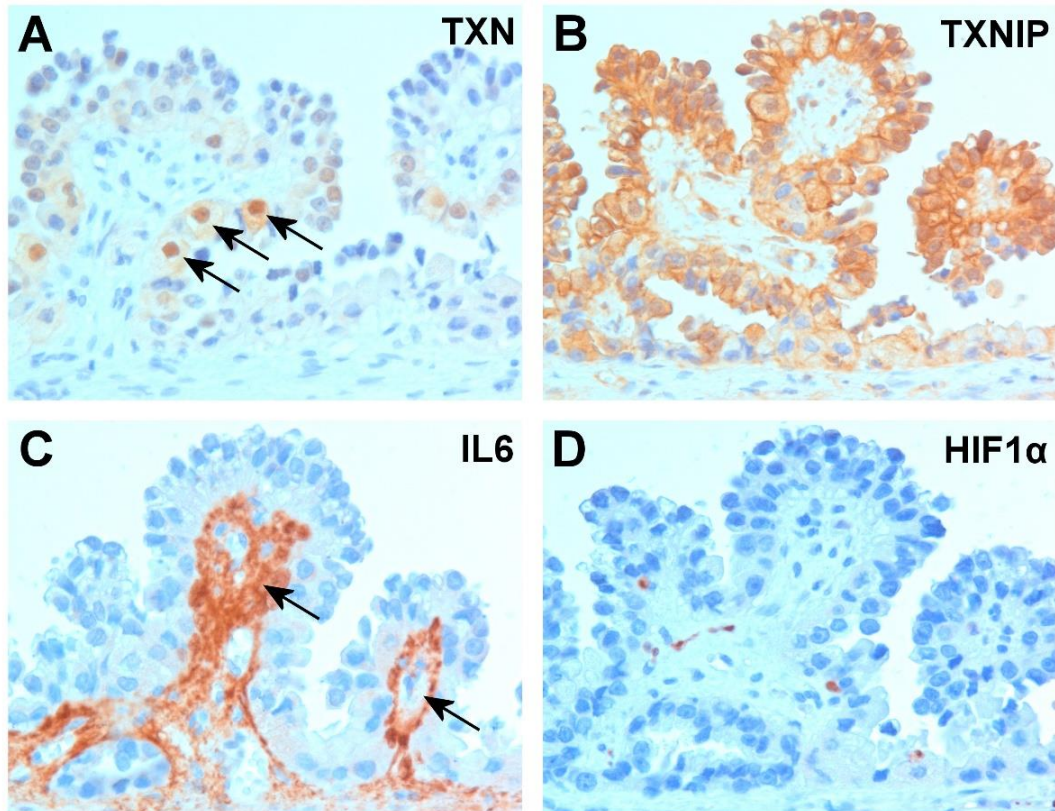
miofibroblasztokban és endotel sejtekben. Majdnem minden metszetben találtunk körülírt proliferációt mutató TXNIP pozitív kapillárisokat (9. Ábra C). A nagyobb arteriákban erőteljes miofibroblaszt, pericita és endotel sejt proliferációt mutató artériák voltak megfigyelhetők (9. Ábra D). Sem a nagy erek, a miofibroblasztok, az endotel sejtek, sem a kis kapillárisok nem bizonyultak pozitívnak TXN antigén vizsgálattal. A fibrotikus hialinizált stromába ágyazott kis hámsejtcsoportok és összenyomott tubulusok erősen pozitívak voltak a TXNIP-re, míg ugyanezek a sejtek csak gyenge TXN expressziót mutattak (9. Ábra D). Szabálytalanul növekvő, proximális tubulusokra emlékeztető tubuláris sejtek kis csoportjai a 12 ESRD/ACRD veséből ötben fordultak elő, és ezekben a TXN pozitívitas erősebb volt, mint a TXNIP pozitívitas. A pozitív sejtek némelyikének sejtmagja is pozitív festődést mutatott TXN antitesttel. A köbhámsejtekkel bélelt egyszerű ciszták döntő többsége gyenge pozitívitasát mutatott a TXN antitesttel (10. Ábra A). Ugyanezek a vese részletek sokkal erősebb immunreakciót adtak TXNIP festéssel (10. Ábra B). A feltételezett fokozott oxidatív stressz vizsgálatára elvégeztük az IL-6 és HIF1 α immunreakciót azonos metszeteken. Bár az IL-6 pozitív reakciót adott a ciszták körüli fibroblasztokban, a HIF-1 α negatív volt az összes metszetben (10. Ábra C és D).



10. Ábra. A TXN, TXNIP, IL-6 és HIF-1 α kifejeződés végtádiumú vese cisztikusan átalakult részében. A. A cisztákat bélelő hámsejtek gyenge TXN festődést mutatnak. B. Ugyanazon veserészletben fokozott TXNIP kifejeződés figyelhető meg. C. Az IL-6 a ciszták közötti gyulladással szomszédos strómában mutat pozitív reakciót. D. A HIF-1 α negatív immunreakciót adott.

A cisztikus elváltozást mutató ACRD vesékben, különösen a proliferatív cisztákban sokkal kifejezettebb volt a TXN és TXNIP kifejeződése közötti különbség (11. Ábra). A papillárisan növekvő sejtek rendkívül enyhe citoplazmatikus TXN reakciót mutattak, viszont a sejtek egy részében erős sejtmagfestődést észleltünk (11. Ábra A). Ugyanezekben a sejtekben a TXNIP antitesttel rendkívül erős citoplazma festődés volt megfigyelhető (11. Ábra B). Az IL-6 immunhisztokémia a papillák strómájában

intenzív IL-6 kifejeződésre utalt (11. Ábra C). Viszont a HIF-1 α az egyszerű cisztákhoz hasonlóan negatív volt (11. Ábra D).

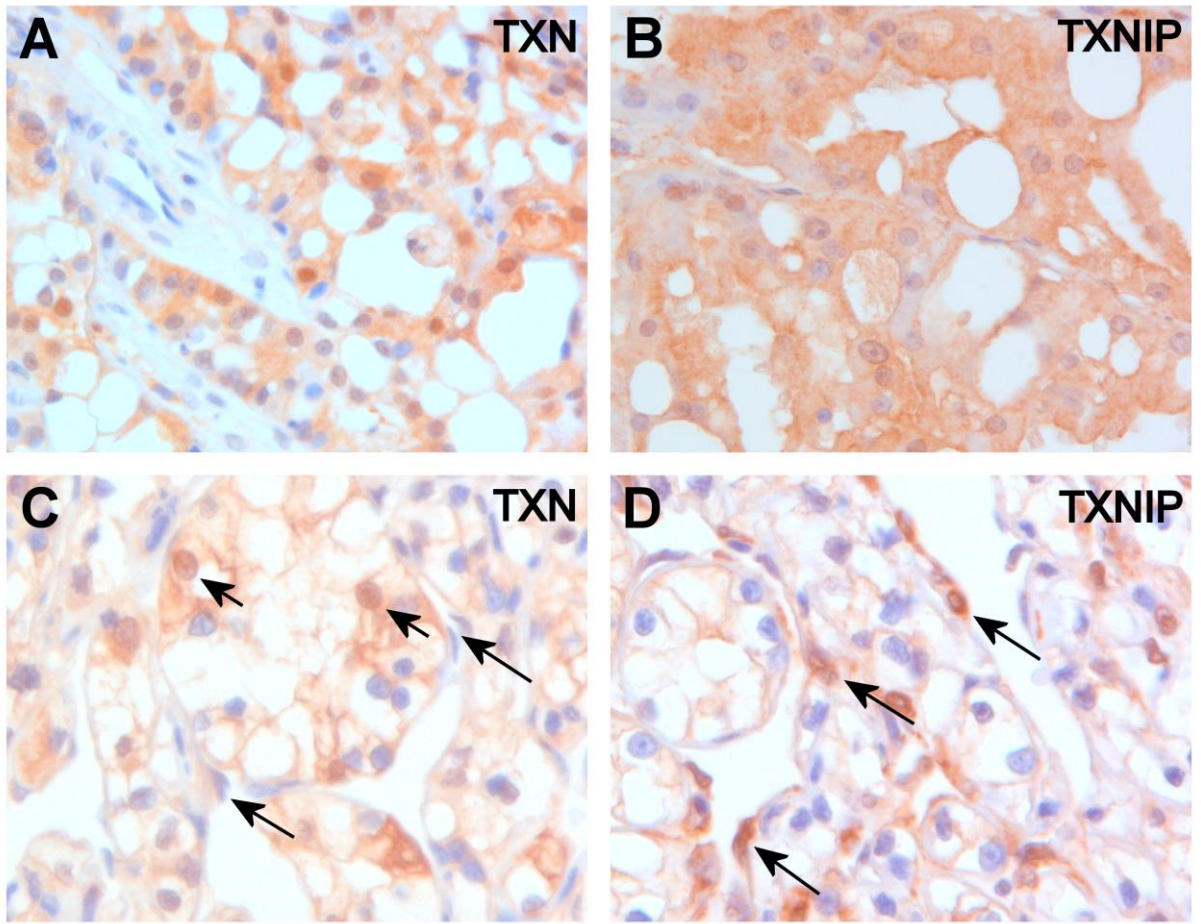


11. ábra. A TXN, TXNIP, IL-6 és HIF-1 α kifejeződése proliferatív cisztában. A. Néhány sejt citoplazmájában, de különösen ezek sejtmagjában erőteljes TXN pozitivitás látható (nyilak). B. A TXNIP antitest kifejezett citoplazmatikus kifejeződése látható. C. A papillaris struktúrák kötőszövetes strómájában jelentős IL-6 pozitivitás fordul elő (nyilak). D. Gyakorlatilag negatív immunreakció a HIF-1 α antitesttel.

4.4.3. ATXNIP, TXN, HIF1 α kifejeződése ESRD/ACRD tumorokban

Hét cisztában, amelyeket papillárisan növekedő eozinofil vakuolizált sejtek csaknem teljesen kitöltöttek, valamint az öt evRCC-ban pozitív immunreakciót találtunk a TXN antitesttel. A legtöbb daganatsejtben sejtmag pozitivitást is megfigyeltünk. Ugyanezek a sejtek erős immunreakciót adtak a TXNIP antitesttel is (12. Ábra A és B). A kilenc chromophobe-like pre-neoplasiás lézió és a négy chl-RCC erős citoplazmatikus pozitivitást mutatott mindkét antitesttel. A papilláris pre-neoplasiás léziók, valamint a TMA-ban lévő öt pRCC-k mindegyike pozitív volt a TXNIP antitesttel. Közepes szintű TXN festést figyeltünk meg nyolc papilláris pre-neoplasiás lézióban és a négy pRCC-ban. A citoplazmatikus festés mellett két pRCC nukleáris TXN pozitivitást mutatott. A világossejtes papilláris tumor mindkét antitest esetében negatív volt.

Hat cRCC mutatott citoplazmatikus és kettő nukleáris TXN expressziót is. Az endoteliális sejtek negatív immunreakciót mutattak (12. Ábra C). Hat cRCC közül három gyenge citoplazmatikus TXNIP expressziót és kettő nukleáris pozitivitást mutatott. A hat cRCC közül ötben erős nukleáris immunreakciót figyeltünk meg a stromális endotel sejtekben (12. Ábra D).



12. ábra. TXN és TXNIP kifejeződése ESRD/ACRD tumorokban. A. Az úgynevezett evRCC sejteiben a citoplazma, valamint a sejtmagok jelentős része is erősen festődött a TXN antitesttel. B. Erős citoplazma és alkalomszerűen egy-egy sejtmag pozitívitás a TXNIP antitesttel. C. Sejtmag TXN pozitívitás cRCC-ban (rövid nyíl), viszont az endothelialis sejtek nem festődtek (nyíl). D. A konvencionális veserák kapilláris érhálózatának endothel sejtjei erős sejtmag pozitívitás mutatnak a TXNIP antitesttel (nyíl).

Az ebben a vizsgálatban szereplő TXN és TXNIP immunreakció eredményeit az ESRD /ACRD-vel összefüggő daganatokban az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. Táblázat. A TXN és TXNIP kifejeződése ESRD/ACRD-tumorokban

Antitest		Tumor			
		evRCC (5)	chlRCC (4)	cRCC (6)	pRCC (5)
TXN	cyt	5	4	6	4
	nucl	5	2	2	2
TXNIP	cyt	5	4	3	5
	nucl	2	1	2	-
	end-nucl	-	-	5	-

evRCC- eozinofil-vakuolizált RCC; chlRCC – kromofob-szerű RCC; cRCC – konventionális RCC; pRCC – papilláris RCC; cyt - citoplazma; nucl – nukleusz; end – endotel

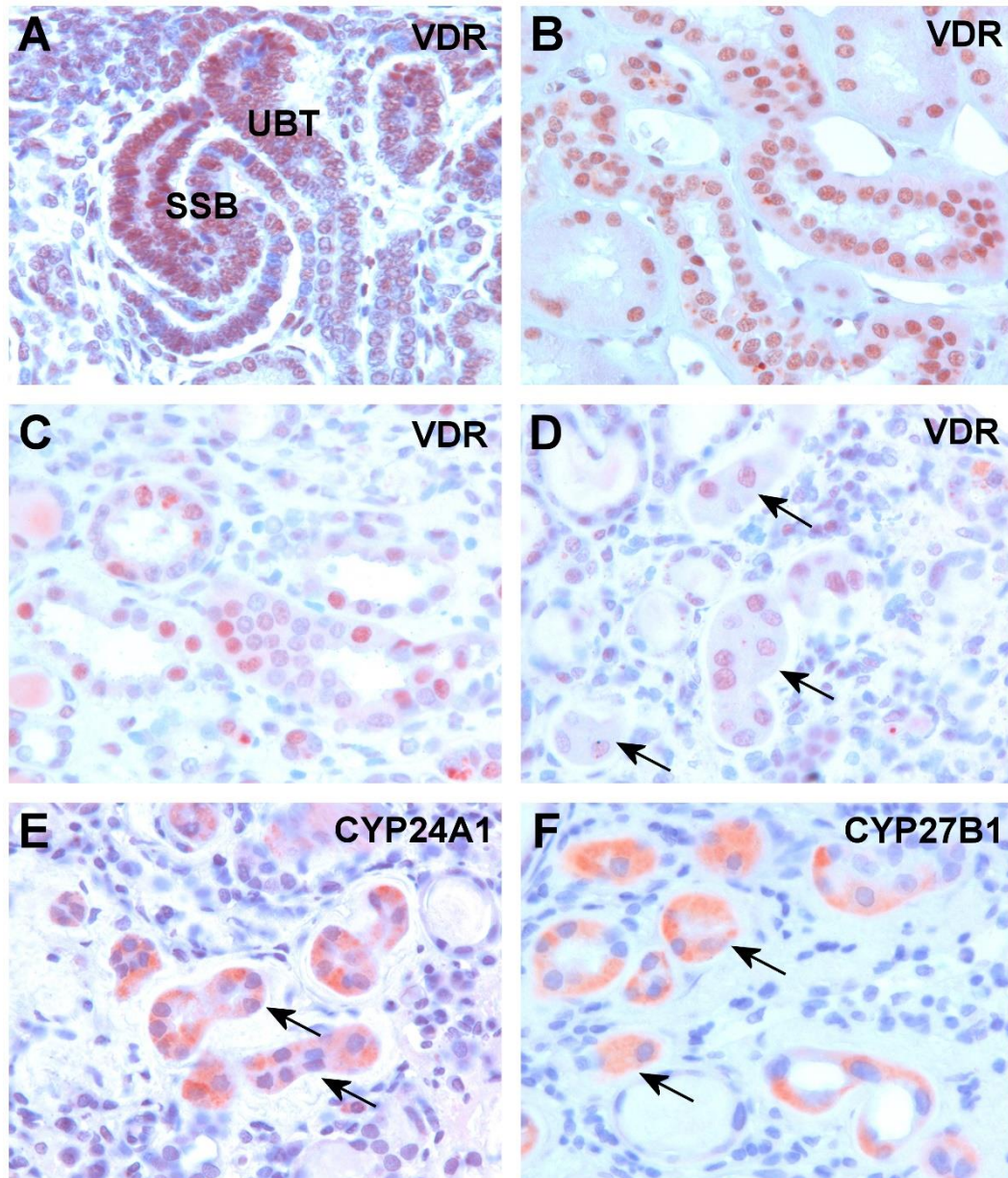
4.5 A D-vitamin jelátvitel ESRD vesében és tumorokban

4.5.1. VDR, CYP24A1, CYP27B1 kifejeződése normál vesében

A D-vitamin receptor (VDR) erős expresszióját találtuk a magzati vesében. A tíz hetes vesében a VDR erős festődést mutatott az ureterbimbó sejtjeiben, az azt körülvevő blasztemális sejtekben, a pre-tubuláris aggregátumokban, és az ezekből a mesenchimális-epiteliális átmenet során kialakuló sejtekben, amelyekből később a gyűjtőcsatornák fejlődnek ki (13. Ábra A). A legerősebb festődést az S-formájú testecskék disztális részén észleltük. A 14-16 hetes főtális vese proximális és disztális tubuláris sejtjei gyenge festődést mutattak a VDR antitesttel. A CYP27B1 antitest a

fejlődő Henle-kacs, a makula denza és a disztális tubulusok sejtjeiben adott erős pozitív reakciót a 10, 14 és 16 hetes főtális vesékben. A CYP24A1 nem fejeződött ki a főtális vesében.

Felnőtt vese minden sejtjében, a proximális tubulusoktól a medulláris gyűjtőcsatornáig nukleáris VDR expresszió volt megfigyelhető, de a legerősebb festődést a disztális tubulusok területén észleltünk (13. Ábra B). CYP27B1 erős kifejeződése a Henle-kacs felszálló ágában, a makula denza sejtjeiben és a disztális tubulusokban fordult elő, míg a gyűjtőcsatornában csak néhány sejt volt pozitív. Mind a CYP27B1, mind a CYP24A1 fehérjék finom szemcsés festődésként vannak jelen a sejtek citoplazmájában, amely megfelel a mitokondriumok elhelyezkedésének.



13. ábra. VDR, CYP27B1 és CYP24A1 kifejeződése. A. Erős magfestés figyelhető meg a főtális vese nefrogén zónában. B. Hasonlóan kifejezett nukleáris VDR pozitivitás a felnőtt vese minden sejtjében. C és D. VDR immunohisztokémia erős sejtmag pozitivitást mutatott az atípusos tubulusok sejtjeiben és a szolid sejtcsoportokban (nyilak). E és F. Gyulladásos stromába ágyazott szabálytalan tubulusok és egy-egy különálló epiteliális sejt citoplazmájában CYP27B1 és CYP24A1 pozitivitás látható (nyilak).

4.5.2. VDR, CYP24A1, CYP27B1 kifejeződése ESRD/ACRD vesében

Az ESRD/ACRD vese szerkezeti átalakulását fibrotikus gyulladással szorított stróma jellemzi, amelyben szabálytalan tubulusokat, epiteliális sejtcsoportokat, és különböző típusú cisztákat lehet találni. A teljesen átépült ESRD/ACRD vesében talált pozitív immunreakciót a normál vesétől eltérően, nehéz egy bizonyos sejtípushoz társítani. VDR expressziót csak szabálytalan tubulusok néhány sejtjében és néhány különálló sejtben észleltünk (13. Ábra C és D). A hialinizált gyulladással szorított strómába ágyazott szabálytalan tubuláris sejtek egy része pozitív immunreakciót adott mind a CYP27B1 mind a CYP24A1 antitesttel (13. Ábra E és F). A ciszták falát alkotó sejtek egy része szintén pozitívnak bizonyult. A még felismerhető epiteliális sejteknek csak kis százaléka (1-3%-a) bizonyult pozitívnak a VDR, CYP27B1 és CYP24A1 antitestekkel. Három ACRD vesében, amelyekben a ciszta lumenébe papilláris szolid eozinofil-vakuolumokat tartalmazó sejtcsoport növekedést figyeltünk meg, erős VDR és CYP27B1, valamint gyenge CYP24A1 pozitívítást észleltünk. Két ESRD vesében, amelyek ugyanazon betegből származnak, az epiteliális sejtek mintegy 30%-ában pozitív festődést észleltünk mind a VDR, CYP27B1 és CYP24A1 immunhisztokémiával. Ezekben a vesékben előforduló számos kromofób veserákra emlékeztető pre-neoplasztikus lézió is pozitívítást mutatott mindhárom antitesttel.

4.5.3. VDR, CYP24A1, CYP27B1 kifejeződése ESRD/ACRD vesetumorokban

Minden papilláris pre-neopláziás lézió és mind a hat pRCC negatívnak bizonyult mindhárom antitest vizsgálata során. Továbbá negatívnak bizonyult a hat cRCC is. Az összes evRCC és azok prekursor léziói is pozitívak voltak a VDR és CYP27B1 antitesttel és gyengén pozitívak a CYP24A1 antitesttel. A kromofób-szerű pre-neopláziás léziók és tumorok erős pozitív festődést mutattak a CYP27B1 antigénnel,

míg a VDR és CYP24A1 antigének csak mérsékelt pozitivitást mutattak. A világossejtes pRCC negatív volt mind a három antitesttel.

5. MEGBESZÉLÉS

A papilláris vesetumor ESRD vesében előforduló szokatlanul magas arányára Ishikawa és Kovács mutatott rá 1993-ban (19). Ezt követően Kovács felvetette az ESRD vesében kialakult mikrokörnyezet hatását a tumorok gyakori kialakulásában (27). Hamarosan az is nyilvánvaló lett, hogy nemcsak szokatlan típusú vesetumork alakulnak ki ESRD vesében, hanem ezekben a tumorokban olyan kromoszómális elváltozások figyelhetők meg, amelyek nem jellemzőek az általános populációban kialakuló tumorokra. Ezeket az adatokat figyelembe véve Nagy és munkatársai elvégezték ESRD és ACRD vesék génexpressziós vizsgálatát az Affymetrix GeneChippel. Az ESRD/ACRD vesékre jellemző expressziós ujjlenyomatot 2016-ban közölték (41). Az ESRD vesében, a normál veseszövethez képest nagymértékben kifejeződő gének között több funkcionális csoportot különítettek el. Az egyik nagyobb géncsoportot a citokinek és citokin receptorok, mint az IL-6, a Chemokine ligand 1 (CXCL1), a Chemokine ligand 3 (CXCL3), a Chemokine ligand 6 (CXCL6), a Chemokine ligand 8 (CXCL8), tették ki. Egy másik funkcionális csoportba a citokeratinok mint a Keratin 7 (KRT7), a Keratin 19 (KRT19), a Keratin 23 (KRT23), a Keratin 81 (KRT81) és a Keratin associated protein 2-2 (KRTAP2-2) tartoztak (41). Ezenkívül számos más gén, mint a CSF2, a G proteincoupled receptor 87 (GPR87), a Forkhead box E1 (FOXE1), az Epregrulin (EREG), a Noggin (NOG), a LAMA3, a LAMB3, a LAMC2 csaknem kizárólag az ESRD/ACRD vesékben fejeződtek ki. Néhány további gén az ESRD/ACRD vesékben kialakuló tumorokban is kifejeződött.

Nagy és munkatársai által elvégzett génexpressziós vizsgálat felhívta a figyelmet a gyulladással mikrokörnyezetben kifejeződő gének, mint az IL-6, TGF β , CSF2, valamint az α SMA, FN1, laminin332 és az MMP9 és MMP12 szerepére a gyulladással-fibrotikus folyamat fenntartásában és az ESRD/ACRD kialakulásában. Ezek a gének jelentős szerepet játszanak az extracelluláris környezet kialakításában, az egyre fokozódó fibrózisban, a vese szerkezet átépülését befolyásoló epiteliális sejtproliferációban és a tumorok kialakulásában. A rendelkezésre álló adatok alapján az IL-6, az IL-8, a Lipopolysaccharide binding protein (LBP), a Serum amyloid A1 (SAA1), valamint más gének (HGF, MET, IGF-1, HIF-2, HIF-1 α , VEGF) expressziójának ismeretében határozottan kijelenthető, hogy a hosszan tartó gyulladással mikrokörnyezetnek fontos szerepe van a vese szerkezetének átalakulásában és a ritka szövettani és genetikai megjelenésű RCC kialakulásában (20, 22, 24-26, 35, 36, 40, 42, 43). Az elváltozások progressziójának lépésről-lépésre történő megfigyelése a gyulladással folyamatok korai fázisától a vese végső szerkezeti átépüléséig lehetetlen, mivel az ESRD/ACRD vesét többnyire csak a progresszió utolsó szakaszában egy klinikailag kimutatható tumor miatt távolítják el. A rendelkezésre álló adatok és a jelen tanulmány adatai alapján megpróbáltuk rekonstruálni az ESRD/ACRD vese kialakulásának és a tumorok kialakulásának a folyamatát.

5.1 A proximális tubuláris sejtek szerepe a CKD kialakulásában

A különféle vesebetegségek által okozott csökkent oxigén- és tápanyag-leadás, illetve a toxikus stressz a proximális tubulusok károsodását eredményezi, amelyek nehezen képesek alkalmazkodni a megváltozott környezethez. Nem képesek könnyen és gyorsan az oxidatív anyagcseréről a glikolitikus anyagcserére átállni. Normál körülmények között egy rövid ideig tartó stresszből, a fennmaradó életképes sejtek

migrációjával és őssejt-szerű képességével a proximális tubuláris rendszer teljesen vagy csaknem teljesen felépülhet (46). A helyzet azonban drámaian megváltozik a hosszan tartó hipoxémiás-toxikus vagy metabolikus stressz során (47). A sérült proximális tubuláris sejtek pro-inflammatórikus citokineket, mint IL-6, CSF2 és tumor nekrosis faktor α (TNF α) termelnek (48, 49). DNP-ban a magas glükóz és a hipoxémiás stressz hatására a proximális tubuláris sejtekben a fibronectin és „heat shock”-fehérjék, a TLR endogén ligandjai fokozottan kifejeződnek (50, 51). A proximális tubuláris sejtek által expresszált TLR-ek aktiválhatják az NFkB jelátviteli rendszert, amely a pro-inflammatórikus citokinek képződéséhez vezet (52). A TLR2 és a TLR4 részt vesz a vese iszkémia-reperfúziós sérülésében és a nefrotoxicitás kialakulásában is (53, 54). A vesesejtek és az aktiválódott immunsejtek folyamatos citokin képzése tovább fokozza a gyulladós folyamatot. A hosszan tartó oxidatív vagy metabolikus stressz a kezdeti gyulladást ördögi körként tovább növeli, ami irreverzibilis intersticiális fibrózishoz, végül a vesefunkció elvesztéséhez vezet (47). Ebben a fázisban molekuláris folyamat az eredeti betegségtől függetlenül, közös utat követ. Ennek a közös útnak a korai jellemzői a tubuláris sérülés mellett a vese stroma fokozott gyulladós sejtes infiltrációja. Ennek a gyulladós körnek a végeredménye az extracelluláris mátrix túltermelése, ami fibrózishoz vezet, átalakítja a vese szerkezetét, és így a szövetek integritása és a vesefunkció fokozatosan elveszik.

5.2. A citokinek szerepe a gyulladós amplifikációs folyamatban

Az immunrendszer fő feladata a szöveti homeosztázis fenntartása, a sérült sejtek felismerése és eltávolítása (55). Hosszantartó gyulladós folyamatokban azonban az immunsejtek hozzájárulnak a fibrózishoz és a tumorok kialakulásához is (56). Génexpresszió-vizsgálattal kimutatták, hogy a CXC családba tartozó citokinek, például

a CXCL1, a CXCL3, a CXCL5, a CXCL6 és a CXCL8, valamint a CSF2, a IL-6, a TGF β és a Chemokin ligand 20 (CCL20) fokozottan kifejeződnek ESRD/ACRD-ben (41). Ezek a citokinek egy sejtfelszíni jelátviteli útvonalat alkotnak az IL-8 receptorokkal, a Chemokin receptor 1 (CXCR1) és a Chemokin receptor 2 (CXCR2) pedig a G-fehérjével aktivált másodlagos hírvivő rendszeren keresztül közvetítik a növekedést stimuláló, angiogenetikus vagy kemotaktikus jeleket a különböző sejteken (57). Immunhisztokémiával kimutatták, hogy a CXCL8 (IL-8) és a CXCR2 receptor ESRD/ACRD vesében az epiteliális és a stróma sejtekben is expresszálódik (41). Az IL-8-nak és receptorának megnövekedett expressziója nem csak a sejtproliferációban, a sejtek migrációjában és a kis erek kialakulásában játszik fontos szerepet, hanem neoplastikus transzformációban is (58).

A legtöbb adat arra utal, hogy az IL-6 kifejeződése az egyik, talán legfontosabb tényező a gyulladással mikrokörnyezet, a szöveti átépülés és tumorok kialakulásában. Immunhisztokémiai módszerekkel már korábban és ebben a tanulmányban is kimutattuk, hogy ESRD/ACRD vesében az IL6-ot miofibroblasztok, proliferáló hámsejtek valamint a cRCC sejteik expresszálják (42). A sérült proximális tubuláris hámsejtekből felszabaduló IL-6 makrofágokat és monocitákat toboroz, amelyek fokozzák az akut fázis fehérjék, mint az LBP és SAA1 szintézisét a strómális sejtekben (59). Az LBP egy CD14 által szabályozott útvonalon keresztül jelet közvetít egy receptor komplexhez, melynek tagja TLR-4, és így pro-inflammatórikus citokinek mint például IL-6 felszabadulását okozza, amely tovább fokozza az LBP szintézist (60,61). Az SAA1 szerepet játszik a gyulladással sejtek kemotaktikus toborzásában és képes aktiválni a TLR4 függő jelátviteli útvonalat (62). Szöveti sérülésben vagy DNP-ban a TLR4 képes felismerni egyes hőszokk-fehérjéket, az extracelluláris mátrix egyes összetevőit, beleértve a fibronektint és a heparin-szulfátot (50, 51, 63). A TLR4

stimulálása az LBP - Cluster of differentiation 14 (CD14) – Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) aktiválásán keresztül elősegíti a pro-inflammatorikus citokinek, a MMP-2 és a béta-integrin NFkB-függő kifejeződését, amelyek mind jelentősek az ESRD/ACRD vese átépülésében és a tartós gyulladással mikrokörnyezet fenntartásában (52, 64).

A TNF α egy másik gyulladással mediátor, amely részt vesz a hosszantartó gyulladással betegségek kialakulásában (65). Az ESRD/ACRD vese hámsejtjeinek alacsony szintű, de hosszán tartó TNF α expressziója növelheti az őssejt-fenotípusú sejtek számát, ezzel elősegítheti a kezdeti daganatos sejtcsoportok kialakítását (66). A TNF α a TNF α / NFkB / Protein kináz B (Akt) / B-cell lymphoma 2 (Bcl2) útvonalon keresztül a sejtek növekedését elősegítő hatással is rendelkezik (67). A TNF α a strómasejtben, fibroblasztokban és makrofágokban valamint a daganatsejtben is kifejeződik, többnyire az IL-6-tal együtt.

5.3. Aktivált miofibroblasztok

A vese strómájának jelentős részét normál fibroblasztok teszik ki, amelyek az extracelluláris mátrix fehérjék előállításával hozzájárulnak a szövetek homeosztázisához (68). A normál vese fibroblasztok a sejtes kapcsolaton keresztül fenntartják a normál szöveti architektúrát és gátolják a daganat kialakulását (69). A normál strómális fibroblasztok gyulladással vagy sebgyógyulás során átmenetileg aktiválódnak, kontraktilissá válnak, ezért a nevük „myofibroblast”. A fibroblasztok aktiválása sebgyógyulás során átmeneti, és a folyamat befejezésével visszaalakulnak normál fibroblasztokká. Hosszán tartó gyulladással során a fibroblasztok tartósan aktiválódnak és az epiteliális sejtekkel való kommunikáción keresztül pro-tumorigén tulajdonságot nyerhetnek (70). Az aktivált fibroblasztok kimutatására valójában nincs

megbízható marker, leginkább az α SMA-t alkalmazzák (71). Az aktivált fibroblasztok kimutatására az ESRD/ACRD vesében mi is az α SMA immunhisztokémiát használtuk. Évekkel ezelőtt a rákot soha nem gyógyuló sebnek (never healing wound) nevezték, ami arra utalt, hogy a rák kialakulásában és progressziójában szerepet játszó molekuláris folyamatok hasonlóak a sebgyógyulás során bekövetkező folyamatokhoz (72). Az aktivált fibroblasztok azonban csak átmenetileg, a gyógyulási folyamat végéig vannak jelen sérülés esetén.

A miofibroblasztok folyamatosan aktiváltak maradnak a rosszindulatú daganatos gyulladással szomszédos strómájában, ami a daganatos progressziót segíti (69). A nem-kissejtes tüdőrákos sejtvonalak különféle fibroblasztokkal történő együttes tenyésztése a CSF2, IL-6, IL-8 és IL-1B, valamint a CXCL1 és CXL6 kemokinek NFkB által irányított expresszióját mutatta (73). Az aktivált miofibroblasztok növekedési faktorok és gyulladással citokinek, mint például az IL-6, TGF β , FGF, HGF révén kommunikálnak a daganatos sejtekkel valamint az ESRD/ACRD vese hámsejtjeivel is (74-76). A daganathoz társuló fibroblasztok az IL-6 expressziójával támogatják epitelsejtek epiteliális mezenhimális átalakulását is az ESRD/ACRD vesékben. Az aktivált fibroblasztok kiválthatják az MMP-k termelését, amelyek elősegítik a tumorsejtek vándorlását, az áttét képzését (64). A miofibroblasztok döntő szerepet játszanak a daganatos progressziójában a Janus kináz 2 (JAK2) – Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) út aktiválásán keresztül (77). Azt is felvetették, hogy a vérből származó fibrociták a TGF β és más citokinek hatására fibroblasztokká differenciálódhatnak, és részt vehetnek a szövetek átalakulásában a sérülés helyén (78,79).

5.4 Oxidatív stressz és genetikai instabilitás

A karcinogenezis egyik gyakori mediátora a gyulladás által kiváltott oxidatív stressz (80, 81). $TNF\alpha$, IL-6 és $TGF\beta$ jelentős szerepet játszik a reaktív oxigén- és nitrogéncsoportok (RONS) képződésében. A RONS mitokondriális és genomikus DNS károsodást okoz, amely szintén fokozhatja a daganatos sejtek kialakulásának a lehetőségét (82, 83). Maga a mitokondrium is a jelentős mennyiségű ROS képzésével az intracelluláris oxidatív stressz forrásának tekinthető (84). A mitokondriális DNS (mtDNS) érzékenyebb a genotoxikus hatásokra, ami a javító mechanizmusok gyenge hatásában és a védő hisztonok hiányában keresendő. Ezért a stressz alatti mutációk száma jelentősen magasabb, mint a nukleáris DNS-ben. A légzési lánc összetevőinek megváltozása az intracelluláris RONS-ek fokozott képződését és felhalmozódását eredményezi, valószínűleg a hibás elektrontranszport lánc okozta elektronszivárgás miatt (85, 86).

A daganatok kialakulásának legkorábbi eseménye az instabilitás következtében kialakult DNS károsodás. Urémiás betegeknél a testvérkromatidok cseréjének gyakoribbá válását, mikronukleoluszok képződését és a DNS-repair mechanizmusok jelentősen csökkent hatékonyságát írták le (87). Az urémiás állapotban jelentkező toxikus hatásoknak figyelemre méltó kóros következményei lehetnek a mitokondriumokra (88). Az mtDNS 4977 bp-os szegmensének deléciója szignifikánsan nagyobb gyakorisággal fordult elő ESRD vesebetegek különböző szöveteiben, mint az életkornak megfelelő kontrollokban várható lett volna (89). Az mtDNS mutációja az ESRD/ACRD-vel összefüggő daganatokban is szignifikánsan magasabb, mint a normál populáció daganataiban (82). A VHL génmutáció előfordulása az ESRD-hez társuló cRCC-ben magasabb (83%) mint az általános populációban előfordulókkal hasonló

típusú daganatokban (55%), ami arra utal, hogy a hipoxémiás stressz és a RONS szerepet játszik a VHL gén mutációjában.

Azonban a normál, fiziológiás RONS szintnek jelentős szerepe van a sejtek működésében és a homeosztázis fenntartásában. Ennek egyik szabályozója a TXNIP/TXN oxido-redukciós rendszer. A TXNIP/TXN kölcsönhatása szabályozza a sejtek közötti ROS képződését a tubuláris oxidatív stressz alatt. A TXNIP/TXN szerepe ESRD/ACRD vesékben még nem ismert. Vizsgálatunk során ESRD/ACRD vesékben jóval magasabb TXNIP mint TXN expressziót találtunk. Ez arra utal, hogy a TXNIP/TXN ROS szabályozó funkciója károsodott. Korábban beszámoltak arról, hogy a DNP-ban szenvedő betegek veséiben szignifikánsan magasabb volt a TXNIP szintje, mint a kontroll vesékben, azonban a TXN expressziója nem különbözött (90). Diabéteszes vesékben a fokozott TXNIP expressziója az extracelluláris mátrix fokozott termelésével jár (90, 91). A TXNIP-hiány véd a DNP kialakulásától (92). TXNIP fokozott kifejeződése a tubuláris autofágia és a mitofágia diszfunkciójához vezet a Mammalian target of rapamycin (mTOR) jelátviteli úton keresztül, míg TXNIP gátlása megfordítja a DNP-ra jellemző túlzott extracelluláris mátrix (ECM) lerakódást (93).

A TXNIP magas expressziója az ESRD/ACRD vesékben valószínűleg megemelkedett ROS-szintet eredményez, ami növeli a gyulladást és az intersticiális fibrózist (94). Az ESRD vesékre jellemző erős artériás és arterioláris szklerózis beszűkült és lassú véráramláshoz vezet, ezzel tovább növeli az oxidatív stresszt. A TXNIP fontos szabályozója a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor 2 receptornak (VEGFR2), az endothel sejtek túlélésének és az angiogenezisnek (95-97). Nemrégiben bebizonyosodott, hogy a TXNIP kulcsfontosságú szerepet játszik a vaszkuláris endoteliális diszfunkcióban és az angiogenezisben a DNP-ban (98). Amint ebben a vizsgálatban kimutattuk, a hialinizált gyulladással stromába ágyazott artériák és endotel

sejtek erős TXNIP expressziót mutattak. A diffúz vagy körülírt kapilláris hálózat endoteliális sejtjei szintén erősen expresszálták a TXNIP fehérjét.

A karcinogenezis, valamint a tumor progressziójának legfontosabb mediátora a gyulladáshoz vezető mikrokörnyezet (99). A redox rendszer egyensúlyának gyulladás által okozott felborulása, az ECM pro-tumorigén átalakítása és a sejtek váratlanul magas osztódása magyarázhatja a ritka daganat típusok kialakulását az ESRD/ACRD vesékben (28, 100). Az ESRD/ACRD vesékben előforduló nagyszámú rákmegelőző léziók jelenléte is erre utal. A prekursor léziók szövettani formája azonos az ugyanabban a vesében a klinikailag felismert daganatok szövettani megjelenésével (42, 101). Egy több intézetet magába foglaló vizsgálatban az ACRD-ben előforduló 66 tumor szinte minden másodikat evRCC-ként diagnosztizáltak, amely kizárólag ACRD-ben keletkezik (22). A TXNIP és a TXN expressziója az evRCC-ben és ezek prekursor elváltozásaiban, ahogy vizsgálataink mutatták, alátámasztja a gyulladáshoz vezető mikrokörnyezet által okozott oxidatív stressz kiemelkedő szerepét.

Oxidatív stressz alatt a TXN fehérje a magba vándorol, és számos jelátvitelt aktivál, amelyek a sejtproliferációban játszanak szerepet. Oxidatív stressz alatt közvetlen kapcsolat van a Mitogen-aktivált protein kináz (ERK1/2 MAP kináz) jelátviteli út aktiválása és a TXN nukleáris transzlokáció között (102). Vizsgálataink során kimutattuk a TXN nukleáris expresszióját az összes evRCC-ben és azok prekursor lézióiban. A TXN nukleáris expressziója ritkán fordult elő azokban a daganatokban, amelyek az általános populációban is előfordulnak, mint a chlRCC, a pRCC és a cRCC. Érdekes módon mind a hat cRCC endoteliális sejtben a TXNIP citoplazmatikus és erős nukleáris expressziója mutatkozott, ami az endotel sejtben jelenlévő oxidatív stresszre utal (103).

A celluláris oxidatív stressz és a citokinek által generált RONS-ok részt vesznek az AKT és ERK1/2 aktiválásával a sejtproliferációban és a túléléshez kapcsolódó szignál útvonalak szabályozásában, valamint a HIF-1 aktiválásában (104, 105). Az ESRD/ACRD vese hipoxémiás állapotának megfelelően leírták a hipoxiával kapcsolatos HIF1 α és HIF2 gének kifejeződését valamint az NF κ B aktiválását (36). A HIF1 α a korábbi experimentális in vitro tanulmányok szerint fontos szerepet játszik a cRCC biológiájában. Vizsgálataink során nem találtunk HIF1 α expressziót az ESRD/ACRD vesékben. A laboratóriumban más szempontból 811 cRCC-ben elvégzett HIF1 α immunhisztokémiai reakció egyetlen tumorban sem mutatott ki expressziót (közlés alatt). Így a korábban közölt irodalmi adatok megkérdőjelezhetőek.

5.5 Extracelluláris mátrix (ECM)

A normál fibroblasztok által termelt ECM molekulák, mint például egyes proteoglikánok, kollagén, fibronectin és laminin332 fontos szerepet játszanak a normál szöveti architektúra fenntartásában. Az aktivált fibroblaszt által kiválasztott fehérjék részt vesznek az ECM átalakításában (106). Az így megváltozott ECM inkább a további szöveti átépülést és tumorok keletkezését segíti, mintsem a normál veseszerkezet fenntartását (107).

Amint ebben a vizsgálatban kimutattuk, a fibronectin jelen van a sejtfelszínen és az ECM-ben az ESRD/ACRD vesében. A fibronectint az aktivált fibroblasztok, a simaizomsejtek és az endotelsejtek szintetizálják. A fibronectinnek különböző szerepe van az embrionális fejlődés során, de még felnőttek normál szöveteiben is. Az embriogenezis során részt vesz a sejtek adhéziójában, a sejtproliferációban és migrációs folyamatokban, felnőtteknél a fibronectin kifejeződését sebgyógyulás és véralvadás során láthatjuk (108). A fibronectin elengedhetetlen az ECM fehérjéinek

összeállításában, beleértve a kollagént, fibrillint, fibrinogént, fibulint, integrint és trombospondint, ezen kívül szerepet játszik az ECM átépülésében (68, 109). A VEGF expressziója az ESRD/ACRD vesében a fibrin és a fibronektin extravazációjához is vezethet, ami az ECM folyamatos átalakulását eredményezi.

A laminin332 mindhárom komponensének (LAMA3, LAMB3 és LAMC2) expresszióját igazoltuk ESRD/ACRD vesékben. Más ECM molekulákkal kölcsönhatásban a laminin332 közvetíti a sejtek kötődését és a migrációját, és ily módon az embrionális fejlődés során a sejtek szerveződését a szövetek kialakulását. Felnőttkorban jelentős szerepe van a regenerációban, tumorok kialakulásában és metasztázis képzésében (110). ESRD vesében a sejtek migrációja elengedhetetlen a normál veseszerkezetének átalakulásához és a daganatok kialakulásához.

Vizsgálatunk során kimutattuk az MMP9 és MMP12 expresszióját az ESRD/ACRD vesében. Az MMP-k alapvető szerepet játszanak az ECM lebontásában és átalakulásában (64). Nemcsak az ECM lebontásában, a normál fiziológiai folyamatokban, az embrionális fejlődésben és a sebgyógyulásban vesznek részt, hanem a szövetek átalakításában és a daganatos sejtek terjedésében is. Az ESRD/ACRD vesékben a karcinogenezis során az egyik első lépés az bazálmembrán lebomlása és az ECM fehérjehálózat proteínázokkal történő átalakítása. Az ECM átrendeződése után megindul az epitheliális sejtek kiszabadulása a normál szöveti kötelékből, ami a tumor keletkezéséhez vezethet (107). A gyulladással járó válasz nagy mennyiségű ROS-t eredményez a makrofágok által, amelyek szintén aktiválhatják az MMP-kat.

5.6. A D-vitamin jelátvitel ESRD vesében és tumorok kialakulásában

A D-vitamin aktív formáinak erős sejtproliferáció és tumornövekedést gátló hatása van (111-113). A D-vitamin hatását a VDR-rel interakcióba lépve, azon keresztül közvetíti. A VDR a szteroid-hormon aktivált nukleáris receptorok egyik tagja (114). A vérben szabadon keringő D-vitamin szintje a vese epiteliális sejtjeiben elhelyezkedő 2 hydroxiláz által szabályozott. A CYP27B1 felelős a biológiailag aktív D-vitamin szintéziséért, míg a CYP24A1 a D-vitamin katabolizmusát közvetíti (115). A CYP24A1-nek van egy úgynevezett vitamin D response element (VDRE) régiója a promoter régióban, amelyen keresztül a CYP24A1 erősen indukálható D-vitaminnal. A folyamat lényege, hogy megvédje a sejtet a D-vitamin intoxikációtól (116). A keringő D-vitamin szintje általában alacsonyabb CKD-ben és ACRD-ben, mint a normál populációban. A csökkent CYP27B1 és megnövekedett CYP24A1 expressziója tumorsejtekben azt sugallja, hogy a D-vitaminnak kulcsfontosságú szerepe lehet a karcinogenezisben (117-119). Adataink azt mutatják, hogy a D-vitamin már feltételezhetően az anyai D-vitamin kötő fehérjéből szintetizálódik a magzati vese disztális tubulusaiban már a terhesség 10. hetétől, és a nefrogén zónában lévő VDR-hez kötődve a célgén expresszióját indukálja és szabályozza a magzati nefron fejlődését. Felnőtt vesében a VDR a nefron összes sejtjében expresszálódik, míg a CYP27B1 és a CYP24A1 expressziója a disztális tubulusokra korlátozódik. A három gén összehangolt működése fiziológiai koncentrációban tartja a keringő D-vitamin szintjét és szabályozza a homeosztázist.

ESRD/ACRD vesében egy fokozódó gyulladással és fibrotikus mikrokörnyezettel és az ebbe ágyazott szerkezetileg és működésében megváltozott nefron váltja fel az ép tubulusokat. A fennmaradó néhány ismeretlen eredetű hámsejt a normál vese hámsejtjeinek körülbelül 5-10%-át teszi ki. Ezen sejthalmazok között jelentősen

csökkent CYP27B1, VDR és CYP24A1 expressziót mutató sejtek száma (1-5%), amelyek normál veséhez képest igen jelentős csökkenés, figyelembe véve az egészséges vesében a VDR esetén 100%-os, míg CYP27B1 esetén 40-50%-os pozitivitását. Ezek a megfigyelések magyarázhatják a keringő D-vitamin rendkívül alacsony szintjét ESRD/ACRD-ben szenvedő betegeknél.

A D-vitamin aktív formáinak erős tumorelles hatása van a rákmegelőző és a rákos elváltozásokban (111-113). Számos tanulmány kimutatta a csökkent CYP27B1-szintet és a megnövekedett CYP24A1-expressziót az emlő, a vastagbél és a prosztaták sejtvonalában, ami utal a diszfunkcionális D-vitamin metabolizmus és a karcinogenezis összefüggésére (117-119). A D-vitamin hatását a VDR-vel való kapcsolódása révén fejti ki. Ebben a tanulmányban bemutattuk, hogy az ESRD/ACRD-ben előforduló cRCC, világossejtes pRCC, pRCC és ezek prekursor elváltozásai nem expresszálják a VDR-t vagy a CYP27B1-et, ami arra utalhat, hogy a tumorsejtek megszabadultak a D-vitamin proliferációt kontrolláló hatásától. Ezzel szemben az evRCC és annak prekursor elváltozásai VDR-t, CYP27B1-t és ugyan kisebb mértékben CYP24A1-t is expresszáltak. A chlRCC-szerű daganatok és azok prekursor elváltozásai szintén a VDR és a CYP27B1 erős, valamint a CYP24A1 gyenge expresszióját mutatták. Figyelemre méltó, hogy az evRCC és a chlRCC-szerű daganat kizárólag az ESRD/ACRD-hez asszociáltan fordul elő, míg a cRCC és a pRCC az általános populációban alakul ki. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a különböző ásványi anyagok homeosztázisa mellett a D-vitaminnak más biológiai funkciója is lehet. A D-vitamin kulcsfontosságú szerepet játszik a differenciálódott sejtek status quo fenntartásában azáltal, hogy szabályozza a sejtproliferációt, az apoptózist, az angiogenezist, az inváziót és a metasztatizálást (120-122). A D-vitamin biológiailag aktív metabolitjai egyes sejtekben, szövetekben és rákos sejtekben erős anti-proliferatív, pro-differenciálódási és pro-

apoptotikus hatásokat fejthet ki (123, 124). A normális D-vitamin szint csökkenti a vese-, vastagbél-, emlő-, tüdő- és hólyag-, valamint a prosztaták kialakulásának kockázatát (125-127). A D-vitamin hatását a VDR-vel való interakció révén hajtja végre (123). A D-vitamin/VDR-komplex gátolja a sejtproliferációt azáltal, hogy VDRE promoter régió keresztül up-regulálja a ciklin-függő kináz inhibitorokat, a p21-et és p27-et (128). A VDR a sejtek vándorlását és invázióját is szabályozza azáltal, hogy gátolja a Wingless and Int-1 (Wnt)/ β -catenin jelátviteli utat és növeli az E-kadherin expresszióját (129). A VDR pro-apoptotikus szerepet játszik azáltal, hogy gátolja a Bcl-2 és B-cell lymphoma extra large (Bcl-XL) anti-apoptotikus fehérjék expresszióját (130).

Nemrégiben bebizonyosodott, hogy a VDR aktivációja gátolja az RCC sejtvonalak proliferációját és metasztatikus potenciálját a Transient receptor potential cation channel subfamily V (TRPV5) epitheliális Ca^+ csatorna szabályozásán keresztül (131). A D-vitamin gátolja az emberi veserák sejtjeinek növekedését és a VDR-vel való kölcsönhatás révén gátolja a tumor növekedését (132, 133). Továbbá, a D-vitamin védőhatásának hiánya növeli a vesetumor kialakulásának kockázatát (134). Ebben a munkában kimutattuk, hogy a CYP27B1, valamint a D-vitamin expressziója lényegesen alulszabályozott az ESRD/ACRD vesékben. Saját és irodalmi adatok a D-vitamin összetett szerepére utalnak, amely egy adott szövetre vagy annak tumorára jellemzőek.

5.7 Epiteliális sejtek plaszticitása, az epitheliális-mesenhimális tranzíció (EMT)

Az ESRD/ACRD vese nefronjának sejtjei fokozatosan elveszítik normális működésüket, felfüggesztik a terminális differenciálódás programját, és extrém szerkezeti átalakuláson mennek keresztül. Normál állapotban a vese tubuláris sejtjei KRT8-at és KRT18-at expresszálnak, hogy fenntartsák szerkezeti integritásukat és stabilitásukat. Az ESRD/ACRD vesében fellépő gyulladás hatására a hámsejtek a

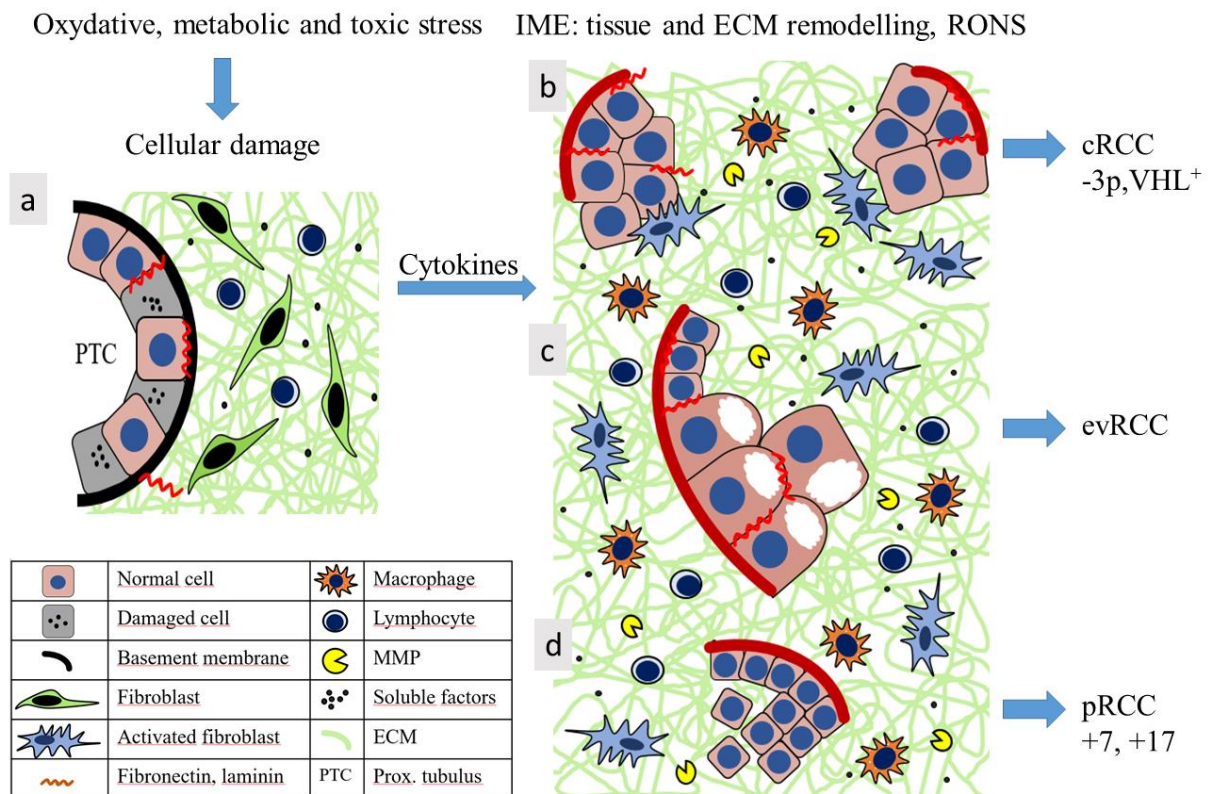
keratin expressziójukat KRT7 és KRT19 irányába tolják el, ami lehetővé teszi alakjuk megváltoztatását és a tumorgenezishez szükséges plaszticitásuk növelését (135). A KRT7 és a KRT19 együttes expressziója proliferatív cisztákban, pre-neoplasztikus elváltozásokban és daganatokban fordul elő, ami erősen utal ezen elváltozások hasonló eredetére. Nemrégiben kimutatták veseelégtelenségek kísérleti modelljeiben, hogy az IL-6, a TNF α expressziója az NF κ B út aktiválásával a citokeratin upregulációjához vezet (136). Amint ebben a tanulmányban kimutattuk, az aktivált fibroblasztok nagy mennyiségű IL-6-ot termelnek, ami megmagyarázhatja a KRT7 és KRT19 fokozott kifejeződését. A gyulladós mikrokörnyezet szintén hozzájárulhat az epiteliális mesenchymalis átmenethez (EMT) a remodeláció során. A sejtek integritásának fenntartásában részt vevő struktúrák elvesznek és megtörténik a citoskeleton újjászerveződése. A fibroblaszt markerek, köztük az α SMA, a fibronectin és a MMP-k is expresszálódnak az EMT során, amelyeket pro-inflammatorikus citokinek, TNF α és TGF β aktiválnak (137, 138). Az IL-6 elősegíti az NF κ B aktiválódását, amely szabályozza az EMT-ben részt vevő transzkripciós faktorok expresszióját (139). A hámsejtek plaszticitása, citoskeletonjuk újjászerveződése szintén fontos lépés az ESRD/ACRD vese átalakításában és a tumorok kialakulásában.

5.8. ESRD vese és fokozott tumorgenezis

Az ESRD vese szöveti képét az idült gyulladós mikrokörnyezet dominálja, amelybe vagy cisztikusan átalakult vagy teljesen rendezetlen sejtcsoportokba tömörült epiteliális sejtek találhatóak. A gyulladós mikrokörnyezetet jelentős részét az ECM és az ebben oldott növekedési faktorok, citokinek és proteinázok teszik ki. A gyulladós mikrokörnyezetben számos sejt elem fordul elő, mint aktivált fibroblasztok, immunsejtek, makrofágok, limfociták. A proliferáló endotelialis sejtek és periciták

szintén a mikrokörnyezet részét képezik. Ezek a mezenhimális sejtek szoros kölcsönhatásban vannak az epiteliális sejtekkel (57). A citokinek folyamatos expressziója, az aktivált fibroblasztok állandó jelenléte, az ebből, valamint a beszűkült vérellátásból adódó oxidatív és metabolikus stressz és ennek következtében kialakult genetikai instabilitás jelentős szerepet játszik a vesetumorok kialakulásában. Ehhez járul az a tény, hogy maguk az epiteliális sejtek is jelentős átalakuláson mennek keresztül, mert működés hiányában átalakítják citoskeleton profiljukat és plasztikusabbá válnak. Ilyen körülmények között, a fokozott citokin és növekedési faktor termelése mellett nem váratlan az a megfigyelés, hogy az ESRD vese nem egy nyugvó, hanem egy jelentős sejtproliferációt mutató szerv (140).

Ha figyelembe vesszük a részletes szövettani és immunhisztokémiai elemzést és a génexpressziós ujjlenyomatból származó adatokat, a következő fejlődési utak rajzolódnak ki az ESRD/ACRD-ben kiinduló tumorok típusokra (14. Ábra).



14. Ábra. A végstádiumú vese és a különböző tumorok kialakulásának a feltételezett patomechanizmusa.

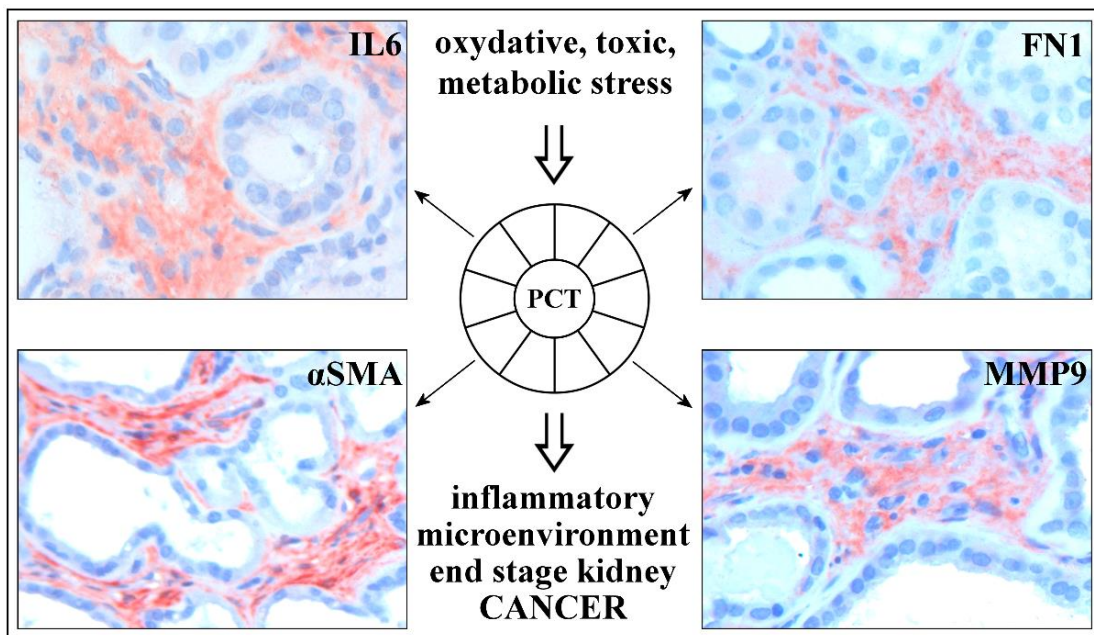
Konvencionális veserák (cRCC). A fibrotikus gyulladással járó vese stromájában egy-két hámsejt vagy lazán összefüggő epitel sejtcsoportok fordulnak elő, amelyek valószínűleg a proximális tubulusok gyulladással, nekrotikus destrukciója után visszamaradt sejteknek felelnek meg. Ezeket a sejtcsoportokat nem veszi körül fénymikroszkópos szinten felismerhető bazális membrán. Véleményünk szerint ezek a sejtek képezik a cRCC potenciális kiindulási alapját. A cRCC 95%-ára az egyik kromoszóma 3-as rövid karjának vesztesége és mintegy 60%-ban a Von Hippel-Lindau (VHL) gén mutációja jellemző. Előzetes vizsgálatból tudjuk, hogy normál felnőtt vesében az embrionális fejlődés során történő fokozott mitotikus aktivitás miatt a 3p kromoszóma régió elvesztése, a VHL gén egy példányával nem ritka jelenség, így az ESRD vesében előforduló rendezetlen sejtcsoportok egy-egy sejtjében a kromoszóma 3p hiány előfordulása várható (141). A RONS magas koncentrációja VHL és/vagy Permeable reactive barrier myc box 1 (PRMB1) gének mutációját okozhatja. Amennyiben VHL mutáció egy kromoszóma-változást hordozó sejtben történik és ez a sejt a mikrokozonyezetben lévő fokozottan kifejeződő növekedési faktorok hatására proliferálni kezd, tumor alakulhat ki. Érdekes módon, az általános populációban (a VHL szindróma kivételével) nem mutattak ki prekursor elváltozásokat, de ESRD/ACRD vesékben, átlagban 3-4 mikroszkópos méretű világossejtes elváltozást fordul elő (42). Az a lelet is azt erősíti, hogy míg az átlag populációban a proximális tubulus sejtjei normál mikrokozonyezetben vannak, addig az ESRD vesében a bazális membrán nélküli sejtcsoportok egy pro-tumorigén mikrokozonyezetbe ágyazottak.

Az eosinofil vakuolizált vesetumor (evRCC) szinte kizárólag csak végstádiumú, ACRD vesékben fordul elő. Egy nagy, több intézményt lefedő vizsgálatban ACRD vesékben szinte minden második daganatot evRCC-ként diagnosztizáltak. Az evRCC előfordulása számos pre-neoplasztikus elváltozáshoz kapcsolódik, amelyek hasonló szövettani mintát mutatnak. Kisebb vagy nagyobb ciszták, nagy eozinofil vakuolizált sejtekkel bélelve kizárólag ACRD vesékben láthatók. Néhány cisztában átmenetet figyeltünk meg a kis köbsejtekből a nagy eozinofil vakuolizált sejtek felé. Véleményünk szerint az evRCC ACRD vesékben előforduló hasonló cisztákból származik.

Papilláris vesetumor (pRCC). Jelenleg is vita folyik a pRCC-k eredetéről a normál populációban, valamint az ESRD/ACRD vesében. Több mint 25 évvel ezelőtt azt javasolták, hogy a pRCC az élet folyamán fennmaradó, nem teljesen differenciált embrionális sejtekből származik (142). Ezt az elméletet erősíti, hogy minden normál populációban kialakuló pRCC átlagosan 42 nefrogén rest-szerű léziót hordoz és átlagosan 13 nefrogén rest-szerű lézió társul az ESRD/ACRD vesékben megfigyelt pRCC esetében (42, 143). A kis papilláris elváltozások/adenomák gyakoriságát az általános populációban Aritz már 1944-ben dokumentálta (144). Azt is javasolta, hogy az adenoma az embrionális vese differenciálódásának zavara miatt alakul ki, és a vese szklerózisa csak ezen elváltozások számát és nagyságát növeli. Az adatok alapján elmondható, hogy a szklerotikus ESRD vesében kimutatott papilláris elváltozások olyan embrionális nyugvó sejtekből alakulnak ki, amelyek az erős gyulladási mikrokörnyezet tumorigén hatására kezdtek növekedni. Az ESRD/ACRD vesékben előforduló pRCC-k túlnyomó többségének genetikai változásai hasonlóak az általános populációban az ESRD/ACRD-vel nem összefüggő pRCC-kben megfigyelttekhez.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálatunk az ESRD/ACRD kialakulásához vezető patomechanizmus jobb megértését célozta. A vese teljes szerkezeti átépüléséhez és így a vese működés beszűküléséhez illetve teljes megszűnéséhez vezető irreverzibilis gyulladással rendelkező mikrokörnyezet patomechanizmusát vizsgáltuk immunhisztológiával (15. Ábra).



15. Ábra. A végstadiumú vesében előforduló változások és tumorgenezis rövid összefoglalása.

a, A proximális tubulusok bármilyen okból, oxidatív, toxikus vagy metabolikus stressz miatt bekövetkezett károsodása elindít egy visszafordíthatatlan folyamatot, amelynek során kialakul egy gyulladással rendelkező mikrokörnyezet.

b, Ennek fenntartásában jelentős szerepe van az IL-6 folyamatos kifejeződésének, de más citokinek, mint az IL-8, CSF2 és TGFB is részt vesznek a gyulladáso mikrokörnyezet fenntartásában és az ECM átalakításában.

c, Az ECM celluláris komponensét nagy részben aktivált fibroblasztok és immunsejtek teszik ki. Az α SMA pozitív aktivált fibroblasztoknak fontos szerepe van az ECM fibrilláris részének képzésében és az epiteliális sejtekkel való állandó kommunikációban.

d, Az α SMA pozitív miofibroblasztok jelentős mennyiségű FN1-t termelnek. A fibronektin elengedhetetlen az ECM fibrilláris fehérje hálózatának összeállításában, beleértve a kollagént, fibrillint, fibrinogént, fibulint, integrint és trombospandint. Az aktivált fibroblasztok jelentős szerepet játszanak az ECM pro-tumorigén átalakításában is.

e, A MMP-ok mint az MMP9 és MMP12 kifejeződés jelentős szerepet játszik az ESRD/ACRD vesék átépülésében, a proliferáló epiteliális sejtek körüli ECM lebontásában és egyúttal a tumorok kialakulásában.

f, A fibrotikusan átépült vese és a benne fennmaradó hámsejtek CYP27B1 és VDR expressziójának jelentős csökkenése és így a D-vitamin protektív hatásának kiiktatása szintén hozzájárul a daganatok kialakulásához

g, A TXN/TXNIP redox rendszer károsodása összefügg az ESRD/ACRD vesében kialakult gyulladáso mikrokörnyezettel. A TXN/TXNIP megváltozott kifejeződése az

ESRD/ACRD-hez társuló evRCC-ban és ezek prekursor lézióiban az oxidatív-reduktív rendszer elváltozás oki szerepére utal.

A gyulladás és a daganatos megbetegés fokozott kockázata közötti összefüggés az utóbbi időben jól dokumentált. Például vírusos hepatitis és a májrák, a *Helicobacter pylori* fertőzés és gyomorrák, a schistosomiasis és a húgyhólyag láphámrákja, vagy a humán papilloma vírus és a méhnyakrák kialakulása közötti kapcsolat ismert (145). Korábbi és jelen vizsgálataink alapján úgy véljük, hogy ezekhez a példákhoz hozzáadhatjuk az ESRD/ARCD-ben előforduló gyulladáshoz mikrokörnyezet és a hozzá kapcsolódó gyakori daganatos megbetegedés közötti összefüggést. A tumor tulajdonképpen egy soha nem gyógyuló sebnek tekinthető. Az ESRD/ACRD vesében megfigyelt irreverzibilis, progresszív gyulladáshoz és fibrotikus folyamatot is egy soha nem gyógyuló sebnek felel meg, amely végül egy másik soha nem gyógyuló seb, egy daganat kialakulásához vezethet.

7. Irodalomjegyzék

1. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395:709-33
2. Zhang QL, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health*. 2008;8:117.
3. Benjamin O, Lappin SL. End-Stage Renal Disease. *StatPearls*. 2020 Jan-
4. Bommer J. Prevalence and socio-economic aspects of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;Suppl 11:8-12.
5. Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, Brown G. End-stage renal disease: global demographics in 2005 and observed trends. *Artif Organs*. 2006;30:895-897.
6. US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD.
7. Heptinstall RH. Pathology of end-stage kidney disease. *Am J Med*. 1968; 44:656-663.
8. Dunnill MS, Millard PR, Oliver D. Acquired cystic disease of the kidneys: a hazard of long-term intermittent maintenance haemodialysis. *J Clin Pathol*. 1977;30:868-877.
9. Hammes MS, Lieske JC, Pawar S, Spargo BH, Toback FG. Calcium oxalate monohydrate crystals stimulate gene expression in renal epithelial cells. *Kidney Int*. 1995;48:501-509
10. Hughson MD, Buchwald D, Fox M. Renal neoplasia and acquired cystic disease in patients receiving long-term dialysis. *Arch Pathol Lab Med*. 1986; 110: 592-601.
11. McManus JF, Hughson MD, Fitts CT, Williams AV. Studies on end-stage kidneys. I. Nodule formation in intrarenal arteries and arterioles. *Lab Invest*. 1977;37:339-349.
12. McManus JF, Hughson MD, Hennigar GR et al. Dialysis enhances renal epithelial proliferations. *Arch Pathol Lab Med*. 1980;104:192-195
13. McManus JF, Hughson MD. New therapies and new pathologies: end-stage--dialysis kidneys. *Arch Pathol Lab Med*. 1979;103:53-57.
14. Matson MA, Cohen EP. Acquired cystic kidney disease: occurrence, prevalence, and renal cancers. *Medicine*. (Baltimore) 1990;69:217-226.
15. Doublet JD, Peraldi MN, Gattengo B, Thibault P, Sraer JD. Renal cell carcinoma of native kidneys: prospective study of 129 renal transplant patients. *J Urol*. 1997; 158: 42-44.
16. Seidman H, Silverberg BS, Bodden A. Probabilities of eventually developing and dying of cancer (risk among persons previously undiagnosed with the cancer). *CA Cancer J Clin*. 1978; 28: 33-46.
17. Ishikawa I. Renal cell carcinomas in patients on long-term hemodialysis. *Contrib Nephrol*. 1999;128:28-44.

18. Kojima Y, Takahara S, Miyake O, Nonomura N, Morimoto A, Mori H. Renal cell carcinoma in dialysis patients: a single center experience. *Int J Urol.* 2006;13:1045-1048.
19. Ishikawa I, Kovacs G. High incidence of papillary renal cell tumors in patients on chronic haemodialysis. *Histopathology.* 1993;22:135-139.
20. Chudek J, Herbers J, Wilhelm M et al. The genetics and morphology of renal cell tumors in end-stage renal failure may differ from those occurring in the general population. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:1045-1051
21. Sule N, Yakupoglu U, Shen SS et al. Calcium oxalate deposition in renal cell carcinoma associated with acquired cystic kidney disease: a comprehensive study. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:443-451
22. Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Harik LR et al. Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:141-153.
23. Hughson MD, Hennigar GR, McManus JF. Atypical cysts, acquired renal cystic disease, and renal cell tumors in end stage dialysis kidneys. *Lab Invest.* 1980;42:475-480.
24. Pan CC, Chen YJ, Chang LC, Chang YH, Ho DM. Immunohistochemical and molecular genetic profiling of acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma. *Histopathology.* 2009;55:145-153.
25. Kuntz E, Yusenkov MV, Nagy A, Kovacs G. Oligoarray-CGH of renal cell tumors developed in patients with acquired cystic renal disease. *Hum Pathol.* 2011;41:1345-1349.
26. Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T et al. Genomic profiling of renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease. *Cancer Sci.* 2012;103:569-576.
27. Kovacs G. High frequency of papillary renal-cell tumours in end-stage kidneys--is there a molecular genetic explanation? *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10:593-596.
28. Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson DL, Silva FG. Tubular atrophy in the end-stage kidney: a lectin and immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1994; 25:22-28.
29. Truong LD, Choi YJ, Shen SS et al. Renal cystic neoplasms and renal neoplasms associated with cystic renal diseases: pathogenetic and molecular links. *Adv Anat Pathol.* 2003;10:135-159.
30. Deck MA, Verani R, Silva FG, Davis LD, Cohen AH. Histogenesis of renal cysts in end-stage renal disease (acquired cystic kidney disease): an immunohistochemical and lectin study. *Surg Pathol.* 1988;1:391-406.
31. Cengiz K, Block AW, Hossfeld DK, Anthonie R, Anthonie S, Sandberg AA. Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988;36:55-67.
32. Malachi T, Zevin D, Gafter U, Chagnac A, Slor H, Levi J. DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients. *Kidney Int.* 1993;44:385-389.

33. Nagy A, Wilhelm M, Kovacs G. Mutations of mtDNA in renal cell tumours arising in end-stage renal disease. *J Pathol.* 2003;199:237-242.
34. Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA et al. Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS One.* 2008;3:e2842.
35. Konda R, Sato H, Hatafuku F, Nozawa T, Ioritani N, Fujioka T. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in acquired renal cystic disease associated with renal cell carcinoma. *J Urol.* 2004; 171:2166-2170.
36. Konda R, Sugimura J, Sohma F, Katagiri T, Nakamura Y, Fujioka T: Over expression of hypoxia-inducible protein 2, hypoxia-inducible factor-1a and nuclear factor kB is putatively involved in acquired renal cyst formation and subsequent tumor transformation in patients with end stage renal failure. *J Urol.* 2008; 180:481-485.
37. Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM, Boland CR Oxydative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283:C148-154.
38. Jaiswal M, LaRuso NF, Burgart LJ, Gores GJ Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2000; 60:184-190.
39. Jung SN, Yang WK, Kim J, Kim HS, Kim EJ, Yun H, Park H, Kim SS, Choe W, Kang I, Ha J Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008; 29:713-721.
40. Yano, T.; Ito, F.; Kobayashi, K.; Yonezawa, Y.; Suzuki, K.; Asano, R.; Hagiwara, K.; Nakazawa, H.; Toma, H.; Yamasaki, H. Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients. *Cancer Letters.* 2004; 208:137-142.
41. Nagy A, Walter E, Zubakov D, Kovacs G: High risk of development of renal cell tumor in end stage kidney disease: the role of microenvironment. *Tumor Biol.* 2016; 37:9511-9519.
42. Peterfi L, Yusenkov MV, Kovacs G: IL6 shapes an inflammatory microenvironment and triggers the development of unique types of Cancer in end-stage kidney. *Anticancer Res.* 2019, 39:1869-1874.
43. Ito, F.; Nakazawa, H.; Ryoji, O.; Okuda, H.; Toma, H. Cytokines accumulated in acquired renal cysts in long-term hemodialysis patients. *Urol Int.* 2000, 65:21-27.
44. Mudaliar, H.; Pollock, C.; Komala, M.G.; Chadban, S.; Wu, H.; Panchapakesan, U. The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013; 305:F143-F154.
45. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Störkel S, van den Berg E, Zbar B The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol.* 1997; 183:131-133.
46. Lindgren, D.; Boström, A.K.; Nilsson, K.; Hansson, J.; Sjölund, J.; Möller, C.; Jirström, K.; Nilsson, E.; Landberg, G.; Axelson, H.; Johansson, M.E. Isolation and

- characterisation of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am J Pathol.* 2011; 178:828-837.
47. Daha, M.R.; van Kooten, C. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15:41-43.
 48. Jevnikar, A.M.; Brennan, D.C.; Singer, G.G.; Heng, J.E.; Maslinski, W.; Wuthrich, R.P.; Glimcher, L.H.; Kelley, V.E. Stimulated kidney tubular epithelial cells express membran associated and secreted TNF- α . *Kidney Int.* 1991; 40:203-211.
 49. Yard, B.A.; Daha, M.R.; Kooymans-Couthino, M.; Bruijn, J.A.; Paape, M.E.; Schrama, E.; van Es, L.A.; van der Woude, F.J. IL-1 α stimulated TNF- α production in culture human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1992; 42:383-389.
 50. Panchapakesan, U.; Sumual, S.; Pollock, C.A.; Chen, X. PPAR γ agonists exert antifibrotic effects in renal tubular cells exposed to high glucose. *Am J Physiol. Renal Physiol.* 2005; 289:F1153-F1156.
 51. Qi, W.; Chen, X.; Gilbert, R.E.; Zhang, Y.; Waltham, M.; Schache, M.; Kelly, D.J.; Pollock, C.A. High glucose-induced thioredoxin-interacting protein in renal proximal tubule cells is independent of transforming growth factor- β 1. *Am J Pathol.* 2007; 171:744-754
 52. Gluba, A.; Banach, M.; Hannam, S.; Mikhailidis, D.P.; Sakowicz, A.; Rysz, J. The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2010; 6:224-235.
 53. Pulskens, W.P.; Teske, G.J.; Butter, L.M.; Roelofs, J.J.; van der Poll, T.; Florquin, S.; Leemans, J.C. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS ONE.* 2008; 3:e3596.
 54. Zhang, B.; Ramesh, G.; Uematsu, S.; Akira, S.; Reeves, W.B. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19:923-932.
 55. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.
 56. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell.* 2010; 140:883-899
 57. Balkwill, F.R.; Capaso, M.; Hagemann, T. Tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012; 125:5591-5596.
 58. Ning, Y.; Nanegold, P.C.; Hong, Y.K.; Zhang, W.; Pohl, A.; Lurje, G.; Winder, T.; Yang, D.; LaBonte, M.J.; Wilson, P.M.; Ladner, R.D.; Lenz, H.J. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer.* 2011; 128:2038-2049.
 59. Schumann, R.R.; Kirschning, C.J.; Unbehauen, A.; Aberle, H.P.; Knope, H.P.; Lamping, N.; Ulevitch, R.J.; Herrmann, F. 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.
 60. Faure, E.; Equils, O.; Sieling, P.A. Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B 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.

61. Harmey, J.H.; Bucana, C.D.; Lu, W.; Byrne, A.M.; McDonnell, S.; Lynch, C.; Bouchier-Hayes, D.; Dong, Z. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer*. 2002; 101:415-422.
62. Cheng, N.; He, R.; Tian, J.; Ye, P.P.; Ye, R.D. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute phase serum amyloid A. *J Immunol*. 2008; 181:22-26.
63. Akira, S.; Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011; 4:499-511.
64. Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010; 141:161-174.
65. Popa, C.; Netea, M.G.; van Riel, P.L.C.M.; van der Meer, J.W.M.; Stalenhoef, A.F.H. The roles of TNF α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res*. 2007; 48:751-762.
66. Lee, S.H.; Hong, H.S.; Liu, Z.X.; Kim, R.H.; Kang, M.K.; Park, N.H.; Shin, K.H. TNF α enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 activation in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 424:58-64.
67. Zhu, G.; Du, Q.; Wang, X.; Tang, N.; Hse, F.; Chen, Y. TNF- α promotes gallbladder cancer cell growth and invasion through autocrine mechanisms. *Int J Mol Med*. 2014; 33:1431-1440.
68. Tracy, L.E.; Minasian, R.A.; Caterson, E.J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv Wound Care*. 2016; 5:119-136.
69. Alkasalias, T.; Moyano-Galceran, L.; Arenian-Hendrickson, M.; Lehti, K. Fibroblasts in the tumor microenvironment: shield or spear? *Int J Mol Sci*. 2018; 19:1532.
70. Wang, M.; Zhao, J.; Zhang, L.; Wei, F.; Lian, Y.; Wu, Y.; Gong, Z.; Zhand, S.; Zhou, J.; Cao, K. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*. 2017; 8:761-773.
71. Huang, J.; Li, Z.; Ding, Z.; Luo, Q.; Lu, S. Different roles of myofibroblasts in the tumorigenesis of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol*. 2016; 37:15525-15534.
72. Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. *N Engl J Med*. 1986; 315:1650-1659.
73. Rudisch, A.; Dewhurst, M.R.; Horga, L.G.; Kramer, N.; Harrer, N.; Dong, M.; van der Kuip, H.; Wernitznig, A.; Bernthaler, A.; Dolznig, H. et al. High EMT signature of invasive non-small cell lung cancer (NSCLC) cells correlates with the NF- κ B driven colony-stimulating factor 2 (CSF2/GM-CSF) secretion by neighboring stromal fibroblasts. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0124283.
74. Kalluri, R.; Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews cancer*. 2006; 6:392-401.
75. Cirri, P.; Chiarugi, P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*. 2011; 1:482-497.
76. Wu, X.; Chen, X.; Zhou, Q.; Li, P.; Yu, B.; Li, J.; Qu, Y.; Yan, J.; Yu, Y.; Yan, M. et al. Hepatocyte growth factor activates tumor stromal fibroblast to promote tumorigenesis in gastric cancer. *Cancer Letters*. 2013; 335:128-135.

77. Wu, X.; Tao, P.; Zou, Q.; Li, J.; Yu, Z.; Wang, X.; Li, J.; Li, C.; Yan, M.; Zhu, Z. et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017; 8:20741-20750.
78. Abe, R.; Donnelly, S.C.; Peng, T.; Bucala, R.; Metz, C.N. Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*. 2001; 166:7556–7562.
79. Saijo, A.; Goto, H.; Nakano, M.; Mitsuhashi, A.; Aono, Y.; Hanibuchi, M.; Ogawa, H.; Uehara, H.; Kondo, K.; Nishioka, Y. Bone marrow-derived fibrocytes promote stem cell-like properties of lung cancer cells. *Cancer Lett*. 2018; 421:17–27.
80. Chang, C.L.; Marra, G.; Chauhan, D.P.; Ha, H.T.; Chang, D.K.; Ricciardiello, L.; Randolph, A.; Carethers, J.M.; Boland, C.R. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2002; 283:C148-154.
81. Jaiswal, M.; LaRuso, N.F.; Burgart, L.J.; Gores, G.J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2000; 60:184-190.
82. Nagy, A.; Wilhelm, M.; Kovacs, G. Mutations of mtDNA in renal cell tumours arising in end-stage renal disease. *J Pathol*. 2003; 199:237-242.
83. Rogowski, V.S. The linkage between inflammation and immune tolerance: interfering with inflammation in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2017; 17:325-332.
84. Birch-Machin, M.A. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clin Exp Dermatol*. 2006; 31:548-552.
85. Wei, Y.H.; Lee, H.C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med*. 2002; 227:671-682.
86. Bertram, C.; Hass, R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem*. 2008; 389:211-220.
87. Buemi, M.; Floccari, F.; Costa, C.; Coppolino, G.; Campo, S.; Bolignano, D.; Sturiale, A.; Lacquaniti, A.; Buemi, A.; Loddo, S.; Teti, D. Dialysis-related genotoxicity: sister chromatid exchanges and DNA lesions in T and B lymphocytes of uremic patients. *Genomic damage in patients on hemodiafiltration. Blood Purif*. 2006; 24:569-574.
88. Rao, M.; Li, L.; Demello, C.; Guo, D.; Jaber, B.L.; Pereira, B.J.; Balakrishnan, V.S.; HEMO Study Group. Mitochondrial DNA injury and mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:189-196.
89. Rossato, L.B.; Nunes, A.C.; Pereira, M.L.; de Souza, C.F.; Dummer, C.; Milani, V.; Porsch, D.B.; de Mattos, C.B.; Barros, E.J. Prevalence of 4977bp deletion in mitochondrial DNA from patients with chronic kidney disease receiving conservative treatment or hemodialysis in southern Brazil *Ren Fail*. 2008; 30:9-14.
90. Advani A, Gilbert RE, Ki KT, Gow RM, Langham RG, Alison J, Cox AJ, Connelly KA, Zhang Y, Herzenberg AM, Christensen PK, Pollock CA, Qi W, Tan SM, Parving HH, Kelly DJ Expression, localisation and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:730-741.

91. Chaudhary K, Phadke G, Nistala R, Weidmeier CE, McFairlane SI, Whaley-Connell A The emerging role of biomarkers in diabetic and hypertensive chronic kidney disease. *Curr Diab Rep.* 2010; 10:37–42.
92. Shah A, Xia L, Masson EAY, Gui C, Momen A, Shikutani EA, Husain M, Quaggin S, John R, Fantus IG Thioredoxin-interacting protein deficiency protects against diabetic nephropathy *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26:2963-2977.
93. Huang C, Zhang Y, Kelly DJ, Tan CYR, Gill A, Cheng D, Braet F, Park JS, Sue CM, Pollock CA, Chen XM Thioredoxin interacting protein (TXNIP) regulates tubular autophagy and mitophagy in diabetic nephropathy through the mTOR signalling pathway. *Scientific Reports.* 2016; 6:29196.
94. Wei J, Shi, Y, Hou Y, Ren Y, Du C, Zhang L, Li Y, Duan H Knockdown of thioredoxin interacting protein ameliorates high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Cellular Signalling.* 2013; 25:2788-2796.
95. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeozzi T Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem.* 2002; 277:31013108.
96. Abdelsaid M, Matragon S, El-Remessy AB Thioredoxin-interacting protein expression is required for VEGF-mediated angiogenic signal in endothelial cells. *Antioxidants Redox Signaling.* 2013; 19:18.
97. Park SY, Shi X, Pang J, Yan C, Berk BC Thioredoxin-interacting protein mediated sustained VEGFR2 signaling in endothelial cells required for angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33:737-743.
98. Li X, Kover KL, Heruth DP, Watkins DJ, Guo Y, Moore WV, He LG, Zang M, Clements MA, Yan Y Thioredoxin-interacting protein promotes high-glucose-induced macrovascular endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 493:291297.
99. Balkwill FR, Capaso M, Hagemann T Tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012; 125:5591-5596.
100. Bertram C, Hass R Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem.* 2008; 389:211-220.
101. Sarlos DP, Peterfi L, Szanto A, Kovacs G: Shift of keratin expression profile in end stage kidney increases the risk of tumor development. *Anticancer Res.* 2018; 38:5217-5222.
102. Ogata FT, Batista WL, Sartori A, Gesteira TF, Masutani H, Arai RJ, Yodoi J, Stern A, Monteiro HP Nitrosative/oxidative stress conditions regulate thioredoxin-interacting protein (TXNIP) expression and thioredoxin-1 (TRX-1) nuclear localisation. *Plos One.* 2013; 8:e84588.
103. Nagaraj K, Lapkina-Gendler L, Sarfstein R, Gurwitz D, Pashmanik-Chor M, Laron Z, Yakar S, Werner H Identification of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) as a downstream target for IGF1 action. *PNAS.* 2018; 115:1045-1050.
104. Jung, S.N.; Yang, W.K.; Kim, J.; Kim, H.S.; Kim, E.J.; Yun, H.; Park, H.; Kim, S.S.; Choe, W.; Kang, I.; Ha, J. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible

- factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29:713-721.
105. Li, Q.; Fu, G.B.; Zheng, J.T.; He, J.; Niu, X.B.; Chen, Q.D.; Yin, Y.; Qian, X.; Xu, Q.; Wang, M.; Sun, A.F.; Shu, Y.; Rui, H.; Liu, L.Z.; Jiang, B.H. NADPH oxidase subunit p22(phox)-mediated reactive oxygen species contribute to angiogenesis and tumor growth through AKT and ERK1/2 signaling pathways in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833:3375-3385.
 106. Tomasek, J.J.; Gabbiani, G.; Hinz, B.; Chaponnier, C.; Brown, R.A. Myofibroblasts and the mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:349-363.
 107. Nguyen-Ngoc, K.V.; Cheung, K.J.; Brenot, A.; Shamir, E.R.; Gray, R.S.; Hines, W.C.; Yaswen, P.; Werb, Z.; Ewald, A.J. ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 2012; 109:E2595-E2604.
 108. Xu, J.; Mosher, D. Fibronectin and other adhesive glycoproteins. in: Mecham, R.P. (Ed)., *Biology of extracellular matrix*, Springer New York. 2011; pp 41-75.
 109. Sottile, J.; Hocking, D.C. Fibronectin polymerisation regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell*. 2002; 13:3546-3559
 110. Marinkovich, M.P. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:370-380.
 111. Mehta RG, Hussain EA, Mehta RR, DasGupta TK: Chemoprevention of mammary carcinogenesis by 1 α -hydroxyvitamin D₅, a synthetic analog of vitamin D. *Mut Res*. 2003; 523:253-264.
 112. Peng X, Hawthorne M, Vaishnav A, Arnaud R, Mehta RG: 25-hydroxyvitamin D₃ is a natural chemopreventive agent against carcinogen induced precancerous lesions in mouse mammary gland organ culture. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 113:31-41.
 113. Slominski AT1, Janjetovic Z, Kim TK, Wright AC, Grese LN, Riney SJ, et al. Novel vitamin D hydroxyderivatives inhibit melanoma growth and show differential effects on normal melanocytes. *Anticancer Res*. 2012; 32:3733-3742.
 114. Bikle DD: Vitamin D and the skin: physiology and pathophysiology. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012; 13:3-19.
 115. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thomson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*. 1998; 13:325-349.
 116. Jones G: Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88:582S-586S.
 117. Tangpricha V, Flanagan JN, Witlatch LW, Tseng CC, Chen TC, Holt PR, et al. 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet*. 2001; 357:1673-1674.

- 118.Chen TC, Wang L, Witlatch LW, Flanagan JN, Holick MF: Prostatic 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and its implication in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2003; 88:315-322.
- 119.Bises G, Kallay E, Weiland T, Wrba F, Wenzl E, Bonner E, et al. 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase Expression in Normal and Malignant Human Colon. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52:985-989.
- 120.Deeb KK, Trump DL, Johnson CS: Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:684-700.
- 121.Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289:F8-28.
- 122.Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE: 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2000; 87:214-220.
- 123.Thorne J, Campbell MJ. The vitamin D receptor in cancer. *Proc Nutr Soc.* 2008; 67:115-127.
- 124.Zheng Y, Trivedi T, Lin RC, Fong-Yee C, Nolte R, Manibo J, et al. Los of the vitamin D receptor in human breast and prostate cancers strongly induces cell apoptosis through downregulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Bone Res.* 2017; 5:17023.
- 125.Chen P, Li M, Gu X, Liu Y, Li X, Li C, et al. Higher blood 25(OH)D level may reduce the breast cancer risk: evidence from a Chinese population-based case-control study and meta-analysis of the observational studies. *PLoS One.* 2013; 8:e49312.
- 126.Liao Y, Huang JL, Qiu MX, Ma ZW: Impact of serum vitamin D level on risk of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 2015; 36:1567-1572.
- 127.Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, Fiorentino M, Fang F, Lis R, et al. Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J Clin Oncol.* 2011; 29:2378-2385.
- 128.Kanemaru M, Maehara N, Chijiwa K. Antoprolferative effect of a 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ involves upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human pancreatic cancer cells. *Hepatogastroenterology.* 2013; 60:1199-1205.
- 129.Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, et al. Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by induction of E-cadherin and inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* 154: 369-388, 2001.
- 130.Chiang KC, Yeh CN, Chen MF, Chen TC. Hepatocellular carcinoma and vitamin D: a review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26:1597-1603.
- 131.Chen Y, Liu XY, Zhang F, Liao S, He X, Zhuo D et al. Vitamin D receptor suppresses proliferation and metastasis in renal carcinoma cell lines via regulating the expression of the epithelial CA²⁺ channel TRPV5. *PLoS ONE.* 2018; 13:e0195844.

132. Nagakura K, Abe E, Suda T, Hayakawa M, Nakamura H, Tazaki H: Inhibitory effect of 1 alpha,25-hydroxyvitamin D₃ on the growth of the renal cell carcinoma cell line. *Kidney Int.* 1986; 29:834-840.
133. Lambert JR, Eddy VJ, Young CD, Persons KS, Sarkar S, Kelly JA, et al. A vitamin D receptor-alkylating derivative of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits growth of human kidney cancer cells and suppresses tumor growth. *Cancer Prev* 2010; Res. 3:1596-1607.
134. Karami S, Brennan P, Navratilova M, Mates D, Zaridze D, Janout V, et al. Vitamin D pathway genes, diet, and risk of renal cell carcinoma. *Int J Endocrinol.* 2010; 879362.
135. Sarlos, D.P.; Peterfi, L.; Szanto, A.; Kovacs, G. Shift of keratin expression profile in end stage kidney increases the risk of tumor development. *Anticancer Res.* 2018; 38:5217-5222.
136. Toivola, D.M.; Strnad, P.; Habtezion, A.; Omary, M.B. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol.* 2009; 20: 79-91.
137. Bates, R.C.; Mercurio, A.M. Tumor necrosis factor- α stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell.* 2003; 14:1790-1800.
138. Abulaiti, A.; Shintani, Y.; Funaki, S.; Nakagiri, T.; Inoue, M.; Sawabata, N.; Minami, M.; Okumura, M. Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF- β signaling by IL-6. *Lung Cancer.* 2013; 82:204-213.
139. Maier, H.J.; Schmidt-Strassburger, U.; Huber, M.A.; Wiedemann, E.M.; Beug, H.; Wirth, T. NF- κ B promotes epithelial-mesenchymal transitions, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Letters.* 2010; 295:214228.
140. Nadasdy, T.; Laszik, Z.; Lajoie, G.; Blick, K.E.; Wheeler, D.E.; Silva, F.G. Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5:1462-1468.
141. Yusenko, M.V.; Nagy, A.; Kovacs, G. Molecular analysis of germline t(3;6) and t(3;12) associated with conventional renal cell carcinomas indicates their rate-limiting role and supports the three-hit model of carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010; 201:15-23.
142. Kovacs, G.; Kovacs, A. Parenchymal abnormalities associated with papillary renal cell tumors: a morphologic study. *J Urol Pathol.* 1993; 1:301-312.
143. Banyai, D.; Sarlos, D.P.; Nagy, A.; Kovacs, G. 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.
144. Apitz, K. Die Geschwülste und Gewebsmissbildungen der Nierenrinde. Die Adenoma. *Virchows Arch.* 1944; 311:328-359.
145. Balkwill, F.; Charles, K.A.; Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005; 7:211-217.

8. Közlemények

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke.

Janos Docs, Danial Banyai, Tibor Flasko, Arpad Szanto, Gyula Kovacs. Impaired Vitamin D Signaling Is Associated with Frequent Development of Renal Cell Tumor in End Stage Kidney. Anticancer Res. 2020; 40:6525-6530

IF: 2.480

Janos Docs, Daniel Banyai, Lehel Peterfi, Gyula Kovacs. The TXNIP/TXN redox system in remodelling of end stage kidney and development of renal cell tumour. JCMM (under review)

Janos Docs, Lilla Domonkos, Daniel Banyai, Gyula Kovacs. End stage kidney: a model of progressive inflammatory microenvironment and renal carcinogenesis. (in preparation)

Az értekezés témájához nem csatlakozó közlemények

Dócs János, Varga Attila, Farkas Antal, Bognár Csilla, Flaskó Tibor, Benyó Mátyás; Szervmegtartó műtét a here térfoglaló folyamata esetén. Magyar Andrológia. 2016; 2:39-42.

Dócs János, Flaskó Tibor, Molnár Zsuzsanna, Benyó Mátyás; A spermiumok monomorf morfológiai rendellenességei: macrozoospermia és globozoospermia. Magyar Andrológia. 2018; 3:75-79.

Dócs János, Flaskó Tibor, Takács Olívia Diána, Benyó Mátyás; A krónikus kismencedei fájdalom szindróma kivizsgálása, kezelése és andrológiai vonatkozásai. Magyar Andrológia. 2019; 2:53-56.

Berczi Csaba, **Dócs János**, Flaskó Tibor; A radikális prostatectomia előtt alkalmazott neoadjuváns hormonkezelés hatékonysága szerve lokalizált magas rizikójú prosztataadaganatokban. Magyar Urológia. 2020; 32/2:53-57.

Berczi Csaba, **Dócs János**, Flaskó Tibor; Cytoreductiv radikális prostatectomiával szerzett tapasztalataink oligometastaticus prosztataadaganatok esetében. Orvosi hetilap. 2021; 162/13:483-487.

Az értekezés témájához nem csatlakozó előadások

Dócs János, Somogyi Tamás, Murányi Mihály, Flaskó Tibor; Az urothelialis rendszer teljes exstirpatioja multicentrikus transitiocelluláris carcinoma végső megoldásaként. P3; 31. Fűvészkerti Urológus Napok. 2018 Február 16-17. Budapest

Murányi Mihály, Kiss Zoltán, Somogyi Tamás, **Dócs János**, Flaskó Tibor; Metasztatikus adrenocorticalis carcinoma sikeres kezelése; P4; 31. Fűvészkerti Urológus Napok. 2018 Február 16-17. Budapest

Somogyi Tamás, **Dócs János**, Murányi Mihály, Flaskó Tibor; Kezdeti tapasztalataink az Arista AH vérzéscsillapító por használatával; P19; 31. Fűvészkerti Urológus Napok. 2018 Február 16-17. Budapest

Dócs János, Flaskó Tibor, Kiss Zoltán, Varga Dániel; Multicentrikus transitiocelluláris carcinoma végső megoldásaként végzett teljes urothelialis rendszer extirpatio; P4; A Magyar Uroonkológusok Társasága IX. Kongresszusa. 2018 május 25-26. Budapest

Mátyás Benyó, **János Dócs**, Márk Molnár, Gyula Drabik; Tibor Flaskó Andrological microsurgery at the University of Debrecen. P130 A-0070; 10th European Congress of Andrology; 11-13. October 2018 Budapest Hungary

Dócs János, Kiss Zoltán, Murányi Mihály, Flaskó Tibor; Recidív pénisz stranguláció. Magyar Urológusok Társasága XXXIII Kongresszusa. 2018 október 18-20. Budapest

Dócs János, Drabik Gyula, Szegedi Krisztián, Murányi Mihály, Kiss Zoltán, Flaskó Tibor; BCG instilláció okozta hypersensitiv pneumonia. P2; 32. Fűvészkerti Urológus Napok. 2019 Február 15-16. Budapest

Dócs János, Drabik Gyula, Szegedi Krisztián, Berczi Csaba, Flaskó Tibor; Urothelialis carcinoma vesetranszplantált beteg esetében. P3; A Magyar Uroonkológusok Társasága X. Kongresszusa. 2019 Május 24-25. Budapest

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Kovács Gyulának, aki lehetőséget adott, hogy megalapozhassam kutatómunkámat. Megtiszteltetés számomra, hogy Vele dolgozhattam. Munkánk során mindvégig motivált, támogatót, tanított. Közös munkánk során megosztotta velem élete során szerzett tapasztalatait, mellyel jelentősen hozzájárult fejlődésemhez. Köszönöm emellett a Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikájának, hogy lehetővé tették számomra a tudományos munkát. Köszönettel tartozom emellett a Debreceni Egyetem Urológiai Klinika orvoskollégáinak, akik tekintettel voltak a kutatómunka- és a dolgozat megírására fordított időmre. Köszönöm a fent említettek mellett a Heidelbergi Molekuláris Onkológiai Labor munkatársainak, hogy korábbi munkájuk eredményeit felhasználhattam. Nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak és feleségemnek, akik megértésükkel, türelmükkel támogattak mindvégig.

10. Rövidítések jegyzéke

ACRD	Szerzett cisztás veseelégtelenség (acquired cystic kidney disease)
Akt/PKB	Protein kinase B
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl XL	B-cell lymphoma extra large
CCL20	Mouse Macrophage Inflammatory Protein 1- γ
CD14	Cluster of differentiation 14
chlRCC	Chromophobe-like renal cell carcinoma
CKD	Krónikus vesebetegség (chronic kidney disease)
CSF2	Colony Stimulating Factor 2
cRCC	Conventional/clear renal cell carcinoma
CXCL1	Chemokine ligand 1
CXCL3	Chemokine ligand 3
CXCL5	Chemokine ligand 5
CXCL6	Chemokine ligand 6
CXCL8	Chemokine ligand 8
CXCR1	Chemokine receptor 1
CXCR2	Chemokine receptor 2
CYP24A1	24-hydroxylase
CYP27B1	1 α -hydroxylase
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DNP	Diabéteszes nefropátia
ECM	Extracelluláris mátrix
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition

EREG	Epiregulin
ERK1-2/MAPK	Mitogen-activated protein kinases
ESRD	Végstádiumú veseelégtelenség (end-stage renal disease)
evRCC	Eosinophilic vacuolated renal cell carcinoma
FN1	Fibronectin 1
FOXE1	Forkhead Box E1
GFR	Glomeruláris filtrációs ráta
GPR87	G Protein-Coupled Receptor 87
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HIF-2	Hypoxia inducible factor 2
IGF-1	Insuline-like growth factor
IL1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8/ CXCL8	Interleukin 8
JAK2	Janus kináz 2
KRTAP2-2	Keratin Associated Protein 2-2
KRT7	Keratin 7
KRT19	Keratin 19
KRT23	Keratin 23
KRT81	Keratin 81
LAMA3	Laminin Subunit α 3
LAMB3	Laminin Subunit β 3
LAMC2	Laminin Subunit γ 2

Laminin332	LAMA3+LAMB3+LAMC2
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
NfκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOG	Noggin
NSAID	Nem szteroid gyulladáscsökkentő
MET	Hepatocyte growth factor receptor
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
MMP12	Matrix metalloproteinase 12
mtDNS	Mitochondriális dezoxiribonukleinsav
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
PRBMB1	Permeable reactive barrier myc box 1
pRCC	Papillar renal cell carcinoma
P21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1α
P27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1β
ROS	Reaktív oxigén szabadgyök
RONS	Reaktív oxigén- és nitrogén szabadgyökök
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SAA1	Serum amyloid A1
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TGFβ	Transforming growth factor β
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Tumor nekrosis faktor α

TRPV5	Transient receptor potential cation channel subfamily V
TXN	Thioredoxin
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
VDR	Vitamine D receptor
VDRE	Vitamine D response element
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VHL	Von Hippel-Lindau
WNT	Wingless and Int-1
α SMA	α smooth muscle actin

Impaired Vitamin D Signaling Is Associated With Frequent Development of Renal Cell Tumor in End-stage Kidney Disease

JANOS DOCS^{1,2}, DANIEL BANYAI¹, TIBOR FLASKO², ARPAD SZANTO¹ and GYULA KOVACS^{1,3}

¹Department of Urology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary;

²Department of Urology, Medical School, University of Debrecen, Debrecen, Hungary;

³Medical Faculty, Ruprecht-Karls-University, Heidelberg, Germany

Abstract. *Background/Aim:* End-stage kidney disease is characterized by chronic inflammation and frequent development of cancer. The level of circulating vitamin D is generally low in patients with end-stage renal disease (ESRD). *Experimental studies* have implicated the role of dysfunctional vitamin D metabolism in tumorigenesis. *Patients and Methods:* We analyzed the expression of vitamin D receptor (VDR), cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1 (CYP27B1) and cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 (CYP24A1), the key genes involved in vitamin D signaling, in kidneys from patients with ESRD, tissue microarrays containing ESRD-associated renal cell tumors, as well as in their precursor lesions by immunohistochemistry. *Results:* Kidneys from patients with ESRD showed strong structural rearrangement with only few tubules and epithelial cell groups embedded in fibrotic-inflammatory stroma. Only an estimated 1-3% of the epithelial cells showed positive staining with antibodies to VDR, CYP27B1 and CYP24A1, which contrasted with the 100%, 40-50% and 40-50% of positively stained cells, respectively, found in normal kidneys. Down-regulation of the vitamin D signaling proteins was found in patients with renal cancer, with the exception of tumors and their precursors occurring exclusively in ESRD. *Conclusion:* The significantly reduced activity of CYP27B1 in kidney from patients with ESRD explains the low level of circulating vitamin D. We suggest that the lack of anti-tumorigenic effect of vitamin D is a crucial factor in the frequent development of unique types of renal cell cancer in patients with ESRD. The number of patients with diabetes mellitus and

hypertension leading to chronic renal disease is rapidly growing worldwide (1). An increasing number of patients with type 2 diabetes receive renal replacement therapy in European Countries (2). This therapy prolongs the patient's life but, in several cases, leads to end-stage renal disease (ESRD), with major structural rearrangement and sclerosis. During long-term hemodialysis, cystic changes, so-called acquired cystic renal disease (ACRD) may develop. In spite of sclerosis, the kidneys in patients with ESRD/ACRD show remarkable mitotic activity. Intense cell proliferation is accompanied by pre-neoplastic lesions and unique types of renal cell carcinomas (RCC) develop at higher frequency than in the general population (3, 4). Clinically recognized RCC of end-stage kidneys has been found in 3.8% of prospectively screened candidates for renal transplantation, whereas the general population has a 0.04% lifetime risk of developing RCC (5, 6).

Several studies have suggested a role of a progressive inflammatory microenvironment in remodeling of ESRD/ACRD kidneys and the development of tumors (7-11). However, less is known about the role of 1,25-(OH)₂D₃ (vitamin D) metabolism in ESRD/ACRD-associated carcinogenesis. Vitamin D has strong antiproliferative and antitumorigenic effects and plays a role in the maintenance of normal cellular status quo by interaction with nuclear VDR (12-15). The level of circulating vitamin D is tightly regulated by the expression of two hydroxylases in epithelial cells in the kidney. 1 α -Hydroxylase (cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1, CYP27B1) is responsible for synthesis of the biologically active form of vitamin D, whereas 24-hydroxylase (CYP24A1) mediates its catabolism (16). CYP24A1 has a vitamin D response element in its promoter region and acts in control mechanisms to prevent tissue vitamin D intoxication (17).

Reduced CYP27B1 and increased CYP24A1 expression have been demonstrated in cancer cell lines, suggesting that dysfunctional vitamin D metabolism may be involved in carcinogenesis (18-20). The aim of this study was to analyze the possible role of vitamin D metabolism in remodeling of

Correspondence to: Gyula Kovacs (ORCID number: 0000 0003 2890 3781), Department of Urology, Medical School, University of Pecs, Munkacsy M. u. 2, H-6721 Pecs, Hungary. Tel: +36 304167243, Fax: +36 72242374, e-mail: g.kovacs@gmx.de

Key Words: End-stage kidney disease, VDR, CYP27B1, CYP24A1, tumor development.

kidney tissue in ESRD/ACRD and in tumor development by comparing the expression to that of normal fetal and adult kidneys. We applied VDR, CYP24A1 and CYP27B1 immunohistochemistry to kidneys, ESRD/ACRD and associated renal cell tumors.

Patients and Methods

Tissue samples. We collected 12 kidneys removed from patients with ESRD/ACRD due to cancer. The formalin-fixed kidney specimens were obtained from the Departments of Urology at the University of Heidelberg, Bad-Hersfeld District Hospital, Germany, Radcliffe Hospital in Cambridge, United Kingdom and of the Institute of Pathology, University of Ljubljana, Slovenia. Six kidneys were classified as ESRD and six with intensive cystic changes as ACRD. Each kidney was processed entirely in paraffin blocks for histological analysis. Hematoxylin and eosin-stained slides were scored for cysts, small precursor lesions and tumors. The diagnosis of the main tumors was established according to the Heidelberg Classification and as proposed by Tickoo *et al.* (21, 22). Five tumors were diagnosed as papillary RCC and another six as conventional RCC. We also found one oncocytoma, two ACRD-associated eosinophilic-vacuolated tumors, two chromophobe-like tumors, and one clear-cell papillary RCC in the 12 kidneys. Altogether, 65 small papillary, 42 chromophobe-like and 24 eosinophilic vacuolated pre-cancerous lesions were detected in the 12 kidneys (10).

Tissue microarray (TMA) containing 3-5 core biopsies from each tumor was constructed from paraffin-embedded tissues after marking the areas of interest on hematoxylin and eosin-stained slides by one of the Authors (GK). Core biopsies of 0.6 mm in diameter were placed within a recipient block by Manual Tissue Arrayer (MTA1; Beecher Instruments, Inc. Sun Prairie, WI, USA). Fetal kidneys were obtained from autopsy whereas adult kidney tissues were from radical tumor nephrectomy. The use of tissue samples for this study was approved by the Ethics Committee of the University Pecs, Hungary (no. 5343/2014). All procedures were in accordance with the ethical standards of the Institutional Research Committee and with the 1964 Helsinki Declaration.

Immunohistochemistry. Sixteen representative paraffin blocks from kidneys from patients with ESRD/ACRD were selected for immunohistochemistry. Serial sections were used in order to be able to compare the results of immunohistochemistry. We also analyzed fetal and adult kidneys for the cellular localization of the antibodies. After dewaxing and rehydration of the slides, antigen de-masking was performed in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 in 2100-Retriever (PICK-Cell Laboratories, Amsterdam, the Netherlands). Endogenous peroxidase activity and nonspecific binding sites were blocked with 3% hydrogen peroxide containing 1% normal horse serum for 10 minutes at room temperature. Slides were then incubated with antibodies to VDR (ab134826, 1:200 dilution; Abcam, Cambridge, UK), CYP27B1 (EPR20271, 1:2000 dilution; Abcam) and CYP24A1 (HPA022261, 1:200 dilution; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) at room temperature for 1 hour each. Horse radish peroxidase-conjugated secondary antibody (Histopathologia Kft, Pecs, Hungary) was applied for 30 minutes. The signal was then visualized with amino-ethyl-carbazol (DAKO, Glostrup, Denmark). Tissue sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Lillie's modification, DAKO) and after 10 seconds

bluing slides were mounted by Glycergel Mounting Medium (DAKO). For negative controls, the primary antibody was omitted. The staining intensity was assessed by comparing it to the intensity observed in adult normal kidneys.

Results

Expression pattern of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 in fetal and adult kidneys. We found strong expression of VDR in the nephrogenic zone of fetal kidney (Figure 1A). Cells of the tip of the ureteric bud, cap of the metanephric mesenchyme, pretubular aggregates, renal vesicles, comma-shaped body and the S-shaped body displayed strong nuclear staining with VDR antibody in 10 gestational-week-old kidneys. The strongest expression was seen in the distal compartment of S-shaped body. In 14- and 16-week-old fetal kidney proximal and distal tubular cells also displayed weakly positive staining with VDR antibody. CYP27B1 protein was strongly expressed in cells of emerging Henle loops, macula dense cells and distal tubules in 10-, 14- and 16-week-old kidney (Figure 1C). No expression was detected by the CYP24A1 antibody in fetal kidneys.

In adult kidney, nuclear VDR expression was observed in all types of cells from the proximal tubules to medullary collecting tubules, but the strongest expression was seen in distal tubules (Figure 1B). CYP27B1 exhibited strong expression in the ascending loop of Henle, macula dense cells and distal tubules (Figure 1D). CYP24A1 expression in distal tubules was weak. Both CYP27B1 and CYP24A1 proteins were present in the cytoplasm of cells, with fine granular staining corresponding to their mitochondrial location.

Expression of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 in kidney tissue from patients with ESRD/ACRD. The strong structural remodeling of kidneys in patients with ESRD/ACRD was characterized by highly fibrotic inflammatory stroma containing small cell clusters, circumscribed proliferation of slightly dilated tubules and different types of cysts, as well as areas displaying atrophic thyroid-like structure. Therefore, positive immune reaction cannot be precisely localized to segment-specific cells of the renal tubular system. VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression was seen only in some solid cell clusters and in small clusters of growing tubular cells (Figure 1E-G). Within the thyroid-like area, occasional solid clusters of cells displayed VDR, CYP27B1 or CYP24A1 positivity. Altogether, only 1-3% of the epithelial cells displayed positive staining for each of VDR or CYP27B1 or CYP24A1. Some of the cysts were lined by positively stained cells and others by negatively stained cells. In three ACRD kidneys, several cysts with papillary-solid eosinophilic-vacuolated cells growing into the lumen were detected, all showing positive staining for VDR and CYP27B1, and weakly for CYP24A1. Of interest, two kidneys obtained from the same patient with ESRD showed diffuse positive staining for

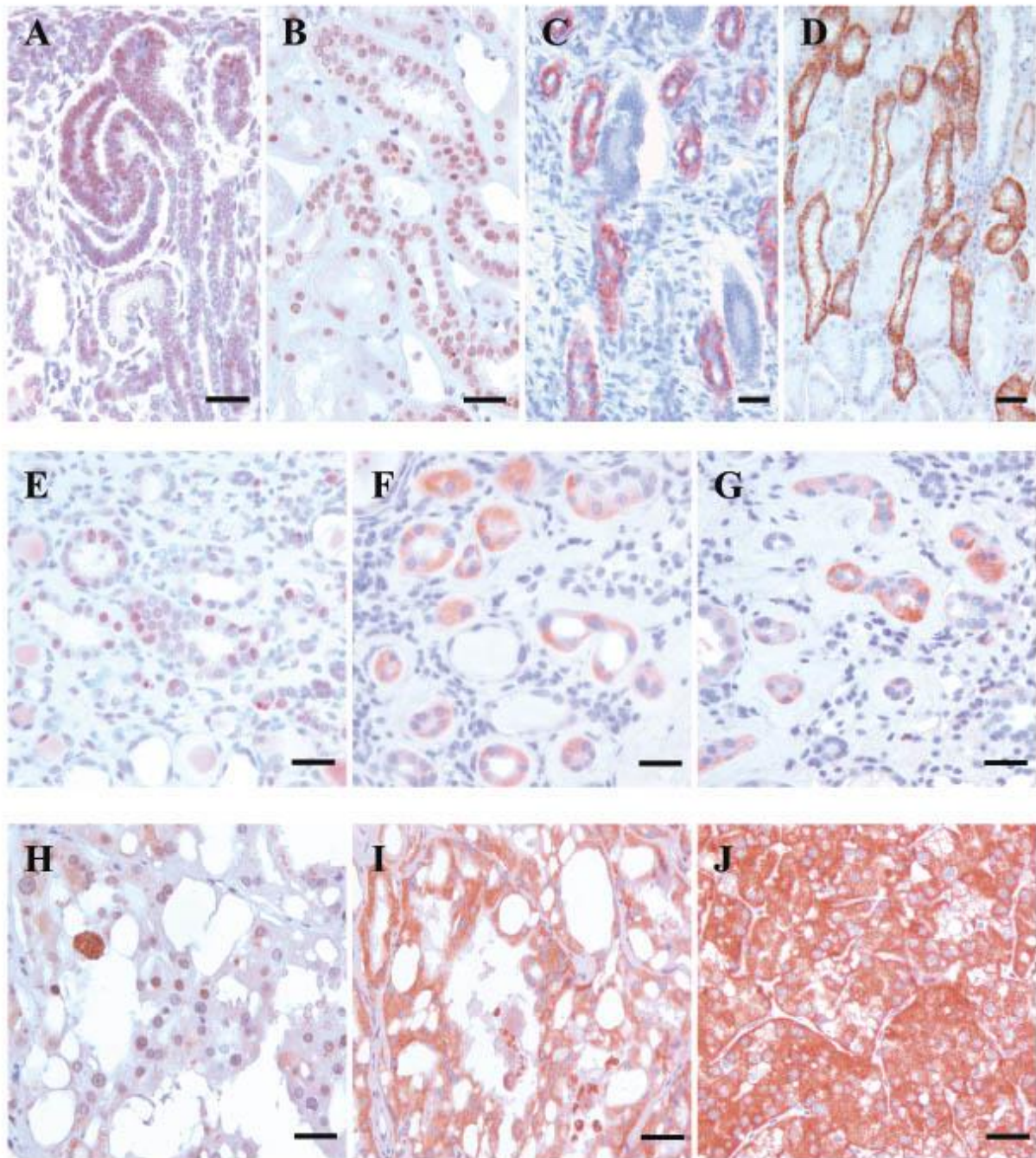


Figure 1. Expression of vitamin D receptor (VDR), cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1 (CYP27B1) and cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 (CYP24A1) in normal, and end-stage renal disease and acquired cystic renal disease (ESRD/ACRD) kidneys and tumors. Strong nuclear VDR expression was found in fetal kidney (A). Nuclear expression of VDR was found in all epithelial cells of adult nephron (B). Strong immunoreaction with CYP27B1 antibody was apparent in thick ascending loop of Henle and distal tubules in fetal (C) and adult (D) kidney. VDR (E), CYP27B1 (F) and CYP24A1 (G) staining of epithelial cell groups embedded in fibrotic stroma of ESRD kidney. Eosinophilic-vacuolated tumor showing nuclear VDR (H) and cytoplasmic CYP27B1 (I). Strong cytoplasmic immunoreaction of CYP27B1 was found in chromophobe-like renal cell carcinoma (J). Scale bar: 25 μ m.

VDR, CYP27B1 and CYP24A1 in approximately 30% of epithelial cells. Several small chromophobe-like pre-neoplastic lesions were also positive for VDR, CYP27B1 and CYP24A1.

Expression of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 in ESRD/ACRD-associated tumors. Several small pre-neoplastic lesions were detected in the slides used for immunohistochemistry. Six papillary RCCs included in TMA as well as all papillary pre-neoplastic lesions were consequently negative with the three antibodies. No expression of VDR, CYP27B1 or CYP24A1 was observed in the six conventional RCCs and the clear-cell papillary RCC. Eosinophil-vacuolated RCCs and their precursors were positive for VDR and CYP27B1 (Figure 1H and I), and weakly for CYP24A1. All chromophobe-like tumors, as well as their precursor lesions displayed strong positive staining for CYP27B1 (Figure 1J) and moderate staining with antibodies against VDR and CYP24A1.

Discussion

Vitamin D is synthesized, presumably from maternal 25(OH)₂D₃/vitamin D-binding protein complex, in distal tubules of fetal kidney as early as the 10th week of pregnancy. By binding to VDR in the nephrogenic zone, it induces target gene expression and controls fetal nephron development. In adult kidney, VDR was found to be ubiquitously expressed in all cells of the nephron, whereas the expression of CYP27B1 and CYP24A1 was limited to the distal nephron. The coordinated expression of these three is necessary to keep the level of circulating vitamin D at an optimal physiological concentration and regulate mineral homeostasis.

In kidney from patients with ESRD/ACRD, a progressive inflammatory and fibrotic microenvironment replaces the functionally intact renal tubules. The remaining few epithelial cells of unknown origin make up approximately 5-10% of epithelial cells of that of normal kidney. Among these cell clusters, we found a substantially reduced number of CYP27B1-, VDR- and CYP24A1-expressing cells (1-5%), which contrasts with the 100% and approximately 40-50% of cells positive for VDR and CYP27B1, respectively, in normal kidneys. These observations may explain the low level of circulating vitamin D in patients with ESRD/ACRD and at the cellular level in affected kidneys.

Active forms of vitamin D have a strong anti-tumorigenic effect on precancerous and cancerous lesions (12-14). Several studies demonstrated reduction of CYP27B1 and increased CYP24A1 expression in breast, colon and prostate cancer cell lines, suggesting an association between dysfunctional vitamin D metabolism and carcinogenesis (18-20). We found in this study that ESRD/ACRD-associated conventional RCCs, clear-cell papillary RCC, papillary RCCs and their precursor lesions did not express VDR or CYP27B1, indicating that tumor cells had escaped vitamin

D control. ESRD/ACRD-associated eosinophilic vacuolated tumors, chromophobe RCC-like tumors and their precursor lesions displayed strong expression of VDR and CYP27B1 and a weak expression of CYP24A1. It is noteworthy that these two types of renal tumors occur exclusively in ESRD/ACRD, whereas conventional RCC and papillary RCC also develop in the general population.

There is increasing evidence that in addition to mineral homeostasis, vitamin D may have other biological functions. Vitamin D plays a crucial role in maintenance of status quo of differentiated cells by controlling cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, invasion and metastasis (23-26). Vitamin D has strong antiproliferative, pro-differentiation and pro-apoptotic actions in some cells, tissues and cancers (27, 28). A normal level of vitamin D reduces the risk of development of renal, colorectal, breast, lung and bladder cancer and lethal prostate cancer (29-31). The biological effect of vitamin D is mediated through its binding to VDR (27). It was shown that vitamin D-VDR complex inhibits cell proliferation by up-regulation of *p21* and *p27* (32). VDR also controls cell migration and invasion by increasing the expression of E-cadherin (33). VDR is involved in apoptosis by inhibiting the expression of anti-apoptotic proteins BCL2 apoptosis regulator (BCL2) and BCL2-like 1 (34).

Recently it was demonstrated that VDR suppresses the proliferation and metastatic potential of RCC cell lines *via* regulation of transient receptor potential cation channel subfamily V member 5 epithelial Ca²⁺ channels (35). Vitamin D inhibited growth of human kidney cancer cells and suppressed tumor growth *via* interaction with VDR (36, 37). The lack of a protective effect of vitamin D due to its diminished expression increases the risk of kidney cancer development (38). We showed in this study that CYP27B1 as well as VDR expression is substantially down-regulated in kidneys from patients with ESRD/ACRD, which may lead to a high risk of tumor development.

In conclusion, our study demonstrates a significant decrease in expression of CYP27B1 and VDR in ESRD/ACRD kidneys which may explain the low level of local and circulating active vitamin D. It was reported that a progressively pro-tumorigenic inflammatory microenvironment is associated with tumorigenesis (9). We showed in this study that the lack of antitumor effect of vitamin D signaling may also be a crucial factor in the frequent development of unique types of RCC in patients with ESRD/ACRD.

Conflicts of Interest

The Authors have no conflicts of interest to declare.

Authors' Contributions

JD and GK designed this study. JD and DB carried out the immunohistochemistry, JB and GK performed the evaluation of the

results. JD wrote the first draft of the article, and GK, TF and AS revised the article. All Authors read and approved the final version of the article for publication.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant of the Medical Faculty, University of Pecs, Hungary (PTE-AOK-KA-2018/16). The Authors thank Drs. G. Staehler, B. Schulze-Brüggemann, D. Ferluga and Mr. D. Cranston for making material available from end-stage kidneys.

References

- Patel UD, Young EW, Ojo AO and Hayward RA: CKD progression and mortality among older patients with diabetes. *Am J Kidney Dis* 46: 406-414, 2005. PMID: 16129201. DOI: 10.1053/j.ajkd.2005.05.027
- Van Dijk PCW, Jager KJ, Stengel B, Gronhagen-Riska C, Feest TG and Briggs JD: Renal replacement therapy for diabetic end-stage renal disease: Data from 10 registries in Europe (1991-2000) *Kidney Int* 67: 1489-1499, 2005. PMID: 15780102. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00227.x
- Dunnill MS, Millard PR and Oliver D: Acquired cystic disease of the kidneys: A hazard of long-term intermittent maintenance haemodialysis. *J Clin Pathol* 30: 868-877, 1977. PMID: 915015. DOI: 10.1136/jcp.30.9.868
- Hughson MD, Buchwald D and Fox M: Renal neoplasia and acquired cystic disease in patients receiving long-term dialysis. *Arch Pathol Lab Med* 110: 592-601, 1986. PMID: 3521533.
- Doublet JD, Peraldi MN, Gattengo B, Thibault P and Sraer JD: Renal cell carcinoma of native kidneys: prospective study of 129 renal transplant patients. *J Urol* 158: 42-44, 1997. PMID: 9186319. DOI: 10.1097/00005392-199707000-00012
- Seidman H, Silverberg BS and Bodden A: Probabilities of eventually developing and dying of cancer (risk among persons previously undiagnosed with cancer). *CA Cancer J Clin* 28: 33-46, 1978. PMID: 417768. DOI: 10.3322/canjclin.28.1.33
- Konda R, Sato H, Hatafuku F, Nozawa T, Ioritani N and Fujioka T: Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-MET in acquired renal cystic disease associated with renal cell carcinoma. *J Urol* 171: 2166-2170, 2004. PMID: 15126778. DOI: 10.1097/01.ju.0000124263.51906.b9
- Konda R, Sugimura J, Sohma F, Katagiri T, Nakamura Y and Fujioka T: Over expression of hypoxia-inducible protein 2, hypoxia-inducible factor-1 α and nuclear factor κ B is putatively involved in acquired renal cyst formation and subsequent tumor transformation in patients with end-stage renal failure. *J Urol* 180: 481-485, 2008. PMID: 18550099. DOI: 10.1016/j.juro.2008.04.006
- Nagy A, Walter E, Zubakov D and Kovacs G: High risk of development of renal cell tumor in end-stage kidney disease: The role of microenvironment. *Tumor Biol* 37: 9511-9519, 2016. PMID: 26790439. DOI: 10.1007/s13277-016-4855-y
- Sarlos DP, Peterfi L, Szanto A and Kovacs G: Shift of keratin expression profile in end-stage kidney increases the risk of tumor development. *Anticancer Res* 38: 5217-5222, 2018. PMID: 30194170. DOI: 10.21873/anticancer.12845
- Peterfi L, Yusenko MV and Kovacs G: IL6 shapes an inflammatory microenvironment and triggers the development of unique types of cancer in end-stage kidney. *Anticancer Res* 39: 1869-1874, 2019. PMID: 30952727. DOI: 10.21873/anticancer.13294
- Mehta RG, Hussain EA, Mehta RR and DasGupta TK: Chemoprevention of mammary carcinogenesis by 1 α -hydroxyvitamin D₃, a synthetic analog of vitamin D. *Mut Res* 523: 253-264, 2003. PMID: 12628523. DOI: 10.1016/s0027-5107(02)00341-x
- Peng X, Hawthorne M, Vaishnav A, Arnaud R and Mehta RG: 25-Hydroxyvitamin D₃ is a natural chemopreventive agent against carcinogen induced precancerous lesions in mouse mammary gland organ culture. *Breast Cancer Res Treat* 113: 31-41, 2009. PMID: 18205042. DOI: 10.1007/s10549-008-9900-0
- Slominski AT, Janjetovic Z, Kim TK, Wright AC, Grese LN, Riney SJ, Nguyen MN and Tuckey RC: Novel vitamin D hydroxyderivatives inhibit melanoma growth and show differential effects on normal melanocytes. *Anticancer Res* 32: 3733-3742, 2012. PMID: 22993313.
- Bikle DD: vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Rev Endocr Metab Disord* 13: 3-19, 2012. PMID: 21845365. DOI: 10.1007/s11154-011-9194-0
- Hausler MR, Whitfield GK, Hausler CA, Hsieh JC, Thomson PD, Selznick SH, Dominguez CE and Jurutka PW: The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13: 325-349, 1998. PMID: 9525333. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.3.325
- Jones G: Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 88: 582S-586S, 2008. PMID: 18689406. DOI: 10.1093/ajcn/88.2.582S
- Tangpricha V, Flanagan JN, Witlatch LW, Tseng CC, Chen TC, Holt PR, Lipkin MS and Holick MF: 25-Hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet* 357: 1673-1674, 2001. PMID: 11425375. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04831-5
- Chen TC, Wang L, Witlatch LW, Flanagan JN and Holick MF: Prostatic 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and its implication in prostate cancer. *J Cell Biochem* 88: 315-322, 2003. PMID: 12520532. DOI: 10.1002/jcb.10342
- Bises G, Kallay E, Weiland T, Wrba F, Wenzl E, Bonner E, Kriwanek S, Obrist P and Cross HS: 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase expression in normal and malignant human colon. *J Histochem Cytochem* 52: 985-989, 2004. PMID: 15208365. DOI: 10.1369/jhc.4B6271.2004
- Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunty B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Störkel S, van den Berg E and Zbar B: The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 183: 131-133, 1997. PMID: 9390023. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199710)183:2
- Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Hanik LR, Worcester HD, Salama ME, Young AN, Moch H and Amin MB: Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 30: 141-153, 2006. PMID: 16434887. DOI: 10.1097/01.pas.0000185382.80844.b1
- Deeb KK, Trump DL and Johnson CS: Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 684-700, 2007. PMID: 17721433. DOI: 10.1038/nrc2196

- 24 Dusso AS, Brown AJ and Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F8-28, 2005. PMID: 15951480. DOI: 10.1152/ajprenal.00336.2004
- 25 Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB and Canfield AE: 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res* 87: 214-220, 2000. PMID: 10926872. DOI: 10.1161/01.res.87.3.214
- 26 Hansen CM, Frandsen TL, Brunner N and Binderup L: 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the invasive potential of human breast cancer cells *in vitro*. *Clin Exp Metastasis* 12: 195-202, 1994. PMID: 8194194. DOI: 10.1007/BF01753887
- 27 Thorne J and Campbell MJ: The vitamin D receptor in cancer. *Proc Nutr Soc* 67: 115-127, 2008. PMID: 18412986. DOI: 10.1017/S0029665108006964
- 28 Zheng Y, Trivedi T, Lin RC, Fong-Yee C, Nolte R, Manibo J, Chen Y, Hossain M, Horas K, Dunstan C, Zhou H and Seibel MJ: Loss of the vitamin D receptor in human breast and prostate cancers strongly induces cell apoptosis through downregulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Bone Res* 5: 17023, 2017. PMID: 28944088. DOI: 10.1038/boneres.2017.23
- 29 Chen P, Li M, Gu X, Liu Y, Li X, Li C, Wang Y, Xie D, Wang F, Yu C, Li J, Chen X, Chu R, Zhu J, Ou Z and Wang H: Higher blood 25(OH)D level may reduce the breast cancer risk: Evidence from a Chinese population based case-control study and meta-analysis of the observational studies. *PLoS One* 8: e49312, 2013. PMID: 23382798. DOI: 10.1371/journal.pone.0049312
- 30 Liao Y, Huang JL, Qiu MX and Ma ZW: Impact of serum vitamin D level on risk of bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol* 36: 1567-1572, 2015. PMID: 25359617. DOI: 10.1007/s13277-014-2728-9
- 31 Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, Fiorentino M, Fang F, Lis R, Fiore C, Penney KL, Ma J, Kantoff PW, Stampfer MJ, Loda M, Mucci LA and Giovannucci E: Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J Clin Oncol* 29: 2378-2385, 2011. PMID: 21537045. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.9880
- 32 Kanemaru M, Machara N and Chijiwa K: Antiproliferative effect of a 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 involves upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human pancreatic cancer cells. *Hepatogastroenterology* 60: 1199-1205, 2013. PMID: 23803383. DOI: 10.5754/hge11073
- 33 Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, Herreros AG, Lafarga M and Munoz A: Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by induction of E-cadherin and inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 154: 369-388, 2001. PMID: 11470825. DOI: 10.1083/jcb.200102028
- 34 Chiang KC, Yeh CN, Chen MF and Chen TC: Hepatocellular carcinoma and vitamin D: A review. *J Gastroenterol Hepatol* 26: 1597-1603, 2011. PMID: 21880026. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06892.x
- 35 Chen Y, Liu XY, Zhang F, Liao S, He X, Zhuo D, Huang HB and Wu YY: vitamin D receptor suppresses proliferation and metastasis in renal carcinoma cell lines *via* regulating the expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. *PLoS One* 13: e0195844, 2018. PMID: 29659618. DOI: 10.1371/journal.pone.0195844
- 36 Nagakura K, Abe E, Suda T, Hayakawa M, Nakamura H and Tazaki H: Inhibitory effect of 1 alpha,25-hydroxyvitamin D3 on the growth of the renal cell carcinoma cell line. *Kidney Int* 29: 834-840, 1986. PMID: 3012186. DOI: 10.1038/ki.1986.74
- 37 Lambert JR, Eddy VJ, Young CD, Persons KS, Sarkar S, Kelly JA, Genova E, Lucia MS, Faller DV and Ray R: A vitamin D receptor-alkylating derivative of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits growth of human kidney cancer cells and suppresses tumor growth. *Cancer Prev Res* 3: 1596-1607, 2010. PMID: 21149334. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0122
- 38 Karami S, Brennan P, Navratilova M, Mates D, Zaridze D, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Matveev V, Szesznia-Dabrowska N, Holcatova I, Yeager M, Chanock S, Rothman N, Boffetta P, Chow W-H and Moore LE: Vitamin D pathway genes, diet, and risk of renal cell carcinoma. *Int J Endocrinol* 2010: 879362, 2010. PMID: 20049159. DOI: 10.1155/2010/879362

Received September 17, 2020

Revised September 26, 2020

Accepted September 29, 2020