

A metanefrogén mesenchyma és ureter bimbó kölcsönhatása: Az összekötő tubulus és Wilms' tumor eredetének új szemlélete.

Doktori (PhD) értekezés

**Dr. Sárkány Beátrix
JEUN5M**

**Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ
Urológiai Klinika**



Pécs, 2022

**Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos
Programvezető: Prof. Dr. Pajor László
Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula**

1.Bevezetés

A vese fejlődése a metanefrogén mezenchima (MM) és az ureter bimbo (UB) jól szabályozott kétoldali kölcsönhatásán alapul. Az UB hatására a blastémális sejtek kondenzációja majd strómális és epitheliális differenciálódása útján létrejön a nefron illetve a vese. A MM és UB kölcsönhatásával és az UB szerepével kapcsolatban két kérdés nem tisztázott. Az egyik a MM-ből származó nefron szakaszokat és UB-ből származó gyűjtőcsatornákat összekötő tubulus eredete. A másik kérdés a MM és UB kölcsönhatásának zavarából keletkező gyermekkori tumor, a nephroblastoma pontos eredete. A tézis ezzel a két különböző, de fejlődéstanilag összefüggő kérdéssel foglalkozik.

1.1. Az összekötő tubulus eredete

Az irodalomban elfogadott, hogy a glomerulus, proximális tubulus, a Henle kacs és distális tubulus a MM epitélizációja és differenciálódása révén jön létre, míg a kivezető csatorna keletkezését az ureter bimbo (UB) szabályozott elágazódásából és differenciálódásából vezetik le. Eltérőek a vélemények a MM-ből képződött nefron szakaszt és az UB-ből eredő kivezető csatornát összekötő tubulus kialakulásáról. Ezzel kapcsolatos tudásunk nagyrészt főtális egér vesék vizsgálatából származik. Egérben kimutatták a Pou3f3 gén kifejeződését a renalis vesikel (RV) distális doménjében, ami arra utalt, hogy egérben a CNT az MM-ből származó RV distális domainjéből keletkezik. A ureter tip marker Calb1 hiánya mind a RV distális doménjében, mind az összekötő szegment sejtjeiben arra utalt, hogy az összekötő szegment a distal RV-ből származik. Az emberi vese fejlődése azonban sok tekintetben különbözik az egér vese embrionális fejlődésétől. Egerekben jóval korábbi fejlődési szakaszban történik meg a MM-ből származó renalis RV és UB fuziója. Emberben az uréter bimbó elágazódása a gesztáció 14-15. hetében, a nefron

kialakulása a 36. héten befejeződik. Ugyanakkor egérben az ureter elágazódása jóval később kezdődik és a nefron kialakulása még posztnatálisan is folytatódik. Így az egér model nem alkalmazható a human vese fejlődésének megértésére. Nemcsak az összekötő tubulus kialakulásával, hanem a principális és interkaláris sejtek differenciálódásával kapcsolatban is eltérnek a vélemények.

1.2. *A Wilms' tumor eredete és definíciója*

Cohnheim 1882-ben feltételezte, hogy bizonyos tumorok kialakulásának hátterében az embrionális szövetek differenciálódási zavara áll: “Die Hauptsache ist und bleibt immer, dass es ein Fehler, eine Unregelmässigkeit der embryonalen Anlage ist, in der die eigentliche Ursache der späteren Geschwulst gesucht werden muss. Aber was wir als angeboren verlangen, ist ja nicht die Geschwulst, sondern lediglich die Anlage dazu, d.h. nach der von uns proponirten Formulirung die Existenz desjenigen über das physiologische Maass hinaus producirten Zellenquantum, aus dem eine Geschwulst sich entwickeln kann“. Azaz a normal szövetek kialakulásához fel nem használt embrionális sejtek (*Anlage*), a születés után tumor kialakulásához vezethetnek.

Az irodalomban számos tanulmány megerősítette, hogy a WT az embrionális blasztémális sejtmaradványokból indul ki. Ennek figyelembe vételével a WHO 2004-ben a következő képpen határozta meg a WT-t: “Nephroblastoma is a malignant embryonal neoplasm derived from *nephrogenic blastemal cells*”. Immunhisztológiai vizsgálattal egy rövid közleményben 2007-ben egyértelműen kimutatták, hogy a WT-ban UB-szerű tubulusok is előfordulnak. Ennek ellenére, a WHO 2016-ban megerősítette a 2004-ben kiadott meghatározást. Bár gyakorlatilag mindenki megegyezik abban, hogy a nefrogén maradványok és a WT kialakulása az UB és a MM kölcsönhatásának zavarán alapul, mégis megmaradtak a WT

blasztémális eredetének elve mellett. Ez nem véletlen, hiszen a WHO meghatározást író patológusok és onkológusok kötve érzik magukat az általuk korábban leírt dogmához.

2. Célkitűzések

Miután számos főtális vese szövettani megfigyelésével valószínűsítettük a CNT kialakulását az UB-ból, a következő lépésben immunhisztológiai vizsgálatok segítségével kívántuk tisztázni az egér és human vese fejlődésének különbözőségét valamint az UB és kivezető csatornák sejtes összetételét főtális és felnőtt vesékben. Ettől a vizsgálattól azt vártuk el, hogy amennyiben a CNT és a CD azonos jellemző sejtsztruktúrát mutat, azaz PC és IC sejtekből áll, akkor ez valószínűsíti a CNT eredetét az UB-ból.

Előző vizsgálatok felvetették annak a lehetőségét, hogy a WT nemcsak a blastémális sejtekből indul ki, hanem valószínűleg az UB sejtsjei is részt vesznek a WT kifejlődésében. Ennek megerősítésére megvizsgáltuk az UB kialakulásában szerepet játszó gének (KRT17, RET, ROBO1 and SLIT2) kifejeződését főtális vesében, NR-ben és WT-ban.

A vese fejlődése során a kivezető és összekötő csatorna (amelyek a vese működéséhez fontos PC és IC sejteket tartalmazzák) az UB-ból fejlődik ki. Ezért megkérdeztük, hogy az UBT sejtsjei milyen mértékben képesek differenciálódni tumoros környezetben, azaz NR-ben és WT-ban. Immunhisztológiával megvizsgáltuk a még differenciálatlan IC sejtek jelenlétét igazoló markerek (CA2, ATP6V1B1 and ATP6V0D2), valamint a működő α - és β - IC sejtekre jellemző markerek (SLC4A1 and SLC26A4), és a PC sejteket azonosító marker (AQP2) kifejeződését NR-ben és WT-ban.

3. Anyag és módszer

3.1. Vizsgálati anyag

Mindkét téma kidolgozásához főtális és adult vesék szövettani metszeteit használtuk fel. A főtális veséket 10 hetes (2), 12 hetes (2), 15 hetes (2), 17 hetes (5) és 21 hetes (5) terhességből származó boncolási anyagból választottuk ki. A felnőtt veséket a vese tumorok eltávolítása és szövettani diagnózisa után fennmaradó normál veserészletekből nyertük. Ezen anyagok tudományos célokra való felhasználását a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága engedélyezte (8466 – PTE 2020). A WT metszeteket a Wilms' Tumor Regiszterből (Szegei Tudományegyetem, Patológiai Intézet) választottuk ki. Az ebben a munkában felhasznált WT minden esetben a sebészi eltávolítás előtt az UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol szerint citosztikus kezelésben részesült. A magyar Wilms' Tumor Regiszterből kiválasztottunk 12 representative tumort immunhisztológiai vizsgálatra, amelyekben korábbi tapasztalatunkra alapozva feltételeztük az UB-ra emlékeztető tubuláris képletek jelenlétét. A vizsgálati anyagba beválasztottunk 8 „mixed” típusú WT-t, amelyekben a kezelés ellenére még jelentős tubuláris struktúrák maradtak meg. Emellett még 2 regresszív típusú WT, egy kizárólag blasztémás sejteket tartalmazó valamint egy fókális anapláziát mutató WT került vizsgálatra. A WT prekursor léziókban előforduló UB származékok megítélésére 6 PLNR és 3 ILNR valamint egy 6 mm átmérőjű hyperplastikus NR került vizsgálatra. A WT-ok és prekursor léziók immunhisztológiai vizsgálatát az Ethics Commission of the Hungarian Medical Research Council (IV/8956-3/2020/EKU) engedélyezte.

3.2. Immunhisztológia

A 4%-os formaldehiddel fixált paraffinba ágyazott szövetekből készült 4 µm vastag metszeteket használtunk fel immunhisztokémiai vizsgálatra. A metszeteket xilolban tartottuk három órán keresztül 42°C-os termosztátban a paraffin leolvasztására. A fedő paraffin réteg eltávolítása után kétszer 5 percig tiszta xilolban, kétszer 5 percig 100% isopropyl alkoholban tartottuk, majd 96% és 70%-os alkoholban kétszer 5-5 percig rehidráltuk. Ezután a metszetekről desztillált vízzel leöblítettük a megmaradt alkoholt, majd Envision FLEX Wash Bufferben (DAKO, Glostrup, Denmark) kétszer 5 percig tartottuk. Az antigén feltárása citrát pufferben (pH 6.0), illetve EnVision FLEX Target Retrieval Solution, high pH (DAKO) oldatban történt a 2100-as Retrieverben (Pick-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia). Feltárás után a lemezeket szobahőmérsékletig lehűtöttük majd kétszer az Envision FLEX Wash Bufferben leöblítettük. Az endogén peroxidáz blokkolására a metszeteket lefedtük az Envision FLEX Peroxydase Blocking Reagens-sel (DAKO) 10 percig, majd az Envision FLEX Wash Bufferben kétszer öblítettük.

Ezután a metszeteket befedtük megfelelő hígítású primér antitestekkel és nedves kamrában 60 percig inkubáltuk. Primér antitest után a lemezeket kétszer leöblítettük az Envision FLEX Wash Bufferrel, majd lefedtük szekunder antitesttel (EnVision FLEX horse-radish-peroxydase conjugated secondary antibody, DAKO) és 20 percig nedves kamrában tartottuk. Ismételt öblítés után az immunreakciót DAB (3,3'-Diaminobenzidin, DAKO) szubsztráttal mikroszkópos ellenőrzés mellett előhívtuk majd a reakciót desztillált vízzel gátoltuk. A magfestést Mayer's haematoxylin (Lillie's modification, DAKO) végeztük és a magfestést körülbelül 10 másodpercig ammonium-hydroxide oldatban kékítettük, majd Glycergel-lel (DAKO) lefedtük. A fotó dokumentációt egy Leitz DMRBE mikroszkóppal, HC PLAN APO 20x0.70 objektívvel és ProgRes C14 kamerával készítettük.

A különböző nefron szakaszokat valamint PC és IC sejteket jelző antitesteket vizsgáltuk meg: Anti-TMEM27, Anti-POU3F3, Anti-SCEL Anti-AQP2, Anti-CALB1, Anti-CA2, Anti-SLC26A4, Anti-SLC4A1, Anti-ATP6V1B1, Anti-ATP6V0D2, Anti-TMEM213, Anti-RET, Anti.-SLIT2, Anti-ROBO1, Anti-KRT17.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. Összekötő tubulus (CNT) eredete

Human főtális vesében nem találtunk POU3F3 transzkripciós faktor pozitív immunreakciót a vese vezikulumok sejtmagjaiban. Míg egér vesében már a vese vezikulumokban felismerhető a szegmentálódás, ez a human főtális vesében csak az SSB szakaszban figyelhető meg. Az SSB fázisban lehet először disztális, mediális és proximális domént megkülönböztetni. Az SSB distális doménje mutat először pozitív festődést a POU3F3 antitesttel. A CALB1 kifejeződése is lényegesen különbözik az egér vesétől. A human főtális vesében az UBT sejteji negatívak, míg az differenciálódó gyűjtő csatorna sejteji pozitív reakciót mutatnak. Az MM-ből származó tubulusok sejteji nem adtak pozitív reakciót sem a POU3F3, sem a CALB1 antitesttel.

4.1.2. Human főtális vesében az uretrer bimbó sejteji csatlakoznak az SSB distális doménjéhez és nem fordítva

A MM eredetű sejtek epitheliális tranzíciója (MET) után az epitheliális sejtek először a RV-t és CSB-t majd az S-shape body-t (SSB) képezik. Az SSB különböző doménjének kialakulása után az elágazódó ureter bimbó kapcsolódik az SSB distális doménjéhez, amely folyamat a működő nefron kialakulásának a feltétele. Immunhisztológiai vizsgálattal megfigyeltük, hogy ezek a tubulárisan rendeződött sejtcsoportok az UBT-ből nőnek ki.

A főtális vesék hematoxylin és eosin festett metszeteinek szövettani vizsgálata során megfigyeltük, hogy kedvező metszési síkokban az ureter bimbóból valóban olyan sejtcsoportok nőnek ki, amelyek időnként szűk lumennel rendelkeznek. Ezek a sejtcsoportok az SSB distális domainjéhez közeledve ellapulnak, hasonlóan az SSB velük szemben álló sejtekhez. Ritkán sikerült olyan síkban elkészíteni a metszeteket, hogy az CNT prekursor és az SSB distális része már közös lument képezett, azaz létrejött a CNT primitív főtális formája, amely összeköti az UBT-t és SSB-t.

4.1.3. A PC és IC sejtek és progenitor sejtjei főtális vesében

PC és IC sejtek kizárólag a CNT-ben és kivezető csatornában fordulnak elő. Ezért megvizsgáltuk a PC specifikus AQP2 valamint az IC sejtek prekursor sejtjeit jelző CA2 kifejeződését főtális vesében immunhisztológiával. A CA2 elsősorban a fejlődéstanilag fiatalabb kortikális UB trunk doménban fejeződött ki. A medullaris UB trunk sejtjei csak elvétve mutattak pozitív CA2 festődést. A PC-t jelző AQP2 fordított erősségű reakciót mutatott. Elsősorban a medullaris UB törzs, azaz a medullaris kivezető csatorna sejtjeiben mutatott erős festődést, míg a kortikális UB sejtjei csak gyenge AQP2 festődést mutattak. Az AQP2 immunreakció fokozatosan erősödött a kortikális doméntól a medullaris kivezető csatornáig. Egyeflén más sejt sem mutatott pozitív immunreakciót az AQP2 és CA2 antitesttel főtális vesében.

Differenciált, működő IC sejteket a transzportáló fehérjék kifejezéséről lehet felismerni. Ezért megvizsgáltuk az SLC4A1, SLC26A4, ATP6V0D2, ATP6V1B1 fehérjéket főtális vesében, amelyek az α - és β -IC sejteket jellemzik. Az ATP6V1B1 kifejeződését már 10. hetes terhességből származó vesében is észleltük. Valamivel idősebb, már 12-15. hetes terhességből származó vesében már a tubuláris sejtek felszínén látható diffúz, vonalszerű ATP6V0D2 immunreakció mellett megjelentek a felnőtt vesében látható „cap” szerű immunoreakciók. Erőteljes immunreakciót

figyeltünk meg az ATP6V1B1 antitesttel, valamint a β -IC marker SLC26A4 antitesttel. Az immunhisztológiai vizsgálatok eredménye arra utal, hogy az IC sejtek a korai terhességi fázisban éretlen fenotípust mutatnak. Az SLC26A4 és ATP6V1B1 kifejeződése főtális vesében arra utal, hogy ezek a sejtek a még nem elkötelezett non α -non β IC sejteknek felelnek meg.

4.1.4. Szegment specifikus gének kifejeződése felnőtt vesében

A human vese minden egyes szegmentje, a CNT és CD kivételével azonos citológiai megjelenésű és működésű sejtekből áll. Ezt a szegment specifikus gének expresziójának vizsgálatával igazoltuk. Az eredményeket az 1. Táblázatban tüntettük fel. A proximális tubulusok azonosítására a TMEM27 antitestet használtuk. A POU3F3 embryonális vesében a SSB disztális és középső doménjében fejeződik ki és fontos szerepe van a nefron középső szakaszának, a Henle kacsnak és makuladenzának a kialakulásában és működésében. A POU3F3 ezenkívül a distális tubulusok néhány sejtjében is pozitív reakciót adott. A SCEL kizárólag a distális kanyarulat csatornák sejtjeiben fejeződik ki, míg a makula densa és CNT sejtjei nem mutattak pozitív immunreakciót.

Az AQP2, amely a PC jellemző markere, a CNT és CCD sejtjeiben kevésbé fejeződött ki, azonban mind a külső és belső medulláris gyűjtőcsatorna sejtjeiben erőteljes és diffúz immunreakciót adott, amely megfelel a PC működésének. CA2, amely az PC és IC sejtek prekursor sejtjeit jelzi, pozitív festődést mutatott a CNT sejtjeiben, de leginkább a CCD és OMCD sejtjeiben találtunk erős reakciót. A distális nefron működésének megfelelő mozaik sejt felépítést mutat. Mind a PC és IC sejtek olyan géneket fejeznek ki, amelyeknek fontos szerepe van a víz és elektrolit háztartás szabályozásában. Az AQP2 kifejeződése kizárólag az PC sejtekben figyelhető meg, míg az α -IC sejtek a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger Solute Carrier Family 4

Member 1 (SLC4A1) bazolaterális expresszióját, a β -IC sejtek pedig a Cl-/HCO₃-exchanger Solute Carrier Family 26 Member 4 (SLC26A4) apikális kifejeződését mutatják. Ezek a sejtípusok kizárólag a CNT-ben és CCD sejtjeiben fordulnak elő, bár az OMCD sejtjei is mutathatnak néhány positive sejtet. Ezeknek a markeroknak a kifejeződését semmilyen más nefron szakaszban sem figyeltük meg. A CALB1 a CCD-ben erős immunreakciót mutatott, míg a CNT-ben csak enyhe CALB1 kifejeződésr találtunk. A CALB1 nem fejeződött ki az OMCD és IMCD sejtjeiben.

Table 1. Expression of segment and cell specific genes in human adult kidney

Gene	PCT	LH	MD	DCT	CNT	CCD	OMCD
TMEM27	++	-	-	-	-	-	-
POU3F3	-	++	+++	+	-	-	-
SCEL	-	-	-	++	-	-	-
AQP2	-	-	-	-	+	++	++
CA2	-	-	-	-	+	+++	+
SLC4A1	-	-	-	-	++	++	+
ATP6V1B1	-	-	-	-	++	++	+
ATP6V0D2	-	-	-	-	++	++	+
TMEM213	-	-	-	-	++	++	+
SLC26A4	-	-	-	-	+	++	-
CALB1	-	-	-	-	+	+++	-

PCT – proximal convoluted tubules; LH – Loop of Henle; MD – macula distal convoluted tubules; CNT – connecting tubules; CCD – cortical collecting duct; OMCD – outer medullary collecting duct; IMCD – inner medullary collecting duct

4.2. Wilms' Tumor

4.2.1. Az ureter-bimbó (UB) markerek expressziója főtális vesében

Először azokat a géneket elemeztük, amelyek kizárólag az elágazódó UB sejtekben fejeződnek ki. Ami az UB törzs-et illetve az UB ampullát illeti, két különböző megjelenésű immunreakciót figyeltünk meg. A KRT17, RET és ROBO1 nemcsak az UB trunk és gyűjtőcsatornák sejtjeiben fejeződött ki, hanem az UB tip pluripotenciális sejtjeiben is. Ezzel a három antitesttel nem találtunk pozitív immunreakciót az MM-eredetű sejtekben, mint a blastéma, a renális vesiculum (RV) vagy S-shape body (SSB) sejtjei. Kivételt alkotott a ROBO1 ligand SLIT2, amely gyenge immunreakciót mutatott UB tip és az UB trunk sejtjeiben, és az MM-ből származó blastemális sejtekben, és a RV és SSB sejtjeiben is.

A CA2 és AQP2 antitestekkel kapott immunreakció különbözött a fent leírtaktól. A CA2 és AQP2 a főtális vesében azokat a progenitor sejteket azonosítja, amelyek később a felnőtt vesében tovább differenciálódnak a kivezető csatornák meghatározott működésű sejtjeire, a PC és IC sejtekre. CA2 expressió már a 10. hetes vesében megjelenik. Ekkor és a későbbiekben is a pozitív festődés az UB trunk kortikális szakaszára korlátozódik, de a medulláris UB trunk és az UB tip sejtjei negatívak maradnak. Az UB-tip és a kortikális UB-trunk sejtjei nem adnak pozitív reakciót az AQP2 antitesttel. Viszont a medulláris UB trunk területén, ami később megfelel a medulláris gyűjtőcsatornának, erős AQP2 protein expresszió látható. Tehát a CA2 pozitív sejtek a vesefejlődést tekintve az UB fiatalabb kortikális doménjében fordulnak elő, közel az UB tip sejtekhez, míg az AQP2 expressió az

UB-trunk idősebb medulláris doménjében jelenik meg. Differenciálatlan IC sejtek pozitív festődést mutattak az IC marker ATP6V1B1 and ATP6V0D2 antitesttel. A két antitest a tubuláris sejtek lumináris felszinen egy vékony egyenletes vonal képében jelent meg. Csak kevés sejt mutatta felnőtt vese differenciálódott IC sejtjeire jellemző, cap-szerű pozitivitást.

Table 2. Expression of ureteric bud and cell specific gene products in human foetal kidney

	RET	ROBO1	SLIT2	CA2	ATPase	AQP2
UBT	+	+	+	-	-	-
C-TRUNK	+	+	+	+	+	-
M-TRUNK	+	-	-	-	-	+
MM-DER	-	-	+	-	-	-

UBT – ureter bimbó tip, C-TRUNK – kortikális ureter szakasz, M-TRUNK – medulláris ureter szakasz, MM-DER – metanefrogén-mezenchyma-származék. – negatív, + pozitív.

4.2.2. Az ureter bimbó (UB) markerek expressziója nefrogén maradványokban

Az egy általánosságban elfogadott tény és az irodalomban egyértelműen dokumentált, hogy a WT nefrogén maradványokból indul ki. Bár már két korábbi közlemény is utalt az UB markerok előfordulására WT-ban, eddig mások nem vizsgálták meg PLNR-ben és ILNR.-ben. Korábban elvégzett immunhisztológiai vizsgálattal kimutattuk a KRT17 antitest jelenlétét az UB származékok sejtjeiben mind WT-ban és ILNR-ben és PLNR-ben.

Ezért megvizsgáltunk 6 perilobáris nefrogén maradványt és 3 intralobuláris nefrogén maradványt, közöttük egy 6 mm átmérőjű hiperplasztikus maradványt azokkal az antitestekkel, amelyeket az UB ampulla differenciálódásának

azonosítására használtunk fel főtális vesékben. UBT-re specifikus markerok, mint a KRT17, ROBO1, RET és SLIT2 mellett a prekursor sejteket jelölő CA2 és a differenciálódott PC és IC sejteket jelző markerokat használtuk fel.

Három PLNR-ben, két ILNR-ben, közöttük a hyperplastikus nefrogén maradványban pozitív immunreakciót kaptunk mind a négy UB markerral, azaz KRT17, ROBO1, RET és SLIT2 antitestekkel. Pozitív immunreakciót elsősorban a nefrogén maradványon belül körülírtan proliferáló epiteliális sejtcsoportokban valamint körülírtan proliferáló tubuláris sejtcsoportokban figyeltünk meg. Pozitív immunreakciót kaptunk a hyperplastikus nefrogén maradványban megfigyelt epiteliális sejtcsoportokban a főtális prekursor IC sejteket kimutató CA2 antitesttel. Továbbá, két fibrotikus epitheliális nefrogén maradványban a differenciálatlan IC sejteket jellemző ATP6V0A4 és ATP6 V1B1 antitestek is fokális pozitivitás mutattak. Nem találtunk viszont pozitív reakciót a differenciált PC és IC sejteket jelző AQP2, SLC26A4 és SLC4A1 antitestekkel.

4.2.3. Az ureter bimbó markerek expressziója Wilms' tumorban

Wilms tumorban elemeztük azoknak a proteineknek a celluláris kifejeződését, melyeket a KRT17, RET, ROBO1, SLIT2, CA2 és AQP2 kódol. Ezzel kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy ezek közül a ROBO1, RET és KRT17 főtális vesében csak az UB trunk és UB ampulla sejtjeiben fejeződik ki, egyetlen blasztémális sejt vagy a MM-ből kiinduló képlet, mint RV vagy SSB sem mutatott pozitív immunreakciót.

A ROBO1, amely a főtális vesék UB ampulla sejtjeiben fejeződik ki és jelentős szerepe van ezek kialakulásában és elágazódásában, erős immunreakciót mutatott trifázisú WT-ban. Az UB ampulla sejtjeire emlékeztető tubulusokban, amelyek noduláris, szerpentin szerű növekedést mutató blasztémális sejtek csoportjába vannak beágyazva, az epiteliális sejtek erős ROBO1 pozitív festődést mutattak. Számos,

néha meglepő formát mutató, laza fibrotikus stromába ágyazott cisztikusan tágult kifejezetten ROBO1 pozitív epiteliális sejtekkel bélelt tubulus volt megfigyelhető. A WT stromális részébe ágyazott köbhámmal bélelt tubulusok is erős ROBO1 festődést mutattak. A ROBO1 kifejeződése elsősorban a nagyobb, epiteliálisan differenciálódott sejtekben volt megfigyelhető. Ezt láttuk az egyetlen, a vizsgálati anyagba bevont hyperplastikus nefrogén maradványban is, ahol a körülírtan proliferáló nagyobb epiteliális sejtek élénk ROBO1 immunreakciót adtak. A trifázisú WT-ok kizárólag epiteliálisan növekvő részében a nefrogén vezikel szerű képletek, amelyek feltehetően a blasztémális sejtekből erednek, negatív ROBO1 festődést mutattak.

A ROBO1 receptor SLIT2, amint azt a főtális vesében is megfigyeltük, úgy a WT-ban is mind az UB-ból származó, mind az MM-ből származó sejtekben is kifejeződik. A nodulárisan növekvő tumoros blasztémális sejtek és a fibrotikus stroma sejtjei SLIT2 pozitív festődést mutattak. A részben differenciált UB törzsre emlékeztető szűk és cisztikusan tágult tubulusok sejtjei erős immunreakciót mutattak a SLIT2 antitesttel. A ROBO1-el ellentétben, a SLIT2 antitest pozitív immunreakciót mutatott a renális vezikulumra emlékeztető tubulusokban.

A RET és KRT17 hasonlóan a ROBO1 génhez, az főtális vesében megfigyelhető UB és blasztéma kölcsönhatására emlékeztető UB-szerű tubuláris sejtekben fejeződtek ki. Ezek RET negatív tumoros blasztémális sejtcsoportokba vagy fibroblasztra emlékeztető strómába voltak ágyazva. A cisztikusan tágult tubulusok jelentős része is RET pozitívítást mutatott. KRT17 a blasztémális sejtekbe ágyazott UBT szerű tubulusokban mutatott erős immunreakciót, de a fibrotikus strómában megfigyelhető egyszerű tubulusok is pozitív festődést mutattak. A perilobuláris NR tubuláris sejtjei nem adtak KRT17 reakciót, viszont a körülírtan

proliferáló szolid epiteliális nodulusok sejtjei KRT17 festődést mutattak. A hyperplastikus ILNR-ben egyes tubuláris, nagyobb hámsejtekkel bélelt képletek erős immunreakciót adtak a KRT17 antitesttel.

A környező blasztémális vagy stromális sejtek egyike sem volt pozitív ROBO1, RET vagy KRT17 immunreakcióval. Továbbá, az MM-ből származó, primitív proximális és distalis tubuláris sejtekre vagy glomerulusra emlékeztető (glomeruloid) képletek negatívak voltak mind a KRT17, ROBO1, RET és SLIT2 festésre. Mivel célunk az UB-tip sejtjeinek kimutatása és differenciálódási képességének megállapítása volt, nem végeztük el az MM-ből származó sejtekre jellemző markerok immunhisztológiai kimutatását.

4.2.4. Az ureter bimbó származékok differenciálódása Wilms tumorban

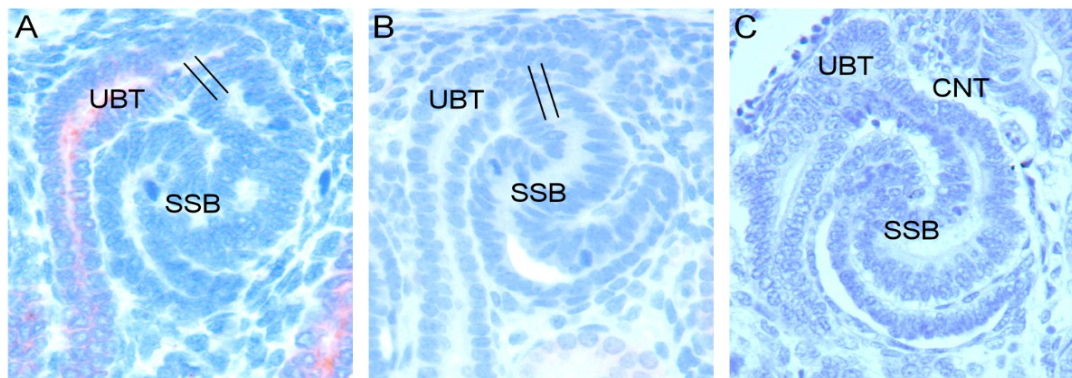
A CA2 a főtális vese IC és PC sejt prekurzorokban ad pozitív immunreakciót. Főtális vesében az UBT sejtjei nem festődtek a CA2 antitesttel. Azonban WT-ban pozitív immunreakciót figyeltünk meg a laza strómába ágyazott proliferáló tubuláris sejtekben, amelyek a kortikális UB-trunk sejtjeire emlékeztetnek. A CA2 antitest pozitív reakciót adott számos cisztikusan tágult tubulusban is. Ugyancsak pozitív CA2 reakciót figyeltünk meg a hyperplastikus ILNR egyes tubuláris képleteiben is.

Megvizsgáltuk az differenciálatlan IC sejtek esetleges jelenlétét WT-ban az ATP6V1B1 and ATP6V0A4 antitestekkel. Mindkét ATPase pozitív reakciót adott a főtális vesék tubuláris képleteiben. Meglepetésünkre, ezek a differenciálatlan IC sejtek nemcsak a főtális vesékben, hanem WT-ban és nefrogén maradványban is előfordulnak. Egyetlen WT sem mutatott pozitív immunreakciót a felnőtt vese összekötő és kivezető csatornájában látható differenciálódott α - és β -IC sejteket jellemző SLC4A1 és SLC26A4 antitestekkel. Egyetlen WT vagy nefrogén maradvány sem mutatott pozitív reakciót az AQP2 antitesttel.

5. Következtetések, új eredmények

5.1. Az összekötő csatorna eredete

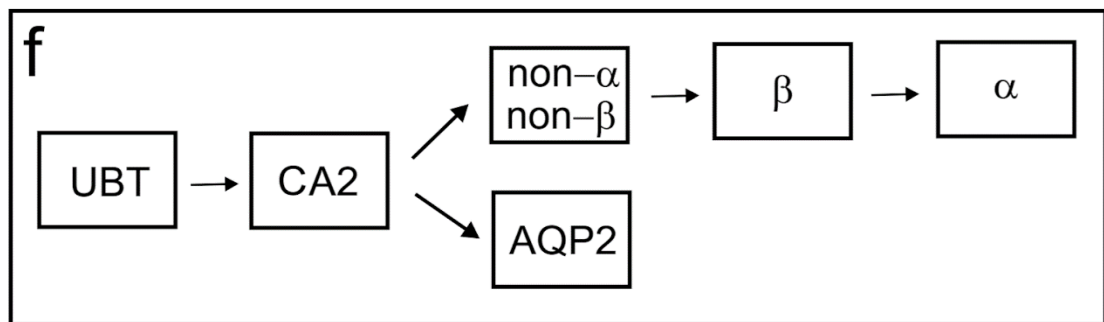
A főtális vesék H&E festett szövettani metszeteinek megfigyelése alapján megállapítottuk, hogy a *humán főtális vesében az ureter bimbóból kinövő sejtek irányítottan csatlakoznak az SSB distális doménjéhez és nem fordítva.*



(Sárkány és Kovacs, Histochem Cell Biol, etc 2021)

Továbbá, immunhisztológiai vizsgálattal egyértelműen bebizonyítottuk, hogy az összekötő tubulus (CNT) emberi vesében az UBT sejtjeiből alakul ki és így a disztális nefron szerves része. Az UB ampulla (UBT) sejtjei először CA2 pozitív precursor sejtékké differenciálódnak, amelyek az UB növekedése és elágazódása során a fejlődésileg idősebb, medulláris gyűjtőcsatornáknakban AQP2 pozitív PC

sejteket, míg a fiatalabb kortikális régióban először differenciálatlan non- α non- β -IC, majd pedig β -IC és α -IC sejteket képeznek.

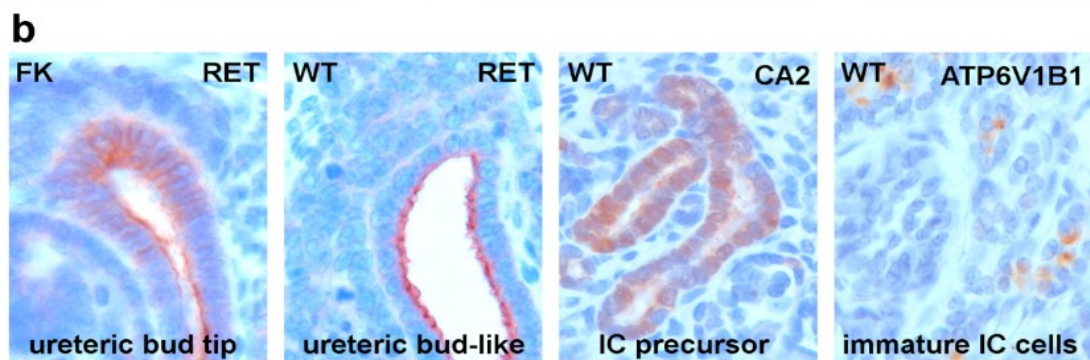
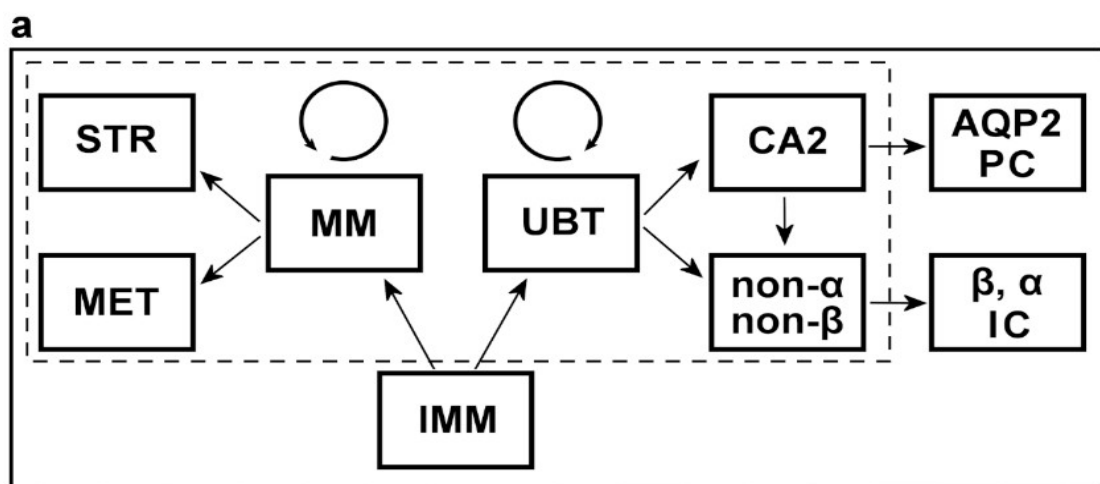


(Sárkány és Kovacs, Histochem. Cell Biol. 156:555-560 (2021))

5.2 A Wilms tumor eredetének új modellje

A WT és NR kialakulásának alapvetően új szemléletét az alábbi ábrán foglaltuk össze:

Differentiation of ureteric bud tip in Wilms' tumour



(Sarkany et al. Scientific Reports, közlésre elküldve).

Az embryonális vesében a MM és UBT az IMM-ból alakul ki, két különböző irányban differenciálódik, de megtartja a sejtproliferációs képességét (self-renewal capacity). Az MM pluripotenciális sejtjeiből alakul ki egyrészt a vese strómája valamint a nefron a kivezető tubulusok kivételével. Az UBT ampulla képezi a sejt rezervoárt a CNT és CD kialakítására. Az UBT-ből kialakuló CD sejtjei elsősorban a prekursor sejtekre jellemző CA2 expressiót mutatják, majd a régebbi CD szakaszban megjelenik a PC sejtekre jellemző AQP2 expresszió. A CA2 pozitív fiatalabb UB törzsben először differenciálatlan non- α non- β -IC sejtek, majd a vese fejlődés későbbi szakaszában először a β -IC sejtek majd az α -IC sejtek jelennek meg. Amint az ábrán látható a szaggatott vonallal bekeretezett sejtek típusok vesznek részt a NR és WT kialakulásában. A vese működés fenntartásához szükséges teljesen differenciálódott AQP2 pozitív PC valamint β -IC és α -IC sejteket nem figyeltünk meg sem NR-ben sem WT-ban.

Az irodalomban elfogadott ténnyel ellentétben egyértelműen kimutattuk, hogy a Wilms” tumor kialakulásában az UB ampulla sejtjei is részt vesznek, amelyek tumoros körülmények között is képesek differenciálódni. Ezért a WHO meghatározás nem felel meg valóságnak. Javasoljuk a WT meghatározására: ***“Wilms’ tumor is a malignant embryonal neoplasm derived from pluripotential cells of nephrogenic blastema and of ureteric bud”.***

6. Közlemények

6.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

Sarkany Beatrix, Kovacs Gyula. Connecting tubules develop from the tip of the ureteric bud in the human kidney.

Histochem. Cell Biol. 156:555-560 (2021).

IF: 4.304

Sarkany Beatrix, Kovacs Gyula, Banyai D. Ureteric bud-derivatives in Wilms' tumor and nephrogenic rest.

In Vivo 35:2159-2162 (2021).

IF: 2.15

Sarkany Beatrix, Kuthi Levente, Kovacs Gyula. Pluripotential cells of ureteric bud tip are involved in the development of nephrogenic rest and Wilms' tumor. Scientific Reports (submitted)

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora

IF: 6.459

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Professzor KOVÁCS GYULÁNAK, témavezetőmnek, aki elfogadott diákjának, megtanított az immunhisztológiai technikára és végig mellettem állt. Köszönöm, hogy bevezetett a gyakorló orvos számára ismeretlen tudományos világba.

Köszönöttem tartozom szerzőtársaimnak, dr. Kuthi Leventének a jól dokumentált Wilms's tumorok metszeteiért, és dr. Banyai Danielnek a közös munkáért.

Köszönöm Székelyhidi Ilona grafikusnak, aki tézisemet esztétikussá varázsolta.

Köszönöm ÉDESANYÁMNAK, aki mindvégig segített támogatásával.

.