

A kromofób veserák és a vese onkocitóma differenciáldiagnózisa

Doktori (PhD) értekezés

Szerző: Dr. Molnár Ágnes

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

Urológiai Klinika



Pécs, 2020

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezetők: Prof. Dr. Kovács Gyula

Dr. Szántó Árpád

A kromofób veserák és a vese onkocitóma differenciáldiagnózisa

Doktori (PhD) értekezés

Szerző: Dr. Molnár Ágnes

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

Urológiai Klinika



Pécs, 2020

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezetők: Prof. Dr. Kovács Gyula

Dr. Szántó Árpád

1.Bevezetés

A vese tumor a férfiakban a 9., míg nőkben a 14. leggyakoribb malignus betegség, 1,5:1 férfi túlsúllyal, incidenciája a fejlett országokban lényegesen magasabb. A modern képalkotó vizsgálatoknak köszönhetően manapság a daganatok jelentős része incidentálisan, korai fázisban kerül felismerésre. A szimptomatikus esetek kb. 50%-ában hematuria, 40%-ában lágyéktáji fájdalom, 25%-ában tapintható terime és 30%-ában metasztázisra utaló tünet, mint a csontfájdalom, éjszakai izzadás, gyengeség, súlyvesztés és hemoptoe veti fel vesedaganat gyanúját. A betegek kevesebb, mint 10%-ánál jelentkezik a klasszikus triád, a tapintható hasi terime, makroszkópos hematuria és a fájdalom. Az esetek kb. 30%-a paraneopláziás tünetek miatt kerül felismerésre. 1886-ban Grawitz írta le először a vese tumorok keletkezését, eredetüket az eltévedt mellékvese szigetekből vezette le, melyek gyakran láthatók a vese tokja alatt. Ez alapján hipernefrómának, vagy leírója után Grawitz-tumornak nevezték el. Az '50-es években elektronmikroszkópos vizsgálattal hasonlóságot találtak a daganatsejtek és a proximális tubulusok hámja között, így egységesen adenokarcinómának nevezték el az amerikai irodalomban. Az AIFP (Armed Force Institute of Pathology) által kiadott klasszifikációk megkülönböztettek világos sejtes, granulár sejtes és kevert sejtes vesekarcinómát és a patológiai leírás során utaltak azok trabekuláris, tubuláris, papilláris és szolid formájára. A '70-es években elektronmikroszkópos és enzimhisztokémiai vizsgálatok alapján Thoenes és munkatársai világos sejtes, kromofil és kromofób vese tumort, valamint vese onkocitómát különböztetett meg, mely a Mainz-klasszifikáció néven került be az irodalomba. Ezen beosztás a korábbiakhoz hasonlóan nem egyértelműen reprodukálható, mivel a tumorok fenotípusát veszi alapul az osztályozás során, azonban Thoenes érdeme, hogy elsőként írta le a kromofób veserákot, mint egy új humán vese tumor entitást. A daganatok jelentős hányada igen heterogén megjelenést mutat, ami megnehezíti a pontos osztályozást a rutin szövettani vizsgálatok során, emellett a kevert növekedési és citológiai formák téves diagnózis felállításához vezethetnek. A '80-as évek végén a Kovács és munkatársai által Heidelbergben elkezdett kromoszóma vizsgálatok hozták az áttörést. A 7-es, 17-es valamint a

8-as, 12-es, 16-os és 20-as kromoszómák triszómiája és az Y kromoszóma vesztese alapján elkülönítették a papilláris vese tumort, mint genetikai és biológiai entitást. A leggyakrabban előforduló vese tumorban, amit mai nomenklatúrával konvencionális veseráknak nevezünk, leírták a 3-as kromoszóma delécióját a tumorok több mint 95%-ában, valamint igazolták, hogy a von Hippel-Lindau gén mutációja kizárólag csak konvencionális veserákban fordul elő. A kromofób daganatoknál a citogenetikai vizsgálatok csakúgy, mint a későbbi DNS vizsgálatok, jellemző kromoszómavesztést, mint az 1-es, 2-es, 6-os, 10-es, 13-as, 17-es és 21-es kromoszómák monoszómiáját fedték fel. A vese onkocitoma jellemző kromoszómális elváltozásai is ekkor kerültek először leírásra. Ezen kromoszóma, és a későbbi DNS vizsgálatok alapján egy alapvetően új vese tumor osztályozás született meg, és mint a „Heidelberg Classification of Renal Cell Tumors” került közlésre. A heidelbergi csoport kidolgozta ezen kívül a vese tumorok differenciáldiagnosztikájára alkalmas mikroszatellita vizsgálatot, mellyel a fent említett négy fő daganat típus olcsó és megbízható módon különíthető el. 1997-ben az amerikai Mayo Klinikán az UICC (Union Internationale Contre le Cancer) és az AJCC (American Joint Committee on Cancer) Storkel vezetésével egy az egyben plagizálta a Heidelbergi klasszifikációt, emellett kiegészítették az összes vese tumor 1-2%-át kitevő rendkívül ritka tumorok katalógusával, majd ismételten visszatértek a morfológián alapuló osztályozáshoz. A későbbiekben a daganatokat megjelenésük alapján további alcsoportokra osztották a korábban leírt genetikai eltérések figyelembe vétele nélkül. A szövettani kép alapján sok esetben nem tudták elkülöníteni az onkocitómát és a kromofób vese daganatot, így bevezették a „hibrid onkocitás kromofób tumor” (HOCT) fogalmát.

A vese onkocitoma a vese tumorok 5-8%-át teszi ki. Makroszkóposan jól körülhatárolt, a vese kortexében elhelyezkedő terime, mely leggyakrabban szoliter megjelenésű, azonban ritkán lehet multifokális és kétoldali is. Onkocitózis leggyakrabban a Birt-Hogg-Dubé szindrómához társul. Szövettani képe igen változatos, típusosan erősen eozinofil citoplazmájú, ún. onkocitákból áll. Ezen sejtek kis, kerek, szabályos sejtmaggal

rendelkeznek, gyakoriak a binukleáris sejtek is. Jellemző ezen kívül a sejtek szolid, fészkes növekedése is, azonban ritkán tubuláris vagy cisztikus elrendeződést mutatnak. Immunhisztokémiai profilja is változatos, a nemzetközi irodalomban nem található az onkocitómára specifikus marker. A sporadikus forma molekuláris genetikájára jellemző az 1-es és 14-es kromoszóma monoszómiája, a 11q13 régió érintésével létrejött kiegyensúlyozott átrendeződés, valamint a férfiakban az Y kromoszóma vesztese. Emellett a Birt-Hogg-Dubé szindróma esetén a folliculin (FLCN) gén autoszomális domináns mutációja fordul elő.

A kromofób veserák a vese daganatok kb. 5-7%-át teszik ki. Makroszkóposan jól körülhatárolt, általában nagyméretű daganat. Mikroszkóposan típusosan alig festődő, retikuláris citoplazmával rendelkeznek, azonban leggyakrabban enyhe eozinofil citoplazmájú sejtekkel keverednek. Sejtmagjuk szabálytalan megjelenésű, melyet perinukleáris halo vesz körül. A széles sejtsoportokat általában vékony szeptum választja el egymástól, azonban tubuláris és papilláris növekedési forma is előfordul. 2-8%-uk szarkómás átalakuláson mehet át. Immunhisztológiai vizsgálatok során a citokeratin 7 (KRT7) bizonyult a kromofób vese tumorra specifikus markernek. Molekuláris patológiájára jellemző az 1, 2, 6, 10, 13, 17 és 21-es kromoszóma monoszómiája.

A mindennapi gyakorlatban a kromofób veserák és az onkocitóma diagnózisa hematoxin és eozin festett metszetek megítélésével történik, amely a típusos szövettani esetekben egyértelmű. A nem típusos metszeteknél azonban a diagnózis még a gyakorlott patológus számára is nehézségekbe ütközik. Ilyen esetekben a következő lépés az immunhisztológiai vizsgálat elvégzése lenne, amely azonban megfelelő marker hiányában nehezített. A két tumor közötti diagnosztikus értékű kromoszomális, illetve DNS elváltozásokon alapuló módszerekhez pedig ritkán nyúlnak.

2. Célkitűzés

- laboratóriumban rendelkezésre álló, genetikai módszerrel egyértelműen igazolt 77 kromofób veserák és 42 vese onkocitóma szövettani variációjának elemzése
- a kromofób veserák és a vese onkocitóma principális sejt, α - és β -interkaláris sejt eredetének vizsgálata
- olyan differenciál diagnózisra alkalmas immunhisztokémiai marker azonosítása, mellyel az onkocitóma és a kromofób veserák egyértelműen elkülöníthető.

3. Anyag és módszer

Előzetesen Heidelbergben olyan vese tumorok globális génexpresszióját vizsgálták, amelyeket DNS vizsgálatokkal egyértelműen kórisméztek. Az RNS alapú vizsgálatokhoz felhasznált friss tumoros és normál vese szövetminták gyűjtése a Heidelbergi Ruprecht-Karls-Egyetem Urológiai Klinikáján 1995-1996-ban operált betegekből történt. Frissen a tumorból vett homogén szövetminta folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztását végezték, majd a mintát további feldolgozásig -80°C hőmérsékleten tárolták. A műtéti preparátumot 4%-os formaldehidben fixálták, majd szövettani vizsgálatra küldték. A szövetminták felhasználását a Heidelbergi Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. A vizsgálati anyag előkészítése és az adatok kiértékelése a Heidelbergi Ruprecht-Karls-Egyetemen Prof. Dr. Kovács Gyula vezetésével működő Molekuláris Onkológiai Laboratóriumban történt. A hibridizációt a Heidelbergben működő EMBL (European Molecular Biology Laboratory) genomikai részlegén végezték el a Molekuláris Onkológiai Labor munkatársai. A dolgozatban vizsgált biomarkerek kiválasztása az Affymetrix adatok kiértékelésének figyelembe vételével történt meg.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a Heidelbergi Molekuláris Onkológiai Laborba küldött, valamint a Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikán 2000 januárja és 2014 decembere között operált kromofób vese tumoron és onkocitómán végeztük el. A markerek

specifitásának megítélésére 220 konvencionális és 121 papilláris vese tumort, valamint egészséges főtális és felnőtt vese szövetét is bevontunk a munkába. A szövettani diagnózis minden esetben felülvizsgálatra került a Heidelbergi Klasszifikációnak megfelelően. A szövetminták gyűjtését és feldolgozását a PTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyének birtokában végeztük (Etikai engedély száma: 5343/2014).

3.1. DNS extrakció, array-CGH és adatelemzés

Az array CGH vizsgálatokat egy kollaboráció keretében Dr. Maria Yusenkovával (Münster, Németország) végeztük el.

A tumor részletek hematoxilín és eozin festett metszeteken megjelölésre kerültek, majd eltávolítást követően a fragmentumok deparaffinálása történt xilollal, melyet rehidráció és szárítás követett. A DNS a Dneasy Blood and Tissue Kit (#69504, Qiagen) segítségével került izolálásra, majd vízben feloldásra, ezt követően a NanoDrop®ND-100 spektrofotométer segítségével meghatározásra került a minősége. Csak azok a DNS-ek kerültek felhasználásra, amelyekben az A260/A280 aránya 1:8 felett volt. A DNS-t ezt követően az ULS-Cy5 és ULS-Cy3 Universal Linkage Systemmel jelölték és a 4x44K HG-CGH array-re (Amadid 014950, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Germany) hibridizálták. A jelölt tumor és normál DNS kombinálásra került, majd 65°C-on egy rotációs kamrában 40 óra hibridizáció történt. Mosás és szárítás után az array azonnal leolvasásra került az Agilent DNA Microarray Scanner-rel. Az adatokat az Agilent CGH Analytics software segítségével tovább értékelték, ahol a DNS kópiaszám emelkedést és csökkenést \log_2 ratio >0.25 és \log_2 ratio <-0.5 értékeknél határozták meg.

3.2. Szöveti microarray (Tissuemicroarray, TMA)

A vizsgálat során főtális és felnőtt egészséges veseszövetet, kromofób veserákot és vese onkocitómát, valamint kontrollként papilláris és konvencionális veserákot tartalmazó paraffin blokkokat használtunk fel a tissue microarray (TMA) készítéséhez. A tumoros blokkokból készített hematoxilin-eozin festett metszetek áttekintése során került kijelölésre a mintavétel helye. Ezt követően a kijelölt területnek megfelelően a paraffinba ágyazott szövetblokkból Manual Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, USA) készülék segítségével 0.6 mm átmérőjű szövethengereket emeltünk ki. Az így nyert szövethengereket az MTA készülék segítségével egy közös paraffin blokkba ágyasztuk be, lehetővé téve 150 különböző minta egy metszeten történő, egyidejű vizsgálatát.

3.3. Immunhisztokémia

A vizsgálatokat az Urológiai Klinika Laboratóriumában végeztük el. Minden antitestet teszteltünk az optimális hígításra, a feltáráshoz használt puffer pH-jára, valamint a primer antitesttel való inkubáció idejére. A TMA-kból, főtális és felnőttkori vesékből készített 4µm vastagságú metszetekből a paraffint xilol segítségével eltávolítottuk, majd a metszeteket leszálló etanol sorozatban rehidráltuk. Ezt követően az antigén feltáráshoz 10 mM nátrium-citrát pufferben (pH 6,0), vagy Tris-EDTA (TE) pufferben (pH 9,0) történő forralással értük el, amit a 2100-Retriever (Pick-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia) készülékben végeztünk el. Az endogén peroxidáz aktivitás és a nem specifikus kötőhelyek blokkolása 1% normál ló szérumot tartalmazó 0,3%-os hidrogén-peroxidban történt szobahőmérsékleten 10 percig. Ezt követően a metszeteket egy éjszakán át nedves kamrában 4°C-on inkubáltuk.

A következő primér antitesteket használtuk fel:

- nyúl poliklonális anti-AQP2 antitest (PA5-38004, ThermoFisher, Budapest, Hungary)
1:500 hígításban,

- nyúl poliklonális anti-FOXI1 antitest (PA5-30031, ThermoFisher) 1:200 hígításban,
- nyúl poliklonális anti-SLC4A1 antitest (HPA015584, SigmaAldrich Budapest, Hungary) 1:200 hígításban,
- egér poliklonális anti-SLC26A4 antitest (LotNo. 12065, Abnova, Taipei, Taiwan) 1:100 hígításban,
- nyúl poliklonális anti-CD82 antitest (HPA 028900, SigmaAldrich) 1:200 hígításban,
- nyúl poliklonális anti-AQP6 antitest (PA5 53296, ThermoFisher) 1:100 hígításban,
- egér monoklonális anti-KRT7 antitest (ab9021, Abcam, Cambridge, UK) 1:300 hígításban.

Szekunder antitestnek Horse-radish-peroxidázhoz (HRP) kötött nyúl és egér specifikus antitestet használtunk, amellyel a lemezeket 30 percig inkubáltuk. Kromogén szubsztrátnak AEC-t vagy DAB-ot használtunk, a magfestést Mayer's Haematoxylinnal (Lillie's modification) végeztük el, majd a lemezeket vagy Glycergél-lel vagy Pertex-el lefedtük. A kiértékelést Leica Laborlux S mikroszkóppal végeztük el, a fotókat Leitz DMRBE mikroszkópra helyezett ProgRes C14 kamerával készítettük.

4. Eredmények

4.1. Kromoszóma eltérések

Az általunk 77 kromofób vese tumoron elvégzett DNS-array vizsgálat során a leggyakoribb kromoszómavesztés az 1-es (95%), a 2-es (94%), a 10-es (90%) és a 17-es (90%) kromoszóma esetén fordult elő. Ezen kívül a 6-os (86%), a 13-a (82%) és a 21-es (66%) kromoszóma vesztése tartozott a gyakori, specifikus elváltozások közé. A 9-es, 3-as, 8-as és 18-as kromoszóma monoszómiája a kromofób veserákok 12-36%-ában volt megfigyelhető. A 42 megvizsgált vese onkocitómában az alábbi eltérések voltak láthatók. Az 1-es kromoszóma

monoszómiája az esetek 23%-ában, míg a 14-es kromoszóma vesztese az esetek 9%-ában fordult elő. Emellett néhány véletlenszerű kromoszomális elváltozás volt megfigyelhető.

4.2. A jellemző kromoszóma elváltozások megoszlása a kromofób veserák esetén

A monoszómiák száma 3 és 12 között változott, mely 34-43 közötti kromoszómaszámot eredményezett. Ez extrém esetben majdnem haploid kromoszómaszámot jelent. Leggyakrabban a 6-os és 7-es kromoszóma vesztesét figyeltük meg. Az eozinofil citoplazmájú daganatoknál a 3, 4, 6, 9 és 11-es kromoszóma monoszómiája fordult elő, mely hasonló a klasszikus kromofób formák esetén észleltekhöz.

4.3. A kromofób veserák szövettani változatossága

A 77, genetikai vizsgálattal egyértelműen kórismézett kromofób veserák szövettani metszeteit átnézve négy, különböző citogenetikai megjelenésű típust tudunk elkülöníteni. Ezek nagy, retikuláris citoplazmájú sejtek, finom retikuláris sejtek mikrovezikulákkal, halvány eozinofilen festődő plazmájú sejtek perinukleáris halóval és kettős sejtmaggal, valamint közepes nagyságú eozinofil citoplazmával rendelkező sejtek, melyek leggyakrabban kevert formában jelentek meg. Csak négy olyan daganatot találtunk, amely kizárólag tiszta retikuláris citoplazmájú sejtekből épült fel és csak hét olyan tumort, amelyet kizárólag eozinofil sejtek alkottak. 6 esetben figyeltünk meg metasztázist a műtét idején, melyek közül 3 eset eozinofil tumor volt. Egy esetben a máj metasztázisból készült szövettani vizsgálat is az eozinofil sejt dominanciáját igazolta. Egy másik eozinofil sejtes daganatnál multiplex csontáttétek igazolódtak, amely eset korábban metasztatikus vese onkocitómaként került publikálásra. A harmadik daganat szarkomatózus átalakulást is mutatott. Az irodalomban szubtypusként jelzett növekedési formákat is megvizsgáltuk a 77 esetünkön. 5 daganatnál azonosítottunk mikrocisztikus és papilláris formát minden esetben szolid növekedéssel kombinálva. Hét

tumornál észleltünk Psammoma testecskét pigmentált területekkel. Egy esetben szokatlan, komedo-szerűen növvő, elhalt sejtekkel kitöltött lument észleltünk, amelynek falát egyértelműen kromofób veseráknak bizonyuló sejtek borították.

4.4. A vese onkocitóma szövettani változatossága

Az általunk genetikai vizsgálattal igazolt 42 vese onkocitóma metszeteit is megvizsgáltuk a szövettani változatosságra figyelve, különös tekintettel a kromofób vese tumor eozinofil variációjára. 7 esetben találtunk erős sejtmag polimorfíát számos binukleáris sejttel. Négy daganatnál tubuláris-fészkés elrendeződésű eozinofil sejteket igazoltunk a kromofób tumorra jellemző perinukleáris felritkulással.

4.5. A vese onkocitóma és a kromofób veserák immunhisztokémiája

A vese kivezető csatorna három meghatározott funkciójú sejttípusból épül fel, úgy, mint principális, α -interkaláris és β -interkaláris sejtekből. Korábbi immunhisztológiai vizsgálatok során arra a következtetésre jutottak, hogy a kromofób veserák a β -interkaláris sejtekből, a vese onkocitóma pedig az α -interkaláris sejtekből indul ki. Kísérletes in vitro munkák, valamint knockout egerek vizsgálata alapján az IC differenciálódását a FOXI1 transzkripció faktor kontrollálja. A kérdés megválaszolására megvizsgáltuk a három sejttípusra jellemző immunhisztológiai markerek, azaz az AQP2, SLC4A1, SLC26A4 valamint a FOXI1 kifejeződését főtális és felnőtt vesében és kromofób veserákot és vese onkocitómát tartalmazó TMA-n. Ezen kívül az előzetes az Affymetrix génexpressziós térképről kiválasztottunk két, az onkocitómában (AQP6) és kromofób veserákban (CD82) erőteljesen kifejeződő gént. Végül az irodalomban bizonytalanul megítélt KRT7 expresszióját néztük meg 83 vese onkocitómát, 90 kromofób veserákot valamint 220 konvencionális és 121 papilláris veserákot tartalmazó TMA-kon.

4.5.1. Aqaporin 2 (AQP2)

A kivezető csatorna sejteinek döntő többsége principális sejt, melyek felszínén az AQP2 fejeződik ki. Ennek megfelelően a felnőttkori vese kortikális és medulláris csatornák felszínén erős AQP2 expressziót mutattunk ki. Egyetlen onkocitóma vagy kromofób vese tumor esetében sem láttunk pozitív reakciót, emellett a konvencionális és papilláris vesedaganatok sem mutattak pozitívítást.

4.5.2. SLC4A1

Nefrológiai kutatások során az SLC4A1 kifejeződést az α -interkaláris sejtekhez társították, mely a sejtek bazolaterális felszínén fejeződik ki. Irodalmi adatok alapján a felnőttkori vesében a kortikális kivezető csatorna sejtei és kisebb számban a medulláris csatornák sejteiben mutatható ki. Vizsgálataink szerint az SLC4A1 az összekötő csatornák sejteinek jelentős részében is pozitív reakciót mutatott, azonban tumor specifikus kifejeződést nem találtunk. A kromofób vesedaganatok 11%-a, míg az onkocitómák 60%-a mutatott pozitív reakciót. Emellett egyetlen konvencionális vagy papilláris vese tumor sem mutatott pozitív festődést.

4.5.3. SLC26A4

Az irodalmi adatok alapján az SLC26A4 a β -interkaláris sejtek felszínén fejeződik ki. A főtális vesében a terhesség 14 hetétől megjelennek, felnőttkori vesében a kortikális β -interkaláris sejtekben figyelhető meg. A 83 vese onkocitóma közül egy esetben sem figyeltünk meg SLC26A4 expressziót. A β -interkaláris sejt marker SLC26A4 csak egyetlen kromofób veserákban volt pozitív, emellett egyetlen konvencionális és papilláris vese tumor esetén sem észleltünk pozitív festődést.

4.5.4. FOXI1

A FOXI1 immunhisztokémiai vizsgálata során a kortikális kivezető csatornák és az összekötő csatornák sejtmagjaiban láttunk pozitív festődést. A vizsgált 83 onkocitóma közül 80 esetben kaptunk pozitív nukleáris immunreakciót (96%). 90 kromofób vese tumorból csak 3 esetben figyeltünk meg pozitív magfestést, míg a 220 konvencionális és 121 papilláris vese tumorból egyetlen egy sem festődött.

4.5.6. Aquaporin 6 (AQP6)

Az AQP6 a vese kortikális és medulláris kivezető csatorna interkaláris sejteiben fejeződik ki. A pozitív sejtek aránya a kortikális tubulusokban nagyobb volt, mint a disztális csatornában. A vese onkocitómák 92%-ában pozitív reakciót kaptunk, míg a kromofób vese tumoros eseteknél mindössze 6%-ban. Az előbbi esetben a sejtek 80-90%-ában volt megfigyelhető, míg az utóbbi esetekben csak a sejtek egy részén mutatkozott és rendkívül gyenge festődést mutatott. A konvencionális és papilláris tumorok esetében ebben az esetben sem láttunk pozitív reakciót.

4.5.7. CD82

A vesében az összekötő csatornák, valamint a kortikális és medulláris gyűjtőcsatornák sejtejei mutatnak pozitív reakciót CD82 antitesttel. A kromofób veserákban a sejtmembrán erősen pozitívan festődött, a citoplazmatikus festődés követte a sejtek citológiai változatosságát, azaz retikuláris vagy eozinofil citoplazmának megfelelően gyengébb vagy erősebb festődés. A kromofób veserákok közül 70 tumor mutatott pozitív immunreakciót. Egyetlen vese onkocitómában sem találtunk pozitív festődést mutató sejteket, csakúgy, mint a konvencionális és a papilláris vese tumoroknál sem.

4.5.8. Citokeratin 7 (KRT7)

A KRT7 immunhisztokémiai vizsgálatával 84 kromofób vese daganatnál figyeltünk meg diffúz pozitív reakciót, mely független volt a tumorok citológiai variációjától és a növekedési formájától. Ugyanazon biopszián belül különböző intenzitású reakció volt megfigyelhető, de a tumor sejtek 91%-a pozitív volt. Diffúz festődést találtunk a korábban metasztatikus onkocitómának diagnosztizált kromofób vese tumor esetén is. Az „onkocitóma-szerű” részében a tumor sejtek citoplazmája granuláris formájú citokeratint tartalmazott, míg a kromofób daganatra hasonló területekben a sejtmembrán mutatott kifejezett pozitivitást. A differenciál diagnosztika alapja, hogy a különböző morfológiájú kromofób vesedaganatok sejteinek legalább 90%-a mutat pozitív immunreakciót KRT7-tel. Ezen festéssel az onkocitóma kis-sejtes tubulo-papilláris részei mutatnak pozitivitást.

A megvizsgált antitestek közül a CD82, KRT7, FOXI1 és az AQP6 bizonyult a mindennapi gyakorlatban használható diagnosztikus markernek. Sem a KRT7, sem a CD82 sem ad pozitív eredményt a vese onkocitómában, így ezek specificitása rendkívül magas, így a kétséges esetekben ezen markerek pozitivitása minden esetben a kromofób vese tumor diagnózisa mellett szól. Mind a FOXI1, mind az AQP6 a vese onkocitómák több, mint 90%-ban bizonyult pozitívnak, azonban sajnos ezen két marker a kromofób veserákok 3, illetve 6%-ában is pozitív eredményt hozott.

5. Megbeszélés

A munka során kiértékelt kromoszomális eltérések egyértelműen bizonyítják, hogy a vese onkocitóma és a kromofób veserák két önálló tumor entitásnak felel meg, függetlenül a sejtmorfológiai és növekedési változatosságtól. A vese onkocitóma is a tankönyvi adatoktól eltérő szövettani képet mutathat, megfelelő tapasztalat hiányában a kromofób veserák ún. eozinofil formájával összetéveszthető. Figyelembe véve a két tumor biológiai viselkedését a

differentiál diagnózisnak döntő szerepe van a tumorok klinikai megítélésében. Ilyen esetekben a genetikai vizsgálat mérvadó lehet. A patológusok jelentős része visszatért a morfológián alapuló osztályzáshoz anélkül, hogy a változó citológiai megjelenés alapján „visszaklasszifikált” szövettani típusok mögött álló genetikai eltéréseket figyelembe vették volna. Ennek következménye lett, hogy az ún. eozinofil-kromofób tumorok csoportjába több vese onkocitoma is bekerült, ami eltorzította a genetikai vizsgálatok eredményét. Egy munkacsoport a next generation sequencing (NGS) technikával végzett vizsgálattal összeállított egy 66 kromofób veserákból álló tumor csoportot, köztük 13 eozinofil-kromofób veserákot. A „klasszikus” kromofób veserákokban megtalálták a jellemző kromoszómavesztést, de a 13 eozinofil tumorból 7 esetben nem fordult elő a kromofób veserákra jellemző genomikus eltérés. Ez az adat arra utal, hogy a diagnózist felállító patológus a 66 tumorból 7 esetben hibás diagnózist állított fel, mert ezek az „eozinofil” kromofób veserákok valójában vese onkocitómák voltak. Egy másik nemzetközi kollaboráció keretében közölt 33 kromofób veserákot magába foglaló szériában nem találtak specifikus kromoszóma eltérést egy „klasszikus” és három „eozinofil” kromofób veserákban. Itt sem lehet kétséges, hogy a patológiai diagnózis helytelen volt. Ezen túlmenően a két analízist összefoglaló csoport arra a következtetésre jutott, hogy az eozinofil kromofób veserákot a rendkívül alacsony kromoszómavesztés jellemzi és így indokolt a „klasszikus” és „eozinofil” kromofób veserák klasszifikáció. A mi vizsgálatunk során nem találtunk különbséget a monszómiák számában a „klasszikus” és az „eozinofil” kromofób tumorok közt. Ennek alapján nem tartjuk indokoltnak a citológiai megjelenésen alapuló szubklasszifikációt. Az általunk vizsgált 77 kromofób veserák közül 7 tumor mutatott kizárólag eozinofil citológiát és minden esetben megtaláltunk a specifikus kromoszómák hiányát, mely jelentős ellentmondásban van a korábban említett két vizsgálattal. A fent említett két vizsgálat konklúziója szerint azok az eozinofil tumorok, amelyek nem mutatják a kromofób veserákra jellemző eltéréseket, rendkívül jó a prognózisúak, a betegek 100%-a tumormentes maradt a követés során. Az általunk genetikailag igazolt 7 eozinofil kromofób veserák közül 3 már a műtét idején áttétet adott, ami ellentmond az eozinofil kromofób veserákok feltételezett jó

prognózisának. Ezek az adatok tovább erősítik a gyanúkat, hogy a kromofób veseráknak diagnosztizált vese onkocitómát vettek bele a vizsgálati anyagba. A 42 vese onkocitómát, annak ellenére, hogy több szokatlan megjelenésű tumor volt köztük, a szövettani kép alapján vese onkocitómának diagnosztizáltuk. 4 eset onkocitómátózisból származott, melyek szokatlan szövettani képet mutattak, azonban a genetikai vizsgálat megerősítette a diagnózist. Figyelembe véve saját adatainkat, valamint az irodalmi adatokat, az 1-es, 2-es, 6-os, 10-es, 13-as, 17-es és 21-es kromoszóma monoszómiája minden kétséget kizáróan a kromofób veserákot jellemzi, függetlenül a citológiai variációktól. Ezeknek a kromoszómaeltéréseknek a hiánya, egyértelműen a vese onkocitóma diagnózisa mellett szól.

A kivezető és gyűjtőcsatorna sejtségei között különböző funkciójú sejtek találhatók a rájuk jellemző markerekkel: principális sejtek (AQP2), α -interkaláris sejtek (SLC4A1), β -interkaláris sejtek (SLC16A4). Az SLC4A1 és SLC26A4 kifejeződését, és így az α - és β -interkaláris sejtek differenciálódását a FOXI1 transzkripciós faktor szabályozza. Az α -interkaláris sejt marker SLC4A1 a vese onkocitómák 60%-ában volt pozitív, de a kromofób veserákok 11%-ában is festődött. A β -interkaláris sejt marker SLC26A4 csak egyetlen kromofób veserákban adott pozitív reakciót és így kizárja annak a lehetőségét, hogy a kromofób veserák a β -interkaláris sejtekből indul ki.

A FOXI1 transzkripciós faktor a vese onkocitómák 97%-ában adott pozitív reakciót és így rámutatott a vese onkocitóma és FOXI1 közötti összefüggésre. Ez azért is meglepetés, mert a FOXI1 kontrollálja az α -interkaláris és β -interkaláris sejtek differenciálódását, és az ezekre jellemző marker SLC4A1 és SLC26A4 nem társult a FOXI1 pozitivitáshoz.

A vizsgálataink alapján jól használható kromofób veserák specifikus marker a KRT7. A mi tapasztalatunk szerint a kromofób veserák diffúz pozitivitást mutat, míg a vese onkocitómában csak néhány tubuláris képlet mutat pozitív festődést. A CD82 a kromofób veserákok 78%-ában mutatott pozitív reakciót, de egyetlen vese onkocitóma sem volt pozitív. Ezzel egy másik olyan immunhisztológiai markert azonosítottunk, amely a rutin munkában hasznos lehet. Az AQP6 a vese onkocitómák 92%-ában mutatott pozitív immunreakciót, de sajnos a kromofób

veserákok 6%-ában is kifejeződött. A kromofób veserákban néhol csak halvány festődést lehetett megfigyelni, és nem is minden sejtben, de a pozitivitás intenzitásában volt átfedés a vese onkocitómákban megfigyeltéktől. Így nem lehet a két tumor egyértelmű elkülönítésére felhasználni.

Az irodalom áttekintése után és saját vizsgálatom alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a KRT7 és CD82 jól megbízhatóan felhasználható a kromofób veserákok jellemzésére, amennyiben a pozitív eseteket egyértelműen kromofób veseráknak lehet kórismézni. A FOXI1 és AQP6 az onkocitómák 97%-ában ill. 92%-ában fejeződnek ki, az átfedő pozitivitás miatt, különösen az AQP6, csak tájékoztató jellegű diagnosztikus értékkel bírnak.

Anti-test	Onkocitóma (n=83)	Kromofób (n=90)
CD82	0 %	78 %
KRT7	0%	93 %
FOXI1	97%	3%
AQP6	92 %	6 %

6. Következtetések

- A kromofób veserák és vese onkocitóma biológiai és genetikai entitás, amelyek egyértelmű elkülönítésének klinikai jelentősége van.
- Nincs sem biológiai, sem genetikai alapja a „klasszikus” és az „eozinofil” kromofób veserák elkülönítésének. Ezt a citológiai változatot, csakúgy, mint a növekedési formát le lehet írni a szövettani leletben, de nem indokolt bevonnai a diagnózisba.
- Nincs HOCT azaz hibrid onkocitóma kromofób tumor, ezek vagy vese onkocitómának vagy kromofób veseráknak felelnek meg.
- A vese onkocitóma és kromofób veserák eredetét nem sikerült megtalálni, mindkét tumorban előfordul pozitív reakció az α -és β -interkaláris sejtekre jellemző marker.
- A FOXI1 gén kifejeződése egy megbízható marker a vese onkocitóma diagnózisára.
- A CD82 és KRT7 gén a kromofób veserákra jellemző marker.
- Összefoglalva, a legtöbb vese onkocitóma és kromofób veserák szövettani diagnózisa tapasztalt uropatológus számára nem okoz problémát. Azokban az esetekben, amikor a diagnózis nem egyértelmű, az általunk kidolgozott immunhisztológiai panelt, vagy amennyiben a patológiai intézetekben a megfelelő módszer rendelkezésre áll, a genetikai vizsgálatot ajánljuk.

A szerző publikációi

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Molnar, Agnes; Horvath, Csenge Anna; Czovek, Petra; Szanto, Arpad; Kovacs, Gyula:
FOX11 Immunohistochemistry Differentiates Benign Renal Oncocytoma from Malignant
Chromophobe Renal Cell Carcinoma

Anticancer Research 39 : 2785-2790, 2019.

IF: 1.935

2. Agnes Molnar, Maria Yusenko, Gyula Kovacs: Eosinophilic variant of chromophobe renal
cell carcinoma: a potential diagnostic pitfall

Pathology, submitted.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impact faktora: 1.935

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

1. Molnár Á, Villányi K, Szántó Á: Tromboprofilaxis az urológiában – Kinek? Mikor?
Mennyit?

Magyar Urológia 30: 156-162., 2018.

2. Takacs I, Horvath S, Molnar A, Gaspar S, Hajos R, Meczker A, Kobor P, Lantos J, Javor S,
Balatonyi B et al. Comparative immunohistochemical study of tissue integration of
macroporous and laminar surgical meshes.

Histology and Histopathology 26: 821-830, 2011.

IF: 2.48

3. Takács I, Horváth Sz, Balatonyi B, Jávör Sz, Molnár Á, Gáspár S, Hajós R, Meczker Á,
Lantos J, Róth E et al. A különböző szilikon bevonatú polipropilén hálók szöveti integrációja.

Magyar Sebészet 63:340-346, 2010.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani egyik témavezetőmnek, Prof. Dr. Kovács Gyulának, hogy annyi éven át felkeltette, majd fenntartotta és kitartóan támogatta tudományos érdeklődésemet és munkásságomat az alapkutatások területén is. Emellett a közös munkánk szüneteiben élettapasztalataival és világlátottságával a hétköznapi élet számos terén is jelentősen hozzájárult a fejlődésemhez. Köszönöm emellett másik témavezetőmnek, Dr. Szántó Árpád tanár úrnak, aki a klinika vezetése mellett külön figyelmet fordított és számtalan támogatást is szerzett tudományos munkám megteremtéséhez. Emellett azt is lehetővé tette, hogy klinikai munkám mellett a tudomány oltárán is áldozhassak. Köszönettel tartozom emellett a PTE Urológiai Klinika orvoskollégáinak, hogy olykor áldozatos munkájukkal pótolták a betegellátás rovására, dolgozat megírására fordított időmet.

Köszönöm a fent említettek mellett Dr. Maria Yusenkonak, illetve a Heidelbergi Molekuláris Onkológiai Labor munkatársainak, hogy korábbi munkájuk eredményét felhasználhattam dolgozatom alapjául.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak és páromnak, hogy türelmükkel és megértésükkel támogattak abban az időben, amit a dolgozatom megírásával töltöttem.