

DOI:10.14753/SE.2019.2278
**Aquaporin-1 expresszió jelentősége kután melanoma
metasztatikus progressziója során**

Doktori értekezés

Dr. Imrédi Eleonóra

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tímár József, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Méhes Gábor, DSc, egyetemi tanár
Dr. Kárpáti Sarolta, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Wikonkál Norbert, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lakatos Péter, DSc, egyetemi tanár
Dr. Jäckel Márta, PhD, osztályvezető főorvos

Budapest

2019

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
1 Bevezetés	7
1.1 Epidemiológiai adatok	7
1.2 A kután melanoma klinikopatológiai típusai	8
1.3 Rizikófaktorok szerepe	11
1.3.1 Az UV sugárzás összefüggése a melanomával.....	11
1.4 Hagyományos prognosztikus markerek jelentősége kután melanomában.....	12
1.4.1 Breslow-féle tumorvastagság	13
1.4.2 Mitotikus ráta (MR).....	13
1.4.3 Ulceráció.....	13
1.4.4 Tumort infiltráló limfociták.....	14
1.4.5 Clark-szint	14
1.4.6 Tumorregresszió	14
1.4.7 Limfovaszkuláris invázió (LVI).....	15
1.4.8 Mikroszatelliták.....	15
1.4.9 Őrszemnyirokcsomó metasztázisok jelentősége	15
1.5 TNM-klasszifikáció (American Joint Committee on Cancer, 2017).....	16
1.6 A kután melanoma kezelése.....	19
1.6.1 A primer melanoma sebészi kezelése.....	19
1.6.2 Nyirokcsomó - blokkdisszekció	19
1.6.3 Sugárterápia	19
1.6.4 Kemoterápia.....	20
1.7 A kután melanoma progresszióját befolyásoló jelátviteli útvonalak és a célzott onkoterápiák.....	21
1.7.1 MAPK jelpálya.....	21
1.7.2 A MAPK jelátviteli út célzott terápiája	22
1.7.3 PI3K/Akt jelpálya.....	23
1.8 Immunterápia	23
1.8.1 Adjuváns interferon	24
1.8.2 Anti-CTLA-4 antitest terápia	24
1.8.3 Anti-PD-1 terápia	25
1.8.4 Indolamin-2,3 - dioxigenáz (IDO).....	25
1.9 Az aquaporinok	25

1.9.1	Az aquaporinok funkciója	25
1.9.2	Az aquaporin-1 szerkezete, előfordulása.....	26
1.9.3	Az aquaporinok jelentősége a tumorprogresszióban	26
1.9.4	Experimentális adatok: az AQP1 - expresszió jelentőségéről melanoma malignumban.....	27
2	Célkitűzések	29
3	Módszerek	30
3.1	Betegcsoportok és a klinikai utánkövetés	30
3.2	Immunhisztokémia.....	31
3.2.1	Immunhisztokémiai értékelés	32
3.3	BRAF V600 mutáció analízis	32
3.4	Statisztikai módszerek	33
4	Eredmények.....	34
4.1	Alacsony és magas rizikójú betegcsoportok klinikai utánkövetése és hisztopatológiai jellemzői	34
4.2	Fokozott AQP1-protein expresszió a magas rizikójú melanomákban.....	38
4.3	A BRAF V600 mutáció jelenléte korrelál az AQP1 - expresszióval.....	41
4.4	Az AQP1 - expresszió összefügg a progressziómentes és teljes túléléssel	41
4.5	Az AQP1 expressziója fokozott a kútan melanoma központi idegrendszeri progressziója során.....	43
4.5.1	Metasztatikus betegcsoportok összehasonlítása és klinikai utánkövetése.....	44
4.5.2	Az intracranialis áttétet adó primer melanoma AQP1- expressziója magasabb az extracranialis áttétet adó melanománál.....	47
5	Megbeszélés	51
5.1	Az AQP1 expresszió klinikai jelentősége.....	51
5.2	Az AQP1 fehérje expressziójának összefüggése a BRAF V600 mutációval	52
5.3	Az AQP1 hatása a sejtmigrációra	53
5.4	A szöveti hypoxia hatása az AQP1 expresszióra.....	54
5.5	Az AQP1 expresszió befolyásolja az angiogenezist	55
6	Következtetések.....	57
7	Összefoglalás.....	58
8	Summary	59
9	Irodalomjegyzék.....	60
10	Saját publikációk jegyzéke	73
11	Köszönetnyilvánítás	74

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Magyarázat és feloldás
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Acrolentiginosus melanoma
APAF 1	Apoptotic protease activating factor 1
AQP1	Aquaporin-1
BRAF	Murine sarcoma viral oncogene homolog B
CCND1	Ciklin D 1
CDKN2A	Ciklindependens kináz 2 A
CDK4	Ciklindependens kináz 4
CT	Computertomográf
CTLA-4	Citotoxikus T-limfocita antigén (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)
DNS	Diszpláziás névusz szindróma
EGFR	Epidermalis növekedési faktor receptor
EMA	Európai Gyógyszerészeti Ügynökség (European Medicines Agency)
FDA	Food and Drug Administration
HIF	Hypoxia inducible factor
IDO	Indolamin-2,3 – dioxigenáz
INF	Interferon

LMM	Lentigo maligna melanoma
MAPK	Mitogén aktiválta proteinkináz
MC1R	Melanocortin 1 receptor
MITF	Microphthalmia-asszociált transzkripció factor
MM	Melanoma malignum
MR	Mitotikus ráta
MRI	Mágneses rezonancia vizsgálat
NK sejtek	Természetes ölő sejtek (natural killer cells)
NM	Nodularis melanoma
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NRG	Neuregulin
OS	Teljes túlélés (overall survival)
PD-1	Programozott sejthalál 1
PI3K	Foszfatidil - inozitol - 3 – kináz
PFS	Progressziómentes túlélés (progression free survival)
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SLNB	Őrszem (Sentinel)-nyirokcsomó biopszia

SSM	Szuperficialisan terjedő melanoma (superficial spreading melanoma)
TAOS1	Tumor amplified and overexpressed sequence
TGF α	Transzformáló növekedési faktor alfa
TIL	Tumorinfiltráló limfociták
TP53	Tumor protein 53

1 Bevezetés

A melanoma a neuroectodermális dúcléc eredű sejtekből származó, pigmenttermelő melanocitákból kialakuló malignus tumor. A human melanomák kialakulhatnak korábban már meglévő jóindulatú névusokból, vagy keletkezhetnek újonnan (de novo). A legtöbb melanoma a jelenlegi kutatások alapján de novo jön létre. RFP-RET transzgenikus egerekben sikerrel modellezték a de novo melanomák képződésének többlépcsős folyamatát, amely során tumormentes, jóindulatú, premalignus és malignus stádiumokat különböztettek meg (Kumasaka, Yajima et al. 2010).

1.1 Epidemiológiai adatok

A melanoma malignum (MM) biológiailag a legagresszívebb rosszindulatú bőrtumor, melynek incidenciája világszerte drámai növekedést mutat. A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség által 2010-ben publikált, 182 ország részvételével készített Globocan felmérés szerint melanoma vonatkozásában az 1990 és 2008 évekre vonatkozóan az életkorra standardizált incidenciaráta férfiakban 2,3 –ról 3,1-re, míg nőkben 2,2-ről 2,6-ra növekedett 100 000 lakosra számolva (Parkin, Pisani et al. 1999, Ferlay, Shin et al. 2010).

Az Amerikai Egyesült Államokban történt felmérés alapján a melanoma férfiak körében az ötödik, nőknél a hatodik leggyakoribb daganatos megbetegedés (Siegel, Miller et al. 2018). 2011-ben a melanoma incidenciája 19,7:100 000, míg 2010 és 2014 közötti periódusban 33:100 000 lakosra emelkedett (Guy, Thomas et al. 2015). Közép-Európában 1970 és 2000 között a melanoma becsült incidenciája 3-4:100 000-ről 10-15:100 000-re változott. Európán belül a melanoma előfordulása Skandináviában a legmagasabb, míg a mediterrán országokban a legalacsonyabb. A kután melanoma incidenciájának éves szintű, becsült növekedése populációtól függően 3-7% (Garbe and Leiter 2009). Ez a növekedés Magyarországon is megfigyelhető, az Országos Onkológiai Intézetben 1998-ban 149, míg 2008-ban 377 betegnél diagnosztizáltak kután melanomát, amely bár önmagában nem reprezentatív epidemiológiai adat, de jól mutatja a 10 év alatt bekövetkezett jelentős esetszám változást (Balatoni, Liskay et al. 2011).

Az incidencia növekedésének hátterében a környezeti rizikófaktorok egyéntől függő emelkedése mellett komoly szerepet játszik bőrgyógyászok és a patológusok által korai stádiumban (≤ 1 mm, T1a or T1b) felismert és diagnosztizált esetek egyre növekvő száma, a szűrőprogramok kiterjesztésének köszönhetően.

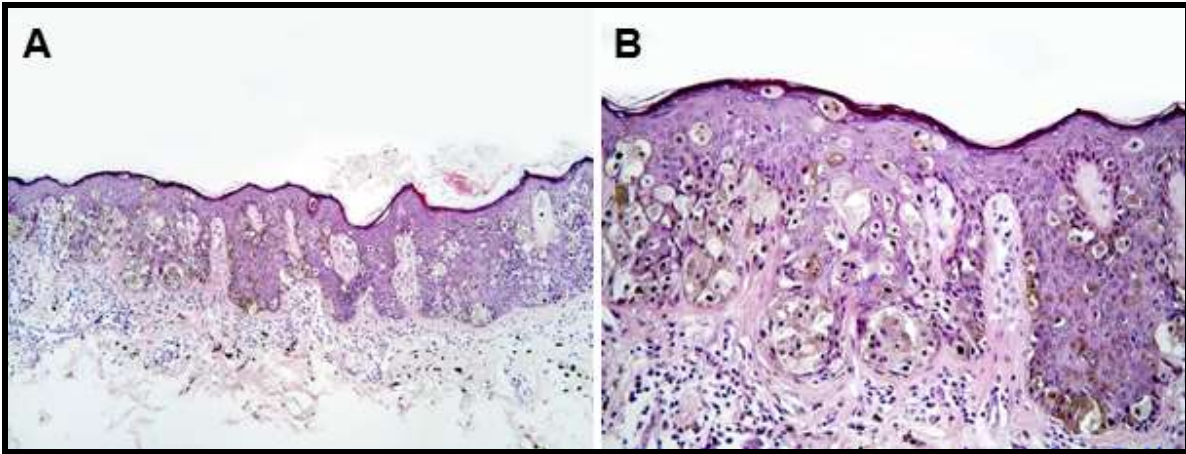
A melanoma előfordulása ritka gyermekekben és serdülőkben, a gyermekkori esetek 90%-a 10 éves életkor felett fordul elő, 55%-a lányoknál. 1973 és 2001 között a melanoma incidenciája évente 2,9%-kal emelkedett a gyermekek körében, az esetek 96,3 %-a kután melanoma, 3% -a okuláris melanoma, míg 0,7%-a ismeretlen lokalizációjú primer tumor volt (Lange, Palis et al. 2007).

A melanoma okozta halálozás ugyancsak jelentősen emelkedik. Az Egyesült Államokban 1990 és 2004 között összességében 0,4 %-os éves szintű emelkedést regisztráltak (Linós, Swetter et al. 2009), a 65 év feletti korcsoportban ugyanakkor a halálozási ráta 6,6%-kal nőtt a férfiaknál, míg 0,7%-kal a nőknél (Jemal, Saraiya et al. 2011).

1.2 A kután melanoma klinikopatológiai típusai

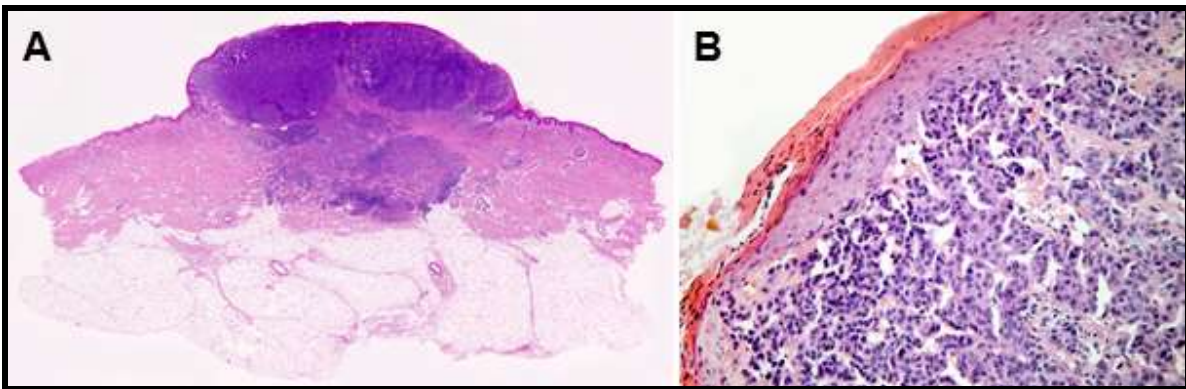
A human kután melanoma hisztogenetikai besorolása az 1960-as évek végére vezethető vissza. Négy fő típusa ismert, a felszínesen terjedő melanoma (SSM), a nodularis melanoma (NM), a lentigo maligna melanoma (LMM) és az acrolentiginosus melanoma (ALM). A ritka szövettani formák közé tartozik a desmoplasticus melanoma, a ballonsejtes melanoma és a spitzoid melanoma (Clark, From et al. 1969). A szuperficiálisan terjedő melanoma és a lentigo maligna melanoma típusok kedvezőbb prognózissal társulnak, mint az acrolentiginosus és nodularis típusok (Plotar, Orosz et al. 2007).

A szuperficiálisan terjedő melanoma fordul elő a leggyakrabban a nem hispániai fehér populáció körében (Wang, Zhao et al. 2016), a melanomák megközelítőleg 70%-a tartozik ebbe a csoportba (Ward, Lambreton et al.) (1.ábra). Elsősorban a napfénykárosodott bőrterületeken, férfiaknál a törzsön, nőknél az alsó végtagokon jelentkezik. Szövettanilag jellemző a melanocyták megjelenése a bazális membrán felett (pagetoid terjedés), az intraepidermalis fészekképződés, a citológiai atípiá, a malignus melanocyták szabálytalan eloszlása és laterális, horizontális terjedése az epidermisen belül. Az intraepidermalis melanomasejtek nagyméretű eozinofil citoplazmával, hólyagos magokkal és hatalmas, multiplex, eozinofil nucleolussal bírnak (Plotar, Orosz et al. 2007).



1.ábra Szuperficiálisan terjedő melanoma (SSM) típusos átnézeti (A, 4x) és nagy felbontású (B, 10x) szövettani képe. Jól látható a pagetoid terjedés, az intraepidermalis fészekképződés, a citológiai atípiá. A felvételek Dr. Plótár Vanda arhívumából származnak.

A nodularis melanoma a második leggyakrabban előforduló szubtypus a fehér populációban, a melanomák mintegy 15-30 %-a tartozik ebbe a csoportba (Kalkhoran, Milne et al. 2010) (2. ábra). Középkorúakban, elsősorban a törzsre lokalizálódó lézió. Jellemzi a vertikális növekedés, így klinikailag kifejezetten rossz prognózissal társul (Plotar, Orosz et al. 2007).

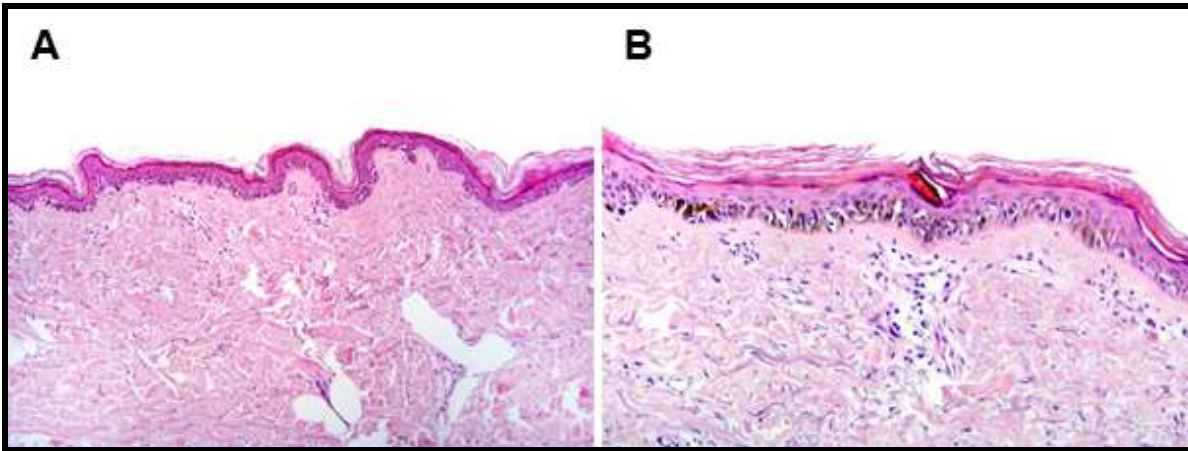


2.ábra Nodularis melanoma (NM) átnézeti (A, 4x) és nagy felbontású (B, 10x) szövettani képe. Hisztológiailag jellemzőek a nagy dermalis tumorsejtfészkek és a citológiailag atípusos melanocyták. A felvételek Dr. Plótár Vanda arhívumából származnak.

A lentigo maligna és a lentigo maligna melanoma (LMM) elsősorban idősek napfénykárosodott bőrterületein, a fej-nyaki régióban jelenik meg, előfordulási gyakorisága 4-15% (Ward, Lamberton et al.) (3.ábra). A lentigo maligna az LMM in situ

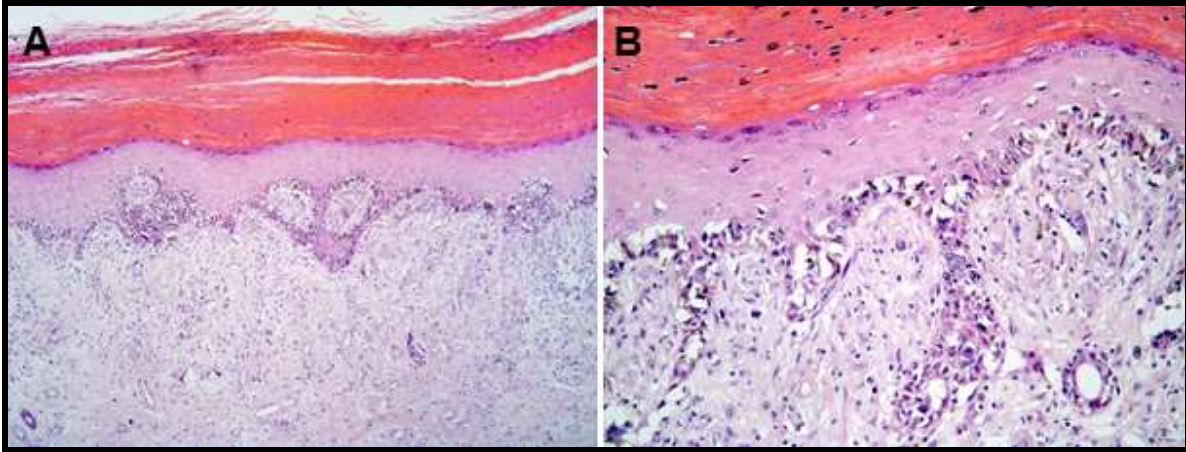
formája. Az epidermis a szoláris károsodás miatt atrófiás (Smoller 2006, Forman, Ferringer et al. 2008).

Az LMM a dermisbe törő melanoma, melynél megfigyelhető a solaris elastosis jelensége. A bőr atrófiás epidermisének basalis rétegében félhold alakú, sötétre festődő maggal bíró melanociták folyamatos terjedése jellemző (Plotar, Orosz et al. 2007). Az orsó alakú melanocyták predilekciós helyei a retikuláris dermisen belül található idegek (Smoller 2006).



3. ábra *Lentigo maligna melanoma átnézeti (A, 4x) és nagy felbontású (B, 10x) szövettani képe. Jellemző a dermoepidermalis junkció mentén a hiperkróm, többmagvú melanociták konfluens elhelyezkedése. A felvételek Dr. Plótár Vanda arhívumából származnak.*

Az acrolentiginosus melanoma (ALM) relatíve ritka altípusa a melanomának, az összes melanoma mintegy 5%-a (Ward, Lamberton et al.), a hispániai fehérekben nagyobb gyakorisággal fordul elő (Wang, Zhao et al. 2016). Elsősorban a körömlemez alatt, a körömágyon belül, a tenyéren és a talpon található. (4. ábra).



4. ábra *Acrolentiginosus melanoma (ALM) átnézeti (A, 4x) és nagy felbontású (B, 10x) szövettani képe. Jól megfigyelhető a vastok szaruréteg, és a melanoma sejtek felfelé irányuló pagetoid terjedése. A felvételek Dr. Plótár Vanda arhívumából származnak.*

1.3 Rizikófaktorok szerepe

A melanoma rizikófaktorai környezeti és genetikai eredetűek lehetnek, melyek kölcsönhatása felelős a melanoma sokszínű előfordulási gyakoriságáért a különböző etnikai csoportokban és földrajzi területeken. A férfi nem, a 60 év feletti életkor, a rákmegelőző állapotok, a nem-melanoma típusú bőrrákok előfordulása, mint a basalioma és a spinalioma, a ritka genodermatosisok, mint a xeroderma pigmentosum, valamint az immunszupprimált állapotok egyaránt prediszpozíciót jelentenek a melanoma kialakulása szempontjából (Rigel 2010). A genetikai eredetű rizikófaktorok esetében a ciklindependens kináz 2 A (CDKN2A), a melanocortin 1 receptor (MC1R), illetve a CDK4 gének csírasejtes mutációinak megléte fokozott melanomára való fogékonysággal társulnak (Chen, Geller et al. 2013). Ugyancsak a melanómára hajlamosító fenotípusos prediszpozíciót jelent a diszpláziás névusz szindróma (DNS), az anyajegyek nagy száma, a leégésre hajlamos, napfényérzékeny világos bőr és haj, valamint a kék szem (Fitzpatrick I. bőrtípus) (Chen, Geller et al. 2013).

1.3.1 Az UV sugárzás összefüggése a melanomával

Klinikai és epidemiológiai adatok bizonyítják, hogy a melanoma magasabb arányban fordul elő a napfénykárosodott bőrterületeken, ismételt intermittáló, intenzív napégéseket követően. A gyermekek és a fehér bőrű egyének kifejezetten veszélyeztetett populációt alkotnak, hiszen az UV-fény penetrációja a bőrbe szignifikánsan magasabb, mint sötét bőr

esetében (Gilchrest, Eller et al. 1999). A gyermek- vagy serdülőkorban elszenvedett súlyos napégések (legalább öt alkalommal) megközelítőleg kétszeres rizikót jelentenek a melanoma kialakulására (Wu, Han et al. 2014). Az ultraviola sugárzás (UV) indukálta melanomagenezis során két különböző útvonal aktiválódhat, az egyik a melanintól független, a közvetlen ultraviola-B sugárzás (UVB, hullámhossza 290-320 nanométer) indukálta DNS-károsodással függ össze, míg a másik a pigmentfüggő útvonal, amelyet az UVA sugárzás (hullámhossza 320-400 nanométer) indukál és a melanocitákban zajló indirekt oxidatív DNS-károsodással van összefüggésben (Noonan, Zaidi et al. 2012).

Több tanulmány igazolta, hogy a szoláriumhasználat fokozza a melanoma rizikót, 2009-ben a WHO (World Health Organization) International Agency for Research on Cancer (IARC) divíziója a szoláriumból származó ultraviola sugárzást rákkeltőnek nyilvánította. Egy évnél hosszabb ideig tartó szoláriumozást követően a melanoma rizikó 61%-kal emelkedett egy 250 000 résztvevő bevonásával készített metaanalízis szerint (O'Sullivan and Tait 2014).

A pikkelysömör és egyéb bőrgyógyászati kórképek kezelésére alkalmazott orális methoxsalen (psoralen) és az UVA sugárzás (PUVA) szintén kapcsolatban állhat a melanoma késői kialakulásával. PUVA terápiában részesülő psoriasisos betegeknél a kután melanomák incidenciája az első 15 évben nem növekedett a normál populációhoz képest, azonban a következő 16-20 évben a közel ötszörösére, míg 20 éven túli utánkövetés során több mint tizenkétszeresére emelkedett a rizikó (Stern 2001).

1.4 Hagyományos prognosztikus markerek jelentősége kután melanomában

Évtizedek óta kutatják a melanoma prognózisát befolyásoló klinikai és kórszöveti paramétereket. Hagyományos értelemben elkülöníthetünk klinikai prognosztikus faktorokat, mint az életkor és a férfi nem, valamint prediktív értékkel bíró kórszöveti paramétereket, mint a Breslow-féle tumorvastagság, az ulceráció, a tumort infiltráló limfociták denzitása, a mikroszatelliták jelenléte, a mitotikus ráta, a vaszkuláris és/vagy limfatikus invázió, amelyek a melanoma prognózisának legfontosabb prediktorai (Mandala and Massi 2014).

1.4.1 Breslow-féle tumorvastagság

1970-ben írta le Breslow a melanoma vastagságát tizedmilliméteres pontossággal, milliméterben meghatározott reprodukálható és megbízható, a patológiai leletben kötelezően feltüntetendő értéket (Breslow 1970). A Breslow - vastagságot az epidermis granuláris rétegének tetejétől mérik, illetve, ha a tumor kifeléyesedett, akkor a fekély alsó részétől a maximális infiltráció kiterjedéséig, azaz a tumor legmélyebb pontjáig határozzák meg (Mandala and Massi 2014). A Breslow növekedésével a szentinel-nyirokcsomó (SLN) metasztázisok előfordulási gyakorisága, és a halálozás egyaránt emelkedik (Mandala and Massi 2014).

A Breslow - vastagság a túlélés legjelentősebb prognosztikus faktora a lokalizált kután melanomában szenvedő betegeknél (Barnhill, Fine et al. 1996). Az AJCC 7. verziójú melanoma stádiumbeosztás szerint a T1 melanoma (≤ 1 mm) esetén a 10 éves túlélés 92%, T2 -nél (1,01- 2,00mm) 80% , T3 esetén (2,01 - 4,00mm) 63%, míg T4-nél (>4 mm) megközelítőleg 50% (Balch, Gershenwald et al. 2009).

1.4.2 Mitotikus ráta (MR)

Az 1950-es évek elején megfigyelték, hogy kután melanomás betegeknél a primer tumor magas mitotikus rátája (MR) esetén a túlélés rendkívül alacsony (Allen and Spitz 1953). Az MR meghatározása a négyzetmilliméterre számolt mitózisok száma alapján történik, melyet a melanoma fokozott mitotikus aktivitású területeiből ("hot spot" = forró pontok) számolnak ki (Balch, Gershenwald et al. 2009). Multivariáns analízisben a MR a második legerősebb prognosztikus faktor a tumorvastagság után lokalizált primer kután melanoma esetén (Thompson, Soong et al. 2011). Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a jelenleg érvényes AJCC ajánlás 8-as verziója szerint a mitotikus ráta már nem kategorizáló tényező a T1 stádium meghatározása során (Gershenwald, Scolyer et al. 2017).

1.4.3 Ulceráció

Az ulceráció kiterjedése jóval pontosabb prognosztikai értékkel bír, mint az ulceráció pusztán jelenléte (In 't Hout, Haydu et al. 2012). A vastagabb melanomák esetében gyakrabban fordul elő ulceráció: az ulceráció incidenciája csupán 6% a vékony melanomákban, míg 63% a vastag melanomák esetében (Barnhill, Fine et al. 1996). A primer melanoma ulcerációjának jelenléte a jelenlegi AJCC rendszer szerint a harmadik legerősebb túlélési prediktor melanoma esetében. Kifeléyesedett primer kután

melanomával rendelkező betegek halálozásának becsült rizikója kétszer magasabb, mint az ulceráció nélküli betegeké (Balch, Gershenwald et al. 2009).

1.4.4 Tumort infiltráló limfociták

A tumort infiltráló limfociták (TIL) jelenléte a gazdaszervezet hatékony immunválaszát reprezentálhatja a tumorra szemben (Klein and Klein 2005). Az irodalmi adatok a TIL klinikai jelentőségét tekintve azonban meglehetősen ellentmondásosak. Több klinikai vizsgálat alapján szignifikánsan kedvezőbb a prognózisa azon betegeknél, akiknél a primer kután melanomában limfociták infiltrációja van jelen, szemben azokkal, ahol hiányoznak a tumort infiltráló limfociták (Day, Sober et al. 1981) (Azimi, Scolyer et al. 2012), más tanulmányok ugyanakkor nem igazolták a TIL független prognosztikai jelentőségét melanomában (Taylor, Patel et al. 2007).

1.4.5 Clark-szint

1969-ben Clark alkotta meg a melanoma hisztopatológiai osztályozását, mely a bőr anatómiai rétegeinek melanoma által involvált rétegein alapul, és igazolta, hogy az invázió szintje szoros kapcsolatban áll a túléléssel (Clark, From et al. 1969). Clark I szint esetén a melanoma az epidermisre korlátozódik. Clark II szintnél a papilláris dermisbe történik szuperficiális terjedés, melynek során tumorsejtfészkek jelennek meg. A Clark III-as inváziós szintnél a papilláris dermis infiltrációja a retikuláris dermisig tart, azaz a papilláris dermist teljesen kitöltő vagy kiszélesítő, vertikális növekedést reprezentáló folyamatot jelent. A Clark IV-es szint a retikuláris dermis invázióját, míg a Clark V szint a bőr alatti zsírszövet infiltrációját jelenti. Az invázió Clark szintje erős korrelációban áll a melanoma kimenetelével. A II-es stádium ötéves túlélése 98,8%, mely 92,5%-ra esik vissza III-as szintnél, a IV-s stádiumnál 76,7%, a V. szintnél pedig 75% (Barnhill, Fine et al. 1996). A 2010-es AJCC osztályozási rendszer ugyanakkor az invázió Clark-szintjét már nem tekintette stádiumbesorolási kritériumnak, mivel multivariáns analízisben a Clark-szint nem bizonyult független prognosztikus faktornak (Balch, Gershenwald et al. 2009).

1.4.6 Tumorregresszió

A regresszió három időbeli fázisa különböztethető meg: korai, intermedier és késői. A regresszió első lépéseként limfociták jelennek meg a primer tumorban, melyek infiltrálják a tumorsejtfészkeket, ezáltal közvetlen kapcsolatba kerülnek a tumorsejtekkel. Az intermedier és késői regresszió eredményezi a primer tumor részleges "eltűnését", melyet

dermalis fibrosis jellemez melanofágok megjelenésével és az epidermis elvékonyodásával (Azimi, Scolyer et al. 2012). A regresszió lehet részleges, melynek során a lézió kevesebb, mint 75%-át, illetve kiterjedt, ekkor a tumor több mint 75 %-át érinti (Compton, Barnhill et al. 2003). Bár az irodalmi adatokat tekintve a regresszió megítélése igen ambivalens, egy tanulmány szerint a regressziót mutató tumorok nagyobb valószínűséggel adnak lokális és távoli áttéteket (Fontaine, Parkhill et al. 2003), míg egy másik vizsgálat alapján a regresszió jelenléte kifejezetten kedvezőbb prognózissal társult (Zugna, Senetta et al. 2018).

1.4.7 Limfovaszkuláris invázió (LVI)

Limfovaszkuláris invázió során a vér és/vagy nyirokerek lumenében melanomasejtek detektálhatóak hagyományos hematoxin-eozinos festéssel. A primer kután melanomák excíziós mintáiban az LVI ritka jelenség, az esetek megközelítőleg 8%-ában fordul elő (Storr, Safuan et al. 2012), s általában kedvezőtlen prognózissal társul (Xu, Chen et al. 2012). Immunhisztokémiai módszerrel az LVI kimutathatósága 16-47% közötti (Massi, Puig et al. 2006).

1.4.8 Mikroszatelliták

A mikroszatelliták a primer melanomától 2 cm-en belül elhelyezkedő, 0,05 mm-nél nagyobb átmérőjű tumorsejtfészkek a reticularis dermisben, illetve a szubkután zsírszövetben, mely a primer tumorról folytonosságot nem mutat (Gershenwald, Scolyer et al. 2017). A szatellita metasztázis a primer tumor 2 cm-es környezetén belül elhelyezkedő kután vagy szubkután áttétet jelenti. Az in-transit metasztázisok a primer melanoma 2 cm-es környezetén túl lokalizálódnak, a primer tumor és a regionális nyirokcsomók között. A mikroszatelliták, a szatelliták és az in-transit metasztázisok megjelenése kedvezőtlen prognózissal társul (Read, Haydu et al. 2015).

1.4.9 Őrszemnyirokcsomó metasztázisok jelentősége

Az őrszemnyirokcsomó az adott anatómiai régióban elhelyezkedő nyirokcsomó, melyben a legkorábban és a legnagyobb valószínűséggel jelenik meg a primer tumor áttéte. A regionális afferens nyirokerekeken keresztüli szekvenciális progresszió elve szerint, amennyiben a szentinel-nyirokcsomók tumormentesek, a távolabbi nyirokutakban sem valószínű a metasztázisok megjelenése (Balch, Morton et al. 2009).

A szentinel-nyirokcsomó aktuális állapota hatással van a prognózisra, a túlélésre, és befolyásolja a terápiát (Plotar, Liskay et al. 2013). Szentinel-nyirokcsomó biopszia (SLNB) javasolt Ib/II. stádiumú melanomás betegek esetében. SLNB nem javasolt abszolút jó prognózisú, azaz 1 mm vagy annál vékonyabb, exulcerációt és regressziós jeleket nem mutató primer tumor esetében, hiszen 95–98%-ban negatív eredmény várható. Exulcerált, 4 mm-nél vastagabb tumorok esetében sem ajánlott elvégezni a beavatkozást, hiszen a prognózis igen kedvezőtlen, függetlenül az eredménytől (Liskay, Peley et al. 2003).

Az SLNB célja a mikrometasztázisok felderítése, majd az érintett nyirokcsomók szelektív eltávolítása (Cook, Green et al. 2003). A szentinel nyirokcsomó pozitivitás 15%-tól 33%-ig terjedhet populációtól, illetve patológiai protokolltól függően (Cook, Green et al. 2003). Az új AJCC adatbázis az érintett nyirokcsomók számának meghatározása mellett megkülönbözteti a klinikailag okkult nyirokcsomó metasztázisokat (N1a, N2a, N3a) és a klinikailag észlelhető nyirokcsomó áttéteket (N1b, N2b, N3b). Az okkult áttétek közé olyan, SLNB során szövettannal igazolt metasztázisok (a korábbi 7. AJCC szerint mikrometasztázisok) tartoznak, amelyek fizikális vizsgálattal és radiológiailag nem detektálhatóak, így ezen betegek túlélése szignifikánsan jobb, mint a klinikailag észlelhető nyirokcsomó-metasztázissal rendelkezőké.

1.5 TNM-klasszifikáció (American Joint Committee on Cancer, 2017)

A malignus melanoma patológiai és klinikai stádiumbeosztását 2017-ben frissítette az American Joint Committee on Cancer (AJCC). Az új ajánlás hivatalosan 2018. január 1-vel került elfogadásra az Amerikai Egyesült Államokban. Az új TNM klasszifikáció megalkotása során során több mint 46 000 melanomával kezelt beteg adatait dolgozták fel, és a korábbi beosztáshoz képest számos fontos aspektusban változott.

A tumor vastagságát tizedmilliméteres pontossággal szükséges meghatározni a korábbi századmilliméteres helyett. A T1 melanomák esetén a tumorvastagság és az ulceráció a melanoma-specifikus túlélés (MSS) erősebb prediktorai, mint a mitotikus ráta (MR). A 0,8 mm-es Breslow vastagság ugyanakkor fontos határérték az SLNB szempontjából: míg a 0,8 mm alatti melanomák (T1a) esetében a szentinel-nyirokcsomó pozitivitás előfordulása 5% alatti, addig a 0,8-1 mm vastag melanomákban (T1b) 5-12%-os őrszemnyirokcsomó-pozitivitás detektálható (Cordeiro, Gervais et al. 2016). A primer tumor ulcerációja a másik fontos, T-kategóriát érintő faktor, melynek jelenléte kedvezőtlen prognózissal társul. A

2018-as AJCC alapján a T2b pN0 esetén az 5 és 10 éves túlélés 93% és 88%, míg T3a pN0 primer kután melanoma esetén 94% és 88%.

Az N kategóriát korábban leíró mikroszkópos vagy makroszkópos nyirokcsomó - metasztázisok helyett a klinikailag okkult (I-II. stádium) vagy klinikailag észlelhető (III. stádium) kifejezések kerültek elfogadásra. Az N csoport beosztásánál figyelembe kell venni a mikroszatelliták, szatelliták és in-tranzit metasztázisok jelenlétét. Az M1 alkategóriákhoz további jellemzőként a tejsavdehidrogenáz (LDH) szint került beválasztásra, melynek emelkedett szérumszintje kedvezőtlen prognózist jelez. Az M1d jelölést a központi idegrendszeri metasztázisok jelölése céljából vezették be (1. táblázat).

1. táblázat *TNM klasszifikáció 8. kiadása az AJCC szerint (Gershenwald, Scolyer et al. 2017)*

T (tumor)	Tumorvastagság (mm)	Ulceráció és mitózisok
Tx	Primer tumor vastagsága nem meghatározható	
T0	Primer tumor nem ismert	
T in situ	In situ melanoma	
T1a	≤ 0,8 mm	a: ulceráció nincs
T1b	≤ 0,8 mm 0,8-1,0 mm	b: ulcerációval ulcerációval vagy nélküle
T2a	1,0-2,0 mm	a: ulceráció nélkül
T2b	1,0-2,0 mm	b: ulcerációval
T3a	2,0-4,0 mm	a: ulceráció nélkül
T3b	2,0-4,0 mm	b: ulcerációval
T4a	> 4,0 mm	a: ulceráció nélkül
T4b	> 4,0 mm	b: ulcerációval
N (nyirokcsomók)	Érintett nyirokcsomók száma	In-tranzit, szatellita vagy mikroszatellita metasztázis jelenléte
Nx	Regionális nyics nem meghatározható	Nincs
N0	Regionális nyics nem detektálható	

N1a	1 klinikailag okkult (SLNB)	Nincs
N1b	1 klinikailag észlelt	Nincs
N1c	0	Van
N2a	2 vagy 3 klin. Okkult (SLNB)	Nincs
N2b	2 vagy 3 klinikailag észlelt	Nincs
N2c	1 klinikailag okkult/észlelt	Van
N3a	> 4 klin. okkult (SLNB)	Nincs
N3b	> 4 klin. észlelt	Nincs
N3c	> 2 klin. Észlelt	Van
M (metasztázis)	Távoli áttét helye	LDH-szint (0=normális, 1=emelkedett)
M0	nincs távoli áttét	Normális
M1a	távoli bőr, izom és/vagy nem regionális nyacs. áttét	Normális/emelkedett
M1b	távoli áttét a tüdőben	Normális/emelkedett
M1c	egyéb távoli, ill. szervi áttét	Normális/emelkedett
M1d	cerebrális áttét	Normális/emelkedett

A melanoma prognózisának szempontjából döntő jelentőségű, hogy milyen klinikai, illetve patológiai stádiumban kerül felismerésre a primer tumor. A T1aN0M0 stádiumban lévő melanomás betegek 5 éves melanoma-specifikus túlélése 99%, 10 éves túlélése 98%, a T4bN0M0 melanomában szenvedő betegek 5 éves túlélése 82%, 10 éves túlélése 75% (Gershenwald, Scolyer et al. 2017), míg a korábbi 7. AJCC adatbázisban 10 éves túlélések az I-es és II-es stádiumban jóval kedvezőtlenebb túléléssel társultak, T1aN0M0-ban 93%, míg T4bN0M0 esetén 39% (Balch, Gershenwald et al. 2009). A kedvezőbb túlélési adatok a fejlődő képalkotó technikáknak és a korszerű terápiáknak köszönhetőek.

IV-es stádiumú melanomás betegek esetében a távoli áttétek lokalizációja szerint az M1 stádium négy kategóriára osztható: M1a, M1b, M1c és M1d. M1a stádium esetén távoli áttétek vannak a bőrben, szubkután, az izmokban és a távoli nyirokcsomókban. M1b-nél tüdőmetasztázisok, míg az M1c-nél egyéb belszeri metastázisok jelennek meg. Az M1d stádium az agyi áttét jelenlétét reprezentálja, és szignifikánsan kedvezőtlenebb túléléssel társul, mint a többi stádium (Gershenwald, Scolyer et al. 2017). A szérumban LDH-szintje

klinikailag szignifikáns faktor, mely jelentős kapcsolatot mutat a terápiára adott válasszal, a PFS-sel, az MSS-sel és az OS-sel. Az egy éves túlélés M1a -ban 62%, M1b-ben 53%, M1c-ben 33%, M1d-ben 10% (Balch, Gershenwald et al. 2009, Davies, Liu et al. 2011).

1.6 A kután melanoma kezelése

1.6.1 A primer melanoma sebészi kezelése

A primer kután melanoma kezelése elsődlegesen sebészi. A sebészi kimetszés határainak indokolatlanul nagy fokú kiterjesztése nem befolyásolta a melanomás betegek túlélését (Veronesi and Cascinelli 1991). Retrospektív vizsgálatok alapján lentigo maligna és in situ melanomák esetén 5 mm-es sebészi kimetszés javasolt (Akhtar, Bhat et al. 2014). A 2018-as NCCN melanomára vonatkozó irányelvek alapján a sebészi kimetszés ajánlott mértéke in situ melanoma esetén 0,5 cm, 1,0 mm-et meg nem haladó lézióknál 1,0 cm, 1,0-2,0 mm esetén 1-2 cm, míg 2.0 mm felett 2,0 cm körkörös biztonsági zónával való excízió javasolt (Gershenwald, Scolyer et al. 2017).

1.6.2 Nyirokcsomó - blokkdisszekció

Pozitív őrszemnyirokcsomó esetében regionális nyirokcsomó-blokkdisszekció elvégzése javasolt, melyet a Melanoma Sentinel Lymph Node Trial (MSLT) is megerősít. Az MSLT 2001 beteg adatait dolgozta fel 10 éves utánkövetéssel, melynek során igazolódott, hogy a regionális nyirokrégió szelektív sebészi ellátásakor szignifikánsan megnövekedett mind a betegségmentes, mind a melanoma-specifikus túlélés (Morton, Thompson et al. 2014).

1.6.3 Sugárterápia

Adjuváns sugárkezelés javasolt in situ melanoma és lentigo maligna esetében, amennyiben a reexcízió kivitelezhetetlen (Tsang, Liu et al. 1994). Desmoplasticus melanoma esetében irradiáció jön szóba, ha mély infiltráció, kiterjedt neurotropizmus, helyileg kiújult betegség és keskeny sebészi kimetszés szerepel a kórszövetben. A sugárkezelés adjuváns terápiaként azoknál a betegeknél alkalmazandó, akiknél 3-nál több nyirokcsomó érintett a regionális nyirokrégióban, extracapsularis terjedést véleményeznek a szövettani leletben, 3 cm-nél nagyobb nyirokcsomóáttét van jelen, a fej-nyaki régióban 2-nél több nyirokcsomó érintett (Bibault, Dewas et al. 2011). Továbbá nem eltávolítható nyirokcsomó, szatellita vagy in-tranzit metasztázis esetén javasolt a sugárkezelés (Pinkham, Foote et al. 2013).

A sztereotaxiás agyi sugársebészet (SRS) primer és adjuváns kezelésként is alkalmazható intracranialis léziók esetében. Az irodalmi adatok és a klinikai tapasztalatok alapján a 3,5 cm átmérő alatti szoliter vagy oligo agyi áttétek (maximum 2-4), különösen, ha primer melanomából származnak, az SRS abszolút indikációját képezik (Horvath, 2010). A teljes agyi besugárzás (WBRT) a multiplex agyi metasztázisok, a kiterjedt extracranialis léziók esetén adjuvánsan alkalmazandó kezelés, amikor az idegsebészeti beavatkozás és az SRS nem javasolt (Nowak-Sadzikowska, Walasek et al. 2016).

1.6.4 Kemoterápia

Napjainkban a melanoma kezelésében másod-, harmadvonalban jönnek szóba a citotoxikus kemoterápiás protokollok, mint a dacarbazine, a temozolomid, a paclitaxel, a carboplatin, a BOLD, vinblastinnal vagy nitrosureával kombinációban.

Az 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide (DTIC) alkilező típusú vegyület, mely a DNS kettős hélixet alkotó polinukleotidláncok között keresztkötéseket hoz létre, ezáltal a DNS szál lokális denaturációjához és a daganatsejt pusztulásához vezet. A DTIC egy prodrug, az aktív metabolit kifejlődéséhez szükséges a citokróm P450 monooxigenáz rendszer (Foletto and Haas 2014). A dacarbazine az FDA által 1970-ben törzskönyveztetett kemoterápia metasztatikus melanoma kezelésére, mely több, mint 30 éven keresztül egyedüli terápiát jelentett: hozzávetőlegesen a betegek 15%-a reagált a terápiára a léziók méretének legalább 50%-os csökkenésével, míg komplett remisszió a betegek 4%-ánál volt megfigyelhető. A DTIC a progressziómentes és a teljes túlélést szignifikánsan nem befolyásolta, a median túlélés 21 hét volt (Costanza, Nathanson et al. 1977).

A temozolomid a dacarbazine analógja, orálisan alkalmazott alkiláló szer, mely a cerebrális metasztázisok esetében hatékony a vér-agy gáton történő penetrációnak köszönhetően (Li, Hou et al. 2015). A median túlélés 7,7 hónap volt a temozolamiddal kezelt betegeknél (Cohen, Johnson et al.).

A kombinált kemoterápiás protokollok, mint a BOLD (bleomycin, oncovin, lomustine, dacarbazine) és a CVD (cisplatin, vinblastine, és DTIC) máj, csont és agyi metasztázisok esetén jönnek szóba. A négy citotoxikus szer kombinációját tartalmazó CBBDT vagy Dartmouth rezsím (cisplatin, carmustin, DTIC és tamoxifen) alkalmazásával a betegek közel felénél értek el terápiás választ (Serrone, Zeuli et al. 2000).

A platinaszármazékok közé tartozó cisplatinnal kezelt metasztatikus melanomás betegeknél a median válaszarány 16%, míg a válasz időtartama 7,3 hónap volt (Glover,

Ibrahim et al. 2003). A carboplatin és paclitaxel kombinációjával 26%-os parciális regressziót, 18%-os stabil betegség állapotot értek el. A PFS 3 hónap, míg a medián OS 7,8 hónap volt (Rao, Holtan et al. 2006). A paclitaxel monoterápiával a betegek 16%-ánál parciális remissziót, míg 0,3%-ánál komplett remissziót értek el 5 hónapos median válaszüddel (Wiernik and Einzig 1993).

1.7 A kután melanoma progresszióját befolyásoló jelátviteli útvonalak és a célzott onkoterápiák

Számos onkogén és tumorszuppresszor gén involvált a melanoma kialakulásában és progressziójában. A human kután melanómák 50–70%-ában kimutatható a BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) onkogén aktivációs mutációja, míg az NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) gén 15-30%-ban mutált. Leírták továbbá az AKT (szerin-treonin kináz 1) fokozott expresszióját, a CDKN2A (ciklindependens kináz 2) (29%) és a PTEN gének (Phosphatase and tensin homolog) delécióját, illetve mutációját (17%), az APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1) gén csendesítését (40%), a TP53 (Tumor protein 53) gén elvesztését és mutációját (17%), a CCND1 (ciklin D1) és a MITF (microphthalmia-asszociált transzkripció faktor) gének amplifikációját (Romano, Schwartz et al. 2011). A krónikusan napfénykárosodott bőrből kiinduló primer melanómák 28%-ánál, az akrális melanómák 36%-ánál, míg a mucosalis melanómák 38%-nál detektáltak KIT (proto-onkogén receptor tirozinkináz) mutációt. A KIT fontos onkogénként van jelen melanómában, melyre célzott kezelésekként KIT-inhibitorok állnak rendelkezésre, mint az imatinib, a nilotinib és a dazatinib (Curtin, Busam et al. 2006).

1.7.1 MAPK jelpálya

A melanoma progressziójában az egyik legjobban ismert útvonal a RAS-RAF-Mitogén-Aktivált Protein Kináz - extracelluláris jel szabályozta - MAPK jelpálya, melynek működését receptor-tirozinkinázok, citokinek és heterotrimer G-fehérje kapcsolt receptorok szabályozzák (Girotti, Pedersen et al. 2013).

A RAS a kis G-fehérje család tagja, melynek három fő típusa ismert, a HRAS, a KRAS és az NRAS. A RAS fehérjék poszttranszlációs módosulásokat követően kötődhetnek a plazmamembránhoz, mely elősegíti a jelút további tagjainak aktiválását: a RAF-MEK-ERK-et. A RAF géneknek szintén három fő típusát különböztetik meg, az ARAF, a BRAF és a CRAF géneket (Girotti, Pedersen et al. 2013). A plazmamembránhoz lokalizálódó kis G-

fehérje RAS-család (HRAS, KRAS és NRAS) aktivációja extracelluláris szignálok hatására jön létre, mely aktiválja a jelátviteli elemét, a RAF-ot (ARAF, BRAF és CRAF). Ezt követően a MEK, az ERK és számos fehérje egymás utáni aktivációja következik be, mely végső soron a MAPK-kaszkádnak az iniciációjához vezet, mely transzkripciós folyamatok sorozatát indukálja a sejtmagban, a foszforilációs folyamatok által jelentős génexpressziót eredményezve. (Lei, Wang et al. 2014). Az aktivált NRAS a PI3K-AKT jelátviteli pályát is működésbe hozza, mely szintén lényeges szerepet tölt be az onkogenezisben. A BRAF egy szerin-treonin proteinkináz, mely kulcsfontosságú a MAPK-pálya működésében, mutációja révén abnormális sejtproliferáció, angiogenesis és invázió jöhet létre, amelyek hozzájárulhatnak a melanoma kialakulásához és progressziójához. Humán melanomákban a BRAF gén 50-70%-ban mutált, mely 80–90%-ban a 600-as aminosavkodonon elhelyezkedő valin-glutamin konverziót jelenti (V600E) (Smalley and Herlyn 2005, Yajima, Kumasaka et al. 2012). A második leggyakoribb, BRAF génben előforduló mutáció a V600K, mely valin - lizin szubsztitúciót eredményez. A V600K mutáció elsősorban idős, krónikusan napfénykárosodott bőr esetén fordul elő (Broekaert, Roy et al. 2010). A BRAF gén mutációja mellett az NRAS aktiváló mutációi jelátviteli kerülő útként szolgálhatnak a mutáns BRAF fehérje inhibitorral szemben kialakult rezisztencia során (Balazs, Vizkeleti et al. 2015).

A krónikusan napfénykárosodott területeken kialakult tumorokban az NRAS kodon aktiváló mutációjának előfordulása szignifikánsan magasabb. A BRAF - mutáció a Breslow-féle tumorvastagsággal, míg az NRAS-mutáció a metasztázisképzéssel mutat szignifikáns összefüggést (Lazar, Ecsedi et al. 2012).

1.7.2 A MAPK jelátviteli út célzott terápiája

A IV-es stádiumú melanomás betegek túlélése kezelés nélkül igen alacsony. A kemoterápia alacsony hatékonysága új terápiás célpontok felderítését tette szükségessé. Az elmúlt években két fő terápiás stratégia változtatta meg alapjaiban a melanoma kezelését, az immunterápia és a célzott terápia, melyek egyaránt javították az áttétes melanomás betegek progressziómentes és teljes túlélését (Garbe, Eigentler et al. 2011).

Az FDA (U. S. Food and Drug Administration) és az Európai Gyógyszerészeti Ügynökség (EMA) BRAF V600E mutációval rendelkező irresektábilis és/vagy metasztatikus melanoma kezelésére két BRAF-inhibítort törzskönyvezett a vemurafenibet (Zelboraf) 2012-ben, és a dabrafenibet (Tafinlar) 2013-ban. Rövid időn belül, 2014-ben került

törzskönyvezésre a trametinib (Mekinist), míg 2015-ben a cobimetinib (Cotellic), melyek MEK-inhibitorok. Az encorafenib és a binimetinib jelenleg fázis III vizsgálatokban érhetőek el.

A BRIM-3 vizsgálat a vemurafenibet dacarbazinnal hasonlította össze, melynek során a medián teljes túlélés 13,6 hónap volt a vemurafenibbel kezelt csoportban, míg 9,7 hónap a dacarbazine esetében. A medián progressziómentes túlélés a vemurafenibbel kezelt csoportban 6,9 hónap, dacarbazine esetében 1,6 hónap volt, mely szintén szignifikáns különbség (McArthur, Chapman et al. 2014). A BRAF-gátlókkal történő kezelésnek nemkívánatos mellékhatásai is előfordultak, így fotoszenzitivitás, laphámcarcinoma, QT idő megnyúlása, azonban a mellékhatások jól kontrollálhatóak és kezelhetőek (Welsh and Corrie 2015).

Problémát jelent azonban a BRAF-inhibitorok ellen kifejlődő rezisztencia, melynek kivédésére MEK-inhibitorokat kombinációban alkalmazzák a BRAF- inhibitorokkal, így a MAPK útvonal gátlása hatékonyabb, mint a kizárólag monoterápiában alkalmazott BRAF-inhibitor kezelés alkalmazásakor (Flaherty, Infante et al. 2012). A kombinációkkal szignifikánsan magasabb válaszarány, kedvezőbb progressziómentes és teljes túlélés érhető el. Egy multicentrikus vizsgálat alapján vemurafenibet cobimetinibbel kombinációban alkalmazva a PFS 12,3 hónap, míg a vemurafenibbel önállóan 7,2 hónap érhető el ($p < 0,0001$). A medián teljes túlélés vemurafenib cobimetinib kombináció esetén 22,3 hónap, míg 17,4 hónap vemurafenib-monoterápiával (Ascierto, McArthur et al. 2016).

1.7.3 PI3K/Akt jelpálya

A MAPK jelátviteli út mellett kiemelt szerep jut a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) /AKT jelpályának is a melanoma onkogenezisében. Az Akt család 3 tagból áll, melyek eltérő expressziós mintázatot mutatnak sejttípustól függően. Az Akt3 konstitutív aktivációját a melanomák 43-50%-ában detektálták. Az Akt gátlása PI3-kináz-inhibitorokkal vagy az Akt 3- at célzó szelektív RNA-inhibitorral melanomában csökkentette a melanomasejtek növekedését és apoptózist eredményezett (Stahl, Sharma et al. 2004).

1.8 Immunterápia

Az immunterápia célja a beteg saját immunválaszának erősítése annak érdekében, hogy az egyensúlyt a tumorelles immunitás irányába toljuk el, ezáltal lehetővé téve a

tumornövekedés tartós és adaptív kontrollját (Atkins and Larkin 2016). A citotoxikus T-limfocita antigén - 4 (CTLA-4) és a programozott sejthalál fehérje 1 (PD-1) olyan T-sejteken található receptorok, melyek a ligand kötődés hatására gátolják a T sejt aktivációt és korlátozzák az immunválaszt. Az anti-CTLA-4 és anti-PD-1 antitestek megakadályozzák a receptor-ligand interakciót, ezáltal a T sejt felszabadul a gátlás alól, így a daganatsejtek elleni küzdelem felerősödik (Peggs, Quezada et al. 2009).

1.8.1 Adjuváns interferon

Primer melanoma sebészi eltávolítását követően Ib/II stádiumú, szentinel nyirkcsomó negatív melanoma esetén adjuváns terápiaként alacsony illetve közepes dóziszú interferon-alfa hatékonyságát több klinikai tanulmányban is vizsgálták, de a betegség progressziójának lassulását a kezelés mellett egyik vizsgálat sem tudta hitelt érdemlően bizonyítani (Kirkwood, Ibrahim et al. 2000). A magas dóziszú INF adagolásának hatékonyságát öt nagy randomizált klinikai vizsgálat eredményei alapján igazolták magas rizikójú, nem metasztatikus, nagy rekurrenciájú melanoma esetében. A kezelés a teljes túlélést ugyan nem befolyásolta, de a progressziómentes túlélést szignifikáns mértékben meghosszabbította a kontroll csoporthoz képest (Kirkwood, Manola et al. 2004). A terápia rutinszerű alkalmazhatóságát a gyakori mellékhatások erősen korlátozzák.

1.8.2 Anti-CTLA-4 antitest terápia

CTLA-4 receptoroknak központi szerepe van a T-sejt-funkció szuppressziójában, aktivációjuk által csökken a T-sejt mediálta tumorellenes aktivitás. A fentiekből következően a CTLA-4 útvonal farmakológiai blokkolása hatékony tumorellenes terápia kidolgozását eredményezte (Khalil, Smith et al. 2016). Az ipilimumab, CTLA4 ellenes monoklonális antitestet 2011-ben törzskönyvezte az FDA irreszekábilis, III-IV. stádiumú előrehaladott metasztatikus melanoma kezelésére.

III-as fázisú vizsgálatban, 502 metasztatikus melanomás beteg bevonásával hasonlították össze a dakarbazinnal kombinált ipilimumab terápia hatékonyságát a dakarbazin-monoterápiával. A kombinációs karon a teljes túlélés 11,2 hónap, míg a dakarbazin-monoterápiában 9,1 hónap volt, mely szignifikánsan különbséget jelentett. Az ipilimumab dacarbazinnal kombinált karon 1 évnél a betegek 47.3%-a, 2 évnél 28.5%-a, 3 évnél pedig 20.8%-a élt, szemben a dakarbazinkar 36.3%, 17.9%, illetve 12.2% túlélési arányaival ($p < 0,001$) (Robert, Thomas et al. 2011).

1.8.3 Anti-PD-1 terápia

A PD-1 és ligandumai (PD-L1/PD-L2) közötti interakció gátolja a T- és B-sejtek funkcióját, és ezáltal a tumor és a fertőzések elleni immunitást (Khoja, Butler et al. 2015). 2014-ben került FDA - befogadásra irreszekábilis vagy metasztatikus melanomás betegek kezelésére a két anti-PD1-receptorra ható immunterápia, a nivolumab és a pembrolizumab, jelentősen bővítve ezáltal a terápiás palettát (Liszkay 2016). A CheckMate 066 klinikai vizsgálatban nivolumab alkalmazásával terápia-naív irreszekábilis vagy metasztatikus melanomás betegeknél az egy éves túlélési ráta 72,9% volt, szemben a kontroll ágon, dacarbazine alkalmazása mellett tapasztalt 42,1%-os túléléssel (Robert, Long et al. 2015).

1.8.4 Indolamin-2,3 - dioxigenáz (IDO)

Az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim az esszenciális aminosav, triptofán útvonal első lépését katalizálja. Az IDO enzimnek az immuntolerancia szabályozásában van szerepe, a triptofán metabolizmusával immunszuppressziót hoz létre. Preklinikai adatok alapján az IDO gátlásával késleltethető a tumornövekedés (Soliman, Mediavilla-Varela et al. 2010). Az IDO1 hatékony és szelektív inhibitora az epacadostat, melyet fázis III vizsgálatokban a PD-1-inhibitor, pembrolizumabbal kombinációban alkalmaznak metasztatikus melanomás betegeknél (Yue, Sparks et al. 2017). Az indoximodot jelenleg fázis III vizsgálatokban alkalmazzák anti-PD1 terápiával kombinációban. Az előzetes eredmények igen biztatóak, 52%-os objektív válaszarányt írtak le előrehaladott, IV-es stádiumú metasztatikus melanomás betegekben (Brochez, Chevolet et al. 2017).

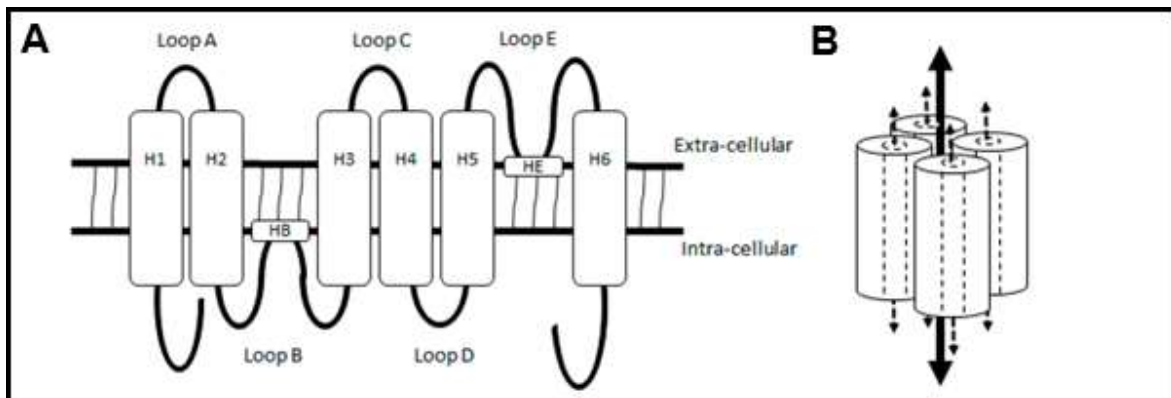
1.9 Az aquaporinok

1.9.1 Az aquaporinok funkciója

Az aquaporinok kisméretű hidrofób transzmembrán fehérjék, melyek elsődleges szerepe a sejten keresztüli víztranszport szabályozása az ozmotikus grádiensnek megfelelően (Agre, King et al. 2002). Az emberi szervezetben eloszlásuk igen heterogén, számtalan szövetben megtalálhatóak, bár döntő többségük az epitéliumban, az endothelben, az eritrocitákban, az asztrocitákban, a zsírszövetekben és a vázizmokban fordul elő (Verkman, Hara-Chikuma et al. 2008). Az aquaporinoknak számos fiziológiai funkciója ismert, elsődleges szerepet játszanak a normális szöveti vizek egyensúlyának, így többek között a vizelet koncentrációjának, a nyálszekréciónak a szabályozásában, a cerebrospinalis folyadék termelésében, az angiogenesisben, a sebgyógyulásban, a neuralis jelátvitelben, a bőr hidratálásában és a zsírmétabolizmusban (Verkman, Anderson et al. 2014).

1.9.2 Az aquaporin-1 szerkezete, előfordulása

Az aquaporin 1 (AQP1) az elsőként felfedezett, emlősökben leírt vízcsatornafehérje, melynek jelenlétét elődlegesen a vörösvértestekben és a renális tubulusokban mutatták ki, és eredetileg csatornaformáló integráns fehérjének (CHIP-28) nevezték (Denker, Smith et al. 1988). Az AQP1 fiziológiásan megtalálható a plexus choroideusban, a szaruhártya endothelben, a gerincvelő fájdalomérzékelő C rostjaiban és a központi idegrendszer kivételével a vaszkuláris endothelsejtekben (Verkman, Anderson et al. 2014). Az AQP1 a plazmamembránon átívelő tetramer szerkezetet képez. Az AQP1-monomer 28 kDa nagyságú fehérje, mely 6 alfa-helikális doménből (H1-H6) és az ezeket összekapcsoló öt hurokból (A-E) épül fel. A „B” és „E” hurkokban található aszparagin-prolin-alanin motívumok hozzájárulnak a vízpórust, melyen keresztül a víz és a vízben oldott molekulák, míg az AQP1 centrális pórusán keresztül a gáz és ionok transzportja történik (5. ábra) (Raina, Preston et al. 1995). Az AQP1 egy olyan kationcsatorna, melynek működését ciklikus nukleotidok szabályozzák, direkt módon a cGMP, míg indirekt úton a cAMP aktiválja (Anthony, Brooks et al. 2000).



5. ábra Az AQP1 molekula szerkezete. Az egyes monomerek (A) hat helikális alegységből, és az ezeket összekötő 5 hurokból állnak. A négy monomerből álló komplex (B) alakítja ki a transzmembrán vízcsatornát (Tomita, Dorward et al. 2017).

1.9.3 Az aquaporinok jelentősége a tumorprogresszióban

Különböző eredetű tumorsejtek kifejezett aquaporin-expressziót mutatnak. Az emlődaganatok, a colontumorok, a tüdő- adenocarcinomák, az epeúti daganatok és a központi idegrendszeri daganatok esetében jelentős korrelációt mutattak ki a túlélési adatok és az aquaporin expressziója között (Verkman, Hara-Chikuma et al. 2008). Amennyiben az AQP1 expresszióját lecsendesítik, csökken a migráció, az invázió és a

vaszkulogén mimikri jelensége. Glioblastoma multiformében (GBM) az AQP1 szerepet játszhat a migrációban és az invázióban, a későbbiekben új diagnosztikus, illetve prognosztikus biomarkerként és potenciális terápiás célpontként szolgálhat GBM-ban (Yang, Tan et al. 2018). Cholangiocarcinomákban az AQP1 fehérje expressziós szintje szignifikánsan korrelál a nyirokcsomó-metasztázissal és a teljes túléléssel. A magasabb AQP1-expresszió kedvezőtlen prognózissal társul, multivariáns analízis bebizonyította, hogy a magas AQP1-expresszió független és kedvezőtlen prognosztikai tényező cholangiocarcinomákban (Li, Li et al. 2017).

1.9.4 Experimentális adatok: az AQP1 - expresszió jelentőségéről melanoma malignumban

Az aquaporin 1 (AQP1) génnel transzfektált B16F10 egér AQP1sejtek kétszer, illetve háromszor gyorsabb migrációs képességet mutattak in vitro körülmények között a kontroll B16F10 sejtekhez képest (Hu and Verkman 2006). Megfigyelték továbbá, hogy AQP1 deficiens egerekbe B16F10 AQP1 sejt vonalat szubkután injektálva, a tumor növekedés és az angiogenesis alacsonyabb volt, mint a normális egerekben (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005).

Az AQP1 szabályozta tumorsejt migráció feltételezett mechanizmusa alapján, az ozmotikus gradiens hatására AQP1-expresszió jön létre, mely elősegíti a vízmolekulák áramlását a plazmamembránon keresztül aktin depolimerizációval és lamellipodiumképződéssel kísérve. Az AQP1-en keresztül létrejövő vízbeáramlás megnöveli a hidrosztatikus nyomást a plazmamembrán helyi kitüremkedését okozva, melyet aktin repolimerizáció követ, s ez a folyamat végső soron stabilizálja a sejtmembrán alakváltozását ezzel facilitálva a sejt migrációt (Verkman, Hara-Chikuma et al. 2008).

Munkacsoportunk széleskörű kutatásokat végez a melanoma progressziós és prediktív markereinek vonatkozásában. Bár sokféle genetikai és fehérjemintázatot sikerült azonosítani, az ígéretes markerek csoportja igen szűk (Timar, Gyorffy et al. 2010). A célzott terápiák területén elért eredményesség, a javuló progressziómentes és teljes túlélési adatok, a human kután melanomában további terápiás célpontok kutatására és felfedezésére irányítják a kutatók figyelmét.

Kután, nyirokcsomó és vizszerális melanoma metasztázisokat vizsgálva kutatócsoportunk azt találta, hogy a metasztázismintázatok bizonyos génmutációk tekintetében részleges átfedést mutatnak. Hét génexpressziós melanoma adatbázis metaanalízisét végeztük el

összesen 350 metasztázis-génmintázat vizsgálatával. A vizsgálat eredményeként egy 17 génből álló, a lokoregionális metasztázisokra jellemző géncsoportot sikerült azonosítanunk. Ezen gének között azonosítottuk az aquaporin fehérjecsalád tagjait (Timar, Gyorffy et al. 2010).

2 Célkitűzések

Az experimentális modelleken végzett kísérletek eredményei ugyancsak felvetették az AQP1- fehérje lehetséges szerepét a malignus melanoma progressziója során, ugyanakkor klinikai adat korábban nem állt rendelkezésre az AQP1-expresszió esetleges prognosztikai jelentőségéről human melanomában. Kutatásunk során ennek megfelelően a következő célokat fogalmaztuk meg:

- 1.) Az AQP1 fehérje expressziójának vizsgálata formalin fixált, paraffinba ágyazott primer kután melanoma mintákon immunhisztokémiai módszerrel.
- 2.) Az AQP1 fehérje expressziója és az AQP1 prognózisát befolyásoló standard hisztopatológiai paraméterek és a BRAF mutációs státusz összefüggésének vizsgálata.
- 3.) Az AQP1 fehérje kifejeződése és a melanoma klinikai kimenetele közötti korreláció vizsgálata.
- 4.) Az AQP1 fehérje expressziójának vizsgálata cerebralis áttétet adó primer kután melanomában.
- 5.) Az AQP1 fehérje expressziójának megfigyelése melanoma intracerebralis metasztázisaiban.

Kutatásunk során primer kután melanoma mintákon vizsgáltuk az AQP1 fehérje expresszióját immunhisztokémiai módszerrel, és összefüggéseket kerestünk a fehérje megjelenése és a melanoma prognózisát befolyásoló standard hisztopatológiai paraméterek, a tumorsejtek BRAF mutációs státusza, valamint a betegség klinikai kimenetele között.

Mivel a legrövidebb túlélésű melanomás betegek rossz prognózisáért kiemelkedő gyakorisággal felelős a központi idegrendszeri progresszió, ezért kutatásunk során külön vizsgáltuk az AQP1 expresszióját cerebralis áttétet adó primer kután melanomákban, és annak intracerebralis metasztázisaiban.

3 Módszerek

3.1 Betegcsoportok és a klinikai utánkövetés

Vizsgálataink során Magyarország két legnagyobb dermato-onkológiai centrumában, az Országos Onkológiai Intézet Onkodermatológiai Osztályán és a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján a 2003 és 2014 közötti periódusban utánkövetett, összesen 121, kután melanoma miatt kezelt beteg adatait és szövettani mintáit dolgoztuk fel.

Az AQP1-expresszió általános prognosztikai jelentőségét vizsgáló tanulmányunk alapját a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikájának 78, primer kután melanomával diagnosztizált és kezelt betegének hosszú távú klinikai utánkövetése jelentette. A primer kután melanomát valamennyi betegnél 2003 és 2004 között diagnosztizálták és távolították el sebészileg a Klinikán. A betegeket retrospektíven két csoportba soroltuk a műtétet követő 5 éves utánkövetésben dokumentált progressziójuk alapján. Az alacsony rizikócsoportba tartozó betegeknél a kutatásba való bevonás idején nem volt igazolható áttét, míg a magas rizikójú csoportba tartozóknál korai áttéteket detektáltunk. A betegek klinikai kórelőzményét és a tumorok patológiai jellemzőit a Semmelweis Egyetem eMedSol adatbázisából gyűjtöttük össze, míg a túlélési adatokat az Országos Egészségbiztosítási Pénztártól szereztük be.

Az agyi áttétre fókuszáló vizsgálatunkba a két intézményben kezelt, összesen 67 áttétes melanomában szenvedő beteg került bevonásra. A betegség progresszióját szoros klinikai utánkövetéssel, fizikális vizsgálattal, laborokkal és három havonta történő kontroll képalkotó vizsgálatokkal monitoroztuk. A kontroll koponya-nyak-mellkas-has-kismedence computertomografos (CT) vizsgálatok mellett, cerebrális metasztázis gyanúja esetén valamennyi betegnél a koponyáról mágneses rezonanciavizsgálat (MRI) is készült.

Két csoportra osztottuk a követett betegeket, az extracranialis metasztázissal (EC) rendelkező 23 beteg esetében agyi metasztázist nem detektáltunk, míg a 44 beteget számláló intracranialis áttétes csoportban (BR) kontrasztanyagot MRI-vizsgálattal igazolódott az agyi áttét. A relatív nagyszámú agyi áttét (N=44) miatt kezelt beteg bevonását egy széles időintervallumban (1998-2005) követett betegcsoport tanulmányozása révén tudtuk megvalósítani. 5 betegnél került sor az agyi metasztázisok idegsebészeti eltávolítására az Országos Klinikai és Idegtudományi Intézetben, ezekből a

daganatokból rutin szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A betegek korelőzményeit és a primer tumorok hisztopatológiai jellemzőit a résztvevő intézmények informatikai adatbázisaiból gyűjtöttük össze.

Klinikai vizsgálatainkat a Helsinki Deklaráció szigorú követelményeinek megfelelően, és az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (TUKEB) jóváhagyásával végeztük el (SE TUKEB 32/2007).

3.2 Immunhisztokémia

Formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE), primer tumort tartalmazó blokkokból 5 mikrométer vastag metszeteket készítettünk mikrotóm segítségével, melyeket SuperFrost Plus (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Németország) tárgylemezekre helyeztünk. A metszeteket deparaffináltuk, majd mikrohullámú feltárást követően, 7D11 típusú, egér monoklonális anti-AQP1 primer antitesttel inkubáltuk +4⁰C fokon egy éjszakán át (1:50 hígítás, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA).

Második körben az antitest kimutatására a Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystem, Nussloch, Németország) detektációs rendszert használtuk az alkalmazási előírásnak megfelelően szobahőmérsékleten 60 percig. Az előhívást AEC (aminoetil-karbazol) Peroxidase Substrate Kittel (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) végeztük el a protokollnak megfelelően. A primer antitest optimális hígítását manuálisan határoztuk meg, majd immunfestő automatával (Ventana Medial System Inc., Tucson, Arizona, USA) végeztük el a metszetek immunhisztokémiai jelölését. Pozitív (human vese) és negatív (human placenta) kontrollt egyaránt alkalmaztunk. Belső kontrollként az AQP1-et kifejező vaszkuláris endothelium szolgált. A háttérfestés hematoxilinnal történt.

A kettős immunjelöléshez a Ventana Benchmark XT Automata rendszert használtuk. A 7D11 klón AQP1 egér monoklonális antitest (Abcam, Cambridge, MA, USA) detektálásához diaminobenzidin (DAB) alapú rendszert (ultraView Universal DAB Detection Kit, Ventana Medial System INC.Tucson, AZ, USA), míg az S100-B nyúl poliklonális antitest (1:5000 dilution, DAKO, Agilent Technologies, Glostrup, Denmark) jelöléséhez alkalikus kitet (ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana Medial System) alkalmaztunk.

3.2.1 Immunhisztokémiai értékelés

A tumortípus és a grading meghatározása a melanoma WHO klasszifikációjának megfelelően történt. A patológus szakorvosok (T.J. és K.I.) segítségével meghatároztuk, standard értékelés alapján az 1+, 2+, 3+ -es területek százalékos arányát. A metszetek tumort és normális szövetrészletet egyaránt tartalmaztak, így három régió került kiválasztásra és kiértékelésre a metszeten. A metszetek kiértékelésére a H-score 0-tól 300-ig terjedő pontozási rendszert alkalmaztuk a következő egyenlet segítségével:

H-score (0-300 scale)=3x (3+ %)+2x (2+ %)+1x (1+%) (Pierceall, Wolfe et al. 2011).

A jelölt sejteket a jel erőssége alapján enyhe (1+), közepes (2+) és erősen (3+) pozitív jelölődésű kategóriákba soroltuk, majd az egyes kategóriákba tartozó sejtek százalékos arányát meghatároztuk a tumorsejtek összesített számához viszonyítva, végül a kapott számot megszoroztuk a kategória számmal és összeadtuk a kapott értékeket. A maximális érték így 300, amennyiben valamennyi tumorsejt maximális intenzitással jelölt. Az immunhisztokémiai kiértékelést két szakképzett patológus (T.J. és K.I.) végezte egymástól független módon, túlélési adatokat nem ismerve.

3.3 BRAF V600 mutáció analízis

Az AQP1-expresszió általános prognosztikai jelentőségét vizsgáló tanulmányunkba bevont 78 beteg mintáiból kíséreltük meg a BRAF V600 mutáció jelenlétének meghatározását, mivel az előrehaladott melanoma kezelését az elmúlt években bevezetésre került célzott terápiát jelentő BRAF-gátlók forradalmasították. Fontos ugyanakkor megjegyeznünk, hogy a retrospektív genetikai analízisek eredménye nem befolyásolta a betegek kezelését.

A betegek formalinban fixált, paraffinba ágyazott melanoma mintáiból BRAF V600 mutáció meghatározást is végeztünk polimeráz láncreakció (PCR) és restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP) segítségével.

A melanoma mintákból a DNS-izolálásához High Pure PCR Template Preparation Kitet (Roche, Basel, Switzerland) alkalmaztunk. A PCR reakció kivitelezése a standard protokolloknak megfelelően történt a kereskedelemben elérhető BRAF V600 primerekkel (Life Technologies, Grand Island, New York, USA). A PCR reakciót Swift Max Pro Thermal Cycler (ESCO, Singapore) készülékkel végeztük el. A PCR termékek

szétválasztására 3%-os agarózgél, míg detektálásukra ethidium-bromid festést követően Gel-Doc 2000 rendszert használtunk (Bio-Rad, Life-Science, Hercules, California, USA). A PCR amplifikációval egy 224 bázispárnyi terméket kaptunk, melyet TspRI restrikciós endonukleázzal (NewEngland Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) emésztettünk. A TspRI restrikciós enzim hatására a 224 bázispárnyi termékből keletkezett egy 212 bázispárnyi termék, mely a mutáns allélt, míg a reziduális rész a vad típust reprezentálta. A mutációk igazolására Sanger-szekvenálást alkalmaztunk (3130 Genetic Analyzer; Thermo Scientific, Westburg, Netherlands).

3.4 Statisztikai módszerek

A statisztikai értékeléseket Statsoft 10 program segítségével végeztük el (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). A különböző betegkohorszok klinikai és patológiai jellemzőinek összehasonlítására Mann–Whitney U-tesztet, T-tesztet, χ^2 -tesztet és Fischer's egzakt tesztet használtunk. Az egyes paraméterek közötti összefüggések igazolására Spearman-féle rangkorrelációt alkalmaztunk. Az ábrák elkészítéséhez részben GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, USA) programot használtunk.

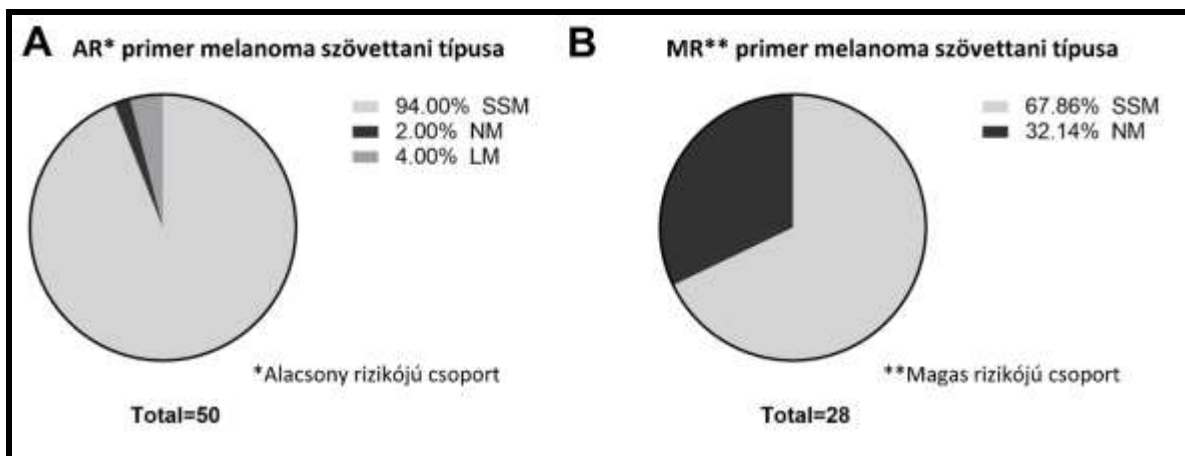
Kaplan-Meier módszerrel becsültük meg a túlélési valószínűségeket, míg a különbségek értékelésre a log-rank teszt szolgált. Az AQP1- expresszió túlélésre és metasztatikus progresszióra gyakorolt független prognosztikus értékének meghatározására a Cox proportional hazards modellt alkalmaztuk. A teszteket kétoldali (two-tailed), 95%-os konfidenciaintervallummal értékeltük, szignifikánsnak tekintettük az eredményt, amennyiben a p értéke kisebbnek adódott, mint 0,05.

4 Eredmények

4.1 Alacsony és magas rizikójú betegcsoportok klinikai utánekvetése és hisztopatológiai jellemzői

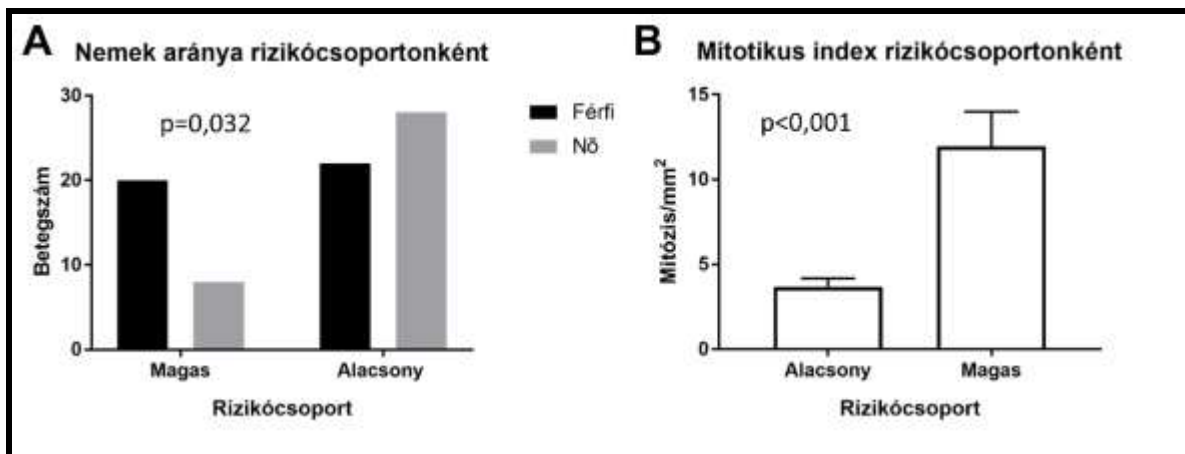
Az AQP1 expresszió klinikai jelentőségét két, konsekutív betegekből álló csoport szövettani mintáinak feldolgozását követően vizsgáltuk. Valamennyi vizsgált beteg 2003 január és 2004 december között esett át primer melanoma kuratív célú sebészi eltávolításán a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján.

Az alacsony rizikócsoportba tartozó páciensek (AR) (n=50) nem mutattak progressziót a műtétet követő öt évben, míg a magas rizikójú betegeknél (MR) (n=28) korai áttétek kialakulását dokumentálták. A primer melanoma szövettani típusa tekintetében hasonló megoszlást mutatott a két csoport, az SSM adta a daganatok többségét, ugyanakkor az MR csoportban szignifikánsan magasabb számban (32%) fordult elő nodularis típus (6. ábra).



6. ábra A primer melanomák szövettani típusainak megoszlása az alacsony (A) és a magas (B) rizikójú betegcsoportokban. Az MR csoportban gyakoribb volt a nodularis forma előfordulása.

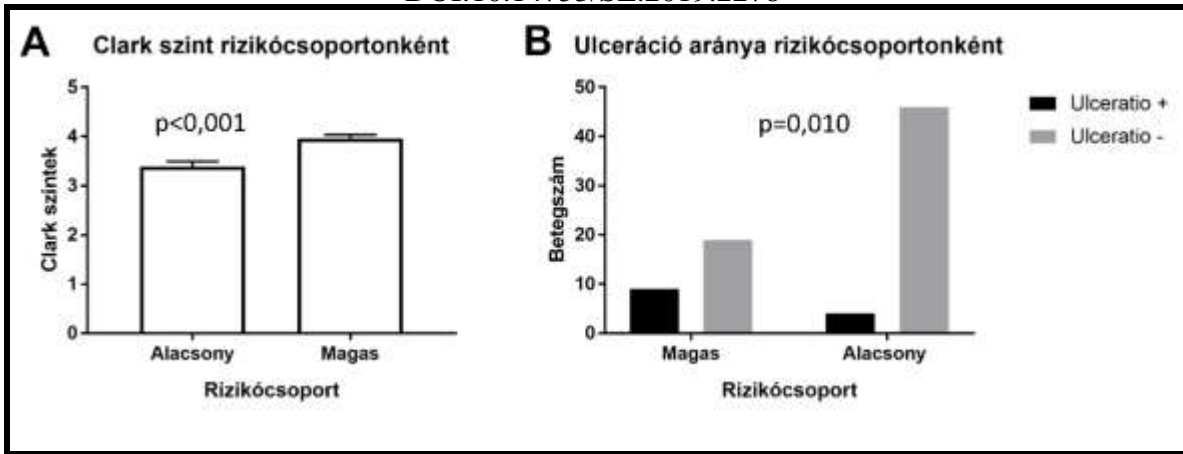
A kután melanoma validált prediktív faktorainak tekintetében a két rizikócsoporthoz szignifikáns különbségeket mutatott. Az MR csoportban szignifikánsan magasabb volt a férfi betegek aránya az AR csoporthoz képest (71% vs. 44%) ($p=0,032$) (7. ábra A). Hisztopatológiai markerek tekintetében is jelentős különbségeket dokumentáltunk, az AR csoportban a daganatokat jellemző mitotikus index medián értéke 3,68 mitózis/mm² (minimum: 0,00 mitózis/mm², maximum 16,0 mitózis/mm²) volt, ami szignifikánsan ($p<0,001$) alacsonyabb az MR csoport 11,96 (minimum 2,00 mitózis/mm² maximum 41,00 mitózis/mm²) értékénél (7.ábra B).



7. ábra A rizikócsoporthoz klinikai és hisztopatológiai jellemzői: a bal oldali oszlopdiagramon fekete színnel jelzett férfi nemű betegek aránya szignifikánsan ($p=0,032$) magasabb a magasabb rizikójú betegcsoporton belül (A). A jobb oldali oszlopdiagramon jól látható, hogy a magas rizikójú csoportban szignifikánsan magasabb ($p<0,001$) a tumorsejtek osztódási rátáját jellemző mitotikus index (B) az alacsony rizikójú csoporttal összehasonlítva (az oszlopok az átlagot, a pálcikák az átlag szórását jelentik).

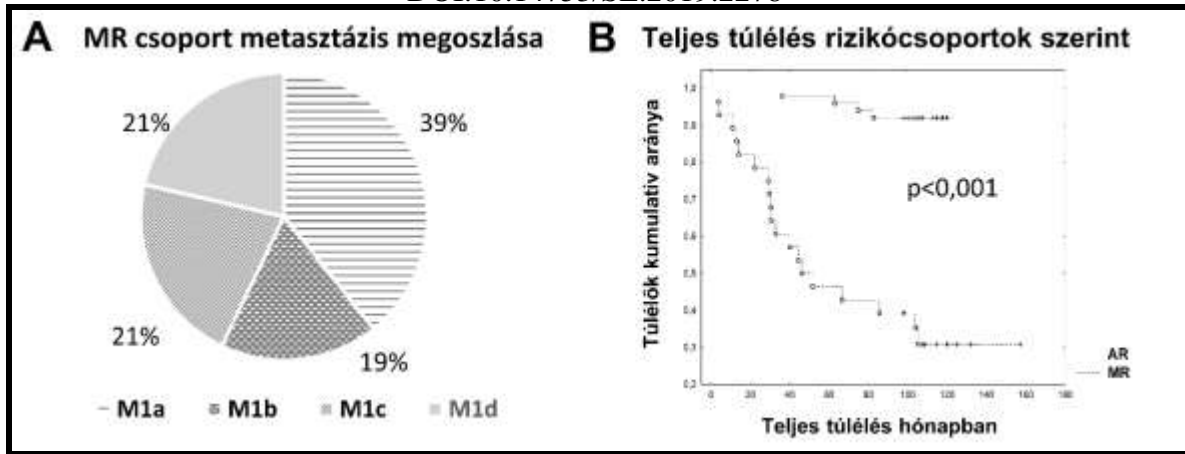
A primer kután melanomák progresszióját validáltan előrejelző Clark-szint ugyan egyik kohorsz tekintetében sem volt kifejezetten alacsonynak mondható, hiszen az AR csoportban is átlagosan 3,35-ös szintet találtunk (minimum 2,0, maximum 4).

Az MR csoportban ugyanakkor konzekvesen magasabb értékeket detektáltunk, és az átlag Clark szint 3,96-os értéke (minimum 3,0 maximum 5,0) szignifikánsan ($p<0,001$) magasabbnak bizonyult az AR betegekkel összehasonlítva, az értékek alacsony szórása miatt (8. ábra A). Az ulceráció tekintetében egyértelmű a két csoport különbsége, míg az AR betegeknél csak 8% volt az ulcerált daganatok aránya, a MR csoportban ez elérte a 32%-ot, ami statisztikailag szignifikáns eltérésnek bizonyult ($p=0,010$) (8. ábra B).



8. ábra Rizikócsoportok hisztopatológiai jellemző. A bal oldali oszlopdiagram a tumorok átlagos Clark szintjét mutatja, a magas rizikójú csoportban szignifikánsan magasabb értéket látunk az alacsony rizikójú csoporttal összehasonlítva (az oszlopok az átlagot, a pálcikák az átlag szórását jelentik) (A). A jobb oldali oszlopdiagramon fekete színnel jelzett ulcerált daganatok aránya szignifikánsan magasabb a magasabb rizikójú betegcsoporton belül, az alacsony rizikójú csoporttal összehasonlítva (B).

A két rizikócsoport közötti különbség nem csak az egyes prognosztikus markerek tekintetében volt kimutatható, hanem a betegszelekció céljával összhangban a betegek valós prognózisában is jelentős különbséget dokumentáltunk. Az MR csoportba sorolt betegek várható prognózisa a jelentős számú központi-idegrendszeri (21%), hasi belszervi (21%) és tüdő áttét (19%) kialakulása miatt jóval rosszabb volt, és a klinikai utánkövetés során is szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb teljes túlélést dokumentáltunk ebben a betegcsoportban (9. ábra).



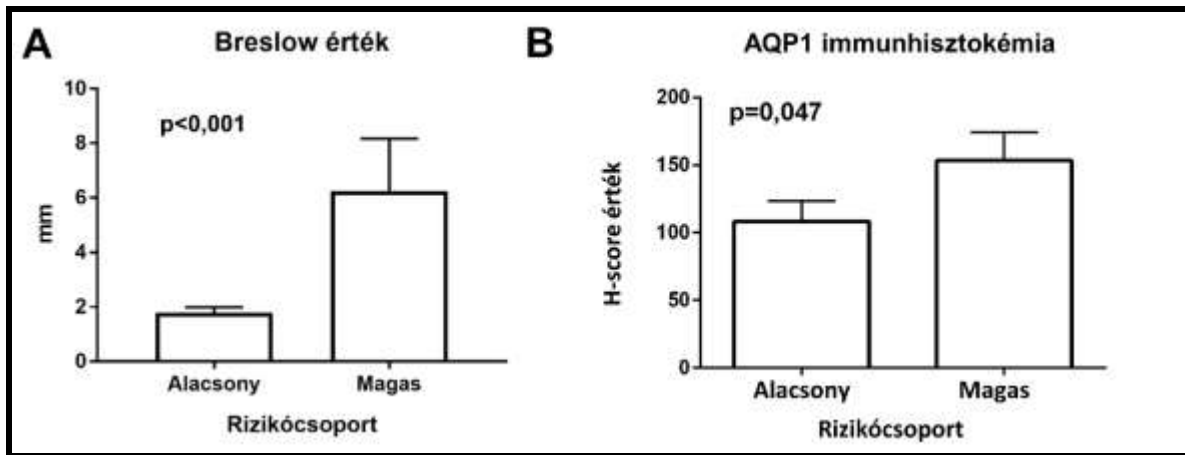
9. ábra A magas rizikójú betegek áttéteinek M kategória szerinti megoszlása (M1a subcutan és nyirokcsomó áttét 39%, M1b tüdő áttét 19%, M1c visceralis áttét 21%, M1d központi idegrendszeri áttét 21%) (A) és a magas és alacsony rizikójú melanómában szenvedő betegek teljes túlélésének összehasonlítása (B) során egyértelműen látszik az AR betegek szignifikánsan kedvezőbb klinikai prognózisa (B) ($p < 0,001$).

2. táblázat A klinikai utánkövetésbe és szövettani kiértékelésbe bevont betegek adatainak áttekintő összehasonlítása. Az átlagok mellett a minimum és maximum értékek szerepelnek.

Csoport	1 (alacsony rizikó) I-II. stádium	2 (magas rizikó) III-IV. stádium	p érték
Betegek száma	50	28	NA
Életkor (év)	53,8 (20,1-78,2)	54,8 (26,4-80,1)	0,652
Férfi nem %	44	71,4	0,032
Mitotikus index	3,68 (0,0-16,0)	11,96 (2,0-41,0)	0,000
Ulceráció %	8,0	32,1	0,008
Clark	3,35 (2,0-4,0)	3,96 (3,0-5,0)	0,000
Breslow (mm)	1,79 (0,5-6,8)	6,26 (0,8-52,0)	0,000

A két csoportban a primer tumorok Breslow vastagsága is jelentős különbséget mutatott ($p < 0,001$): míg az AR csoport primer daganatainak vastagsága átlagosan 1.8mm volt (minimum 0.5mm maximum 6.8mm), addig az MR kohorszban 6,3 mm-es átlagvastagságot (minimum 2,0mm maximum 52,0 mm) mértünk (10. ábra A) (Imredi, Toth et al. 2016).

A betegek életkorának tekintetében nem volt szignifikáns különbség ($p=0,630$) a két csoport között, az AR betegek átlagos életkora 53,8 év (minimum 20,2 év, maximum 78,8év), míg az MR csoportban 54,1 év (minimum 26,4 év, maximum 80,1 év) volt az átlagéletkor. A magas rizikócsoportba tartozó betegeknél a férfi nem aránya szignifikánsan magasabb értéket mutatott az alacsony rizikócsoportba tartozó férfiak arányához képest ($p=0,032$). A vizsgálatba bevont két rizikócsoport klinikopatológiai jellemzőit a 2. táblázatban foglaltuk össze a jobb áttekinthetőség céljából.



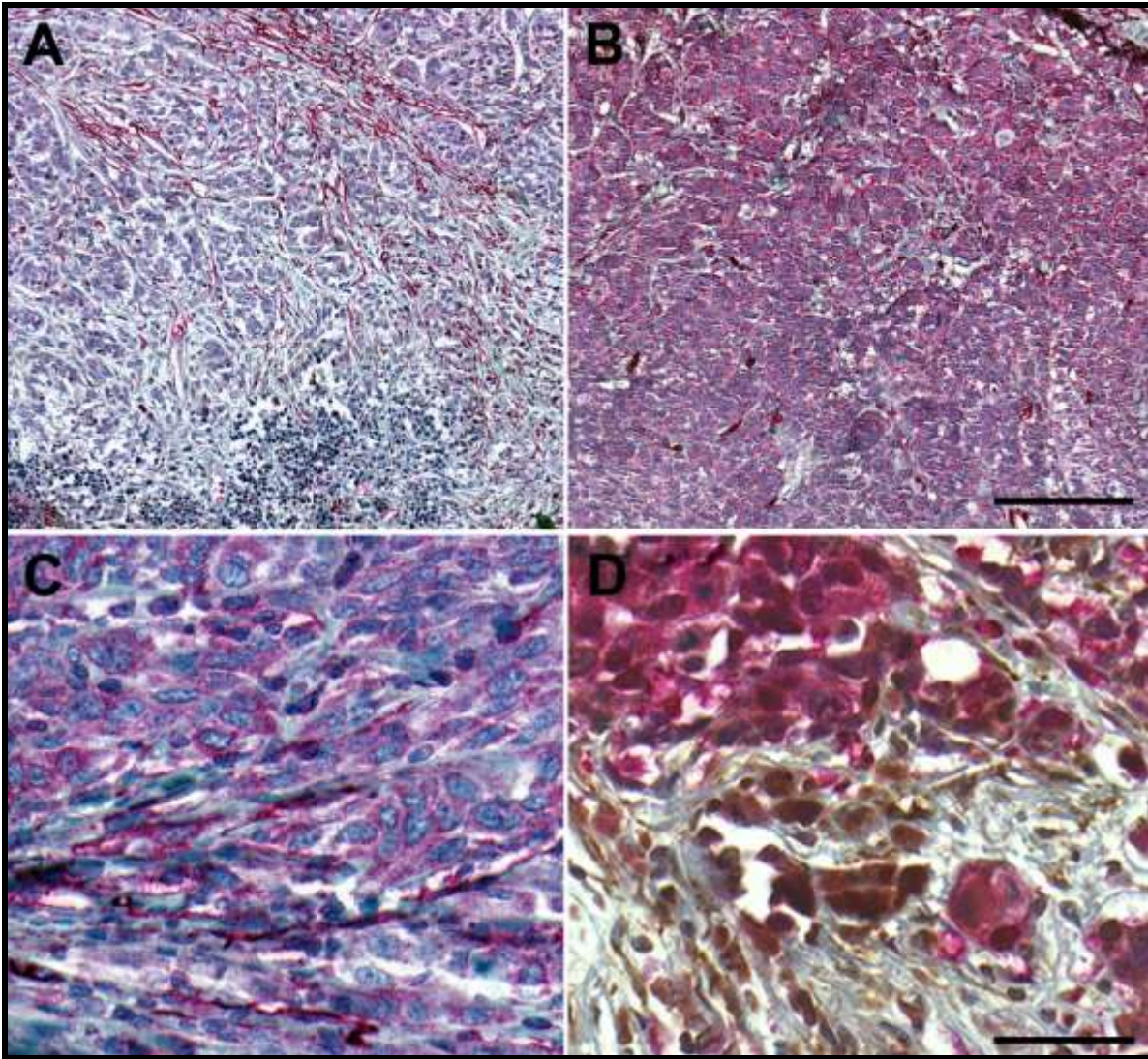
10. ábra Breslow érték és AQP1 protein expresszió az alacsony és a magas rizikójú betegcsoportokban. Az oszlopok az ábra bal oldalán szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabb Breslow értéket mutattak a magasabb rizikójú betegek esetében (A), ugyanezen betegcsoportok AQP1 H-pontszáma is szignifikánsan magasabb volt ($p = 0,047$). Az oszlopok az átlagokat, a hibajelek az átlag szórását jelenítik meg (Imredi, Toth et al. 2016).

4.2 Fokozott AQP1-protein expresszió a magas rizikójú melanómákban

Az AQP1 immunhisztokémiai kifejeződését 78, primer kután melanómában szenvedő beteg esetében értékeltük, akik két különböző becsült prognózissal rendelkező kohorszot alkottak. A pozitív AQP1-reakció esetén az endothelsejtek piros membránfestődést (11. A ábra), míg a tumorsejtek citoplazmatikus és membránfestődést egyaránt mutattak (11. B, C ábra). Kettős jelölés alkalmazásával az AQP1-pozitív melanomasejtek jelenléte nem korrelált szorosan az S100-pozitív tumorsejtekkel, gyakrabban lehetett látni egy markerre pozitív melanomasejteket a kettős jelölődésük mellett (11. D ábra).

Immunhisztokémiai módszerrel megvizsgáltuk az AQP1-expressziót a H-score alapján a magas és az alacsony rizikójú betegcsoportokban. Az alacsony rizikócsoportba tartozó betegeknél távoli áttéket nem igazoltak a képalkotó vizsgálatok, 50 beteg tartozott ebbe a csoportba. A magas rizikócsoportba tartozó betegeknél távoli áttéket detektáltunk, így többek között a tüdőben, májban, mellékvesében, és az agyban. A magas rizikójú csoportba 28 beteget vontunk be.

A vizsgált betegpopuláció 66,7%-a (52 eset) expresszáta az aquaporin-1-et, a median H-score 124,24 (0-300) volt a bevont betegcsoportban.



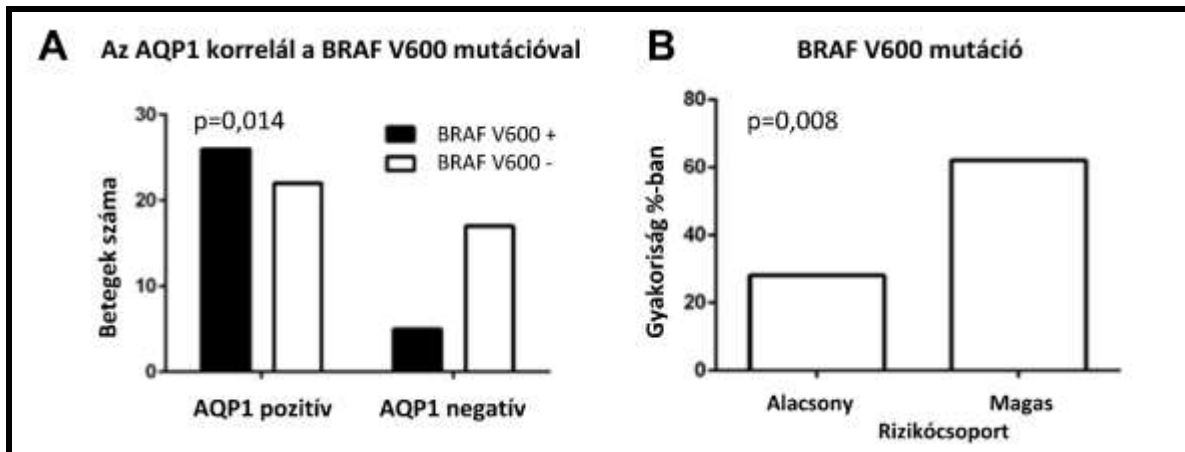
11. ábra Az AQP1-negatív melanoma mintákban kizárólag az intratumorális kapillárisok mutattak pozitív reakciót (A), míg az AQP1-pozitív melanoma mintákban a diffúz piros jelölés miatt az intratumorális kapillárisok nem különböztethetők meg a melanoma sejtészektől (B). Referencia vonal =200 μ m. A nagy felbontású képeken az AQP1-pozitív melanomasejtek esetén jól látható a citoplazmatikus és a membránasszociált piros jelölődés (C), míg a kettős immunjelöléssel készült felvételen az S100 melanomamarker (piros jel) és az AQP1 (barna jel) gyakori, de nem kizárólagos kolokalizációja figyelhető meg (D). Referenciavonal: 50 μ m (Imredi, Toth et al. 2016).

Legfontosabb megfigyelésünk szerint szignifikánsan magasabb AQP1 H-score ($p=0,047$) jellemezte a magas rizikójú melanomás betegek csoportját az alacsony rizikójú betegekkel összehasonlítva (10. B ábra).

A Spearman-féle rangkorreláció során az AQP1 H-score-t a melanoma progressziójában szerepet játszó meghatározott prognosztikai faktorokkal hasonlítottuk össze, azonban nem találtunk szignifikáns összefüggést a mitotikus indexszel ($p=0,42$), a Clark szinttel ($p=0,95$) és a Breslow-féle tumorvastagsággal sem ($p=0,51$). Az AQP1 H-score nem mutatott szignifikáns összefüggést a nemmel, a korrall és a szövettani típussal sem.

4.3 A BRAF V600 mutáció jelenléte korrelál az AQP1 - expresszióval

Sikeres mutációs vizsgálatokat 70 kután melanomát tartalmazó mintából tudtunk végezni, mely az immunhisztokémiai jelölésre került minták 89,74%-át reprezentálta. A mutáns allél 31 mintában fordult elő, így a vizsgált betegpopulációban a BRAF V600 mutáció előfordulása 44,29%-os volt. A mutáns allél jelenléte szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,008$) az alacsony rizikójú kohorszban ($n=14/45$; 31%), mint a magas rizikójú betegek esetében ($n=16/25$; 64%). Fontos megjegyezni, hogy szignifikáns összefüggést detektáltunk az AQP1 fehérje kifejeződése és a BRAF V600 mutáció között ($p=0,014$) (12. ábra).

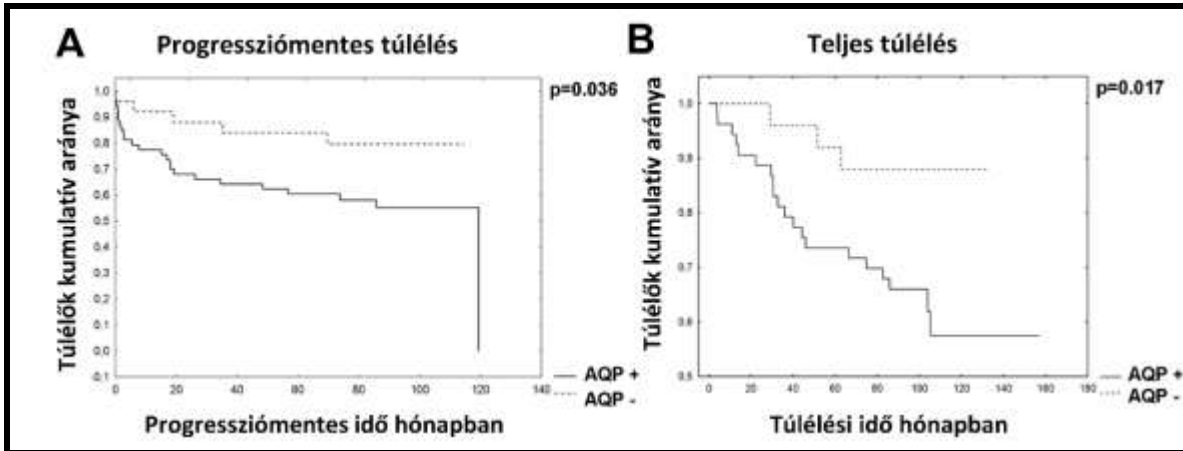


12. ábra A BRAF V600 mutációk előfordulási gyakorisága az alacsony és magas rizikójú betegcsoportokban (B), valamint a mutáció előfordulásának összefüggése az AQP1-expresszióval. A magas rizikócsoportokban szignifikánsan magasabb volt a BRAF V600 mutáció előfordulási gyakorisága ($p=0,008$), és a mutáció előfordulása szignifikáns korrelációt mutatott az AQP1 protein expresszióval ($p=0,014$) (Imredi, Toth et al. 2016).

4.4 Az AQP1 - expresszió összefügg a progressziómentes és teljes túléléssel

A betegek részletes klinikai utánkövetésének medián időtartama 81,1 (0,0-119,4) hónap volt, míg a validált teljes túlélési adatok median utánkövetési ideje 101,8 (3,8-157,0) hónapnak adódott.

Az AQP1 expressziójának metasztatikus progresszióra és túlélésre kifejtett hatását Kaplan-Meier módszerrel és log rank teszttel vizsgáltuk. Analízisünk alapján az AQP1-pozitív kután melanomás eseteknél mind a progressziómentes túlélés ($p=0,038$), mind a teljes túlélés ($p=0,017$) szignifikánsan alacsonyabb volt az AQP1-negatív kután melanomás esetekkel összehasonlítva (13. ábra).



13. ábra Az AQP1-pozitív (AQP+) és AQP1-negatív (AQP-) kután melanomás betegek progressziómentes és teljes túlélésének ábrázolása Kaplan-Meier görbékkel: szignifikáns különbség látható a progressziómentes túlélés (A) ($p=0,036$) és a teljes túlélés (B) ($p=0,017$) tekintetében egyaránt (Imredi, Toth et al. 2016).

Az AQP1 független prognosztikus értékét is vizsgáltuk a betegpopulációban, melyhez Cox-féle hazard modellt alkalmaztunk lépcsőzetes logisztikus regresszióval. A modell számítása során bevonásra kerültek az ulceráció, a mitotikus index, a Breslow-féle tumorvastagság, az életkor, a férfi nem az AQP1-expresszió mellett. Az analízis során nem igazolódott az AQP1 független prediktor szerepe sem a progressziómentes, sem a teljes túlélésre vonatkozóan (3., 4. táblázat).

3. táblázat *Multivariáns analízis a teljes túlélés vizsgálatára: az AQP1 expresszió nem bizonyult a teljes túlélés független prediktorának.*

	B	SE	Wald	Df	Sig.(p)	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)
							Lower
AQP1 poz	1.006	.778	1.671	1	.196	2.734	.595
Breslow	.015	.040	.146	1	.702	1.015	.940
Ulceráció	1.221	.537	5.169	1	.023	3.390	1.183
Mit.index	.107	.046	5.544	1	.019	1.113	1.018

4. táblázat *Multivariáns analízis a progressziómentes túlélés vizsgálatára: az AQP1 nem bizonyult a progressziómentes túlélés független prediktorának.*

	B	SE	Wald	Df	Sig. (p)	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)
							Lower
AQP1 poz	1.190	.763	2.432	1	.119	3.287	.737
Mit.index	.069	.037	3.542	1	.060	1.071	.997
Breslow	.033	.039	.689	1	.407	1.033	.957
Ulceráció	1.045	.497	4.420	1	.036	2.842	1.073

4.5 Az AQP1 expressziója fokozott a kután melanoma központi idegrendszeri progressziója során

Az agyi metasztázisok előfordulása meglehetősen magas metasztatikus melanómában, a betegek mintegy 50%-nál diagnosztizálnak agyi áttétet a betegség progressziója során (Spagnolo, Picasso et al. 2016). Az agyi metasztázis esetén a prognózis igen kedvezőtlen, a medián teljes túlélés kezelés nélkül megközelítőleg 4-5 hónap, míg bizonyos idegsebészeti és neuroradiológiai beavatkozásokkal 8-10 hónap érhető el (Franceschini, Franzese et al.

2016). A melanomás betegek autopsziájakor, az esetek 75%-ában találnak intracerebrális metasztázist a patológusok (Staudt, Lasithiotakis et al. 2010).

4.5.1 Metasztatikus betegcsoportok összehasonlítása és klinikai utánkövetése

Az AQP1 expresszió és az intracranialis progresszió összefüggését két konszekutív, extracranialis (EC), illetve intracranialis (IC) metasztatikus betegcsoporton vizsgáltuk (3. táblázat). A betegek kezelése hazánk két legnagyobb dermatoonkológiai központjában, az Országos Onkológiai Intézet Dermatoonkológiai Osztályán és a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőnonkológiai Klinikáján történt a 2003 és 2014 közötti időintervallumban. Az extracranialis betegcsoportba 23 beteg tartozott, akiknél az utánkövetési periódus alatt nem jelentkezett cerebrális disszemináció míg az intracranialis metasztázist hordozó betegcsoportnál (n=44) kontrasztanyaggal történő MR vizsgálattal cerebrális propagációt diagnosztizáltak. A betegek kórelőzményét és a primer tumorok jellemzőit a résztvevő intézetek klinikai adatbázisából nyertük (5. táblázat). A két betegcsoportban, a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően eltérő kezelési stratégiákat alkalmaztak, a kezeléseket a 6. táblázatban foglaltuk össze.

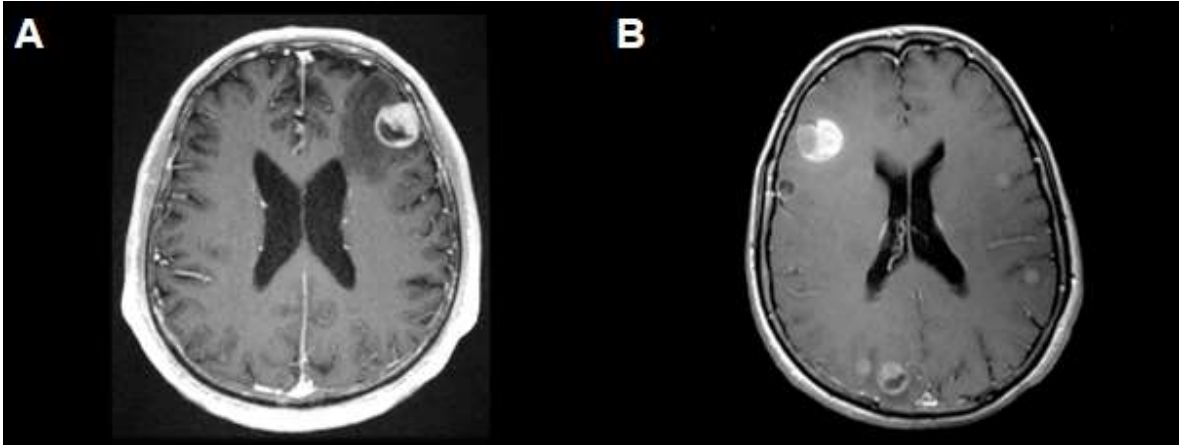
5. táblázat *A klinikai utánkövetésbe és a szövettani kiértékelésbe bevont betegek adatainak áttekintő összehasonlítása. Az átlagok mellett a minimum és maximum értékeket szerepelnek (Imredi, Liskay et al. 2018).*

Csoport	1. EC áttétes melanoma	2. IC áttétes melanoma	p =
Betegek száma	23	44	
Életkor	56,0(26,6;80,5)	56,3(24,8;82,9)	0,963
Férfi nem	73,9%	61,36%	0,304
Clark	3,97 (3,0;5,0)	3,52 (1,0;5,0)	0,177
Breslow vastagság (mm)	6,62(0,8;52,0)	3,23 (0,1;10,0)	0,087
Utánkövetés (hónap)	83,0 (3,8;186,7)	55,1 (4,0;227,0)	0,030

6. táblázat A klinikai utánkövetésbe bevont áttétes betegek kezelése során alkalmazott terápiás modalitások összehasonlítása. **BOLD:** Bleomycin, Oncovin, Carmustin, Dacarbazine

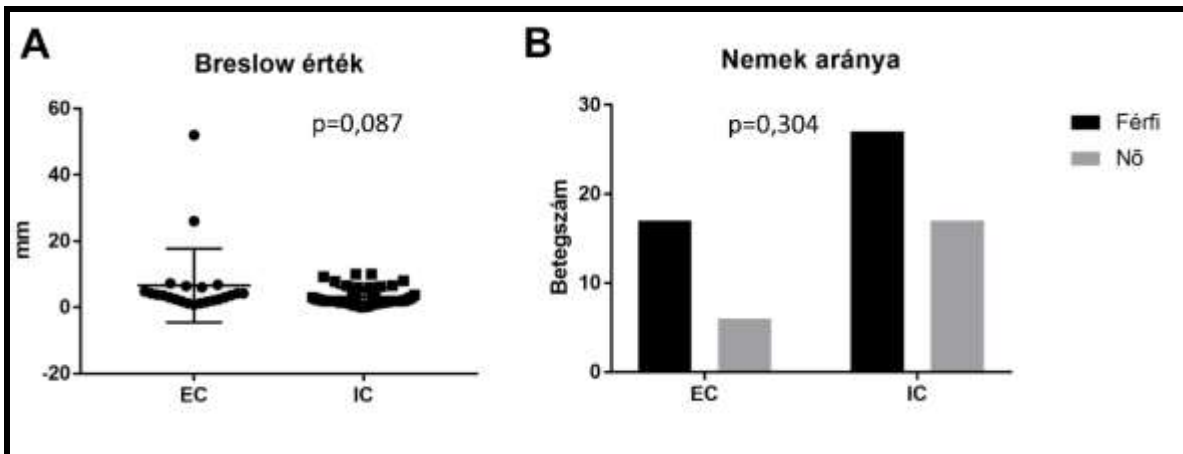
Csoport	EC áttétes melanoma (n=23)	IC áttétes melanoma (n=44)	p=
Sugárkezelés %	26,09	88,18	<0,001
Carboplatin %	0,00	43,18	<0,001
Temodal %	0,00	18,18	0,044
BRAF inhibitor %	0,00	20,45	0,023
Anti CTLA4 %	4,35	2,27	1,000
Interferon %	60,87	52,27	0,438
Dacarbazine %	52,17	11,36	0,001
BOLD %	13,04	0,00	0,037

Az intracerebralis lokalizálódó szoliter metasztázisok (14. ábra) eltávolítására 5 esetben került sor az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben. Az idegsebészeti eltávolított metasztázisokból szövettan és immunhisztokémia is készült. Az extracranialis (EC) csoportba sorolt áttétes betegeknél (n=23), mely megegyezett a korábbi vizsgálatunk magas rizikójú csoportjával (MR) az agyi áttétesek kivételével, a kontrasztanyag MR-rel végzett kontrollvizsgálat nem igazolt agyi áttétet.



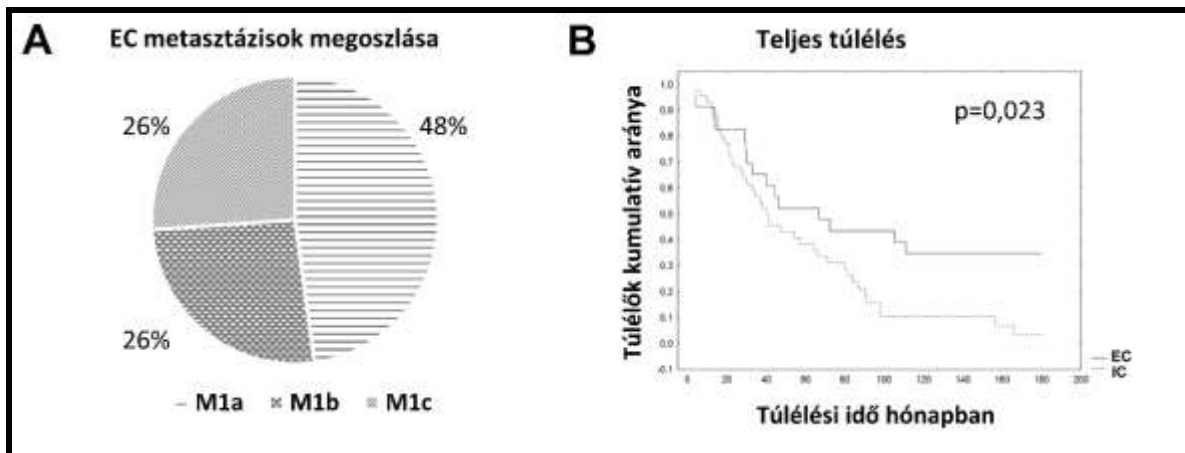
14. ábra Agyi áttétek metasztatikus melanomában. Az IC csoport betegei közül 5 esetben szoliter agyi áttét jelenlétét igazolták és idegsebészeti metastesectomia történt, amely során szövettani mintát is nyertünk (A). A kohorsz betegeinek többségében ugyanakkor multiplex agyi áttétet találtunk, így ezen betegnél műtéti beavatkozás nem történt (B) (MRI T1 szekvencia gadolinium adását követően).

A két betegcsoport a standard prediktív markerek tekintetében nem különbözött szignifikánsan, az EC csoportban a medián Breslow érték 3,6 mm volt (minimum 0,8 mm maximum 52 mm), míg az IC kohorsz median Breslow értéke 2 mm volt (minimum 0,1 maximum 7,85mm) ($p=0,087$). Az EC csoportban 73,9%, míg az IC kohorszban 61,4% volt a férfiak aránya ($p=0,304$) (15. ábra).



15. ábra Metasztatikus betegek Breslow értékei (A) és a nemek aránya (B) a központi idegrendszeri (IC) és extra-cranialis (EC) progressziót mutató betegcsoportban. Az extra-cranialis metasztázist adó primer daganatok (A) Breslow értékei ugyan nagyobb szórást mutattak, szignifikáns különbség nem volt kimutatható a két csoport között ($p=0,087$). Mindkét betegcsoportban többségben voltak a férfi nemű páciensek, így a nemek aránya nem különbözött érdemben (B).

Az extracranialis metasztázissal bíró betegek klinikai utánkövetésének median ideje 66,5 hónap (minimum 3,8 hónap; maximum 186,7 hónap) volt, míg az intracranialis áttéttel rendelkező esetek alacsonyabb túlélése miatt a median utánkövetés ebben a csoportban 40,4 hónapig tartott (minimum 4 hónap, maximum 227 hónap). Az AJCC (American Joint Committee on Cancer) legújabb ajánlása szerint (Gershenwald, Scolyer et al. 2017) osztályozva az extracranialis terjedést mutató melanoma eseteket: a betegek 48 %-a (n=11) az M1a kategóriába tartozott, mivel kizárólag subcutan illetve nyirokcsomó áttétet hordozott, míg 26%-nál (n=6) tüdő áttétet (M1b) és 26%-nál (n=6) viscerális metasztázist detektáltunk (M1c) (16.A ábra). Az ismert irodalmi adatoknak megfelelően az intracranialis áttétet hordozó betegek (M1d) teljes túlélése vizsgálatunkban is szignifikánsan alacsonyabb volt a többi extracranialis áttétes melanomában szenvedő beteggel összehasonlítva (55,1 vs 83,0 hónap a primer tumor detektálását követően) (16.B ábra).



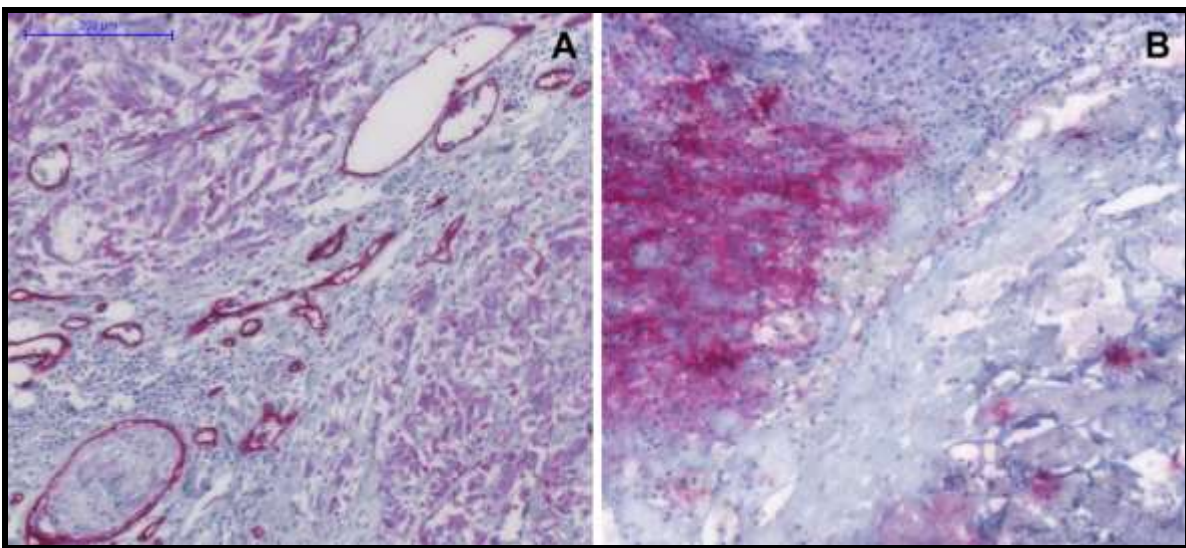
16. ábra Az extracranialis áttétek M kategória szerinti megoszlása (M1a subcutan és nyirokcsomó áttét, M1b tüdőáttét, M1c viscerális áttét) (A) és az intracranialis (IC) és az extracranialis (EC) metasztatikus melanomában szenvedő betegek teljes túlélésének összehasonlítása (B).

A kördiagramból jól látszik, hogy az extracranialis áttétes betegek közel felében csak nyirokcsomóáttétet dokumentáltunk (A), ami részben magyarázza is a két csoport túlélésében látható szignifikáns különbséget az EC áttétes betegek javára (B) ($p=0,023$).

4.5.2 Az intracranialis áttétet adó primer melanoma AQP1- expressziója magasabb az extracranialis áttétet adó melanománál

A vizsgálatba bevont 67 metasztatikus kután melanomás beteg primer tumorának, illetve 5 primer és a hozzátartozó agyi metasztázisokban az AQP1 expresszióját

immunhisztokémiai vizsgálattal határoztuk meg 5 mikrométer vastag FFPE metszeteken. Deparaffinálást és mikrohullámú feltárást követően, 7D11 típusú, egér monoklonális anti-AQP1 primer antitestet 1:50 hígítási arányban alkalmaztunk egy éjszakán át +4 Celsius fokon. Az előhíváshoz UltraView Universal AP-red detektációs rendszert használtunk. A primer antitest optimális hígítását manuálisan határoztuk meg, majd immunfestő automatával (Benchmark Ultra) történt az immunhisztokémiai reakciók kivitelezése. A pozitív AQP1-jelölődés esetén az endothelsejtekben vörös membránfestődést észleltünk, míg a tumorsejtek citoplazmatikus és membránpozitivitást egyaránt mutattak a primer tumorban (17. A ábra). Agyi metasztázisban a korábbi közleményekkel összhangban a kapilláris endothelsejtek nem expresszálták az AQP1-et (17. B ábra).

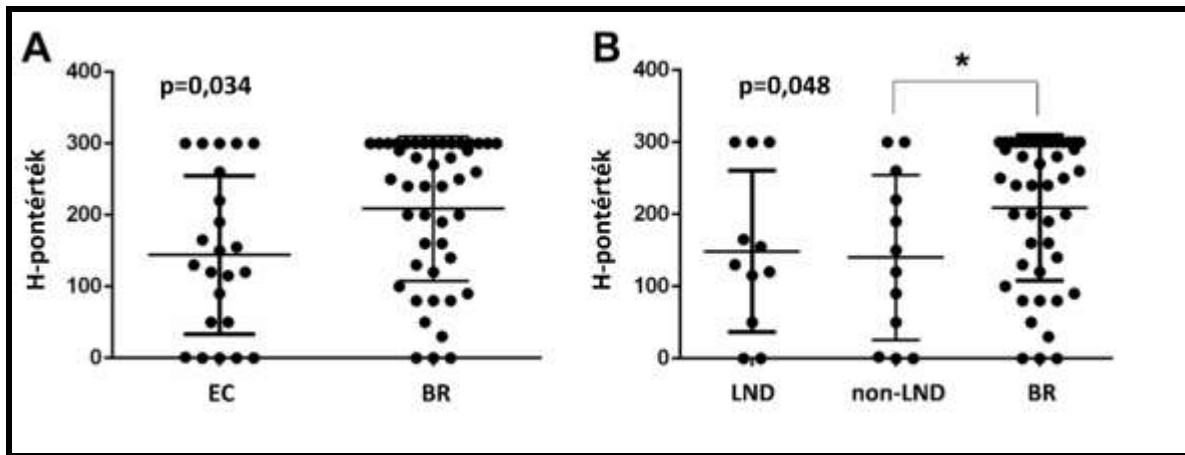


17. ábra Az AQP1-pozitív primer melanoma (A) és a hozzá tartozó cerebrális melanoma metasztázis (B). A primer tumorban található intratumoralis kapillárisok prominens pozitív reakciót mutattak (vörös jel), míg az AQP1-pozitív melanomasejteket különböző citoplazmatikus és membránasszociált reakció jellemezte egyenletes eloszlásban (A). Az AQP1-pozitív melanomasejtek egyenlőtlen eloszlást mutattak az intracerebrális metasztázis mintában, a kapillárisoktól távolabb mutattak expressziót, míg maguk a kapillárisok nem mutattak AQP1-kifejeződést (B) (Imredi, Liszkay et al. 2018).

Az AQP1-jelölődést mutató melanomasejteket a primer tumorok 89.56%-ában (60 eset) detektáltunk. A H-score median középértéke 187,00 (0; 300) volt a vizsgált populációban. Az extra- és intracranialis metasztázissal bíró csoportok nem mutattak szignifikáns eltérést a standard hisztopatológiai markerek tekintetében. Az intracranialis csoportban

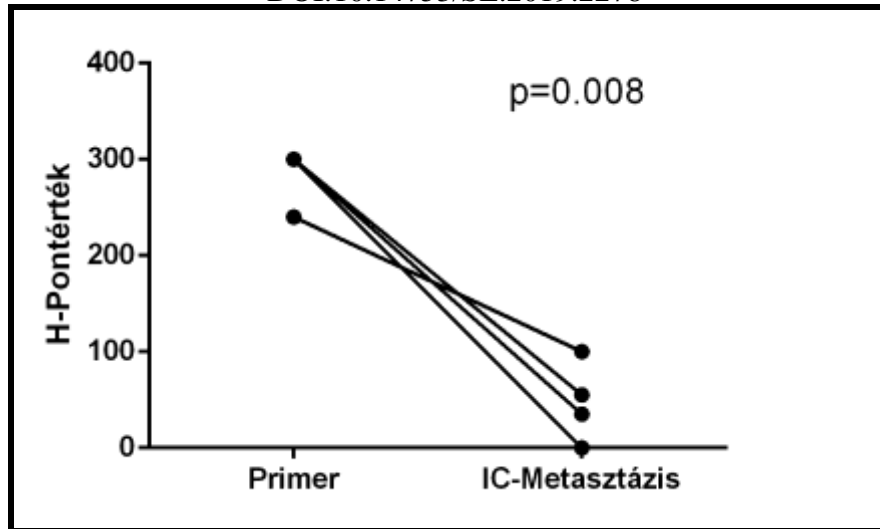
szignifikánsan magasabb AQP1 H-score-t észleltünk az extracranialis csoporthoz képest (T-tesztel $p=0.019$, Mann Whitney U-tesztel $p=0.034$) (18. A ábra).

Mivel az EC csoport heterogénen tartalmazott viszcerális és nyirokcsomó metasztázisokat, összevetettük a nyirokcsomó áttéteket (LND) a viszcerális (non-LND) és cerebrális metasztázist (BR) hordozó csoportokkal. Statisztikai analízisünk azt mutatta, hogy a nyirokcsomó és a viszcerális metasztázis esetei AQP1 expressziójukban nem különböztek egymástól, míg a viszcerális metasztázist mutató esetek AQP1 expressziója szignifikáns mértékben különbözött az agyi áttétektől ($p=0,048$) (18. B ábra).



18. ábra Az AQP1-expressziója az extracranialis (EC) és az intracranialis (BR) metasztatikus melanomás betegek csoportjaiban (A). Az AQP1 expressziója a nyirokcsomó áttéteket (LND-EC), a viszcerális áttéteket (non-LND-EC) és az agyi áttétes (IC) csoportokban (B). Az intracranialis progressziót mutató primer tumorok AQP1 expressziója magasabb az extracranialis csoportokénál. Az egyes eseteket pontok jelölik, míg a vonalak az átlagot és a standard deviációt mutatják (Imredi, Liszkay et al. 2018).

Az AQP1 H-score tekintetében szignifikánsan alacsonyabb értékeket találtunk az agyi áttétekben a primer tumorok immunhisztokémiai értékeivel összehasonlítva ($p=0,008$): a primer tumorok AQP1 H-pont középértéke 300,0, a metasztázisokban a H-középérték mindössze 35,0 volt (19. ábra). Az AQP1 fehérje tumoron belüli eloszlását vizsgálva az intracranialis metasztatikus mintákban azt találtuk, hogy az AQP1-pozitív tumorsejtek a mikroerektől távolabbi területeket foglalták el, míg a vaszkuláris struktúrákkal szomszédos melanomasejtek kevésbé expresszálták az AQP1 fehérjét (19. ábra).



19. ábra Az összetartozó primer és metasztatikus daganatok összehasonlító elemzése során az AQP1-expresszió szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott ($p=0,01$) az intracranialis metasztázisokban, mint a primer tumorokban (Imredi, Liszkay et al. 2018).

5 Megbeszélés

5.1 Az AQP1 expresszió klinikai jelentősége

Az elmúlt évtizedekben számos tumortípusban dokumentálták az AQP1 expresszió prognosztikai jelentőségét (Verkman, Hara-Chikuma et al. 2008). Emlőrákos betegeknél a magas AQP1-expresszió kedvezőtlenebb túléléssel társult, különösen a luminalis altípusban. Az AQP1 citoplazmatikus expressziója elősegíti az emlőrák progresszióját és potenciális biomarkerként szolgálhat az emlődaganatok diagnosztikájában (Qin, Zhang et al. 2016). Kolorektális daganatokban az AQP1 expressziója szignifikáns összefüggést mutatott a nyirokcsomó-metasztázisokkal multivariáns logisztikus analízis során (Kang, Kim et al. 2015). Primer tüdő-adenocarcinómákban az AQP1 szignifikáns expresszióját figyelték meg, míg kissejtes tüdőrákok gyakorlatilag nem expresszálták az AQP1 fehérjét. Mesotheliomák és metasztatikus adenocarcinómák szintén magas AQP1-expressziót mutattak, mely elsősorban a tumor környezetében található kis kapillárisok endothelborításában számottevő (Lopez-Campos, Sanchez Silva et al. 2011). Az AQP1-t kifejező tüdő-adenocarcinomás betegek esetében szignifikánsan rövidebb progressziómentes túlélést (PFS) figyeltek meg az AQP1 fehérjét nem expresszáló betegekkal összehasonlítva (46,1 hónap versus 56,2 hónap). Multivariáns analízissel bizonyították, hogy az AQP1-expressziója szignifikánsan korrelál a rövidebb PFS-sel, tehát független prognosztikai faktor, továbbá a jövőben tüdő-adenocarcinómák potenciális prognosztikus biomarkere lehet (Yun, Sun et al. 2016).

Kután melanómában ugyanakkor egészen a közelmúltig csak experimentális vizsgálatokból származó adatok utaltak a fehérje tumorprogresszióban betöltött potenciális szerepére. Az AQP1 génnel transzfektált B16F10 egér melanomasejtek migrációs képessége háromszor gyorsabbnak bizonyult in vitro körülmények között (Hu and Verkman 2006), míg ha az AQP1-deficiens egerekbe B16F10 AQP1sejteket szubkután injektáltak, a tumornövekedés és az angiogenesis jelentős mértékben lelassult (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005). Az AQP1-expresszióval kapcsolatos human klinikai vizsgálatok eredményei kután melanómában ugyanakkor korábban nem álltak rendelkezésre.

Vizsgálataink során elsőként 78, primer kután melanómában szenvedő beteg esetében értékeltük az AQP1 fehérje expresszióját, majd második lépésben 67 metasztatikus melanomás páciensben vizsgáltuk a fehérje kifejeződését a betegség központi

idegrendszeri progressziója során. Míg az AQP1 protein mennyisége a standard szövettani paraméterekkel nem mutatott direkt korrelációt, a nagyobb tumorvastagsággal és a fokozott metasztatikus potenciállal rendelkező, magas rizikójú betegcsoportban szignifikánsan magasabb AQP1- expressziót dokumentáltunk az intracranialis progressziót nem mutató melanomákkal összehasonlítva. A fehérje megjelenése a betegek túlélésével is egyértelmű összefüggést mutatott, mind a progressziómentes, mind a teljes túlélés jelentős csökkenését figyeltük meg az AQP1-et kifejező humán melanomák esetében.

Az agyi áttétek megjelenése kedvezőtlen prognózissal társul, szoros összefüggést mutat a mortalitással, az esetek jelentős részében felelős a halálozásért (Fidler, Schackert et al. 1999). Annak demonstrálására, hogy az AQP1 expresszió miként függ össze a melanoma intracranialis progressziójával, metasztatikus kután melanómában szenvedő konszekutív betegek két csoportját vizsgáltuk. A csoportokba sorolt primer tumorok standard hisztológiai tulajdonságai szignifikánsan nem különböztek, mindegyik esetet hasonlóan magas Breslow-érték jellemezte. A központi idegrendszerbe metasztázist adó primer melanomák AQP1 fehérje expressziója ugyanakkor szignifikánsan magasabb értékeket mutatott az extracranialis metasztázist képző primer tumorokkal összevetve. Bár ez a megállapítás nem bizonyítja, hogy az AQP1 az agyi metasztázisképzés prediktora lenne, mégis támogatja azt az elméletet, hogy az AQP1- expresszió közreműködhet a tumorsejtek vér-agy gáton át történő migrációjának elősegítésében. Az agyi metasztázisok jelentős prognosztikai hatással bírnak, így vizsgálataink alapján nagy valószínűséggel az agyi progresszió is felelős lehet az AQP1- pozitív melanomás betegek csökkent túléléséért.

5.2 Az AQP1 fehérje expressziójának összefüggése a BRAF V600 mutációval

A melanoma prognózisát potenciálisan befolyásoló molekuláris markerek közül a BRAF V600 esetében tudták multivariáns analízissel igazolni, hogy független prediktív értékkel rendelkezik, és a mutáció jelenléte negatívan befolyásolta a III. stádiumú melanomás betegek teljes túlélését (Moreau, Saiag et al. 2012). Az AQP1 fehérjét expresszáló melanomák esetében dokumentált csökkent teljes túlélésben szerepet játszhat a BRAF jelátviteli út aktivációja, ugyanis az AQP1 fehérje és a BRAF V600 mutáció megjelenése között egyértelmű korrelációt találtunk. Az összefüggés molekuláris hátterét az jelentheti, hogy a BRAF V600 mutáns melanoma sejtekben az ERK útvonal konstitutív aktivációját írták le, ennek a jelátviteli mechanizmusnak a fokozott működése pedig fokozza az AQP1- expressziót (Umenishi and Schrier 2003).

5.3 Az AQP1 hatása a sejtmigrációra

Az aquaporinok áttétképzésre gyakorolt hatásának pontos mechanizmusa részleteiben teljesen még nem ismert, azonban a fokozott sejtmigrációnak kiemelt jelentőséget tulajdonítanak a folyamatban (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005, Hu and Verkman 2006). Szerkezetileg eltérő aquaporinok fokozott expressziója esetén (AQP1, AQP3, AQP4, AQP9) a migráció nagymértékű fokozódását figyelték meg, amely arra utalhat, hogy az AQP1 facilitálta transzmembrán víztranszport kulcsfontosságú eleme lehet a migrációs folyamatnak. Ezt az elméletet az is alátámasztja, hogy in vitro körülmények között a tumorsejtek migrációja befolyásolható, azaz gátolható vagy serkenthető az extracelluláris medium ozmolalitásának változtatásával (Hara-Chikuma and Verkman 2006).

Részecske-képalkotó módszerrel bebizonyították, hogy az AQP1 rendkívül gyors mozgásra képes a sejt plazmamembránján keresztül, mely a polarizáció megváltoztatásával elősegíti a sejtmigrációt. A szabálytalan alakú extracelluláris téren keresztüli helyváltoztatás során a sejt alakjában létrejövő átalakulásokat az AQP molekulák teszik lehetővé (Crane and Verkman 2008). Az AQP1 fehérje fokozott expresszióját bizonyították primer humán gliomákban és glioma-eredetű sejtvonalakban, az AQP1 gén csendesítésével pedig csökkent a gliomasejtek migrációja és inváziós képessége in vitro, valamint a tumor növekedésének lassulását írták le in vivo körülmények között (Yang, Tan et al. 2018).

A sejtmigrációhoz megfelelően szabályozott ionszintekre, intra-és extracelluláris pH-ra, sejtmembrán-potenciálra és volumenre van szükség, amelyhez az ioncsatornák és transzporterek nélkülözhetlen komponensek. Az aquaporinok, a K^+ , Na^+/H^+ kicserélő- és a Na^+ /glükóz ko-transzporterek kulcsszerepet játszanak a metasztázisképzésben, így a sejt-sejt kontaktus elvesztésében, a környező stróma inváziójában és a tumoros érhálózat létrehozásában (Stock and Schwab 2015).

Az aquaporin vízcsatornák fokozzák a tumorsejtek extravazációs képességét, a tumorsejtek membránjában bekövetkező dinamikus változások teszik ugyanis lehetővé a vaszkuláris barriereken való transzportot (Hu and Verkman 2006). Az agyi metasztázisképzés során különös jelentőségű lehet ez a folyamat, hiszen a vér-agy gát rendkívül összetett szerkezete folytán számos molekula számára átjárhatatlan. Az AQP1 jelenléte segítheti a melanoma sejtek vér-agy gáton keresztüli átjutását, ezáltal megteremtve a daganatsejtek számára a cerebrális invázió lehetőségét.

5.4 A szöveti hypoxia hatása az AQP1 expresszióra

A krónikus hypoxia számos gén expresszióját segíti elő a hypoxia által indukált transzkripciós faktorok, a HIF-1 α és a HIF-2 α aktivációja révén (Lopez-Barneo, Pardal et al. 2001). Hypoxiát előidézve fokozódott a HIF-1 α , a vaszkuláris endothel növekedési faktor (VEGF) és az AQP4 mRNS-és fehérjeszintű expressziója patkány cerebellum kísérletes vizsgálata során. Az AQP4 elősegítette az erek vízpermeabilitásának fokozódását, így szerepet játszhat az ödémaképződésben (Kaur, Sivakumar et al. 2006). Traumás agyi sérülés következtében a HIF-1 α fokozta az AQP4 és a VEGF kifejeződését a gliomasejtekben és a peritumoralis ödémával érintett területeken (Mou, Chen et al. 2010). A hypoxia számos malignus daganat progressziójában és a terápiára létrejövő rezisztencia kialakulásában is szerepet játszhat. Patkány glioblastomasejtekben igazolták, hogy a hypoxia eredményeként létrejövő fokozott AQP1 expresszió kapcsolatban áll a glikolízis mértékével (Hayashi, Edwards et al. 2007). A hypoxia hatására a sejten belül végbemenő tejsavas acidózis melléktermékeként keletkező H⁺ ionokat a tumorsejteknek neutralizálniuk kell, melyet a szénsavanhidráz enzim segítségével hajtanak végre. Az enzim működése során keletkező H₂O-molekulákat szintén az AQP1 szállítja az extracelluláris térbe, csökkentve ezzel a sejten belüli citotoxikus ödémaképződést (Potter and Harris 2003).

A hypoxia AQP1 expresszióra gyakorolt hatásának molekuláris hátterét 9L gliomasejtvonalon végzett vizsgálatok során tárták fel, a hypoxia hatására fokozódott az AQP1 transzkripciója, az AQP1 gén promoter régiójának szekvenálása során pedig sikerrel azonosították a HIF-1 α -kötő szekvenciát (Abreu-Rodriguez, Sanchez Silva et al. 2011). Humán prosztata daganat-sejtvonalban (PC-3M) kimutatták, hogy amennyiben a hypoxia válaszelem (HRE) mutációja bekövetkezik, a HIF-1-alfa nem képes kötődni ehhez a régióhoz, így a hypoxia AQP1-expresszióra gyakorolt stimulációja megszűnik. A hypoxia indukálta AQP1- expresszió dóziszfüggő módon gátolható p38 MAPK-inhibitorral (Tie, Lu et al. 2012).

Saját kutatásunk során a szövettani mintázat karakterizálásakor azt figyeltük meg, hogy az AQP1 fehérje fokozott kifejeződést mutatott az agyi metasztatikus kevésbé vaszkularizált területein. Az összetartozó primer és metasztatikus tumorminták összehasonlító immunhisztokémiai analízisét elvégezve azt találtuk, hogy a teljes AQP1-kifejeződés szignifikánsan lecsökken a betegség intracranialis progressziója során. A magas Breslow-vastagsággal rendelkező primer melanomákban megfigyelt felülszabályozott AQP1-

expresszió valószínűleg a gyorsan növekvő tumor csökkent oxigénellátottságának következménye. Az azonos betegekből származó metasztatikus léziókban ugyanakkor a kezdeti vaszkuláris ellátottság jóval kedvezőbb, mint a primer tumorban. A metasztázis növekedésével a daganat bizonyos részei távolabb esnek a tápláló érhálózattól, és megfigyeléseink alapján ezek a melanomasejtek nagyobb valószínűséggel fogják expresszálni az AQP1-fehérjét. Ennek a jelenségnek a magyarázata az lehet, hogy az erektől távolabb elhelyezkedő sejtekben az AQP1 jelenléte megkönnyíti a hypoxiához való adaptációt a fentebb részletezett módon, a sejten belüli citotoxikus ödéma mérséklésével (Potter and Harris 2003). Következésképpen a vízcsatornák nem csupán a metasztatikus sejtek intracerebrális extravazációját facilitálják, hanem a tumorexpanszió során a hypoxiára is rezisztensekké teszik őket.

5.5 Az AQP1 expresszió befolyásolja az angiogenezist

A tumorangiogenesis a daganatok fundamentális tulajdonsága, melynek során érújdonképződés jön létre a daganaton belül. Az angiogenesis esszenciális tápanyagokkal látja el tumort, és lehetőséget teremt a daganatsejteknek a primer tumort elhagyva a szisztémás keringésbe jutni, mely az áttétképződéshez elengedhetetlen tényező. Számos tumor esetében a vaszkuláris denzitás a metasztatikus potenciál prognosztikus indikátora lehet. A gazdagon erezett primer tumorok nagyobb valószínűséggel metasztatizálnak, mint az alacsonyabb erezettségel bíró primer daganatok (Zetter 1998). AQP1- hiányos egerekbe melanoma sejteket szubkután injektálva megfigyelték, hogy a tumor mikroereinek denzitása lecsökkent, a tumor növekedése lelassult, az egerek túlélése pedig meghosszabbodott (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005). AQP1-hiányos egerekből izolált endothelsejteket vizsgálva megállapították, hogy az AQP1-deficiens endothelsejtek csökkent migrációja az abnormális érújdonképződéssel mutat összefüggést (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005). Az AQP1-géncsendesített WM115 AQP1sejtekben az F-aktin-polarizáció lecsökkent a migráló sejtek plazmamembránjának migráció irányába eső részén, ezáltal ezek a sejtek nem képesek hálózatképzésre (Monzani, Bazzotti et al. 2009).

A melanoma sejtek a neurogén mimikri jelenségét alkalmazzák a cerebrális mikrokörnyezethez való adaptáció során (Nygaard, Prasmickaite et al. 2014), s rendkívül hatékonyan jutnak át a vér-agy gáton, bár a folyamat molekuláris háttere egyelőre részleteiben nem tisztázott (Wilhelm, Molnar et al. 2013). A vér-agy gát összetett szerkezetének köszönhetően az agyi metasztázis képzés rendkívül komplex folyamat, mely

a daganatsejtek számára lényegesen hosszabb időt vesz igénybe más szervekbe történő extravazációhoz képest (Paku, Dome et al. 2000). A melanómasejtek vér-agy gáton való keresztüljutásához szükséges a PLEKHA5 és heparanáz gének expressziója (Jilaveanu, Parisi et al. 2015). Az extravazációban fontos szerep jut a konnexin 26 gap junction fehérjének (Cx26), és a CCR4 kemokin receptor expressziójának (Gaziel-Sovran, Osman et al. 2013).

Egy experimentalis kutatásban a kután melanoma intra-és extracranialis áttétképzését hasonlították össze molekuláris profilanalízissel, melynek során az agyi metasztázisképzésben a PI3K/AKT jelátviteli út, míg az extracranialis metasztázisokban a SGK3, SGSM2 and ELOVL2 gének felülszabályozódását írták le (Chen, Chakravarti et al. 2014).

Az aquaporin vízcsatornák bizonyítottan elősegítik a tumorsejtek extravazációs képességét, a sejt volumenben létrejövő gyors változásokkal, melyet az ereken keresztül préselődő tumorsejtek alakváltozása kísér (Hu and Verkman 2006). Kutatócsoportunk elsőként demonstrálta, hogy az intracranialis metasztázist adó primer melanómák AQP1 expressziója szignifikánsan magasabb az extracranialis metasztázisokhoz képest. Az AQP1 felülszabályozódása a 7p14.3 kromoszóma régióban lokalizálódó ezen gén kópiaszám emelkedésének tulajdonítható. Korábbi vizsgálatok alapján a 7-es kromoszóma poliszomiája viszonylag gyakori jelenség melanómában, mely számos gén, így többek között – az AQP1 és az EGFR - kópiaszám emelkedését eredményezheti (Rakosy, Vízkeleti et al. 2007). A metasztázis-gének két csoportba sorolhatók, a ún. metasztázis-iniciáló illetve metasztázis-fenntartó génekre. Az AQP1 nagy valószínűséggel a human melanoma metasztázis iniciáló génjei közé tartozik, mely szükséges az intra-és az extravazáció folyamatához.

Az AQP1 tumorprogresszióban betöltött szerepével kapcsolatos irodalmi adatokat és saját megfigyeléseink azt sugallják, hogy az AQP1 fehérje expresszió a melanoma malignum agyi metasztázisképzésének lehetséges prognosztikus markere, mely a közeljövőben lehetséges terápiás célpontként szolgálhat. A pontos mechanizmus felderítése céljából ugyanakkor további experimentális és klinikai vizsgálatok elvégzésére van szükség.

6 Következtetések

1. Kimutattuk az AQP1 immunhisztokémiai kifejeződését primer kután melanomában szenvedő betegek két különböző becsült prognózissal rendelkező csoportjában. Szignifikánsan magasabb AQP1 H-score értékeket detektáltunk a magas rizikójú melanomás betegek csoportjában az alacsony rizikójú betegekkel összehasonlítva.
2. A BRAF V600 mutáció jelenléte szignifikánsan alacsonyabb volt az alacsony rizikójú kohorszban, mint a magas rizikójú betegek esetében. Szignifikáns összefüggést detektáltunk az AQP1 kifejeződés és a BRAF V600 mutáció megjelenése között.
3. Az AQP1-pozitív kután melanomás eseteknél mind a progressziómentes túlélés, mind a teljes túlélés szignifikánsan csökkent az AQP1-negatív kután melanomás esetekkel összehasonlítva.
4. Az intracranialis áttétet hordozó betegek (M1d) teljes túlélése vizsgálatunkban is szignifikánsan alacsonyabb volt a többi áttétes melanomában szenvedő beteggel összehasonlítva, mely megfelel az irodalomban ismert adatoknak.
5. A primer tumor intratumoralis kapillárisai AQP1 fehérje tekintetében prominens pozitív reakciót mutattak, míg az AQP1-pozitív melanoma sejteket különböző citoplazmatikus és membránasszociált reakció jellemezte egyenletes eloszlásban. Az AQP1-pozitív melanoma sejtek egyenlőtlen eloszlást mutattak az intracerebrális metasztázismintákban, az AQP1-pozitív tumorsejtek a mikroerektől távolabbi területeket foglalták el, míg a vaszkuláris struktúrákkal szomszédos melanoma sejtek kevésbé fejezték ki az AQP1 fehérjét.
6. Az intracranialis áttétet adó primer tumorok AQP1-kifejeződése szignifikánsan magasabb az extracranialis áttétet adó primer melanomákénál.
7. Az összetartozó primer és metasztatikus melanómák összehasonlító elemzése során az AQP1-fehérje expresszió szignifikáns csökkenését dokumentáltuk az intracranialis progresszió során.

7 Összefoglalás

A melanoma malignum (MM) biológiailag a legagresszívebb rosszindulatú bőrtumor, melynek incidenciája világszerte drámai növekedést mutat. A melanoma progresszióját befolyásoló molekuláris mechanizmusok megismerése alapvető fontosságú a hatékonyabb terápiák kidolgozása céljából. Az elmúlt évtizedekben számos tumortípusban dokumentálták az AQP1-expresszió prognosztikai jelentőségét, kután melanomában ugyanakkor a közelmúltig csak experimentális vizsgálatokból származó adatok utaltak a fehérje potenciális tumorbiológiai jelentőségére.

Vizsgálataink során sikeresen igazoltuk az AQP1 fehérje kifejeződését humán melanomában szenvedő betegek daganatsejtjeiben. A fehérje expresszió kvantifikációja során igazoltuk, hogy a rosszabb várható prognózissal rendelkező primer kután melanomák nagyobb mennyiségben fejezik ki az AQP1 fehérjét. Ez a különbség az alacsony rizikójú (I-II stádium) és magas rizikójú (III-IV stádium) áttétes daganatok, valamint az extra- és intracranialis progressziót mutató áttétes daganatok összehasonlítása során is kimutatható volt. Az AQP1 fehérje megjelenése szignifikáns összefüggést mutatott a daganatos betegek progressziómentes és teljes túlélésével egyaránt, a teljes túlélés önálló prediktoraként ismert BRAF V600 mutáció jelenlétével pedig direkt korrelációt mutatott az AQP1 fehérje expressziója.

Az összetartozó primer és metasztatikus melanomák összehasonlító elemzése során az AQP1 fehérje expressziójának szignifikáns csökkenését dokumentáltuk az intracranialis progresszió során. Az AQP1 fehérje tumoron belüli eloszlása tekintetében pedig azt találtuk, hogy az intracranialis metasztatikus mintákban az AQP1-pozitív tumorsejtek a mikroerektől távolabbi területeket foglalták el, míg a vaszkuláris struktúrákkal szomszédos melanoma sejtek kevésbé fejezték ki az AQP1 fehérjét. Ez a két megfigyelés egyaránt a hypoxia AQP1 indukáló hatására enged következtetni. Eredményeink jól illeszkednek a korábbi in vitro kísérletekhez és más tumorokhoz kapcsolódó klinikai megfigyelésekhez, reményeink szerint elősegítik a melanoma áttétképzésének jobb megértését. A jövőben további in vitro és klinikai vizsgálatok végzésére van szükség az AQP1 molekula tumorprogresszióban betöltött szerepének tisztázása céljából.

8 Summary

Malignant melanoma (MM) is the most aggressive cutaneous malignancy with dramatically growing incidence world-wide. The exploration of molecular mechanisms responsible for the progression of melanoma is essential for the development of effective new therapies. The prognostic role of AQP1 expression has been demonstrated in several tumor types in the last few decades, however in cutaneous melanoma only experimental findings supposed the potential role of the protein in the disease progression.

We have successfully demonstrated the expression of the AQP1 protein in the tumor samples of patients suffering from malignant melanoma. Using the quantitative analysis we have confirmed that the primary tumors with worse prognosis were characterized by a higher level of AQP1 expression. This difference could be documented comparing the low-risk (Stage I-II) and high risk (Stage III-IV) tumors, as well as between the metastatic melanomas with extra-cranial and intra-cranial progression. The expression of the AQP1 protein was significantly associated with the decreased progression free survival and decreased overall survival, while it showed direct correlation with the presence of the BRAF V600 mutation, a previously identified predictive molecular marker of the overall survival. We have documented the decreased expression of AQP1 during the intra-cranial progression of the disease by comparative immunohistochemical analysis of coherent primary and metastatic tumor samples. The intra-tumoral distribution of AQP1 showed a specific pattern in the intra-cranial metastases, with higher abundance of the protein in the tumoral regions more distant from the vascular structures. These two observations suggest the role of hypoxia in the induction of AQP1 expression.

Our findings fit into the picture drawn by previous *in vitro* experiments and clinical observations on other tumors, and hopefully they enhance the understanding of melanoma progression. Our results certainly call for further experimental and clinical investigations of AQP1 expression, in order to determine the eventual value of this interesting molecule as a potential prognostic marker, or therapeutic target in cutaneous melanoma.

9 Irodalomjegyzék

- Abreu-Rodriguez, I., R. Sanchez Silva, A. P. Martins, G. Soveral, J. J. Toledo-Aral, J. Lopez-Barneo and M. Echevarria. (2011) Functional and transcriptional induction of aquaporin-1 gene by hypoxia; analysis of promoter and role of Hif-1alpha. *PLoS One*, 6: 7.
- Agre, P., L. S. King, M. Yasui, W. B. Guggino, O. P. Ottersen, Y. Fujiyoshi, A. Engel and S. Nielsen. (2002) Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 542: 3-16.
- Akhtar, S., W. Bhat, A. Magdum and P. R. Stanley. (2014) Surgical excision margins for melanoma in situ. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 67: 320-323.
- Allen, A. C. and S. Spitz. (1953) Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer*, 6: 1-45.
- Anthony, T. L., H. L. Brooks, D. Boassa, S. Leonov, G. M. Yanochko, J. W. Regan and A. J. Yool. (2000) Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. *Mol Pharmacol*, 57: 576-588.
- Ascierto, P. A., G. A. McArthur, B. Dreno, V. Atkinson, G. Liskay, A. M. Di Giacomo, M. Mandalà, L. Demidov, D. Stroyakovskiy, L. Thomas, L. de la Cruz-Merino, C. Dutriaux, C. Garbe, Y. Yan, M. Wongchenko, I. Chang, J. J. Hsu, D. O. Koralek, I. Rooney, A. Ribas and J. Larkin. (2016) Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 17: 1248-1260.
- Atkins, M. B. and J. Larkin. (2016) Immunotherapy Combined or Sequenced With Targeted Therapy in the Treatment of Solid Tumors: Current Perspectives. *J Natl Cancer Inst*, 108.
- Azimi, F., R. A. Scolyer, P. Rumcheva, M. Moncrieff, R. Murali, S. W. McCarthy, R. P. Saw and J. F. Thompson. (2012) Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 30: 2678-2683.
- Balatoni, T., G. Liskay, Z. Miklos and M. Kasler. (2011) [Epidemiology of malignant melanoma (Clinical experience at the National Institute of Oncology in Hungary)]. *Orv Hetil*, 152: 1000-1006.

- Balazs, M., L. Vizkeleti, S. Ecsedi, R. Adany, E. Raso, B. Hegedus, A. Ladanyi, J. Tovari and J. Timar. (2015) [Melanoma research in Hungary: promising results in a previously orphan tumor]. *Magy Onkol*, 59: 275-281.
- Balch, C. M., J. E. Gershenwald, S. J. Soong, J. F. Thompson, M. B. Atkins, D. R. Byrd, A. C. Buzaid, A. J. Cochran, D. G. Coit, S. Ding, A. M. Eggermont, K. T. Flaherty, P. A. Gimotty, J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. C. Mihm, Jr., D. L. Morton, M. I. Ross, A. J. Sober and V. K. Sondak. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27: 6199-6206.
- Balch, C. M., D. L. Morton, J. E. Gershenwald, K. M. McMasters, O. E. Nieweg, B. Powell, M. I. Ross, V. K. Sondak and J. F. Thompson. (2009) Sentinel node biopsy and standard of care for melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 60: 872-875.
- Barnhill, R. L., J. A. Fine, G. C. Roush and M. Berwick. (1996) Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer*, 78: 427-432.
- Bibault, J. E., S. Dewas, X. Mirabel, L. Mortier, N. Penel, L. Vanseymortier and E. Lartigau. (2011) Adjuvant radiation therapy in metastatic lymph nodes from melanoma. *Radiat Oncol*, 6: 6-12.
- Breslow, A. (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172: 902-908.
- Brochez, L., I. Chevolet and V. Kruse. (2017) The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur J Cancer*, 76: 167-182.
- Broekaert, S. M., R. Roy, I. Okamoto, J. van den Oord, J. Bauer, C. Garbe, R. L. Barnhill, K. J. Busam, A. J. Cochran, M. G. Cook, D. E. Elder, S. W. McCarthy, M. C. Mihm, D. Schadendorf, R. A. Scolyer, A. Spatz and B. C. Bastian. (2010) Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23: 763-770.
- Chen, G., N. Chakravarti, K. Aardalen, A. J. Lazar, M. T. Tetzlaff, B. Wubbenhorst, S. B. Kim, S. Kopetz, A. A. Ledoux, Y. N. Gopal, C. G. Pereira, W. Deng, J. S. Lee, K. L. Nathanson, K. D. Aldape, V. G. Prieto, D. Stuart and M. A. Davies. (2014) Molecular profiling of patient-matched brain and extracranial melanoma metastases implicates the PI3K pathway as a therapeutic target. *Clin Cancer Res*, 20: 5537-5546.
- Chen, S. T., A. C. Geller and H. Tsao. (2013) Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr Dermatol Rep*, 2: 24-34.

- Clark, W. H., Jr., L. From, E. A. Bernardino and M. C. Mihm. (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29: 705-727.
- Cohen, M. H., J. R. Johnson and M. R. Middleton Temozolomide for advanced, metastatic melanoma, *J Clin Oncol*. 2000 May;18(10):2185.
- Compton, C. C., R. Barnhill, M. R. Wick and C. Balch. (2003) Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. *Arch Pathol Lab Med*, 127: 1253-1262.
- Cook, M. G., M. A. Green, B. Anderson, A. M. Eggermont, D. J. Ruiter, A. Spatz, M. W. Kissin and B. W. Powell. (2003) The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Pathol*, 200: 314-319.
- Costanza, M. E., L. Nathanson, D. Schoenfeld, J. Wolter, J. Colsky, W. Regelson, T. Cunningham and N. Sedransk. (1977) Results with methyl-CCNU and DTIC in metastatic melanoma. *Cancer*, 40: 1010-1015.
- Crane, J. M. and A. S. Verkman. (2008) Long-range nonanomalous diffusion of quantum dot-labeled aquaporin-1 water channels in the cell plasma membrane. *Biophys J*, 94: 702-713.
- Curtin, J. A., K. Busam, D. Pinkel and B. C. Bastian. (2006) Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 24: 4340-4346.
- Davies, M. A., P. Liu, S. McIntyre, K. B. Kim, N. Papadopoulos, W. J. Hwu, P. Hwu and A. Bedikian. (2011) Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer*, 117: 1687-1696.
- Day, C. L., Jr., A. J. Sober, A. W. Kopf, R. A. Lew, M. C. Mihm, Jr., F. M. Golomb, A. Postel, P. Hennessey, M. N. Harris, S. L. Gumport, J. W. Raker, R. A. Malt, A. B. Cosimi, W. C. Wood, D. F. Roses, F. Gorstein and T. B. Fitzpatrick. (1981) A prognostic model for clinical stage I melanoma of the trunk. Location near the midline is not an independent risk factor for recurrent disease. *Am J Surg*, 142: 247-251.
- Denker, B. M., B. L. Smith, F. P. Kuhajda and P. Agre. (1988) Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem*, 263: 15634-15642.
- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127: 2893-2917.

- Fidler, I. J., G. Schackert, R. D. Zhang, R. Radinsky and T. Fujimaki. (1999) The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 18: 387-400.
- Flaherty, K. T., J. R. Infante, A. Daud, R. Gonzalez, R. F. Kefford, J. Sosman, O. Hamid, L. Schuchter, J. Cebon, N. Ibrahim, R. Kudchadkar, H. A. Burris, 3rd, G. Falchook, A. Algazi, K. Lewis, G. V. Long, I. Puzanov, P. Lebowitz, A. Singh, S. Little, P. Sun, A. Allred, D. Ouellet, K. B. Kim, K. Patel and J. Weber. (2012) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 367: 1694-1703.
- Foletto, M. C. and S. E. Haas. (2014) Cutaneous melanoma: new advances in treatment. *An Bras Dermatol*, 89: 301-310.
- Fontaine, D., W. Parkhill, W. Greer and N. Walsh. (2003) Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? *Am J Dermatopathol*, 25: 371-376.
- Forman, S. B., T. C. Ferringer, S. J. Peckham, S. R. Dalton, G. T. Sasaki, L. F. Libow and D. M. Elston. (2008) Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma? *J Am Acad Dermatol*, 58: 1013-1020.
- Franceschini, D., C. Franzese, P. Navarria, A. M. Ascolese, F. De Rose, M. Del Vecchio, A. Santoro and M. Scorsetti. (2016) Radiotherapy and immunotherapy: Can this combination change the prognosis of patients with melanoma brain metastases? *Cancer Treat Rev*, 50: 1-8.
- Garbe, C., T. K. Eigentler, U. Keilholz, A. Hauschild and J. M. Kirkwood. (2011) Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*, 16: 5-24.
- Garbe, C. and U. Leiter. (2009) Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*, 27: 3-9.
- Gaziel-Sovran, A., I. Osman and E. Hernando. (2013) In vivo Modeling and Molecular Characterization: A Path Toward Targeted Therapy of Melanoma Brain Metastasis. *Front Oncol*, 3.
- Gershenwald, J. E., R. A. Scolyer, K. R. Hess, V. K. Sondak, G. V. Long, M. I. Ross, A. J. Lazar, M. B. Faries, J. M. Kirkwood, G. A. McArthur, L. E. Haydu, A. M. M. Eggermont, K. T. Flaherty, C. M. Balch and J. F. Thompson. (2017) Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*, 67: 472-492.

- Gilchrest, B. A., M. S. Eller, A. C. Geller and M. Yaar. (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*, 340: 1341-1348.
- Girotti, M. R., M. Pedersen, B. Sanchez-Laorden, A. Viros, S. Turajlic, D. Niculescu-Duvaz, A. Zambon, J. Sinclair, A. Hayes, M. Gore, P. Lorigan, C. Springer, J. Larkin, C. Jorgensen and R. Marais. (2013) Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov*, 3: 158-167.
- Glover, D., J. Ibrahim, J. Kirkwood, J. Glick, D. Karp, J. Stewart, M. Ewell and E. Borden. (2003) Phase II randomized trial of cisplatin and WR-2721 versus cisplatin alone for metastatic melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1686). *Melanoma Res*, 13: 619-626.
- Guy, G. P., Jr., C. C. Thomas, T. Thompson, M. Watson, G. M. Massetti and L. C. Richardson. (2015) Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64: 591-596.
- Hara-Chikuma, M. and A. S. Verkman. (2006) Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*, 17: 39-45.
- Hayashi, Y., N. A. Edwards, M. A. Proescholdt, E. H. Oldfield and M. J. Merrill. (2007) Regulation and function of aquaporin-1 in glioma cells. *Neoplasia*, 9: 777-787.
- Horvath, A. [Stereotaxic brain radiosurgery in Hungary 1991-2009], *Magy Onkol*. 2010 Jun;54(2):93-8. doi: 10.1556/MOnkol.54.2010.2.1.
- Hu, J. and A. S. Verkman. (2006) Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J*, 20: 1892-1894.
- Imredi, E., G. Liskay, I. Kenessey, V. Plotar, M. Godeny, B. Toth, I. Fedorcsak and J. Timar. (2018) Aquaporin-1 Protein Expression of the Primary Tumor May Predict Cerebral Progression of Cutaneous Melanoma. *Pathol Oncol Res*.
- Imredi, E., B. Toth, V. Doma, T. Barbai, E. Raso, I. Kenessey and J. Timar. (2016) Aquaporin 1 protein expression is associated with BRAF V600 mutation and adverse prognosis in cutaneous melanoma. *Melanoma Res*, 26: 254-260.
- In 't Hout, F. E., L. E. Haydu, R. Murali, J. J. Bonenkamp, J. F. Thompson and R. A. Scolyer. (2012) Prognostic importance of the extent of ulceración in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 255: 1165-1170.
- Jemal, A., M. Saraiya, P. Patel, S. S. Cherala, J. Barnholtz-Sloan, J. Kim, C. L. Wiggins and P. A. Wingo. (2011) Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *J Am Acad Dermatol*, 65: 032.

- Jilaveanu, L. B., F. Parisi, M. L. Barr, C. R. Zito, W. Cruz-Munoz, R. S. Kerbel, D. L. Rimm, M. W. Bosenberg, R. Halaban, Y. Kluger and H. M. Kluger. (2015) PLEKHA5 as a Biomarker and Potential Mediator of Melanoma Brain Metastasis. *Clin Cancer Res*, 21: 2138-2147.
- Kalkhoran, S., O. Milne, I. Zalaudek, S. Puig, J. Malvehy, J. W. Kelly and A. A. Marghoob. (2010) Historical, clinical, and dermoscopic characteristics of thin nodular melanoma. *Arch Dermatol*, 146: 311-318.
- Kang, B. W., J. G. Kim, S. J. Lee, Y. S. Chae, J. Y. Jeong, G. S. Yoon, S. Y. Park, H. J. Kim, J. S. Park and G. S. Choi. (2015) Expression of aquaporin-1, aquaporin-3, and aquaporin-5 correlates with nodal metastasis in colon cancer. *Oncology*, 88: 369-376.
- Kaur, C., V. Sivakumar, Y. Zhang and E. A. Ling. (2006) Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia*, 54: 826-839.
- Khalil, D. N., E. L. Smith, R. J. Brentjens and J. D. Wolchok. (2016) The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 13: 273-290.
- Khoja, L., M. O. Butler, S. P. Kang, S. Ebbinghaus and A. M. Joshua. (2015) Pembrolizumab. *J Immunother Cancer*, 3: 015-0078.
- Kirkwood, J. M., J. G. Ibrahim, V. K. Sondak, J. Richards, L. E. Flaherty, M. S. Ernstoff, T. J. Smith, U. Rao, M. Steele and R. H. Blum. (2000) High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol*, 18: 2444-2458.
- Kirkwood, J. M., J. Manola, J. Ibrahim, V. Sondak, M. S. Ernstoff and U. Rao. (2004) A pooled analysis of eastern cooperative oncology group and intergroup trials of adjuvant high-dose interferon for melanoma. *Clin Cancer Res*, 10: 1670-1677.
- Klein, G. and E. Klein. (2005) Surveillance against tumors--is it mainly immunological? *Immunol Lett*, 100: 29-33.
- Kumasaka, M. Y., I. Yajima, K. Hossain, M. Iida, T. Tsuzuki, T. Ohno, M. Takahashi, M. Yanagisawa and M. Kato. (2010) A novel mouse model for de novo Melanoma. *Cancer Res*, 70: 24-29.
- Lange, J. R., B. E. Palis, D. C. Chang, S. J. Soong and C. M. Balch. (2007) Melanoma in children and teenagers: an analysis of patients from the National Cancer Data Base. *J Clin Oncol*, 25: 1363-1368.

- Lazar, V., S. Ecsedi, L. Vizkeleti, Z. Rakosy, G. Boross, B. Szappanos, A. Begany, G. Emri, R. Adany and M. Balazs. (2012) Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization. *Melanoma Res*, 22: 202-214.
- Lei, Y. Y., W. J. Wang, J. H. Mei and C. L. Wang. (2014) Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 8539-8548.
- Li, C., X. Li, L. Wu and Z. Jiang. (2017) Elevated AQP1 Expression Is Associated With Unfavorable Oncologic Outcome in Patients With Hilar Cholangiocarcinoma. *Technol Cancer Res Treat*, 16: 421-427.
- Li, R. H., X. Y. Hou, C. S. Yang, W. L. Liu, J. Q. Tang, Y. Q. Liu and G. Jiang. (2015) Temozolomide for Treating Malignant Melanoma. *J Coll Physicians Surg Pak*, 25: 680-688.
- Linos, E., S. M. Swetter, M. G. Cockburn, G. A. Colditz and C. A. Clarke. (2009) Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol*, 129: 1666-1674.
- Liszky, G. (2016) [Clinical studies and accepted therapies of advanced melanoma]. *Magy Onkol*, 60: 11-15.
- Liszky, G., G. Peley, I. Sinkovics, I. Peter, Z. Fejos, B. Horvath, T. Banfalvi, K. Gilde and I. Koves. (2003) [Report on clinical observations obtained with sentinel lymph node surgery in malignant melanoma and during their follow-up at the Department of Dermatology, National Institute of Oncology, Budapest]. *Magy Onkol*, 47: 79-83.
- Lopez-Barneo, J., R. Pardal and P. Ortega-Saenz. (2001) Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol*, 63: 259-287.
- Lopez-Campos, J. L., R. Sanchez Silva, L. Gomez Izquierdo, E. Marquez, F. Ortega Ruiz, P. Cejudo, E. Barrot Cortes, J. J. Toledo Aral and M. Echevarria. (2011) Overexpression of Aquaporin-1 in lung adenocarcinomas and pleural mesotheliomas. *Histol Histopathol*, 26: 451-459.
- Mandala, M. and D. Massi. (2014) Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch*, 464: 265-281.
- Massi, D., S. Puig, A. Franchi, J. Malveyh, S. Vidal-Sicart, M. Gonzalez-Cao, G. Baroni, S. Ketabchi, J. Palou and M. Santucci. (2006) Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. *J Clin Pathol*, 59: 166-173.

- McArthur, G. A., P. B. Chapman, C. Robert, J. Larkin, J. B. Haanen, R. Dummer, A. Ribas, D. Hogg, O. Hamid, P. A. Ascierto, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, S. J. O'Day, J. M. Kirkwood, A. M. Eggermont, B. Dreno, J. A. Sosman, K. T. Flaherty, M. Yin, I. Caro, S. Cheng, K. Trunzer and A. Hauschild. (2014) Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*, 15: 323-332.
- Monzani, E., R. Bazzotti, C. Perego and C. A. La Porta. (2009) AQP1 is not only a water channel: it contributes to cell migration through Lin7/beta-catenin. *PLoS One*, 4: 0006167.
- Moreau, S., P. Saiag, P. Aegerter, D. Bosset, C. Longvert, Z. Helias-Rodzewicz, C. Marin, F. Peschard, S. Chagnon, U. Zimmermann, T. Clerici and J. F. Emile. (2012) Prognostic value of BRAF(V600E) mutations in melanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. *Ann Surg Oncol*, 19: 4314-4321.
- Morton, D. L., J. F. Thompson, A. J. Cochran, N. Mozzillo, O. E. Nieweg, D. F. Roses, H. J. Hoekstra, C. P. Karakousis, C. A. Puleo, B. J. Coventry, M. Kashani-Sabet, B. M. Smithers, E. Paul, W. G. Kraybill, J. G. McKinnon, H. J. Wang, R. Elashoff and M. B. Faries. (2014) Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*, 370: 599-609.
- Mou, K., M. Chen, Q. Mao, P. Wang, R. Ni, X. Xia and Y. Liu. (2010) AQP-4 in peritumoral edematous tissue is correlated with the degree of glioma and with expression of VEGF and HIF-alpha. *J Neurooncol*, 100: 375-383.
- Noonan, F. P., M. R. Zaidi, A. Wolnicka-Glubisz, M. R. Anver, J. Bahn, A. Wielgus, J. Cadet, T. Douki, S. Mouret, M. A. Tucker, A. Popratiloff, G. Merlino and E. C. De Fabo. (2012) Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nat Commun*, 3: 884.
- Nowak-Sadzikowska, J., T. Walasek, J. Jakubowicz, P. Blecharz and M. Reinfuss. (2016) Current treatment options of brain metastases and outcomes in patients with malignant melanoma. *Rep Pract Oncol Radiother*, 21: 271-277.
- Nygaard, V., L. Prasmickaite, K. Vasiliauskaite, T. Clancy and E. Hovig. (2014) Melanoma brain colonization involves the emergence of a brain-adaptive phenotype. *Oncoscience*, 1: 82-94.
- O'Sullivan, N. A. and C. P. Tait. (2014) Tanning bed and nail lamp use and the risk of cutaneous malignancy: a review of the literature. *Australas J Dermatol*, 55: 99-106.

- Paku, S., B. Dome, R. Toth and J. Timar. (2000) Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study. *Clin Exp Metastasis*, 18: 481-492.
- Parkin, D. M., P. Pisani and J. Ferlay. (1999) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*, 80: 827-841.
- Peggs, K. S., S. A. Quezada, C. A. Chambers, A. J. Korman and J. P. Allison. (2009) Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*, 206: 1717-1725.
- Pierceall, W. E., M. Wolfe, J. Suschak, H. Chang, Y. Chen, K. M. Spratt, J. L. Kutok, S. Quan, D. T. Weaver and B. E. Ward. (2011) Strategies for H-score normalization of preanalytical technical variables with potential utility to immunohistochemical-based biomarker quantitation in therapeutic response diagnostics. *Anal Cell Pathol*, 34: 159-168.
- Pinkham, M. B., M. C. Foote, E. Burmeister, J. Thomas, J. Meakin, B. M. Smithers and B. H. Burmeister. (2013) Stage III melanoma in the axilla: patterns of regional recurrence after surgery with and without adjuvant radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 86: 702-708.
- Plotar, V., G. Liskay, A. Ladanyi and E. Toth. (2013) [New TNM classification (AJCC 2009) and the pathological significance of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma]. *Magy Onkol*, 57: 68-72.
- Plotar, V., Z. Orosz, E. Toth and Z. Szentirmay. (2007) [Histopathological prognostic factors of malignant melanoma]. *Magy Onkol*, 51: 39-46.
- Potter, C. P. and A. L. Harris. (2003) Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer*, 89: 2-7.
- Qin, F., H. Zhang, Y. Shao, X. Liu, L. Yang, Y. Huang, L. Fu, F. Gu and Y. Ma. (2016) Expression of aquaporin1, a water channel protein, in cytoplasm is negatively correlated with prognosis of breast cancer patients. *Oncotarget*, 7: 8143-8154.
- Raina, S., G. M. Preston, W. B. Guggino and P. Agre. (1995) Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem*, 270: 1908-1912.
- Rakosy, Z., L. Vizkeleti, S. Ecsedi, Z. Voko, A. Begany, M. Barok, Z. Krekk, M. Gallai, Z. Szentirmay, R. Adany and M. Balazs. (2007) EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer*, 121: 1729-1737.

- Rao, R. D., S. G. Holtan, J. N. Ingle, G. A. Croghan, L. A. Kottschade, E. T. Creagan, J. S. Kaur, H. C. Pitot and S. N. Markovic. (2006) Combination of paclitaxel and carboplatin as second-line therapy for patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 106: 375-382.
- Read, R. L., L. Haydu, R. P. Saw, M. J. Quinn, K. Shannon, A. J. Spillane, J. R. Stretch, R. A. Scolyer and J. F. Thompson. (2015) In-transit melanoma metastases: incidence, prognosis, and the role of lymphadenectomy. *Ann Surg Oncol*, 22: 475-481.
- Rigel, D. S. (2010) Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg*, 29: 204-209.
- Robert, C., G. V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J. C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K. J. Savage, M. M. Hernberg, C. Lebbe, J. Charles, C. Mihalciou, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I. M. Waxman, V. Atkinson and P. A. Ascierto. (2015) Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*, 372: 320-330.
- Robert, C., L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe, C. Lebbe, J. F. Baurain, A. Testori, J. J. Grob, N. Davidson, J. Richards, M. Maio, A. Hauschild, W. H. Miller, Jr., P. Gascon, M. Lotem, K. Harmanakaya, R. Ibrahim, S. Francis, T. T. Chen, R. Humphrey, A. Hoos and J. D. Wolchok. (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364: 2517-2526.
- Romano, E., G. K. Schwartz, P. B. Chapman, J. D. Wolchock and R. D. Carvajal. (2011) Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol*, 12: 913-922.
- Saadoun, S., M. C. Papadopoulos, M. Hara-Chikuma and A. S. Verkman. (2005) Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*, 434: 786-792.
- Serrone, L., M. Zeuli, F. M. Sega and F. Cognetti. (2000) Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*, 19: 21-34.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal. (2018) Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 68: 7-30.
- Smalley, K. S. and M. Herlyn. (2005) Targeting intracellular signaling pathways as a novel strategy in melanoma therapeutics. *Ann N Y Acad Sci*: 16-25.
- Smoller, B. R. (2006) Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*, 19: S34-40.

- Soliman, H., M. Mediavilla-Varela and S. Antonia. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? *Cancer J*, 16: 354-359.
- Spagnolo, F., V. Picasso, M. Lambertini, V. Ottaviano, B. Dozin and P. Queirolo. (2016) Survival of patients with metastatic melanoma and brain metastases in the era of MAP-kinase inhibitors and immunologic checkpoint blockade antibodies: A systematic review. *Cancer Treat Rev*, 45: 38-45.
- Stahl, J. M., A. Sharma, M. Cheung, M. Zimmerman, J. Q. Cheng, M. W. Bosenberg, M. Kester, L. Sandirasegarane and G. P. Robertson. (2004) Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*, 64: 7002-7010.
- Staudt, M., K. Lasithiotakis, U. Leiter, F. Meier, T. Eigentler, M. Bamberg, M. Tatagiba, P. Brossart and C. Garbe. (2010) Determinants of survival in patients with brain metastases from cutaneous melanoma. *Br J Cancer*, 102: 1213-1218.
- Stern, R. S. (2001) The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol*, 44: 755-761.
- Stock, C. and A. Schwab. (2015) Ion channels and transporters in metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 10: 15.
- Storr, S. J., S. Safuan, A. Mitra, F. Elliott, C. Walker, M. J. Vasko, B. Ho, M. Cook, R. A. Mohammed, P. M. Patel, I. O. Ellis, J. A. Newton-Bishop and S. G. Martin. (2012) Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol*, 25: 493-504.
- Taylor, R. C., A. Patel, K. S. Panageas, K. J. Busam and M. S. Brady. (2007) Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 25: 869-875.
- Thompson, J. F., S. J. Soong, C. M. Balch, J. E. Gershenwald, S. Ding, D. G. Coit, K. T. Flaherty, P. A. Gimotty, T. Johnson, M. M. Johnson, S. P. Leong, M. I. Ross, D. R. Byrd, N. Cascinelli, A. J. Cochran, A. M. Eggermont, K. M. McMasters, M. C. Mihm, Jr., D. L. Morton and V. K. Sondak. (2011) Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol*, 29: 2199-2205.
- Tie, L., N. Lu, X. Y. Pan, Y. Pan, Y. An, J. W. Gao, Y. H. Lin, H. M. Yu and X. J. Li. (2012) Hypoxia-induced up-regulation of aquaporin-1 protein in prostate cancer cells in a p38-dependent manner. *Cell Physiol Biochem*, 29: 269-280.

- Timar, J., B. Gyorffy and E. Raso. (2010) Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little? *Clin Exp Metastasis*, 27: 371-387.
- Tomita, Y., H. Dorward, A. J. Yool, E. Smith, A. R. Townsend, T. J. Price and J. E. Hardingham. (2017) Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci*, 18.
- Tsang, R. W., F. F. Liu, W. Wells and D. G. Payne. (1994) Lentigo maligna of the head and neck. Results of treatment by radiotherapy. *Arch Dermatol*, 130: 1008-1012.
- Umenishi, F. and R. W. Schrier. (2003) Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-responsive element in the AQP1 gene. *J Biol Chem*, 278: 15765-15770.
- Verkman, A. S., M. O. Anderson and M. C. Papadopoulos. (2014) Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 13: 259-277.
- Verkman, A. S., M. Hara-Chikuma and M. C. Papadopoulos. (2008) Aquaporins--new players in cancer biology. *J Mol Med (Berl)*, 86: 523-529.
- Verkman, A. S., M. Hara-Chikuma and M. C. Papadopoulos. (2008) Aquaporins--new players in cancer biology. *J Mol Med*, 86: 523-529.
- Veronesi, U. and N. Cascinelli. (1991) Narrow excision (1-cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma. *Arch Surg*, 126: 438-441.
- Wang, Y., Y. Zhao and S. Ma. (2016) Racial differences in six major subtypes of melanoma: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*, 16: 016-2747.
- Ward, W. H., F. Lambreton, N. Goel, J. Q. Yu and J. M. Farma Clinical Presentation and Staging of Melanoma.
- Welsh, S. J. and P. G. Corrie. (2015) Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. *Ther Adv Med Oncol*, 7: 122-136.
- Wiernik, P. H. and A. I. Einzig. (1993) Taxol in malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 15: 185-187.
- Wilhelm, I., J. Molnar, C. Fazakas, J. Hasko and I. A. Krizbai. (2013) Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. *Int J Mol Sci*, 14: 1383-1411.
- Wu, S., J. Han, F. Laden and A. A. Qureshi. (2014) Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: a cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23: 1080-1089.
- Xu, X., L. Chen, D. Guerry, P. R. Dawson, W. T. Hwang, P. VanBelle, D. E. Elder, P. J. Zhang, M. E. Ming, L. Schuchter and P. A. Gimotty. (2012) Lymphatic invasion is

independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*, 18: 229-237.

Yajima, I., M. Y. Kumasaka, N. D. Thang, Y. Goto, K. Takeda, O. Yamanoshita, M. Iida, N. Ohgami, H. Tamura, Y. Kawamoto and M. Kato. (2012) RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol Res Pract*, 354191: 12.

Yang, W. Y., Z. F. Tan, D. W. Dong, Y. Ding, H. Meng, Y. Zhao, X. F. Xin and W. Bi. (2018) Association of aquaporin1 with tumor migration, invasion and vasculogenic mimicry in glioblastoma multiforme. *Mol Med Rep*, 17: 3206-3211.

Yue, E. W., R. Sparks, P. Polam, D. Modi, B. Douty, B. Wayland, B. Glass, A. Takvorian, J. Glenn, W. Zhu, M. Bower, X. Liu, L. Leffet, Q. Wang, K. J. Bowman, M. J. Hansbury, M. Wei, Y. Li, R. Wynn, T. C. Burn, H. K. Koblisch, J. S. Fridman, T. Emm, P. A. Scherle, B. Metcalf and A. P. Combs. (2017) INCB24360 (Epacadostat), a Highly Potent and Selective Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor for Immuno-oncology. *ACS Med Chem Lett*, 8: 486-491.

Yun, S., P. L. Sun, Y. Jin, H. Kim, E. Park, S. Y. Park, K. Lee and J. H. Chung. (2016) Aquaporin 1 Is an Independent Marker of Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med*, 50: 251-257.

Zetter, B. R. (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*, 49: 407-424.

Zugna, D., R. Senetta, S. Osella-Abate, M. T. Fierro, A. Pisacane, A. Zaccagna, A. Sapino, V. Bataille, A. Maurichi, F. Picciotto, P. Cassoni, P. Quaglino and S. Ribero. (2018) Favourable prognostic role of histological regression in stage III positive sentinel lymph node melanoma patients. *Br J Cancer*, 118: 398-404.

10 Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Imrédi E, Liskay G, Kenessey I, Plotár V, Gödény M ; Tóth B, Fedorcsák I, Tímár J.

Aquaporin-1 Protein Expression of the Primary Tumor May Predict Cerebral Progression of Cutaneous Melanoma.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH

DOI: 10.1007/s12253-018-0513-6 6p. (2018)

IF:1,935

Imrédi E, Toth B, Doma V, Barbai T, Raso E, Kenessey I, Timar, J

Aquaporin 1 protein expression is associated with BRAF V600 mutation and adverse prognosis in cutaneous melanoma.

MELANOMA RESEARCH 26:3pp. 254-260. (2016)

IF:2,615

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Imrédi E, Plotár V, Szavcsúr P, Pánczél G, Melegh K, Schlachter K, Liskay G.

Metasztatikus progresszió kezelése primer cutan és ocularis melanoma szinkrón előfordulását követően.

ORVOSI HETILAP 159: 16 pp. 642-647. 6 p. (2018)

IF:0,322

11 Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Tímár József Professzor Úrnak, aki támogatta felvételemet a Doktori Iskolába, szakmai tapasztalataival kezdetektől hozzájárult kutatási munkám sikeréhez, hasznos tanácsokkal és ötletekkel látott el.

Köszönettel tartozom Piurkó Violetta orvosdiagnosztikai laboranalitikusnak az immunhisztokémiai reakciók kivitelezésében nyújtott határtalan segítségéért, továbbá Dr. Kenessey István egyetemi tanársegédnek a szövettani és immunhisztokémiai kiértékelésben nyújtott segítségéért.

Szeretném kifejezni köszönetemet a Tumor Progressziós Osztály laborvezetőjének, Dr. Rásó Erzsébet Tanárnőnek és Dr. Barbai Tamás tudományos munkatársnak, akik a molekuláris patológiai módszerek kivitelezésében nyújtottak hatalmas segítséget.

Köszönöm a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika vezetőségének és munkatársainak a munkámhoz nyújtott támogatást.

Hálával tartozom, Dr. Liszkay Gabriella Professzor Asszonynak, jelenlegi munkahelyem, az Országos Onkológiai Intézet Bőrgyógyászati Osztályának osztályvezető főorvosának szakmai tanácsaiért és támogatásáért, amelyekkel nagyban hozzájárult kutatásom sikeres befejezéséhez.

Köszönöm korábbi és jelenlegi kollégáimnak, Dr. Kiss Orsolyának, Dr. Schlachter Krisztinának, Dr. Balatoni Tímea Főorvosnak, Dr. Pánczél Gittának, Dr. Czirbesz Katának, Dr. Geszti Franciskának, Dr. Melegh Krisztinának és Dr. Kovács Péternek támogatását a PhD munkám végzése során.

Köszönöm szüleimnek a támogatást, akik az orvosi pálya felé tereltek, lelkileg támogattak, rengeteg biztatást kaptam tőlük. Férjem, Dr. Nardai Sándor klinikusként és kutatóként nagyszerű tanácsokkal látott el a kutatás kezdeti fázisaitól a PhD munkám befejezéséig.