

ИСПОЉАВАЊЕ *Fas* И *Fas-L* У КАРЦИНОМУ ЋЕЛИЈА БУБРЕГА

Витомир ГОВЕДАРОВИЋ¹, Сања РАДОЈЕВИЋ-ШКОДРИЋ¹, Драган МИТРОВИЋ¹,
*Claudia A. MÜLLER*², *Gerhard A. MÜLLER*³, Јасмина МАРКОВИЋ-ЛИПКОВСКИ¹

¹Институт за патологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд;

²Центар за медицинска истраживања, Универзитет „Еберхард Карлс“, Тибинген, Немачка;

³Центар за интерну медицину, Универзитет „Георг Аугуст“, Гетинген, Немачка

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Резултати досадашњих испитивања показују да различито испољавање *Fas* и *Fas-L* молекула на ћелијама тумора може утицати на раст тумора уз учешће имунског система или без њега.

Циљ рада Циљ рада је био да се испита испољавање *Fas* и *Fas-L* у ткиву нормалних људских бубрега и код различитих типова карцинома ћелија бубрега (КЋБ), те да се упореди са градирањем тумора.

Метод рада Анализирано је 25 КЋБ градуса G1-G3 и следећих типова ћелија: 17 светлоћелијских, три хромофилна (два еозинофилна и један базофилни), два хромофобна и три саркоматоидна, као и осам узорака нормалног ткива бубрега. Бојене пресека ткива је вршено методом индиректне имунопероксидазе, а дистрибуција и интензитет експресије протеина одређивани су семиквантитативно.

Резултати Дистрибуција испољавања *Fas* код светлоћелијских КЋБ ниског градуса је најчешће дифузна. Супротно испољавању *Fas*, у светлоћелијском типу КЋБ испољавање *Fas-L* скоро потпуно изостаје. Занимљив је налаз у три светлоћелијска случаја КЋБ у којима су стромалне ћелије тумора показивале јако испољавање *Fas-L*. Супротно светлоћелијском типу, остали анализирани хистолошки типови КЋБ (хромофилни, хромофобни и вретенасти) градуса G2-G3 имали су различите комбинације испољавања *Fas-L* и *Fas*.

Закључак Већина КЋБ светлоћелијског типа ниског градуса показало је јако и распрострањено испољавање *Fas*, а изостанак *Fas-L*. Међутим, КЋБ високог степена малигнитета, било да је реч о светлоћелијском, еозинофилном, хромофобном или саркоматоидном типу, могу имати различите комбинације испољавања *Fas* и *Fas-L*. То највероватније доводи до различитих механизма избегавања имунолошког одговора на КЋБ.

Кључне речи: карцином ћелија бубрега; апоптоза; *Fas*; *Fas-L*

УВОД

Апоптоза је програмирана (физиолошка) смрт ћелија која може бити покренута најразличитијим сигнаlima, од недостатка фактора раста или хормона, преко активације рецептора одговарајућим молекулом (лигандом), до специфичних оштеђујућих агенаса у патолошким условима. Губитак ћелијског одговора на индуковану апоптозу могао би да буде један од механизма који су укључени у прогресију малигног тумора и настанак резистенције на хемиотерапију [1]. *Fas* (*APO-1* антиген) је прва врста трансмембранског протеина који припада суперфамилији рецептора фактора раста нерава (фактора некрозе тумора алфа), а одговоран је за почетак процеса апоптозе [2]. *Fas* лиганд (*Fas-L*, *CD95L*) је друга врста трансмембранског протеина породице фактора некрозе тумора који стимулише ћелије да шаљу апоптозне сигнале у ћелије које испољавају *Fas* [3, 4]. Апоптоза која је посредована *Fas* је важна за процесе ембриогенезе, атрофије ткива, селекцију *T* ћелија у тимусу и различите имунске функције, као што су цитотоксичност, имунска хомеостаза и аутоотолеранција [5]. Унакрсним повезивањем са његовим природним мембранским рецептором (*Fas*, *APO-1*) *Fas-L* индукује секвентну активацију каспаза, што доводи до смрти *Fas*-позитивних ћелија [6].

Испољавање *Fas* молекула је запажено код разних врста ћелија, укључујући хепатоците, активирани *T* и *B* лимфоците, као и неутрофилне гранулоците. Такође, значајно је изражен у разним епителним ћелијама,

укључујући прелазни епител и тубуларне епителне ћелије [7-9]. *Fas-L* се испољава само у одређеним ћелијама, укључујући активирани *T* лимфоцити, Сертолијеве ћелије у тестису и епителне ћелије предње коморе ока, обезбеђујући тако специфичност ткива [10, 11].

Развој малигног тумора може бити контролисан путем апоптозе посредоване *Fas* молекулом [12]. Подаци из литературе указују на то да је *Fas-Fas-L* систем укључен у имунолошку инхибицију раста тумора, што је уочено код неких хематолошких малигнитета, карцинома плућа, тумора мозга, карцинома јажника, меланома и карцинома ћелија бубрега (КЋБ) [13]. Познато је да малигни тумори не расту само због повећане пролиферације ћелија, већ и због инхибиције програмиране смрти ћелија. Резултати досадашњих испитивања су показали да *Fas-L* на ћелијама тумора може бити укључен у раст тумора или, супротно, довести до његове регресије уз активацију имунског система или без ње. У случају смањења тумора, интеракција *Fas-L* испољеног на мембрани цитотоксичних лимфоцита који инфилтришу тумор и *Fas* на ћелијама тумора индукује сигнал у туморској ћелији који доводи до апоптозе. Цитотоксична функција је посредована мембранским *Fas-L*, док растворљиви *Fas-L* може инхибирати цитотоксичност или се везује за *Fas* и испољава неке друге функције. Међутим, тумори могу избећи имунолошко одбацивање. Интеракција *Fas* и *Fas-L* који су испољени на површини ћелија тумора условљава непрекидно слање и примање сигнала смрти између ћелија тумора, а са-

мим тим и смањење тумора (тзв. братоубилачка деструкција ћелија тумора). Додатна улога *Fas-L* у реверзној сигнализацији испољава се тако што *Fas-L* може сам изазвати повећану пролиферацију после везивања [13]. Овако може изгледати објашњење за повећање тумора без активације имунског система. На ове, засад недовољно потврђене, функције *Fas-L* утичу бројни фактори, као што су ниво његовог испољавања, облик самог *Fas-L*, локализација тумора, лимфоцитни инфилтрати и локално ослобађање цитокина и других медијатора [14].

ЦИЉ РАДА

Циљ нашег рада је био да се испита испољавање *Fas* и *Fas-L* у ткиву нормалних људских бубрега и код различитих типова и градуса карцинома ћелија бубрега.

МЕТОД РАДА

У овом раду коришћен је хируршки материјал 25 случајева КЋБ (Табела 1) и осам случајева нормалног ткива бубрега добијених биопсијом графтова пре трансплантације. Један део сваког узорка ткива бубрега је технички обрађен за светлосномикроскопску анализу, а други део узорка је, после вађења, стављен у медијум за ћелијску културу (*RPMI 1640, GIBCO-Europe, Karlsruhe, Germany*), одмах замрзнут и чуван у течном азоту. Из сваког узорка ткива формиран су исечци дебљине 5 μm , а затим су фиксирани у ацетону у трајању од 10 минута и сушени на собној температури два часа, а потом коришћени за имунохистохемијско бојење. Бојење је урађено индиректним имунопероксидазном техником на криостатским исечцима, како је то већ раније описано [15]. Као примарна антитета коришћена су следећа моноклонска антитета: клон број *DX2*, специфичан за *Fas/APO-1* анитиген (*CD95*), и клон број *G247-4*, специфичан за *Fas/APO-1* лиганд (*PharMingen, Hamburg, Germany*). Оба антитета била су разблажена у односу 1:50, а примена је трајала 45 минута. Као хромоген коришћен је 3,3-диаминобензидин (*DAB*), а за контрастно бојење Мајеров (*Mayer*) хематоксилин. Обојене исечке су посматрала светлосним микроскопом два патолога која нису знала клиничку, нити хистолошку дијагнозу. Дистрибуција имунохистохемијског бојења КЋБ је дескриптивно приказана по сле-

ТАБЕЛА 1. Класификација и градирање 25 случајева карцинома ћелија бубрега.

TABLE 1. Classification and grading of 25 renal cell carcinomas.

Тип Type	I	II	III	Укупно Total
Светлоћелијски Clear cell	5	10	1	16
Хромofilни Chromophilic	0	3	1	4
Хромofобни Chromophobe	0	2	0	2
Вретенaсти Spindle cell	0	0	3	3

дећем принципу: изостанак бојења у свим ћелијама, позитивно бојење на појединачним ћелијама, позитивно бојење на малој групи ћелија, позитивно бојење код око половине присутних ћелија и позитивно бојење на већини ћелија. Интензитет бојења је анализиран као јако, умерено и слабо бојење, што је такође описно дато у резултатима рада. Међутим, табеларно је приказан изостанак имунохистохемијског бојења као -, док је позитивна имунохистохемијска реакција приказана као +.

РЕЗУЛТАТИ

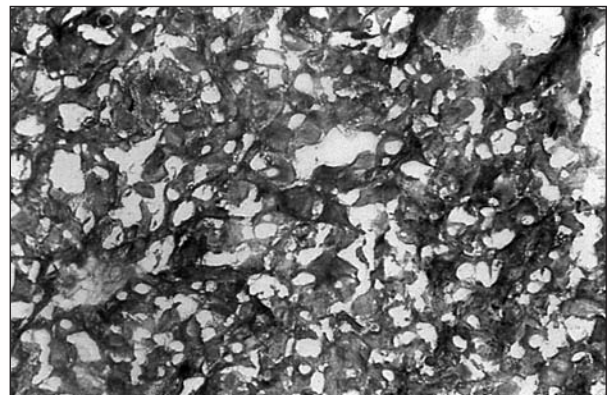
Нормално ткиво бубрега

На свим испитиваним узорцима нормалног ткива бубрега испољавање *Fas* је уочено, како у гломерулима, тако и на тубулима. У гломерулима је добијено јасно бојење на паријеталним епителним ћелијама Боуманове (*Bowman*) капсуле и на појединачним мезангијским ћелијама. Све тубуларне епителне ћелије, с изузетком једног дела дисталног тубула, показале су умерено испољавање *Fas*. Насупрот испољавању *Fas*, *Fas-L* није уочен на гломерулима нормалног ткива, док је на ћелијама проксималних тубула испољавање било различитог интензитета. Код свих анализираних узорака уочено је интензивно бојење медије крвних судова. Остале структуре нормалног бубрега нису показале бојење *Fas*, нити *Fas-L*.

Карцином ћелија бубрега

Резултати испољавања *Fas* и *Fas-L* у анализираним случајевима КЋБ приказани су у табели 2. Сви анализирани случајеви КЋБ градуса *G1-G2*, осим једног, светлоћелијског, показали су уједначен интензитет испољавања *Fas* и *Fas-L*.

Fas је показао умерено до јако мембранско испољавање, а само неколико светлоћелијских случајева је показало и цитоплазматско бојење (Слика 1). Дистрибуција испољавања *Fas* код ових КЋБ обично је



СЛИКА 1. Дифузно цитоплазматско и мембранско испољавање *Fas* на ћелијама светлоћелијског карцинома ћелија бубрега (моноклонско антителио клон *DX2*, Мајеров хематоксилин, $\times 320$).

FIGURE 1. Diffuse cytoplasmic and membrane *Fas* expression on clear cell renal cell carcinoma (monoclonal antibody clone *DX2*, Mayer's hematoxylin, $\times 320$).

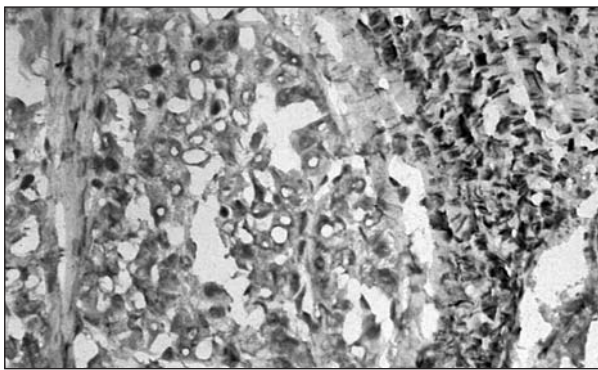
ТАБЕЛА 2. Испољавање *Fas* и *Fas-L* у карциномима ћелија бубрега (број случајева).
TABLE 2. Expression of *Fas* and *Fas-L* in renal cell carcinoma (case numbers).

Тип Type	<i>Fas+</i> и <i>Fas-L-</i> Fas+ and Fas-L-	<i>Fas+</i> и <i>Fas-L+</i> Fas+ and Fas-L+	<i>Fas-</i> и <i>Fas-L-</i> Fas- and Fas-L-	<i>Fas-</i> и <i>Fas-L+</i> Fas- and Fas-L+
Светлоћелијски Clear cell	15*	1	–	–
Базофилни Basophilic	1	–	–	–
Еозинофилни Eosinophilic	–	2	1	–
Вретенести Spindle cell	–	2	1	–
Хромофобни Chromophobe	–	1	1	–
Онкоцитом Oncocytoma	–	–	–	1

* У четири случаја *Fas-L* је био слабо позитиван у неким ћелијама тумора.

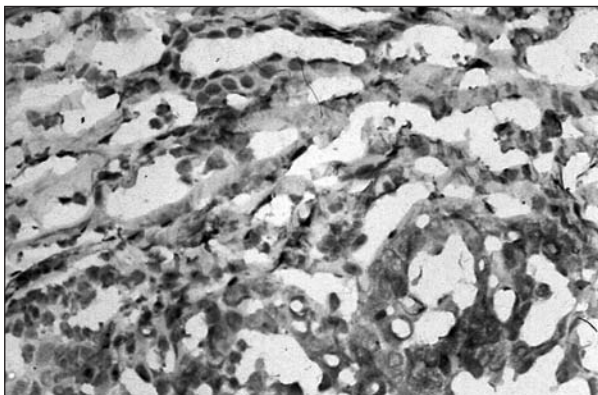
* In 4 cases *Fas-L* was slightly positive in some tumor cells.

дифузна, тј. уочена је у готово свим ћелијама тумора (Слика 1), а у само неколико случајева ћелије су спорадично биле негативне на *Fas*. Супротно испољавању *Fas*, у светлоћелијском типу КЋБ испољавање *Fas-L* скоро потпуно изостаје. Бојење *Fas-L* веома слабе јачине на појединим ћелијама тумора код неколико светлоћелијских типова КЋБ сматрано је негатив-



СЛИКА 2. *Fas-L* дискретно испољен на ћелијама тумора, али интензивно испољен на ћелијама строма тумора (моноклонско антитело клон G247-4, Мајеров хематоксилин, $\times 320$).

FIGURE 2. Discreet expression of *Fas-L* on tumor cells and intensive expression on tumor stromal cells (monoclonal antibody clone G247-4, Majer's haematoxylin, $\times 320$).



СЛИКА 3. *Fas-L* позитивност на ћелијама тумора у еозинофилном типу карцинома ћелија бубрега (моноклонско антитело клон G247-4, Мајеров хематоксилин, $\times 320$).

FIGURE 3. *Fas-L* positive on tumor cells of eosinophilic type of renal cell carcinoma (monoclonal antibody clone G247-4, Mayer's hematoxylin, $\times 320$).

ним. Само код једног случаја светлоћелијског КЋБ уочено је умерено и дифузно испољавање *Fas-L*. Занимљиво је да су код три случаја светлоћелијског КЋБ туморске стромалне ћелије показивале јако испољавање *Fas-L* (Слика 2). На основу њихове морфологије, највероватније су у питању стромални фибробласти или крвни судови тумора који се формирају пре него инфилтришући мононуклеарни леукоцити. Облик ових ћелија је издужени и фузиформан.

Супротно светлоћелијском типу, остали анализирани хистолошки типови КЋБ (хромофилни, хромофобни и вретенести) градуса G2-G3 имали су различиту комбинацију испољавања *Fas-L* и *Fas*. Један еозинофилни, један хромофобни и један саркоматоидни КЋБ били су негативни, како на *Fas-L*, тако и на *Fas*. Умерено испољавање *Fas* и *Fas-L* (Слика 3) је уочено код једног еозинофилног, а дифузно код два саркоматоидна КЋБ. Један случај хромофобног КЋБ је показао јако испољавање *Fas*, а слабо *Fas-L*. Онкоцитомни тип КЋБ је био једини тумор који је показивао умерено и дифузно испољавање *Fas-L*, а био негативан на *Fas*.

ДИСКУСИЈА

Степен апоптозе је променљив у малигним туморима и може допринети смањењу раста тумора. Различити протеински регулатори апоптозе могу утицати на степен апоптозе у тумору. Поремећај испољавања различитих протеина апоптозе утврђен је у обољењима бубрега код људи, експерименталним моделима акутне инсуфицијенције рада бубрега, Вилмсовом (*Wilms*) тумору, као и у КЋБ [16-18]. Важни молекули који индукују сигнал за апоптозу су *Fas-L* и *Fas*. Везивање *Fas-L* за његов рецептор *Fas* на сензибилисаним ћелијама доводи до програмиране смрти ћелија. За разлику од нормалних и малигну хематопоезних ћелија, у којима је најпре анализирано испољавање *Fas* и *Fas-L*, тек у новијој литератури се испитују код нехематопоезних тумора *in situ*. Стога су у овој студији испитивани испољавање *Fas-L* и *Fas* код КЋБ и корелација са хистолошким особинама. Испитивање је вршено код нормалног ткива бубрега и КЋБ.

У нормалном ткиву бубрега *Fas* је био експримиран у паријеталном листу Боуманове капсуле, мезангијуму и тубулима (проксималним и дисталним). За разлику од нашег налаза, Јанг-Сика (*Young-Sik*) [12] и сарадници нису уочили испољавање *Fas* у гломерулима. *Fas-L* је у анализираним случајевима уочен само у тубулима, док су неки аутори уочили испољавање *Fas-L* и на паријеталним епителним ћелијама Боуманове капсуле [12]. Подаци из литературе који се односе на испољавање у КЋБ и на његову прогресију су контроверзни. Неки показују да *Fas* и *Fas-L* не утичу на развој тумора путем апоптозе [12]. Супротно томе, други аутори указују на значај поремећаја испољавања *Fas* и *Fas-L* у патогенези КЋБ [19, 20]. Код свих анализираних светлоћелијских КЋБ уочено је дифузно, углавном мембранско, али у неким и цитоплазматско, испољавање *Fas*. Испољавање *Fas* је уочено и у осталим анализираним хистолошким типовима КЋБ. Овај налаз је у супротности са налазима Рампа (*Ramp*) и сарадника, који су показали смањен ниво испољавања *Fas*, а повећан ниво испољавања *Fas-L* у светлоћелијском типу КЋБ [20], што највероватније зависи од градуса анализираних карцинома бубрега. КЋБ иначе показује имуноморфолошку разнородност, што смо показали у нашим претходним радовима [15, 21].

Иако нисмо били у могућности да испитамо да ли је испољавање функционалног *Fas* повећано, наши резултати указују на то да КЋБ може бити осетљив на *Fas*-посредовану апоптозу. *Fas*-посредована апоптоза код КЋБ може бити индукована преко инфилтрирајућих активираних лимфоцита који испољавају *Fas-L* [22] или применом анти-*Fas* моноклонских антитела. Нономура (*Nonomura*) и сарадници [23] су показали да су ћелијске линије КЋБ осетљиве на индукцију апоптозе применом анти-*Fas* моноклонских антитела. Подаци из доступне литературе указују на испољавање рецептора *Fas in vivo* код већине уобичајених типова КЋБ [19]. Ипак, у овој студији открили смо изостанак испољавања *Fas* у три случаја (саркоматоидни, еозинофилни и хромофобни) који не припадају светлоћелијском типу КЋБ. Код ових тумора апоптоза преко *Fas* и *Fas-L* система не може бити индукована. Ово је занимљиво с обзиром на то да нормални тубули испољавају *Fas*, па је могуће да су ове ћелије тумора изгубиле могућност испољавања *Fas* током њихове недиференцијације.

Испољавање *Fas* испитивано је код различитих малигнитета код људи. Већина ових анализа је заснована на испитивању ћелијских култура, а само неколико њих се односило на испитивања ткива тумора. Резултати који су у складу с резултатима наше студије су добијени код хепатоцелуларног карцинома и карцинома езофагуса. Наиме, добро диферентовани случајеви хепатоцелуларног карцинома показали су испољавање *Fas*, док су слабо диферентовани случајеви показали изостанак испољавања *Fas*, а присуство испољавања *Fas-L* [24, 25]. Насупрот *Fas*, *Fas-L* испољавање је испитивано код мањег броја карцинома код људи. У нашем раду уочено је умерено до дифузно испољавање *Fas-L* у седам случајева КЋБ, углавном градуса G2 и G3. Подаци из литературе [26] показују високо испољавање *Fas-L* у саркоматоидним ћелијама

КЋБ, који су увек градуса G3, што је у сагласности с резултатима наше студије, која показује испољавање *Fas-L* у случајевима КЋБ високог степена малигнитета. Као што је показано за ћелије карцинома колоне, и ћелије КЋБ које испољавају *Fas-L* могу да инхибирају имунски одговор Т лимфоцита [27]. Дакле, ћелије карцинома које испољавају *Fas-L* могу да индукују *Fas*-посредовану апоптозу у активираним лимфоцитима који инфилтрирају тумор. На тај начин КЋБ, који је обично „богат” инфилтрирајућим лимфоцитима, може избећи имунски одговор и тако наставити да расте. Такође, анализе ћелија меланома [28] које испољавају *Fas-L* потврђују хипотезу да *Fas-L* може бити одговоран за избегавање имунског одговора тумора. Наиме, показано је да *Fas-L*-позитивне ћелије меланома код мишева доводе до брзог раста тумора, насупрот спором развоју тумора код *Fas*-дефицијентних мишева, указујући на то да *Fas-L*-позитивне ћелије меланома могу да доведу до *Fas*-посредоване апоптозе *Fas*-позитивних Т ћелија. У нашој студији је показано да стромалне ћелије неколико случајева КЋБ испољавају *Fas-L*. Највероватније је да *Fas*-позитивне стромалне ћелије КЋБ учествују у избегавању имунског одговора будући да ове ћелије прве ступају у контакт с инфилтрирајућим лимфоцитима. На сличан начин се објашњавају резултати одбацивања алографта преко миобласта који испољавају *Fas-L*. Показано је да увођење генетски добијених миобласта који испољавају *Fas-L* у калем штити калем од имунског одговора и одбацивања путем слања апоптозног сигнала инфилтрирајућим активираним Т ћелијама које експримирају *Fas* [29].

Познато је да су случајеви КЋБ, нарочито вишег стадијума, углавном резистентни на хемиотерапију, док мање од 20% болесника показује одговор на имунотерапију цитокинима. Наши резултати испољавања *Fas* и *Fas-L*, тј. повећано испољавање *Fas-L*, а смањено *Fas*, у слабо диферентованим туморима могу пружити објашњење за неуспешну цитотоксичну и имуномодулациону хемиотерапију код напредних случајева КЋБ. Боље разумевање процеса који су укључени у апоптозу код тумора, као што су испољавање *Fas* и *Fas-L in vivo*, могу омогућити побољшање лечења особа оболелих од КЋБ. Ово може имати значаја и у примени нове терапије, као што је примена анти-*Fas* моноклонских антитела, која могу изазвати апоптозу ћелија тумора. У последње време је објављено да анти-*Fas* антитела могу смањити број ћелија тумора у култури стимулацијом апоптозе помоћу терапије интерфероном гама. Показано је да комбинована имунотерапија с интерфероном гама и анти-*Fas* антителима или цитотоксичним Т ћелијама које испољавају *Fas-L* може бити корисна допунска терапија за болеснике са малигим тумором [30-32].

ЗАКЉУЧАК

Уочено је аберантно испољавање *Fas* и *Fas-L* у ткиву КЋБ у односу на тубулски епител бубрега од којих потичу карциномске ћелије овог тумора. Смањено испољавање *Fas*, као и повећано испољавање *Fas-L*, које је одговорно за избегавање имунских ме-

ханизама код неких малигнитета, може бити одговорно за туморску прогрессију КЊБ.

ЛИТЕРАТУРА

- Ghanem MA, Van der Kwast TH, Den Hollander JC, et al. The prognostic significance of apoptosis – associated proteins bcl-2, bax and bcl-x in clinical nephroblastoma. *Br J Cancer* 2001; 85(10): 1557-63.
- Fishman D, Irena B, Kellman-Pressman S, et al. The role of MHC class I glycoproteins in the regulation of induction of cell death in immunocytes by malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(4):1740-4.
- Nagata, S, Golstein, P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-56.
- Lee JW, Gersuk GM, Kiener PA, et al. HLA-DR-triggered inhibition of hematopoiesis involves Fas/Fas ligand interactions and is prevented by c-kit ligand. *J Immunol* 1997; 159(7):3211-9.
- Akbar AN, Salmon M. Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunology Today* 1997; 18:72-6.
- Radfar S, Martin H, Tilkin-Mariame AF. Tumor escape mechanism involving Fas and Fas-L molecules in human colorectal tumors. *Gastroenterol Clin Biol* 2000; 24(12):1191-6.
- Leithauser F, Dhein J, Mechttersheimer G, et al. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumour necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 1993; 69:415-29.
- Chello M, Mastroberto P, Qurino A. Inhibition of neutrophil apoptosis after coronary bypass operation with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(1):123-29.
- Luc X, Elisabeth D, Jacques H, et al. Fas ligand is not only expression in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues. *Clin Pathol Clin Mol Pathol* 1997; 50:87-91.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 2:1306-7.
- Du C, Guan Q, Yin Z. Renal tubular epithelial cell apoptosis by Fas-Fas-L-dependent self-injury can augment renal allograft injury. *Transplant Proc* 2003; 35(7):2481-2.
- Young-Sik K, Kwang HK, Jung-Ah C, et al. Fas (APO-1/CD95) ligand and Fas expression in renal cell carcinomas. *Arh Pathol Lab Med* 2000; 124:687-93.
- Terheyden P, Siedel C, Merkel A, et al. Predominant expression of Fas (CD95) ligand in metastatic melanoma revealed by longitudinal analysis. *J Invest Dermatol* 1999; 112:899-902.
- Li JH, Rosen D, Sondel P, et al. Immune privilege and Fas-L: two ways inactivate effector cytotoxic T lymphocytes by Fas-L-expressing cells. *Immunology* 2002; 105(3):267-77.
- Marković-Lipkovski J, Brašanac D, Todorović V, et al. Immunomorphological characteristics of renal cell carcinoma. *Histology and Histopath* 1995; 10:651-9.
- Ghanem MA, van der Kwast TH, Den Hollander JC, et al. The prognostic significance of apoptosis – associated proteins bcl-2, bax and bcl-x in clinical nephroblastoma. *Br J Cancer* 2001; 85(10):1557-63.
- Gobe G, Zhang X, Willgoss AD, et al. Relationship between expression bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(3):454-67.
- Gobe G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R. Apoptosis and expression of bcl-2, bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest* 2002; 20(3):324-32.
- Koga F, Arai K, Kamai T, et al. Fas labeling status does not correlate with apoptosis of renal cell carcinoma in vivo. *Anticancer Res* 2001; 21(5):3193-7.
- Sejima T, Isoyama T, Miyagawa I. Alteration of apoptotic regulatory molecules expression during carcinogenesis and tumor progression of renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2003; 10(9):476-84.
- Blasche S, Müller CA, Marković-Lipkovski J, et al. Expression of cadherin-8 in renal cell carcinoma and fetal kidney. *Int J Cancer* 2002; 101(4):327-34.
- Elsasser-Beile U, Gierschner D, Welchner T, Wetterauer U. Different expression of Fas and Fas ligand in tumor infiltrating and peripheral lymphocytes of patients with renal cell carcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23:433-7.
- Nonomura N, Miki T, Yokoyama M, et al. FAS/APO-1 mediated apoptosis of human renal cell carcinoma. *Biochem and Biophys Research Comm* 1996; 229:945-51.
- Ito Y, Monden M, Takeda T, et al. The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 2000; 82:1211-7.
- Gratas C, Tohma Y, Barnas C. Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:2057-62.
- Leroy X, Wacrenier A, De la Taille A, et al. Immunohistochemical detection of Fas and Fas ligand in sarcomatoid renal cell carcinoma. *APMIS* 2001; 109:469-73.
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, et al. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184:1075-82.
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumour immune escape. *Science* 1996; 274:1363-6.
- Lau HT, Yu M, Fontana A, Stoeckert CJ. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing Fas-L in mice. *Science* 1996; 273:109-12.
- Scholz M, Cinatl J. Fas/Fas-L interaction: a novel immune therapy approach with immobilized biologicals. *Med Res Rev* 2005; 25(3):331-42.
- Inaba H, Glibetic M, Buck S, et al. Interferon-gamma sensitizes osteosarcoma cells to Fas-induced apoptosis by up-regulating Fas receptors and caspase-8. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43(7):729-36.
- Khar A, Varalakshmi C, Pardhasaradhi BV, et al. Role of IFN-gamma produced after intraperitoneal transplantation of AK-5 cells in the induction of Fas ligand expression by tumor cells tumor cells leading to immune evasion. *Immunol Lett* 2002; 84(2):145-51.

EXPRESSION OF Fas AND Fas-L IN RENAL CELL CARCINOMA

Vitomir GOVEDAROVIĆ¹, Sanja RADOJEVIĆ-ŠKODRIĆ¹, Dragan MITROVIĆ¹, Claudia A. MÜLLER²,
Gerhard A. MÜLLER³, Jasmina MARKOVIĆ-LIPKOVSKI¹

¹Institute of Pathology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade; ²Centre for Medical Researches, Eberhard-Karls University, Tübingen, Germany; ³Centre for Internal Medicine, Georg-August University, Göttingen, Germany

INTRODUCTION The previous investigations revealed that Fas-L expression on tumor cells can be one of the reasons of tumor growth, or tumor regression, with or without activation of the immune response.

OBJECTIVE The objective of our study was to investigate the expression of Fas and Fas-L in situ in normal human renal tissue as well as in different types of renal cell carcinoma (RCC) according to tumor grading.

METHOD Expression of Fas and Fas-L was examined in 25 RCCs classified according to nuclear grades: G1-G3 and to cell type: 17 clear cells, 3 chromophilics (2 eosinophilics, 1 basophilic), 2 chromophobes and 3 spindle cells. Ten normal human kidneys were analyzed, too. Indirect immunoperoxidase technique was applied. Spread and intensity of staining of Fas and Fas-L molecules expression were scored semiquantitatively.

RESULTS Distribution of Fas expression in these RCC was typically diffuse. However, Fas-L was almost completely absent in clear cell RCC. In 3 clear cell RCC, some tumor stromal cells exhibited strong expression of Fas-L. On the contrary, chromo-

philic, chromophobe and spindle cell RCCs grading from G2-G3, manifested variable combinations of Fas and Fas-L expression.

CONCLUSION The most of clear cell type low grade RCCs manifested intensive and extensive expression of Fas and completely absence of Fas-L. However, RCCs of high grade malignancy belonging to the clear cell, eosinophilic, chromophobe or spindle cell types can have various combinations of Fas and Fas-L expression. It may probably lead to development of different mechanisms of avoidance of immune response to RCC.

Key words: renal cell carcinoma; apoptosis; Fas; Fas-L

Jasmina MARKOVIĆ-LIPKOVSKI
Institut za patologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Tel.: 011 685 559