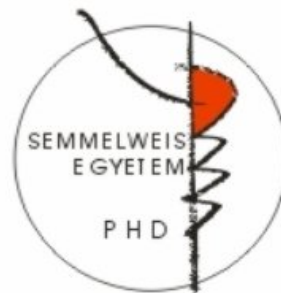


Új diagnosztikai és prognosztikai vizsgálatok a húgyhólyag rosszindulatú daganatain

Doktori értekezés

dr. Riesz Péter

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Romics Imre egyetemi tanár
Az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Flaskó Tibor, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Kovács András, osztályvezető főorvos
az orvostudomány kandidátusa

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kádár Anna egyetemi tanár
az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Merksz Miklós, osztályvezető főorvos, Ph.D.
Dr. Várbíró Szabolcs, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest

2009.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	6
2.1. Húgyhólyagrakokról általában	6
2.2. Irodalmi háttér	7
2.2.1. Epidemiológia	7
2.2.2. Prediszponáló tényezők	8
2.2.3. Kórlefolyás	9
2.2.4. Húgyhólyagrakok patológiája	12
2.2.4.1. Szövettani típusok	12
2.2.4.2. A húgyhólyagrakok TNM klasszifikációja	14
2.2.4.3. Grading: urothelialis papilloma /1973/	16
2.2.4.4. WHO 2004: urothelialis papilloma	16
2.2.4.5. Biológiai viselkedés	16
2.2.5. Kromoszóma eltérések, mikroszatellita	17
2.2.6. Húgyhólyagrak prognosztikai markerei	19
2.2.6.1. Protoonkogének	19
2.2.6.2. Tumor szupresszor gének	20
2.2.6.3. Sejtciklus szabályozók	21
2.2.6.4. Extracelluláris Mátrix, adhéziós molekulák, sejtfelszíni markerek és kapcsolódó fehérjék	21
2.2.7. Sejtkapcsoló struktúrák	22
2.2.7.1. A TJ transzmembrán fehérjéi	22
2.2.7.1.1. Occludin	23
2.2.7.1.2. Claudin	23
2.2.7.1.2.1. A claudinok szerepe a tumorgenezisben	25
2.2.7.1.2.2. Claudinok a különböző daganatokban	25
2.2.7.1.3. Tetraspanin	26
2.2.8. Húgyhólyagrakok diagnosztikája	26
2.2.8.1. Tünettan	26
2.2.8.2. Diagnosztikus módszerek	27
2.2.8.2.1. Alapvizsgálatok	27

2.2.8.2.2. Tumor markerek	30
2.2.8.2.3. Kiegészítő vizsgálatok	33
3. Célkitűzések	33
4. Módszer	35
4.1. Klinikai diagnosztikai vizsgálatok	36
4.1.2. 1.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat	36
4.1.2. 2.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat	37
4.1.3. 3.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat	38
4.2. Hólyagtumor prognosztikai vizsgálatok	41
4.2.1. 1.sz. Prognosztikai vizsgálat	41
4.2.2. 2.sz. Prognosztikai vizsgálat	41
4.2.3. 3.sz. Prognosztikai vizsgálat	43
5. Eredmények	48
5.1. Klinikai diagnosztikai vizsgálatok (1.-3. sz.) eredményeinek bemutatása	48
5.1.1. 1.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat	48
5.1.2. 2.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat	50
5.1.3. 3.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat	56
5.2. Prognosztikai vizsgálatok (1.-3. sz.) eredményeinek bemutatása	58
5.2.1. 1.sz. Prognosztikai vizsgálat	58
5.2.2. 2.sz. Prognosztikai vizsgálat	58
5.2.3. 3.sz. Prognosztikai vizsgálat	61
6. Megbeszélés	67
7. Következtetések	79
8. Összefoglalás	80
9. Summary	82
10. Függelék	84
11. Irodalomjegyzék	88
12. Saját közlemények jegyzéke	108
13. Köszönetnyilvánítás	116

1. Rövidítések jegyzéke

ABI	primer expressz program
ABC	avidin-biotin komplex
AFP	alfa-fötóprotein
ALA	5-aminolevulinsav
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl-2	(B cell lymphoma) antiapoptotikus gén
β -HCG	humán choriogonadotropin
BSA	bovine-serum albumin
BTA	bladder tumor antigén
CGH	összehasonlító genomikai hibridizációs vizsgálat
CIS	carcinoma in situ
CLDN	claudin
CPE	Clostridium perfringens enterotoxin
CPE-r	Clostridium perfringens enterotoxin receptor
CT	computer tomographia
DAB	diaminobenzidin
DNS	dezoxiribonukleinsav
EAU	European Association of Urology
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancers
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FGFR3	fibroblaszt növekedési receptor-3
FISH	fluorescens in situ hibridizáció
Her-2	herceptin-2 (C-erbB-2) protoonkogén
IGF-1	inzulin növekedési faktor-1
JAM	junkcionális adhéziós molekula
LOH	heterozigótaság elvesztése
MAGUK	membrán asszociált guanilát kináz homológ fehérje
MMP	mátrix metalloproteináz
MR	mágneses rezonancia

MSI	mikorszatellita instabilitás
MUPP1	multiple pdz domain protein
NMP22	nuklear matrix protein 22
NSE	neuro-specifikus enoláz
O.D.	optikai denzitás
OSP	oligodendrocyta-specifikus protein
PATJ	pALS1-asszociált tight junction fehérje
PCR	polimeráz láncreakció
PDD	fotodinámiás diagnosztika
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	real time polimeráz láncreakció
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
Tis	carcinoma in situ
TJ	tight junction
TPA	tissue polypeptid antigén
TUR	transuretralis resectio
UH	ultrahang
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
ZO	zonula occludens fehérje
TCC	transitocellularis carcinoma

2. Bevezetés

2.1. Húgyhólyagrakokról általában

Az uropoetikus rendszer szerveit bélelő hám az urothelium. Ez összefüggően található meg a vesék üregrendszerétől, az uretereken, a húgyhólyagon át, a férfi és női húgycső proximális harmadáig. Az urothelium daganatai közül, gyakoriság szempontjából kiemelkedik a hólyagrák. A hólyagcarcinoma a második legtöbbször diagnosztizált urológiai rosszindulatú daganat.

A hólyagrák mind Magyarországon, mind világszerte gyakori daganat. A betegség korai felismerésével a kuratív kezelés lehetősége és az életminőség megtartása érhető el. Napjainkban a hólyagrakkal foglalkozó kutatások között kiemelkedő kérdésként merül fel a korai diagnosztika és ennek megfelelő eljárások kifejlesztése. Hasonlóan gyakori kutatási téma és így forrongó terület, a felismert hólyagrák prognosztikai tényezőinek értékelése, a túlélés jóslása és ezen keresztül a további terápiás lépések indikációja.

A húgyúti tumorok diagnosztizálása és csoportokba sorolása, mely az operatív megoldást indikálja, a daganat kiterjedtsége esetén a további műtéti terápiát meghatározza és véleményt formál a prognózisról, hagyományosan a szövettani diagnosztikán alapszik. Általános összefüggés, hogy a daganatok korai felfedezése szignifikánsan javítja a beteg kezelésének hatékonyságát és a beteg életkilátásait. Így a húgyhólyagrák korai diagnózisa is csökkenthetné a morbiditást és a mortalitást, ezzel együtt a gazdasági és szociális terheket a túlélés során, illetve jelentősen mérsékelné a terápiás költségeket is (1).

Az átmeneti sejtes karcinóma az összes hólyagrák több, mint 90 %-át teszi ki, míg a hólyagrakok 5 %-a laphám, 2 %-az adenokarcinóma (2). A nem hám eredetű daganatok ritkák, nem érik el az 1 %-os arányt. Gyermekkorban előfordulhat rhabdomyosarcoma, míg felnőttkorban melanoma malignum vagy vérképzőszervi daganat adhat ide áttétet (3).

A hólyagrakok több mint kétharmada endoszkóposan papilláris megjelenésű, gyakran egy vékonyabb nyéllal csatlakozik a nyálkahártyájához. Ezek a papilláris elváltozások viszonylag jobb indulatúak, ellentétben a lapos, a nyálkahártyából alig kiemelkedő, nekrotikus felszínű, ödémás környezetű, többségében izominvazív daganatokkal.

Bár a különböző kutatások számtalan molekuláris változást írtak le a hólyag illetve a felső húgyútak urothelsejtes karcinómájában, a normál hám tumoros átalakulásának pontos molekuláris útja még nincs kellőképpen feltérképezve (4).

A daganatra jellemző, hogy egy,- illetve többgócú formában is előfordulhat. Egyes szerzők szerint egyszerre több sejtben jön létre daganatos transzformáció, így a daganatok genetikailag különböznek egymástól, míg mások szerint ugyanazon klón sejtszejtjei telepednek meg a húgyútak különböző részein, így örökléstanilag azonosak (5, 6).

2.2. Irodalmi háttér

2.2.1. Epidemiológia

A hólyagrák epidemiológiai jelentőségét az adja, hogy a fejlett országokban férfiak között az ötödik, nők körében a negyedik leggyakoribb rosszindulatú daganat. A hólyagtumoros esetek száma évről évre emelkedő tendenciát mutat.

A hólyagban előforduló urothelsejtes tumor a két nemből együtt a negyedik leggyakrabban előforduló daganat Európában, közel 120,000 éves új esetszámmal (7,8). A világon évente a több mint 300,000 új hólyagrákot fedeznek fel és ebből a betegcsoportból nem kevesebb, mint 100,000 beteg hal meg évente (9). A hazai halálozási statisztikák alapján 800 felett van a hólyagdaganatban évente elhunytak száma (1. táblázat) (10). Az Egyesült Államok területén évente 55,000-nél is több hólyagrákot diagnosztizálnak (11).

A betegek 80 %-ának életkora 50 és 80 év között van. Sajnálatos módon azonban, ez a tartomány fokozatosan a fiatalabb korosztály irányába tolódik. A férfi-nő előfordulási arány 2,7:1-hez (12,13,14).

1. táblázat. Hólyagrák hazai halálozása

	Nem	Abszolút szám
1965	férfi	314
	nő	107
1970	férfi	387
	nő	115
2000	férfi	600
	nő	215
2001	férfi	609
	nő	233
2002	férfi	595
	nő	209
2003	férfi	638
	nő	210

Otto S, Kasler M. (2005) A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása. A népegészségügyi programok jellegzetességei és várható eredményei. Magy Onkol, 49(2):99-107. (10)

2.2.2. Prediszponáló tényezők

A hajlamosító tényezők közül a legfontosabb a dohányzás, mely ötszörösére emeli a hólyagrák kockázatát. A folyamat kialakulásához relatív hosszabb időre van szükség (5-10 év), mely idő eltelte után a leszokás már alig csökkenti a tumor kialakulásának rizikóját. Szintén fokozott a hólyagrák esélye azoknál, akik rendszeresen többgyűrűs aromás vegyületekkel érintkeznek (pl.: vegyi-, festék-, gumi- és fémiparban dolgozók esetén). Kockáztnövelő hatásukat már az 50-es években kimutatták brit vegyipari munkásoknál. Elsőként a benzidínét vagy a 2-naftilaminét (13). A daganatkeltő hatás kialakulásához szintén sok idő, több évtized szükséges.

Újabban felmerült a diabetes mellitus is, mint a hólyagrák etiológiai tényezője. Bár még nem bizonyított, de valószínűnek látszik az összefüggés a két kórkép között. Ezt támasztja alá az, hogy több olyan dolgozat született, melyekben a szerzők arra az eredményre

jutottak, hogy a hólyagrák kialakulásának esélye a cukorbetegség körében nagyobb a normál szénhidrát-háztartású kontrollcsoporthoz viszonyítva. Kravchik és munkatársai cikkében 2,34-es az esélyhányados, Yeung és munkatársainál ugyanez 2,69 (15,16). A patomechanizmus még ismeretlen. Az elmélet támogatói különböző molekuláris biológiai magyarázatokat adnak, melyek középpontjában az extracelluláris mátrix makromolekuláinak megváltozott összetétele áll. A változás kiváltójának pedig az IGF-1-et, illetve az inzulint tartják (15,16).

A rendszeres phenacetin és az ismételt adott cyclophosphamid talaján is nagyobb eséllyel alakul ki hólyagdaganat. Kismencedei besugárzás szintén elindíthat a hólyagban malignus tumort, mely általában 5-10 év múlva kerül felismerésre. Léteznek még egyéb anyagok, melyek szerepét feltételezik a húgyhólyag karcinogenezisében, de jelenleg még nem bizonyították be egyértelműen. Ilyen lehet például a túlzott kávé, a tömény alkohol, illetve a mesterséges édesítőszer fogyasztása. A Schistosoma haematobiummal fertőzött trópusi területeken magasabb a laphám típusú húgyhólyagrágok incidenciája, a WHO ezért is támogatja a bilharziasis világméretű eradikációját (3,12).

2.2.3. Kórlefolyás

A húgyhólyagrágok diagnózisának és terápiájának is meghatározó eleme, hogy mikor kerül felismerésre a tumor. Az időtényezőnél is nagyobb jelentősége van annak, hogy biológiai viselkedés alapján a hólyagrágokat két nagy csoportba sorolhatjuk. A nem-izominvazív (korábbi nomenklátúra szerint felületes), és az izominvazív típus, melyet további alcsoportokra lehet bontani. A két fő csoport biológiai viselkedése, prognosztikája, a beteg életkilátása, a daganat áttétképző hajlama annyira különbözik, hogy szinte két külön entitásról lehet beszélni.

A nem-izominvazív hólyagdaganatok standard terápiája a transurethralis tumor reszekció (TUR), bár kiterjedt multiplex Tis esetén olykor radikális cystectomy is szóba jöhet. Az alacsony kockázatú TaG1 hólyagrág után helyi intravesicalis kemoterápia nem szükséges. A közepes kockázatú csoportba tartozó TaG2, T1G1 és T1G2 stádiumú tumor TUR-ral történő teljes eltávolítása után, profilaktikus intravesicalis kemoterápiás kezelést kell végezni, melynek hatására a relapszus- és progressziós ráta csökken. A magas kockázatú T1G3 és Tis daganat eltávolítása után intravesicalis BCG kezelés javasolt. Ugyanez szükséges a recidív TaG2, T1G1 és T1G2 daganat után.

Az izominvazív típusnál az elsőként választandó kezelési mód a radikális műtét, melynek elvégzését azonban a jelentős műtéti megterhelés sok esetben korlátozza. Izominvazív daganatok (pT2-T4) esetében gyógyulást nem lehet elérni az endoszkópos módszerrel. Amennyiben a beteg általános belgyógyászati állapota alkalmassá teszi radikális cystectomya végezhető, mely után pT2-pT3b patológiai stádiumig 50 % feletti ötéves túlélés érhető el. Radikális cystectomya végezhető BCG-rezisztens, recidíváló pT1G3 és pTis esetében, illetve az endoszkóposan nem uralható méretű pT1 stádiumú exophyticus hólyagráknál is. A műtét során gondoskodni kell a vizelet eltereléséről, illetve elvezetéséről, melynek számos formáját írták le. A megfelelő deviációt a beteg igényének figyelembe vételével, de a betegség kiterjedésének függvényében kell kialakítani.

Amennyiben az egyetlen végleges kuratív megoldás, a cystectomya nem jön szóba, akkor a beteg kemo- és/vagy sugárterápiában részesül, esetleg palliatív műtétek végezhetők (3,12,17,18).

Az újonnan diagnosztizált urothelsejtes hólyagkarcinómák az esetek 70-80 %-ban nem-izominvazívak és teljes egészében reszekálhatóak, a daganatok 30-85 %-a mégis recidíválni, míg a tumorok 10-20 %-a progrediálni fog a stádiumától és a differenciáltságától függően. A recidívák többsége az első 3 évben jelentkezik (4,17,18,19).

A 2006-os EAU Guideline szerint a betegek esélyét a tumor-progresszióra, illetve a recidívára az úgynevezett EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancers) pontozó rendszer szerint határozhatjuk meg (2., 3. táblázat). A multiplex, a nagy (≥ 3 cm), és a gyakran recidíváló (több mint évi egyszer) tumorú betegeknek van a legnagyobb esélye a daganat kiújulására, míg a tumor-progresszióra a pT1G3 és a pTis stádiumú pácienseknek van a legmagasabb rizikója. Internetes progresszió és recidíva kalkulátor elérhető a <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/> - internetes címen.

**2. táblázat: Recidíva és progresszió pont számítása
(European Assotiation of Urology, Guidelines 2006)**

Tényező	Recidíva	Progresszió
Tumorok száma		
egy	0	0
3-9	3	3
≥10	6	3
Tumor-átmérő		
<3cm	0	0
≥3cm	3	3
Recidíva arány		
első	0	0
≤1 recidíva/év	2	2
>1 recidíva/év	4	2
Kategória		
Ta	0	0
T1	1	4
CIS		
nincs	0	0
van	1	6
Grade (1973 WHO)		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Összes pont	0-17	0-23

3. Táblázat: A recidíva és a progresszió esélye a pontrendszer alapján

Recidíva pont	Recidíva esélye 1 éves (95% KI)	Recidíva esélye 5 éves (95% KI)
0	15% (10%, 19%)	31% (24%, 37%)
1-4	24% (21%, 26%)	46% (42%, 49%)
5-9	38% (35%, 41%)	62% (58%, 65%)
10-17	61% (55%, 67%)	78% (73%, 84%)
Progresszió pont		
Progresszió pont	Progresszió esélye 1 éves (95% KI)	Progresszió esélye 5 éves (95% KI)
0	0,2% (0%, 0,7%)	0,8% (0%, 1,7%)
2-6	1% (0,4%, 1,6%)	6% (5%, 8%)
7-13	5% (4%, 7%)	17% (14%, 20%)
14-23	17% (10%, 24%)	45% (35%, 55%)

(KI: konfidencia intervallum)

A transurethralis reszekció (TUR) után, a beteg jellemzőitől függően, az egy éven belüli recidíva esélye 15 %-tól 70 %-ig, míg az 5 éven belüli progresszió esélye 7 %-tól 40 %-ig terjed (20,21).

Hazai munkacsoport Kondás vezetésével egy matematikai módszeren alapuló, nem-izominvazív hólyagtumoros betegek prediktív prognosztikai tényezőinek többváltozós analízisét dolgozta ki. A modellt, 328 beteg adatainak feldolgozása után alkalmasnak találták az öt éves recidívamentes túlélés, a recidívák és a későbbiekben kialakuló izominfiltráció relatív kockázatának előrejelzésére (22).

2.2.4. Húgyhólyagrák patológiája

2.2.4.1. Szöveti típusok

A átmeneti sejtes karcinóma az összes hólyagrák több mint 90%-át teszi ki. A szövettanilag igazolt laphámrák 5 %, az adenokarcinóma 2 % (2). Egyéb nem hám eredetű daganatok ritkák, előfordulási arányuk nem éri el az 1 %-ot.

Átmenetisejtes daganat: Az urothelsejtes daganatok leggyakrabban a hólyagalapon, valamint az ureterek beszájadásánál alakulnak ki. Ismert papilláris és nem papilláris megjelenés is.

- A papilláris típusra jellemző az exofitikus növekedés, általában jól differenciált, grade I vagy grade II fokozatú. Papilloma a megnevezése, és ebben az esetben benignus elváltozás, amennyiben a daganat nem invazív, papilláris szerkezetű, gyér strómájú, az atípiá enyhe és 7 sejtrétegnél nem vastagabb. Itt kell megemlíteni egy ritka, szintén jóindulatú szövettani entitást, az invertált papillomát. Paschkis az első leírója, „adenomaszerű polypusnak” titulálta (23). Az invertált papillomát (átmenetisejtes papilloma, invertált típus) szabályos, transitiocellularis sejtek alkotják, kis fészkekbe rendeződve, minimális sejt atípiával. Az elváltozást általában normál urothelium fedi.

- Nem papilláris szerkezetű az átmenetisejtes karcinómák 25 %. A daganat megjelenése szesszilis, polypoid vagy kifelélyesedő. Gyakran grade III, a papilláris szerkezet csak néhol sejthető. Az atípiá kifejezett, a sejtek gyakran az izomréteget beszűrik, azon túlnőnek.

In situ carcinoma (pTis): vörös, bársonyos foltozottságként jelentkezik, lapos elváltozás, rétegszáma 3-20, atípiá igen kifejezett, mely gyakran az egész urotheliumra vonatkozik. A polaritása teljességgel megszűnt, de a bazális membrán ép.

Laphámrák: hólyagkövek ill. tartós katéter okozta irritációval, vagy bilharziazissal van kapcsolatban. A tartósan gyulladt urotheliumban laphám-metaplázia, majd dysplasia, in situ carcinoma végül invazív karcinóma alakulhat ki. Általában közepesen differenciált, erősen infiltratív, elszarusodó karcinóma.

Adenokarcinóma: Rendszerint súlyos irritáció előzi meg, rizikótényező az intesztinális metaplázia, az urocystitis cystica, és urocystitis glandularis, ill urachusmaradvány dysplasiaja. Egygócú, a trigonum területéről kiinduló, lapos, szemölcsszerű, erősen invazív tumor (6).

2.2.4.2. A húgyhólyagrágok TNM klasszifikációja

A húgyhólyagrágoknál is, mint a daganatok többségénél a TNM-beosztást használják világszerte. A T a primer tumor méretére, az N a nyirokcsomóstátuszra, az M pedig a metasztázisokra utal. A 2007-es EAU Guideline a húgyhólyagrágok stádiumának meghatározásához az alábbi 2002-es TNM beosztást ajánlja:

T: primer tumor:

Tx: a primer tumor nem értékelhető

T0: a primer tumor nem nyilvánvaló

Ta: nem invazív papilláris karcinóma

Tis: carcinoma in situ

T1: tumor betör a subepithelialis szövetbe

T2: Tumor betör az izomrétegbe

T2a: tumor a felületes izomrétegbe tör be, belső fél

T2b: tumor a mély izomrétegbe tör be, külső fél

T3: tumor a perivesicalis szövetet is infiltrálja

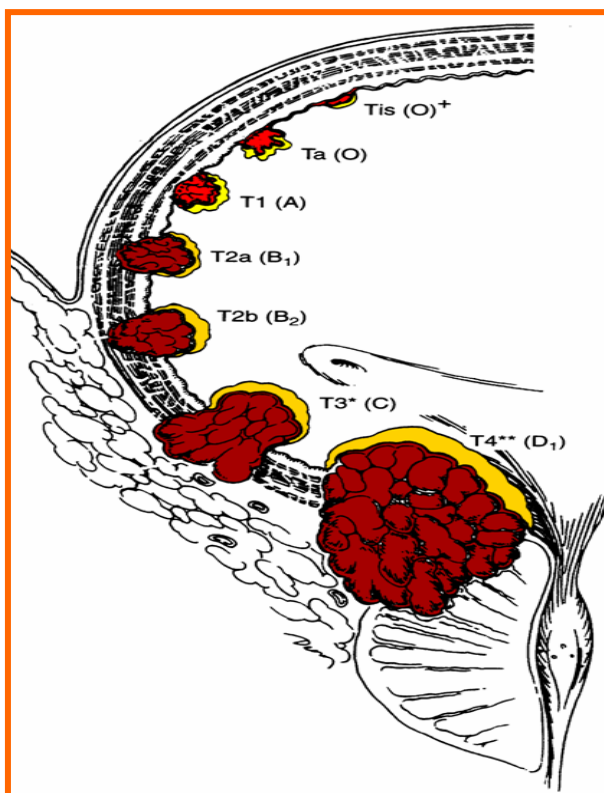
T3a: mikroszkóposan

T3b: makroszkóposan (extravesicalis tömeg)

T4: tumor a következőkből legalább egyet infiltrál: prostata, vagina, uterus, medence fal, hasfal

T4a: tumor infiltrálja a prostatát, vaginát vagy uterust

T4b: tumor infiltrálja a medencefalat, vagy a hasfalat (1. ábra).



1. ábra. A hólyagdaganat T stádiuma

N: nyirokcsomók

Nx: regionális nyirokcsomók értékelhetetlenek

N0: nincs regionális nyirokcsomó metasztázis

N1: egyetlen regionális nyirokcsomóáttét, a legnagyobb átmérője nem nagyobb, mint 2 cm

N2: egyetlen regionális nyirokcsomóáttét, mely nagyobb, mint 2 cm, de nem nagyobb, mint 5, vagy több nyirokcsomó érintett, melyből egyik sem nagyobb 5 cm-nél

N3: nyirokcsomó, mely nagyobb, mint 5 cm

M: metasztázis

Mx: nem értékelhető

M0: nincs távoli metasztázis

M1: van távoli metasztázis

2.2.4.3. Grading: urothelialis papilloma /1973/

G: hisztopatológiai grading

Gx: differenciálódást nem lehet megállapítani

G1: jól differenciált

G2: mérsékelten differenciált

G3: rosszul differenciált

2.2.4.4. WHO 2004: urothelialis papilloma

urothelialis papilloma

papillaris urothelialis neoplasma, alacsony malignitási potenciállal: PUNLMP

low-grade urothelialis carcinoma

high-grade urothelialis carcinoma

A 2004-es WHO grading a húgyhólyagrakokat két csoportra bontja (urotheliális papilloma és papillaris urothelialis neoplasma), melyekben csak alacsony és magas differenciáltságú alcsoportokat különít el.

Grading beosztásnál a nemzetközi ajánlások alapján a G1-G3-ig terjedő beosztást használják. E szerint mind a kétféle rendszerben osztályozandóak a daganatok.

2.2.4.5. Biológiai viselkedés

Az urothelsejtes karcinóma klinikai viselkedése alapján két csoportra osztható: izominvazív és a nem-izominvazív (felületes). A két csoport rendkívül eltérő 5 éves túléléssel rendelkezik (95 % viszonyítva az 50 %-hoz), mely egyben tükrözi a biológiai viselkedésüket is (24). Míg a legtöbb urothelsejtes karcinóma besorolható az előbb említett csoportok egyikébe, néhány közülük mindkét kategória jellemzőit magán hordja (pl.: rosszul differenciált nem-izominvazív tumorok /pT1 G3/), igazolva azt, hogy ezeket a tumorokat a legnehezebb klinikailag megfelelően kezelni (25). Az alacsony differenciáltságú (G3) Ta, T1 és pTis stádiumokat a nagy rizikójú nem-izominvazív hólyagrakok közé sorolták, mivel ezekben a stádiumokban nagy százalékban recidíválnak, illetve progrediálnak a tumorok (26).

A klinikai érdeklődés középpontjában áll, hogy milyen módon lehet előre megmondani, melyik tumor fog recidiválni, illetve progrediálni, ez ugyanis nagyon hasznos lenne a terápia és az után követés megtervezésekor (27). Az egyes faktorok prognosztikus jelentősége nem mindig egyezik meg a különböző közleményekben. Ezen eltérések okai a minták különbözősége, az eltérő elnevezés, a multivariábilis analízis, illetve a faktorok közötti kölcsönhatás. Az eltérés másik fontos forrása, hogy nem mindegy, hogy az első recidíva, vagy a progresszió alapján állapítják meg a következtetéseket. A betegek rizikócsoportokba osztása problematikus. Néhány esetben ugyanazt a rizikó klasszifikációt alkalmazták a recidívára és a progresszióra, annak ellenére, hogy a prognosztikus faktorok relatív jelentősége e két kimenetel szempontjából eltérő (28).

Ideális lenne kiszámolni a rövid és hosszú távú esélyét a recidívának és a progresszióknak az elérhető klinikai és patológiai adatok alapján. Több vizsgálatban használtak molekuláris markereket a prognózis meghatározására, de ezek közül a markerek közül jelenleg egyiket sem használják a mindennapos klinikai gyakorlatban (29). Egyelőre nem lehetséges pontosan megállapítani a biológiai viselkedését e tumoroknak. Ily módon a hólyagrákkutatás elsősorban a daganatok minél korábbi stádiumban való diagnosztizálására és a hólyagtumor-progresszió lépéseinek elkülönítésére irányult (30).

2.2.5. Kromoszóma eltérések, mikroszatellita

A molekuláris biológiában és patológiában történő fejlődés nagymértékben befolyásolja a daganatkutatást és így a hólyagrákokkal kapcsolatos vizsgálatok eredményeit is. A molekuláris biológiai kutatások nagymértékben felgyorsultak az elmúlt évtizedben és a nagy mintaszámú vizsgálatok hatalmas adattömeget szolgáltatnak. A biotechnológiában az egyik leggyakrabban használt adatbázis a National Library of Medicine, ami a National Institutes of Health campus mellett székelő USA központi könyvtárának adatbázisa. A humán genom ismert és töredék génszekvenciái, fehérje szekvenciák elérhetőek az alábbi internet kapcsolaton: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/>. A korai citogenetikai vizsgálatok felfedtek számos nagy, kromoszómális szintű, tumorspecifikus aberrációt. A számfeletti kromoszómák, kromoszóma karok elvesztése, transzlokációja, stb. mind ebbe a kategóriába tartozik. Az összehasonlító genomikai hibridizációs vizsgálatok (CGH) jellegzetesen hiányzó (deléción), illetve felerősített területeket (amplifikáció) is kimutattak. A leegyszerűsített és némely esetben igazolt karcinogenezis elméletek a hiányzó kromoszóma, illetve DNS

szakaszokon tumorszupresszor géneket feltételeznek, míg a genomikus DNS, illetve RNS expressziós amplifikáció esetében onkogének jelenlétét valószínűsítik.

A közelmúltban nagy jelentőséget kapott a genetikai mikroszatellita analízis. A gének közt, illetve az intronok közt és a promóter régióban is repetitív, 2-5 nukleotidból felépülő, konzervatív, Mendeli szabályok szerint öröklődő DNS szekvenciák vannak. A mikroszatellita régiók nagyon megőrzöttek, az egyed minden sejtjében azonosak és mintázatuk csak kóros körülmények között változhat meg a szövetekben. Ezért használják őket egyének azonosítására is. Ezen DNS szekvenciák rövidülése, eltűnése jelzi a szomszédos génterületek sérülését. A gyakorlatban nagyon jól hasznosíthatóan jelzik adott terület genetikai sérülését és ehhez nincs szükség a pontos károsodás megállapítására. Természetesen pont mutációk ezzel az eljárással nem mutathatóak ki. Több biotechnológiai cég foglalkozik a markerek feltérképezésével és e területek PCR-al történő amplifikálásához szükséges primér párok forgalmazásával. A daganatkutatásban a DNS chip-ekkel kapott génexpresszió csökkenés validálására kiválóan alkalmas a módszer, mivel általa az allélvesztés vagy kisebb deléciók kimutathatóak. A genomikai instabilitás, a heterozigótaság elvesztése (LOH) tehát jól vizsgálható a mikroszatellita marker analízissel. Ennek kimutatásához a tumor mintából vagy a vizsgálni kívánt szövetből nagy tisztaságú genomikus DNS-re van szükség. A kontrollt általában a tumormentes szövet DNS-e, illetve a perifériás vérből izolált fehérvérsejtek DNS-e adja.

A daganatos betegségek gyakorisága világszerte egyre növekszik. Sajnálatos módon a testfelszínen látható daganatokon és a jól szűrhető méhnyak és emlőrákon kívül a daganatok korai felismerése ma is probléma. Nincs olyan diagnosztikus próba, mellyel a tumoros elváltozás korán, gyorsan, kevés költséggel és a beteg számára kis terheléssel kimutatható lenne, és ez a húgyúti tumorok esetében is igaz.

A molekuláris biológia új lehetőségeket tárt fel a daganatok diagnózisára. Ismertté vált, hogy a rosszindulatú daganatok egyik közös jellemzője a genetikai instabilitás, mely a genom teljes egészén érvényesül. Egyes szervek, szövetek tumorai ma már jellemezhetőek génállományuk károsodásának lokalizációjával és a génhibák megjelenésének sorrendjével. A daganatos génkárosodásoknak számos formája ismert, az egy nukleotidot érintő pontmutációtól a kromoszómák számbeli vagy szerkezeti zavaráig. Az egyik igen gyakori, és rendszerint szuppresszor géneket érintő génhiba a deléció, melynek finomabb vizsgálatára kiválóan alkalmasnak bizonyult a fentiekben vázolt mikroszatellita analízis.

Az irodalmi adatok alapján, a húgyhólyagrák esetén a leggyakoribb károsodás a 9-es kromoszóma rövid és/vagy hosszú karján történő allélvesztés. Ezek közül kitüntetett lókuszkok

a 9p21, 9q32-34, melyek károsodása már korai rákokban is megfigyelhető. Mellettük jelentőséget tulajdonítanak a 4p (FGFR3), 8p, 13q és 17p területén kimutatható allélvesztéseknek (31).

Hoque és munkatársai vizsgálatai szerint a húgyhólyagtumorokban jelenlevő genetikai változások 95 %-ban kimutathatók a vizeletüledékből, míg a rutin citológia ezen esetekben csak a daganatok 50 %-át ismeri fel (32). Kovács Gyula adatai szerint a D9S1748 és D9S1870 markerek területén megjelenő allélvesztés vizsgálatával az átmenetisejtes hólyagrákok 98 %-a felfedezhető (33).

Ez az eredmény arra utal, hogy a vizsgálat viszonylag csekély költséggel (amerikai becslések alapján a citológia költségének 1/3-áért) elvégezhető és pontosabb eredményt ad. A hólyagrákokra igaz az a fent említett megfigyelés, hogy a sejtmentes vizeletben nagyon gyakran megtalálható a kóros DNS.

A közelmúltban jó néhány kutatócsoport tűzte ki célul, hogy azonosítsa azokat a biológiai markereket, melyek segíthetnek a recidívák előrejelzésében. A malignitás biológiai markerei közül a p53-t tanulmányozták a legtöbben (34).

2.2.6. Húgyhólyagrák prognosztikai markerei

A hólyagrák prognosztikai tényezőinek, a betegség lefolyását befolyásoló szöveti és molekuláris elváltozásainak kutatása az elmúlt két évtizedben felgyorsult (35,36,37). A kivett sebészi biopszia vagy eltávolított szerv patológiai feldolgozásánál a morfológiai kép, a szövetek festődése számos esetben csak korlátozottan tükrözi a molekuláris történések igen komplex folyamatát.

A kidolgozott új molekuláris módszerek, mint a FISH (fluorescence in situ hybridization), heterozigóta analízis, és összehasonlító gén hibridizáció lehetővé tette több tumorszupresszor gén eltűnésének kimutatását.

2.2.6.1. Protoonkogének

EGFR: Epidermal growth Factor Receptor: epidermális növekedési hormon receptor. Több vizsgálat is összefüggést mutatott az EGFR overexpressziója és hólyagtumor magas grade ill. magas stage között (38,39,40). Mellon és munkatársai vizsgálatai alapján, 212 újonnan diagnosztizált húgyhólyagrák esetében bizonyult az EGFR független prognosztikai

markernek (41). Hasonló következtetésre jutottak az MD Anderson Cancer Center kutatói, az EGFR és a HER-2 overexpressziója vizsgálataik szerint a rossz prognózis jele (42).

HER-2: A HER-2 gén termékét megtalálták a húgyhólyagkarcinómában is (43). A HER-2 fehérje overexpressziója az első vizsgálatok alapján összefüggést mutatott emelkedett tumor graddal, túléléssel és metasztatizáló képességgel (44).

A HER-2 vizsgálata, az utóbbi években a lehetséges célzott molekuláris onkoterápia miatt több daganat esetében napirenden van. Hólyagrakkal kapcsolatban számos igen eltérő eredményt publikáltak. A legújabb, 2008 áprilisában ismertetett kutatás alapján nincs az emlőrákhoz hasonlóan szoros kapcsolat a HER-2 és az izominvazív, differenciálatlan hólyagdaganat között (45).

bcl-2: Kimutatták, hogy az apoptózist befolyásoló bcl-2 overexpressziója szignifikánsan asszociált a hólyagtumor progressziójával a radioterápia folyamán (46). További vizsgálatok eredményei alapján ismert, hogy bcl-2, p53 és mdm-2 együttes megjelenése rontja a beteg gyógyulási esélyét (47).

mdm-2: Az mdm-2 gén amplifikációja, ritkábban, mint az előbb felsoroltak, de kimutatható hólyagtumorban (48).

2.2.6.2. Tumor szupresszor gének

p53: A p53 központi szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, valamint az apoptózis folyamatában. Ezen fehérje elváltozásai a legáltalánosabb genetikai elváltozások a humán tumorokban (49). A mutáns fehérjének megnyúlik a féléletideje, valamint akkumulálódik a sejtmagban. A különböző tanulmányok 1-20 % közé teszik a p53 negatív hólyagtumorokat (50). A legtöbb vizsgálat a p53 génnel történt a hólyagdaganat molekuláris prognosztikai faktorainak elemzése során és mutációja kivétel nélkül a rosszabb prognózis felé mozdítja el az eredményeket (51).

Rb: Cordon-Cardo és munkatársai az átlagos túlélést magasabbnak találták a stage-től függetlenül pRb-normális tumorú betegekben, egy 38 betegből álló csoportban, mint csökkent pRb tumorok esetében (34). Jelenleg angol kutatók a Rb gén inaktiválásával kísérleteznek, mely sejtvonalakon a hólyagrak gyógyulását okozta (52).

2.2.6.3. Sejtciklus szabályozók

p21: Stein és munkatársai tanulmánya szerint, melyben 242 beteg vett részt, a cystectomizált betegeken a p21 és p53 független prediktora volt a túlélésnek, illetve a tumor kiújulásának (53). 96 nem izominazív urothelialis karcinómában szenvedő személy analízise folytán kimutatták, hogy a p21 expressziójának hiánya összefüggésben állt a csökkent átlagos túléléssel, de nem változott a betegségmentes túlélés (54).

Ki-67: Több tanulmány is független prognosztikai markernek tekinti a Ki-67-et húgyhólyagrákban. Egy, 159 Ta vagy T1 stádiumú hólyagrákos beteget vizsgáló munkacsoport szerint, a magas Ki-67 index ($\geq 18\%$) szignifikánsan összefüggött a progresszió- és kiújulás-mentes túléléssel és független prognosztikai faktorok voltak egy multivariábilis analízisben (55).

2.2.6.4. Extracelluláris Mátrix, adhéziós molekulák, sejtfelszíni markerek és kapcsolódó fehérjék

E-Cadherin: Az E-cadherin a cadherinek családjába tartozó Ca^{2+} -dependens sejtadhéziós molekula. Az epitheliális sejtek felszínén expresszálódva, homológ, zipp-zár szerűen kapcsolódva alkotja a zonula adherensnek nevezett sejtkepcsoló struktúrát. A molekula intracellulárisan a sejtek aktin filamentumaihoz rögzített egy több komponensből álló fehérjekomplexum révén. Csökkent E-Cadherin expresszió általánosan korrelál az izominvázóval és távoli metasztázisok megjelenésével, úgymint alacsonyabb differenciáltságú és magasabb stádiumú tumor megjelenésével (56,57). Az E-cadherin expressziót összefüggésbe hozták a túléléssel és a kiújulás nélküli túléléssel is (56,59). A különböző munkacsoportok más-más eredményre jutottak az E-Cadherin hólyagtumor carcinogenezisében elfoglalt szerepe kapcsán. (60-63)

CD44: Egy széleskörűen expresszált sejtfelszíni adhéziós molekula, mely részt vesz mind a sejt-sejt, mind a sejt-mátrix interakciókban. A különböző exonok eltérő mértékben fejeződnek ki a különböző szövetekben. A standard CD44 közeli összefüggésbe hozható a tumorprogresszióval (64). Golshani és munkatársai a CD44 szerepét bizonyították a sejtenyészeten, ahol a hólyagrák növekedését, invázióját és angiogenezisét vizsgálták (65).

2.2.7. Sejtkapcsoló struktúrák

A hám alapvető funkciója a különböző kompartmentek elválasztása, valamint az anyagcsere-folyamatok szabályozása. A Tight Junction (TJ) szabályozza mind az ionok és molekulák, mind a fehérjék és lipidek transzportját a plazmamembrán apikális és bazolaterális része között. A TJ-ban mind kortikális, mind transzmembrán proteinek is megtalálhatóak, előzők között PDZ domének, tumor szupresszorok, transzkripciós faktorok és a vezikuláris transzportban résztvevők találhatóak. A transzmembrán proteinek közül fontosak az occludinok és claudinok, melyek képesek polimerizációra, valamint a szomszédos sejten lévő komplementer fehérjével is kötődni. Ezen felismerések hozzájárultak ahhoz a már korábbi elképzeléshez, hogy a TJ-ok dinamikus struktúrák, melyek a különböző szövetek morfológiai és permeabilitási sajátosságait szabályozzák.

A TJ-ök egy sor fúziós pontnak tűnnek két sejt sejtmembránjai között ultra-vékony metszetekben, ahol a sejtközötti tér teljességgel eltűnt. Fagyasztott metszeteken a protoplazmás felszínen egy folyamatos, anasztomizáló hálózat képét mutatja, az exoplazmatikus oldalon komplementis behúzódnásokkal (66). Az elmúlt években mind a kortikális, mind a transzmembrán proteinek elhelyezkedéséről sok ismeretet szereztünk. Több, mint 16 fehérjét identifikáltak. Néhány az integráns fehérjéket köti össze az aktinnal, míg mások a transzmembrán és junkciós proteineket kapcsolja össze, míg mások a vezikuláris transzportban, vagy a jelátvitelben vesznek részt. Egyes fehérjéknek akár a génexpresszióban, a magi transzportban, illetve a transzkripciós faktorok megkötésében is lehet szerepe.

Három integráns fehérjét találtak: a claudint, occludint és a JAM-et (junkcionális addhéziós molekulát). Az első kettő a TJ gerincét adja, míg a JAM a limfociták, neutrofilek és dentritikus sejtek kapcsolódását teszi lehetővé.

2.2.7.1. A TJ transzmembrán fehérjei

A TJ transzmembrán fehérjeire jellemző, hogy két extracelluláris doménjük és négy transzmembrán szakaszuk van, valamint mind az amino, mind a karboxilvég a citoplazmában található.

2.2.7.1.1. Occludin

Az elnevezés a latin *occludere* szóból származik, melynek jelentése elzár, eltömít (67). Két bizonyíték is rendelkezésre áll arról, hogy az occludinok a TJ alkotóelemei: 1: amikor az occludinokat egy TJ mentes sejtbe helyezük, akkor TJ-szerű filamentumokat alkotnak (68). 2: immunfestéssel kimutatható az occludinok jelenléte a TJ-ben (69).

Hámsejtekben a mutáns occludinexpresszió nagyban befolyásolja a TJ funkcióit (70,71). Hámsejtekben erősen foszforilált occludin molekulák a TJ-ben találhatóak, míg kevésbé vagy nem foszforiláltak a citoplazmában helyezkednek el (72,73,74). DeMaio és munkatársai megfigyelése, hogy endothel sejtekben a stressz csökkenti az occludin tartalmat, és fokozza annak tirozin foszforilálását (75). Elképzelhető, hogy a foszforiláció különböző biológiai rendszerekben eltérő funkcióval rendelkezik. A karboxilvég utolsó 150 aminosav molekulája közvetlen az F-aktinhoz kötődik (76), valamint kötődik a MAGUK (membrán asszociált guanilát kináz homológ) fehérjékhez: a ZO-1-hez (zonula occludens) (77), ZO-2-höz (76,78) és a ZO-3-hoz (79). Ez az utolsó 150 aminosav igen konzervatív, valamint tipikus α -hélix szerkezettel rendelkezik (80). Az occludin e része kapcsolatba lép reguláló fehérjékkel, nem receptor tirozin-kinázokkal és a connexinnel, mely a gap-junction része (81).

2.2.7.1.2. Claudin

Az elnevezés a *claudere* szóból származik, melynek jelentése zárni. A fehérjecsaldának ma már több mint 24 tagja van (82). Ezekre jellemző, hogy 20-27 kDa méretű fehérjék, 4 transzmembrán doménnel, és két extracelluláris hurokkal, melyből az első szignifikánsan nagyobb, valamint egy intracelluláris karboxil véggel rendelkeznek. A claudinok utolsó aminosavai is igen konzervatív szekvenciák a családon belül és tartalmazzák a PDZ-kötő motívumot. Ezeket keresztül kötődnek a ZO-1-hez, a ZO-2-höz és a ZO-3-hoz (78), a PATJ-hoz és MUPP1-hez. (83) Ha különböző claudinokat ültetünk L fibroblasztokba, akkor fagyasztott metszeten előtűnnek az intramembrán filamentumok. Ez arra enged következtetni, hogy a claudinok képezik a TJ gerincét (86). Heterogén claudinok képesek ugyanazon TJ szálon belül kapcsolódni. A sejt közötti állományban lévő hurkok alkalmasak arra, hogy a szomszédos sejt claudinjaival kapcsolatot létesítsenek, mely alól csak néhány kombináció kivétel.

4. Táblázat: A különböző claudinok néhány jellemzője

Claudin	Jellemző
1	Jelen van a magas rezisztenciájú hámszövetben (gyűjtő szegmentum) és hiányzik az alacsony rezisztenciájú hámból (proximális tubulus) (85). Döntő jelentőségű az emlő epidermiális barrierében (86). A legtöbb humán mellrák vonalból hiányzik (87).
2	Megtalálható a magas átteresztőképességű hámban (proximális tubulus) és hiányzik az alacsony átteresztőképességű hámból (gyűjtőcsatorna) (85). Megtalálható a plexus choroideus epitheliumában (88).
3	Jelen van a nefron szorosabb szegmentumaiban (89), expressziója emelkedett a ventrális prosztatában, valamint a prostata adenokarcinómájában (90), képes CPE-t (<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin) kötni (91).
4	Expressziója csökkenti a paracelluláris vezetőképességet a nátrium átteresztés szelektív csökkentésével (77). Jelen van a nefron szorosabb részeiben (89), overexpresszált a hasnyálmirigy és gasztrointesztinális tumoroknál. A szelektív CPE kötése adta alternatív nevét: CPE-R (91).
5	Alternatív neve a TMVCF, mert sokszor deletált a Velo cardio facial szindrómában. Az endothelsejtekben alkotóeleme TJ-nek (92). Átmenetileg expresszálódik a retina pigmenthámjának fejlődésekor (93).
6	Jelen van az embrionális epitheliumban (94). Transzgenetikus egerekben a túlexpressziója defektes epidermális átteresztőképességet eredményez (95).
7	Alulregulált a fej és nyak squamozus sejtes karcinómáiban (96).
8	Jelen van a nefron szorosabb szegmentumaiban (89).
11	OSP néven is ismert, jelen van az oligodendrocitákban és a Sertoli sejtekben (92).
14	A Corti-szerv érzékhámsejtjeiben található, mutációja autoszomális recesszív süketséget okoz (97).
15	Endothelsejtekben található (89).
16	Paracellin-1 néven is ismert. Kritikus a magnézium és kalcium reszorpció szempontjából a Henle-kacs vastag szegmentumában (98,99).
18	A T/EBP/NKX2.1 homeodomén transzkripció faktor downstream célgénje. A tüdőben és a gyomorban expresszálódik (100).

Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. (2003) Tight junction proteins. Prog Biophys Mol Biol, 81(1):1-44. (101)

A claudinok különböző szövetekben eltérő arányban oszlanak meg, alátámasztva ezzel azt a gondolatot, hogy ők a felelősek a különböző elektromos rezisztenciáért és a paracelluláris ionos változékonyságért az endothel- és epithelsejtekben (2.táblázat). A fejlődés során a különböző claudinok expressziója finoman hangolt.

2.2.7.1.2.1. A claudinok szerepe a tumorigenezisben

A tumor típusától függően a claudinok expressziója lehet emelkedett vagy csökkent a különböző kiindulású malignomákban.

A TJ struktúrája gyakran módosul humán tumorokban, ahol elvesztése párosulhat progresszióval, főleg a sejt-sejt közötti kapcsolat elvesztése esetén, valamint a sejt-differenciációban. Több tanulmány is kimutatta, hogy a claudinok downreguláltak különböző tumortípusban (102,103,104).

A TJ asszociált fehérjék, főként claudinok csökkent termelődése a tumorokban összecseng azzal a hipotézissel, miszerint a tumorigenezis összefügg a TJ-ök átstrukturálódásával, fellazulásával, és a sejt-sejt adhézió elvesztésével. E folyamat szerepet játszhat a differenciáció elvesztésében, valamint a kontrollálatlan proliferációban.

Ezzel ellentétben több tanulmány is kimutatta a claudinok szintjének emelkedését a tumorigenezisben. A claudin overexpresszió a tumorigenezis korai történéseinek tűnik, megtalálható például a nyelőcső adenokarcinóma prekursor lézióiban a claudin-3, -4 és -7 fokozott kifejeződése (105).

2.2.7.1.2.2. Claudinok a különböző daganatokban

A claudin-1 expresszió csökkent mellrákban, ahol felvetődött tumorszupresszor szerepe is (106,107). Szintén tumorszupresszor hatását feltételezik vastagbél karcinómában, ahol a kiújulással és a túlélés csökkenésével is összefüggést mutatott a csökkent expresszió (108). Oliveira és munkatársai kutatásuk során colorectalis karcinómában (109,110), pajzsmirigy rákban – az invazív formát kivéve – (111) valamint hasnyálmirigy-karcinómában

emelkedett szintjét mutatták ki (112). Csökkent claudin-1 expressziót találtak még a glioblastoma és a Barrett oesophagus esetében is. A claudin-6 és -7 csökkent szintet mutat az invazív mellrákban, ahol korrelál a hisztológia grade-del és a metasztatizáció megjelenésével, valamint a squamózus fej-nyak tumorokban (109). A glioblastoma multiformében a claudin-3 szintje csökkent a kis erekben. A claudin-3 és -4 (Clostridium perfringens enterotoxin receptor) szintje emelkedett mell-, petefészek-, hasnyálmirigy- gyomor-, és dűlmirigy tumorokban (109,113-116). Michl és munkatársai demonstrációja szerint a claudin-4 overexpressziója a hasnyálmirigy SUI-2 sejtjeiben csökkent invazivitást és csökkent metasztatizáló képességet eredményez (117). Sata és munkatársai kimutatták, hogy claudin-4 mRNS, illetve a fehérje is emelkedett az invazív kolloidális és tubuláris hasnyálmirigy karcinómában az adenomához vagy a CIS-hoz képest (91). A claudin-7 szinte kimutathatatlan volt normál sejteken, viszont mind primer, mind metasztatikus mellrákban (118) és a hepatocelluláris karcinogenezisben is emelkedett szintet találtak (119). A normál cervikális hámokban sem a claudin-1, sem a claudin-7 szintje nem detektálható, azonban a low-grade metaplaziától az invazív karcinómáig szintjük a membránban folyamatosan nő (120).

A kontakt gátlás elvesztése, - amely a szignál-transzdukcióban fontos szerepet játszik mind a korai (sejtpolaritás elvesztése, növekedési kontroll csökkenése), mind a késői (invázió és metasztatizáció) tumorprogresszióban, - fontos szerepet tölt be. A TJ centrális szerepet játszik a sejtközötti jelátvitelben, a proliferáció regulálásában, a differenciációban és a polarizációban (121).

2.2.7.1.3. Tetraspanin

E proteinek első extracelluláris hurka sokkal kisebb, mint a második, valamint karakterisztikusan jelen van a hosszú hurokban a CCG valamint a PXXCC motívum és a kettő vagy négy cisztein maradvány.

2.2.8. Húgyhólyagrákok diagnosztikája

2.2.8.1. Tünettan

A hólyagdaganatot felvető leggyakoribb tünet a mikroszkópos vagy makroszkópos vérrel kevert vizelet, mely az esetek 90 %-ában észlelhető. Ezt néma vérrel kevert vizeletnek is szokták nevezni, mivel egyéb panasz általában nem társul hozzá, és gyakran magától megszűnik. A vérrel kevert vizelet

spontán megszűnése sokszor az orvost, illetve magát a beteget is meglepi, és egyben egy diagnosztikus csapdát képez, azt a látszatot keltve, hogy a beteg meggyógyult. Egyéb okok miatt is kialakulhat vérvizelés, többek között húgyúti gyulladás, kőbetegség, alvadás gátlók túladagolása, vesebetegség miatt és ezek feltételezése tévútra viheti a diagnózist. Ezért minden vérvizelést urológiai rosszindulatú daganat tüneteként kell kezelni addig, míg részletes vizsgálatok során a malignitás nem zárható ki. Ritkábban jelentkező tünetek a nehézvizelés, az anuria, melyet az ureterek elzáródása okozhat, a gyakori vizelés, melyet a csökkent hólyagkapacitás és irritáció, az aszimmetrikus alsó végtag ödéma a nyirokutak érintettsége miatt, illetve a terápia rezisztens húgyúti infekció. Előfordul, hogy általános daganatos jelek, fogyás, anémia miatt kezdődnek a vizsgálatok. Napjainkban szerencsére már ritkán kerül felismerésre olyan késői stádiumban, hogy az áttétek okozta tünetek uralják a klinikai képet. Ilyen lehet a nehézlégzés, a csont- és deréktáji fájdalom (3,12,14).

2.2.8.2. Diagnosztikus módszerek

2.2.8.2.1. Alapvizsgálatok

A részletes anamnézis-felvétel után a húgyhólyagrak diagnosztikájának első lépése a vizeletvizsgálat, mellyel kimutatható a vizelet vörösvértesttartalma, azaz jelen van-e mikrohaematuria, esetleg fenn áll-e szignifikáns bakteruria, van-e húgyúti gyulladás.

Amennyiben a húgyhólyagdaganat lehetősége felmerül, telt hólyag mellett végzett kismedence és hasi ultrahangos vizsgálat a következő lépés, mely során látható lehet az intravesicalis terime, esetleges következményes veseüregrendszeri tágulat. Az ultrahangos vizsgálat érzékenysége nagyban függ a vizsgáló tapasztalatától és a készülék minőségétől. Kisméretű vagy hátsó falon elhelyezkedő daganat felismerése nem könnyű feladat. További érzékenyebb radiológiai vizsgálat, CT, PET-CT, MRI nem indokolt, mert nem tudta kiváltani az invazív vizsgálatnak számító, de a daganat detektálása szempontjából elkerülhetetlen cystoscopiát. Jelenleg ugyanez igaz a virtuális cystoscopiára, amely egy professzionális szoftverrel készített, háromdimenziós, rekonstrukciós spirál-CT vizsgálat (122).

A diagnosztikus skálába épül be a vizelet citológiai vizsgálata. Ennek, a nagyban vizsgálófüggő technikának előnye noninvazivitása, de nagy hátránya a bizonytalan szenzitivitása, mely főként alacsony fokozatú (jól differenciált) daganatoknál figyelhető meg.

Végleges, biztos diagnózis csak a daganat transurethralis eltávolítása, illetve méretétől függően biopszia után végzett hisztológiai vizsgálat során adható. Az újonnan diagnosztizált

hólyagkarcinómák az esetek 70-80 %-ban nem-izominvazívák és teljes egészében reszekálhatóak transurethralis műtét során. A daganatok 30-85 %-a mégis recidiválni, míg a tumorok 10-20 %-a progrediálni fog, a stádiumát vagy a differenciáltságát illetően, ezért a beteg követése nagyon lényeges kérdés (4).

A rendszeres, három havonkénti kontroll vizsgálatoknak is része a hólyagtükrözés (17,18,124).

A cystosopia a beteg számára igen kellemetlen és gyakran fájdalmas eszközös beavatkozás. A vizsgálatot merev vagy flexibilis műszerrel lehet végezni, a leggyakrabban helyi érzéstelenítésben, ritkán van szükség regionális vagy általános anesztéziára. A vizsgálat invazivitása miatt lenne sikeres a hólyagtükrözés kiváltása azonos szenzitivitású vagy érzékenyebb módszerrel.

A betegek kisebb részében a tumor izominvazívá progrediál, így lényeges a hosszú távú követés, melynek két alapvető módszere az invazív cystosopia és a noninvazív, vizeletből történő vizsgálat, a vizeletcitológia. A citológia hátránya, hogy nem kellőképpen érzékeny a jól differenciált malignus tumorok diagnosztikájában (125,126) és eredménye nagyban függ a citopatológus jártasságától (84,127,128).

Régi törekvés, hogy megfelelő érzékeny tumor markerrel vagy a vizeletcitológia szenzitivitásának, specificitásának növelésével olyan jól reprodukálható módszert dolgozzanak ki, mely a cystoscopiát kiválthatja, ugyanis a húgyúti daganatok kimutatására alkalmazott vizeletcitológia - különösen a korai stádiumú léziók esetében - sokszor nem bizonyul elegendő érzékenységűnek, emellett nagyfokú speciális képzettséget igényel a vizsgáló részéről. Ezért vált indokolttá, hogy a morfológiai kritériumok mellett a sejtek örökítő-anyagában fellépő elváltozások kimutatása is az urológiai tumor-diagnosztika részévé váljon (129,130,131).

Az urothelből kiinduló rosszindulatú daganatokra jellemző genetikai elváltozások közül a leggyakoribb a 9-es kromoszóma részleges vagy teljes elvesztése, amely már a tumor-képződés korai stádiumában is megfigyelhető. Külön kiemelendő a 9p21-es lókuszon található p16 (CDKN2A) tumorszupresszor gén, mely gyakran már korai stádiumban inaktiválódik a húgyúti tumorokban. A daganatprogresszió további szakaszaiban fokozódó kromoszómális instabilitás és aneuploidia lép fel a tumor-sejtekben, mely leginkább az 1, 3, 7, 9, 11, 17-as kromoszómákat érinti (132).

A kromoszómák jellemző számbeli és/vagy struktúrális rendellenességeiknek magukban a sejtekben történő kimutatására legalkalmasabb módszer az interfázisos fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH), ami egy speciális fluoreszcens mikroszkópos

vizsgálat. Napjainkban a vizsgálat még nem tartozik a rutin alapvizsgálatok közé, de didaktikus szempontból ebben a fejezetben ismertetjük. Az eljárás során fluoreszcensen leölt nukleotid szakaszokat (próbákat) juttatnak be a sejtmagba, ahol az adott próba a celluláris DNS vele komplementer régiójához kötődik. A kromoszómák központi részéhez kötődő peri-centromér próbák alkalmasak az adott kromoszóma sejtenkénti számának detektálására, míg a lókuszt-specifikus próbák egy adott régió meglétéről, illetve hiányáról tájékoztatnak.

Mivel a biztos diagnózis érdekében párhuzamosan több kromoszóma eltéréseit kell vizsgálni, ezért a legjobb, ha egyetlen hibridizálás során többfajta próbát lehet bejuttatni a sejtekbe, ami viszont e próbák reakciós feltételeinek nagyfokú összehangolását igényli. Ennek beállítása a rutin laboratóriumok lehetőségeit általában meghaladja. Ezért fejlesztette ki a Vysis cég az UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit-et, amely jelenleg az egyetlen, diagnosztikus vizsgálatként elfogadott FISH módszer az urotheliális rákok detektálására. Ebben a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák peri-centromérikus régióit, továbbá a 9p21-es lókuszt detektáló próbák keveréke található meg (133).

A hólyagrák kimutatására teljesen megbízható, a rutin diagnosztikában elterjedt noninvaszív vizsgálat jelenleg még nincs, azonban az FDA által két engedélyezett módszer az Urovysion és a NMP22 (nuklear matrix protein) kimutatás már kereskedelmi forgalomban van.

A hólyagrák diagnosztika fejlesztésének másik irányvonala a cystoscopia eredményességének növelése. Endoszkóposan nehezen, vagy egyáltalán nem felismerhető elváltozás a carcinoma in situ (pTis), mely amennyiben látható, leginkább piros, bársonyos folt formájában észlelhető. Az in situ carcinoma endoszkópos diagnosztikájában alkalmazható egy speciális eljárás, a fotodinámiás vizsgálat. Ennek lényege, hogy az eljárás előtt két órával 5-aminolevulinsavat (ALA) fecskendeznek a hólyagba, mely a tumorsejtek felszínéhez kötődik. Ezután speciális fényforrással (D-light), illetve szűrővel rendelkező eszközzel hatolnak a hólyagba. Az in situ carcinomás területek - melyek normál tükrözés során a környezetüktől nem különíthetők el - ezúttal vörös színűek lesznek, szemben a környező ép nyálkahártyával, amely kékeslila. A vizsgálat kitűnően alkalmazható a daganat diagnosztikájában és a transurethralis műtét során, a reszekció kiterjesztésének meghatározásához. Hazánkban Kovács és munkatársai számoltak be a módszer első alkalmazásáról és specificitását 100 %-osnak, szenzitivitását 65,2 %-osnak találták (134).

Annak ellenére, hogy az urológusok többsége ezt a beavatkozást tartja a legjobb módszernek a hólyagrák diagnózisának felállítására, illetve követésre a sebészeti kezelést és a terápiát követően, elterjedésének gátat szab a magas költsége (135). Napjainkban a módszer

támogatóinak közleményei alapján a fotodinámiás diagnosztika az évek alatt megtérül, mert a recidívák száma csökkenthető, így a műtétek, a kórházi tartózkodás és a gyógyszerelés költségei a hagyományos fehér fényel való diagnosztikai és terápiás csoporthoz képest lényegesen alacsonyabbak (136,137).

2.2.8.2.2. Tumor markerek

Tumor markereknek tekintünk minden olyan test azonos anyagot, amelynek megjelenése vagy koncentrációjának jellemző változása jelzi a tumor jelenlétét, annak fejlődését, változását. Ideális az a tumor marker, amely kizárólag egy szerv daganatára specifikus, a mintavétel a beteget nem veszélyezteti, olcsó, gyors, reprodukálható. Fontos szempont, hogy érzékenysége révén korán jelezze a rosszindulatú folyamatot és ne legyen hamis pozitív eredmény. Lehetőleg értéke a tumor stádiumával, nagyságával, a betegség progressziójával vagy regressziójával korreláljon. Jelenleg nincs olyan tumormarker, amely e követelményeknek mindenben megfelelni képes.

Az urológiai daganatok közül csak a prosztaták markere, a prosztata specifikus antigén, valamint a heredaganatos betegek AFP, β -HCG, NSE koncentráció vizsgálata alkalmazott rutinszerűen a klinikai gyakorlatban.

Az elmúlt három évtizedben számos kutató vizsgálta a különböző tumormarkerek jelentőségét hólyagdaganatos betegekben. A vizsgálatok kiterjedtek a vizeletben lévő, illetve a szérumban megjelenő fehérjék, polipeptidek, glikoproteinek kimutatására. Az új évezredben a vizsgálatok célpontjai a remélt szenzitivitás és specificitás növelése érdekében a molekuláris diagnosztika irányába terelődtek. Ennek ellenére megbízható tumormarker jelenleg sem áll rendelkezésre. Napjainkban leggyakrabban a Bard-tesztet és a két FDA által is engedélyezett vizsgálatot, az NMP22-t (nuclear matrix protein) és az Urovisyon-t alkalmazzák (17,18).

A hólyagrák tumor markereit összefoglaló legnagyobb volumenű dolgozat van Rhijn és munkatársaitól származik, mely során 64 cikk alapján, 18 vizeletből kimutatható marker eredményeinek meta-analízisét készítették el (138). Ezek szerint a legmagasabb szenzitivitást a cytokeratin-20 (85 %), a cyfra 21-1 (85 %) és a mikroszatellita (82 %) vizsgálat mutatta. A specificitást a vizelet citológia (94 %), a BTA (92 %) és a mikroszatellita (89 %) értékelése után találták a legmagasabbnak (3. táblázat).

5. táblázat. Vizelet tumor markerek (64 cikk meta-analízise alapján)

Marker	Betegszám	Szenzitivitás	Betegszám	Specifititás
BT Astat	1377	58%	2084	73%
BT Atrakt	360	71%	195	66%
NMP22	838	71%	1203	73%
FDP	168	54%	173	61%
Immunocyst	276	67%	683	75%
Citometria	364	60%	89	82%
Quanticyt	129	58%	227	76%
Hb-dipstick	117	40%	113	87%
LewisX	95	75%	215	85%
FISH	165	79%	147	70%
Telomeráz	146	39%	-	Na
Mikroszatellita	108	82%	153	89%
Cyfra21-1	156	85%	323	82%
UBC	267	60%	480	87%
Cytokeratin20	117	85%	61	76%
BTA	436	48%	216	92%
TPS	179	65%	246	83%
Citológia	2213	35%	3322	94%

van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. Eur Urol. 2005 Jun;47(6):736-48. (138)

A hazai irodalomban a Bard BTA-teszt (Bladder Tumor Antigén) multicentrikus vizsgálat keretében való tanulmányozásáról számolnak be Kottász és munkatársai. A 7 centrumban elvégzett 101 vizsgálat 77 %-os szenzitivitási eredményt hozott (139).

Messing és munkatársai az arany standardnak számító citológia vizsgálatot értékelték és hasonlították össze a kevésbé szubjektív, molekuláris patológiai fegyvertárt felhasználó Immunocyst (FISH) citológiai vizsgálatával. A szenzitivitást a citológia során 23 %-nak, az Immunocyst vizsgálatával 81 %-nak találták. A vizelet citológia specificitását 93%-nak, a Immunocyst specificitását 75 %-nak értékelték (140).

Értékes munkával sikerült a citológiai vizsgálat szenzitivitásának növelését elérniük Pytel és munkatársainak. A fotodinámiás alapokat felhasználó, levulinsavval érzékenyített citológiai vizsgálatot végeztek fluorescens mikroszkóppal. Közvetlenül a transurethralis reszekció előtt 46 betegnél végezték el a fotodinámiás citológiai vizsgálatot és később 42 esetben szövettanilag igazolt hólyagrák közül 41 esetben (98 %) tudták kimutatni a daganatot (141).

Több, jelenleg futó vizsgálatban a mátrix metalloproteinázokat (MMP), illetve ezek inhibitorait (TIMP-tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) próbálják meg tumormarkerként felhasználni. Az elv azon alapul, hogy a daganatos folyamat progressziójakor a bazális membrán lebomlásában szerepet játszó legfontosabb fehérjék az MMP-k és ezek inhibitorai. Invazív rák esetén arányuk megbomlik, a kötőszövet homeosztázisa a lebontó folyamatok irányába tolódik. Egy randomizált németországi vizsgálat során a szerzők szignifikánsan magasabb MMP2 szintet és alacsonyabb TIMP1, TIMP2, és MTC-1 (MMP1-TIMP1 komplex) szérumszintet mértek a hólyagrákos páciensek körében, mint a kontrollcsoportban. A már távoli áttétet adott hólyagtumorra rendelkezők vérében minden vizsgált MMP típus, a TIMP1 és az MTC-1 szintje magasabb volt a szervre lokalizált daganatok hasonló értékeihez képest. Az egyetlen kivétel a TIMP2 volt, ami nem volt magasabb (142,143).

A tumormarkerek fő klinikai értéke nem csak az első diagnózis felállításában van, hiszen sok álpozitív vagy álnegatív eset fordulhat elő. A betegek nyomon követésénél, recidívák minél korábbi felfedezésénél, a terápia sikerének felmérésénél nagy előnyt jelenthetnek, mivel egyszerűen elvégezhető, minimálisan invazív vizsgálati módszernek számítanak (142-145).

Hólyagdaganat esetén a tumor markerek egy további érdekes hasznosításáról számoltak be olasz szerzők. Transurethralis hólyagtumor reszekció után vizsgálták a vizelet hyaluronsav koncentrációját, mint a reziduális daganat érzékeny markerét. A vizsgálat szenzitivitását 92,9 %-nak, specificitását 83 %-nak találták (144).

Munkacsoportunk diagnosztikai vizsgálatait az alábbi fejezetekben részletesen tárgyaljuk. A három vizsgálat közül a fluoreszcens in situ hibridizációs módszer (FISH) és a

mikroszatellita vizsgálatok tudományos háttérét már ismertettük a 4. és a 7.2.1. fejezetekben. Az időrendben elsőként indított szöveti polipeptid antigén vizsgálat (TPA= tissue polypeptid antigén) egy 180.000 Dalton molekulatömegű polipeptid kimutatásán alapszik, melyet 1957-ben tumorsejt sejtmembránjából izoláltak. Ezt a tumorhoz társult antigént különböző daganatos betegekben találták emelkedettnek. A TPA az emberi ráksejtek membránjában termelődik és aktívan kiválasztódik a testfolyadékokba. Univerzális tumor-asszociált antigénnek tekinthető, mivel a daganat lokalizációtól függetlenül emelkedett értéket mutat (145). Mammakarcinómások szérumban Lüthgens és Schlegel (146), hólyagtumorban először Kumar és munkatársai mértek TPA koncentrációt, de ezek viszonyát a stádiumokhoz nem vizsgálták (147).

2.2.8.2.3. Kiegészítő vizsgálatok

Magas kockázatú, nem-izominvazív vagy izominvazív hólyagrák esetén az esetleges, hólyagon kívüli terjedés vagy távoli áttétek keresése miatt kiegészítő vizsgálatokat szükséges végezni. A kontrasztanyag CT vagy MR megmutatja, ha a daganat áthatolt a hólyagfalra, nyirokcsomó-megnagyobbodást, májáttétet okozott, vagy ráterjedt a szomszédos szervekre, méhre, hüvelyre, prosztatára, ondóhólyagra, végbélre vagy a has- illetve a kismedence falára.

A tüdőáttétek kimutatására mellkasröntgen-felvételt készítünk, de kétes esetben tüdő CT vizsgálat javasolt. A csontáttét gyanúját a vérben a csont lebomlási markerek szintjének emelkedése alátámasztja, bizonyítására csontszcintigráfiát végzünk. Bizonyos esetekben szükség lehet célzott rgt, vagy CT vizsgálatra.

A diagnosztikában használatos módszer még az intravénás urográfia is, mely azonban nem elsődleges vizsgálat. Jelentősége akkor lehet, ha felmerül a gyanú, hogy a húgyhólyagrák felső húgyúti üregrendszeri daganattal társul. Ilyen esetben célszerű vizsgálat a kontrasztanyag CT, mely jóval információ-gazdagabb képet nyújt (3,12,148).

3. Célkitűzések

A hólyagrakkal foglalkozó munkacsoportunk vizsgálatait két alapvető cél irányába építettük fel. Egyik volt a hólyagdaganat korai diagnosztikája és az erre bevethető módszerek, tumor marker és genetikai vizsgálatok klinikumban való alkalmazása, az eredmények összehasonlítása a nemzetközi vizsgálatokéval.

Munkacsoportunk másik célkitűzése a hólyagdaganat prognosztika irányvonala. Feladatunk volt újabb ismeretek és összefüggések feltérképezése a hólyagrákok finom szöveti struktúrája és a betegek túlélése, illetve a betegség recidívája között.

A két alapvetően különböző vizsgálati csoport miatt a továbbiakban mind a módszerek, mind az eredmények során külön rendszerezve ismertetjük a „klinikai diagnosztikai” és a „prognosztikai vizsgálatokat”.

1. Szöveti polipeptid antigén koncentráció vizsgálata hólyagdaganatos betegekben

Célunk volt vizsgálni a szérum szöveti polipeptid antigén koncentrációt különböző stádiumú és szöveti differenciáltságú hólyagrákos betegben és egészségesekben, valamint nem rosszindulatú urológiai megbetegedésben szenvedőknél. Arra a kérdésre kívántunk választ kapni, hogy a szérum szöveti polipeptid antigén használható-e tumor markerként, illetve a szérum koncentrációja jelzi-e a betegség izominvazív vá válását.

2. Hólyagrák kimutatása vizeletből, fluoreszcens in situ hibridizációs módszerrel

Vizsgálatokat végeztünk a hólyagrák kimutatására kifejlesztett, fluoreszcens in situ hibridizációs módszerrel. Célunk volt az új technikával elérhető specificitás és szenzitivitás értékelése, továbbá a vizsgálat metodikájának finomítása a jobb eredmény elérése érdekében, és annak megállapítása, hogy a FISH technikával kiváltható-e az invazív cystoscopya.

3. Mikroszatellita vizsgálatok hólyagrákos betegekben

Célunk volt a mikroszatelliták vizeletből való kimutatásával igazolni a hólyagrák diagnózisát. A vizsgálat érzékenységét és specificitását növelő módszer, vizsgálati módszer kidolgozását terveztük. További vizsgálatokat végeztünk annak bizonyítására, hogy a vizelet felülúszó felhasználásával jobb eredmény érhető el, mint a vizelet üledékkel. Vizsgáltuk továbbá, hogy a mikroszatellita kimutatás módszerének eredményeit mennyire befolyásolja az, hogy nem-izominvazív vagy izominvazív daganatnál végezzük a detektálást.

4. Invertált papilloma előfordulása a húgyhólyagban

Célunk az volt, hogy a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján invertált papillomával diagnosztizált betegeket prospektív vizsgálattal kövessük és választ kapjunk, hogy a betegség kiújulása vagy malignizálódása milyen gyakorisággal fordul elő. Választ kívántunk kapni arra a kérdésre, hogy a betegek követését milyen szorosan kell végezni.

5. E-cadherin expresszió vizsgálata hólyagrákban

Az egyik legfontosabb sejtheadhéziós molekula, az E-cadherin expressziójának erősségét vizsgáltuk hólyagrákos betegek szövettani metszetein. Célunk az E-cadherin expresszió összefüggésének kimutatása volt a daganat stádiumával, differenciáltsági fokával, recidívák számával és a betegség túlélésével. Meg kívántuk határozni, hogy az E-cadherin expresszió vizsgálata mennyire használható mutató a klinikai prognózis, a betegség kimenetele szempontjából.

6. Claudin expresszió változásának vizsgálata hólyagrákban

Fel kívántuk tární a claudin expressziós mintázat összetételét és az expresszió mértékét normál húgyhólyag urotheliumban, gyulladásos húgyhólyaghámban és a húgyhólyagrák különböző patológiai stádiumaiban, és e stádiumok eltérő differenciáltságú tumoraiban. A vizsgálatokkal hozzá kívánunk járulni a humán urotheliumban a claudin expressziós eloszlás feltérképezéséhez. Ezen túl a feltárt adatokkal közelebb kívántunk kerülni a sejtkapcsoló struktúrák és ezen belül a claudinok szerepének megértéséhez a húgyhólyagrák kialakulásában és progressziójában. Vizsgálatunk során különös figyelmet fordítottunk a magas rizikójú nem-izominvazív hólyagrákokra (pT1G3), ugyanis e csoport alkotja a klinikai határterületet a radicalis cystectomy és a TUR-műtétek között. A recidíváló és nem recidíváló tumorok várt claudin expressziós karakterizálása segítséget nyújthat a jövőben a pT1G3 csoport tumorok előrejelzésének pontosabb meghatározásához.

4. Módszer

Célkitűzéseink megvalósításához három klinikai diagnosztikai vizsgálatot és három prognosztikai vizsgálatot végeztünk el. A vizsgálatokban résztvevő hólyagrákos betegeket és a kontrolcsoportot képező egészséges, vagy egyéb urológiai jóindulatú betegségben szenvedőket a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján kezeltük, illetve operáltuk, 1996 január 1. és 2006 december 31. között. A humán vizsgálatokat a betegek írásos hozzájárulásával és az illetékes etikai bizottságok engedélyének birtokában végeztük. A kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetében, a molekuláris vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben és a II. Sz. Patológiai Intézet, Molekuláris Patológiai Laboratóriumában végeztük. Az adatfeldolgozást és statisztikai elemzéseket a fenti három intézetben készítettük.

4.1. Klinikai diagnosztikai vizsgálatok

4.1.1. 1.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat: Szöveti polipeptid antigén koncentráció vizsgálata hólyagdaganatos betegeknél

Betegek és kontroll személyek: A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján, 1998. március és október között 39 hólyagrákos betegnél vizsgáltuk a szérumban szöveti polipeptid antigén (TPA) szintjét. A 18 férfi és 21 nőbeteg átlagos életkora 71,6 (52-87) év volt. 26 betegnél szerepelt az anamnézisben transurethralis reszekció hólyagtumor miatt, tehát 13 betegnek volt primer daganata. A vizsgálatban csak azon betegek eredményeit vettük figyelembe, akiknél a szövettani feldolgozás során a daganat kiterjedése (TNM) és a differenciáltsági fokozat egyértelműen megállapítható volt. Az anyagot transurethralis reszekció vagy radikális cystectomy során nyertük. A szövettani stádium és a malignitási fokozat meghatározásában a UICC előírása volt irányadó. A stage és a grade megoszlása a 6. táblázaton látható.

TPA vizsgálat: A szérumban TPA meghatározását műtét előtt vett savóból, a BYK Sangtec cég immunoluminometrikus módszerével végeztük, a referencia tartomány felső határa a gyári standardok alapján 65 U/l volt.

A két kontrollcsoportot egészségesek és nem rosszindulatú urológiai betegségben szenvedők (hólyaggyulladás, vesekő, ureterkő) alkották. Az első csoportban 250, a második csoportban 132 mintát vizsgáltunk.

Kiértékelés: A vizsgálat statisztikai értékelésére Student-féle 2 próbas statisztikai számítást alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük az eltéréseket $p < 0,05$ esetén.

6. táblázat. A betegek staging és grading megoszlása

Grade	G 1	G 2	G 3	Összes
T a	6	3	-	9
T 1	5	9	5	19
T 2-4	-	2	9	11
Összes	11	14	14	39

4.1.2. 2.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat: Hólyagrák kimutatása vizeletből, fluoreszcens in situ hibridizációs módszerrel

Betegek és kontroll személyek: 43 szövettanilag igazolt urothelsejtes karcinómában szenvedő beteg vizeletmintáit vizsgáltuk, emellett kontrollként 6 gyulladós, 2 hyperplasiás és 2 benignus tumoros (papilloma) elváltozásban szenvedő beteg vizeletmintája szolgált. Emellett vizsgáltunk még 2, klinikailag és szövettanilag tumormentes és egyéb specifikus szövettani elváltozást sem mutató betegből származó vizeletet is (7. táblázat).

7. táblázat. A betegek száma szövettani csoportok szerint

Szövettan	Esetszám
Malignus	
Urothelsejtes rák	43
Benignus	
Gyulladás	6
Hyperplasia	2
Papilloma	2
Eltérés nélkül	2

Vizelet preparálás: A vizsgált személy reggeli első és második vizeletéből az ürítéstől számolva 1/2 órán belül 33 ml térfogatnyit 17 ml Carbowax oldattal (2 % PEG1450 50 %-os ethanolban) elkeverünk (ezen állapotában a fixált vizelet 4°C-on 72 órán át eltartható a további feldolgozásig). A következőkben 600 g-vel 10 percig centrifugálva kiülepítjük, és a felülúszót eldobva 10 ml PBS-ben mossuk a sejteket, majd ismét 600 g / 10 min centrifugálás és a felülúszó eldobása következik. A kiülepített sejteket a csőben maradó kis felülúszó-maradékban reszuszpendáljuk és 5 ml frissen elkészített Carnoy fixálót (methanol / ecetsav 3:1) hozzáadva legalább 30 percig -20 °C-on tartjuk. 600 g / 5 perces centrifugálás után megfelelő tisztaságú pellet esetén 100 µl felülúszót meghagyva abba visszaoldjuk, különben a Carnoy fixálós mosási lépést megismételjük.

Kenet készítés: 3 µl, 10 µl, 30 µl sejtsuszpenziót kicsöppentünk tárgylemezre, majd száradás után mikroszkóp alatt a legmegfelelőbb sejtsűrűségűt körbekarcolva megjelöljük.

Előkezelés: A teljesen megszáradt keneteket 2x SSC oldatba helyezve 37 °C-on inkubáljuk 60 percig, majd 0,5 mg/ml-es pH 1,0 pepszin oldatban 37 °C-on 15 percig, végül 1x PBS-ben 5 percig mossuk. Utó-fixáljuk a kenetet: 1 % formaldehid 5 perc, 1x PBS 5 perc, 70-85-100 % os ethanol 1-1 perc, majd hagyjuk megszáradni.

FISH: 3 µl próbakeveréket a sejteket hordozó tárgylemez kiválasztott részére cseppentünk és fedőlemezt helyezünk rá, melyet gumicementtel hermetikusan lezárunk. A tárgylemezt ezután Eppendorf MasterCycler Gradient PCR készülék in situ feltétjére helyezzük, és 73 °C-on 2 percig ko-denaturáljuk a próbákat és a sejtek DNS-ét, majd 39 °C-on overnight (12-14 órán át) hibridizálunk. A gumicement és a fedőlemez eltávolítása után 73 °C-os 0,4x SSC / 0,3 % NP-40 oldatba helyezzük a tárgylemezeket 2 percre, majd szobahőmérsékletű 2x SSC / 0,1 % NP-40 oldatba mártjuk 1 percig. Ezután sötétben, szobahőmérsékletén hagyjuk megszáradni és 3 µl DAPI-II magfestést tartalmazó anti-fading-es lefedővel fedjük. A próbakeverékben a 3-as, 7-es, 17-es kromoszómák peri-centromérikus régióit (CEP3, CEP7, CEP17), és a 9p21 lokuszra specifikus (LSI 9p21), direkt jelölt DNS próba található. A CEP3 jelölése Texas red (vörös), a CEP7 Spectrum green (zöld), a CEP 17 Spectrum aqua (világoskék), az LSI 9p21 Spectrum gold (aransárga) jelölésű.

Az értékelés kritériumai: pozitívnak számít a minta, ha fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva legalább 12 sejtben egyáltalán nincs LSI 9p21 szignál, vagy ha legalább 4 sejtben a CEP3, CEP7, CEP17 közül legalább kettő multiplikálódott (= 3 vagy több szignál/sejt).

4.1.3. 3.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat: Mikroszatellita allélvesztés-vizsgálat

Betegek és kontroll személyek: Mikroszatellita vizsgálatainkhoz 44, a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján hólyagtumor miatt operált beteg (13 nő, 31 férfi) vér, vizelet és tumoros szövetszövetmintáit használtuk. A betegek átlagéletkora 74 év volt. Az értékelés nem volt mindig teljes, 18 esetben a tumor, míg 4 esetben a vizelet üledék nem állt rendelkezésre. A kontrollmérésekhez vér és vizelet mintákat gyűjtöttünk, továbbá 16 egészséges (normál kontroll) és 20 más - nem daganatos - urológiai betegségben szenvedő személytől (urológiai kontroll) is. A szövettani diagnózis felállítása a WHO hólyagtumorokra vonatkozó 2004-es irányelvei alapján történt. A betegek stádium (T) és grade (G) eloszlását, valamint a kontrollok diagnózisait a 8. táblázat foglalja össze.

Mintagyűjtés és DNS izolálás: A tumoros betegtől műtét előtti vér-, vizeletmintákat és műtét során kimetszett tumorokat gyűjtöttünk. A vérmintákat EDTÁ-s csövekbe gyűjtöttük, ezek mononukleáris sejtjei szolgálták a mikroszatellita-vizsgálat negatív kontrolljaként.

8. táblázat: Betegek és kontrollok klinikai adatai

Beteg	n = 44	Kontroll	n = 36
Ta	7	BPH	6
T1	18	Vesekő	6
T2	18	Colica renis	2
T3	1	Cystitis	3
T4	0	Prostatitis	1
G1	4	Phimosis	1
G2	20	Stressz inkont.	1
G3	20	Egészséges	16

A vizeletmintákat felülúszóra és üledékre választottuk szét, miután centrifugálást (3000 rpm 4 °C, 20 perc) végeztünk. A két frakciót -70 °C-on tároltuk, később külön-külön izoláltunk DNS-t. A vizelet felülúszókból történő DNS izolálás során a kit használatát megelőzően a nukleinsavat izopropanol és 5M-os NaCl oldat segítségével kicsaptuk, a csapadékot centrifugáltuk (3000 rpm, 4 °C, 10 perc), a pelletet 70 % etanollal mostuk, majd kiszáritottuk. A tumormintákat -70 °C-on tároltuk.

A gyártó előírásait követve végeztük a DNS izolációt az előkészített mintákból High Pure PCR Template Preparation Kittal (Roche, Indianapolis, MN, USA). Az izolált DNS koncentrációját spektrofotométerrel (GeneQuant II, Cambridge UK) 260 nm-en mértük. Az izolált mintákat további felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

Polimeráz láncreakció: A primerek kiválasztását irodalmi adatok alapján végeztük. A PCR során 12 mikroszatellita régiót szaporítottunk fel a mintákban. Ezen 12 mikroszatellita, 6 kromoszóma különböző régióin találhatóak.

Az amplifikálást ABI 7000 PCR készülékben végeztük (Applied Biosystems). Egy reakcióban egy minta, egy mikroszatellita régióját szaporítottuk fel 25 µl végtérfogatú reakcióelegyben, melynek összetétele a következő volt: 12,5 µl reakciópuffer (Sigma-Aldrich, Seelze, Németország), 2-2 µl 2,5 µM *forward* és *reverse* primer, 3 µl 10 ng/µl koncentrációjú templát DNS, 5,5 µl desztillált víz (Sigma-Aldrich, Seelze, Németország).

Elektroforézis: A PCR termékek elválasztásához jó felbontóképességű módszerre van szükség, mert az egy lókuszhoz tartozó allélek közötti méretkülönbség igen kicsi (gyakran csak 2-3 bp). A mikroszatelliták amplifikációja során keletkező termékek mérete 100-300 bp közé esik.

A kapilláris elektroforézis a fenti céloknak megfelelő nagyfelbontású elválasztást lehetővé tevő módszer. A kapilláris egy vékony, géllal telt cső, melyben a PCR termékek elektromos feszültség hatására méretük függvényében különböző sebességgel vándorolnak a pozitív pólus felé. Ennek megfelelően különböző időpontban érkeznek meg a kapilláris egy adott pontjára (a detektorablakba), ahol a primerek által rájuk kapcsolt fluoreszcens festék gerjesztésével válnak láthatóvá. A jelölésre három különböző fluoreszcens festék használható (FAM, NED, HEX), így az azonos mérettartományban detektált termékekből multiplex módon három-három futtatható együtt. A módszer előnye, hogy gyors és precíz (a termékek méretét ± 1 bp eltéréssel adja meg) valamint, hogy a detektált fluoreszcencia-intenzitás arányos a keletkezett termék mennyiségével és ez az analízis során számszerűsíthető, ami objektívvé teszi az eredmény kiértékelését. Az amplifikálás során keletkezett termékeket hígítást és denaturálást követően (95°C, 5 perc) kapilláris elektroforézissel választottuk el (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Kiértékelés: Az allélek azonosítása a PCR termékek méretének (fragment-hosszának) meghatározásán alapszik. A kapilláris elektroforézisnél is szükség van méret-standardra (mólsúly-standard), amit a mintákhoz keverve futtatunk (GeneScan-500, Applied Biosystems). Itt segítséget jelent, hogy ez egy negyedik fajta fluoreszcens festékkal van jelölve (ROX), ezért jól elkülönül a vele együtt futtatott mintáktól. Az egyes fragmentek méretét a kiértékeléshez használt GeneScan 3.7 szoftver a mintával együtt futtatott méret-standardhoz viszonyított elhelyezkedése alapján határozza meg ± 1 bp pontossággal.

A program a csúcsmagasság értékeket is megjeleníti, nem csak a méretet, ez pedig az adott fragment fluoreszcencia-intenzitását mutatja. Ez arányos a keletkezett PCR termék mennyiségével. Ugyanazon beteg egy mikroszatellita lókuszt vizsgálva a negatív kontroll vérmintához képest a tumorsejteket tartalmazó mintában (vizelet és tumor) az allélek arányaiban bekövetkező eltérés jelzi a deléció. Ennek megítélésére egy általánosan elfogadott számolási módszert alkalmaztunk: a kapott fragmentek csúcsmagasságának arányát minden mintában külön kiszámoltuk. A kisebb méretű allél csúcsmagasságát elosztottuk a nagyobb méretű allél csúcsmagasságával, (így a futtatások közötti eltérések minimalizálhatók). Ezután az egészséges, mutációmentes szövetben (vér) kapott arányt a tumoros szövetben (tumor, vizelet) kapott arányhoz viszonyítottuk. Ötven százaléknál nagyobb eltérés allélvesztésre utal.

4.2. Hólyagtumor prognosztikai vizsgálatok

4.2.1. 1.sz. Prognosztikai vizsgálat: Húgyhólyag invertált papilloma miatt operált betegek prospektív, követéses vizsgálata

Betegek és módszer: A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján 1998. március 1-jétől 2005. február 28-ig tizenkét betegnél végeztünk műtétet invertált papilloma miatt. Az operáció időpontjában az átlagos életkor 62,1 év (41-91 év) volt. A betegek közül, hét férfi és öt nő volt. A vizsgálat átlagos követési ideje 52,1 hónap (4-84 hónap) volt.

A műtétet megelőzően vizelet-, és vérvizsgálatokat, ultrahangos vizsgálatot és cystoscopiát végeztünk. Hét betegünkönél találtunk haematuriát, közülük öt makroszkópos vérrelés miatt jelentkezett. Pyuriája egyik betegünknek sem volt. A tumor nyolc esetben a trigonumon vagy a hólyagnyakon helyezkedett el, három betegünkönél az oldalfalon, míg egy esetben, teljes vizeletelakadást okozva a prosztatikus húgycsőszakaszon. A legkisebb mérete 3 milliméteres, míg egy daganat 25 x 20 milliméteres, egy pedig 3 centiméter hosszúságú, kígyószerű volt. Makroszkóposan 7 daganat tűnt papillarisnak, 5 daganat nem-papillarisnak. Négy betegünkönél volt látható hasi ultrahang vizsgálat során az intravesicalis képlet. A daganatot minden alkalommal transurethralis resectióval távolítottuk el és a diagnózishoz csak a szövettani vizsgálat után jutottunk.

A betegek szoros követését, a háromhavonta esedékes vizeletvizsgálat, hasi ultrahangos vizsgálat és hólyagtükrözés alkotta. 2 év után a fenti vizsgálatokat félévente végeztük el.

4.2.2. 2.sz. Prognosztikai vizsgálat: E-cadherin expresszió vizsgálata hólyagrákban

Betegek és módszer: 1996. január 1-je és 1997. február 1-je között a Semmelweis Egyetem Urológia Klinikáján ötven, első transurethralis reszekción (TUR) átesett, primer hólyagtumoros (TCC) beteg esetében vizsgáltuk az E-cadherin expresszió erősségét.

Immunhisztokémia: A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákból készült metszeteken hematoxin-eosin festést, és monoklonális anti-humán-E-cadherin ellenes antitesttel immunhisztokémiai reakciót végeztünk. A daganatban meghatároztuk a fokozatot, ill. a stádiumot.

Immunhisztokémiai kiértékelés: Az immunhisztokémiai reakciók erősségét szemikvantitatív értékeléssel négy kategóriába soroltuk, úgymint: -, +/- (bizonytalan reakció),

+, ++. Az így kapott értékeket kontingencia analízissel vizsgáltuk, a szignifikanciát χ^2 próbával ellenőriztük.

Kiértékelés: 2004-ben a betegek nyolc éves követése után elemeztük a túlélésük és a későbbi recidívák kialakulásának esélyét az E-cadherin expresszió függvényében.

A 2004-es évre vonatkoztatva a túlélést három kategóriába soroltuk az alábbiak szerint:

1. kategóriába az öt évnél rövidebb túlélést, a 2. kategóriába az 5 évnél hosszabb, de 8 évnél rövidebb túlélést, a 3. csoportba pedig a 8 évnél is hosszabban túlélőket soroltuk. Tíz beteg esetében nem találtunk információt a későbbi kórtörténetre, így negyven betegnél tudtuk a vizsgálatot elvégezni. A recidívakészség szempontjából négy kategóriát állítottunk az első transzurethrális reszekció időpontjához viszonyítva: **A.** két éven belül kialakult recidíva; **B.** kettő-négy év múlva kialakult recidíva; **C.** négy éven túl kialakult recidíva; **D.** recidívamentes kategória. (9. táblázat).

9. táblázat. A betegek neme, kora, a tumor grade, stádium, az E-cadherin expresszió erőssége, a túlélési és recidíva-kategória (a vizsgálatban részt vevő 40 beteg adatai)

Beteg sorszáma	Beteg Grade	Nem (ffi, nő)	TNM	E-Cad	Túlélési kategória	Recidíva kategória	Beteg kora 1996-ban
1	I	F	Tx	+	3	D	59
2	I	N	Ta	-	3	B	50
3	I	F	Ta	+	1	D	75
4	I	F	Tx	+	3	D	66
5	II	N	T1	+	2	B	73
7	III	N	Ta	++	3	B	59
8	I	F	Ta	+	3	D	54
10	II	N	T1	-	3	D	82
11	II	N	Tx	++	3	D	71
12	I	N	Ta	+	3	D	69
13	I	N	Tx	-	3	B	71
14	I	F	Ta	+	3	D	50
15	I	F	Tx	+	1	D	73
18	II	F	T1	+	1	D	81
19	I	F	Ta	-	1	D	87
20	IP	F	Tx	+	3	D	29
21	II	F	T1	+	1	A	57

22	II	N	T1	++	2	A	86
25	I	F	Ta	-	3	D	69
27	III	N	T1	++	1	D	70
28	II	F	T1	-	3	D	75
29	I	F	Ta	-	3	D	55
30	IP	F	Ta	+	1	D	49
31	I	F	Tx	-	1	B	76
32	I	N	Ta	+	1	D	63
33	I	F	T1	-	1	B	50
34	I	N	Ta	-	2	D	76
35	I	F	T1	-	3	D	72
36	II	F	T1	+	3	A	70
38	II	F	T1	-	3	D	40
39	I	F	Ta	-	2	D	75
40	I	F	Ta	+/-	3	D	51
41	I	F	Ta	+	3	D	40
43	II	F	Ta	+	1	B	66
44	III	F	T1	+	2	D	67
45	III	N	Tis	+	3	C	57
46	III	N	Tis	+/-	3	D	50
48	I	N	Ta	+	3	D	61
49	II	F	Ta	++	1	D	64
50	III	N	Ta	+	1	D	71

4.2.3. 3.sz. Prognosztikai vizsgálat: Claudin expresszió változásának vizsgálata hólyagrákban

Betegek és kontroll személyek: A humán húgyhólyagminták a Semmelweis Egyetem Urológia Klinikáján hólyagrákkal vagy egyéb nem daganatos betegség miatt operált betegekből származtak. Összességében 56 mintát vizsgáltunk. A vizsgált betegek átlagéletkora 66,65 év, a férfi:nő arány 2,3:1-hez volt. A mintákat normál, gyulladásoz, TaG1, T1G1, T1G2, T1G3, és T2G3 csoportokra osztottuk. A T1G3-as csoportot kettéválasztottuk aszerint, hogy vizsgálatunk ideéig jelentkezett-e recidíva a betegeknél. Ha jelentkezett recidíva, akkor a beteg a T1G3-as recidiváló csoportba került. Azokat a betegeket, akiknél nem jelentkezett, a T1G3 nem recidiváló csoportba soroltuk be (10. táblázat).

10. táblázat. Minták kor és nem eloszlás szerint

	Nem		Átlagéletkor	
	Ffi	Nő	Ffi	Nő
Normál	3	1	59	64
Gyulladásos	2	2	68,5	66
TaG1	7	1	66,3	68
T1G1	5	3	63	72,3
T1G2	6	2	63	68,5
T1G3	11	5	62,8	73,1
T1G3Nrec	5	3	54	66,7
T1G3Rec	6	2	71,6	79,5
T2G3	5	3	75,2	61,6
Összesen	39	17	65	68,3
	56		66,65	

Előkészítés: Az eltávolított tumor mintákat környező nem tumoros szövetekkel együtt, valamint normál húgyhólyag mintákat 10 % neutrális pufferelt formalinban fixáltuk 24 órán keresztül, utána dehidráltuk és paraffinba beágyaztuk. A tumor grade megítélése hematoxilín-eozinnal festett metszeteken történt. Molekuláris biológiai vizsgálatokra a mintákat RNA laterben fixáltuk vagy folyékony nitrogénben fagyasztás után -80 °C-on archiváltuk.

Immunhisztokémia: A formalinban fixált, paraffinba ágyazott anyagok antigén feltárása a deparaffinálást követően részben proteáz emésztéssel történt (0,01 % tripszin, 10 perc, szobahőn). A claudin antitestnél mikrohullámos antigén feltáró kezelés volt szükséges (0,01 M citrát pufferben (pH 6,0) (DAKOCytomation, Glostrup, Denmark), forraltuk a mintákat 30 percen keresztül 700 W 10 % teljesítményen. Ezt követően az endogén peroxidáz aktivitásának gátlását 3 %-os hidrogén peroxiddal (5 perc) végeztük. Az antitest aspecifikus kötődését ló szérum (Novocast) inkubálással előztük meg (30 perc, szobahőn). Az elsődleges antitesteket, melyek a claudinok intracitoplazmatikusan elhelyezkedő karboxi végéhez kötődnek az alábbi hígításokban használtuk: monoklonális anti-egér claudin-2,-4,-5 1:80, poliklonális anti-nyúl claudin-1,-3,-7,-10 1:80. Másodlagos antitestként biotinált anti-nyúl és

anti-egér IgG-t (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, USA) használtunk 1:200 hígításban, 30 percig szobahőn. Ezt ABC inkubálás (30 perc szobahőn) követte. Az immunreakciót diaminobenzidin (DAB) kromogénnel hívtuk elő. A reakcióhoz Ventana ES automata immunfestési eljárást (Ventana Medical System Inc, Tucson, Arizona, USA) alkalmaztunk. Csapvizes mosás után hematoxilines háttérfestést végeztünk és glicerines fedőanyag segítségével fedtük a metszeteket.

Pozitív kontrollként humán colon és veseszövetet használtunk. Negatív kontroll metszeteken a primer antitestek helyett BSA-t használtunk.

A normál húgyhólyaghamban a claudinok immunhisztokémiai képét az eredményekben szemléltetjük.

Immunhisztokémia értékelés: Az immunhisztokémiai metszetek kiértékelést két különböző módon végeztük el. Először egy szemikvantitatív analízist végeztük fénymikroszkóp segítségével, melynek során figyelembe vettük a reakció erősségét, illetve a reakciót mutató tumor-területek arányát. A reakció intenzitását 1-től 3-ig (1-gyenge, 2-közepes, 3-erős reakció), míg a reakciót adó területet 1-5-ig pontoztuk (0-5 % 1p, 5-25 % 2p, 25-50 % 3p, 50-75 % 4p, 75-100 % 5p), majd a két értéket összeszoroztuk egymással. Az így kapott értékek segítségével hasonlítottuk össze az egyes tumor-stádiumok fehérje expresszióját.

score x intenzitás

0-5% 1p	kis 1p
5-25% 2p	
25-50% 3p	X közepes 2p
50-75% 4p	
75-100% 5p	erős 3p

Morfometria: Ezután morfometriai analízist végeztünk. Az immunhisztokémiai reakciók eredményét fénymikroszkóppal készített fotók segítségével dokumentáltuk (200X nagyítás, Olympus BX mikroszkóp). Minden metszetről 10, egymást nem átfedő képet rögzítettünk. Azokat a digitális képeket, melyeken a claudin immunreakcióval kimutatható volt, a Leica QWin szoftver (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) segítségével kvantitatívan kiértékeljük. A mérések elvégzése előtt az egyértelműen pozitívnak tartott területre kattintva határoztunk meg azt a szinttartományt, amit mérni szeretnénk volna.

Mindemellett az immunreakció küszöbértékét piros, zöld és kék alcsoportokban állítottuk be és ezeket az értékeket az egyes metszetek közötti különbségek láthatóvá tételéhez használtuk. A pozitív területet egy előre kijelölt területen a küszöbérték feletti, specifikus immunreakciót mutató pixelek százalékos arányában kaptuk meg.

Statisztikai analízis: A statisztikai analízist a GraphPad Prism szoftver 2.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) verziója segítségével végeztük el. A közép értékeket különböző csoportok között a Mann-Whitney U teszttel készítettük. A $p < 0.05$ értéket vettük szignifikánsnak.

RNS izolálás a RNA later-ben fixált anyagból: Egyenként kb. 20 mg szövetből (48 húgyhólyagrakos, 4 gyulladós valamint 4 normál húgyhólyag) Trizol módszerrel RNS-t izoláltunk azokból a mintákból, amelyeket eltávolítás után RNA later-ben (Sigma, R0901, St. Louis, MO) 24 órán keresztül fixált és használatig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Homogenizálás után Trizol reagensben (Sigma, T 9424) inkubáltuk szobahőmérsékleten 15 percig. Steril Eppendorf-csövekbe pipettáztuk át a folyadékot, majd 0,2 ml kloroform hozzáadása után vortexeltük és centrifugáltuk. Ezután a felülúszót, amely az RNS-t tartalmazza, átpipettáztuk egy másik Eppendorf-csőbe és kloroformmal tovább tisztítottuk. A felülúszót új csőbe tettük, majd az RNS-t izopropanollal kicsaptuk, vortexeltük és 10 perc állás után újra centrifugáltuk. Ezután leöntöttük a felülúszót és 75 %-os etanollal mostuk, majd centrifugáltuk. Roche RNS tisztító kitből (Roche, Indianapolis, Indiana, USA) származó elúciós pufferben feloldottuk az RNS-t, DNázissal emésztettük, majd a Roche RNS-tisztító kitjével (Roche, 3270289) tovább tisztítottuk, végül megmértük az optikai denzitását (O.D.) és az RNS koncentrációját a kapott folyadéknak. További felhasználásig a tisztított RNS-t $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A teljes RNS épségét 2%-os formaldehid/agaróz gélen ellenőriztük.

RNS izoláció a formalin-fixált, paraffinba ágyazott anyagból: A formalin-fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintákból az össz RNS kivonása High Pure RNA Paraffin Kit-tel (Roche) történt, blokkonként 8 db $5\text{ }\mu\text{m}$ vastagságú metszet. A Proteináz K emésztés minden minta esetében 16 óra volt, a teljes folyamat a gyártó útmutatásai szerint történt. Az izolálás után az RNS mintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig. Az össz RNS integritását egy korábban leírt módszerrel ellenőriztük.

Reverz transzkripció: Az össz RNS ($0,5\text{ }\mu\text{g}$ $10\text{ }\mu\text{l}$ mixben) átírása MuLV reverz transzkriptázzal (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) történt (10 perc $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 50 perc $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, és 5 perc $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) RNáz inhibitor (Applied Biosystems) jelenlétében, Random Hexamer (Applied Biosystems) felhasználásával.

Primerek és a PCR körülményei: A kísérletek megkezdése előtt a rendelkezésre álló szekvenciák alapján a Primer Expressz program (ABI) segítségével megterveztük a lehetőségek szerinti legideálisabb primereket a kísérletek elvégzéséhez (11. táblázat).

11. Táblázat: Real-time PCR-hez használt primerek

	Forward	Reverse	Accession Number
Claudin-1	ttcgtacctggcattgactgg	gcgcgatatttcttcttgcag	GI 4559277
Claudin-2	acctgtaccgccactctgt	ctccctggcctgcattatctc	GI 9966780
Claudin-3	ctgctctgctgctcgtgtcc	ttagacgtagtccttgcggtcgtag	GI 21536298
Claudin-4	ggctgctttgctgcaactgtc	gagcctggcaccttacag	GI 14790131
Claudin-7	catcgtggcaggtcttgcc	gatggcagggccaaactcatac	GI 24496764
Gapdh	gaaggtgaaggctggagt	gaagatggtgatgggatttc	GI 7669491
β -actin	cctggcaccagcacaat	gggccggactcgtcatac	GI 15928802
RNS polimeráz II	gcaccacgtccaatgacat	gtgcggctgcttcataa	GI 14589948

A PCR-hez megkerestük az optimális primer kötődési hőmérsékletet gradiens PCR-rel. Ehhez a reakcióhoz MgCl₂-t tartalmazó PCR puffert (Roche J 0051), dNTP mixet (Applied Biosystems, D8220), forward és reverz primert, AmpliTaq Gold enzimet (Roche, G 0448), desztillált vizet (Eppendorf, 0032006159) és a korábban előállított cDNS-t használtuk fel. A reakció végtérfogata 25 μ l lett. Az azonos tartalmú PCR csöveket úgy helyeztük el a készülékben, hogy 53 °C és 66 °C közötti hőmérsékleten történjen meg a primer kötődés. A reakció paraméterei: (95 °C-on 10 perc, 95 °C-on 20 másodperc, 60 °C-on 60 másodperc, 72 °C-on 60 másodperc, és 4 °C Ciklusszám: 40) x ábra.

Real-time kvantitatív RT-PCR: A real-time PCR reakciókhoz 2 μ l cDNS-oldatot használtunk, a méréseket ABI Prism 7000 készüléken (Applied Biosystems) végeztük. Minden egyes PCR reakciót 25 μ l reakcióelegyben, SYBR Green Green PCR Master Mix (AB4309155, Foster City, USA) felhasználásával végeztünk. A mérések 96-os plate-eken, triplikátumokban történtek: 10 percig 95 °C-on, majd 40 cikluson keresztül 95 °C-on 20 másodperc, 60 °C-on 60 másodperc és 72 °C-on 1 perc. Az adatok elemzéséhez és a statisztikai analízishez REST-programot (relative expression software tool, www.wzw.tum.de/gene-quantification) használtunk, a génexpressziót minden gén esetében

GAPDH háztartásgénhez, mint referenciagénhez viszonyítottuk. A relatív expressziót az alábbi képlet alapján számítottuk ki:

$$R = \frac{E_{target}^{\Delta CP_{target}(\text{kontroll-minta})}}{E_{referencia}^{\Delta CP_{referencia}(\text{kontroll-minta})}}$$

R= a relatív expresszió

E = a PCR reakció hatékonysága (azaz ciklusonként észlelt PCR növekedés szorzója, ideális esetben ciklusonként triplikálódás, azaz 3)

ΔCP = azaz crossing point, az a ciklusszám, ahol az RNS mennyisége meghaladja a detektálhatóság küszöb (threshold) értékét

A reakció termékekből 10 μ l-t futtattunk 2 %-os agaróz gélen, majd etídium-bromidos festéssel tettük láthatóvá az amplikonokat.

5. Eredmények

Az eredmények ismertetésekor felhívjuk a figyelmet arra, hogy az egyes vizsgálatok között az adatokat illetően átfedések vannak, hiszen voltak olyan betegek, akiket több vizsgálatba is bevontunk. A fentiek alapján a számszerű adatok mindig adott vizsgálatra vonatkoznak és ezekre a megbeszélés részben mindig irodalmi referencia számmal vagy a vizsgálat számával hivatkozunk. Különösen fontos megemlíteni, hogy a vizsgálatok elemszáma különböző, ezért a számszerűleg megadott értékek eltérőek lehetnek.

5.1. Klinikai diagnosztikai vizsgálatok (1.-3.sz.) eredményeinek bemutatása

5.1.1. 1.sz.. *Klinikai diagnosztikai vizsgálat: Szöveti polipeptid antigén koncentráció vizsgálata hólyagdaganatos betegeknél*

A hólyagtumoros betegcsoportban a szérumban TPA értékét különböző stádiumokban más-más arányban találtuk emelkedettnek (12. táblázat). A legmagasabb értékeket az izominvazív (T2-T4) daganatos esetekben találtuk. Az átlagérték 177,6 U/l (53,9-736,2) volt, az esetek 73 %-a meghaladta a referencia tartományt. A nem-izominvazív hólyagtumorok esetében (Ta, T1) ez az érték 55, ill. 58 %-ban volt megfigyelhető.

A daganat differenciáltsági foka és a szérumban lévő TPA szint között nem tudunk kimutatni pozitív korrelációt (13. táblázat). A referencia tartományt közel azonos arányban haladják meg a jól, illetve a kevésbé differenciált betegeknél a tissue protein antigén értékei. Student-féle 2 próbas statisztikai számításokkal szignifikáns eltérés nem volt kimutatható ($p > 0,05$).

A kontroll betegcsoportot alkotó egészségeseknél a TPA átlagértéke 47,6 U/l (45,8-58,0), a jóindulatú elváltozásban szenvedőknél ez az érték 54,2 U/l (36,4-78,2) volt (2. ábra).

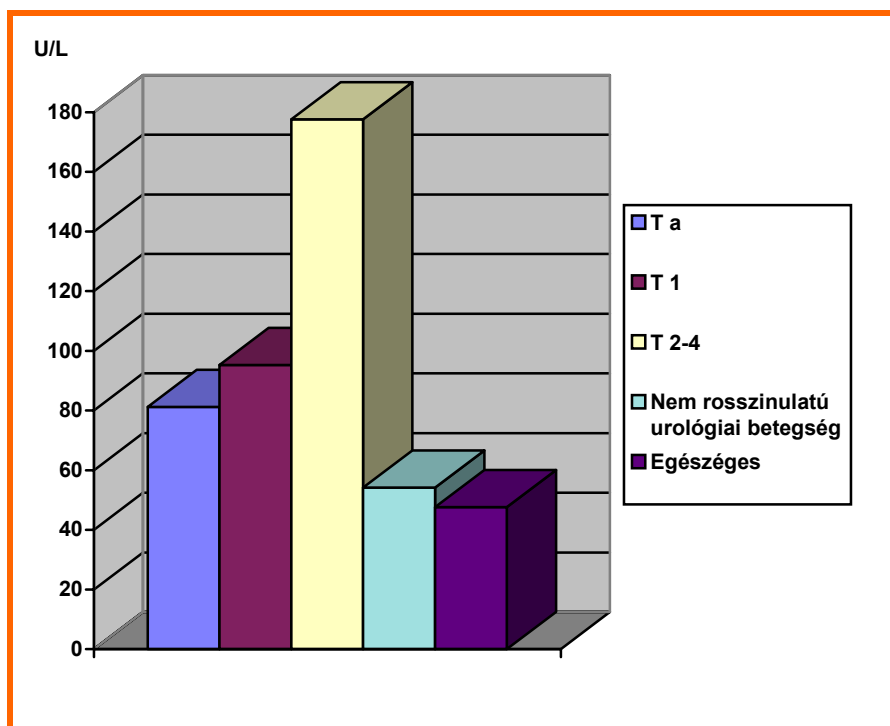
Azon 2 betegnél, akiknél a hisztológiai vizsgálat papillomát talált, a szérumban lévő TPA szint a referencia érték felső határa alatt volt.

12. táblázat. A szérumban lévő TPA emelkedett és normál értékének eloszlása különböző stádiumú betegeknél

Stage	se. TPA átlag	Emelkedett se. TPA	Normál se. TPA
T a	81,2 (44,8-143,9)	5 beteg (55%)	4 beteg (45%)
T 1	95,3 (39,4-305,9)	11 beteg (58%)	8 beteg (42%)
T 2-4	177,6 (53,9-736,2)	8 beteg (73%)	3 beteg (27%)

13. táblázat. A szérumban lévő TPA emelkedett és normál értékének eloszlása különböző szövettani fokozatokban

Grade	se. TPA átlag	Emelkedett se. TPA	Normál se. TPA
G 1	99,5 (51,5-305,9)	7 beteg (64%)	4 (36%)
G 2	94 (44,2-216)	7 beteg (50%)	7 beteg (50%)
G 3	148,3 (39,4-736,2)	9 beteg (64%)	5 beteg (36%)



2. ábra. A szérumban TPA átlagértékei a különböző stádiumú hólyagdaganatokban, egészséges populációban és nem rosszindulatú urológiai betegségben

5.1.2. 2.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat: Hólyagrák kimutatása vizeletből, fluoreszcens *in situ* hibridizációs módszerrel

A betegek vizeletvizsgálatának *in situ* fluoreszcens hibridizációs módszerrel kimutatott, ráksejtekre jellemző kromoszómális eltéréseit a transurethralis szövettani mintavétel után értékelt hisztológiai lelettel vetettük össze. Ennek során a vizsgálat specificitását 100 %-nak, a szenzitivitását 87 %-nak találtuk. 34 esetben kaptunk pozitív reakciót az UroVysion reagenssel. Ezen esetek közül mind a 34 betegnél igazolódott a hólyagrák. 16 alkalommal a vizsgálat során negatív eredményt kaptunk. Ezen 16 beteg közül ötnél mutatott a későbbi szövettani feldolgozás karcinómát, melyek mindegyike nem-izominvazív pTa stádiumú volt, ebből három 5 mm-es vagy kisebb. A részletes eredményeket az alábbi táblázatokban mutatjuk be (14. és 15. táblázat).

14. táblázat. Szövetteni vizsgálattal és fluoreszcens in situ hibridizációs módszerrel kapott eredmények összehasonlítása.

Szövettan	FISH		
	+	-	?
Malignus			
Urothelsejtes rák	34	5*	4
Benignus			
Gyulladás	-	5	1
Hyperplasia	-	2	-
Papilloma	-	2	-
Eltérés nélkül	-	2	-

**mind pTa*

15. táblázat. A pTa stádiumú urothelsejtes rákok fluoreszcens in situ hibridizációs eredményei.

Szövettan	FISH		
	+	-	?
pTa stádiumú			
Urothelsejtes rák	3*	5**	1

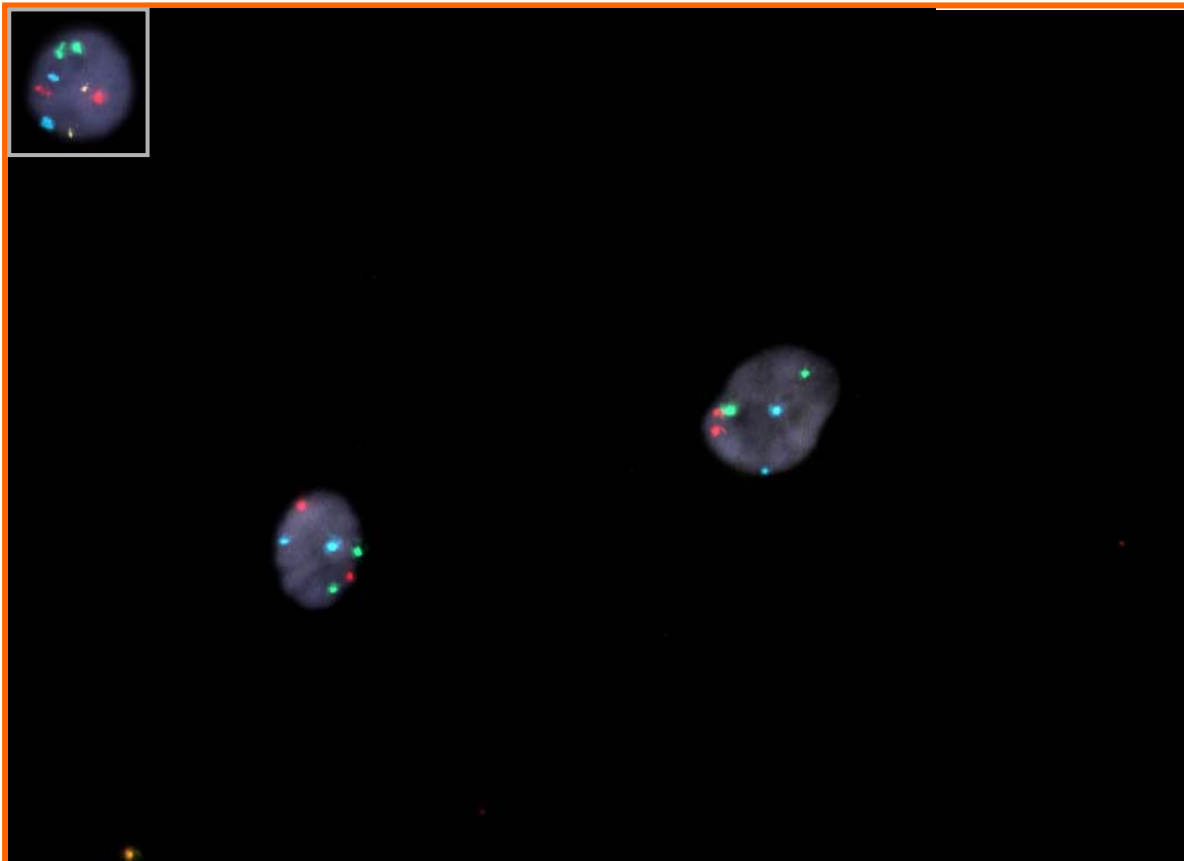
*** 5 mm-nél nagyobb v. multiplex mindhárom tumor**

**** 5 mm-es vagy kisebb az 5-ből 3 tumor**

12 esetben nemcsak a standard eljárás szerint előírt második reggeli vizeletből, hanem az elsőként ürítettből is elvégeztük a FISH vizsgálatot. Pozitívnak értékeltünk minden esetet, amikor a két FISH vizsgálatból legalább az egyik pozitív volt. A 9 urothelialis rák közül 3 esetében mindkét eredmény pozitív volt, négy esetben az egyik pozitív, a másik nem értékelhető, egy esetben az egyik pozitív, a másik negatív, míg egy esetben az egyik eredmény negatív volt, a másik nem értékelhető, tehát 8-esetet pozitívnak, 1-et negatívnak

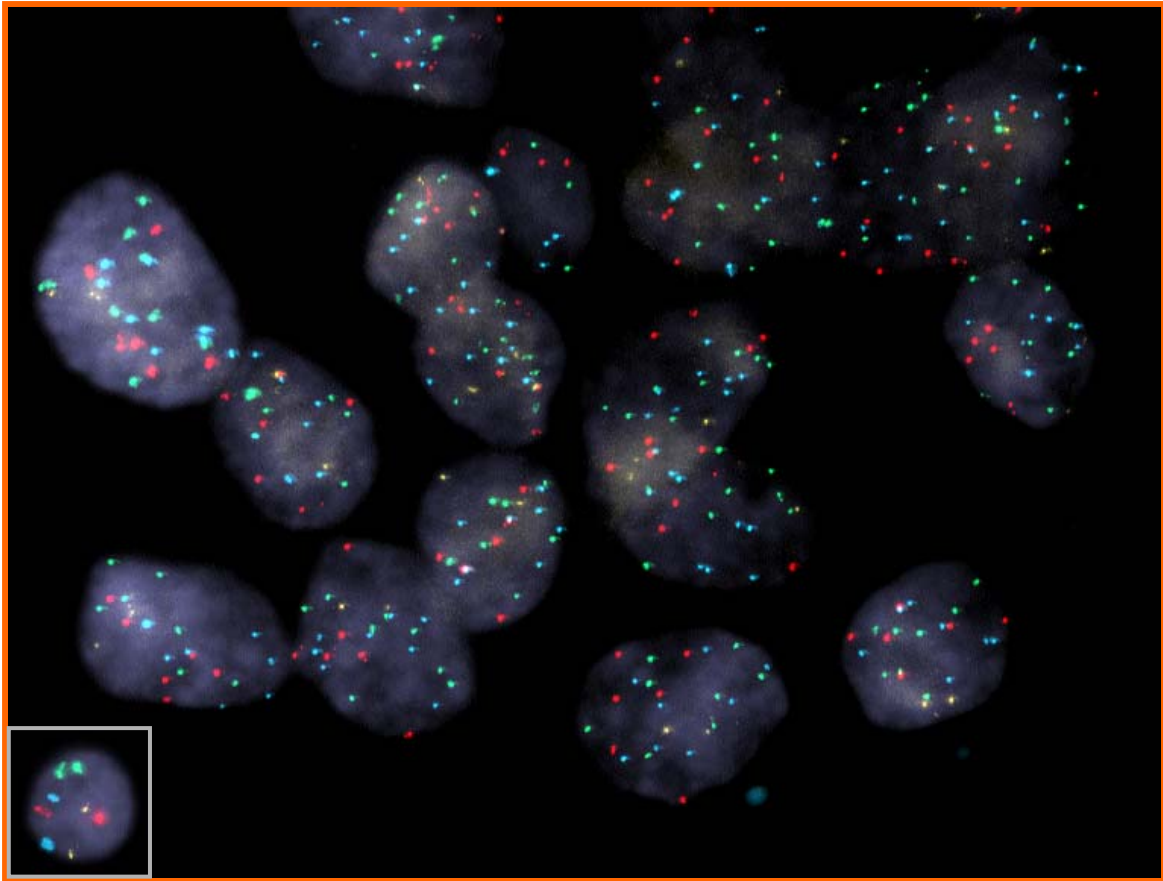
értékelünk. Egy-egy gyulladáso és specifikus eltérést nem mutató esetben mindkét vizeletminta FISH negatív lett, míg egy papilloma esetében az egyik minta negatív, a másik nem értékelhető volt, tehát mindhárom benignus eset negatívnak bizonyult.

A 34 FISH pozitív átmenetisejtes karcinómás esetből 2 T1 és 2 T2 stádiumúban a 9p21 vesztés volt a vezető genetikai elváltozás (3. ábra) (12 %). 30 esetben (88 %) – beleértve a 3 Ta stádiumú FISH pozitív esetet is – 3/7/17 multiplikációt találtunk (4. ábra). Egyes esetekben a 3/7/17 kromoszómák felszaporodásához a 9p21 multiplikációja is társult (5. ábra). 7 esetben viszont a 3/7/17 multiplikáció mellett ugyanazon sejtekben 9p21 deléció is megfigyelhető volt (6. ábra). A 7. ábrán látható, hogy a gennysejtek jelenléte mennyire megnehezíti a vizsgálatot.



3. ábra

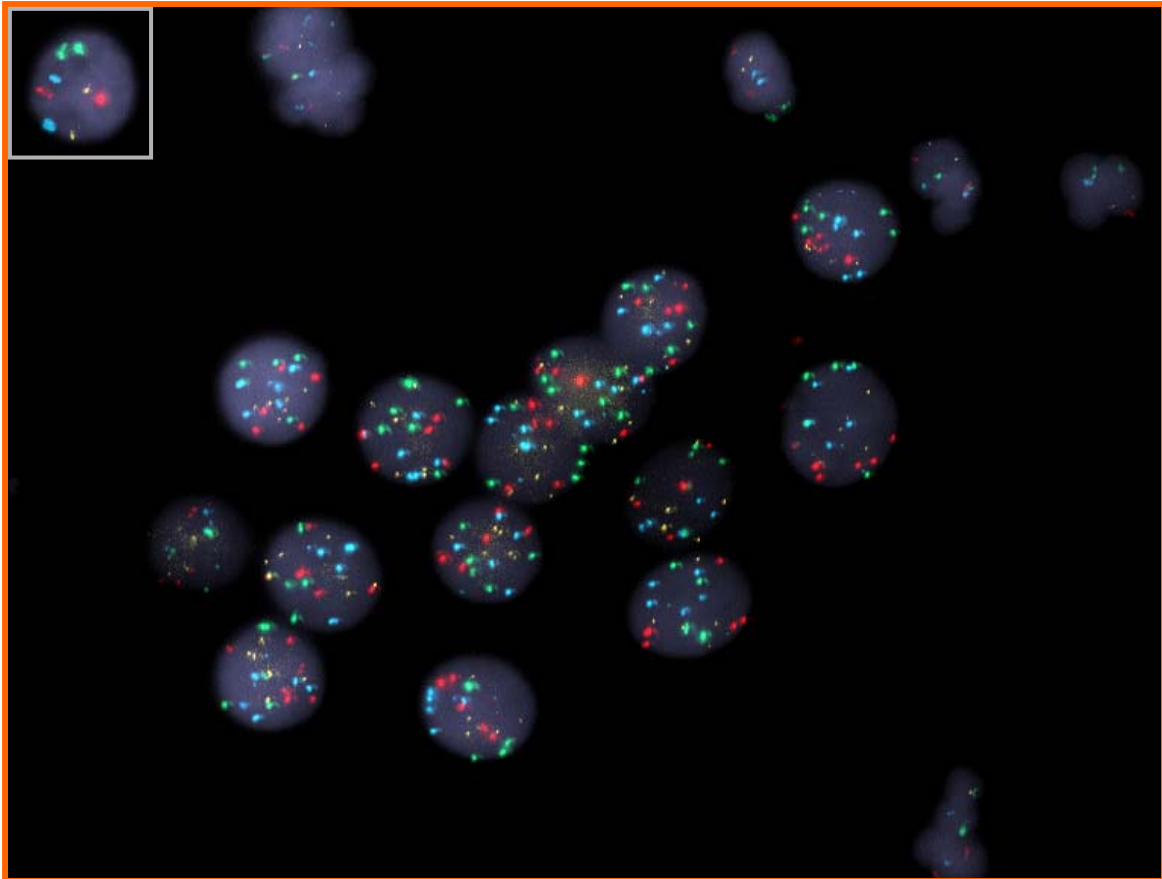
9p21 deléció: a specifikus lókuszt jelenlétét mutató Spectrum gold (aransárga) jel hiányzik a sejtmagokból. A bal felső inzertben egy normál sejt látható kontrollként. CEP3: Texas red (vörös), CEP7: Spectrum green (zöld), a CEP 17: Spectrum aqua (világoskék), LSI 9p21: Spectrum gold (aransárga) jelölés, magfestés: DAPI. Orig magn. 1000X



4. ábra

3/7/17 multiplikáció: a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák jelenlétét mutató vörös, zöld és világoskék jelekből kettőnél több látható a sejtmagokban. A 9p21 lókusznak megfelelő aransárga jelből magonként a normális két kópia található. A bal alsó inzerben egy normál sejt látható kontrollként. Jól megfigyelhető a fenotípusos különbség: a tumoros sejtmagok szabálytalan alakúak és jelentősen nagyobbak a normálisnál.

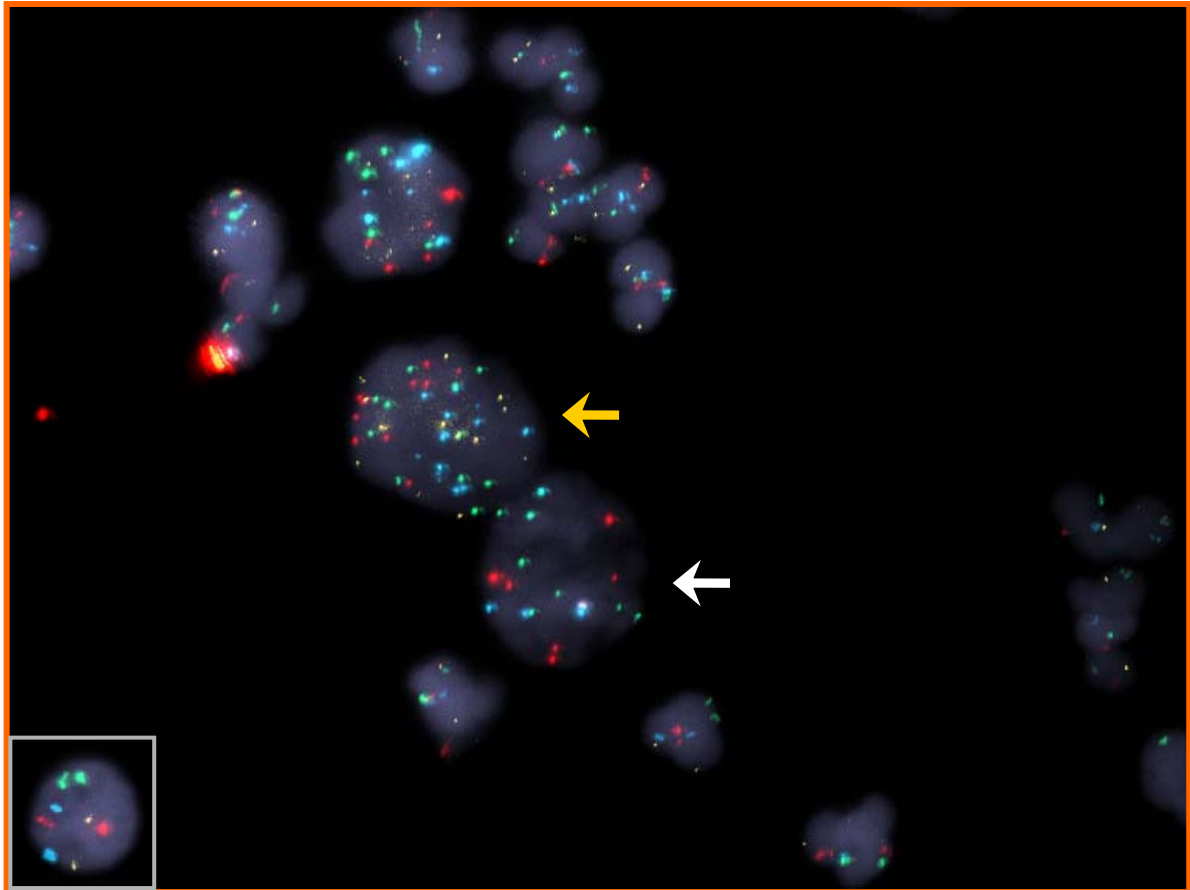
CEP3: Texas red (vörös), CEP7: Spectrum green (zöld), a CEP 17: Spectrum aqua (világoskék), LSI 9p21: Spectrum gold (aransárga) jelölés, magfestés: DAPI. Orig magn. 1000X



5. ábra

3/7/17 és 9p21 multiplikáció: a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák jelenlétét mutató vörös, zöld és világoskék jelekből kettőnél több látható a sejtmagokban. A 9p21 lókusznak megfelelő aranyárga jelből szintén több található magonként a normális két kópiánál. A bal felső inzertben egy normál sejt látható kontrollként. Fenotípusos különbség nem figyelhető meg: a tumoros sejtmagok a normálhoz hasonlóan szabályos alakúak és méretük is hasonló.

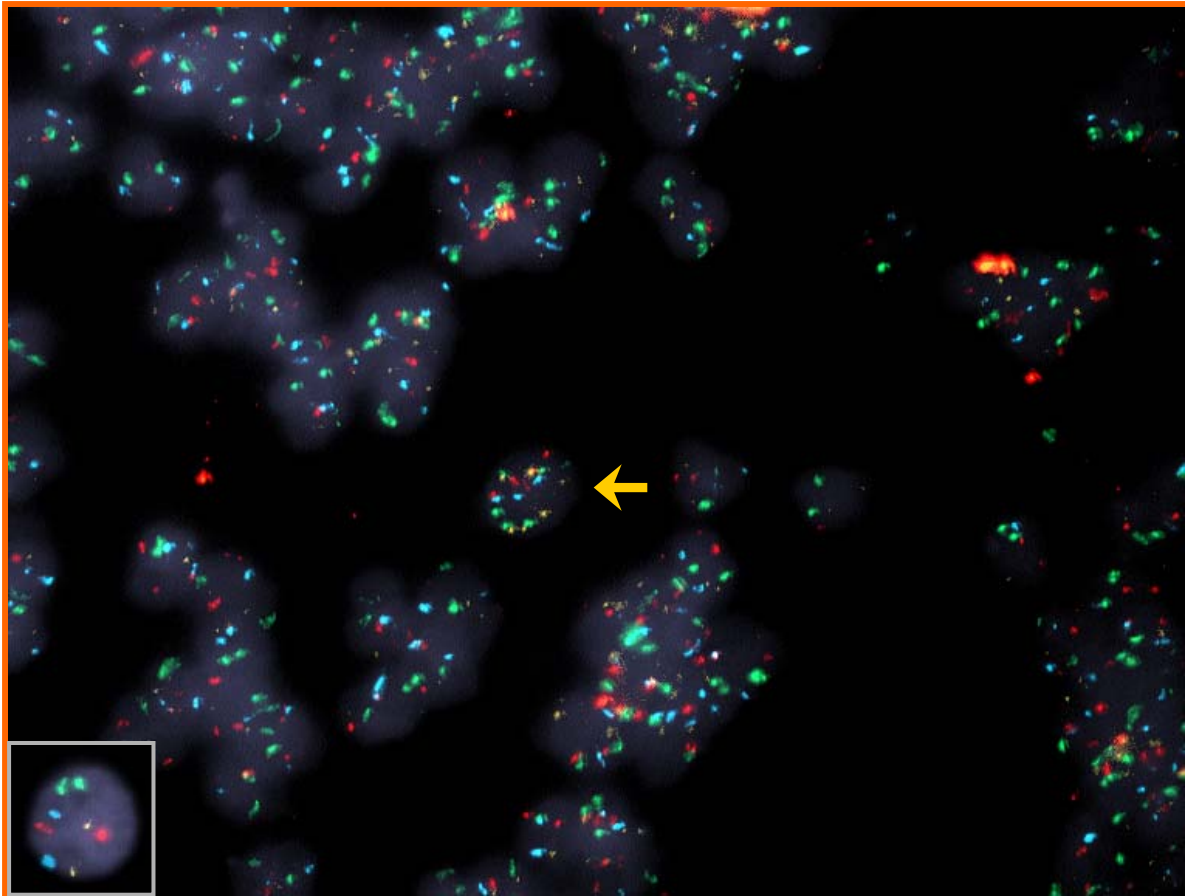
CEP3: Texas red (vörös), CEP7: Spectrum green (zöld), a CEP 17: Spectrum aqua (világoskék), LSI 9p21: Spectrum gold (aranyárga) jelölés, magfestés: DAPI. Orig magn. 1000X



6. ábra

3/7/17 és 9p21 multiplikáció, valamint 9p21 deléció: a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák jelenlétét mutató vörös, zöld és világoskék jelekből kettőnél több látható a nyíllal jelölt tumoros sejtmagokban. A 9p21 lókusznak megfelelő aranysárga jelből a sárga nyíllal jelölt magban szintén több található a normális két kópiánál, míg a fehér nyíllal jelölt esetben egyáltalán nem található 9p21 jel (komplett deléció). A bal alsó inzeremben egy normál sejt látható kontrollként. Jól megfigyelhető a fenotípusos különbség: a tumoros sejtmagok szabálytalan alakúak és jelentősen nagyobbak a normálisnál.

CEP3: Texas red (vörös), CEP7: Spectrum green (zöld), a CEP 17: Spectrum aqua (világoskék), LSI 9p21: Spectrum gold (aranysárga) jelölés, magfestés: DAPI. Orig magn. 1000X



7. ábra

Gennysejtek: a nagy mennyiségű granulocyta jelenléte és hámsejtekhez tapadása jelentősen nehezíti illetve gátolhatja a tumorsejtek felismerését. Ezen az ábrán a gennysejtek tömegében egyetlen tumorsejt ismerhető csak fel (sárga nyíllal jelölve), melyben a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómákat reprezentáló vörös, zöld és világoskék jelekből, továbbá a 9p21 lókusznak megfelelő aransyárga jelből több található a normális két kópiánál. A bal alsó inzertben egy normál sejt látható kontrollként.

CEP3: Texas red (vörös), CEP7: Spectrum green (zöld), a CEP 17: Spectrum aqua (világoskék), LSI 9p21: Spectrum gold (aransyárga) jelölés, magfestés: DAPI. Orig magn. 1000X

5.1.3. 3.sz. Klinikai diagnosztikai vizsgálat: Mikroszatellita allélvesztés-vizsgálat

A mikroszatellita allélvesztés-vizsgálat során 44 hólyagtumoros beteg mintáit elemeztük. A 3 vizsgált minta (tumor, vizelet üledék, vizelet felülúszó) közül az esetek 93%-ában legalább az egyikben minimum egy eltérést találtunk. A feldolgozás során 18 esetben a tumorminta, 4-ben pedig a vizelet üledék nem állt rendelkezésünkre. Így a vizsgált 26

tumormintából (12 mikroszatellita markert használva) 22-ben sikerült legalább egy allélvesztést (LOH) kimutatni (85 %). Ezután a vizeletminták feldolgozását követően az üledékből, mely sejteket is tartalmazott és a vizelet felülúszóból (oldott, sejtmertes DNS-t tartalmazó rész) külön-külön végeztük el a vizsgálatokat. Az érzékenység értéke különböző volt, a vizelet felülúszóban 86 %-os (38/44), míg ugyanez a vizelet üledékben 68 % (27/40). A kiértékelést a továbbiakban a hólyagrák stádiumainak megfelelően is elvégeztük, mely szerint a nem-izominvazív tumoroknál (pTa-T1) a két különböző vizeletfrakció között az érzékenységben jelentősebb eltérést tapasztaltunk; ami a vizelet felülúszónál 84 % (21/25), a vizelet üledéknél pedig 67 % (14/21) volt. A pT2-4, klinikailag invazív tumoroknál a különbséget lényegesen kisebbnek találtuk. A vizelet felülúszóban esetében 74 % (14/19), a vizelet üledékben pedig 68 % (13/19) volt. (16. táblázat).

16. táblázat: Mikroszatellita allélvesztés-vizsgálat eredményei 44 beteg mintáiban.

	Hólyagrákos betegek			Beteg kontroll (n=20)	Egészséges kontroll (n=16)
	Ta/T1 (n=25)	T2-4 (n=19)	Σ (n=44)		
LOH legalább egy mintában	23/25 92%	18/19 95%	41/44 93%	4/20 20%	5/16 31%
Legalább egy LOH a vizelet felülúszóban	21/25 84%	14/19 74%	35/44 80%	4/20 20%	3/16 19%
Legalább egy LOH a vizelet üledékben	14/21 67%	13/19 68%	27/40 68%	1/20 5%	2/16 12,5%

A kontroll betegek vizsgálata során, a 20 nem daganatos urológiai betegségben szenvedő személy közül 4-nél, míg a 16 egészséges kontroll közül 5-nél találtunk eltéréseket. A vizsgálat specificitásának értéke a beteg kontrolloknál 80 %, míg az egészségeseknél 69 % volt. A vizsgálat érzékenységevel ellentétben a specificitása mindkét kontroll csoport esetében a vizelet üledékben magasabb volt (95 % ill. 88 %), mint a vizelet sejtmertes felülúszójában (80 % ill. 81 %).

Összesítve a vizsgálatok során igazolt allélvesztéseket 9p21 (46 %) volt a leggyakrabban deléciót szenvedő lókus, ezután a 9q32 (34 %), és a 5q15 (34 %) következett. Amennyiben csak a 9p21 és a 4q32-es allélvesztéseit vettük figyelembe a vizsgálat érzékenysége 57 %-os volt, és 64 %-ra emelkedett, ha ezek mellé a 16q24-es régió allélvesztéseit is tekintetbe vettük.

5.2. Prognosztikai vizsgálatok (1.-3.sz.) eredményeinek bemutatása

5.2.1. 1.sz. Prognosztikai vizsgálat: Húgyhólyag invertált papilloma miatt operált betegek prospektív, követéses vizsgálata

Betegeink műtét utáni követése során az invertált papilloma kiújulását vagy távoli metasztázisát nem tudtuk kimutatni. Egy 64 éves férfinél jelentkezett makroszkópos vérvizelés az operáció után 13 hónappal. A beteg kórelőzményében szerepelt a jobb oldali veséjének eltávolítása, vesekövesség okozta krónikus pyelonephritis okozta zsugorvесе miatt. A cystoscopos vizsgálat során vézésforrást a húgyhólyagban nem találtunk. 4 hónappal később ismételt jelentkezett a vérvizelés és az ekkor végzett hólyagtükrözés során a jobboldali ureterszájadékból tudunk haematuriát kórismézni. Az uretercsonek disztális végének transurethralis reszekciója után feldolgozott szövettani anyag urothelialis karcinómát mutatott. Ezután az uretercsonekot nyílt műtéttel távolítottuk el és nem-izominvazív pT1 G2 transitiocellularis karcinómát találtunk. A beteg 7 éve recidíva- és tünetmentes. Egy másik férfi betegünket nem-izominvazív (pT1 G2) átmenetisejtes carcinomával operáltuk, majd lokális kemoterápiában részesült. 15 hónappal a reszekció után, kontroll hólyagtükrözés során, az előző daganattól távol fedeztünk fel egy 3 mm-es solid elváltozást az oldalfalon. Az eltávolított daganat szövettani vizsgálatának eredménye invertált papilloma volt.

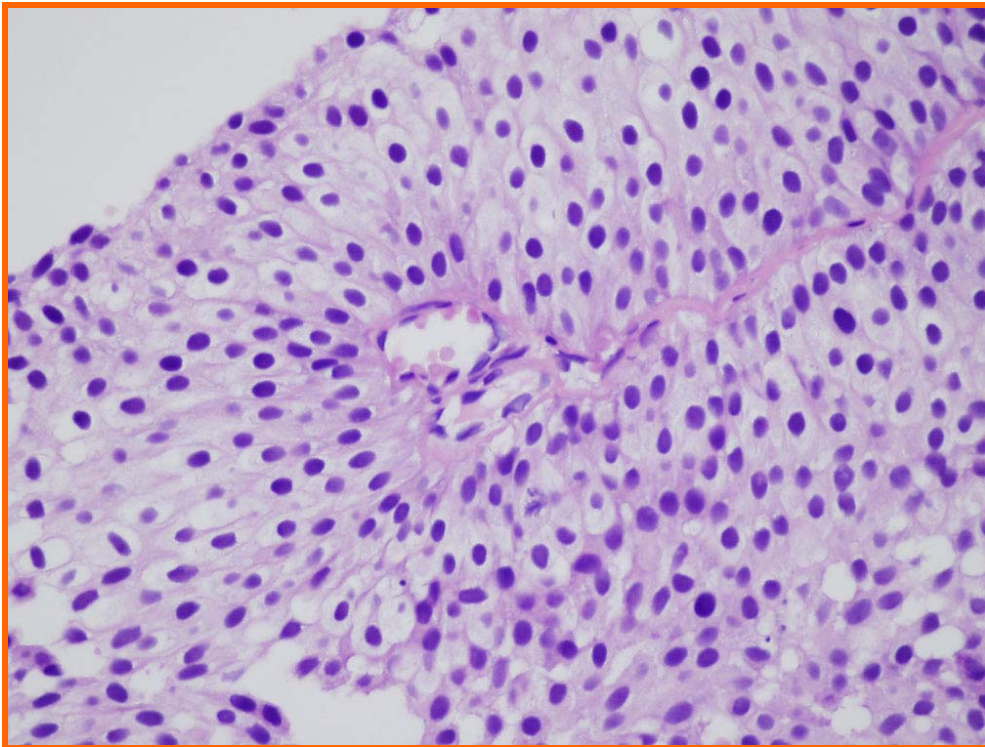
A többi tíz betegünknel végzett vizelet, hasi ultrahangos vizsgálat és cystoscopia az invertált papilloma kiújulásának vagy malignizálódásának gyanúját nem vetette fel.

5.2.2. 2.sz. Prognosztikai vizsgálat: E-cadherin expresszió vizsgálata hólyagrákban

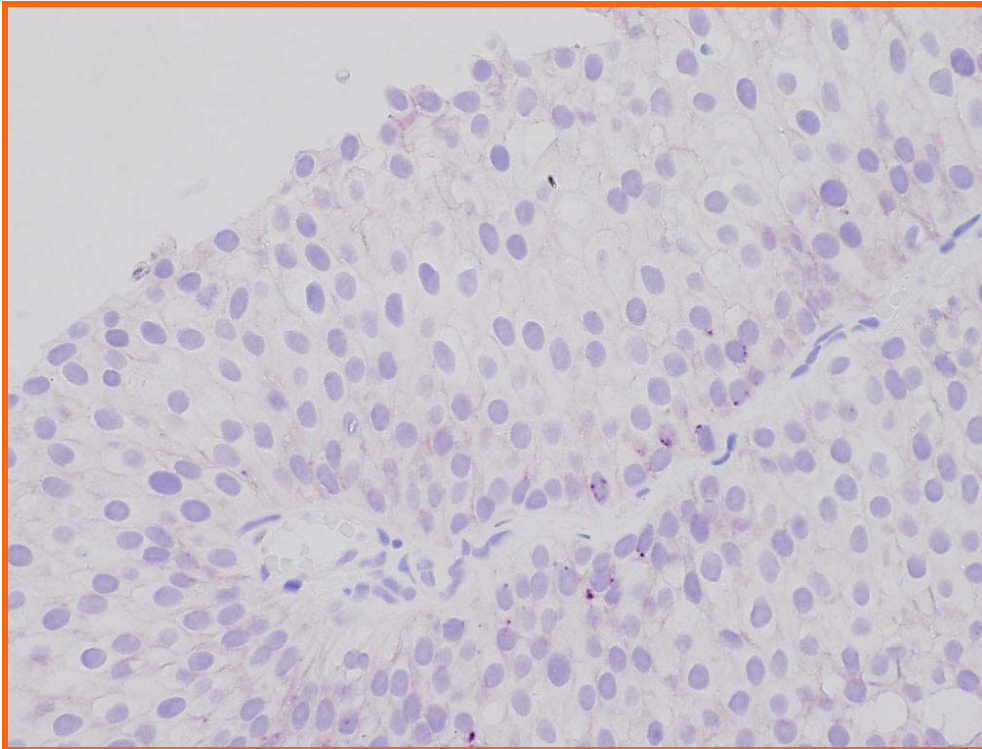
Az 50 hólyagrákos beteg közül a rendszeres urológiai kontrollvizsgálatokon 40 jelent meg, másik 10 betegnel különböző okok miatt nem volt teljes a követés, így a továbbiakban 40 beteg anyagának adataival számoltunk.

E-cadherin expresszió nem volt kimutatható (-) 13/40 (32 %)-ban. 25/40 (63 %)-ban az E-cadherin expresszió megtartott volt, (+ vagy ++), a reakció intenzitása megegyezett a

normál urothelével, (++) vagy megtartott volt, de a normál urothelhez viszonyítva gyengébbnek bizonyult (+) (8. és 9. ábra). További két esetben az expresszió kétséges volt. Két esetben, -melyek korábbi szövettani vizsgálattal invazív tumorként szerepeltek,- a metszetek revíziójakor invertált papillómának bizonyultak. Az E-cadherin expresszió mindkét esetben 3 erősségű volt.



8. ábra. pT1G1 hólyagtumor hematoxylin-eosin festés



9. ábra. pT1G1 hólyagtumor E-cadherin vizsgálata + / pozitív

Az E-cadherin expresszió erőssége és a tumor differenciáltsága, illetve stádiuma között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Az expresszió csökkenése nem mutatott összefüggést a nemmel (férfiakban 30 %, nőkben 34 %) sem.

2004-ben a későbbi recidíva kialakulását 40 betegnél vizsgáltuk és ezt 11 esetben (25 %) észleltük, azonban a kontingencia analízissel itt sem találtunk szorosabb összefüggést az E-cadherin expresszió erősségével.

Összesen 18 beteg exitált az első TUR-t követő nyolc éven belül, közülük 13 beteg öt éven belül. 72 % (13/18) tumor mintájában az E-cadherin expresszió megtartott volt, (+, vagy ++) és csupán 27 %-ban (5/18) találtunk csökkent expressziót. Az átlagos túlélés sem mutatott összefüggést az E-cadherin expresszió mértékével (7.táblázat).

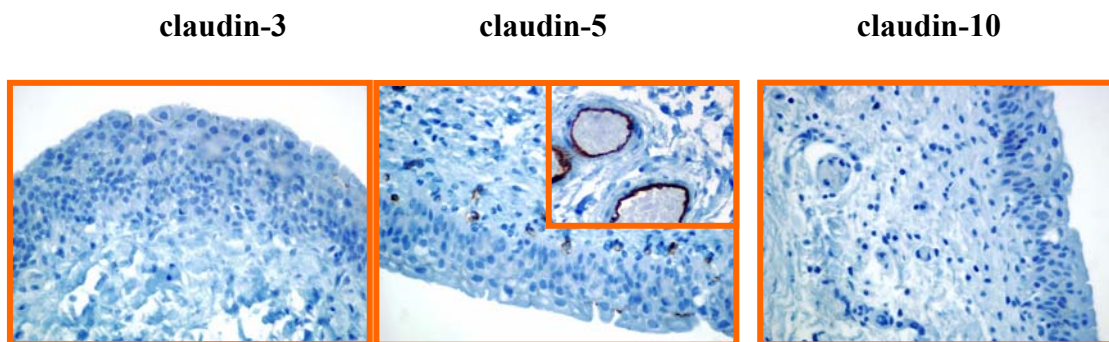
5.2.3. 3.sz. Prognosztikai vizsgálat: Claudin expresszió változásának vizsgálata hólyagrákban

Immunhisztokémiai vizsgálatok

Eredményeinket a normál hám, gyulladásos hám, húgyhólyagrák sorrendben ismertetjük. A grafikonok adattáblája, a morfológiai és a statisztikai eredmények megtalálhatók a függelék megfelelő táblázataiban.

Normál húgyhólyag urothelium

A normál urotheliumban a claudin-3, -5, -10 fehérje nem, vagy gyengén volt kimutatható (10. ábra).

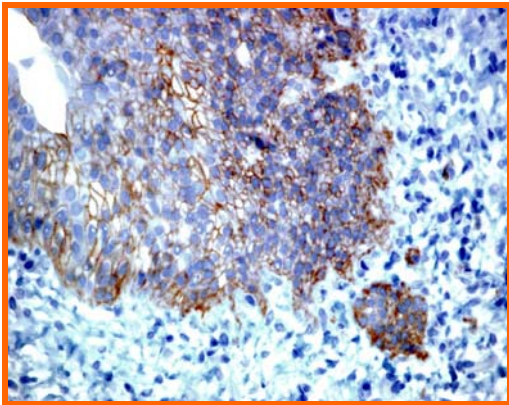


10. ábra. Normál hám

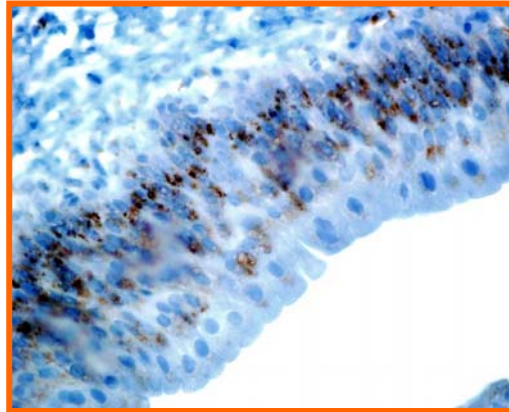
A claudin-5 az erek és kapillárisok endotheljében mindig kimutatható volt (10. ábra: inzert), így vizsgálatunk során, mint belső pozitív kontrollt is tudtuk alkalmazni a reakció megfelelő működésének igazolására.

A claudin-1 erős membránpozitív reakciót adott, mely a hám bazális és parabazális rétegeiben kifejezettebb volt. A claudin-2 peri-membránózus / citoplazmatikus reakciót adott (11. ábra).

claudin-1



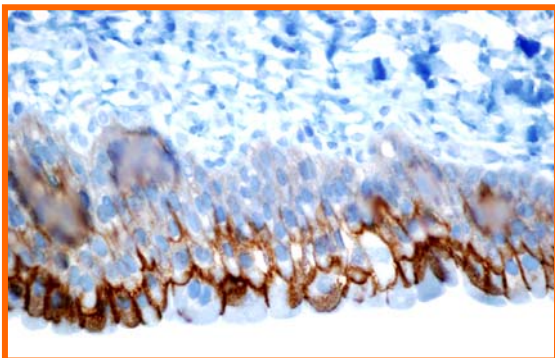
claudin-2



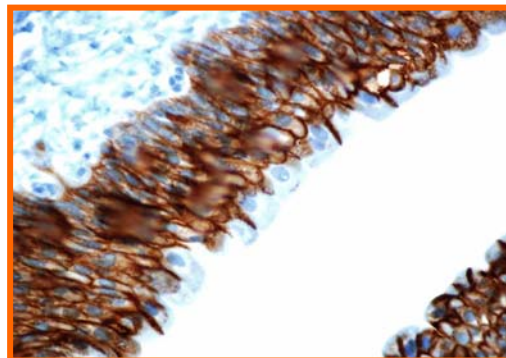
11. ábra. Normál hám

A claudin-4 és -7 erős membrán pozitivitást mutatott (12. ábra.). A claudin-4 a húgyhólyaghám lumináris felszíne felé erősebb reakciót adott. A claudin-7 a membrán teljes szélességében azonos intenzitással jelent meg.

claudin-4



claudin-7

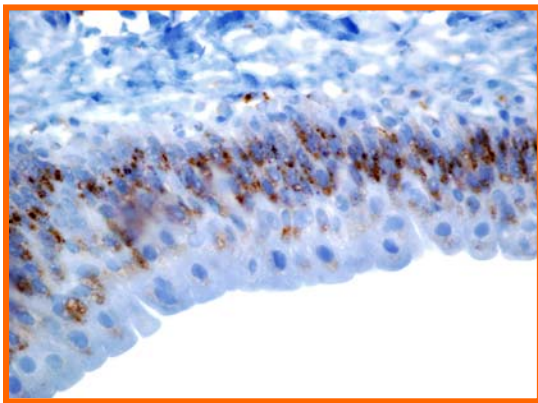


12. ábra. Normál hám

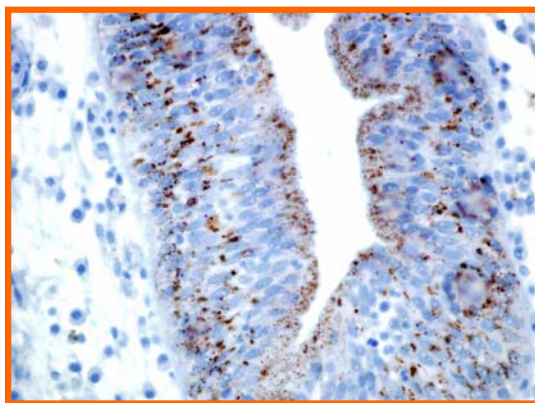
Gyulladásos hám

A claudin-1 fehérje expresszió nem mutat eltérést a normál hámhoz viszonyítva. A claudin-2 fehérje expresszió emelkedett értéket ad a gyulladásos hámokban, különösen az esernyősejtekben a normál hám esernyősejtjeihez képest (13. ábra; függelék: 17. és 18. táblázat).

Normál hám: claudin-2



Gyulladásos hám: claudin-2



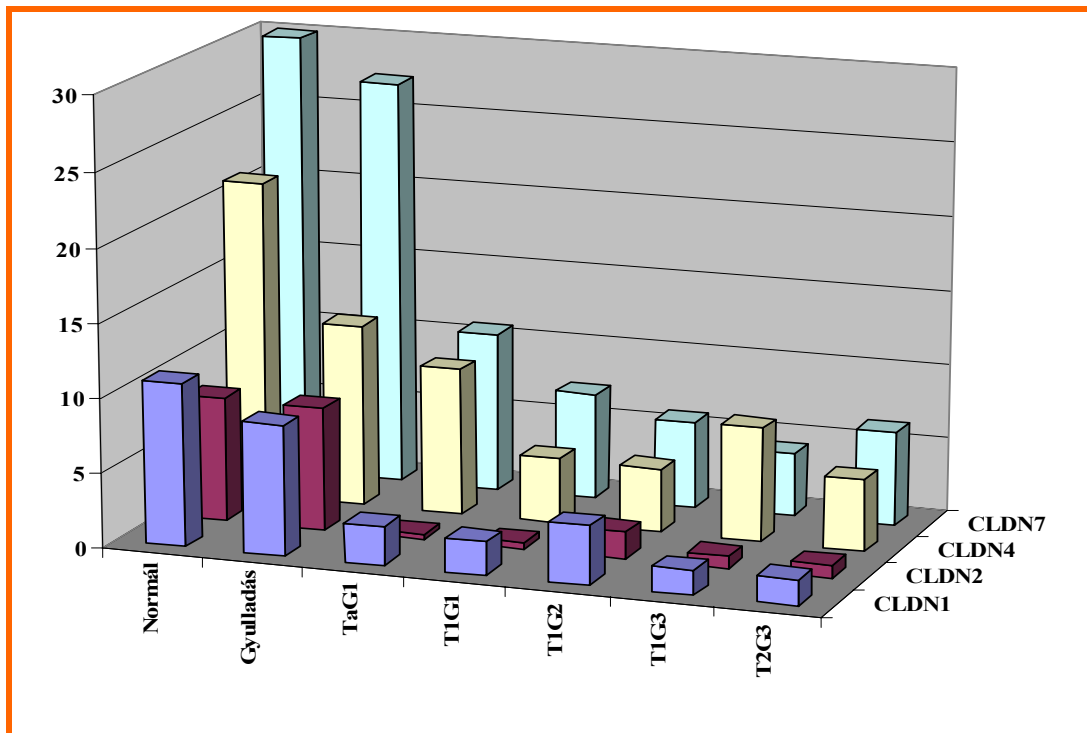
13. ábra: Normál és gyulladásos hám

A claudin-4 és -7 expresszió szignifikánsan csökkent a gyulladásos hámokban a normál hámhoz képest (claudin-4 $p=0,0059$; claudin-7 $p<0,0001$; függelék 19. és 20. táblázat).

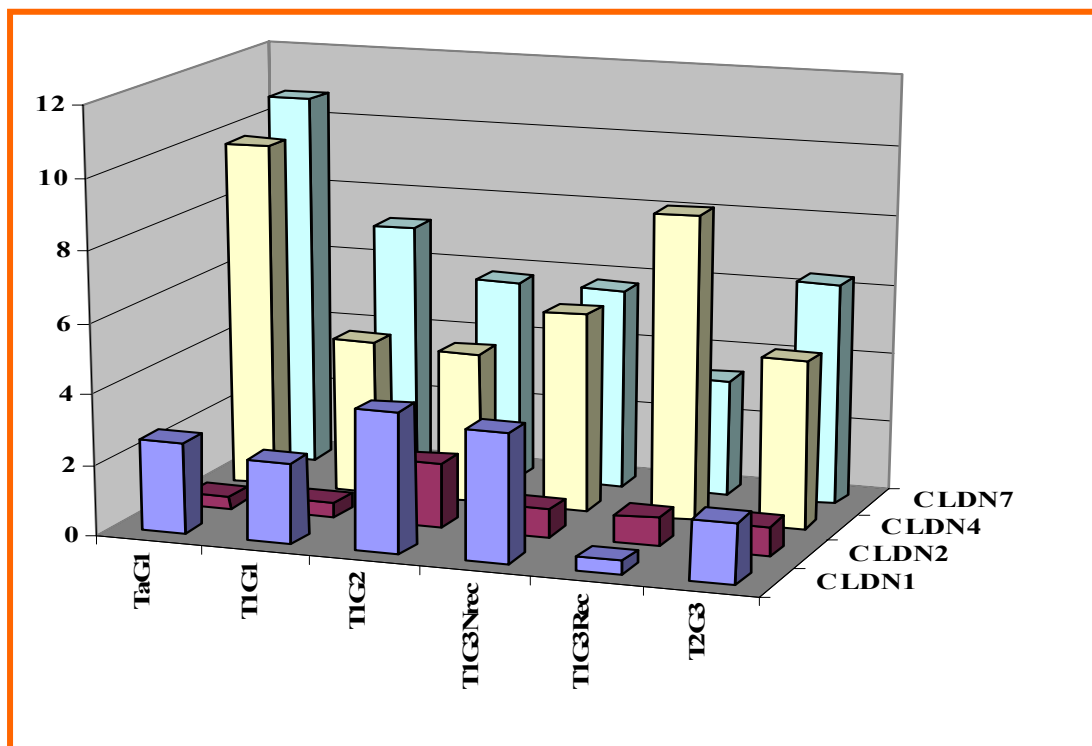
Húgyhólyagrák

A húgyhólyagrák különböző stádiumaiban (pTaG1→pT2G3) csökkent claudin fehérje expressziót találtunk mind a normál, mind a gyulladásos húgyhólyaghoz képest (14. ábra).

A pT1G3-csoport eredményeit a pT1G3 nem recidiváló és a pT1G3 recidiváló csoportokba osztottuk be. A pT1G3-as csoport fehérje expresszióját az 14. ábrán illetve a függelék 19. táblázatában, a pT1G3 nem recidiváló és pT1G3 recidiváló csoportét pedig a 15. ábrán és a függelék 21. táblázatában szemléltetjük.



14. ábra. A claudin fehérje expresszió változása (adattábla: függelék 19. táblázat)



15. ábra. CLDN fehérje expresszió változás, csoportbontással (adattábla: függelék 21. táblázatában)

A claudin-1 fehérje expresszió a pTaG1-estől a pT1G2-es stádiumig növekszik, majd a pT2-es stádiumban csökken (14. ábra; függelék: 19. táblázat). A claudin-1 fehérje expresszió szignifikánsan kisebb a recidiváló pT1G3-as csoportban a nem recidiváló pT1G3-as csoporthoz képest (14. ábra; függelék 21. és 22. táblázat).

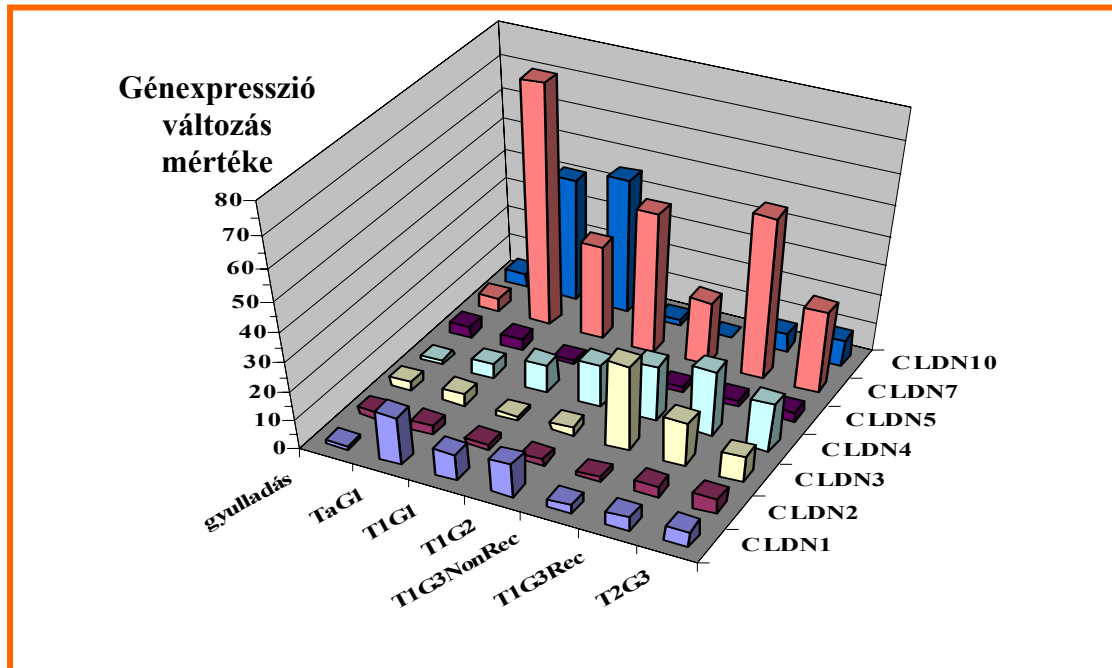
A claudin-2 fehérje expresszió (lásd 14. ábra, függelék: 7. táblázat) emelkedett a pT1G2-es tumorokban a pTaG1 és a pT1G1-es tumorokhoz viszonyítva. A pT1G3 és pT2G3-as húgyhólyagrákokban a claudin-2 fehérje expresszió csökkent a pT1G2-es tumorokhoz viszonyítva. A pT1G2-es tumorokhoz képest szignifikánsan alacsonyabb claudin-2 mRNS expressziót találtunk a pT2G3-as daganatokban. A pT2G3-as tumorokban a pT1G3-as recidiváló csoporthoz viszonyítva magasabb claudin-2 értéket találtunk. A pT1G3-as csoport és a pT2G3-as csoport között nem mutattunk ki szignifikáns eltérést a claudin-2 fehérje expresszióban (14. ábra; függelék: 19. és 23. táblázat).

A pTaG1-es tumorokhoz képest a többi tumorstádiumban szignifikánsan csökkent claudin-4 expressziót találtunk. A pT1G3-as csoportban a claudin-4 expresszió emelkedett volt a pT1G2-es csoporthoz képest (14. ábra; függelék 19. és 24. táblázat). A claudin-4 fehérje expresszió emelkedett a pT1G3-as recidiváló csoportban a pT1G3-as nem recidiváló csoporthoz viszonyítva. A pT2G3-as tumorokban a pT1G3 nem recidiváló és a pT1G3 recidiváló csoporthoz képest is csökkent claudin-4 fehérje expressziót találtunk, mely csökkenés kifejezettebb volt a recidiváló csoporthoz nézve. A többi stádium között nem találtunk jelentős eltérést (15. ábra; függelék 24. táblázat).

A claudin-7 fehérje expresszióban csökkenő tendenciát láttunk a stádium és/vagy a grade előrehaladásával párhuzamosan (TaG1→T1G3), majd az invázió megjelenésekor (pT2) az expresszió növekedését fedeztük fel a pT1G3-as csoporthoz viszonyítva. A pTaG1-es csoporthoz viszonyítva a többi tumorstádiumban szignifikánsan csökkent claudin-7 expressziót találtunk (14. ábra; függelék 19. és 25. táblázat). Az összes pT1G3-as illetve a pT1G3-as nem recidiváló tumorokban szignifikánsan csökkent a claudin-7 fehérje szintje a pT1G1-es tumorokhoz képest (14. ábra; függelék 25. táblázat). A claudin-7 fehérje expresszió szignifikánsan emelkedett a pT2G3-as tumorokban a pT1G3-as és a pT1G3 nem recidiváló csoporthoz viszonyítva. A pT1G3-as nem recidiváló és recidiváló csoportok között nem találtunk szignifikáns eltérést (15. ábra; függelék 21. és 25. táblázat).

RNS expressziós vizsgálatok

Normál és gyulladós hám



16. ábra. mRNA expressziós eredmények normál hámhoz viszonyítva (adattábla: függelék 26. táblázat)

A normál és a gyulladós húgyhólyaghám claudin mRNA expressziójában lényeges eltérést nem találtunk (16. ábra; függelék: 27. táblázat).

Húgyhólyagrák

A pTaG1 stádiumban, a normál hámhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett claudin-1 mRNA expressziót találtunk. A claudin-1 mRNA expresszió a pTaG1-estől a pT2-esig fokozatosan csökken. A pT1G3-as recidiváló tumorok a nem recidiváló pT1G3-as tumorokhoz képest, ellentétben a fehérje expresszióval emelkedett claudin-1 mRNA expressziót mutatnak.

A claudin-2 mRNA expresszió szignifikánsan emelkedett a normál hámhoz viszonyítva a pTaG1-es stádiumban. Egyéb vonatkozásban nem találtunk lényeges eltérést a claudin-2 mRNA expresszió változásában.

A claudin-3 mRNA expresszióban a normál hámphoz képest szignifikánsan emelkedett értékeket találtunk a pT1G3-as és a pT2G3-as tumorokban. A pT1G3 nem recidiváló csoporthoz képest csökkent claudin-3 mRNA expressziót mértünk a pT1G3 recidiváló csoportban, míg a pT2G3-as csoportban a pT1G3 recidiváló és nem recidiváló csoporthoz képest is csökkent expressziót állapítottunk meg. Ezen mRNA expressziós változások a fehérje expresszió vizsgálata során nem jelentek meg.

A claudin-4 mRNA expresszió esetében a normál hámphoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett expressziót találtunk a pT1G1, illetve az ennél előrehaladottabb stádiumú tumorokban. A claudin-4 mRNA expresszió a fehérje expresszióhoz hasonlóan a pTaG1-estől a differenciáltság csökkenésével (G1→G3) fokozatosan növekszik, majd az invázió megjelenésekor (pT2) csökken.

A claudin-5 mRNA expresszióban a fehérje expresszióhoz hasonlóan nem volt kimutatható lényeges eltérés az egyes tumorstádiumok között.

A claudin-7 mRNA-expresszió szignifikánsan emelkedett az egyes tumorstádiumokban a normál hámphoz képest. A claudin-7 mRNA expresszió a pTaG1-es tumoroktól a grade és/vagy stádium növekedésével csökkenő tendenciát mutat. A claudin-7 mRNA expresszió, szemben a fehérje expresszióval, a pT1G3 recidiváló csoportban emelkedett a pT1G3-as nem recidiváló tumorokhoz képest. A pT2G3-asban a pT1G3-as recidiváló csoporthoz képest csökkent claudin-7 mRNA expressziót találtunk.

A claudin-10 mRNA expresszió szignifikánsan emelkedett a pTaG1 és a pT1G1-es tumorokban, mely emelkedés nem volt kimutatható fehérje szinten. A többi stádiumban nem fedeztünk fel eltérést a claudin-10 mRNA expresszióban a normál hámphoz viszonyítva (16. ábra; függelék: 26. és 27. táblázat).

6. Megbeszélés

A húgyhólyagrák igen gyakori előfordulású rosszindulatú megbetegedés, világszerte évente 200.000 új esetet diagnosztizálnak férfiakban és 60,000-et nőkben (149.). A hólyagrák ezzel a második leggyakoribb urológiai rosszindulatú daganat. Szövettani típusát tekintve a malignomák 94 %-a átmenetisejtes daganat. E tumorok felismerésének vezető tünete a mikroszkópos és a makroszkópos vérvizelés. Napjainkban számos tumormarkerrel történnek vizsgálatok, melyekkel a jobb gyógyulási eséllyel kecsegtető korai diagnózis felállítása a cél. Biztos szövettani eredmény a daganat transurethralis eltávolítása, illetve méretétől függően,

biopsziája után végzett hisztológiai vizsgálat során adható. A további kezelés és várható előrejelzés nagymértékben függ a daganat pathológiai stádiumától és differenciáltsági fokától. Alapvetően két nagy csoportot különítünk el: a nem-izominvazív (Ta, T1), és az izominvazív (T2-4) daganatokat. Az előbbi csoportot tovább tagoljuk alacsony, közepes és magas kockázatú (Tis, T1G3) esetekre (150).

A tumor stádiuma mellett fontos prognosztikai faktor a differenciáltsági fokozat. Míg a nem-invazív papilláris tumorok többségében alacsony (G 1-2), addig az invazívan növekvő daganatok magas (G 3) fokozatúak. Az összes nem izominvazív hólyagdaganat 10-20 %-a azonban invazív tumorrá alakul vagy metasztatizál. Számos kutatás célja a betegség előrejelzését meghatározó további klinikai, patológiai faktorok kimutatása (151-157). Amennyiben sikerülne pontosabban megbecsülni a betegség várható lefolyását, a magasabb kockázatú tumort hordozó betegek szorosabb követését vagy korábban történő radikális műtéti ellátását lehetne javasolni (158-160).

Az értekezés előző fejezeteiben a munkacsoportunk által végzett új diagnosztikai eljárások és prognosztikai faktorok vizsgálatainak részleteit és eredményeit ismertettük.

A vizelet citológiai vizsgálatát szűrővizsgálat jelleggel 1945 óta használták a hólyagrák szempontjából magas kockázatú személyeken. A noninvazivitásából származó előnye mellett vizsgálófüggősége és a differenciált daganatok esetében mérsékelt szenzitivitása az eljárás hátránya (161). Az elmúlt években számos tumor markert, speciális citológiai vizsgálatot fejlesztettek és próbálták ki a hólyagdaganat kimutatására. Ezen eljárások közül a legtöbb közlés a BTA tesztről, az NMP22-ről, TPA-ról, fibrin degradációs termékekről, telomeráz aktivitás méréséről, a mikroszatellita analízisről és a fluoreszcens in situ hibridizációs módszerről (FISH) született (162-167). A vizelet citológiát és a cystoscopiát teljes mértékben kiváltó módszer nem jött létre, de a vizsgálatok kombinációjával magas érzékenység és specificitás érhető el.

Tumor markereknek tekintünk minden olyan test azonos anyagot, amelynek megjelenése vagy koncentrációjának jellemző változása jelzi a tumor jelenlétét, annak fejlődését, változását. Jelenleg nincs olyan anyag, amely ezen követelményeknek maradéktalanul megfelelni képes.

A TPA az emberi ráksejtek membránjában termelődik és aktívan szekretálódik a testfolyadékokba. Univerzális tumor-asszociált antigénnek tekinthető, mivel a daganat lokalizációtól függetlenül emelkedett értéket mutat (145). Adolphs és Oehr egészséges, különböző nem hólyagdaganatos urológiai beteg és 75 hólyagdaganatos beteg szérumban és vizeletében vizsgálta a TPA-t (168). Jelentős különbséget találtak egészséges és rosszindulatú

hólyagdaganatos betegek szérum TPA koncentrációja között. Magas százalékban emelkedett a nem-izominvazív daganatok esetében is a TPA, a stádiummal korrelációt azonban nem találtak.

Van Poppel és munkatársai a TPA szérum szintjét az összes Ta-T1 hólyagtumoros esetben normálisnak találta, míg T2-T3 stádiumú esetekben 80 %-ban emelkedettnek. T4 stádiumban ill. kismedencei nyirokcsomó áttétek esetében a betegek 86 %-ban volt emelkedett a TPA (169). Tizzani és munkatársai 67 hólyagtumoros beteget vizsgált és a TPA érzékenységét 60 %-osnak találta (170). Vogel és Oehr hasonló beteganyagban 90 %-os szenzitivitást mutatott (171). Correale és Arnberg 50 és 80 % közötti érzékenységet mutatott ki tüdő, kolorektális és hólyagrákos betegekben is (172). Romics és munkatársai Ta-T1-es hólyagtumoros esetekben 57 %, T2 stádiumban 62 % és T3-T4 stádiumban 83 %-ban találták a szérum TPA szintjét emelkedettnek (173). Szoros korrelációt mutatattak ki a szöveti differenciáltsági fokkal. Ecke és munkatársai összehasonlították a TPA, a HER-2/neu és a urokináz plazminogén aktivátor szenzitivitását hatvan hólyagrákos betegen és sorrendben 68, 87, 79 %-osnak találták (174).

Saját eredményeink feldolgozása során a daganat stádiumával tudunk szignifikáns összefüggést kimutatni, míg a daganat differenciáltságával nem mutatott szignifikanciát a szérum TPA érték (164).

Jelenleg a TPA legnagyobb jelentőségét a betegkövetés során látják. Több kutató szerint a marker értéke jól korrelál a betegség regressziójával, progressziójával. Schmidt és munkatársai előrehaladott hólyagdaganatos betegek MVAC terápiája során észlelték a TPA szint változását a klinikai stádiummal párhuzamosan (175). Pectasides és munkatársai és van Poppel egymástól függetlenül a TPA szint monitorozását hasznosnak találta a hólyagrákos betegek követésében (169,176). Spanyol kutatók 421 beteg vizsgálata és követése során arra a megállapításra jutottak, hogy a TPA értéke összefügg a daganat stádiumával, differenciáltságával, nyirokcsomó státuszával és a távoli áttétekkel, de nem alkalmas a recidívák előrejelzésére, nem használható a betegség prognózisának jóslására (177).

A fentiek alapján a tissue polypeptid antigén önálló alkalmazása a hólyagdaganatok kórismézésére és követésére nem elegendő. Az irodalmi adatok alapján a betegség követésében a diagnosztikai fegyvertár fontos része lehet, kiegészítve más markerekkel, mint az MNP 22, survivin, telomeráz, a mikroszatellita analízis, UroVysion.

Az UroVysion nevű, fluoreszcens in situ hibridizációs módszert 2000-ben fejlesztették ki és 2001. július óta az FDA elfogadta az eljárást az urothelialis carcinomák kimutatására.

Halling és munkatársai 265 beteg vizeletének vizsgálatát végezték közvetlenül

cystoscopy előtt. Összehasonlították a BTA teszt, hemoglobin stix, telomeráz teszt és az UroVysion eljárás érzékenységét és specificitását (130). A négy módszer közül az UroVysion szenzitivitását (81 %) és specificitását (96 %) találták a legmagasabbnak. Szenzitivitás szempontjából a BTA teszt (78 %), míg a specificitás alapján a telomeráz reakció (91 %) volt a következő érzékenységu vizsgálat. Skacel és munkatársai 120 beteg vizeletének fluorescens in situ hibridizációs vizsgálatával a módszer érzékenységét 85 %-nak találták (178). Kiemelték, hogy a metódus a daganat jelenlétét 9 esetből 8 alkalommal a negatív vizelet citológia mellett és in situ carcinoma esetén is jelezte. Bollmann és munkatársai 47 hólyagtumoros beteg esetében UroVysion módszerrel a kromoszóma eltérések súlyossága és a betegség progressziója között szoros összefüggést találtak (131). Hajdinjak 14 centrum, 2477 UroVysion vizsgálatának meta-analízisét elvégezve a módszer szenzitivitását 72 % (69 %-75 %)-nak, specificitását 83 % (82 %-85 %)-nak találta (179).

Saját vizsgálatunkban a módszer szenzitivitását 87 %-nak, specificitását 100 %-nak találtuk, ugyanakkor a talált genetikai eltérések nem mutattak egyértelmű összefüggést a progresszióval. A nagyobb méretű és/vagy súlyosabb grade-del bíró esetekben jellemzően könnyebb volt a diagnózis felállítása a diagnosztikai kritériumoknak megfelelő sejtek nagyobb száma miatt. A tumorsejtek fenotípusa esetenként nagyban egyezett a normál sejtekével (3. ábra), ami jelzi a genetikai eltérések kimutatása nélküli, pusztán vizeletcitológiára alapozott tumordiagnosztika korlátozott lehetőségeit (180).

Pécsi kutatócsoport az UroVysion diagnosztika további finomításáról és a szenzitivitás 97,3 %-ra, illetve a specificitás 96,1 %-ra emeléséről számolt be. Módszerük szerint a vizsgálat előtt immunhisztokémiai segítséggel kiválasztják a citokeratin-7 pozitív sejteket és csak ezeken a célsejteken értékelik az UroVysion FISH vizsgálatot (181).

A daganatok keletkezésével és progressziójával összefüggő genetikai háttér bonyolultságára utal, hogy az „alap” elváltozások, a 9p21 deléció illetve a 3/7/17 multiplikáció előfordulásán túl egyes esetekben a 3/7/17-hez társulva 9p21 multiplikáció is megfigyelhető volt a daganatsejtekben (4. ábra), míg máskor a 3/7/17 kromoszómák felszaporodása 9p21 delécióval társult (3. ábra). A 9p21 multiplikáció valószínűsíthetően nem egy specifikusan a 9p21 régiót érintő amplifikációt, hanem a 9-es kromoszóma megsokszorozódását jelzi (a genetikai / kromoszómális instabilitás jeleként).

Az UroVysion módszer esetében a minták végső értékelhetőségét számos tényező befolyásolhatja. Technikai problémák (nem időben megkezdett feldolgozás, a sejtek túl sokszori vagy túl kevés mosása, stb.), illetve magának a vizeletmintának a sajátosságai (a vizelet kémiai jellemzői, a tumorokat gyakran kísérő gyulladás miatti masszív granulocytá-

ürítés, bakteriuria, a vizelet ürítésének időpontja /reggeli első vizelet vagy forszírozott folyadékbevitel után napi második ürítés/, stb.). A technikai feladatok megfelelő szervezéssel és a metodika előírásainak szigorú betartásával jórészt kiküszöbölhetőek, azonban a vizelet inherens jellemzői gyakran értékelhetlenné tehetik a mintát. Így a túl sok granulocita jelenléte és hámsejtekhez asszociációja rendkívül megnehezíti az értékelést, úgy mint a masszív bakteriuria (7. ábra), mivel ez esetben a leginkább Spectrum Gold tartományban fluoreszkáló baktériumoknak a sejtekhez tapadása gyakorlatilag lehetetlenné teszi a 9p21 jelek korrekt észlelését. Az éjszaka során gyűlő, koncentráltabb reggeli első vizeletben feldúsulhatnak a sejtek, ami kevés tumorsejt esetén kedvező, de pl. a granulocyták feldúsulása ronthatja a minta minőségét. Mindezekon túl az értékelést végző személy hozzáértése, tapasztalata is kritikus tényező lehet. Fontos például, hogy ne értékeljünk kromoszóma multiplikációként egyes sejtek egymásra csúszásából adódó többszörös jeleket. Ez utóbbi elkerüléséhez elengedhetetlen a magfestés (DAPI) csatornáját is mindig külön gondosan megvizsgálni. A vizeletminták változó minőségéből adódó hibák kiküszöbölésében segíthet és tapasztalataink szerint nagyban képes csökkenteni az értékelhetetlen esetek számát, ha mind a reggeli első, mind a forszírozott folyadékbevitel utáni napi második vizeletürítésből származó mintán elvégezzük az UroVysion vizsgálatot.

Az UroVysion FISH módszerrel végzett vizsgálatok eredményeiről elsőként számolunk be hazánkban. A különleges követelményeknek megfelelő technika elsajátítása után az eljárás érzékenysége és specificitása hasonlóan alakult a saját anyagunkban, mint a nemzetközi közleményekben megjelent adatok. Mind önmagában, mind a vizelet citológiával kiegészítve kitűnő eredmények születtek. Ennek ellenére a módszer a magas költség és időigényessége miatt a hazai rutin gyakorlatban nem valószínű, hogy a közeljövőben elterjed. Jelenleg a cystoscopos vizsgálatot véglegesen kiváltani nem képes.

A molekuláris biológiában és molekuláris patológiában történő fejlődés nagymértékben befolyásolja a daganatkutatás és ezen belül a hólyagrakkokkal kapcsolatos vizsgálatokat is. A módszerek közül a közelmúltban nagy jelentőséget kapott a genetikai mikroszatellita analízis. A vizsgálatok alapját az biztosítja, hogy a gének közt, illetve az intronok közt és a promóter régióban is ismétlődő, 2-5 nukleotidból felépülő, konzervatív, Mendeli szabályok szerint öröklődő rövid DNS szekvenciák vannak. Ezek a mikroszatellita régiók nagyon megőrzöttek, az egyed minden sejtjében azonosak és mintázatuk csak kóros körülmények között változhat meg a szövetekben. A mikroszatellita DNS szekvenciák rövidülése, eltűnése jelzi a szomszédos génterületek sérülését. A genomikai instabilitás, a heterozigotáság elvesztése (LOH) tehát jól vizsgálható a mikroszatellita marker analízissel.

Az eltérések kimutatását magából a tumorból is lehet végezni, de szerencsés esetben a daganattal kapcsolatba kerülő testfolyadékok is alkalmasak a kimutatáshoz (17,32,33). A hólyagrák esetében adódik a logikus feltételezés, hogy a vizelet vizsgálatának segítségével adjunk választ a daganat meglétére. Ehhez azonban ismerni kell azt a tényt, hogy a vizsgálni kívánt szövetből vagy folyadékból nagy tisztaságú genomikus DNS-re van szükség. A módszer előnye, hogy a vizeletből való kimutatás nem igényel invazív beavatkozást, így a betegre nem jelent semmiféle kockázatot. A módszert jelenleg a rutin diagnosztikában nem használják, de a későbbiekben több területen is segítséget nyújthat. Lehetségesé válhat a használata, - mint tumor marker - a daganat kimutatására panaszmentes, veszélyeztetett populációban. Segítséget nyújthat a diagnózisban a tünetekkel orvoshoz forduló betegeknél. Az ismert betegség követése során a recidívák minél korábbi jelzésére, az alkalmazott kemoterápia vagy sugárterápia eredményességének mérésére, a tumor várható viselkedésének, progressziójának meghatározása. Jelenleg a módszer érzékenységének és specificitásának növelése, illetve az eredmények pontos felmérése a kutatások célja. Saját anyagunkkal ebben a fejlődésben kívántunk segíteni.

Vizsgálataink során sikerült igazolni, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően a 9-es kromoszóma rövid és/vagy hosszú karján történő allélvesztés a leggyakoribb genetikai károsodás. 44 beteg mintáinak feldolgozása során a módszer a tumor szövetek 85 %-ában talált legalább egy deléciót, míg a vizeletből történő kimutatás érzékenysége 68 és 80 % között változott attól függően, hogy a vizelet mely részét vizsgáltuk. A tumorban talált deléciók 67 %-a a vizeletben is kimutatható volt (182).

Sikerült azt a feltételezésünket igazolni, hogy a vizelet felülúszó sejtmentes DNS-ének mikroszatellita analízisével magasabb érzékenység érhető el, mint a vizelet üledékkel (80 % és 68 %). Így a vizelet frakciók külön vizsgálatával a módszer hatékonysága javítható volt. Feltételezésünket arra alapoztuk, hogy a felülúszó vizsgálatokor túlnyomórészt a tumorból származó DNS-t elemezzük. Így a vizelet üledékénél, mely a hólyagfal normális lesodródott hámsejtjeit is tartalmazza, kisebb arányú egészséges DNS-szennyeződéssel zavarjuk meg a vizsgálatot. A plazmából a sejtmentes DNS kimutatását már 1948-ban megvalósították, de olyan molekuláris technológiák és genetikai ismeretek nem álltak rendelkezésre, hogy a diagnosztikába ezt akkor beépítsék (183). 1977-ben Leon munkacsoportjának sikerült igazolnia, hogy a szabad DNS tartalom a hasnyálmirigygyrákos betegek szérumában emelkedett és ez a tumorból származik (184). Ezután a kutatások felgyorsultak és kimutatták, hogy a daganatokból származó DNS, természetesen a daganat típusától függően, különböző százalékban megjelenik a szérumban, a pleurális folyadékban, a liquorban és a vizeletben is.

Jelenlegi ismereteink szerint a DNS, a sejtek apoptózisával, illetve nekrozisával jut a keringésbe és egyéb testfolyadékba (185-188).

A vizsgálatunk során természetesen a különböző vizeletfrakciók mikroszatellita analízisének specificitására is választ kívántunk kapni. A specificitás a vizelet üledék esetében volt kedvezőbb; 95 % a beteg kontrolloknál és 88 % az egészséges személyek vizeletét vizsgálva. Ezzel szemben a vizelet felülúszóban 80 és 81 %-os specificitás volt tapasztalható. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az egészséges, illetve nem tumoros személyek vizelet felülúszójában alacsonyabb koncentrációban van jelen a DNS, ezért több az amplifikációs hiba következtében hibásan pozitívnak mutatózó lókuszt.

Miután a vizelet felülúszó magasabb érzékenységet biztosít tumor jelenlétében, specificitása viszont alacsonyabb, a már diagnosztizált tumor monitorozására valószínűleg a vizelet felülúszó alkalmazása ajánlható, míg az első alkalommal történő kimutatásra a vizelet üledék látszik alkalmasabbnak.

A továbbiakban a prognosztikai vizsgálatokkal szerzett tapasztalatainkat részletezzük az irodalmi adatok tükrében. Elsőként az invertált papillomával operált betegek prospektív követését végeztük.

Invertált papilloma megjelenése a vizeletelvezető rendszerben ritkán fordul elő. A húgyhólyagban diagnosztizált összes daganat, beleértve a benignus és a malignus elváltozásokat is, 2,2 %-át teszik ki az invertált papillomák (189). Mai napig kevesebb, mint 500 húgyhólyag invertált papillomáról számolt be az irodalom, de ezek többsége esettanulmány és csak 8 olyan publikáció olvasható, amely 10 esetnél többet vizsgál (190,191). Szervezetünkben a leggyakrabban az arcüregben és a felső légutakban találkozhatunk invertált papillomával, de természetesen az itt észlelt daganatok felszínét nem urotheliális hám borítja.

Az elnevezésében található papilloma szó jelezheti a vizsgáló számára, hogy egy jóindulatú elváltozásról van szó, de nagy beteganyagot elemző közlemény, amely ebben határozottan állást foglal, kevés létezik. Az invertált papillomák hosszú távú követésével kapcsolatosan még nem születtek I-es evidencia szintnek megfelelő eredmények.

Az első húgyhólyag invertált papillomát Paschkis közölte 1927-ben, miután 4 betegben talált „adenomaszerű polipust” (23). Az invertált papillomát, mint hisztopathológiai fogalmat először Potts és Hirst használta 1963-ban (192). Az invertált papilloma (átmenetisejtes papilloma, invertált típus) a húgyhólyag egy ritka, jóindulatú daganata. A daganatot szabályos, transitiocellularis sejtek alkotják, kis fészkekbe rendeződve, minimális sejt atípiával. Az elváltozást általában normál urothelium fedi. A két legfontosabb kérdés az

invertált papillomával kapcsolatban a daganat kiújulása és a malignizálódása. Nagy beteganyagot átfogó vizsgálat kevés található az irodalomban, amelyekből korrekt választ kaphatnánk (190,191,193). A másik probléma a pontos, minden kétséget kizáró szövettani diagnózis meghatározása. Sung és munkatársai a 75 húgyúti, köztük 67 hólyag invertált papillomát követtek, átlagosan 68 hónapig. Malignus elfajulást nem észleltek, egy betegüknél írtak le recidívát. Következtetésként a komplett reszekció után szükségtelennek tartják a betegek szigorú, hólyagráknak megfelelő protokollok szerinti követését (194). Az elméletük genetikai alapjait is próbálták feltérképezni és mikroszatellita vizsgálatot végeztek 39 invertált papillomán. Eredményeik alapján a heterozigótaság elvesztésének aránya a vizsgált kromoszómákon szignifikánsan kisebb arányú volt a hólyagrákokhoz képest (194).

Európai tanulmányok között a legnagyobb betegszám Witjes és munkatársai munkájában áll rendelkezésünkre, ahol 37 beteget követtek átlagosan 34 hónapig. Egy betegnél találtak 49 hónappal az invertált papilloma műtéte után pTaG1 hólyag tumort (191). A férfi:nő arány 5,2:1 (31:6). Az átlagos életkor 60,3 év volt tanulmányukban. A két leggyakoribb tünet a haematuria (43 %) és a nehézzvizelés (23 %) volt. A daganat, mely mérete néhány millimétertől 3 centiméterig terjedt 67 %-ban a hólyagnyakon vagy a trigonumon, 13 %-ban az oldalfalon és 13 %-ban a prosztatikus húgycsőben helyezkedett el. Miután az invertált papillomát normál urothelium fedi, a citológiai vizsgálatot bár elvégezték, minden esetben normál eredményt hozott. Witjes végkövetkeztetése szerint, amennyiben biztos a szövettani diagnózis felesleges a hosszú távú, szoros ellenőrzése a betegeknek. Japán szerzők 20 éves anyagukban 35 invertált papillomát találtak, szintén erős férfi dominanciával (31:4) (190). Két betegüknél egy időben húgyhólyagrákot is diagnosztizáltak és másik két betegüknél 16, illetve 30 hónap múlva az invertált papilloma kiújulását észlelték. Következtetésük alapján a kiújulásra és malignizálódásra hajlamos invertált papillomát minimum két évig úgy kell követni, mint egy alacsony grade-ű transitocellularis carcinomát. Hasonlóan szoros és cystoscoppal való ellenőrzést javasolnak Castello és munkatársai. Ezt azzal indokolják, hogy 16 invertált papillomás betegük között két alkalommal is találtak a követés során hólyagrákot (197). Kobayashi 9 beteget figyelt meg és nem mutatott ki recidívát vagy hólyagrákot (195). Nyolc esetben a hólyagnyakon volt a tumor, egy alkalommal a hólyagfalon. A makroszkópos kép alapján egy daganatot írtak csak le papilláris típusúnak. Szövettani feldolgozás során megkülönböztettek glanduláris, trabekuláris és egy kevert csoportot. Marquez Moreno a húgyhólyag multiplex invertált papillomatózisának egy esetét közölte (197). Néhány esetben leírták az invertált papillomát a felső húgyúti traktusban és a disztális húgycsőszakaszban is (190,191,198-200). A témában az első hazai publikáció

Kisbenedek és munkatársai munkájuként jelent meg, mely dolgozat legnagyobb értékét az adja, hogy a hat eset között egy vesemedence invertált papilloma is volt (200). Szapanidinisz és munkatársai a Szent János Kórházból négy invertált papilloma klinikai és szövettani jellemzőit ismertetik, melyek közül az egyik esetben szinkron hólyagrákot, míg egy másik betegnél ugyanazon hólyagelváltozásban invertált papillomát és átmeneti sejtes karcinómát is felfedeztek (201). A rövid 6-12 hónapos követési idő alatt recidíva nem következett be.

Saját eredményeink alapján,- bár ebben, mint a fentiekben látható az irodalom nem foglal teljesen egyformán állást,- az invertált papillomával kezelt betegek követését a primer pTa G1 hólyagrágoknak megfelelően ajánljuk. Ennek megfelelően vizelet üledékvizsgálat és hasi ultrahangvizsgálat javasolt az ellenőrzések során (202).

Az E-cadherin az egyik leggyakrabban vizsgált sejtadhéziós molekula. Az adhéziós molekulák szerepe a daganatokban összetett, mivel expressziójuk változása befolyásolhatja a tumorsejtek motilitását, ezáltal segíthetik metasztázisok kialakulását (203-207).

Az E-cadherin a cadherinek családjába tartozó, Ca^{2+} -dependens sejtadhéziós molekula. Az epitheliális sejtek felszínén expresszálódva, homológ, zipp-zár szerűen kapcsolódva alkotja a zonula adherensnek nevezett sejtkapcsoló struktúrát. A molekula intracellulárisan a sejtek aktin filamentumaihoz rögzített, egy több komponensből álló fehérjekomplexum révén. A hámszövet integritásának biztosításán túl szerepet játszik a neuruláció folyamatában, mivel az ectodermáról lefűződő sejteken expressziója csökken (208).

Az E-cadherint tumor szuppresszorként említi az irodalom, bár az adhéziós molekulák patofiziológiai szerepe ellentmondásos. Jelenlétük akadályozza a tumorsejtek alapszövetből történő kiválását, így csökkenti motilitásukat, ugyanakkor paradox módon előnyös lehet távoli metasztázisok kialakulása szempontjából. Az E-cadherin immunhisztokémiai kimutatása egyes tumorok esetében komoly differenciáldiagnosztikai jelentőségű (pl. ductális / lobuláris emlőcarcinoma). Az expresszió elvesztése ugyanis gyakori a tumorokban és szerepet játszhat azok progressziójában. Bizonyos esetekben az expresszió helyreállítható D3-vitamin adagolással (203-207).

Az E-cadherint a CDH1 gén kódolja, mely a 16-os kromoszóma hosszú karjának 22.1-es lókusznál helyezkedik el (16q22.1). Expressziójának elvesztése többféle módon következhet be: a molekula expressziójának szabályozási zavara útján, génmutációval (deléció, pontmutáció), illetve promoterének hipermetilációjával. A CDH1 gén promoterének hipermetilációja és az abnormális E-cadherin expresszió között összefüggés mutatható ki egyes szerzők szerint (209-214). Cai és munkacsoportja az E-cadherin mRNS expresszióját

vizsgálta 30 hólyagrákos betegen, akiket 12 évig követtek. Eredményeik alapján szignifikáns összefüggést találtak a daganat stádiumával ($p=0,02$) és differenciáltságával ($p=0,08$). Többváltozós statisztikai analízis során az E-cadherin mRNS expressziójának változását független prognosztikai tényezőnek találták a daganatspecifikus túlélésben (215).

Saját vizsgálataink alapján az E-cadherin expresszióknak nincs kimutatható összefüggése a tumor fokozatával, klinikai stádiumával, ill. a hosszú távú túléléssel (216). Ezen adatok némiképpen ellentmondanak más munkacsoportok által megállapítottakkal, megjegyzendő azonban, hogy szinte minden munkacsoport más eredményre jut az E-cadherin expresszió, a tumor stádium, grade, ill. túlélés adatainak értékelése során (59-63). Nagy, átfogó vizsgálatra jóval több beteg adatainak elemzésére lenne szükség egy végső konklúzió eléréséhez.

Harmadik prognosztikával és egyben a hólyagrák carcinogenezisével foglalkozó vizsgálatunk a claudinok szerepének vizsgálata volt. A normál hámban a claudinok extracelluláris hurkait a TJ egyéb struktúrái elfedhetik, ezért nem vagy nehezen mutathatóak ki immunhisztokémiai módszerrel, még akkor is, ha e fehérjék magas szinten vannak jelen a sejtekben. A normál hámmal szemben a tumoros szövetekben a TJ átstrukturálódása következik be, melynek során megváltozhat a claudinok elhelyezkedése, illetve a claudin fehérje mennyisége is. A TJ-ök átstrukturálódása során a claudinok extracelluláris hurka a claudin antitestek számára hozzáférhetővé válhat (217).

A gyógyszeres terápia során léteznek olyan specifikus módszerek, mint az antitest-alapú terápia, amely segítségével jelentősen csökkenthetőek a konvencionális kemoterápia során jelentkező mellékhatások. A mai onkológiai gyógyszeres kutatások eredményeként egymás után jelennek meg a különböző daganatokra specifikus monoklonális ellenanyagok, illetve célzott biológiai fegyverként alkalmazható tirozin-kináz receptor-gátló hatóanyagok. Offner és munkatársai felvetik, hogy a claudin ellen irányuló antitesteknek is lehetne hasonló szerepük a daganatok kezelésében (217). A jelenlegi kereskedelmi forgalomban elérhető claudin ellenes antitestek a claudinok intracellulárisan elhelyezkedő karboxi-terminálisához kötődnek, ezért az immunhisztokémiai reakció, az antitest bekötődése csak mesterséges antigénfeltárás vagy sejtlízis, nekrozis esetén jöhet létre. A claudinok extracelluláris hurkait felismerő antitestek kifejlesztésével jelentős előrelépést lehetne elérni a claudinok, mint terápiai célpontok felhasználásának területén.

A *Clostridium perfringens* enterotoxinjáról (CPE) már több mint 15 éve ismert, hogy említi sejtken gyors, direkt citolízist okoz (218). A közelmúltban a claudin-3-at és -4-et a CPE receptoraként írták le (219, 220).

A claudin-3 és -4 overexpresszált ovariális karcinómában. Az ovariális karcinóma dózisdependens citotoxikus visszahatással reagál a CPE kezelésre. Xenograft egérkísérletekben a CPE-nek szignifikáns gátló hatása volt a tumorprogresszióra, valamint a túlélés jelentősen meghosszabbodott (121).

Normál prosztatahámában a claudin-3 és -4 expressziós szintje magas, prosztatákban viszont csak a claudin-3 szintje marad magas. Ez a tulajdonság az androgénhormon független csontmetasztázis tumor sejteiben is kimutatható, így a claudin-3 új potenciális terápiás célpont lehet a prosztaták kezelésében (90).

Hasnyálmirigy tumorok többségében, hasonlóan a többi gasztrointesztinális tumorhoz a claudin-4 expresszió szintje emelkedett. A CPE-val történő kezelés akut dózisdependens citotoxikus hatást vált ki, mely hatás kizárólag a claudin-4 pozitív sejteken az expresszió mértékétől függő választ vált ki. A pancreas tumor egér xenograft modellben a CPE injektálása tumor lízist okozott (222).

Saját vizsgálatunk során a claudin-3 nem, vagy csak gyengén volt kimutatható. Ebből kifolyólag a claudin-3 nem lesz terápiás célpont a húgyhólyagrak antitest-alapú kezelésében. A claudin-4 azonban, mely fehérje és mRNS szinten is detektálható volt, szóba jön, mint lehetséges terápiás célpont. Boireau és munkatársai leírták, hogy a progresszió elején, a differenciáltabb tumoroknál túlexpresszálódik a claudin-4, majd az anaplasztikus/izominvazív húgyhólyagrakokban jelentős csökkenés következik be a claudin-4 expressziós szintjében. Kutatásaik során vizsgálták még a claudin-1-et illetve -7-et, de e fehérjék expressziójában nem találtak lényeges eltérést a különböző differenciáltságú tumorok között. A húgyhólyagrakokat két részre osztották fel: jól differenciált illetve anaplasztikus/izominvazív tumorokká. (223). Ezzel szemben vizsgálataink során 8 különböző csoportot elemeztünk. Összesen 6 tumor stádiumot illetve normál és gyulladós hámokat hasonlítottunk össze a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 expresszió tekintetében (104, 224).

Eredményeink alapján a gyulladós és a normál húgyhólyaghám között sem fehérje-, sem mRNS-szinten nincs lényeges eltérés a claudin-1, -3, -5, -10 expresszióban. A normál húgyhólyaghám és a húgyhólyagrak stádiumai eltérő claudin expressziót mutatnak.

A claudin-2 fehérje expresszió a gyulladós hámokban átrendeződik és emelkedett értéket mutat a gyulladós hám esernyősejtjeihez képest. Ez alátámasztja, hogy a claudin-2 fehérje megjelenés a hámokban az átérésztőképesség megnövekedését eredményezi (225,226,227). A claudin-3, -5, -10 valószínűleg nem játszik lényeges szerepet a húgyhólyagrak progressziójában.

Vizsgálatunk alapján a pT1G3 szövettani stádiuma a claudin expresszió és a recidívahajlam tekintetében is köztes helyet foglal el a pT1G2 és pT2G3 tumorok között. A pT1G3-as betegek heterogén csoportot alkotnak a claudin expresszió és a biológiai viselkedés tekintetében. A nem recidiváló, illetve a recidiváló pT1G3-as tumorok eltérő claudin expressziót mutatnak. A claudin-1 csökkent expressziója együtt jár a recidívahajlam növekedésével. A claudin expresszió, mint prognosztikai faktor vizsgálata lehetőség nyújthatna a pT1G3, malignus nem-izominvazív tumorok pontosabb besorolására és így a megfelelő korszerű terápia kiválasztására. Jelen dolgozat esetszámának növelésével a statisztikai adatok megerősíthetőek.

Vizsgálatunk alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a tumorok kialakulása, a tumor progresszió során a sejtkapcsoló-struktúrák átalakulása, fellazulása következik be. A claudin expresszió változásából arra következtetünk, hogy szerepük lehet a húgyhólyagrak karcinogenezisében. Az mRNS-, illetve a fehérje expressziós értékek nem mindenhol azonos irányban változnak a tumor progresszió során. A pT1G3-as csoporton belül a claudin-1 fehérje expresszió kisebb a recidiváló csoportban a nem recidiváló csoporthoz képest, míg az mRNS expresszió magasabb. A claudin-3 mRNS expresszió emelkedett a pT1G3 és pT2G3 - as tumorokban, mely változás nem jelent meg fehérje szinten. A claudin-4 expresszió hasonlóan változik fehérje és mRNS szinten is. A claudin-5 expressziós szintjében nem volt kimutatható jelentős eltérés, sem fehérje sem mRNS szinten. A claudin-7 fehérje expresszió a pT1G3-as tumorokon belül csökken a recidiváló csoportban a nem recidiváló csoporthoz képest, míg az mRNS expresszió szintje emelkedett ugyanezen vonatkozásban. A claudin-10 mRNS szintén emelkedett volt a tumor progresszió kezdetén (TaG1, T1G1), mely emelkedett érték fehérje szinten nem mutatkozott. Az mRNS és fehérje expressziós értékek eltérése egyrészt felveti a claudin fehérje expresszió poszttranszlációs szabályozásának lehetőségét, másrészt az adatok arra utalhatnak, hogy a karcinogenezis során komplex patobiológiai folyamatok zajlanak, melyek során egyes stádiumokban a sejtdhézió fellazulása, másokban a sejtdhézió szorosabbá válása következik be. A folyamatoknak szerepük lehet az invázió kialakulásában, a biológiai viselkedés meghatározásában, illetve az áttétképzésben is.

A további vizsgálatok célja kibővített anyagon a claudin expresszió részletesebb vizsgálata a húgyhólyagrakban, a claudinok pontos prognosztikai szerepének tanulmányozása érdekében.

7. Következtetések

- A szérumból származó polipeptid antigén (TPA) értéke szignifikánsan magasabb az izominvazív hólyagrákok esetében, a nem-izominvazív csoportéhoz képest.
- A daganat differenciáltsági foka és a szérumból származó TPA szint között nincs szignifikáns összefüggés.
- A TPA tumor marker önálló alkalmazása a hólyagdaganatok kórismézésére és követésére nem elegendő.
- A hólyagrák vizeletből való kimutatására kifejlesztett UroVysion vizsgálat során végzett, fluoreszcens in situ hibridizációs módszer (FISH), egy nem invazív, kitűnő specificitású (100 %) és magas érzékenységgel (87 %) rendelkező módszer.
- A vizsgálat során álnegatív eredmény csak a nem-izominvazív pTa stádiumban született.
- A vizeletminták változó minőségéből adódó hibák kiküszöbölésében csökkenti az értékelhetetlen esetek számát, ha mind a reggeli első, mind a forszírozott folyadékbevitel utáni napi második vizeletürítésből származó mintán megtörténik az UroVysion vizsgálat.
- A módszer kitűnő eredményei ellenére, az ára és a munkaigényessége gátat szab az elterjedésének.
- A vizeletből történő mikroszatellita allélvesztés szintén egy érzékeny, nem invazív módszer a húgyhólyagrák kimutatására.
- A vizelet felülúszóból a sejt-mentes DNS-en elvégzett vizsgálatok nagyobb érzékenységet biztosítanak a módszer számára, mint a vizelet üledékből történő kimutatás.
- Jelenleg a fenti módszerek kitűnő eredményei ellenére a cystoscopiát véglegesen kiváltani nem képesek.
- Az invertált papilloma egy jóindulatú elváltozás, de nagy beteganyagot elemző közlemény, amely ebben határozottan állást foglal a mai napig kevés létezik.
- Az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján, a betegek követését a primer pTa G1 hólyagrákoknak megfelelően ajánljuk.
- Az E-cadherin, sejtadhéziós molekula hólyagrák carcinogenezisében elfoglalt szerepének vizsgálata során nem mutattunk ki összefüggést az E-cadherin expressziója és a tumor

fokozata, a klinikai stádiuma, a betegek neme, a daganat kiújulása ill. a hosszú távú túlélés között.

- Miután különböző munkacsoportok más-más eredményre jutottak, további nagy, átfogó vizsgálatra, jóval több beteg adatainak elemzésére van szükség egy végső konklúzió eléréséhez.
- A gyulladássos és a normál húgyhólyaghám között a claudin expresszióban nincs lényeges eltérés.
- A claudin-2, -3, -5, -10 valószínűleg nem játszik lényeges szerepet a húgyhólyagrák progressziójában.
- A progresszió előrehaladtával a claudin-1, -4, -7 mRNS expressziója a pT2 állapotban a pT1G2-G3 állapothoz képest csökken, míg a claudin-2, -3 és -10 mRNS expressziója nő.
- A claudin-1, -4, -7 fehérje expresszió az invázió megjelenésekor /pT2/ csökken.
- A claudin-4 tűnik a legígéretesebbnek a célzott terápiák szempontjából.
- A pT1G3 a claudinok szempontjából is köztes stádiumnak tűnik a pT1G2 és pT2G3 tumorok között.
- A pT1G3 stádiumon belül, a recidíváló esetekben a claudin-1, -4, -7 fehérje expressziója magasabb, mely kimutatása segítheti a terápiás döntést ezen kiszámíthatatlan viselkedésű csoportban.
- További, nagyobb elemszámot tartalmazó vizsgálatok szükségesek a claudinok karcinogenezisben való szerepének pontos tisztázására.

8. Összefoglalás

A hólyagrák a második leggyakoribb urológiai rosszindulatú daganat, mely előfordulása világszerte növekszik. A sikeres terápia központi kérdése a korai diagnosztika és a prognosztikai faktorok korszerű értékelése, ezeken keresztül a további terápiás lépések indikációja. Jelen értekezésben célul tűztük ki a hólyagrák korai felismerésére bevethető módszerek, tumor marker és genetikai vizsgálatok klinikumban való alkalmazását és a hólyagdaganat prognosztikája felé irányuló újabb ismeretek és összefüggések feltérképezését, a hólyagrákok finom szöveti struktúrája és a betegek túlélése, illetve a betegség recidívája között. A tumor marker vizsgálatok során a szérumban lévő polipeptid antigén koncentrációt elemeztük a különböző stádiumú és szöveti differenciáltságú hólyagrákos betegeken,

összehasonlítva kontrollcsoportokon. Arra a következtetésre jutottunk, hogy bár az izominvazív folyamat során a koncentrációja emelkedik, de a daganat felismerésére, a betegség szűrésére, mint klasszikus tumor marker használata nem elégséges. A molekuláris diagnosztikát segítségül hívó, két kromoszómális eltéréseket detektálni képes módszert teszteltünk és hatékonyságuk növelésére törekedtünk. A hólyagrák felderítésére, mind a fluoreszcens in situ hibridizációs módszer, mind a mikroszatelliták vizeletből való kimutatása kitűnő vizsgálatnak bizonyult. A FISH vizsgálatok során megállapítottuk, hogy ha mind a reggeli első, mind a forszírozott folyadékbevitel utáni napi második vizeletürítésből származó mintán megtörténik az UroVysion diagnosztika, pontosabb eredményeket kapunk, de a kisméretű pTaG1 szövettani stádiumú hólyagrágok esetén még így is bizonytalan a vizsgálat eredménye. A mikroszatellita vizsgálatok során arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgálat érzékenységét tovább lehet növelni, ha a vizelet felülúszóból a sejt-mentes DNS-en végezzük el a kimutatást. Végso következtetésként megállapítható, hogy a fenti módszerek kitűnő eredményei ellenére az invazív cystoscopiát végleg kiváltani jelenleg még nem képesek. A húgyhólyagrág prognosztikai vizsgálatai során az invertált papillomával diagnosztizált betegeket prospektív követését végeztük. A betegség kiújulását nem észleltük, a tizenkét beteg közül egy férfiban alakult ki a követés során hólyagrág. Annak ellenére, hogy egyértelmű, első szintű evidencia (IA/IB), még nem foglal állást a betegek követését illetően, az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján a primer pTaG1 hólyagrágoknak megfelelően ajánljuk. A további prognosztikával, karcinogenezissel foglalkozó munkáink során az egyik legfontosabb sejtadhéziós molekula, az E-cadherin expresszió erősségét vizsgáltuk hólyagrágos betegek szövettani metszetein. Más munkacsoportoktól eltérve nem találtunk szignifikáns összefüggést a daganat stádiumával, differenciáltsági fokával, recidívák számával és a betegség túlélésével. A tight junction transzmembrán fehérjéi közé tartozó claudinoknak több daganat kialakulásában is szerepet tulajdonítanak. Vizsgálataink során feltérképeztük a normál húgyhólyag urothelium, gyulladós húgyhólyaghám és a húgyhólyagrág különböző patológiai stádiumainak claudin expressziós mintázatát. A feltárt adatokkal közelebb kívántunk kerülni a sejtkapcsoló struktúrák és ezen belül a claudinok szerepének megértéséhez a húgyhólyagrág kialakulásában és progressziójában. Az izominvazív stádiumokban, a progresszió előrehaladtával a claudin-1, -4, -7 mRNS expressziója és a fehérje expressziója is csökken. Ismert tény, hogy a pT1G3 daganat külön entitást képez a hólyagrágok között. Amennyiben a pT1G3-as carcinoma prognózisát, invazív képességét előre meg lehetne jósolni, több betegnél érnék el időben kuratív beavatkozást. A pT1G3 a claudinok szempontjából is köztes stádiumnak tűnik a pT1G2 és pT2G3 tumorok

között. A pT1G3-on belül, a recidíváló esetekben a claudin-1, 4, 7 fehérje expressziója magasabb, mely kimutatása segítheti a terápiás döntést ezen kiszámíthatatlan viselkedésű csoportban. A jelenlegi onkológiai gyógyszerkutatások célja, hogy kevesebb mellékhatással rendelkező, daganatra specifikus készítményeket sikerüljön előállítani. Ez akkor lehet sikeres, ha a daganatsejteken lévő célpontokat megtalálni képes gyógyszer komplexet alakítanak ki. A hólyagrák claudin mintázatának leírása után, a claudin-4, mely fehérje és mRNS szinten is detektálható volt ígéretes terápiás célpontnak tűnik a további kutatások alapjaihoz.

9. Summary

Bladder carcinoma is the second leading malignant tumor in urology and it is getting more and more common in all over the world. The central query of the successful therapy are the early diagnostics, up-to-date valuation of the prognostical factors and with the help of these further indications of therapeutic steps. The goal of this thesis was to introduce the application of different methods for early clinical diagnostics such as genetic investigations, tumor markers and connections between the tissue structure of bladder cancer and the survival rate of the patients which are heading for the prognostication of bladder cancer. In the case of our tumor marker investigations, we analyzed the serum polypeptide antigene concentration in tumors with different tissue structure and in dissimilar stage and we made them compared with data from controlling groups. Summing up our experiments, we came to the conclusion that, however, the tumor marker concentration rises in muscular invasive processes, it is not sufficient as a classical marker for recognizing and screening of tumors. As for the molecular diagnostic tools, we developed two methods capable of recognizing chromosomal differences, moreover, we also aimed at increasing their efficiency. Both the fluorescent in situ hybridization method and the detection of microsatellites from urine samples considered as an excellent investigation methodology.

In the course of FISH experiments the followings were realized: if the UroVysion diagnostic are done both with the first urine per day and with the second which is a consequence of the forced fluid intake, we could get more accurate data, however, in the case of little histological bladder tumors in stage pTaG1 the results still remain uncertain. Concerning the investigations with microsatellites, we realized that the sensitivity of the check could further be increased with analyzing the DNS without cells only from the supernatant of the urine probes. As for the final conclusion, despite the above mentioned methods possessing excellent results, they are unable to take cytосcopy out from everyday

practice. Patients diagnosed with inverted papilloma were followed up prospectively at prognostic medical checks and no renewal were detected but unfortunately bladder cancer occurred in a male patient among the twelve patients we treated. In spite of having no primary evidence (IA/IB) on taking stand on the follow-up of patients, we suggest that follow-up based on literature data according to pTaG1 bladder cancer. For our further investigations dealing with prognostics and carcinogenesis, we examined the strength of the E-cadherine expression, which is one of the most important cell adhesive molecule, in tissue intersections from patients with bladder tumor. Opposite to the results of other work groups, we found no significant correlation among the stage and grade of differentiation of tumor, number of recidives and survival of patients. In oe hand, the claudines, which are fall under the tight junction transmembrane proteins, are suspected to have a share in developing many tumors. During our expreiments, we discovered the caludine expression pattern of normal vesical urothellum, of inflamed vesical tissue and of different pathological stages of bladder cancer. With these data we aimed at getting further to the role of cell-linking structures especially the role of claudines in the development and progression of bladder carcinoma. In the other hand, both the mRNS and protein expression of claudine-1, -4, -7 decrease in parallel with the progression in muscular invasive cases. Anyway, it is well known that tumor type pT1G3 creates an own entity among bladder tumors. Should the anticipating and invasive ability of pT1G3 carcinoma be estimated ahead, we could achieve curative intervention in more patients on time. As for stage pT1G3, it seems to be an internal stage between pT1G2 and pT2G3 tumors and in recidival cases the proteine expression of claudine-1, 4, 7 is higher. That expression result could be the help with making correct therapeutic decisions in case of this inestimable group of carcinoma.

The goal of recent medical research is to develop medicines with less side effects and with more specificity for different kinds of tumors which would really be successful if molecular complexes could be synthesized with target points appropriate also for tumor cells. After having the pattern of claudine in bladder cancer been discovered, the claudine-4, which were detected both in mRNS and protein layer, seems very promising therapeutic target for the basic of further laboratory works.

10. Függelék

17. Táblázat: Esernyősejtek CLDN-2 fehérje expressziója

	norm	gyull
mean	4.975	7.078

18. táblázat: Normál és gyulladással esernyősejtek CLDN-2 fehérje expressziójának összehasonlítása

p érték	Gyull
Norm.	0.4460

19. táblázat: Fehérje expressziós középértékek

	CLDN1	CLDN2	CLDN4	CLDN7
Normál	10,95	8,37	21,45	49
Gyulladás	8,77	8,324	12,27	27,32
TaG1	2,629	0,3435	9,864	10,73
T1G1	2,279	0,4419	4,4	7,168
T1G2	3,965	1,809	4,296	5,778
T1G3	1,66	0,8025	7,665	4,271
T2G3	1,723	0,9028	4,805	6,347

20. táblázat: Gyulladásos hám viszonyítva a normál hámhoz

	CLDN1	CLDN2	CLDN4	CLDN7
p érték	0,6907	0,5798	<u>0,0059</u>	<u><0,0001</u>

(a vastagon jelölt értékek szignifikáns eltérések)

21. táblázat: Fehérje-expressziós középértékek 2.

	CLDN1	CLDN2	CLDN4	CLDN7
Normál	10,95	8,37	21,45	49
Gyulladás	8,77	8,324	12,27	27,32
TaG1	2,629	0,3435	9,864	10,73
T1G1	2,279	0,4419	4,4	7,168
T1G2	3,965	1,809	4,296	5,778
T1G3Nrec	3,662	0,7773	5,671	5,751
T1G3Rec	0,3836	0,8151	8,661	3,346
T2G3	1,723	0,9028	4,805	6,347

22. táblázat: CLDN-1 fehérje expresszió változásának összehasonlítása *
(a vastagon jelölt értékek szignifikáns eltérések)

CLDN-1	TaG1	T1G1	T1G2	T1G3	T1G3Nrec	T1G3Rec
<i>T1G1</i>	0.3659					
<i>T1G2</i>	0.1543	0.2025				
<i>T1G3</i>	0.0013	0.0091	0.0091			
<i>T1G3Nrec</i>	0.0076	0.0380	0.0302			0.0058
<i>T1G3Rec</i>	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001		0.0058	
<i>T2G3</i>	0.7875	0.6189	0.0612	0.1703	0.2551	P<0.0001

*A vastagon jelölt csoporthoz viszonyítva a *dőlt* értékeket

23. táblázat: CLDN-2 fehérje expresszió változásának összehasonlítása *
(a vastagon jelölt értékek szignifikáns eltérések)

CLDN2	TaG1	T1G1	T1G2	T1G3	T1G3Nrec	T1G3Rec
<i>T1G1</i>	0.1027					
<i>T1G2</i>	P<0.0001	P<0.0001				
<i>T1G3</i>	P<0.0001	0.0059	0.0542			
<i>T1G3Nrec</i>	0.0011	0.0643	0.1164			0.7487
<i>T1G3Rec</i>	P<0.0001	0.0104	0.0753		0.7487	
<i>T2G3</i>	0.1923	0.9728	0.0004	0.0852	0.0940	0.1194

*A vastagon jelölt csoporthoz viszonyítva a *dőlt* értékeket

24. táblázat: CLDN-4 fehérje expresszió változásának összehasonlítása *

(a vastagon jelölt értékek szignifikáns eltérések)

CLDN4	TaG1	T1G1	T1G2	T1G3	T1G3Nrec	T1G3Rec
<i>T1G1</i>	<i>P<0.0001</i>					
<i>T1G2</i>	<i>P<0.0001</i>	0.7000				
<i>T1G3</i>	<i>0.0006</i>	0.7348	0.2973			
<i>T1G3Nrec</i>	<i>0.0022</i>	0.9662	0.4883			0.8065
<i>T1G3Rec</i>	<i>0.0045</i>	0.6597	0.3174		0.8065	
<i>T2G3</i>	<i>P<0.0001</i>	0.6134	0.4580	0.7009	0.7552	0.7393

***A vastagon jelölt csoporthoz viszonyítva a *dőlt* értékeket**

25. táblázat: CLDN-7 fehérje expresszió változásának összehasonlítása

(a vastagon jelölt értékek szignifikáns eltérések)

CLDN7	TaG1	T1G1	T1G2	T1G3	T1G3Nrec	T1G3Rec
<i>T1G1</i>	<i>0.0011</i>					
<i>T1G2</i>	<i>P<0.0001</i>	0.4983				
<i>T1G3</i>	<i>P<0.0001</i>	<i>0.0174</i>	0.1087			
<i>T1G3Nrec</i>	<i>P<0.0001</i>	0.3895	0.7905			0.1058
<i>T1G3Rec</i>	<i>P<0.0001</i>	<i>0.0038</i>	<i>0.0316</i>		0.1058	
<i>T2G3</i>	<i>P<0.0001</i>	0.5928	0.7705	<i>0.0428</i>	0.5937	<i>0.0101</i>

***A vastagon jelölt csoporthoz viszonyítva a *dőlt* értékeket**

26. táblázat: mRNS adatok

	CLDN1	CLDN2	CLDN3	CLDN4	CLDN5	CLDN7	CLDN10
gyulladás	1,248	2,628	3,277	1,253	3,479	4,603	4,764
TaG1	17,163	3,156	4,234	4,753	4,192	79,41	41,493
T1G1	9,379	2,233	1,492	9,547	1,369	32,153	45,688
T1G2	11,738	2,166	2,981	14,678	1,558	47,423	1,68
T1G3NonRec	3,056	1,66	29,651	19,335	1,788	22,066	7,20
T1G3Rec	4,657	3,964	15,542	22,775	2,235	54,474	6,386
T2G3	5,704	5,399	8,865	16,672	3,281	28,492	8,814

**27. táblázat: a claudinok mRNS expressziója viszonyítva a normál hámphoz
(a vastagon jelölt értékek szignifikáns eltérések)**

p-értékek	CLDN-1	CLDN-2	CLDN-3	CLDN-4	CLDN-5	CLDN-7	CLDN-10
gyulladás	0,920	0,770	0,500	0,92	0,480	0,400	0,410
TaG1	0,007	0,031	0,160	0,28	0,140	0,001	0,043
T1G1	0,017	0,300	0,570	0,037	0,540	0,004	0,043
T1G2	0,016	0,160	0,130	0,031	0,470	0,001	0,570
T1G3NRec	0,310	0,390	0,003	0,0205	0,340	0,021	0,140
T1G3Rec	0,180	0,110	0,036	0,037	0,330	0,004	0,210
T2G3	0,230	0,152	0,016	0,052	0,380	0,018	0,170

11. Irodalomjegyzék

1. Botteman MF, Pashos CL, Hauser RS, Laskin BL, Redaelli A. (2003) Quality of life aspects of bladder cancer: a review of the literature. *Qual Life Res*, 12(6):675-88.
2. Sternberg CN, Calabro F. (2000) Chemotherapy and management of bladder tumours. *BJU Int*, 85(5):599-610.
3. Pajor L. Hólyagdaganat. In: Romics I (szerk.), *Az urológia tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2004: 139-147.
4. Catto JW, Meuth M, Hamdy FC. (2004) Genetic instability and transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int*, 93(1):19-24.
5. Knowles MA. (2001) What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol*, 54(4):215-21.
6. Iványi B. Húgyhólyag daganati. In: Kopper L, Schaff ZS (szerk.), *Patológia II*. Medicina Kiadó, Budapest, 2004:1007-1009.
7. Chopin DK, Gattegno B. (2002) Superficial bladder tumors. *Eur Urol*, 42(6):533-41.
8. Sherman AB, Koss LG, Adams SE. (1984) Interobserver and intraobserver differences in the diagnosis of urothelial cells. Comparison with classification by computer. *Anal Quant Cytol*, 6(2):112-20.
9. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 94(2):153-6.
10. Otto S, Kasler M. (2005) A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása. A népegészségügyi programok jellegzetességei és várható eredményei. *Magy Onkol*, 49(2):99-107.
11. American Cancer Society. (2004) *Cancer Facts and Figures, 2004*. Statistics
12. Pajor L. Hólyagdaganatok. In: Tóth Cs (szerk.), *Urológia*. Medicina Kiadó, Budapest, 2005:121-126.
13. Adrian PM, van der Meijden. (1998) Bladder cancer. *British Medical Journal*, 317:1366-1369.
14. Riesz P, Mavrogenis S, Szücs M, Romics I. (2008) Hólyagrák. *Orv Hetil*, 30;149(13):613-5.
15. Yeung NG, Husain I, Waterfall N. (2003) Diabetes Mellitus and Bladder Cancer-An Epidemiological Relationship? *Pathol Oncol Res*, 9(1) 30-31.

16. Kravchick S, Gal R, Cytron S, Peled R, Wiessman Y, Mukamel E, Koren R. (2001) Increased Incidence of Diabetes Mellitus in the Patients with Transitional Cell Carcinoma of Urinary Bladder. *Pathol Oncol Res*, 7(1) 56-59.
17. Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmstrom PU, Stockle M, Sternberg C; European Association of Urology (EAU) Working Group on Oncological Urology. (2002) Guidelines on bladder cancer. *Eur Urol*, 41(2):105-12.
18. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, Pruthi RS, Seigne JD, Skinner EC, Wolf JS Jr, Schellhammer PF. (2007) Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol*, 178(6):2314-30.
19. Kiemeny LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM. (1993) Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol*, 150(1):60-4.
20. Allard P, Bernard P, Fradet Y, Tetu B. (1998) The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol*, 81(5):692-8.
21. Kurth KH, Denis L, Bouffieux C, Sylvester R, Debruyne FM, Pavone-Macaluso M, Oosterlinck W. (1995) Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours. *Eur J Cancer*, 31(11):1840-6.
22. Kondás J, Lendvay J. (1998) A felületes (Ta-T1) hólyagtumoros betegek prognosztikai tulajdonságainak többváltozós analízise. *Magy Urol*, 10(4):383-389.
23. Paschkis R. (1927) Über Adenome der Harnblase. *Z Urol Chir*, 21:315-17.
24. Lee R, Droller MJ. (2000) The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am*, 27(1):1-13.
25. Abbod MF, Linkens DA, Catto JW, Hamdy FC. (2006) Comparative study of intelligent models for the prediction of bladder cancer progression. *Oncol Rep*, 15 Spec no.:1019-22.
26. Heney NM. Natural history of superficial bladder cancer. (1992) Prognostic features and long-term disease course. *Urol Clin North Am*, 19(3):429-33.
27. Takahashi T, Haggisawa S, Yoshikawa K, Tezuka F, Kaku M, Ohyama C. (2006) Predictive value of N-acetylglucosaminyltransferase-V for superficial bladder cancer recurrence. *J Urol*, 175(1):90-3.
28. Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodriguez J. (2000) Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol*, 164(3 Pt 1):680-4.

29. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Boufflioux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. (2006) Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 49(3):466-5.
30. Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC. (2005) Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 23(13):2903-10.
31. Grossman HB. (2008) FGFR3 mutations and a normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumors van Oers JM, Wild PJ, Burger M, Denzinger S, Stoehr R, Roskopf E, Hofstaedter F, Steyerberg EW, Klinkhammer-Schalke M, Zwarthoff EC, van der Kwast TH, Hartmann A, Department of Pathology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands. *Urol Oncol*, 26(3):331-2.
32. Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D. (2003) Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res*, 63(9):2216-22.
33. von Knobloch R, Bugert P, Jauch A, Kälble T, Kovacs G. (2000) Allelic changes at multiple regions of chromosome 5 are associated with progression of urinary bladder cancer. *J Pathol*, 190(2):163-8.
34. Cordon-Cardo C, Reuter VE. (1997) Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer. *Semin Diagn Pathol*, 14(2):123-32.
35. Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, De Pauw M, Robinson M, Denis L, Smith P, Viggiano G. (1983) Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organization for Research on Treatment of Cancer: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *J Urol*, 129(4):730-3.
36. Parmar MK, Freedman LS, Hargreave TB, Tolley DA. (1989) Prognostic factors for recurrence and followup policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council Subgroup on Superficial Bladder Cancer (Urological Cancer Working Party). *J Urol*, 142(2 Pt 1):284-8.
37. Herr HW, Badalament RA, Amato DA, Laudone VP, Fair WR, Whitmore WF Jr. (1989) Superficial bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: a multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J Urol*, 141(1):22-9.

38. Neal De, Marsh C, Bennett MK, Abel PD, Hall RR, Sainsbury JR, Harris AL. (1985) Epidermal-growth-factor receptors in human cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet*, 16(1):366-368.
39. Messing EM. (1990) Clinical implications of the expression of epidermal-growth-factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*, 50:2530-2537.
40. Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W. (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder: a multivariate survival analysis. *Am. J Clin Pathol*, 101:166-176,
41. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE. (1996) C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol*, 155(1):321-6.
42. Black PC, Dinney CP. (2008) Growth factors and receptors as prognostic markers in urothelial carcinoma. *Curr Urol Rep*, 9(1):55-61.
43. Lipponen P, Eskelinen M, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. (1991) Use of immunohistochemically demonstrated c-erb B-2 oncoprotein expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol*, 20:238-242.
44. Sato K, Moriyama M, Mori S, Saito M, Watanuki T, Terada K, Okuhara E, Akiyama T, Toyoshima K, Yamamoto T. (1992) An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 oncoprotein in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer*, 70:2493-2498.
45. Caner V, Turk NS, Duzcan F, Tufan NL, Kelten EC, Zencir S, Dodurga Y, Bagci H, Duzcan SE. (2008) No Strong Association Between HER-2/neu Protein Overexpression and Gene Amplification in High-grade Invasive Urothelial Carcinomas. *Pathol Oncol Res*, 2008 Apr 16. [Epub ahead of print]
46. Pollack A, Wu CS, Czerniak B, Zagars GK, Benedict WF, McDonnell TJ. (1997) Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 3:1823-1829
47. Maluf FC, Cordon-Cardo C, Verbel DA, Satagopan JM, Boyle MG, Herr H, Bajorin DF. (2006) Assessing interactions between mdm-2, p53, and bcl-2 as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment. *Ann Oncol*, 17(11):1677-86.
48. Habuchi T, Kinoshita H, Yamada H, Kakehi Y, Ogawa O, Wu WJ, Takahashi R, Sugiyama T, Yoshida O. (1994) Oncogene amplification in urothelial cancer with p53 mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst*, 86:133-1335.

49. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015):49-53.
50. McShane LM, Aamodt R, Cordon-Cardo C, Cote R, Faraggi D, Fradet Y, Grossman HB, Peng A, Taube SE, Waldman FM. (2000) Reproducibility of p53 immunohistochemistry in bladder tumors. National Cancer Institute, Bladder Tumor Marker Network. *Clin Cancer Res*, 6(5):1854-1864.
51. Ye Y, Yang H, Grossman HB, Dinney C, Wu X, Gu J. (2008) Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to bladder cancer. *Cancer*, 112(11):2467-74.
52. Hurst CD, Tomlinson DC, Williams SV, Platt FM, Knowles MA. (2008) Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification. *Oncogene*, 27(19):2716-27.
53. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, Groshen S, Taylor CR, Jones PA, Skinner DG, Cote RJ. (1998) Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90:1072-1079.
54. Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani C, Cittadini A, Trentini GP. (2000) Effect of p21WAF1 expression is strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin Cancer Res*, 6:3131-3138.
55. Santos L, Amaro T, Costa C, Pereira S, Bento MJ, Lopes P, Oliveira J, Criado B, Lopes C. (2003) Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer*, 105:267-272.
56. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA. (1993) Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res*, 53:3241-3245.
57. Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, Hinke A, Schipper J, Rübber H, Raz A. (1994) Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res*, 54(12):3120-3123.
58. Bringuier PP, Girolidi LA, Umbas R, Shimazui T, Schalken JA. (1999) Changes in cadherin-catenin complexes in the progression of human bladder carcinoma. *Int J Cancer*, 82(1):70-76.
59. Bringuier PP, Girolidi LA, Umbas R, Shimazui T, Schalken JA. (1999) Mechanisms associated with abnormal E-cadherin immunoreactivity in human bladder tumors. *Int J Cancer*, 83(5):591-595.

60. Köksal IT, Ozcan F, Kiliçaslan I, Tefekli A. (2002) Expression of E-cadherin in prostate cancer in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with pathological features. *Pathology*, 34(3):233-238.
61. Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Kremers ED, Dinjens WN, Bosman FT. (1997) Reduced expression of the cadherin-catenin complex in oesophageal adenocarcinoma correlates with poor prognosis. *J Pathol*, 182(3):331-338.
62. Thrasher JB, Crawford ED. (1993) Current management of invasive and metastatic transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 149(5):957-992.
63. Riesz P, Székely E, Török V, Székely T, Romics I. (2007) E-cadherin-expresszió vizsgálata hólyagrákban. *Magy Urol*, 3:159-163.
64. Matsumura Y, Sugiyama M, Matsumura S, Hayle AJ, Robinson P, Smith JC, Tarin D. (1995) Unusual retention of introns in CD44 gene transcripts in bladder cancer provides new diagnostic and clinical oncological opportunities. *J Pathol*, 177:11-20.
65. Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. (2008) Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res*, 68(2):483-91.
66. Gonzalez-Mariscal L, Avila-Flores L, Betanzos A. (2001) The relationship between structure and function of tight junctions. In: Cereijido M, Anderson JM (Eds.). *Tight Junctions*, Boca Raton, pp. 89–119.
67. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol*, 123:1777–1788.
68. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol*, 143:391–401.
69. Fujimoto K. (1995) Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell Sci*, 108:3443–3449.
70. Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K. (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol*, 134(4):1031-49.

71. Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. (1999) A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci*, 112:1879-88.
72. Andreeva AY, Krause E, Muller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI. (2001) Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem*, 276(42):38480-6.
73. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*, 137:1393-1401.
74. Tsukamoto T, Nigam SK. (1999) Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins. *Am J Physiol*, 276:737-750.
75. DeMaio L, Chang YS, Gardner TW, Tarbell JM, Antonetti DA. (2001) Shear stress regulates occludin content and phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol*, 281:105-113.
76. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. (1999) Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem*, 274:35179-35185.
77. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol*, 127:1617-1626.
78. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, 147:1351-1363.
79. Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 141:199-208.
80. Ando-Akatsuka Y, Yonemura S, Itoh M, Furuse M, Tsukita S. (1999) Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity. *J Cell Physiol*, 179(2):115-25.
81. Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ. (2000) The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem*, 275:29816-29822.
82. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:285-293.

83. Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. (2002) Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*, 277:455–461.
84. Moonen PM, Peelen P, Kiemeney LA, Boon ME, Schalken JA, Witjes JA. (2006) Quantitative cytology on bladder wash versus voided urine: a comparison of results. *Eur Urol*, 49(6):1044-9.
85. Reyes JL, Lamas M, Martin D, Namorado MC, Islas S, Luna J, Tauc M, Gonzalez-Mariscal L. (2002) The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int*, 62:476-487.
86. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156:1099-1111.
87. Hoevel T, Macek R, Mundigl O, Swisshelm K, Kubbies M. (2002) Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J Cell Physiol*, 191:60-68.
88. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B. (2001) Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett*, 307:77-80.
89. Kiuchi-Saichin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. (2002) *J Am Soc Nephrol*, 13:875-886.
90. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. (2002) Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res*, 61:7878-7881.
91. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. (1999) *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, 147:195–204.
92. Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S. (1999) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol*, 145:579-588.
93. Kojima S, Rahner C, Peng S, Rizzolo LJ. (2002) Claudin 5 is transiently expressed during the development of the retinal pigment epithelium. *J Membr Biol*, 186:81-88.

94. Turksen K, Troy TC. (2001) Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev Dyn*, 222:292-300.
95. Turksen K, Troy TC. (2002) Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development*, 129:1775-1784.
96. Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black MJ, Sladek R, Foulkes WD. (2002) Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene*, 21(17):2634-40.
97. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB. (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 104:165-172.
98. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M, Houillier P. (2001) Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int*, 59(6):2206-15.
99. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifto RP. (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science*, 285:103-106.
100. Niimi T, Nagashima K, Ward J.M, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, Kimura S. (2001) Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol Cell Biol*, 21:7380-7390.
101. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 81(1):1-44.
102. Miyamoto K, Kusumi T, Sato F, Kawasaki H, Shibata S, Ohashi M, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. (2008) Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed Res*, 29(2):71-6.
103. Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ. (2008) Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology*, 53(1):48-55.

104. Riesz P, Kiss A, Páska Cs, Törzsök P, Lotz G, Majoros A, Schaff Zs, Romics I. (2006) A claudin expresszió változása a húgyhólyag carcinogenesisében. *Magy Urol*, 13(3), Abstr. 165.
105. Montgomery E, Mamelak AJ, Gibson M, Maitra A, Sheikh S, Amr SS, Yang S, Brock M, Forastiere A, Zhang S, Murphy KM, Berg KD. (2006) Overexpression of claudin proteins in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Appl. Immunohistochem. Mol Morphol*, 14:24-30.
106. Tőkés A M, Kulka J, Paku S, Szik A, Páska C, Novák PK, Szilak L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z. (2005) Claudin-1, -3, -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: research study. *Breast Cancer Res*, 7:296-305.
107. Kramer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH. (2000) Genomic organisation of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet*, 107:249-256.
108. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. (2005) Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: tissue microarray study. *Mod. Pathol*, 18:511-518.
109. Oliviera SS, Oliviera IM, De Souza W, Morgado-Diaz JA. (2005) Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett*, 579:6179-6185.
110. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. (2000) Involvement of claudin-1 in the beta catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancer. *Oncol Res*, 12:469-476.
111. Fluge O, Bruland O, Asklen LA, Lillehaug J R, Varhaug JE. (2006) Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid*, 16:161-175.
112. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-ong GL, van Heek T, Ashfaq R, Meyer R, Walter K, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo C J, Kern SE, Gogins M, Hruban RH. (2002) Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol*. 160:1239-1249.
113. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schartz DR, Cho KR, Morin PJ. (2003) Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res*, 9:2567-2575.
114. Resnick MB, Gavilanez B, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, Sabo E, Moss SF. (2005) Claudin expression in gastric adenocarcinomas. Tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol*, 36:886-892.

115. Kominksky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P and Sukumar S. (2004) Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol*, 164:1627-1633.
116. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW and Gabig TG. (2001) Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res*, 61:7878–7881.
117. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. (2001) Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology*, 121:678–684.
118. Nacht M, Ferguson AT, Zhang W, Petroziello JM, Cook BP, Gao YH, Maguire S, Riley D, Coppola G, Landes GM, Madden SL, Sukumar S. (1999) Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res*, 59(21):5464-70.
119. Borlak J, Meier T, Halter R, Spanel R, Spanel-Borowski K. (2005) Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours. *Oncogene*, 24(11):1809-19.
120. Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. (2000) Implications for therapy. *Urol Clin North Am*, 27(1):1-13.
121. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. (2005) Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 17(5):453-8.
122. Arslan H, Ceylan K, Harman M, Yilmaz Y, Temizoz O, Can S. (2006) Virtual computed tomography cystoscopy in bladder pathologies. *Int Braz J Urol*, 32(2):147-54.
123. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ. (1983) Superficial bladder cancer progression et recurrence. *J Urol*, 130:1083-6.
124. Fradet Y. (2002) Recent advances in the management of superficial bladder tumors. *Can J Urol*, 9(3):1544-50.
125. Koss LG. (1997) Errors and pitfalls in cytology of the lower urinary tract. *Monogr Pathol*, 39:60-74.
126. Brown FM. Urine cytology. It is still the gold standard for screening? (2000) *Urol Clin North Am*, 27(1):25-37.

127. Sherman AB, Koss LG, Adams SE. (1984) Interobserver and intraobserver differences in the diagnosis of urothelial cells. Comparison with classification by computer. *Anal Quant Cytol*, 6(2):112-20.
128. Moonen PM, Kiemeny LA, Witjes JA. (2005) Urinary NMP22 BladderChek test in the diagnosis of superficial bladder cancer. *Eur Urol*, 48(6):951-6.
129. Halling KC, King W, Sokolova IA, Meyer RG, Burkhardt HM, Halling AC, Cheville JC, Sebo TJ, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz S, O'Kane DJ, Seelig SA, Lieber MM, Jenkins RB. (2000) A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of bladder cancer. *J Urol*, 164:1768.
130. Halling KC, King W, Sokolova IA, Karnes RJ, Meyer RG, Powell EL, Sebo TJ, Cheville JC, Clayton AC, Krajnik KL, Ebert TA, Nelson RE, Burkhardt HM, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz VS, Lieber MM, Blute ML, Zincke H, Seelig SA, Jenkins RB, O'Kane DJ. (2002) A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol*, 167(5):2001-6.
131. Bollmann M, Heller H, Bankfalvi A, Griefingholt H, Bollmann R. (2005) Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU Int*, 95(9):1219-25.
132. Lotan Y, Bensalah K, Ruddell T, Shariat SF, Sagalowsky AI, Ashfaq R. (2008) Prospective evaluation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol*, 179(6):2164-9.
133. Steiner H, Bergmeister M, Verdorfer I, Granig T, Mikuz G, Bartsch G, Stoehr B, Brunner A. (2008) Early results of bladder-cancer screening in a high-risk population of heavy smokers. *BJU Int*. 2008 Mar 11. [Epub ahead of print]
134. Kovács A, Szolnoki G, Szapanidisz J, Wabrosch G. (1999) A fotodynamias diagnosztika (PDD) bevezetése felületes hólyagdaganatok eseteiben osztályunkon (első vizsgálatainkkal szerzett tapasztalataink előzetes közleménye). *Magy Urol*, 11(2):155-162.
135. Messing EM, Teot L, Korman H, Underhill E, Barker E, Stork B, Qian J, Bostwick DG. (2005) Performance of urine test in patients monitored for recurrence of bladder cancer: a multicenter study in the United States. *J Urol*, 174(4 Pt 1):1238-41.

136. Burger M, Zaak D, Stief CG, Filbeck T, Wieland WF, Roessler W, Denzinger S. (2007) Photodynamic diagnostics and noninvasive bladder cancer: is it cost-effective in long-term application? A Germany-based cost analysis. *Eur Urol*, 52(1):142-7.
137. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M; Hexvix PCB301/01 Study Group. (2004) Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J Urol*, 171(1):135-8.
138. van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. (2005) Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*, 47(6):736-48.
139. Kottász S, Kovács A, Flaskó T, Kálmán J, Lovász S, Csata S, Zempéni T, Pap Z. (1997) Bard BTA-teszt a húgyhólyagdaganat kimutatására (hazai multicentrikus vizsgálat). *Magy Urol*, 9(2):89-93.
140. Messing EM, Teot L, Korman H, Underhill E, Barker E, Stork B, Qian J, Bostwick DG. (2005) Performance of urine test in patients monitored for recurrence of bladder cancer: a multicenter study in the United States. *J Urol*, 174(4 Pt 1):1238-41.
141. Pytel A, Schmeller N. (2002) New aspect of photodynamic diagnosis of bladder tumors: fluorescence cytology. *Urology*, 59(2):216-9.
142. Staack A, Badendieck S, Schnorr D, Loening SA, Jung K. (2006) Combined determination of plasma MMP2, MMP9, and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BMC Urol*, 6:19.
143. Di Carlo A, Terracciano D, Mariano A, Macchia V. (2006) Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors. *Oncol Rep*, 15(5):1321-6.
144. Passerotti CC, Bonfim A, Martins JR, Dall'Oglio MF, Sampaio LO, Mendes A, Ortiz V, Srougi M, Dietrich CP, Nader HB. (2006) Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol*, 49(1):71-5.
145. Schumann B (szerk.). (1998) Keringő tumor markerek klinikai alkalmazásai. Budapest, BYK Sangtec. 15-17.
146. Lüthgens, M., Schlegel, G. (1980) CEA + TPA in der klinischen Tumordiagnostik, insbesondere des Mamma-Karzinoms. *Int J Cancer*, 2:63-7.
147. Kumar S, Wilson P, Brenchley P, Taylor G, Björklund B, Eklund G. (1978) Frequent elevation of tissue polypeptide antigen in the sera of workers exposed to bladder carcinogens. *Int J Cancer*, 22:542-6.

148. Herranz-Amo F, Diez-Cordero JM, Verdú-Tartajo F, Bueno-Chomón G, Leal-Hernández F, Bielsa-Carrillo A. (1999) Need for intravenous urography in patients with primary transitional carcinoma of the bladder? *Eur Urol*, 36(3):221-4.
149. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. (1999) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*, 80:827.
150. Kisbenedek L, Romics I, Pajor L, Répássy D. (2004) A hólyagrák kezelése (módszertani levél). *Magy Urol*, 16(1):50-59.
151. Yoo J, Park S, Kang CS, Kang SJ, Kim BK. (2002) Expression of E-Cadherin and p53 Proteins in Human Soft Tissue Sarcomas. *Arch Pathol Lab Med*, 126:33–38.
152. Laskin WB, Miettinen M. (2002) Epithelial-Type and Neural-Type Cadherin Expression in Malignant Noncarcinomatous Neoplasms With Epithelioid Features That Involve the Soft Tissues. *Arch Pathol Lab Med*, 126(4):425–431.
153. Han AC, Soler AP, Tang CK et al: (2004) Nuclear Localization of E-Cadherin Expression in Merkel Cell Carcinoma *Arch Pathol Lab Med*, 124 (8):1147–1151.
154. Acs G, LiVolsi VA. (2001) Loss of Membrane Expression of E-Cadherin in Leukemic Erythroblasts *Arch Pathol Lab Med*, 125(2):198–201.
155. Röpke M, Boltze C, Neumann HW, Roessner A, Schneider-Stock R. (2003) Genetic and epigenetic alteration in tumor progression in a dedifferentiated chondrosarcoma. *Pathol Res Pract*, 199(6):437-444.
156. Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F, von Diest P, Brakenhoff R, Pantel K. (2003) Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res*, 63:5679-5684.
157. Koksál IT, Ates M, Danisman A, Sezer C, Ciftcioglu A, Karpuzoglu G, Sevuk M. (2006) Reduced E-cadherin and alfa-catenin expressions have no prognostic role in bladder carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 12(1):13-19.
158. Gervain M, Szabó Z, Vanik M, Lesznyák J, Intzédy K, Tobák Z, Ervin F, Pinter E. (1999) Felületes hólyagtumorok komplex ellátása és nyomon követése (multicentrikus tanulmány). *Magy Urol*, 11(3):244-250.
159. Pajor L. (2000) A hólyagrák kezelése a XXI. Században. *Magy Urol*, 12(4):322-331.
160. Romics I, Riesz P, Keszthelyi A, Pánovics J. (2006) Tapasztalataink radikális cystectomy és egy ülésben végzett ureter-sigmatasak (Mainz-pouch II) típusú vizeletdeviációval hólyagrákos betegekben. *Orv Hetil*, 147(35):1691-1696.
161. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH. (2003) Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J*

- Urol, 169:1975-82.
162. Grossman HB. (1998) New methods for detection of bladder cancer. *Semin Urol Oncol*, 16(1):17-22.
 163. Slaton JW, Dinney CP, Veltri RW, Miller CM, Liebert M, O'Dowd GJ, Grossman HB. (1997) Deoxyribonucleic acid ploidy enhances the cytological prediction of recurrent transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 158:806.
 164. Riesz P, Majoros A, Fazakas Zs. (2002) Szöveti polipeptid antigén húgyhólyagdaganatos betegekben. *Magy Urol*, 4:330-334.
 165. Zhang FF, Arber DA, Wilson TG, Kawachi MH, Slovak ML. (1997) Toward the validation of aneusomy detection by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer: comparative analysis with cytology, cytogenetics, and clinical features predicts recurrence and defines clinical testing limitations. *Clin Cancer Res*, 3(12 Pt 1):2317-28.
 166. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, Sidransky D. (1996) Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science*, 271(5249):659-62.
 167. Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D. (1997) Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nature Med*, 3(6):621-4.
 168. Adolphs HD, Oehr P. (1984) Significance of plasma tissue polypeptide antigen determination for diagnosis and follow-up of urothelial bladder cancer. *Urol Res*, 12:125-29.
 169. van Poppel H, Billen J, Goethuys H, Elgamal AA, Gerits M, Mortelmans L, Blanckaert N, Baert L. (1996) Serum tissue polypeptide antigen (TPA) as a tumor marker for bladder cancer. *Anticancer Res*, 16(4B):2205-7.
 170. Tizzani A, Casetta G, Cavallini A, Piana P, Piantino P. (1990) Blood and urine determinations of tissue polypeptide antigen in patients with bladder carcinoma. *Minerva Urol Nefrol*, 42(2):69-71.
 171. Vogel J, Oehr P, Maisey R, Adolphs HD. (1988) Comparison between tissue antigen analysis and plasma determinations for TPA and CEA in transitional cell carcinomas and in tumorfree urothelium of the urinary bladder. *Cancer Detect Prev*, 11(3-6): 389-396.
 172. Correale M, Arnberg H. (1994) Clinical profile of a new monoclonal antibody-based immunoassay for tissue polypeptide antigen. *Int J Biol Markers*, 9(4):231-238.

173. Romics I. (1987) Újabb lehetőségek a hólyagdaganatok kórismézésében. *Urol Nephrol Szle*, 14:139-142.
174. Ecke TH, Schlechte HH, Schulze G, Lenk SV, Loening SA. (2005) Four tumour markers for urinary bladder cancer--tissue polypeptide antigen (TPA), HER-2/neu (ERB B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation. *Anticancer Res*, 25(1B):635-41.
175. Schmidt A. (1987) Tissue polypeptid antigen (TPA) for monitoring of advanced bladder cancer after MVEC- chemotherapy. *Markers in Urology. 2nd Mediterranean Congress of Urology. J Biological Markers*, 2:121-124. Abstr.10.
176. Pectasides D, Bafaloucos D, Antoniou F, Gogou L, Economides N, Varthalitis J, Dimitriades M, Kosmidis P, Athanassiou A. (1996) TPA, TATI, CEA, AFP, beta-HCG, PSA, SCC and CA 19-9 for monitoring transitional cell carcinoma of the bladder. *Am J Clin Oncol*, 19(3):271-7.
177. Menéndez López V, Galán JA, Fernández-Suárez A, López-Celada S, Alcover J, Filella X. (2003) Usefulness of tissue polypeptide antigen in the follow-up of bladder cancer. *Urology*, 62(2):243-8.
178. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, Procop GW, Jones JS, Ulchaker J, Zippe CD, Tubbs RR. (2003) Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol*, 169(6):2101-5.
179. Hajdinjak T. (2008) UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: Meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol*. 2008 Jan 14. [Epub ahead of print]
180. Riesz P, Lotz G, Páska Cs, Szendrői A, Majoros A, Németh Zs, Törzsök P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Zs, Romics I, Kiss A. (2007) Detection of Bladder Cancer from the Urine using Fluorescence in situ Hybridization Technique. *Pathol Oncol Res*, 13(3):187-194.
181. Pajor G, Süle N, Alpár D, Kajtár B, Kneif M, Bollmann D, Somogyi L, Pajor L. (2008) Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical preselection of uroepithelial cells. *Cytometry A*, 73(3):259-65.
182. Szarvas T, Kovalszky I, Bedi K, Szendrői A, Majoros A, Riesz P, Füle T, László V, Kiss A, Romics I. (2007) Deletion analysis of urinary DNA to detect bladder cancer: Urine supernatant versus urine sediment. *Oncol Rep*, 18(2):405-9.

183. Mandel P, Metais P. (1948) Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. CR Acad Sci Paris, 142:241-243.
184. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res, 37 (3):646-50.
185. Szarvas T, Kovalszky I, Majoros A, Szendrői A, Romics I. (2002) A hólyagtumorok szűrésének és nyomon követésének lehetősége multiplex mikroszatellita-vizsgálattal. Magy Urol, 14(4):321-329.
186. Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, Comperat E, Catto JW, Meuth M, Lackmichi A, Ricci S, Lacave R, Gattegno B, Richard F, Hamdy FC, Cussenot O. (2008) A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis. BJU Int, 101(11):1448-53.
187. Rubio J, Blanes A, Sanchez-Carrillo JJ, Diaz-Cano SJ. (2007) Microsatellite abnormalities and somatic down-regulation of mismatch repair characterize nodular-trabecular muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. Histopathology, 51(4):458-67.
188. Fornari D, Steven K, Hansen AB, Vibits H, Jepsen JV, Poulsen AL, Schwartz M, Horn T. (2005) Under-representation of bladder transitional cell tumour 9q, 11p and 14q LOH in urine and impact on molecular diagnosis. Anticancer Res, 25(6B):4049-52.
189. Kunze E, Schauer A, Schmitt M. (1983) Histology and histogenesis of two different types of inverted urothelial papillomas. Cancer, 51: 348-51.
190. Asano K, Miki J, Maeda S, Naruoka T, Takahashi H, Oishi Y. (2003) Clinical studies on inverted papilloma of the urinary tract: report of 48 cases and review of the literature. J Urol, 170(4 Pt 1):1209-12.
191. Witjes JA, van Balken MR. (1997) The prognostic value of a primary inverted papilloma of the urinary tract. J Urol, 158:1500-05.
192. Potts IF, Hirst E. (1963) Inverted papilloma of the bladder. J Urol, 90:175-78.
193. Sung MT, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, Cheng L. (2006) Natural history of urothelial inverted papilloma. Cancer, 107(11):2622-7.
194. Sung MT, Eble JN, Wang M, Tan PH, Lopez-Beltran A, Cheng L. (2006) Inverted papilloma of the urinary bladder: a molecular genetic appraisal. Mod Pathol, 19(10):1289-94.
195. Kobayashi Y, Hashimoto S, Ishikawa S, Ishiyama S, Tokue A. (1992) A clinico-

- pathological study of inverted papilloma of the urinary bladder. Analysis of histogenesis. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 83(12):2037-43
196. Castillo O, Hoyos J, Vitagliano G, Arellano L. Inverted papilloma of the bladder. (2006) *Arch Esp Urol*, 59(7):691-5.
 197. Marquez Moreno AJ, Julve Villalta E. (2001) Multiple bladder inverted papillomas. *Arch Esp Urol*, 54(7):692-4.
 198. Anderström C, Johansson S, Pettersson S. (1982) Inverted papilloma of the urinary tract. *J Urol*, 127:1132-35.
 199. Geisler CH, Mori K, Leiter E. (1980) Lobulated inverted papilloma of the ureter. *J Urol*, 123:270.
 200. Kisbenedek L, Hidvégi J, Romics I. (1984) A húgyúrendszer inverz papillomáiról. *Urol Nephrol Szle*, 11:133-134.
 201. Szapanidinis J, Vadász G, Kovács A, Szolnoki Gy, Árpási G. (2003) A húgyhólyag invertált papillomájáról négy eset kapcsán. *Magy Urol*, 15(1):34-37.
 202. Riesz P, Székely E, Majoros A, Romics I. (2005) Invertált papilloma húgyhólyagban. *Uroonkológia*, 2(3):86-88.
 203. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. (2002) The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*, 109(8):987-991.
 204. Fearon ER. (2003) Connecting estrogen receptor function, transcriptional repression, and E-cadherin expression in breast cancer. *Cancer Cell*, 4:307-310.
 205. Horikawa Y, Sugano K, Shigyo M. (2003) Hypermethylation of an E-Cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J Urol*, 169(4):1541-1545.
 206. Handschuh G, Candidus S, Lubert B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Höfler H, Becker KF. (1999) Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility *Oncogene*, 18(30):4301-12.
 207. Takeichi M. (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, 5(5):806-11.
 208. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. (1990) Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region in the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(11):4246-50.
 209. Soloway MS. (1988) Intravesical therapy for bladder cancer *Urol Clin North Am*, 15(4):661-669.

210. Landis SH, Murray T, Bolden S. (1999) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 49(1):8-31.
211. Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Marris JA. (1995). Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(11):5067-5071.
212. Lipponen PK, Eskelinen MJ. (1995) Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 121(5):303-308.
213. Mialhe A, Louis J, Montlevier S, Peoch M, Pasquier D, Bosson JL, Rambeaud JJ, Seigneurin D. (1997) Expression of E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? *Invasion Metastasis*, 17(3):124-137.
214. Ross JS, del Rosario AD, Figge HL, Sheehan C, Fisher HA, Bui HX. (1995) E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol*, 26(9):940-944.
215. Cai T, Piazzini M, Nesi G, Taddei I, Sardi I, Detti B, Mondaini N, Dal Canto M, Bartoletti R. (2007) E-cadherin mRNA expression analysis in evaluating the natural history of urothelial bladder cell carcinoma: results from a long-term follow-up study. *Oncol Rep*, 17(4):925-30.
216. Székely E, Török V, Székely T, Riesz P, Romics I. (2006) E-cadherin expression in transitional cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*, 12(2):73-7.
217. Offner S, Hekele A, Teichmann U, Weinberger S, Gross S, Kufer P, Itin C, Baeuerle AP, Kohleisen B. (2005) Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 54:431-445.
218. McClane BA, Hanna PC, Wnek AP. (1988) Clostridium perfringens enterotoxin. *Microb Pathog*, 4:317-323.
219. Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. (1997) Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors *in vivo*. *J Biochem*, 272:26652-26658.
220. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:511-516.
221. Santin AD, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorellis S. (2005) Treatment of chemotherapy-resistant

- human ovarian cancer xenograft in c.b.-17/scid mice by intraperitoneal administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cancer Res*, 65:(10)4334-42.
222. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. (2001) Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology*, 121:678–684.
223. Boireau S, Buchert M, Samuel MS, Pannequin J, Ryan JL, Choquet A, Chapuis H, Rebillard X, Avances C, Ernst M, Joubert D, Mottet N, Hollande F. (2007) DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. *Carcinogenesis*, 28(2):246-58.
224. Riesz P, Kiss A, Törzsök P, Páska Cs, Lotz G, Majoros A, Szendrői A, Schaff Zs, Romics I. (2007) Altered claudin expression in human urinary bladder carcinogenesis. *Eur Urol Meetings*, 2(7):Abstr. 4.
225. P. M. Cuckow, P. Nyirády. (2001) Embryology of the Urogenital Tract. In: *Pediatric Urology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 3-13.
226. Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. (2001) De Roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Trafic*, 2(2):93-8.
227. Tsukita S, Furuse M. (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol*, 3:149(1):13-6.

12. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Riesz P**, Majoros A, Fazakas Zs. (2002) Szöveti polipeptid antigén koncentráció vizsgálata hólyagdaganatos betegekben. *Magy Urol*, 4:330-334
2. **Riesz P**, Székely E, Majoros A, Romics I. (2005) Invertált papilloma húgyhólyagban. *Uroonkológia*, 2(3):86-88.
3. Székely E, Török V, Székely T, **Riesz P**, Romics I. (2006) E-cadherin expression in transitional cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*, 12(2):73-7.
IF:1,241
4. **Riesz P**, Lotz G, Páska Cs, Szendrői A, Majoros A, Németh Zs, Törzsök P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Zs, Romics I, Kiss A. (2007) Detection of Bladder Cancer from the Urine using Fluorescence in situ Hybridization Technique. *Pathol Oncol Res*, 13(3):187-194.
IF: 1,272
5. Szarvas T, Kovalszky I, Bedi K, Szendrői A, Majoros A, **Riesz P**, Füle T, László V, Kiss A, Romics I. (2007) Deletion analysis of urinary DNA to detect bladder cancer: Urine supernatant versus urine sediment. *Oncol Rep*, 18(2):405-9.
IF: 1,597
6. **Riesz P**, Székely E, Török V, Székely T, Romics I. (2007) E-cadherin-expresszió vizsgálata hólyagrákban. *Magy Urol*, 3:159-163.
7. **Riesz P**, Mavrogenis S, Szűcs M, Romics I. (2008) Húgyhólyagrák. *Orv Hetil*, 149(13):613-5.

Az értekezés témájában megjelent idézhető abstractok:

1. **Riesz P**, Kiss A, Páska Cs, Törzsök P, Lotz G, Majoros A, Schaff Zs, Romics I. (2006) A claudin expresszió változása a húgyhólyagrak carcinogenesisében. *Magy Urol*, 3:Abstr. 165.
2. Kiss A, Törzsök P, Páska Cs, Lotz G, **Riesz P**, Romics I, Schaff Zs. (2006) Altered claudin expression in human urinary bladder carcinogenesis. *Modern Pathol*, 19 S3:Abstr. 139.
IF: 4,286
3. **Riesz P**, Kiss A, Törzsök P, Páska Cs, Lotz G, Majoros A, Szendrői A, Schaff Zs, Romics I. (2007) Altered claudin expression in human urinary bladder carcinogenesis. *Eur Urol, Meetings*, 2(7):Abstr. 4.
4. **Riesz P**, Kiss A, Páska Cs, Törzsök P, Lotz G, Majoros A, Schaff Zs, Romics I. (2007) A claudinok szerepének vizsgálata húgyhólyagrakban. *Magy Onk*, 51:Abstr. 387.
5. **Riesz P**, Kiss A, Páska Cs, Törzsök P, Lotz G, Majoros A, Szűcs M, Nyírády P, Schaff Zs, Romics I. (2008) Claudinok vizsgálata a normál és a malignus húgyhólyagon. *Orv Szem*, 6:Abstr. 8.

Nem az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Riesz P**, Török V, Járay B, Fazakas Z, Frang D. (2000) Vesetumort utánzó mellékvese-pseudocysta. *Magy Urol*, 1:57-60.
2. **Riesz P**, Nagy F, Glasz T, Fazakas Zs. (2000) Malignus melanoma veseáttéte. *Magy Urol*, 12:159-162.
3. Romics I, Nemere Gy, Torda I, **Riesz P**. (2000) Radikális protatectomiával szerzett tapasztalataink. *Magy Urol*, 12:317-321.

4. Romics I, **Riesz P**, Szelepcsényi J, Nyirády P. (2002) Bilateral renal cell carcinoma in a horseshoe kidney. *Pathol Oncol Res*, 8(4):270-1.
 5. Szendrői A, **Riesz P**. (2002) A preputium bőrének epidermális cystája. *Magy Urol*, 4:340-342.
 6. **Riesz P**, Szendrői A. (2003) A külső férfi nemi szervek gyulladásai. *Hippocrates*, 104-105.
 7. Szendrői A, Székely E, **Riesz P**, Romics I. (2003) Vesedaganat kezelése klinikánkon. *Magy Urol*, 4:224-232.
 8. Szendrői A, Rusz A, Székely E, **Riesz P**, Kelemen Zs. (2003) Renal tumor causing haematuria and sepsis. *Pathol Oncol Res*, 9(4):246-8.
 9. Junker K, Romics I, Szendrői A, **Riesz P**, Moravek P, Hindermann W, Winter R, Schubert J. (2004) Genetic profile of bone metastases in renal cell carcinoma. *Eur. Urol*, 45:320-324.
- IF: 2,651**
10. **Riesz P**, Rusz A. (2004) A férfiak szexuális szokásai és az erektilis diszfunkció. *Urol Szemle*, 1:5-8.
 11. Szendrői A, Rusz A, **Riesz P**, Székely E, Kelemen Zs. (2004) Terhesség alatti vérvizelést, gyermekágyban szепtikus állapotot okozó vesetumor esete. *Uroonkológia*, 1(2):46-48.
 12. Romics I, Szendrői A, **Riesz P**. (2004) Öt évre visszatekintő tapasztalataink és eredményeink vesedaganatos betegek kezelésével. *Orv Hetil*, 145(39):1991-1996.
 13. Szendrői A, Antal I, **Riesz P**, Szendrői M, Romics I. (2004) Vesedaganat csontáttétjének műtéti kezelése. *Magy Urol*, 16(1):9-17.

14. Romics I, Pánovics J, **Riesz P**, Kállai L, Déry L. (2004) Radicalis prostatectomiával szerzett tapasztalatok. Orv Értésítő, 77(4): 494-499.
15. **Riesz P**, Walter Gy, Székely E, Romics I. (2005) Scrotalis leiomyosarcoma többszörös kiújulása. Uroonkológia, 2(1):20-22.
16. **Riesz P**, Nyírády P, Székely E, Szelepcsényi J, Romics I. (2005) Kétoldali vesetumor patkóvesében. Uroonkológia, 2(2):53-55.
17. Majoros A, Bach D, Keszthelyi A, Hamvas A, Mayer P, Seidl E, **Riesz P**, Romics I. (2005) Befolyásolja-e a radikális prostatectomia utáni kontinenciát a betegség patológiai stádiuma? Uroonkológia, 2(3):71-74.
18. Lovász S, **Riesz P**. (2005) Urodinamiás alapvizsgálatok a felső húgyúti obstrukciók megítélésében III. - A retroperitoneális tér nyomás meghatározásának módszerei és jelentősége a felső húgyúti urodinamiás vizsgálatokban. Magy Urol, 12:150-156.
19. **Riesz P**, Szendrői A. (2005) A húgyúti megbetegségek előfordulása és tünetei I. rész. Családorvosi Fórum, 11:20-22.
20. **Riesz P**, Szendrői A. (2006) A húgyúti megbetegségek előfordulása és tünetei II. rész. Családorvosi Fórum, 1:23-26.
21. **Riesz P**. (2006) A benignus prostata hyperplasia. Hyppocrates, 8(1):11-13.
22. **Riesz P**, Hamvas A, Szendrői A, Székely E, Romics I. (2006) Vesesejtes karcinóma és ellenoldali oncocyoma. Magy Urol, (18)1:50-54.
23. Romics I, Pánovics J, Majoros A, **Riesz P**. (2006) Száz radikális retropubicus prostatectomiával szerzett tapasztalataink. Orv Hetil, 147(24):1107-1112.
24. Romics I, **Riesz P**, Keszthelyi A, Pánovics J. (2006) Tapasztalataink radikális cystectomy és egy ülésben végzett ureter-sigmatasak (Mainz-pouch II) típusú vizeletdeviációval hólyagrákos betegekben. Orv Hetil, 147(35):1691-1696.

25. **Riesz P**, Rusz A, Walter Gy, Székely E, Romics I. (2006) Véletlenül felfedezett heredaganat. Uroonkológia, 3(3):77-79.
26. Majoros A, Bach D, Keszthelyi A, Hamvas A, Mayer P, **Riesz P**, Seidl E, Romics I. (2007) Analysis of risk factors for urinary incontinence after radical prostatectomy. Urol Int, 78(3):202-7.
IF: 0,82
27. Bánfi G, Nyirády P, **Riesz P**, Kelemen Zs. (2007) Húgycső sérüléssel társuló péniszfraktúra. Magy Urol, (19)1:70-74.
28. **Riesz P**, Nyirády P, Szűcs M, Szendrői A, Majoros A, Bánfi G, Kiss A, Lotz G, Törzsök P, Kelemen Zs, Romics I. (2007) Hímvesződaganatos betegek kezelésével szerzett tapasztalataink. Orv Hetil, 48(37):1751-6.
29. Szűcs M, **Riesz P**, Mavrogenis S, Romics I. (2008) A hererák diagnózisa és kezelése. Orv Hetil, 149(19):894-896.

Nem az értekezés témájában megjelent idézhető abstractok

1. Romics I, **Riesz P**, Szendrői A. (2001) 204 vesedaganat műtétjével szerzett tapasztalataink. Magy Onk, 45:Abstr. 172.
2. Romics I, Déry L, Kállai L, **Riesz P**, Rusz A. (2003) Change in quality of life after radical prostatectomy. Int J Imp Res, 15(6):Abstr. 6.
IF: 3,063
3. **Riesz P**, Walter Gy, Romics I. (2003) Scrotalis tumor többszörös kiújulása. Magy Urol, 15(2):Abstr. 156.
4. Rusz A, Szendrői A, **Riesz P**, Romics I. (2003) Vese rák 30 évnél fiatalabb betegeken. Magy Urol, 15(2):Abstr. 141.

5. Harsányi L, **Riesz P**, Pajor L, Romics I. (2004) Daganatok miatt végzett húgyhólyag-deviációk szövődményeinek sebészi kezeléséről. *Magy Onk*, 48(1 Suppl):Abstr. 40.
6. Becker U, Moravek P, Romics I, **Riesz P**, Szendroi A, Schubert J, Ilse B, Junker K. (2006) Genetic alterations in squamous cell carcinoma of the penis detected by comparative genomic hybridization. *Der Urol Suppl*, 45(1):S89.
IF: 0,404
7. Romics I, Pánovics J, Majoros A, **Riesz P**. (2006) Radicalis prostatectomiával szerzett tapasztalataink (100 eset retrospektív analízise). *Magy Urol*, 3:Abstr. 140.
8. Romics I, **Riesz P**, Keszthelyi A, Pánovics J. (2006) Tapasztalataink radikális cystectomy és egy ülésben végzett ureter-sigmatasak (Mainz-pouch II) típusú vizeletdeviációval hólyagrakos betegekben. *Magy Urol*, 3:Abstr. 160.
9. Nyirády P, Bánfi G, **Riesz P**, Glasz T, Kelemen Zs. (2006) Invazív péniszgyöki daganatok. *Magy Urol*, 3:Abstr. 159.
10. Romics I, Majoros A, Pánovics J, **Riesz P**, Keszthelyi A. (2007) Lehetséges-e jelenlegi módszereinkkel az „understaging” csökkentése radicalis prostatectomiát megelőzően? *Magy Onk*, 51:Abstr. 388.
11. Szűcs M, Szendrői A, Mavrogenis S, **Riesz P**, Borka K, Székely E, Romics I. (2008) Krónikus lymphoid leukémia transzformációjának megjelenése a hímvessző bőrén. *Uroonkológia*, 5:Abstr. 21.
12. Romics I, Szász M, Székely E, Nyirády P, **Riesz P**, Majoros A. (2008) Could the experience of the pathologist influence under staging and under grading related to radical prostatectomy? *Eur Urol Suppl*, 7(3):P 930.
13. Bechker U, Romics I, Moravek P, Szendrői A, **Riesz P**, Schubert J, Junker K. (2008) Genetic imbalances in penile squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Eur Urol Suppl*, 7(3):P 156.

14. Nyírády P, Kelemen Zs, **Riesz P**, Szűcs M, Romics I. (2008) A hímveszôrák korszerû kezelésének aktuális kérdései. Orv Szem, 19:Abstr. 33.
15. Szűcs M, Mavrogenis S, **Riesz P**, Bécsi Á, Romics I. (2008) A szisztémás kemoterápia szerepe az invazív hólyagdaganatok kezelésében. 100 beteg követési adatai. Orv Szem, 20:Abstr. 35.
16. Szűcs M, Mavrogenis S, **Riesz P**, Romics I. (2008) Uroonkológiai Centrum: 9 év 6000 kezelésének tapasztalata. Orv Szem, 51: 139.

Könyvrészek:

1. Hamvas A, **Riesz P.** (2001) Húgyúti kövesség, kezelés, megelőzés. In.: Pharmindex Zsebkönyv. Urológiai Kiadás. MediMedia Információs Kft. Budapest. 25-26.
2. Hamvas A, **Riesz P.** (2003) Húgyúti kövesség, kezelés, megelőzés. In.: Pharmindex Zsebkönyv. Gyógyszeres terápia az urológiában. MediMedia Információs Kft. Budapest. 27-29.
3. Fekete F. **Riesz P.** (2004) Az erektilis diszfunkció (ED) és induratio penis plastica (IPP) In.: Docindex. Urológia 2004. Documed Kft. Budapest. 69-74.
4. Hamvas A, **Riesz P.** (2004) Húgyúti kövesség, kezelés, megelőzés. In.: Pharmindex. Urológia 2004. CMPMedica Információs Kft. Budapest. 464-465.
5. **Riesz P.** (2005) Személyi és gazdasági adatok. In.: Romics I. (szerk). 85 éves a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikája. Magyar Tudománytörténeti Intézet. Budapest. 161-168.
6. **Riesz P.** (2005) A klinika gyógyító munkáját jellemző számszerű adatok. In.: Romics I. (szerk). 85 éves a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikája. Magyar Tudománytörténeti Intézet. Budapest. 169-182.
7. **Riesz P.**, Sterlik G. (2006) A prostata alternatív műtétei. In.: Romics I. (szerk). Prostatata betegségei. White Golden Book. Budapest. 154-157.
8. **Riesz P.** (2006) Melyek azok az alternatív kezelések? In.: Romics I. (szerk). 66 kérdés a prostatáról. White Golden Book. Budapest. 113-114.
9. **Riesz P.** (2006) Miért kell műtét után kontrollra járni? In.: Romics I. (szerk). 66 kérdés a prostatáról. White Golden Book. Budapest. 114-115.

13. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Romics Imre Professzor Úrnak, aki az Urológiai Klinikára való belépésem óta segíti munkámat, szakmai fejlődésemet, lehetővé tette, hogy az alapvető szakmai ismeretek átadása után speciális területeken is képzésben részesülhessek. Soha nem fogom elfelejteni első beszélgetésünk során hallott szavait, miszerint igyekezzem a Klinikán eltöltött éveim alatt az „Intézetet szolgálni”. Ezt mindvégig figyelembe véve, Professzor Úr kiemelt szakmai és emberi támogatása mellett, magától értendő volt, hogy a tudományos munka felé terelődött a figyelmem. Tudományos pályafutásomat minden lehetséges eszközzel támogatta, tanácsaival segítette. Támogatásával itthoni és külföldi társintézetekkel sikerült kiépíteni gyümölcsöző munkakapcsolatokat, melyek nagyban hozzájárultak a disszertáció alapjait képező dolgozatok megszületéséhez. Támogatott abban, hogy a szűkebb szakterületemen folyamatosan naprakész ismeretekre tehettem szert, képzésemhez, kutatómunkámhoz időt és - amennyiben kellett - anyagi forrást biztosított. Nagyon sokat tanulhattam tőle nemcsak jelen munkám előkészítése, kivitelezése során, de élő példáját mutatta az alapos, önmagát folyamatosan képző, komoly szakmai alapokra helyezett, emberséges, kutató-klinikus orvoslásnak is.

Hálás vagyok, hogy a Professzor Úr által kialakított hólyagtumor munkacsoport tagjai a magasszintű gyógyító munka mellett az anyaggyűjtésben és a statisztikai feldolgozásban is segítségemre voltak. Így külön köszönetet szeretnék mondani Pánovics József docens Úrnak, Keszthelyi Attila és Majoros Attila adjunktus Uraknak és Szendrői Attila tanársegéd Úrnak. Hálás vagyok és minden segítségét köszönöm Schaff Zsuzsa Professzor Asszonynak, a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetének volt igazgatójának, aki pályám kezdete óta figyelemmel kísérte klinikai fejlődésemet, majd a tudományos vizsgálataim során személyes odafigyelésével minden helyzetben kitüntetett és támogatott. Lehetővé tette, hogy hazánk legnagyobb gyakorlatú uro-patológusával Székely Eszter Adjunktus Asszonnyal dolgozhassak együtt. Köszönöm továbbá, hogy a molekuláris vizsgálatokat a II. Sz. Patológiai Intézet, Molekuláris Patológiai Laboratóriumában barátaimmal Kis András docens Úrral, a Laboratorium Vezetőjével, Lotz Gábor Adjunktus Úrral és Törzsök Péter PhD ösztöndíjas fiatal kutatóval, nemzetközi szintű körülmények között végezhattük. Köszönet illeti Szarvas Tibor kutató barátomat, aki a molekuláris vizsgálatokban további segítségemre volt.

Nagyon köszönöm azt a nyitottságot, pozitív hozzáállást és a mindenkor érezhető segíteni akarást, melyet a Semmelweis Egyetem, Urológiai Klinikájának összes dolgozója

felől munkám során érezhettem. Tudom, hogy a nővérek, mütősnők, aszisztensek, egyéb szakdolgozók és orvosaink segítőkészsége egy ilyen munkához nélkülözhetetlen feltétel volt.

Természetesen, ha az ember a lemondásokkal teli tudományos munkát is fontosnak tartja, szüksége van kizökkenhetetlen háttérre, amit családom nagy türelme és szeretete biztosított. Köszönöm szépen feleségemnek Árvai Beátának, hogy mindvégig mellettem állt és támogatott, aki gyermekeimet a legcsodálatosabb békében neveli. Hálával tartozom Szüleimnek azért, mert számomra gyermekkorom óta erőn felül mindent megadtak, hogy álmaimat valóra válthassam.