Új vizsgálóeljárások urológiai daganatok diagnosztikájában

Doktori tézisek

Dr. Székely Eszter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Tímár József PhD., D.Sc.

Iskolavezető: Dr. Kovalszky Ilona PhD., D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Verebély Tibor PhD., D.Sc.
Dr. Tenke Péter PhD.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy Péter PhD., D.Sc.
tagjai: Dr. Kocsis Judit PhD.
Dr. Bajtai Attila PhD.

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 4
1. Bevezetés 5
1.1. Urothelialis daganatok 5
1.1.1. Az urothelialis tumorok epidemiológiája 5
1.1.2. Predisponáló tényezők az urothelialis tumorok kialakulásában 6
1.1.3.Az urothelialis sejtes carcinoma tünetei 6
1.2. A húgyhólyagdaganatok szövettani típusai 7
1.2.1.Benignus elváltozások 8
1.2.2. Papillomákat, papillaris carcinomákat utánzó elváltozások 9
1.2.3. Malignus elváltozások 10
1.2.3.1. Carcinoma in situ (CIS) 10
1.2.3.2. Malignus, papillaris urothelialis tumorok 12
1.2.3.2.1. Grade I. /PUNLMP/ 12
1.2.3.2.2. Grade II. /low grade/ carcinoma 13
1.2.3.2.3. Grade II. /high grade/ carcinoma 13
1.2.3.2.4. Grade III. /high grade/ carcinoma 14
1.3. Az urothelialis daganatok osztályozási rendszere (differentialtság, daganat stádium) 15
1.3.1. Urothelialis sejtes carcinoma - osztályozás- differentialtság 15
1.3.2. Urothelialis sejtes carcinoma – stádium beosztás (staging) 16
1.4. Az urothelialis sejtes carcinoma lefolyása 17
1.5.A daganatos betegek utánkövetése 18
1.6. Az urothelialis sejtes carcinoma molecularis diagnosztikája 18
1.7. A rutin diagnosztikában alkalmazott immunhistochemiai markerek (CK/5-6, CK20, CD44, Ki67) 19
1.8. Prognosticai markerek 20
1.8.1. Oncogenek (EGFR, FGFR3, BCL-2, VEGF) 20

1.8.2. Tumorsupressor gének (p53, p16, p27/kip1, PRB) 21
1.8.3. Proliferatiós markerek (Ki67, Aurora A/STK15, Survivin) 21
1.8.4. Gyulladásos markerek (Cytotoxicus sejtek, COX2) 22
1.8.5. Adhaesios molekulák, E-cadherin 23
1.9. Sejtkapcsoló struktúrák 23
1.9.1. Claudinok 23
1.9.2. Occludin 27
1.9.3. Tricellulin 27
1.10. Az urothelialis sejtes carcinoma terápiája 28
2. Célkitűzések 29
2.1. Az E-cadherin expressio grade-stage, ill. prognosticai összefüggéseinek meghatározása immunhistochemiai módszerekkel 29
2.2. Low grade ill. high grade urothelialis sejtes carcinomák Claudin expressiójának vizsgálata 29
2.3. Claudinok, Cytokeratinok ill. Ki67 expressiójának összehasonlítása nem malignus, ill. low grade urothelsejtes daganatokban 30
3. Anyag és módszer 31
3.1. E-cadherin expressio vizsgálata urothelialis sejtes carcinomákban 31
3.2. Low/high grade urothelialis sejtes carcinomák vizsgálata 34
3.2.1. Beteganyag 34
3.2.2. Szövettani vizsgálat, immunhistochemia 36
3.2.3. Molecularis biológiai vizsgálatok 37
3.2.4. Immunhistochemiai kiértékelés 39
- Semiquantitativ score analysis 39
- Morphometria 39
- Ki67 reakció értékelése 40
3.2.5. Statisztikai analysis 40

3.3. Felszínes – nem invasiv urothelialis tumorok vizsgálata 40
3.3.1. Immunhistochemiai vizsgálatok 41
3.3.1.1. Tissue microarray 42
3.3.1.2. Az immunhistochemiai reakciók kiértékelése 42
3.3.1.3. Statisztikai kiértékelés 43
4. Eredmények 44
4.1. E-cadherin prognosticai szerepének elemzése 44
4.1.1. E-cadherin expressio összefüggése a tumor grade-del, ill. stádiummal 44
4.1.2. E-cadherin expressio prognosticai szerepe 46
4.2. Low, ill. high grade urothelsejtes carcinomák Claudin expressiójának vizsgálata 46
4.2.1. Nem daganatos, ill. daganatos urothel immun-histochemiai, ill. Real Time PCR eredményei 46
4.2.2. A Claudin-7 prognosticai szerepe 51
4.3. Felszínes urothelsejtes carcinomák vizsgálata 53
4.3.1. Immunhistochemiai értékelés 53
4.3.2. A vizsgált markerek prognosticai szerepe normál urothelben, benignus, ill. low grade urothelialis daganatokban 59
5. Megbeszélés 61
6. Új megállapítások, következtetések 71
7. Összefoglalás 72
8. Summary 74
Irodalomjegyzék 75
Saját publikációk jegyzéke 97
Köszönetnyilvánítás 104

Rövidítések jegyzéke

AVD	Avidin-biotin complex
BCG	Bacillus Calmette Guérin
BPH	Benignus prostata hyperplasia
BSA	Bovine serum albumin
CIS	Carcinoma in situ
CLDN	Claudin
CPE	Clostridium perfringens enterotoxin
CT	Computer tomographia
CK	Cytokeratin
DAB	Diamino-benzidin
DNS	Desoxiribonucleinsav
EAU	European Assotiation of Urology
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FGFR3	Fibroblast growth factor 3
FISH	Fluorescens in situ hybridisatio
H&E	Hematoxylin-Eosin
HCV	Hepatitis C vírus
HG	High grade
IP	Invertalt papilloma
LG	Low grade
MA	Macula adherens
MMC	Mytomicin-C
MRNS	Messenger ribonucleinsav
MR	Mágneses resonantia
NMP22	Nuclear matrix protein 22
OS	Overall survival
PBS	Phosphate-buffer-saline
PCR	Polymerase chain reaction
PUNLMP	Papillary urothelial neoplasm, low malignant potential
RNS	Ribonucleinsav
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
TCC	Transitional cell carcinoma
TJ	Tight junction
TMA	Tissue microarray
TUR	Transurethral resectio
UCC	Urothelial cell carcinoma
UH	Ultrahang
UP	Urothelial cell papilloma
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIM	Vimentin

1. BEVEZETÉS

1.1. Urothelialis daganatok

1.1.1. Az urothelialis tumorok epidemiológiája

A rosszindulatú daganatos betegségek gyakorisága világszerte, de hazánkban is növekvő tendenciát mutat (1-4). E daganatok között szerepelnek az urothelialis hámból kiinduló rosszindulatú daganatok is. Az urothelialis hám - mely a vesemedencétől a húgycsőig béleli a vizelettel érintkező üregek belfelszínét - az urothelialis sejtes carcinoma (UCC) kiindulási helye. Az UCC incidenciája is világszerte emelkedő tendenciát mutat, az urológiai tumorok közül a második leggyakrabban előforduló daganatféleség. Leggyakrabban húgyhólyagból indul ki, de az uretherek, a vesemedence is lehet primer UCC kiindulási helye (5). Az UCC korai felismerése a betegség kezelése, a várható kórlefolyás megítélése, a kezelt betegek életminősége szempontjából igen fontos. Az UCC leggyakrabban vérvizelés tünete miatti kivizsgáláson átesett betegeknél kerül felismerése. Általában transurethralis resectio –TUR - szövettani vizsgálatával sikerül a rosszindulatú daganat jelenlétét igazolni. Egyelőre nem ismert olyan non-invasiv vizsgáló eljárás, amelynek segítségével vérvizelés miatt jelentkező betegeknél biztonsággal lehet UCC jelenlétét igazolni, vagy kizárni. Az UCC szövettani képét tekintve low grade ill. high grade csoportba sorolható. E két csoportnál lényeges különbség mutatkozik a várható klinikai lefolyás tekintetében. Ugyan low grade daganatok recidivára hajlamot mutatnak, csupán egy részük (mintegy 10-20%) mutat klinikai progressiót – infiltrativ terjedést. Jelenleg nem ismert olyan biztonsággal használható vizsgáló módszer, amelynek segítségével sikerül kiszűrni a low grade UCC-k közül azt a csoportot, amely klinikailag agresszívebben viselkedik, így erőteljesebb kezelést igényel (1).

Az UCC miatt megbetegedettek száma évente 300 ezer körüli, Európában évente több mint 100000 megbetegedés fordul elő. Férfiaknál az ötödik, nőknél a negyedik leggyakoribb hám eredetű rosszindulatú daganatféleség. Magyarországon évente mintegy 2000 új megbetegedés fordul elő. E daganat miatt csaknem 1000 haláleset következik be évente Magyarországon (6, 7). E daganat miatt megbetegedett férfiaknál

az indicencia mintegy háromszor magasabb a nőknél (8, 9). Bár az UCC miatt megbetegedettek gyakran az 50 évesnél idősebbek korosztályából kerülnek ki, évről-évre csökken e daganatban megbetegedettek átlagos életkora (6-8).

1.1.2. Predisponáló tényezők az urothelialis tumorok kialakulásában

Az UCC-re predisponáló faktorok közül első helyen említendő a dohányzás. A dohányzás okozta UCC-hez legalább 10 év intenzív (napi fél-1 doboz cigaretta elszívása) dohányzás szükséges, azonban ezen intervallum után történő dohányzásmentes évek nem csökkentik az UCC kialakulásának rizikóját (9). Az UCC kialakulásának megelőzésében így elsődleges szerepe lenne a dohányzás megszüntetésének, ill. a fiatalok körében a dohányzástól való elrettentésnek. A dohányzás mellett jól ismert daganatot előidéző tényezők bizonyos gyógyszerek szedése (cyclophosphamide, tartós phenacetin kezelés), ill. foglalkozási ártalom; a dolgozó egyének aromás vegyületekkel való koncentrált érintkezése (10,11).

Fokozott rizikócsoportba tartoznak azok a betegek is, akik más kismedencei szerv rosszindulatú daganata miatt sugártherapiában részesültek (prostata, cervix, endometrium cc.) (12). Feltételezett, de egyelőre teljes körben még nem bizonyított a túlzott kávé, alkohol, mesterséges édesítőszerek fogyasztásának ill. az UCC kialakulásának összefüggése (2, 13). Diabeteses betegeknél is fokozott megbetegedési hajlamot mutatott ki néhány munkacsoport (14). A húgyhólyagban kialakuló laphám carcinoma okaként a Schistosoma hematobium fertőzés, ill. chronicus irritatio egyértelműnek tűnik (3, 15). A dohányzáson kívüli oki tényezőknél az is egyértelmű, hogy fokozott folyadékbevitellel a carcinogének koncentrációja csökkenthető, így az urotheliumban kialakított carcinogén hatásuk is kevésbé érvényesül (11, 16).

1.1.3. Az urothelialis sejtes carcinoma tünetei

Az UCC kialakulását az esetek túlnyomó többségében mikroszkópos vagy makroszkópos haematuria jelzi (17). Haematuriát okozhat természetesen számos egyéb megbetegedés is, azonban a haematuria hátterében az UCC-t mindig ki kell zárni (8).

Haematuriát okozó egyéb megbetegedések a húgyutak gyulladásos betegségei, kövesség, vesebetegség, cardiológiai megbetegedések miatt alkalmazott alvadásgátlók alkalmazása, ill. számos haematológiai megbetegedés. Vérvizelés esetén vizelet cytologiai vizsgálat is végzendő, sajnos azonban e vizsgálat csak mintegy 60-70%-ban világít rá rosszindulatú daganat jelenlétére, ezért egyéb kiegészítő vizsgálatok is szükségesek. Vérvizelés esetén a húgyhólyag cytologiai vizsgálata mellett fontos szerepe van a cystoscopiának, a hasi ultrahang vizsgálatnak; a papillaris tumorok ugyanis - melyek a hólyag lumenébe emelkednek - e kiegészítő vizsgálatokkal könnyedén felfedezhetőek, azonban gyakran nem járnak markáns cytologiai eltéréssel. A laposan megjelenő in situ carcinoma cystoscopiával, ill. az ezt kiegészítő szövettani vizsgálattal diagnosztizálható -a vizelet cytologiai vizsgálat mellett-, ugyanis a CIS egy high grade tumor, melynek leváló sejtjei markáns malignitási jeleket mutatnak vizelet cytologiai mintában) (18). A CIS diagnosztikájában tehát elsődleges szerepe van a vizelet cytologiai vizsgálatnak, ill. a cystoscopiának. Akár bizonytalan klinikai észlelés esetén, akár rosszindulatú daganat erőteljes feltételezése esetén transurethralis resectio, ill. hólyag térképbiopsia alkalmazása szükséges. A TUR minták, ill. a hólyagbiopsiák értékelése a pathológusok mindennapi feladata között szerepel. Ezek pontos megítélését lásd a későbbi fejezetben. Az imént felsorolt diagnosztikus eljárások mellett a klinikai stádium megítélésére a továbbiakban CT vagy MR vizsgálat szükséges (19, 20). Ezek segítségével a betegség kiterjedtségét meg lehet becsülni, a választandó ideális therapia meghatározása céljából. A CT vizsgálatok elterjedése az intravénás urographiát, mint diagnosztikus módszert mára lényegében kiszorította a napi gyakorlatból (20, 21).

1.2. A húgyhólyagdaganatok szövettani típusai

A húgyhólyagban megjelenő daganatok túlnyomó többsége rosszindulatú, azonban számolnunk kell a ritkábban előforduló jóindulatú daganatokkal is. Ezek leggyakrabban előforduló típusai a papillomák, melyek általában „szokványos” urothelsejtes papillomák, melyek a húgyhólyag lumenébe emelkednek, illetve az ún. invertalt papillomák, melyek a felszínről a subepithelialis szövetbe türemkedő növekedést mutatnak (lásd alább).

1.2.1. Benignus elváltozások

Urothelialis Papilloma (UP)

A papilloma papillaris növedék, mely centralis fibrovascularis tengellyel rendelkezik. A fibrovascularis tengelyre normál morphologiájú, rétegzettségű urothel borul. Nagy nagyítású látótérben vizsgálva a tengelyre boruló urothelialis sejtek morphologiája megkülönböztethetetlen az ép húgyhólyag hámjától. Ez a szövettani kritériuma a papilloma diagnózisának. Ennek elkülönítése low grade urothelsejtes carcinomáktól olykor igen nehéz, ugyanis a papillomákon belül is előfordulhat kisfokú rendezetlenség, vagy monotónia, amely már a carcinomák szövettani képére emlékeztethet. (A low grade daganatokban általában az ún. monoton atypia jellemző).
További fontos szövettani kritériumként említendő, hogy papilla fúzió nincs. Mivel benignus daganat, infiltrativ terjedést nem mutat. (Néha invertalt papillomával keveredhet.) (22, 23)

Invertalt papilloma (IP)

Az invertalt papilloma morphologiai jegyei azonosak a szokványos papillomáéval, azonban itt a papilloma nem a húgyhólyag lumene felé boltosul, hanem a falba türemkedik. E jellegzetes mintázat azért veszedelmes, mert az invertalt növekedés technikailag nem megfelelően készített metszeteken megtévesztő lehet, ugyanis infiltrativ terjedést mutató urothelsejtes carcinomát utánozhat. Felismerésének éppen ebben van a jelentősége; az invertalt papilloma sebészi eltávolítása után a beteg nem igényel további urológiai/onkológiai kezelést, míg invasiv carcinomáknál ez utóbbi mindenképpen szükséges.

Az invertalt papilloma benignus voltának felfedezése a szövettani vizsgálattól várható, ami olykor nehézségekbe ütközhet (lásd fent). Az invertalt papilloma morphologiája az invertalt mintázatot leszámítva megegyezik a szokvány urothelialis papillomáéval. Jellegzetesnek mondható, hogy a papillák basisán elhelyezkedő sejtek pallisad állásba rendeződnek. Emellett igen jellegzetesek a pseudoglandularis struktúrák is, melyek Brunn-fészkekre, cystitis glandularisra emlékeztető szöveti képet

mutathatnak. (Véleményem szerint a cystitis glandularis és az invertalt papilloma kialakulása közös tőről fakadhat, bár ilyen irányú adatot az irodalomban csak igen régi közleményekben találtam (24, 25)). Az invertalt papillomák keletkezésének hátterében HPV infectio nem játszik szerepet (26). Sokak szerint gyulladás okozta relative limitált hámproliferáció következtében alakulnak ki (22). Az invertalt papillomák felszíne sima, így tapasztalt urológusokban már a resectio során felmerülhet, hogy ezzel a betegséggel kell számolni. (Amennyiben az urológus e benyomása szerepel a kérőlapon, az esetleges fals-positiv diagnózis könnyebben elkerülhető). Érdemes megjegyezni, hogy az urothelsejtes carcinomáknak előfordulhat invertalt növekedési mintázata. Ezek szöveti képe azonban jóval polymorphabb az invertalt papillomákénál, ezért ezzel tapasztalt pathológus nem keverheti össze az invertalt papillomát (22, 23, 25, 27-38).

Laphámpapillomák

Laphámpapillomák előfordulhatnak a húgyutakban, ezek igen ritkán jelennek meg. Jelen ismereteink szerint kialakulásuknak nincs köze HPV infectióhoz (26, 39, 40). Szöveti képük megegyezik a más testtájakon előforduló laphámpapillomáékkal.

1.2.2. Papillomákat, papillaris carcinomákat utánzó elváltozások

Előfordulhat, hogy gyulladás során a nyálkahártya papillaszerű redőket vet, ezek morphologiája olykor mind makroszkóposan, mind mikroszkóposan papillaris növedékekre emlékeztethet. A diagnosztikus munka során ezek valódi neoplasticus folyamatoktól való elkülönítése nehézségekbe ütközhet. A gyulladásos atypia igen komoly diagnosztikus nehézséget jelenthet az urológiai minták vizsgálata során, ilyenkor kiegészítő immunhistochemiai reakciók (CD44, p53, Ki67, CK20) végzése szükséges (1. táblázat). Megjegyzendő, hogy még ezek segítségével sem sikerül valamennyi esetben biztosan elkülöníteni a daganatos folyamatot reaktív gyulladásos atypiától, különösen olyan betegek mintában, akiknél korábbi rosszindulatú daganat kezelése mellett recidiva, vagy a kezelés következtében kialakult gyulladásos atypia lehetősége merül fel (22).

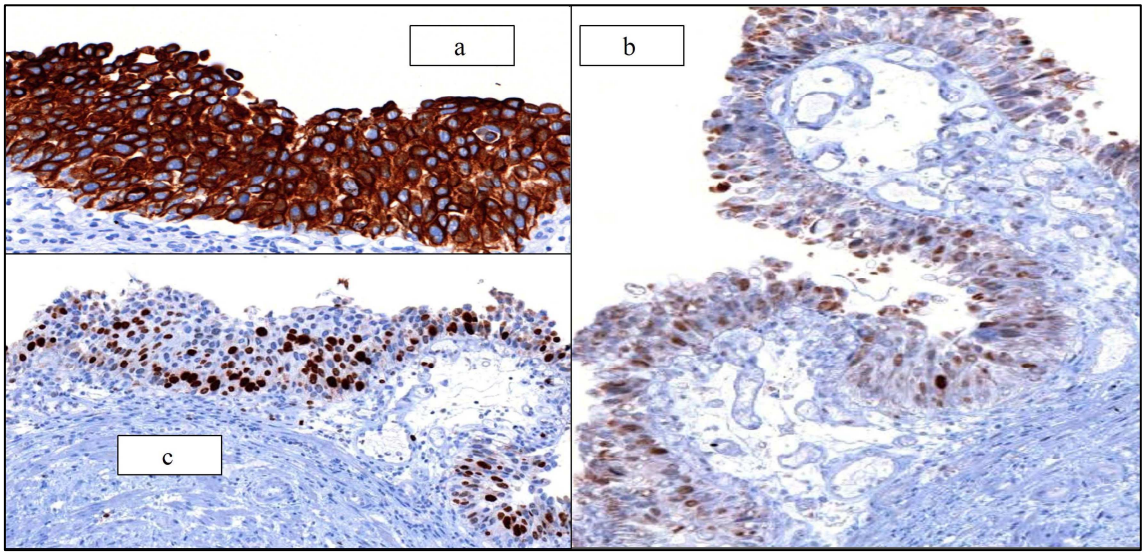
1.2.3. Malignus elváltozások

1.2.3.1. Carcinoma in situ (CIS)

Előfordulhat önmagában, de papillaris carcinoma mellett is. Amennyiben önmagában fordul elő, cystitises panaszokat okozhat, és előfordul, hogy a cystoscopián sem egyértelműen tumor benyomását kelti (az interstitialis cystitis szinte azonos cystoscopos képet mutathat). Az in situ carcinoma szövettani felismerése típusos esetekben nem okoz gondot. Olykor azonban gyulladás melletti atypia okozhat hasonló szöveti képet. Az in situ carcinomát súlyos dysplasiától a mai ajánlások szerint nem kell elkülöníteni, a súlyos dysplasia már in situ carcinomának tekinthető. Amennyiben gyulladásos atypiától akarjuk elkülöníteni, a Ki67, CK20, p53, CD44 immunhistochemiai reakciók nyújthatnak segítséget. Ezek pontos kiértékelését lásd az 1. táblázatban (22).

1. Táblázat. Immunhistochemiai markerek expressiója különböző urothelialis eltérésekben

	Normál urothel	**Reaktív atypia**	**Dysplasia**	**CIS**
CK20	Felszíni hámrétegben	-	Felszín, + intermedier sejtrétegek	Intenzív festődés valamennyi sejtrétegben
Ki67	Csak a basalis rétegben	Basalis sejtrétegben + elszórtan az intermedier sejtrétegekben	Basalis sejtrétegben + elszórtan az intermedier sejtrétegekben	Fokozott, valamennyi sejtrétegben
P53	-/+ a basalis rétegben	Csak basalisan, gyengén +, vagy -	Fokozott expressio bármely sejtrétegben	Intenzív festődés valamennyi sejtrétegben
CD44	Csak a basalis rétegben van reakció	Diffúz, erőteljes reakció	Nincs reakció, vagy csak elszórtan, bármely sejtrétegben	Nincs reakció



1. Ábra. Az 1. táblázatban jelzett immunhistochemiai markerek jellegzetes eloszlása high grade, non-invasiv urothelialis carcinomában a. CK20, b. p53, c. Ki67 reakció (200X)

a.: CK20, b.: P53, c: Ki67 reakció.

(A CK20 reakció erőteljesen positiv a **rendezetlen** hámban, változó intensitasú p53 nuclearis positivitás számos sejt magjában, Ki67 nuclearis positivitás valamennyi sejtréteg jónéhány sejtjében.)

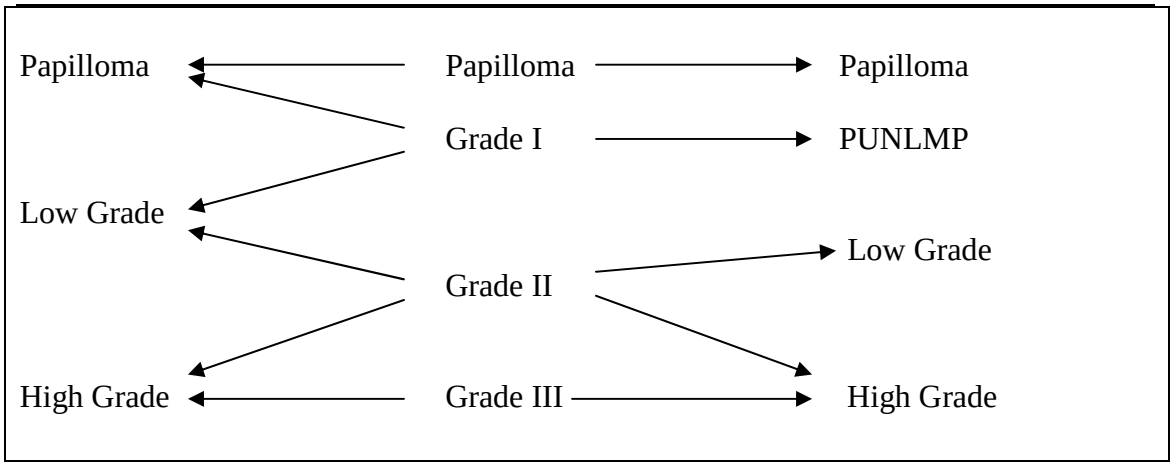
Az in situ carcinoma megjelenhet Brunn-fészkekben is, ez utóbbi focusokat igen fontos invasiv carcinomától elkülöníteni. Az in situ carcinoma szövettanilag egy high grade tumor, melynek önmagában való megjelenése esetén invasio nincs. Típusos esetben a basalis membran felett kifejezetten polymorph, nagy maggal, keskeny cytoplasma szegéllyel rendelkező sejtek alkotnak szabálytalan, rendezetlen sorokat. Osztódó alakok bármely sejtsorban előfordulnak - normál hámban osztódás csak a basalis sejtsorban mutatható ki. Az in situ carcinomáknak előfordulhatnak olyan szövettani típusai, melyek felismerése komoly tapasztalatot igényel. Ilyen lehet a kissejtes in situ carcinoma, az ún. „denuding" mintázatú carcinoma. Ez utóbbi diagnosztikus nehézségét éppen az adja, hogy a tumorsejtek könnyen lesodródnak a felszínről és olykor egyetlen sejtsorba rendeződött atypusos sejtek jelzik rosszindulatú daganat jelenlétét (22, 23).

1.2.3.2. Malignus, papillaris urothelialis tumorok

Valamennyi altípusra jellemző több-kevesebb papillaris megjelenés. A grade meghatározása a sejtpolymorphia, a mitosisok helye és száma, necrosis jelenléte/hiánya alapján történik.

2. Táblázat. Urothelialis daganatok - a jelenleg használatos nomenclatura, ill. a korábbi nomenclaturák összevetése

Papillaris tumorok- GRADING, Nomenclatura



1.2.3.2.1. Urothelialis sejtes carcinoma Grade I.

(Papillaris urothelialis neoplasia, low malignant potential - /PUNLMP/)

A korábban grade I-nek nevezett urothelsejtes carcinomát a jelenlegi nomenclatura alapján PUNLMP-nek szokás nevezni (papillaris urothelialis neoplasia, low malignant potential). Az elnevezés igen bonyolult és sokak számára nevetséges, várhatóan a következő években ez az elnevezés módosulni fog. Az elnevezés kialakításában egyik fő szempontként szerepelt, hogy a névből a carcinoma szó hiányozzon, egyik elmélet szerint azért, hogy a betegeket ne sokkolja a betegségük kapcsán a carcinoma szó, hiszen ez alacsony malignitású betegség, és a várható klinikai lefolyás alapján relatíve szelíd betegségnek felel meg (alacsony recidiva ill. progressiora való esély) (22). Az elváltozás szöveti képe igen erőteljesen emlékeztet a papillomára,

azonban szemben a papillomáknál látható, a papillákat borító normál urothelsejtes képpel, ún. monoton cytologiai atypia jellemző: hiányzik a normál urothelialis rétegződés, a sejtmagok a normál sejtek magjainál valamelyest nagyobbak, de lényegében egyformák. Mitosisok e daganat típusban ritkán fordulnak elő, ha igen, csupán a papillák basisán. Invasio nem szokott előfordulni. (Amennyiben mégis invasio merül fel, felvetődik, hogy egyes területeken a tumor grade-je magasabb lehet (22, 23)).

1.2.3.2.2. Grade II. /low grade/ carcinoma

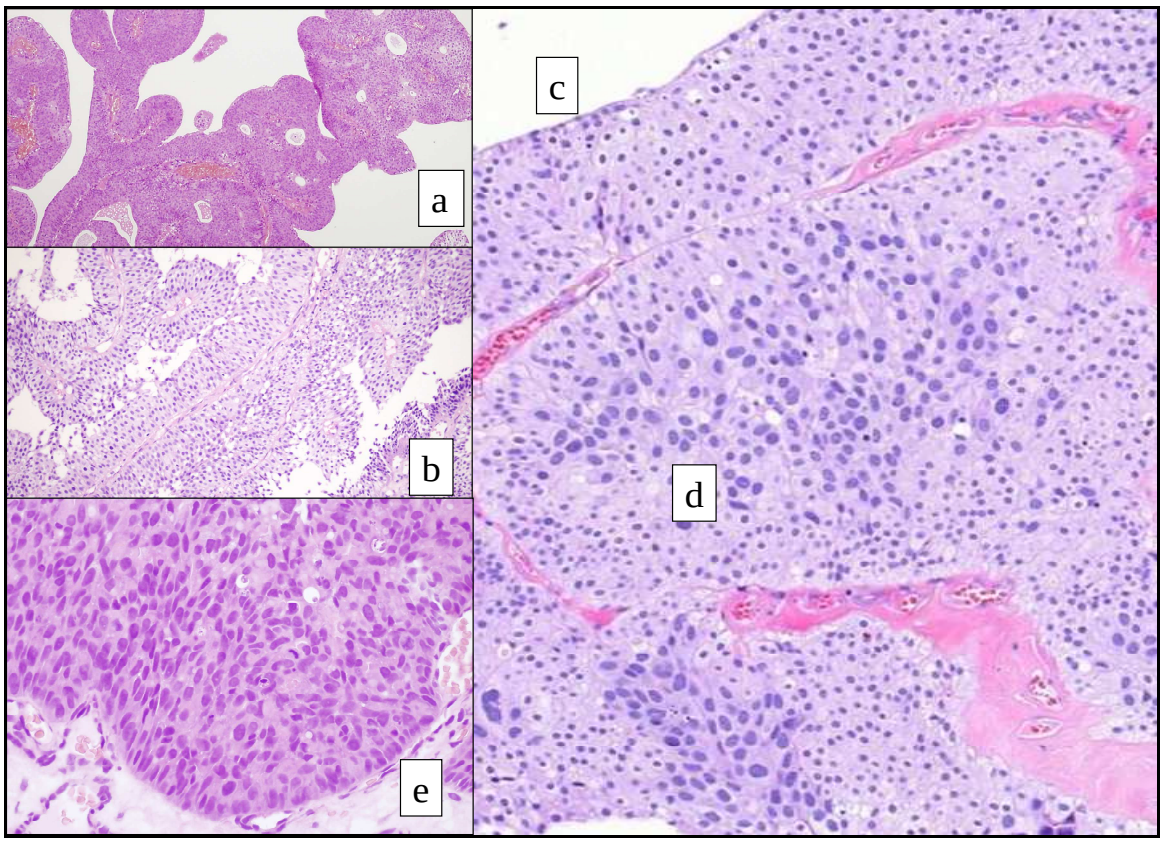
E daganatoknál kis nagyítással is jól érzékelhető kisfokú cytologiai, illetve structurális zavar látható. A kötőszövetes sövényeket vaskos sorokba rendeződő daganatsejtek borítják. Papillafúzió gyakran fordul elő. Az osztódások nem gyakoriak, illetve low grade tumorok jellegzetességeként a basison fordulnak elő, azonban egy-egy osztódás a magasabb rétegekben is jelen lehet. E daganatok viszonylag változatos szöveti képet mutathatnak, a legsúlyosabb eltérés értékelendő a grade megállapításakor. Előfordul, hogy egy daganat túlnyomórészt low grade szöveti képet mutat, azonban egy-egy fókuszban magasabb grade-et mutató eltérés is jelen van, ilyenkor a legsúlyosabb eltérést kell a végső grade meghatározásánál figyelembe venni.

1.2.3.2.3. Grade II. /high grade/ carcinoma

A high grade urothelsejtes carcinoma kifejezett cytologiai, illetve structurális atypiát mutató eltérés. A daganat magas grade-je (alacsonyan differenciált foka) jól érzékelhető, itt már kis nagyítással is könnyű észrevenni a magpolymorphismust, illetve az osztódások nagyobb számát, valamint utóbbiak valamennyi rétegben történő előfordulását. Igen gyakran low grade eltérések mellett kisebb fókuszokban jelenik meg. A grade III. high grade tumortól azonban elkülöníti a jól érzékelhető papillaris mintázat megőrzött volta. E daganatok már gyakran invasiv terjedést mutathatnak, azonban előfordul, hogy csak apró fókuszokban, sorozatmetszeten válik egyértelművé az invasio – microinvasio – jelenléte (22).

1.2.3.2.4. Grade III. /high grade/ carcinoma

Jól érzékelhető structurális és cytologiai atypiával jár. Papillaképződés nem, vagy csak jelzetten észlelhető, típusos, illetve atípusos osztódások minden szinten előfordulnak. E daganat igen gyakran kifejezett infiltrativ terjedést mutat, gyakran a hólyagfal mélyebb rétegeiben is egyértelműen megfigyelhetőek az invasiv gócok. Gyakran fordul elő kiterjedt necrosis is a daganaton belül. A tumor configuratioját, ill. terjedési mintázatát is meg kell határozni a leletezés során. Az ún. infiltrativ mintázatú invasiot mutató daganatot hordozó betegség kedvezőtlenebb klinikai lefolyással jár, mint a trabecularis ill. nodularis invasiot mutató daganattípus (22, 23).



2. Ábra. Különböző urothelialis daganatok jellegzetes mikroszkópos képe

a. Urothelialis papilloma (H&E, 100X)
b. Urothelialis sejtes carcinoma Gr I. (PUNLMP) (H&E, 100X)
c. Urothelialis sejtes carcinoma Gr II. low grade (H&E, 200X)
d. Urothelialis sejtes carcinoma Gr II. high grade (A papilla kötőszövetes tengelyének két oldalán különböző differentialtságú UCC látható) (H&E, 200X)
e. Urothelialis sejtes carcinoma Gr III. high grade (H&E, 200X)

1.3. Az urothelialis daganatok osztályozási rendszere (differentialtság, daganat stádium)

1.3.1. Urothelialis sejtes carcinoma - osztályozás- differentialtság

Az urothelsejtes carcinomák szövettani osztályozása adott esetben igen komoly diagnosztikus nehézségekbe ütközhet. A WHO 1973-as osztályozása hosszú ideig a nemzetközi standard alappillérének volt tekinthető. Ennek alapján a benignusnak tekintett urothelialis papilloma mellett I., II., III. grade-ű, vagyis fokozatú urothelsejtes carcinomát különböztettek meg. A WHO 2004-es osztályozása a korábbitól valamelyest eltér; (a korábbi szövettani ismertetés már az új WHO kritériumok alapján íródott) a korábban grade I. differenciáltságú TCC-nek nevezett daganatokat „illették" az alábbi új névvel: papillaris urothelialis neoplasia, low malignant potential (azaz alacsony malignitási potenciállal rendelkező) - PUNLMP (22, 23, 41). E daganatféleség különleges megnevezésének indoka azon alapszik, hogy e daganatok recidivahajlama igen alacsony, a betegek carcinomával való megbélyegzése fölösleges aggodalmat okoz (valójában vélhetően biztosítási ügyek elkerülése volt az elsődleges cél). Az új osztályozás legfőbb előnyének az tartható, hogy a korábban grade II-nek nevezett daganatok békésebb szöveti képet mutató tagjait a grade I-be lehet sorolni. (A korábbi osztályozás szerinti grade II. daganatokat a papillákat borító sorok vaskossága, emelkedett sejtsor száma miatt nem lehetett grade I-nek nevezni a szabályok szerint). A papillaris jellegű, de igen kifejezett cytologiai atypiát mutató daganatok a grade II. high grade, némelyikük a grade III. jelzésű csoportba kerültek. A jelenleg érvényben lévő ajánlás alapján húgyhólyagdaganatok diagnosztizálásakor mind a WHO 1973, mind a WHO 2004. évi osztályozását fel kell tüntetni a leletben a két grading szisztéma statisztikai összevethetőségének könnyebbé tétele miatt (19, 20). Nyugat-európai országokban a betegek kezelése annak alapján történik, hogy a daganat low grade, vagy high grade típusba tartozik-e. Magyarországon a high grade daganatok közül csupán a grade III. tumorokat kezelik agresszíven, a grade II. high grade, ill. a grade II. low grade tumorok kezelési stratégiája azonos a jelenlegi szokások szerint (20, 42, 43).

1.3.2. Urothelialis sejtes carcinoma – stádium beosztás (staging)

3. Táblázat. A húgyhólyagrákok 2009-es TNM beosztása (TNM7)

T- Primer tumor	
TX	nem értékelhető a primer tumor
T0	nincs igazolható primer tumor
Ta	nem-invasiv papillaris carcinoma
Tis	carcinoma in situ: "lapos tumor"
T1	tumor betör a hám alatti 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 hólyag körüli szövetekbe tör
T3a	mikroszkóposan
T3b	makroszkóposan (hólyagon kívüli tömeg)
T4	tumor a következőkből legalább egyet beszűr: prostata, vagina, méh, medencefal, hasfal
T4a	tumor beszűri a prostatát, a vaginát vagy a méhet
T4b	tumor beszűri a medencefalat vagy a hasfalat
N- nyirokcsomó	
NX	regionális nyirokcsomók nem értékelhetőek
N0	nincs regionális nyirokcsomó áttét
N1	egyetlen kismedencei nyirokcsomó áttét (hypogastricus, obturator, külső iliacalis vagy presacralis)
N2	több kismedencei nyirokcsomó áttét, mely> 2 cm és <5cm, vagy több nyirokcsomó érintett, melyből egyik sem> 5cm
N3	nyirokcsomó áttét, mely> 5cm
M - távoli áttét	
MX	nem értékelhető a távoli áttét
M0	nincs távoli áttét
M1	van távoli áttét

A TNM 2009. évi kiadása alapján a 3. táblázat ismerteti a stádiumbeosztást. Intézetünkben a transurethralis resecatumok stage-meghatározása az urológus kollégákkal való közös megegyezés alapján úgy történik, hogy a stage száma elé odateszünk egy „minimum” megjelölést. Ugyanis amennyiben a TUR minta tartalmaz hólyagfali izomszövetet, és a daganat izominvasiot mutat, a T-meghatározás T2 lenne, de mivel nem zárható ki, hogy a betegnek hólyagfalat áttörő daganata van, ami a mintavétel természete miatt nem állapítható meg, a T-meghatározás csak hozzávetőleges lehet (44). A fals T meghatározását - helytelenül alacsony T-meghatározást - elkerülendő szerepel leleteinken a minimum-T megjelölés. (Ez egy „házi szabály”, az irodalomban konkrét hasonló megjelölésre nem találtam adatot, csupán arra vonatkozóan, hogy a grade/stage meghatározása cystectomia előtt gyakran pontatlan lehet (44, 45)). Ez az urológus kollégáknak nagyobb segítséget jelent a therapia megválasztásában, mintha a mintavétel természete miatt Tx szerepelne a leleten. A húgyhólyagban zsírszövet a subepithelialis térben is előfordulhat, így zsírsejtek közötti infiltratio nem jelenti feltétlenül T3-as daganat jelenlétét (22).

1.4. Az urothelialis sejtes carcinoma lefolyása

A felszínes, ill. a minimálisan invasiv (T1) stádiumú daganatok 5 éves túlélése mintegy 95%. Amennyiben a daganat invasivvá, izominvasivvá válik, az 5 éves túlélés már csupán 50%. Felszínes daganatok esetén is mintegy 10-20% az esélye a daganat progressiojának, vagyis adott esetben egy Ta stádiumú daganat T1-es, majd a későbbiekben T2 stádiumúvá való fejlődésének. Mindezek miatt a betegek kezelése, ill. a recidivák minél hamarabbi felfedezése elengedhetetlen. Amennyiben a resecatumban hólyagfali izomrostok jelenlétét szövettani vizsgálattal igazolni nem lehet, 6 héttel a resectio után re-resectio szükséges. A recidiva kialakulásának esélyét növeli a daganat több gócban való egyidejű megjelenése, ill. a magasabb grade jelenléte, valamint akár minimális invasio. Amennyiben a daganat izominfiltrációt is mutat, cystectomia, ill. chemotherapia alkalmazása esetén is kell számolnunk metastasisok kialakulásának mintegy 50%-os esélyével, mely a regionális nyirokcsomók mellett leggyakrabban a tüdőben, májban, csontokban várható (19, 20, 42).

1.5. A daganatos betegek utánkövetése

Az utánkövetésnek alappillére a cystoscopos vizsgálat, ill. a rutinszerűen elvégzett cytologiai mintavétel. A TUR után 3 hónappal rutinszerűen cystoscopos vizsgálatot kell végezni, emellett vizelet cytologiai vizsgálat szükséges. Ideálisan 3 egymást követő napon hólyagürítés utáni első vizelet vizsgálata szükséges, mely cytospinnel való centrifugálás után Papanicolau-festést követően történik.

Low grade tumorok esetén, amennyiben a beteg panaszmentes és az első TUR után végzett cystoscopos vizsgálat, ill. a cytologiai minták is negatívak, fél éves kontrollok elégségesek.

High grade tumor esetén tünetek megjelenése nélkül is 3 havonta szükséges cystoscopiát, ill. vizelet cytologiai vizsgálatot végezni. Ez utóbbi megítélését nehézzé teheti a kezelések miatt kialakult kifejezett cystitis jelenléte, ugyanis a gyulladásos sejtek „lefedhetik" a diagnosztikus hámsejteket.

Residualis tumor, ill. recidiva esetén high grade tumoroknál a már említett 3 egymást követő minta alapján nagy valószínűséggel sikerül a tumor recidivát kimutatni. Izominvasiv daganatoknál az említett módszerek mellett CT, ill. MR vizsgálatokat is szükséges végezni a lehetséges távoli áttétek lehető legkorábbi kimutatása céljából (19, 20, 42, 46-48).

1.6. Az urothelialis sejtes carcinoma molecularis diagnosztikája

A vizelet cytologiai vizsgálatok nem kielégítő érzékenysége miatt számos molecularis biológiai teszt kifejlesztésére irányuló kísérlet zajlik. A molecularis biológiai tesztek a hámsejtekben leggyakrabban jelenlévő genetikai eltérések kimutatására irányulnak. Ennek következtében elmondható, hogy e tesztek érzékenysége bár igen kifejezett, specificitásuk azonban elmarad a vizelet cytologiai mintákétól, ugyanis gyakran eltérést mutatnak ki olyan sejtekben is, amelyek morphologiája nem utal daganat jelenlétére. Vagyis már olyan stádiumban mutatnak ki károsodást, amikor a betegnek még nem fejlődött ki a daganata. Emiatt, ill. kifejezett költség- valamint szakember igényük miatt jelenleg még nem terjedtek el. (A II. sz.

Pathologiai Intézetben az UROVYSION elnevezésű teszt kipróbálása történt az elmúlt években. Ez egy fluorescens in situ hybridisation alapuló vizsgálat, mely a 9-es chromosoma részleges vagy teljes elvesztésének kimutatására irányul. Emellett a 3., 7. és 17. chromosomák pericentromericus régióinak eltéréseit célozza meg (49, 50). Az eredmények a többi tesztéhez hasonlóak: a túl magas sensitivitás miatt a klinikai alkalmazhatósága elmarad a hagyományos cystoscopia/vizelet cytologiai vizsgálat effectivitásától (51, 52)).

1.7. A rutin diagnosztikában alkalmazott immunhistochemiai markerek (CK/5-6, CK20, CD44, Ki67)

A CK/5-6 más szervek hámjaihoz hasonlóan, az urothelialis hámban a basalis rétegben megjelenő magas molekula-súlyú cytokeratin. Egyes alacsonyan differentiált urothelialis daganatokban magasan expressalódik (53).

A CK20 normál urotheliumban az esernyő sejtekben mutatható ki (54). Kóros expressiója high grade urothelialis daganatokban fordul elő. Segítségével a differenciál-diagnosztikailag hasonló képet mutató entitások megkülönböztethetőek: gyulladásos atypia vs. CIS. (22) (lásd 1. táblázat) (Saját tapasztalatom alapján ez utóbbi megállapítás a napi gyakorlatban sajnos nem minden esetben igaz.)

A CD44 sejtfelszínen megjelenő sejt-sejt ill. sejt-matrix communicatióban résztvevő molekula, mely igen sokféle szövetben kimutatható. Expressiójának változatossága szintén a gyulladásos atypia/carcinoma differenciál-diagnosztikájában játszik szerepet (22, 55). (lásd 1. táblázat)

A Ki67 proliferatiós marker normál hámban csupán a basalis sejtréteg sejtjeiben mutatható ki (a nem G0 fázisban lévő sejteket kimutató proliferatiós marker). A basalis sejtrétegtől eltérő localisatióban megjelenő expressiója malignus ill. premalignus állapotokban fordul elő (22).

1.8. Prognosticai markerek

Számos prognosticai marker (lásd a következő fejezetek) vizsgálata történt az elmúlt években, e vizsgálatok eredményei egymásnak sokszor ellentmondóak. Az eredmények azt mutatják, hogy kombinált használatuk eredményesebb a daganatok prognosticájának meghatározásában, mint egyes prognosticai markerek külön-külön történő vizsgálata (56-58). Nehézséget jelent az értékelésben az a tény is, hogy a húgyhólyagdaganatok diagnosztizálása során a daganat stádium, ill. grade meghatározása szintjén is igen magas az inter- ill. az intra observer variabilitás (59). Valamennyi prognosticai marker vizsgálat szövettani diagnózison alapul, így false grade, ill. stage meghatározások esetén maguk a vizsgálatok is helytelen eredményre vezethetnek.

1.8.1. Oncogenek (*EGFR* - Epidermal growth factor receptor, *FGFR3* - fibroblast growth factor receptor 3, *BCL-2*, *VEGF* – vascularis endothel growth factor)

Az **EGFR**-hez tyrosine-kinase aktivitású növekedési receptorok tartoznak, melyek szerepét a sejttenyészetekben a sejtek proliferatiójában, túlélésében, motilitásában, ill. differentialódásában mutatták ki (60, 61). Overexpressiójuk magas stage esetén kimutatható. Az EGFR elleni kezelés terápiás célpontként szerepelhet, bár az irodalmi adatok ellentmondóak: egyes szerzők szerint az EGFR magas IH-kimutathatósága nem jár együtt az EGFR exonok mutatiojával (62), míg más szerzők tapasztalatai alapján sunitinib kezelés therapia-refracter hólyagtumorok esetén effectivnek bizonyult.

Az **FGFR3** - fibroblast growth factor receptor 3 - az FGFR családba tartozó fehérje, melynek egy transmembran regiója van. Intracellularis domenje tyrosine-kinase activitással rendelkezik. 48 isoformját ismerjük. Az FGFR3 szerepét a sejtproliferatio, differentiatio, ill. érképződés kialakításában találták. Az FGFR3 magas expressiója jobb prognosissal függ össze (alacsony recidiva arány, ill. stádium progressio (63-69)). Az

FGFR3 csökkent kimutathatósága fokozott recidivahajlammal járt low grade tumorok esetén (70).

Radiotherapia során a fokozott **BCL-2** expressio a daganat sugárresistentiajával, ill. a daganat fokozott előrehaladásával jár együtt (71).

A **VEGF** fokozott expressiója összefügg a daganat előrehaladott stádiumával (72-74). E gén polymorphismusa esetén emelkedett az esélye UCC kialakulásának (72). VEGF gátló chemotherapiás szerek kipróbálása jelenleg is zajlik (75).

1.8.2. Tumorsupressor gének (p53, p16, p27/kip1, PRB)

A **p53** tumorsupressor gén (mely a chr17p13.1 locusban található) mutatiója mintegy 15 éve prognosticai markerként szerepel számos daganat szövettani diagnosztikájában (pl.: emlőcarcinoma) (76). Vad típusa nem mutatható ki IH reakcióval, ugyanis igen hamar elbomlik. Amennyiben egy daganaton belül p53 pozitivitás észlelhető, az általában p53 mutatióra utal, melyet rosszabb prognosissal hoznak összefüggésbe. Hólyagdaganatok esetében a mutáns p53 egyes szerzők szerint magasabb halálozási rátával, illetve korábbi recidivával jár együtt (46, 77), mások szerint nincs ilyen összefüggése a prognosissal (78). A **p16** fehérjét kódoló INK4A supressor gén - mely a chr9P21-en található - expressiójának elvesztése korai recidiva megjelenéssel függ össze (79). A **p27/kip1** cyclin-dependens kinase-inhibitor, locusa: chr12p13. Low grade, felületes papillaris carcinomákban magas az expressiója, mint az alacsonyabban differentialt daganatokban. A p27 vesztés során csökken kimutathatósága, mely a recidivahajlam emelkedésével függ össze. Egyes szerzők szerint önmagában is prognosticai faktor UCC-k esetén (80-82). A retinoblastoma tumorsupressor **(PRB**) génnek a programozott sejthalál szabályozásában ismert szerepe (83). Locusa: 13q14.3. Alacsony expressiója high grade tumorokban nyilvánvaló (84). A diagnosztikában nem alkalmazzák rutinszerűen (85, 86).

1.8.3. Proliferatiós markerek (Ki67, Aurora A/STK15, Survivin)

A p53 kimutatás mellett a rutin diagnosztikában is alkalmazott **Ki67** proliferatiós marker (kinase gátló nuclearis protein) (87, 88) fokozott expressiója a

mitoticusan aktív high grade tumorokban egyértelmű. Amennyiben kérdéses a szövettani vizsgálat során, hogy egy daganat inkább low vagy high grade differencialtságú csoportba tartozik-e, a magas Ki67 index segítségül hívható (89). Hólyagcarcinomák esetén prognosticai markernek tekinthető (87, 88, 90-92).

Az **Aurora A/STK15** kimutathatósága elsősorban low grade tumorok kiújulási esélyének megbecslésére alkalmas (93). High grade tumorok esetén a daganat invasiv hajlamával ill. áttétképző képességével függ össze (94).

A **Survivin**nek a programozott sejthalál gátlásában van szerepe, emellett az osztódást ill. érképződést szabályozza (95). Normál urothelben nem mutatható ki. Magasabb expressiója rosszabb prognosissal társul, ill. rövidebb a várható túlélés (96).

1.8.4. Gyulladásos markerek (Cytotoxicus sejtek, Cyclooxygenase /COX2/)

Cytotoxicus sejtek - jól megfigyelhető, hogy azon UCC esetekben, ahol a daganatsejtek körül fokozott lymphoid sejtes infiltratio látszik, a prognosis várhatóan jobb. Ennek szép példája az ún. lymphoepithelioma like carcinoma (LELC), melyben a differentialatlan daganatsejtek körül fokozott lymphoid sejtes beszűrődés van, és e daganatok prognosisa kifejezetten kedvező a barátságtalan szöveti kép ellenére (22, 97, 98).

Cyclooxygenase (COX2) - jól ismert, hogy chronicus cystitisek mellett adott esetben carcinoma alakul ki (20). Localis gyulladásokban a COX2-nek igen fontos szerep jut (99, 100). A COX2 izominvasiv daganatokban magasabb koncentrációban mutatható ki (88, 99-102). Kísérletekben UCC-ből származó sejtvonalakban a sejtproliferatiót COX2-gátlókkal sikerült megállítani (102).

1.8.5. Adhaesios molekulák, E-cadherin

Az E-cadherin egy, a Cadherinek csoportjába tartozó, a sejtek adhaesiojának fontos fehérjéje. Kódolása a 16-os chromosoma hosszú karján történik (16q22.1). A hámsejtek felszínén található, az ún. zonula adherens alkotóeleme. A sejten belül actin filamentumokhoz kapcsolódik, Ca^2dependens. Egyes szerzők alacsony expressioját alacsony daganat-differenciatióval, ill. fokozott progressióval hozzák összefüggésbe (103, 104). (E tényt saját kísérleteinkben nem sikerült reprodukálni, lásd az *Eredmények* fejezetben (105)).

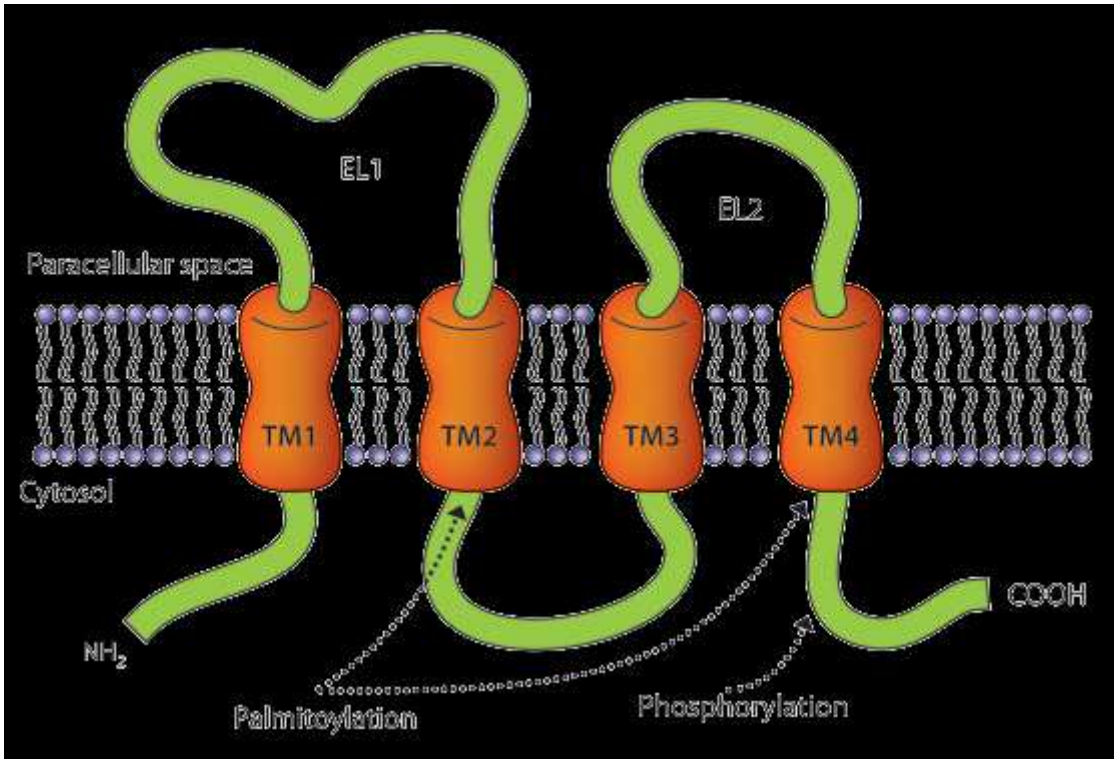
1.9. Sejtkapcsoló struktúrák

A hámsejtek a szöveti szerveződés fenntartásában egyrészt a szövetek külvilágtól való, ill. a szövetek egymástól való elválasztásában játszanak szerepet. A húgyutakban a vizeletben található, a szervezet számára mérgező anyagok szövetek közé való visszajutását akadályozzák meg (106). A hámsejtek közötti kapcsolatok több típusúak lehetnek, ezek közül a legszorosabb kapcsolatot a zonula occludens típusú - más néven tight junction - jelenti. E mellett léteznek ún. zonula adherens típusú kapcsolatok, ill. hemidesmosomák, valamint ún. gap junction típusú kapcsolódások. Mindezek a sejtek közötti kommunikációban játszanak szerepet (107). A tight junction vázát transmembran doménnel rendelkező fehérjék alkotják (occludin, claudin, junctionalis adhaesios fehérjék, tricellulin). Ezek struktúrája dinamikusan változik a sejtek pillanatnyi igényei alapján (54, 108). Transmembran ill. corticalis fehérjék vannak jelen, melyek között transcriptiós factorok, ill. tumorsupressor fehérjék egyaránt kimutathatóak.

1.9.1. Claudinok

A tight junctionok gerincét alkotó fehérjék családját nevezik így (109). Kimutatása 1998-ban történt. Jelen ismereteink alapján 27 altípusa ismert (110). A

claudinok egyes típusai szövet- ill. szervspecifikusak. A 4 transmembran régió közül elsősorban a két középsőben mutatkozik különbség az egyes claudin típusok között. A claudinok szerepe a sejt növekedésében, ill. a sejt-szöveti differentiatio szabályozásában is ismert. A claudinokat kódoló génszakaszok különböző chromosomákon helyezkednek el - 7., 13., 16.,17., 21., 22. - (111). E fehérjemolekulák a transmembran domének mellett extracellularis hurkokat is tartalmaznak (112). Az extracellularis hurkok közül az első ún. intercellularis zippzárt alakít ki. Intercellularis kapcsolataikban a claudinok homo- ill. heterodimereket alkotnak, adott esetben trimereket is létrehozhatnak (113). Szerepük a sejtközötti ion, ill. fehérje transportban van (114). Legnagyobb változatosságot az extracellularis hurok C-terminálisa mutatja, ezzel kapcsolódik különböző extracellularisan elhelyezkedő fehérjékhez (115-117). Mivel a claudinokat a kórokozók receptorként használják (Helicobacter pylori, Clostridium perfringens) a jövőben terápiás célpontként is szerepelhetnek (118). Tekintettel azon tényre, hogy különböző szervek rosszindulatú daganatainak sejtjeiben fokozott, ill. csökkent az expressziójuk, számos vizsgálat célpontjai a claudin fehérjék. Az alábbiakban azon claudinokat mutatjuk be, melyek expressziója saját vizsgálatainknak is tárgya.



3. Ábra. A claudinok (jelen esetben Claudin-7) sejten belüli elhelyezkedése, és kapcsolata egyéb sejtkapcsoló struktúrákkal (119)
Schematic representation of the claudin-7

A claudinok „hurkokat vetnek” a sejtmembranon keresztül. C-és N-terminalis végük a cytoplasmában helyezkedik el. A C-terminalis vég kapcsolódik a tight junction-ok egyéb fehérjéivel.

Claudin-1

Génje a 3. chromosomán található (3q28-q29). Fokozott expresszióját kimutatták többféle szerv daganatában kimutatták: cervicalis intraepithelialis neoplasia (119), nyelőcső laphámcarcinoma (120, 121), papillaris pajzsmirigycarcinoma (122). Expressziója csökkent a hepatoblastomák embryonalis componensében (123). A HCV májsejtekbe való bejutásának is fontos receptora (124). A vastagbélcarcinomákban csökkent expressziója tumorprogressióval függ össze (125).

Claudin-2

A kódoló gén az Xq22.3-23 locusban van. A sejtmembranon kisebb behúzódásokat mutat, nem folytonosan jelenik meg. Elsősorban nagyobb áteresztő képességgel rendelkező hámban (vese proximalis tubulusai, plexus chorioideus) tűnik fel (126, 127). Amennyiben expressziója fokozott, colon adenocarcinoma esetében a betegség prognosisa rosszabb (125). Hepatoblastomák embryonalis componensében expressziója alacsonyabb, mint e daganatok foetalis részleteiben (123).

Claudin-3

A 7. chromosoma 7q11 régiójában kódolt fehérje. Pancreasban az endocrin differentiatio markere (128). A máj regenerációs vizsgálatai során a zonula occludens 1 proteinnel együtt kimutatták szerepét a regenerációban. A Clostiridium perfringens toxinjának egyik receptoraként is ismert (129).

Claudin-4

A 7. chromosoma 7q11.23 locusában kódolt fehérje. A Claudin-3-hoz hasonlóan CPE receptor potenciállal rendelkezik. Az epidermis normál componense (130), ugyanis a csökkent áteresztőképességű hám alkotóeleme (112). Fokozott expressioját kedvezőtlen prognosisú pancreas (128), prostata (113, 131), ovarium (132), ill. emlőcarcinomákban mutatták ki (133-136), míg gyomorcarcinomákban csökkent expressiója rossz prognosissal függ össze (137). Metastaticus fej-nyak tumorokban szintén csökkent expressioját észlelték (138). A Claudin-4 kimutatása az alacsonyan differentialt cholangiocellularis carcinomák hepatocellularis carcinomától való elkülönítésében segíthet (139).

Claudin-5

A fehérjét kódoló gén a 22q11.21. locusban található. Endothelsejtek valamint a vér-agy gát tight junction sejtjeinek alkotó része (140, 141). A podocyták membranjában, ill. mesenchymalis sejtekben mutatható ki (142). Kimutatása tüdődaganatok differenciál-diagnosztikájában alkalmazható, ugyanis a pulmonalis eredetű adenocarcinomában expressalódik, míg laphámcarcinomában nem (143). Leginkább azonban vascularis daganatokban expressalódik (144).

Claudin-7

A 17. chromosomán kódolt fehérje. Hámeredetű daganatokban kimutatható (144), azonban emlő, uterus, fej-nyak, colorectalis tumorokban csökkent az expressiója (112, 134, 145-149). Normál körülmények között a vese proximalis tubulusaiban mutatható ki (126).

Claudin-10

A 13. chromosoma q31-q34. locusán kódolt fehérje. Cholangiocellularis carcinomákban a normál máj Claudin-10 expressiojához képest csökken a reakció erőssége (150). Hepatocellularis carcinomák esetén expressiojának mértéke a daganatrecidivával függ össze(151).

1.9.2. Occludin

A tight junctionok közül ezt a fehérjét mutatták ki először (152). Gén locus: 5q13.1. A zonula occludens fehérjéihez kötődik, ezeken keresztül actin filamentumokkal társul. Fokozott expressio esetén a hám áteresztőképessége csökken. A vér-agy gát nélkülözhetetlen alkotóeleme (153). Az occludin a HCV receptoraként is ismert (154).

1.9.3. Tricellulin

Az occludinhoz hasonló fehérje, mely 3 sejt találkozási pontjánál jelenik meg (155). A kódoló génje a 5q13.2 locusban található. E fehérjét kódoló gén mutatiója süketséget okoz (156). Hiányában a hám áteresztővé válik (157). Pancreas exocrin sejtjeiben, ill. daganataiban kimutatható, míg a Langerhans-szigetekben, ill. endocrin daganataiban nem (158).

Prognosticai meghatározás molecularis módszerekkel

Tekintettel arra, hogy az UCC szövettani osztályozása mind a differentialtság, mind a stádium meghatározás szempontjából igen vizsgálófüggő a korábban említett nehézségek miatt, számos kísérlet irányult arra, hogy vajon molecularis biológiai módszerekkel sikerül-e kiválasztani azt a betegcsoportot, akiknek azonos morphologiai jegyek mellett várhatóan agresszívebben viselkedő daganata van, vagyis agresszívebb onkológiai kezelést igényel már a betegség indulásakor. Egy holland munkacsoport egy viszonylag egyszerűsített, immunhistochemiai és molecularis biológiai vizsgálatokat egyesítő módszerrel 2 csoportra osztotta e betegségeket (159). Véleményük szerint e kombinált módszerrel viszonylag nagy biztonsággal szétválik az agresszívebben kezelendő, ill. a várhatóan szelídebb therapia mellett is hosszabban progressio-mentes betegcsoport. Eredményeik alapján az FGFR3 mutáns daganatot hordozók esélye igen alacsony a progressio szempontjából, míg az FGFR3 mutatio szempontjából negativ, p53, Ki67 overexpressiót mutató daganatoknál korai progressióra kell számítani. Mindezek alapján egy ún. molecularis osztályozási rendszer is bevezethető lenne,

aminek a betegek kezelésében a szövettani paraméterek meghatározása mellett szintén igen komoly szerepjutna. Molecularis alapokon történő recidivahajlam meghatározás, ill. az ún. gén-osztályozó rendszer - 50-80 daganat-specificus gén - meghatározása, a jelen ismeretes vizsgálatok alapján azonban még nem kecsegtet túl sok reménnyel.

1.10. Az urothelialis sejtes carcinoma therapiája

Felszínes urothelialis sejtes carcinoma (TA)

Transurethralis resectio során - amennyiben klinikailag az UCC feltételezése igen megalapozott -, azonnali chemo-instillatio történik. A chemotherapiás szerek közül a doxorubicin, epirubicin, ill. mitomycin C szerepelnek. Grade III. daganatok (CIS) esetén 6 hétig heti egy BCG instilláció történik, de a további therapia szükségessége tekintetében nincs konszenzus (19, 20).

Invasiv urothelialis sejtes carcinoma (T1, ill. magasabb T)

Egyértelműen invasiv hólyagdaganatok esetén, amennyiben a beteg általános állapota lehetővé teszi, a chemotherapiával (cysplatin alapú) kombinált cystectomia ajánlott. Emellett a kiterjedt, több gócú in situ carcinoma esetén is ajánlott a cystectomia. Mindezen therapia megválasztásában a betegekkel való konzultáció, a betegek beleegyezése szükséges (19, 20, 42, 160).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk célkitűzése az volt, hogy a különböző típusú urothelsejtes carcinomák, ill. papillomák eseteiben megvizsgáljuk, van-e különbség a különböző sejtkapcsoló struktúrák – alkotó fehérjék - expressiojának kimutathatóságában, ill. mintázatában. Vizsgálataink arra irányultak, hogy sikerül-e kimutatni olyan különbséget a claudin expressióban, melynek alapján diagnosztikus nehézséget adó esetekben a claudin expressiót vizsgálva könnyebben lehet megállapítani az adott daganat megfelelő szövettani típusát?

2.1. Az E-cadherin expressio grade-stage, ill. prognosticai összefüggéseinek meghatározása immunhistochemiai módszerekkel

E-cadherin expressio immunhistochemiai kimutatásával vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az E-cadherin expressiós mintázata, valamint a daganat stádiuma, ill. grade-je között, ill. a várható recidiva bekövetkeztének esélye, ill. a túlélési mutatók megbecslése lehetséges-e.

2.2. Low grade ill. high grade urothelialis sejtes carcinomák Claudin expressiojának vizsgálata

A Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 fehérjék messenger RNS és fehérje szintű, valamint Ki67 proliferatiós marker expressioját vizsgáltuk low ill. high grade daganatokban abból a szempontból, hogy

A: van-e lényeges különbség az expressióban, ill.

B.: amennyiben van, ez prognosticai jelentőségű-e.

2.3. Claudinok, Cytokeratinok ill. Ki67 expressziójának összehasonlítása nem malignus, ill. low grade urothelsejtes daganatokban

A Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, cytokeratin/5-6, cytokeratin 20, ill. Ki67 fehérje expresszióját hasonlítottuk össze húgyhólyag papillomákban, invertalt papillomákban, PUNLMP ill. low grade UCC-kben rutin diagnosztikai szempontból, ill. a recidiva-esély lehetséges megbecslésének szempontjából.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Humán, húgyhólyagból származó szövetmintákat vizsgáltunk, melyek a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján gyógyított betegekből származnak (283 eset). A vizsgálatokat az Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével (E.sz.:1/2005) végeztük. A vizsgálatok során a szövetminták pathológiai diagnózisának újraértékelését, az immunhistochemiai reakciók analysisét, valamint az eredmények összegzését végeztem, míg a betegkövetési vizsgálatokat Dr. Riesz Péter, a molecularis biológiai vizsgálatokat, valamint a morfometriás vizsgálatokat Dr. Törzsök Péter és munkatársai végezték.

3.1. E-cadherin expressio vizsgálata urothelialis sejtes carcinomában

1996. január 1. és 1997. február 1. között a SOTE Urológiai Klinikáján transurethralis resection átesett primer UCC-s betegek szövettani mintáiban vizsgáltuk az E-cadherin expressio erősségét. A transurethralis hólyagtumor-resectios mintákat újravizsgáltuk.

A korábbi szövettani diagnózisoknak megfelelő grade, stage eseteket használtuk. (A grade meghatározás ezen esetekben az 1973-as WHO beosztás szerint történt). A vizsgálatra kiválasztott betegek anyagaiból a legmegfelelőbbnek kínálkozó H&E festett metszethez tartozó blokkból immunhistochemiai vizsgálatra készült külön metszeteken végeztük a reakciót. Az antigén feltárás mikrohullámú sütőben történt, forrásig való melegítés után 30 percig 200 watton. Feltáró oldatként Target Retrieval ph6-os DAKO oldatot használtunk. A 3-5 □m vastag silanizált metszeteken monoclonalis anti-humán E-cadherin antitestet használtunk (NLH 38, Dako Cytomation Glostrup, Denmark, higítás: 1:100). Semiquantitativ módszerekkel vizsgáltuk az E-cadherin elleni antitesttel detektálható reakció erősségét.

4 csoportot határoztunk meg: negatív, +/- (bizonytalanul értékelhető reakció), +, - a sejtek 10-50 %-ban gyenge, ill. ++ - a sejtek 50-100 %-ban erőteljes reakció. A vizsgálat eredményét contingentia analysissel értékeltük. Az adatok végleges

kiértékelése 2004-ben, a primer resectio után 8 évvel történt. A recidiva hajlam, ill. az E-cadherin expressio függvényében vizsgáltuk a nyert adatokat. Három csoportot alakítottunk ki önkényesen:

- 1. csoport: rövidebb, mint 5 évet túlélők
- 2. csoport: 5-8 év évet túlélők
- 3. csoport: 8 év, ill. annál hosszabban túlélők.

A kiválasztott betegek adatait, valamint az immunhistochemiai reakciók eredményét a 4. táblázatban tüntettük fel. Eredetileg 50 beteget vizsgáltunk. Az 50 beteg közül csupán 40-nél volt a további kiértékelés lehetséges, a további tíz, az eredeti vizsgálatokban szereplő betegről további információ nem volt nyerhető a retrospectiv analysis során.

A recidivakészség kialakulásának tekintetében önkényesen 4 csoportot alakítottunk ki:

A. recidiva 2 éven belül,

B. recidiva 2-4 év között,

C. 4 évnél későbbi recidiva, ill.

D. recidivamentes kategória.

4. Táblázat. A tumor grade, a betegek neme, TNM stádium, az E-cadherin (E-cad) expressio erőssége, a túlélési és recidiva-kategória, ill. a betegek kora a vizsgálat kezdetén (a végső kiértékelésben részt vevő 40 beteg adatai)

Beteg sorszáma	Grade	Nem (ffi, nő)	TNM	E-cad	Túlélési kategória	Recidiva kategória	A 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

A vizsgálatot 2012-ben újabb mintákon validáltuk. Ötven újabb UCC esetet választottunk ki, melyek között különböző grade-t (GrI-III.) ill. stage-t (min.Ta-min.T2) mutató hólyagtumorból származó anyagban igyekeztünk az E-cadherin expressiós mintázatát kimutatni.

3.2. Low/high grade urothelialis sejtes carcinomák vizsgálata

3.2.1. Beteganyag

Százhárom, urológus által vett, TUR, ill. térképbiopsia során nyert szövetmintát vizsgáltunk. Közülük 86 származott UCC-ből, míg 17 control mintát értékeltünk, e control minták olyan betegekből származtak, akiknek UCC az anamnézisükben nem szerepelt. A 17 beteg közül 7 benignus prostata hyperplasiában szenvedett, 2 betegnek visszatérő gyulladásai szerepeltek az anamnézisben. Hatnál véres vizelet megjelenése miatt történt biopsia, 1 beteg szenvedett hólyagkövességben, 1-nek pedig vesico-cutan fistulája volt. Az összesített adatokat az alábbi táblázatban tüntettük fel.

5. Táblázat. A daganatos betegek adatai, az eltávolított daganat grade ill. stage beosztása

Betegek kliniko-patológiai adatai	**UCC T2 nélkül (TaT1)**	**T2**	**LG**	**HG**	**HG (T2 nélkül)**
Betegszám 86 (100%)	**64** (74%)	**22** (26%)	**27** (31%)	**59** (69%)	**37** (43%)
Low Grade (LG)	27/64 (42%)	0	-	-	-
High Grade (HG)	37/64 (58%)	22/22 (100%)	-	-	-
Nicotin	29/64 (45%)	12/22 (55%)	14/27 (52%)	27/59 (46%)	15/59 (25%)
Nem (ffi: nő)	50:14 (3.57:1)	14:8 (1.75:1)	20:7 (2.85:1)	44:15 (2.93:1)	30:7 (4.3:1)
Betegek kora (év)	65.38 (46-91)	67.59 (43-91)	62.89 (47-81)	67.34 (43-91)	67.18 (46-91)
Multifocalis tumor	28/64 (44%)	6/22 (27.3%)	11/27 (41%)	23/59 (39%)	17/59 (29%)
Solid mintázatú tumor	8/64 (12.5%)	9/22 (41%)	2/27 (7.4%)	15/59 (25%)	4/59 (7%)
Chemotherapia - intravesicalis	14/64 (22%)	2/22 (9%)	7/27 (26%)	9/59 (15%)	7/59 (12%)
Intravesicalis BCG	21/64 (33%)	0	1/27 (4%)	20/59 (34%)	20/59 (34%)
Chemotherapia - systhemas	0	5/22 (22.72%)	0	5/59 (8%)	0
Cystectomia	2/64 (3%)	7/22 (32%)	0	9/59 (15%)	7/59 (12%)
Tumor recidiva	20/64 (31%)	3/22 (14%)	13/27 (48%)	10/59 (17%)	7/59 (12%)
Tumor progressio	3/64 (5%)	0	0	3/59 (5%)	0
Recidiva-mentes túlélés (hónap)	43.98 (4-110)	29.75 (4-55)	38.04 (4-79)	47.03 (4-110)	45.39 (4-110)
Teljes túlélés (hónap)	54.62 (10-120)	28.27 (4-54)	57.75 (10-120)	45.5 (4-110)	49.15 (4-110)
Exitus	12 (10*)	19 (2*)	2 (2*)	2 9(10*)	10 (8*)

(LG - low grade, HG - high grade)
Progressio: Ta-T1 stádium T2-re „ugrott” – a daganat izominvasiv lett.
Multifocalitás: A klinikai adatok alapján a resecatum több ponton megjelenő daganatból származott.

A daganatok szövettani kiértékelése során a szövettani diagnózis a 2004-es WHO classificatio alapján történt. A betegeknél a férfi-nő arány 2,9:1, átlag életkoruk 66,5 év volt (a legfiatalabb 43, a legidősebb 91 éves volt). Az utánkövetési idő átlaga kereken 46 hónap volt. A teljes túlélés a kezdeti diagnózistól a beteg haláláig, ill. a vizsgálat lezárásáig eltelt időnek felelt meg, míg a kiújulás-mentes túlélés a resectiotól a recidiva megjelenéséig tartott.

Amennyiben a betegnél több alkalommal történt TUR, és a műtéti anyagok szövettani eredménye eltért, véglegesnek a későbbi resectio szövettani eredményét tekintettük.

6. Táblázat. Control, nem daganat miatt vizsgált betegek mintái (n=17)

Mintavételi indikáció	**Histologiai eredmény**	
	NIC (7)	**IC (10)**
Recurráló gyulladás	-	2
Haematuria	-	6
Prostata hyperplasia	7	-
Calculosis	-	1
Fistula	-	1

NIC: control minták inflammatoricus eltérés nélkül; IC: inflammatoricus control minták

A transurethralis resectio során, amennyiben a műtét során perforatiót, vérzést nem észleltek, a betegek a műtétet követő 6 órán belül intravesicalis chemotherapiában részesültek. Öt esetben – kettő low grade, ill. három high grade tumort hordozó betegnél - a chemo-instillatio nem volt kivitelezhető a fenti szövődmények bekövetkezte miatt. Azon betegeknél, akiknél a korai intravesicalis chemo-instillatio nem volt kivitelezhető, késői intravesicalis chemotherapiát alkalmaztak.

BCG kezelést high grade – grade III, ill. in situ carcinomás betegek kaptak, valamint olyan betegek, akiknek recidiv, therapia-resistens daganata volt (pT1 grade I-II. daganatot hordozó betegek). A BCG kezelést hetente egy alkalommal végezték 5 héten át, majd a betegek fenntartó kezelést kaptak 1 éven keresztül. Huszonkettő izom invasiv esetből 7 betegnél történt radicalis cystectomia, míg 5 beteg systhemás chemotherapiában részesült.

3.2.2. Szövettani vizsgálat, immunhistochemia

A resecalt szöveteket 1 napon át 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk a rutin eljárásoknak megfelelően. Az ezután szokásos beágyazási módszerek után készült haematoxylin eosin festett metszetek alapján születtek a diagnózisok. Az immunhistochemiai reakciók során hasonló, 3-4 μm vastagságú metszeteket használtunk. A deparaffinálás után a mosás PBS-ben történt, 7,4 pH értéken. Az antigén feltárás mikrohullámú sütőben történt: 3 percen át 850 W teljesítmény mellett. Ez után történt az antigén feltáró oldatban (Target Retrieval Solution/Dako Glostrup Denmark)

30 percen át 170 W-on. Az immunhistochemiai reakciók Ventana ES immun-automata gépben készültek (Ventana Medical System Inc. Tucson, AZ, USA). A festékanyag diamino-benzidin volt a gyártó előírásainak megfelelően (I wiev DAB detection kit Ventana). Az eljárás avidin-biotin peroxidase technikával történt. A következő (7.) táblázatban olvashatóak a gyártó által ajánlott positiv controlok, a különböző antitestek, ill. hígításaik. Negativ controlt is használtunk, primer antitest hozzáadása nélkül.

7. Táblázat. Az IH reakciókhoz használt reagensek, ill. a gyártó által ajánlott controlok

Antitest	Hígítás	Pozitiv control	Gyártó	Antitest típus	Lot szám	Pozitivitás helye
Ki67	1:100	nyirokcsomó	DAKO	egér monoclonalis	00070375	mag
CLDN-1	1:80	bőr	Zymed	nyúl polyclonalis	624568A	membran
CLDN-2	1:80	vastagbél	Zymed	egér monoclonalis	787052A	cytoplasma
CLDN-3	1:80	vastagbél	Zymed	nyúl polyclonalis	760684A	membran
CLDN-4	1:100	vastagbél	Zymed	egér monoclonalis	716863A	membran
CLDN-5	1:120	endothel	Zymed	egér monoclonalis	425681A	membran
CLDN-7	1:100	emlő	Zymed	nyúl polyclonalis	673366A	membran
CLDN10	1:60	vese	Zymed	nyúl polyclonalis	432094A	membran

3.2.3. Molecularis biológiai vizsgálatok

(quantitativ valós idejű PCR vizsgálat – primerek, ill. PCR reakciók)

RNS izolálás

A minták közül 70 UCC-ből származott, a 8 control közül 4 cystitisből, 4 normál, nem gyulladt urothel-szövetből származott. A minták macrodissectiója is megtörtént a daganatos, ill. nem tisztán daganatos területek vizsgálata céljából. Minden esetben 55°C-on 16 óra volt az 5 μm vastagságú metszetek proteinase-K emésztésére fordított idő (Protease1 (0.38 mg/ml) Ventana Ref: 760-2018, Lot: C0221)).

A paraffinba ágyazott szövetekből a teljes RNS-t High Pure RNA Paraffin Kittel izolálták, mely a gyártási protokollnak megfelelően történt. (Roche, Indianapolis, IN, USA).

Reverse transcriptio RNS

Teljes RNS átírás történt (2 μg) 20 μl-es reakció elegyben, ez a gyártó előírásainak megfelelően történt - High Capacity RNA-to-cDNA kit, Applied Biosystems – ABI Foster City, CA, USA-.

Real time quantitativ RT-PCR

A real time PCR reakciók elvégzése duplikátumokban történt a β-actin referencia gén, valamint a Claudin-1, -5, -7, -10 célgének esetében. A cDNS reakciónként 100 ng volt, a végtérfogat a teljes reakció esetében 25 μl (SYBR Green PCR Master Mix ABI, AB4309155). A primer sequentiákat a 8. táblázatban tüntettük fel. A real time PCR reakciók a következőképpen történtek: kezdeti denaturálás 95°C fok - 2 perc.; ciklusok (40X): 95°C 20s, 60°C 30s, 72°C 60s, terminálás: 72°C 5 perc. A reakciókhoz ABI Prism 7000 sequence detecting syteme-et alkalmaztunk. (Applied Biosystems). Az adatok kiértékeléséhez az alábbi képletet használtuk: $e=2^{\Delta CT}$ (ΔCT=CT referencia gén – CT célgén). A számolás a duplikátumok átlag CT értékével történt.

8. Táblázat. Primer sequentiák - Claudinok, ill. β-actin expressio vizsgálata során

Gén	**3'→5'**	**5'→ 3'**
β-actin	cct ggc acc cag cac aat	ggg ccg gac tcg tca tac
Claudin-1	gtg cga tat ttc ttc ttg cag gtc	ttc gta cct ggc att gac tgg
Claudin-2	ctc cc tgg cct gca tta tct c	acc tgc tac cgc cac tct gt
Claudin-3	ctg ctc tgc tgc tcg tgt cc	tta gac gta gtc ctt gcg gtc gta g
Claudin-4	ggc tgc ttt gct gca act gtc	gag ccg tgg cac ctt ac acg
Claudin-5	ttc ctg aag tgg tgt cac ctg aac	tgg cag ctc tca atc ttc aca g
Claudin-7	cat cgt gg cag gtc ttg cc	gat ggc agg gcc aaa ctc ata c
Claudin-10	tgg atg ttc cct ata tgc aaa caa	aaa cag agc ggc tcc taa ttc a

3.2.4. Immunhistochemiai kiértékelés

Semiquantitativ score analysis

A semiquantitativ analysist három független vizsgáló végezte (Dr. Törzsök Péter, Dr. Székely Eszter, Dr. Kiss András). Az értékelés során a reakció localisatiója, ill. erőssége volt meghatározó. Az egyes metszetek pontértéket kaptak az alábbiak szerint: a reakció intenzitását a terület százalékos pozitivitásával szoroztuk. A reakció erősségének meghatározása 0-3 skálán mozgott: 0 – nincs reakció; 1 pont – gyenge; 2 pont – közepes, 3 pont – erős reakciót jelentett. A reakció területszázalékos pontértékeit az alábbiakban határoztuk meg:

5 pont: 76 – 100%
4 pont: 51 – 75%
3 pont: 26 – 50%
2 pont: 6 – 25%
1 pont: 0 – 5%.

A reakció erősségének számát a pozitivitás arányára adott számmal összeszoroztuk. A maximális pontérték 15, a minimális 0 volt.

Morphometria

Valamennyi metszetről 60-as objektívvel Olympus BX50 mikroszkóppal (Olympus Co. Tokyo, Japan) fényképeket készítettünk, mintánként 10 át nem fedő képet. E képek kiértékelése quantitativan történt. A quantitativ kiértékeléshez használt softver Leica Qwin V3-as morphometriai softver volt (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK). A metszeteken a mintavétel technikájából fakadó nem értékelhető területeket nem vizsgáltuk. Az immunhistochemiai reakciókkal pozitiv területek százalékos arányát a teljes vizsgált területekhez viszonyítva adtuk meg. A statisztikai analysis során az egyes esetekről készült 10 fotón mért adatok átlagértékét számoltuk (161).

Ki67 proliferatiós marker elleni antitesttel végzett reakció értékelése

60-as objektívvel vizsgált metszeten 10 egymást át nem fedő látótérben vizsgáltuk a pozitiv sejtek arányát az összeshez viszonyítva, ennek átlagát vettük figyelembe (ugyanazon mikroszkóp).

3.2.5. Statisztikai analysis

Mann-Whitney U teszttel összehasonlítottuk a nem Gauss-eloszlást követő változókat. Fisher-féle egzakt tesztet, ill. CHI^{2-} et használtunk a kategorikus változók vizsgálatára. Kaplan-Meier-módszert alkalmaztunk a teljes túlélés, ill. a recidivamentes túlélés vizsgálataihoz. Logrank-tesztet használtunk a túlélési görbék összehasonlításához. Cox regressziós modellel a független prognosticai faktorok vizsgálata történt. Significans valószínűségi értéknek a $P<0.05$-öt fogadtuk el. Valamennyi statisztikai analysis a Statisztika 8.0 programmal történt (Statsoft Inc., Tulsa OK, USA).

3.3. Felszínes – nem invasiv urothelialis tumorok vizsgálata

A claudin expressiós mintázatát vizsgáltuk 80 transurethralis resectióval eltávolított, valamilyen urothelialis daganatból származó szövetmintán, valamint 5 nem daganatos betegből származó mintán. Ezek között 15 invertalt urothelialis papilloma, 20 urothelialis papilloma, 20 grade I. (PUNLMP), ill. 20 Grade II. (low grade) UCC eset szerepelt. A nem daganatos minták olyan betegekből származtak, akik sosem szenvedtek urothelsejtes carcinomában.

Invertalt papillomák: 15,5 év leforgása alatt (1994. április - 2010. december között a II. sz. Pathologiai Intézetben – a számítógépes nyilvántartás adatai alapján 30 invertalt papilloma diagnózis született. Ezek közül 3 betegnél az invertalt papilloma mellett urothelialis sejtes carcinoma is jelen volt. Az esetek újraértékelése után 15 olyan

mintát találtunk, mely immunhistochemiai vizsgálatok végzésére alkalmasnak bizonyult. A betegek átlagéletkora 60,8 év volt, a legfiatalabb 9, a legidősebb 91 éves volt. A férfi-nő arány 1.5:1. A recidivamentes túlélés a mintavétel, ill. az első recidiva között eltelt időt jelentette.

3.3.1. Immunhistochemiai vizsgálatok

A szövetminták fixálása 1 teljes napon át 4%-os pufferolt formalinban történt. A metszetek a szokvány szövettani laboratóriumokban alkalmazott paraffin-ágyazásos technikával készültek. A szövettani diagnózisokat a haematoxylin eosinnal festett metszetek alapján állapítottuk meg. Immunhistochemiai vizsgálatok végzéséhez silanizált tárgylemezre helyezett, 3-4 μm vastag metszeteket alkalmaztunk mind a teljes blokkból származó metszetek esetén, mind a TMA blokkokból származó metszetek esetén. Az immunhistochemiai reakciók végzése a gyártó ajánlásai alapján választott reagensekkel, BenchMark XP immunfestő automata segítségével történt (UltraView Universal DAB Detection Kit Ventana Tucson, AZ, USA). Negatív controlok esetén az antitest elhagyása mellett antitest solutiont alkalmaztunk, a negatív controlok negatív eredményt mutattak. A hígítási paraméterek, valamint a pozitív controlok az alábbi (9.) táblázatban olvashatóak.

9. Táblázat. A kísérletben vizsgált antitestek, hígításaik, ill. a vizsgálatban szereplő pozitív controlként szereplő szövetek típusai

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; DAKO, Glostrup, Denmark

Antitest	**Hígítás**	**Positiv control**	**Gyártó**	**Antitest típus**	**Lot szám**	**Pozitivitás helye**
Ki67	1:100	nyirokcsomó	DAKO	egér monoclonalis	00070375	mag
CK/5-6	1:2000	nyirokcsomó	DAKO	egér monoclonalis	00033034	cytoplasma
CK20	1:600	vastagbél ACC	DAKO	egér monoclonalis	00032659	cytoplasma
CLDN-1	1:100	bőr	Invitrogen	nyúl polyclonalis	624568A	membran
CLDN-2	1:50	vastagbél	Invitrogen	egér monoclonalis	787052A	cytoplasma
CLDN-3	1:80	vastagbél	Invitrogen	nyúl polyclonalis	760684A	membran
CLDN-4	1:200	vastagbél	Invitrogen	egér monoclonalis	716863A	membran
CLDN-7	1:100	emlő	Invitrogen	nyúl polyclonalis	673366A	membran

3.3.1.1. Tissue microarray

A vizsgálandó mintákból tissue microarray vizsgálatra esetenként 2-2 mm-es szövethengereket szúrtunk ki a paraffinos blokkokból. Valamennyi szövettani típushoz tartozó csoportból 3-3 véletlenszerűen kiválasztott esetben teljes blokkból származó „szokvány" metszetet is megvizsgáltunk. Az immunhistochemiai reakciók kiértékelése kétféleképpen történt: semiquantitativ módon pontozással, ill. morphometriai programmal (mind a szokvány, mind a TMA metszetek esetén). Az immunhistochemiai reakciók eredménye mind a teljes metszeten, mind a TMA metszeteken azonos eredményt mutatott.

3.3.1.2. Az immunhistochemiai reakciók kiértékelése

Semiquantitativ analysis: a kiértékelést egymástól függetlenül 4 orvos végezte (Dr. Törzsök Péter, Dr. Kiss András, Dr. Székely Tamás, Dr. Székely Eszter). Ennek során a reakció erőssége mellett a reakció szöveten belüli localisatioját is meghatározták. Az egyes esetek pontozásos értékelése a következőképpen történt a reakció erőssége alapján:

0 – nincs reakció; 1 pont – gyenge; 2 pont – közepes, 3 pont – erős reakciót jelzett.

A metszetek digitalizálásához Mirax Midi metszet scannelő rendszert használtunk (3D Histech, Budapest, Hungary). Valamennyi esetben 15 át nem fedő kép készült (Claudinok, CK/5-6, ill. CK20 reakciók). A quantitativ morphometria terület százalékos pozitivitása Leica Qwin V3 morphometria szoftverrel történt (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK). A kiértékelés során a daganatmentes területeket figyelmen kívül hagytuk. A Ki67, proliferatiós marker elleni antitesttel végzett reakció esetén a nuclearis positivitást mutató sejtek mennyiségének valamennyi sejthez való viszonyítása történt. A statisztikai analysis során esetenként 15 érték átlagát összegeztük.

3.3.1.3. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai vizsgálatok Statistiva V8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) programmal történtek. Tekintettel azon tényre, hogy a minták nem normál eloszlást követtek, az expressziós értékek összehasonlítása nem parametrikus ANOVA teszttel (Kruskal-Wallis) történt nem daganatos esetekben, valamint invertalt, ill. nem invertalt papillomák, ill. a két típusú urothelialis carcinoma között. Kaplan-Meier-módszerrel vizsgáltuk a recidíva mentes túlélést. A módszerhez két csoportra kellett osztani az eseteket valamennyi kategórián belül annak tekintetében, hogy a claudinok, a Ki67, a CK20, ill. a CK/5-6 reakciók erőssége a medián fölött vagy alatt mutatkozott-e. Log-Rank-teszttel hasonlítottuk össze a túlélési görbéket. Spearman-féle correlatiós teszttel a semiquantitativ, ill. quantitativ vizsgálat során nyert eredményeket vetettük össze. Significansnak a $P<0.05$ értéket fogadtuk el.

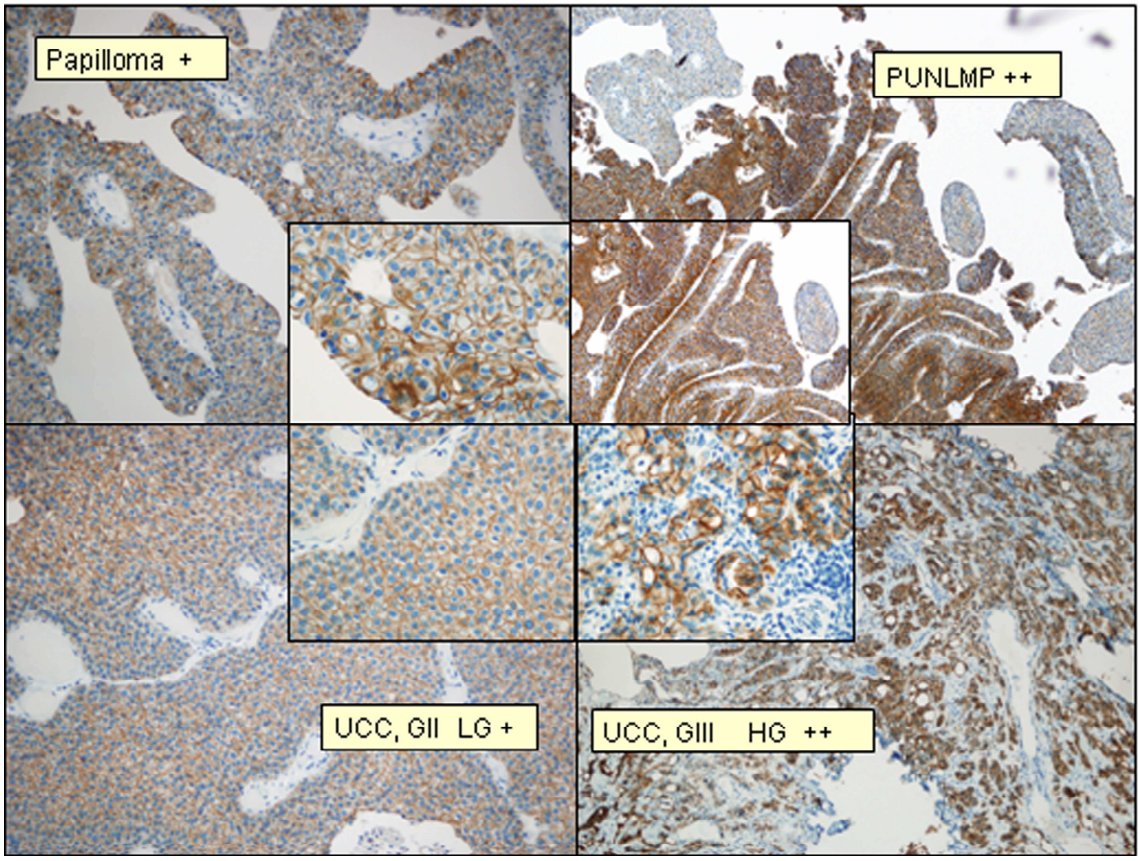
4. EREDMÉNYEK

4.1. Az E-cadherin expressio grade-stage, ill. prognosticai összefüggéseinek meghatározása immunhistochemiai módszerekkel

4.1.1. E-cadherin expressio összefüggése a tumor grade-del, ill. stádiummal

A 40 betegből 13 esetében (33%) az E-cadherin reakció negativnak bizonyult. Huszonöt betegnél (63%) +, ill. ++ erősségű eredmény született. A reakció erőssége vagy megegyezett a normál urotheliummal, vagy a normál urothelhez képest valamivel gyengébbnek bizonyult. Két esetben észleltünk kétséges expressiót. Az E-cadherin expressio mindkét, a revisio során invert papillomának bizonyult esetben igen erőteljes volt. A kiértékelés során a 38 urothelsejtes carcinoma grade-je, ill. a stage nem mutatott significans összefüggést az E-cadherin expressio erősségével - negativ eredményt mutattak nem-invasiv, alacsony grade-ű daganatok, míg erőteljes positivitást mutattak alacsonyan differentialt, invasiv daganatok (105). (E vizsgálat eredményével ellenkező megállapításra jutottak más munkacsoportok (158,159) - lásd *Megbeszélés* fejezet). Két olyan esetet találtunk, ahol a korábban invasiv tumornak diagnosztizált eset a revisio során invertalt papillomának bizonyult.

A 2012-ben megismételt E-cadherin IH vizsgálatok eredményei a következőképpen alakultak: valamennyi daganatban kimutathatónak bizonyult a reakció. Az 50 vizsgált esetből 45-nél ++ erősségű, 5-nél + erősségű reakciót találtunk. Sem negativ, sem bizonytalan eredmény nem született. Tekintettel arra, hogy a beválasztott esetek között low grade, high grade, invasiv, nem-invasiv UCC-k egyaránt szerepeltek, ill. hogy az infiltratív daganatok esetében az infiltratív componens lényegében a felszínen látható daganattal azonos intenzitású reakciót mutatott, korábbi eredményeinket – vagyis azt, hogy az E-cadherin expressiós mintázatának az urothelialis daganatokban nincs összefüggése a tumor grade-del ill. stage-el - továbbra is fenntarthatónak, megalapozottnak tekintjük (4. ábra).



4. Ábra. E-cadherin expressio urothelialis papilloma, PUNLMP, GII. LG, ill. GIII. HG invasiv daganatban (200X)

A reakciók a különböző típusú daganatokban +/++ erősségű positivitást mutattak.

A HG eset igen intensiv positivitása alapján nem tűnik megalapozottnak az a nemzetközileg sokak által evidenciának tekintett állítás, mely szerint az alacsonyan differentialt UCC-ban a tumorsejtek E-cadherin expressiója csökken. (A PUNLMP, ill. a low grade UCC eset T min.a stádiumú, míg a HG UCC eset T min.2 stádiumú mintából származott.)

4.1.2. E-cadherin expressio prognosticai szerepe

A 2004-ben lezárt recidiva adatok vizsgálata során 11 esetben találtunk recidiva kialakulást, melynek során contingentia analysissel az E-cadherin expressiós mintázatával lényeges összefüggés nem mutatkozott. Tizennyolc beteg a transurethralis resectiot követő 8 éven belül exitalt, 13 közülük 5 éven belül halt meg. Ezen 18 beteg közül 13 esetében az E-cadherin expressio megőrzöttnek bizonyult, 5 esetben nem találtunk expressiót, vagy csökkent expressio mutatkozott. Az E-cadherin reakció erősségének mértéke, ill. az átlagos túlélés között nem találtunk összefüggést (105).

A 2012-ben megismételt E-cadherin vizsgálatokat friss szövettani eseteken (2011-2012-ben operált daganatok) végeztük, így recidiva/túlélés vizsgálatok még nem végezhetőek, ezeket a későbbiekben tervezzük.

4.2. Low, ill. high grade urothelsejtes carcinomák Claudin expressiojának vizsgálata

4.2.1. Nem daganatos, ill. daganatos urothel immunhistochemiai, ill. Real Time PCR eredményei

Nem daganatból származó urothelben Claudin-1 elleni antitesttel a hám basalis rétegében detectaltunk pozitiv reakciót, mely a sejtmembranokon jelent meg. Ezzel ellentétesen a Claudin-4, ill. -7 reakciókkal – szintén membran positivitás volt észlelhető – a hám felső sejtsoraiban volt regisztrálható a pozitivitás. A reakció erőssége a basalis sejtrétegek felé csökkenő intenzitást mutatott. Egy-egy esetben a Claudin-7 elleni antitesttel a hám teljes rétegében azonos intenzitású erős reakciót észleltünk. Claudin-3, ill. -5 elleni antitestekkel néhány mintában gyenge felszíni reakció volt megfigyelhető. A Claudin-5 - melyet egyéb vizsgálatok során is elsősorban mesenchymalis sejtekben észleltek positivnak - a mi mintáinkban is elsősorban az érendothelben mutatott pozitivitást. Claudin-10 elleni antitesttel egyetlen esetben sem észleltünk pozitiv reakciót. Ki67 proliferatiós marker elleni antitesttel elvétve

mutatkozott pozitiv sejt. Azon minták, melyek cystitises hólyagból származtak, significansan magasabb Claudin-2, ill. -7 pozitivitást mutattak a nem cystitises hólyagból származó mintákhoz képest (Claudin-2 esetében morphometria: P = 0,0007, claudin-7: P = 0,047). Cystitises hólyagból származó mintákban Claudin-2 az esernyő sejtekben is kimutathatónak bizonyult. Ugyanezen sejtek nem cystitises hólyagból származó mintákban negativnak bizonyultak e reakcióval. (P= 0.034)

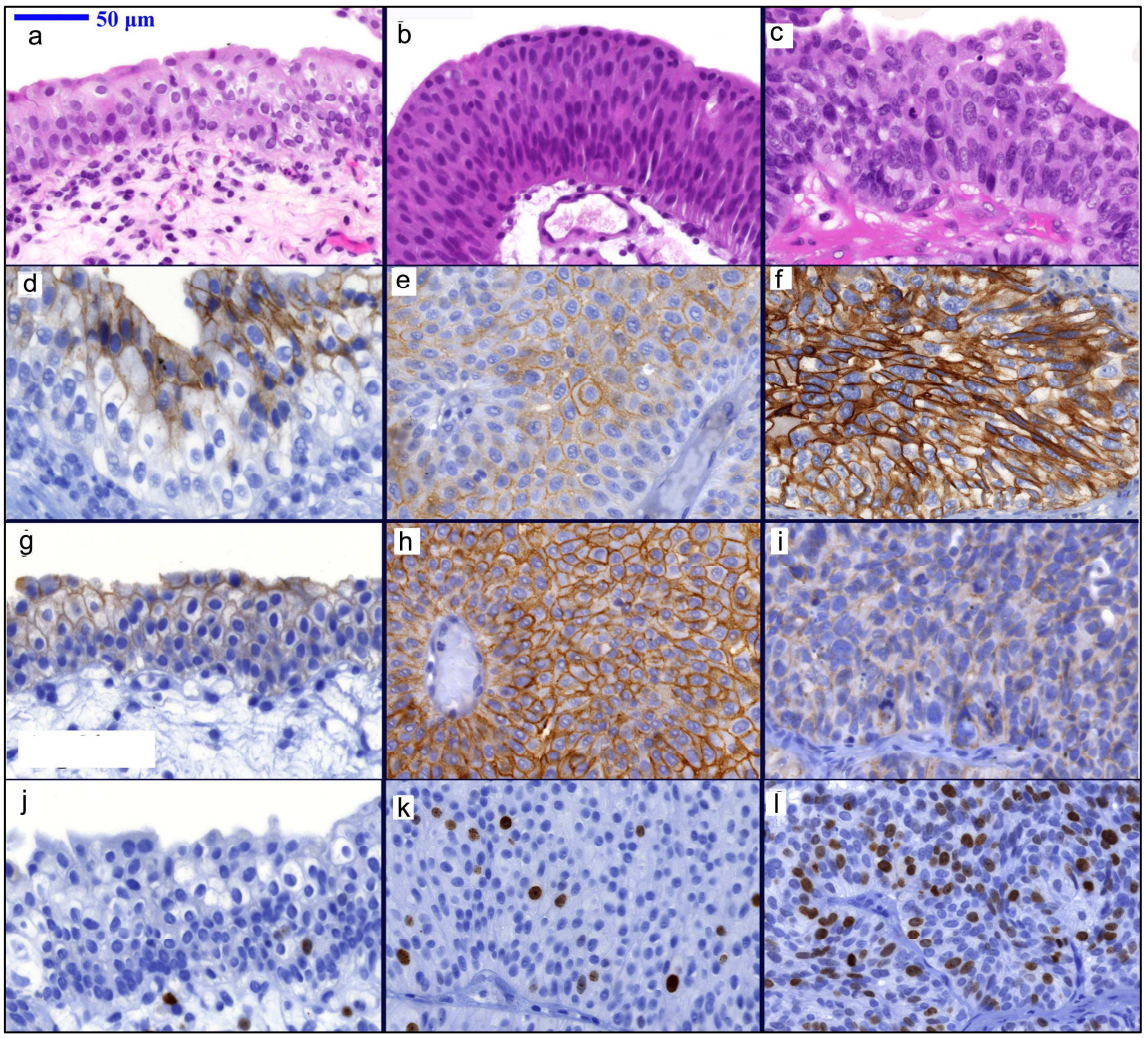
A daganatos mintákban Claudin-1, -2, -4 ill. -7 elleni antitestekkel legtöbb esetben pozitivitást észleltünk. Claudin-3, ill. -5 elleni antitestekkel csupán néhány, javarészt magasan differencialt daganatban észleltünk pozitiv reakciót. Claudin-10 pozitivitást – hasonlóan a normál, ill. gyulladt hámban észlelthez – nem észleltünk. Az urothelsejtes carcinomák Claudin-1, -2 ill. -7 pozitivitása a különböző sejtrétegekben hasonlóképpen alakult ahhoz, amit normál hámban észleltünk, vagyis Claudin-1 pozitivitást elsősorban a basalis rétegekben észleltünk, Claudin-2 ill. -7 elleni antitesttel elsősorban a hám felső rétegeiben észleltünk pozitivitást. Claudin-4 elleni antitesttel a hám teljes szélességében pozitiv reakciót észleltünk.

A daganatos esetekben a Claudin-1 expressio csökkentnek bizonyult (P=0.01), a Claudin-2, -4, ill. -7 azonban emelkedést mutatott mind fehérje, mind messenger RNS szinten a controlként használt gyulladásos mintákban észlelthez képest. A Ki67 proliferatiós marker – fehérje - szintén fokozott aktivitást mutatott (5, 6. ábra).

Összehasonlítottuk a low grade ill. high grade tumorból származó eseteket: az izom invazív esetek figyelembe vétele hasonló statisztikai eredményt mutatott, mint amikor kivontuk a csoportból az izom invazív tumorokat.

High grade tumorok esetén (P*=0.037 – T2 daganatokat figyelembe véve - P**=0.011 T2 daganatokat a csoportból kivonva) a Claudin-4 expressio emelkedett voltát tapasztaltuk, emellett a Ki67 pozitivitás is kifejezettebbnek bizonyult. E mellett a Claudin-1 expressio - P**=0.035, a Claudin-7 P*=0.025; P**<0.001 – alacsonyabb expressiót mutatott fehérje szinten is. Semiquantitativ vizsgálatot is végeztünk: az eredmény hasonlóképpen significans különbséget mutatott a két csoportban. A Claudin-1 expressio csökkent, a Claudin-2 expressio emelkedettnek bizonyult: (P*=0.025, P**=0.017) (P*0.002, P**=0.009, Claudin-4 expressio vizsgálatával P*<0.001; P**<0.001) volt RNS expressio szinten (high grade contra low grade UCC).

Low grade tumorok esetén több mintában Claudin-4 expressio inkább csupán a hám felső rétegében mutatkozott, mely hasonlónak bizonyult a normál hámban megfigyeltekhez (CHI^2 teszt P*<0.001; P**<0.001) (161).



5. Ábra. H&E, ill. IH reakciók: Claudin-4, -7 ill. Ki67 expressio normál urothelben (1. oszlop, a, d, g, j képek)), low grade UCC-ben, (2. oszlop, b, e, h, k képek), ill. high grade UCC-ben (3. oszlop, c, f, j, l képek) (200X)

Az ábra képei azonos nagyításúak ill. beállításúak, 50µm-es lépték.

A high grade UCC-k significansan magasabb Ki67 p<0.0001, Claudin-4 p=0.037 ill. significansan csökkent Claudin-7 p<0.0001 fehérje expressiót mutattak a low grade tumorokhoz viszonyítva. A Claudin-4, ill. Claudin-7 döntően membran positivitast mutat, Ki67 positivitás a magokban látható.

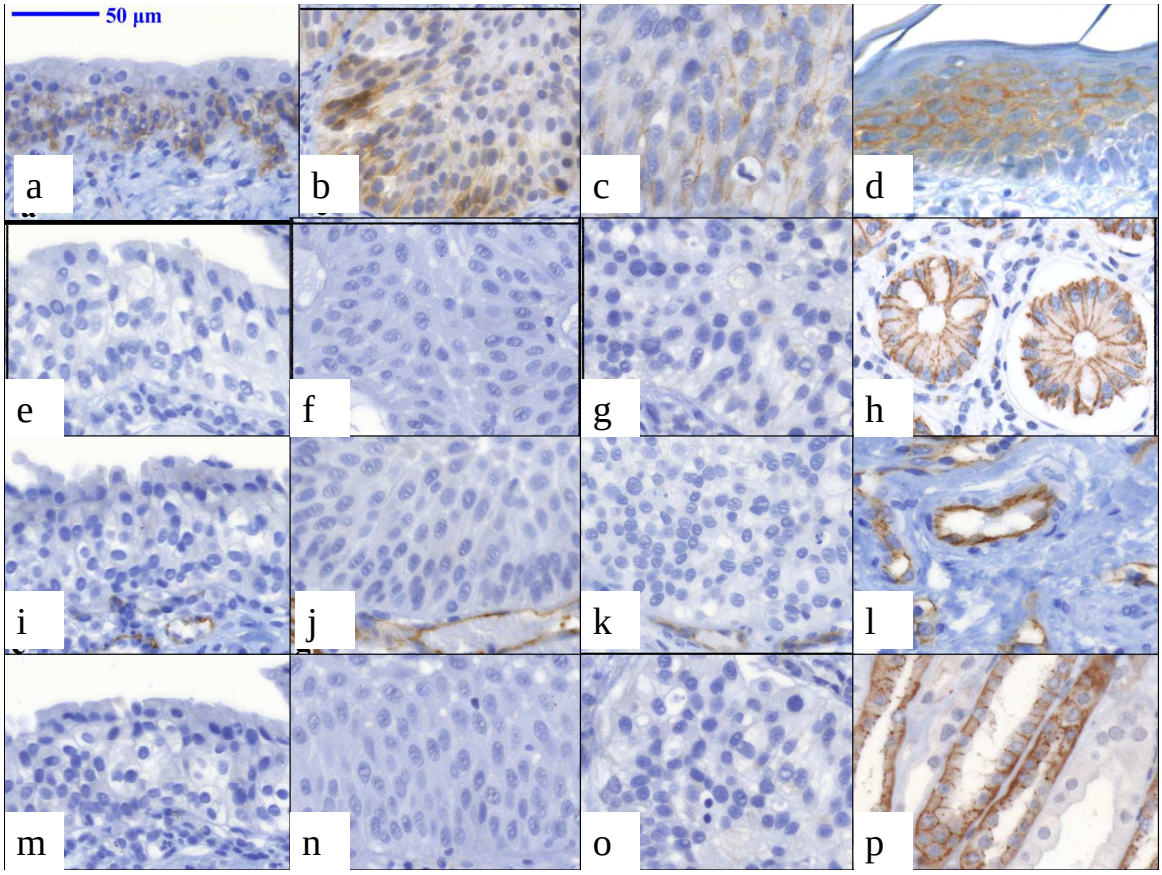
10. Táblázat. Control ill. UCC minták Ki67 fehérje, claudin fehérje, ill. mRNS expressiójának statisztikai analysise

	NGYC vs GYC	**NGYC vs UCC**	**GYC vs UCC**	**LG vs HG***	**LG vs HG****
Ki67 IH	↓(0.245)	↑(0.076)	↑(0.196)	↑(**<0.001**)	↑(**<0.001**)
Claudin-1 IH	↑ (0.386)	↓(**0.014**)	↓(**0.001**)	↓(0.078)	↓(**0.035**)
Claudin-2 IH	↑ (**0.007**)	↑(0.489)	↓(**0.001**)	↑(0.913)	↑(0.337)
Claudin-4 IH	↑ (**0.039**)	↑(0.125)	↓(0.082)	↑(**0.037**)	↑(**0.011**)
Claudin-7 IH	↑ (0.791)	↑(0.115)	↓(0.062)	↓(**<0.001**)	↓ (**0.001**)
Claudin-1 mRNS	↓(0.624)	↑(0.101)	↑(0.117)	↓(**0.025**)	↓(**0.0173**
Claudin-2 mRNS	↑(0.624)	↑(**0.037**)	↑(0.727)	↑(**0.002**)	↑ (**0.009**)
Claudin-4 mRNS	↓(0.624)	↑(0.092)	↑(**0.034**)	↑(**<0.001**)	↑(**<0.001**)
Claudin-7 mRNS	↑(**0.047**)	↑(**0.001**)	↑(**0.043**)	↓(0.720)	↓(0.819)

11. Táblázat. Claudin fehérje expressiójának statisztikai analysise control ill. UCC mintákban

	NGYC vs GYC	**NGYC vs UCC**	**GYC vs UCC**	**LG vs HG***	**LG vs HG****
Claudin-1 IH	↑ (0.337)	↓(**0.047**)	↓(**0.003**)	↓(0.914)	↓(**0.049**)
Claudin-2 IH	↑ (**0.034**)	↑(0.279)	↓(**<0.001**)	↑(0.810)	↑(0.337)
Claudin-4 IHK	↑ (**0.014**)	↑(0.075)	↓(0.062)	↑(**0.011**)	↑(**0.042**)
Claudin-7 IH	↑ (0.637)	↑(0.373)	↓(0.081)	↓(**0.014**)	↓ (**0.024**)

* T2-vel ;** T2 nélkül;
IH: immunhistochemia; GYC: gyulladásos control; NGYC: control gyulladás nélkül; A significans eltérések vastagon szedve; vs= /versus/; Két, egymástól független csoport közötti különbség vizsgálatára (TaT1 vs T2; LG vs HG) Mann-Whitney U tesztet használtuk; A nem aláhúzottan jelzett csoportokat viszonyítottuk az aláhúzással jelzett – referencia - csoportokhoz.
↑ A nem aláhúzottan jelzett csoportok magasabb expressiót mutattak a referencia csoporthoz képest.
↓ A nem aláhúzottan jelzett csoportok alacsonyabb expressiót mutattak a referencia csoporthoz képest.
( ): P-értékek a zárójelben feltüntetve



6. Ábra. IH reakciók: Claudin-1, (a, b, c, d), -3, (e, f, g, h), -5 (i, j, k, l) és -10 (m, n, o, p) expressio (vízszintes sorok) tumormentes urothelben, low ill. high grade UCC-ben, valamint positiv control mintákban (200X)

1. sor - Claudin-1, **2. sor -** Claudin-3, **3. sor -** Claudin-5, **4. sor -** Claudin-10.

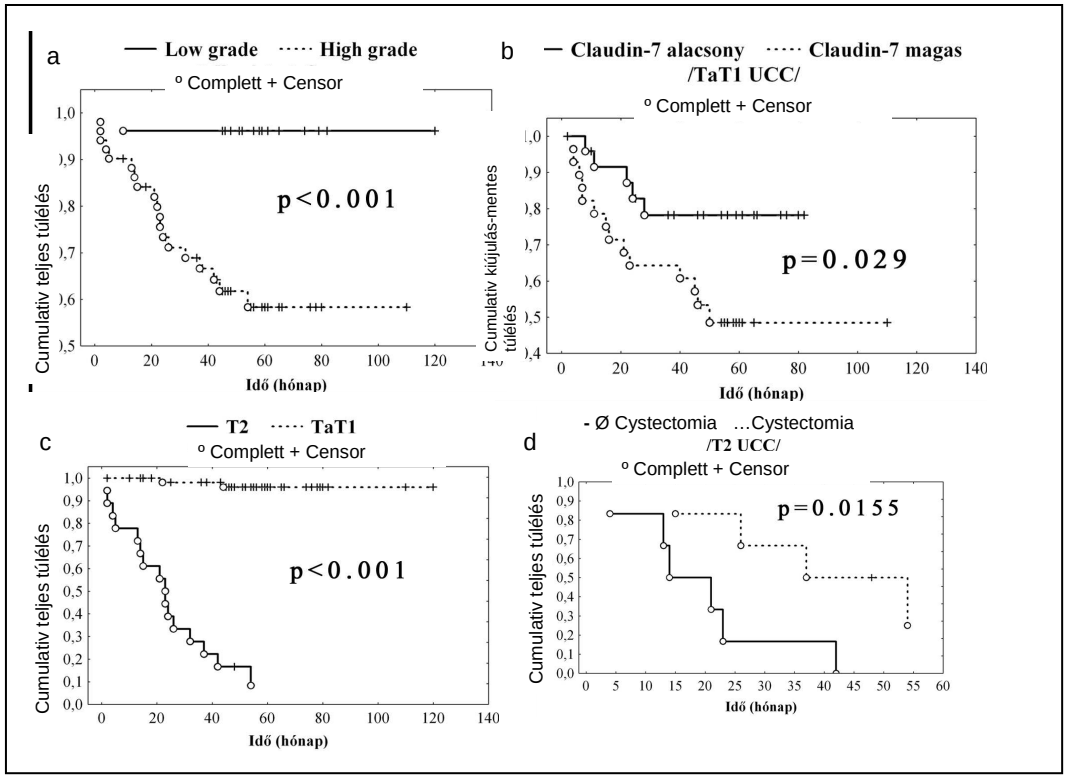
Az ábra képei azonos nagyításúak ill. beállításúak, 50µm-es lépték.
Az egységes fotók elérése érdekében kizárólag (!) lineáris változtatásokat tettünk – „brightness/contrast" , ill. „color-balance" gombokkal.

4.2.2. A Claudin-7 prognosticai szerepe

Low grade tumort hordozó betegeknél haláleset a vizsgálat lezártáig nem történt (4-120 hónap alatt). High grade tumort hordozó betegeknél azonban a páciensek 1/3-a UCC következtében halt meg ($P<0.01$; Fischer-féle egzakt teszt, 7/a ábra). A 19 UCC miatti halált szenvedett beteg közül 17-en T2 stádiumú UCC-ban szenvedtek. Két beteg megállapított T stádiuma T1-nek bizonyult. 64 beteget sikerült utánkövetni: 27 low grade, ill. 37 high grade tumort hordozó beteg volt. A low grade daganatot hordozó betegek 48%-ánál – 13 beteg -, a high grade tumort hordozó betegek 18%-ánál – 7 beteg – alakult ki recidiva. A recidivamentes túlélés a low grade tumort hordozók esetében átlagosan 38 hónap, míg high grade tumort hordozók esetében 47 hónap volt. A rövidebb recidivamentes túlélést mutató betegek esetében a tumor Claudin-7 expressziója magasabbnak bizonyult – medián felett expressalódott – a többi daganathoz képest ($P=0.029$; (7/b. ábra)).

A low grade daganatok egyike sem lépett a recidiva során magasabb T stádiumba a vizsgálati időszak alatt, míg a high grade tumort hordozóknál 3 beteg tumora progressiót mutatott T stádium tekintetében. Ezen 3 beteg közül 2 UCC miatt exitált. A túlélés tekintetében a high grade tumort hordozók significansan rosszabb mutatókkal rendelkeznek a low grade tumort hordozó betegekhez képest (Kaplan-Meier-analysis $P<0.001$); (7/a. ábra). E megállapítás egyezik a nemzetközi irodalmi adatokban foglaltakkal; a közlemények alapján is rosszabb túlélést mutatnak az izom invazív esetek a felszínesebb daganattal rendelkező betegekhez képest (Kaplan-Meier-analysis $P<0.001$); (7/c. ábra). Megjegyzendő, hogy azon betegek, akik a szövettani vizsgálat után cystectomián estek át, significansan hosszabb túlélési adatokat mutattak (48 hónap kontra 14 hónap – 14 hónapos átlagos túlélést a nem cystectomiával kezelt betegek mutatták). (Kaplan-Meier-analysis $P=0.0155$); (7/d. ábra). A rendelkezésre álló adatokból multivariáns analysis nem volt végezhető, ugyanis low grade tumorú betegek közül egy sem exitált, míg high grade tumort hordozók közül 19 exitus volt regisztrálható lásd 4. táblázat (a vizsgált UCC-s betegek adatai, az eltávolított daganat grade, stage beosztása) (161).

7. Ábra. UCC-s betegek túlélési adatainak elemzése a daganat grade-je, stage-e, ill. a Claudin-7 fehérje expressziójának alapján

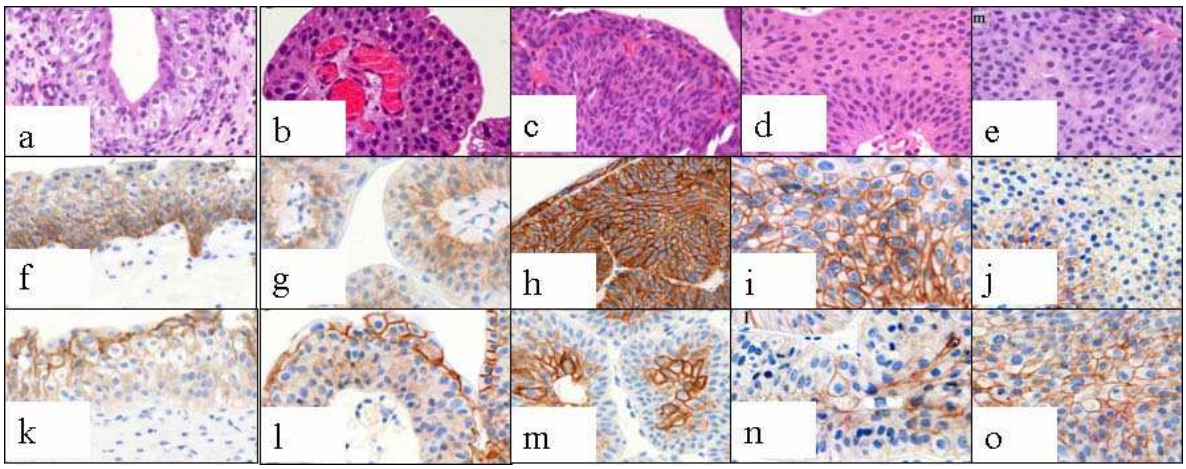


7/a. ábra**:** A high grade UCC-t hordozó betegek significansan rövidebb teljes túlélést mutattak a low grade tumort hordozó társaikhoz viszonyítva.
7/b. ábra**:** A medián alatti Claudin-7 fehérje expressio significansan hosszabb recidivamentes túléléssel társult a medián fölötti Claudin-7 fehérje expressióhoz viszonyítva Ta/T1-es tumoros esetekben.
7/c. ábra**:** T2-es stádiumú daganatot hordozók significansan rövidebb teljes túlélést mutattak a Ta/T1-es tumort hordozókhoz viszonyítva.
7/d. ábra: Cystectomiával kezelt T2 stádiumú daganatot hordozó betegek significansan hosszabb teljes túlélési adatokat mutattak a nem radicalisan kezelt hasonló stádiumú UCC-ben szenvedő társaikhoz viszonyítva.
Complett esemény: a beteg meghalt vagy a daganat recidivált.
Cenzorált esemény: a beteg nem UCC következtében, de meghalt, vagy véget ért az utánkövetési időszak.

4.3. Felszínes urothelsejtes carcinomák vizsgálata

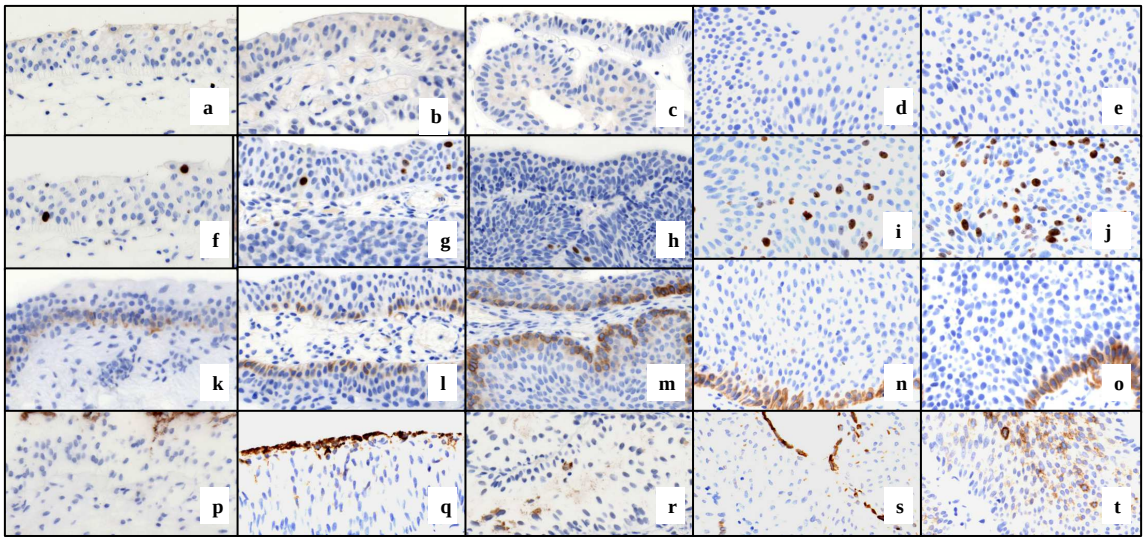
4.3.1. Immunhistochemiai értékelés

Valamennyi vizsgált Claudin hámon belüli kimutathatósága, mintázata megegyezett a korábbi közleményekben megállapítottakkal (178., 179., 209). Tekintettel azon tényre, hogy invertalt papillomák esetén az összepréselődött papillákon belül a basalis, ill. felszíni réteg elkülönítése igen nehézkes lehet, a Claudinok expressiós mintázatának hámon belüli localisatiója, ill. ennek ismerete segíthet a szövettani kép megítélésében misdiagnosisok elkerülésében. Mint korábban már ismertettük, a Claudin-1 a basalis réteg sejtjeiben expressalódik, a Claudin-4 inkább a hám felső soraiban mutatható ki. Hasonló pozitivitás észlelhető Claudin-7 esetében, bár a reakció erőssége jóval gyengébb. A Claudin-2 elleni antitesttel végzett reakció granularis jellegű, mely a hám basalis rétegében mutat kifejezettebb pozitivitást. Egy-egy invertalt papillomán belül azonban az esernyősejtek is mutattak pozitiv reakciót. Claudin-3 esetében elsősorban az esernyősejtek mutattak gyenge pozitiv reakciót.



8. Ábra. H&E, Claudin-1 és -4 (vízszintes sorok) jellegzetes expressiója felszínes UCC-ban

Normál urothel (a, f, k), urothelialis papilloma (UP) (b, g, l), invertalt urothelialis papilloma (IUP) (c, h, m), Grade I. urothelsejtes carcinoma (PUNLMP)(d,i,n), ill. low grade urothelsejtes carcinoma (LG-UCC)(e, j, o) esetekben – (függőleges sorok a felsorolás sorrendjében) (200X)
Az ábra képei azonos nagyításúak ill. beállításúak, 50μm-es lépték.
Az egységes fotók elérése érdekében kizárólag (!) lineáris változtatásokat tettünk – „brightness/contrast", ill. „color-balance" gombokkal.



9. Ábra. Claudin-3, Ki67, CK/5-6 és CK20 expressio normál urothelben, benignus, ill. low grade urothelialis daganatokban

Claudin-3, Ki67, CK/5-6 és CK20 expressio (vízszintes sorok) normál urothelben (a, f, k,p), papillomában (b, g, l,q), invertalt papillomában (c, h, m,r) , PUNLMP-ben (d, i, n,s) és LG-UCC-ben (e, j, o,t) (függőleges oszlopok a felsorolás sorrendjében) (200X)

Claudin-3 positivitás nem mutatkozott, ill. egy-egy esetben nagyon gyenge positivitást észleltünk. Ki67 positivitás a normál urothelben, urothelialis papillomában ill. invertalt urothelialis papillomában alacsony százalékban, a basalis sejtréteg területén volt kimutatható, míg PUNLMP, ill. low grade UCC-ben emelkedett expressiót észleltünk, positivitás a hám bármely pontján – nem csupán a basalis rétegben - kimutatható volt.

CK/5-6 reakció a hám basalis, míg a CK20 positivitás a hám legfelső rétegében jelent meg. (Ez az elrendeződés megfelel az irodalmi adatoknak.) CK20 pozitivitás LG-UCC-k esetén nem csupán a basalis rétegben mutatkozott, megjelent az intermedier rétegekben is az esetek egy részében (212).

12. Táblázat. Claudin expressio morphometriai eredményei normál urothelben, benignus, ill. low grade urothelialis daganatokban

Reakció	Csoport	Átlag	St.Hiba	Kruskal-Wallis-teszt P érték	vs UP p érték	vs IUP p érték	vs PUNLMP p érték	vs LG-UCC p érték
Claudin-1	**Normál**	13.45	1.82		1.000	**0.040***	1.000	1.000
	UP	20.21	2.09			**0.006***	1.000	1.000
	IUP	34.95	3.74	**0.001***			**0.047***	**0.002***
	PUNLMP	22.74	3.14					1.000
	LG-UCC	18.65	3.46					
Claudin-2	**Normál**	0.44	0.15		1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	1.27	0.29			1.000	1.000	0.057
	IUP	1.21	0.56	0.104			1.000	1.000
	PUNLMP	0.81	0.29					1.000
	LG-UCC	0.33	0.08					
Caudin-4	**Normál**	2.56	1.20		1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	4.77	0.77			1.000	1.000	1.000
	IUP	3.92	1.02	0.631			1.000	1.000
	PUNLMP	4.11	0.51					1.000
	LG-UCC	4.03	0.66					
Claudin-7	**Normál**	0.284	0.094		1.000	1.000	1.000	0.620
	UP	0.15	0.06			1.000	1.000	1.000
	IUP	0.24	0.10	0.162			1.000	1.000
	PUNLMP	0.21	0.09					0.720
	LG-UCC	0.07	0.05					

A fenti táblázatban átlag és standard hiba (St.Hiba) értékeket tüntettünk fel az egyes csoportok közötti fehérje expressio összehasonlításával együtt **(**normál, UP, IUP, PUNLMP ill. LG-UCC). A vízszintes csoportok expressioját ill. a függőleges csoportok expressióját Kruskal-Wallis-teszttel hasonlítottuk össze. A P értékeket a táblázatban tüntettük fel. A significans változásokat ($p<0.05$) vastagon szedtük, ill. csillaggal (*) jelöltük. Azonos jelölések a13, 14., ill. 15. táblázatban is.

13. Táblázat. A semiquantitativ vizsgálat eredményei (score x intenzitás) normál urothelben, benignus, ill. low grade urothelialis daganatokban .

Reakció	**Csoport**	**Átlag**	**St.Hiba**	**Kruskal-Wallis-teszt** P érték	**vs UP** p érték	**vs IUP** p érték	**vs PUNLMP** p érték	**vs LG-UCC** p érték
Claudin-1	Normál	6.00	1.155		1.000	**0.047***	1.000	1.000
	UP	8.68	0.75			**0.039***	1.000	1.000
	IUP	11.63	0.97	**0.002***			**0.027***	**0.006***
	PUNLMP	8.82	0.85					1.000
	LG-UCC	7.50	0.98					
Claudin-2	Normál	2.4	0.65		1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	3.52	0.59			1.000	1.000	1.000
	IUP	3.36	0.76	0.567			1.000	1.000
	PUNLMP	3.83	0.73					1.000
	LG-UCC	2.79	0.52					
Claudin-4	Normál	3.00	0.58		1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	3.75	0.49			1.000	1.000	1.000
	IUP	4.27	0.73	0.459			1.000	1.000
	PUNLMP	3.62	0.47					1.000
	LG-UCC	4.89	0.62					
Claudin-7	Normál	1.67	0.33		1.000	1.000	1.000	0.164
	UP	0.83	0.26			1.000	1.000	1.000
	IUP	1.33	0.66	0.096			1.000	1.000
	PUNLMP	0.59	0.17					0.651
	LG-UCC	0.37	0.15					

14. Táblázat. Ki67 reakció morphometriai értékei normál urothelben, benignus, ill. low grade urothelialis daganatokban

Reakció	**Csoport**	**Átlag**	**St.Hiba**	**Kruskal-Wallis-teszt** p érték	**vs UP** p érték	**vs IUP** p érték	**vs PUNLMP** p érték	**vs LG-UCC** p érték
Ki-67	Normál	2.10	1.05		1.000	1.000	0.323	**<0.001***
	UP	3.27	0.41			1.000	**0.038***	**<0.001***
	IUP	5.37	1.55	**<0.001***			0.223	**<0.001***
	PUNLMP	9.27	1.87					0.621
	LG-UCC	17.88	2.87					

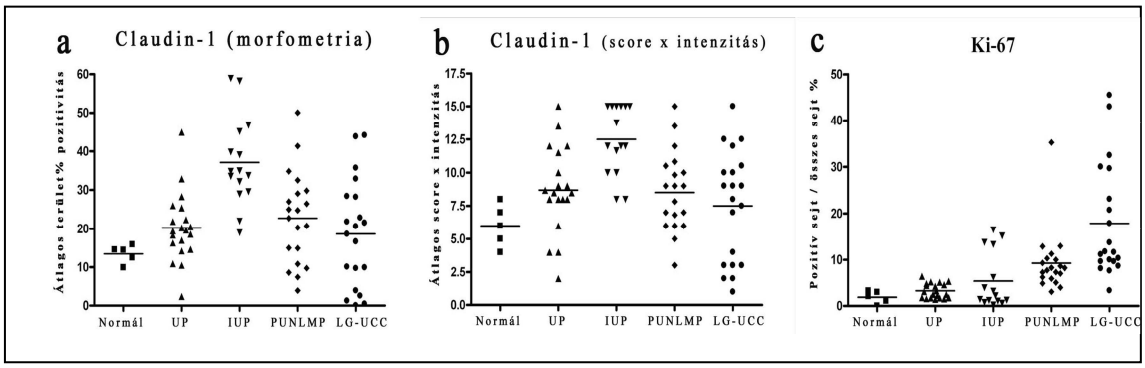
15. Táblázat. A CK/5-6 és CK20 reakciók morfometria elemzésének eredményei normál urothelben, benignus, ill. low grade urothelialis daganatokban

Reakció	Csoport	Átlag	St.Hiba	Kruskal-Wallis-teszt p érték	vs UP p érték	vs IUP p érték	vs PUNLMP p érték	vs LG-UCC p érték
CK/5-6	Normál	1.12	0.30	0.608	1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	1.13	0.46			1.000	1.000	1.000
	IUP	1.10	0.56				1.000	1.000
	PUNLMP	2.72	0.72					1.000
	LG-UCC	2.23	1.05					
CK20	Normál	1.69	0.07	**0.024 ***	0.281	0.549	**0.004 ***	1.000
	UP	1.71	0.72			1.000	0.712	1.000
	IUP	0.31	0.20				1.000	1.000
	PUNLMP	0.47	0.37					**0.016 ***
	LG-UCC	4.34	2.09					

Significans eltérés csupán a Claudin-1 esetében mutatkozott: invertalt papillomákban magasabb volt a Claudin-1 expressio a többi daganathoz képest. E megállapítások nem csupán a semiquantitativ értékelés során mutatkoztak meg, a morphometriás vizsgálatok is ezt mutatták (12. táblázat). Emellett a Claudin-1, ill. 2 low grade UCC eseteinkben csökkent expressiót mutatott a többi vizsgált daganathoz viszonyítva. Nem mutatkozott jelentős eltérés az egyes alcsoportok között sem a Claudin-4, sem a Claudin-7 expressióban (12. táblázat).

Jól ismert irodalmi adatok alapján a basalis sejtréteg sejtjei CK/5-6 pozitivitást mutatnak, míg normál hámban – urothelben - a CK20 expressio csupán a felszíni rétegben mutatható ki (53). A CK20 reakciót már jó ideje használjuk diagnosztikus dilemma esetén: fokozott expressiója tumor jelenléte mellett regisztrálható (22). Vizsgálatainkban csupán a low grade UCC esetekben volt emelkedett CK20 expressio, míg a többi vizsgált csoportban nem észleltünk fokozott expressiót (15. Táblázat). A CK/5-6 expressióban nem mutatkozott lényeges eltérés a különböző vizsgált csoportok között. Ez a megfigyelésünk némiképp ellentmond más munkacsoport által jelzett, az irodalomban megjelent adatoknak (162). A Ki67 proliferatiós marker – mely a CK20 mellett szintén rutinszerűen használt antitest a tumordiagnosztikában – szintén fokozott

expressiót mutatott low grade UCC tumor eseteinkben, hasonlóképpen a CK20 fokozott expressiójához. E megállapításokat mind semiquantitativ analysissel, mind morphometriai vizsgálattal is sikerült megerősíteni (Spearman-féle correlatio; R=0.75, p <0.05) (12-15. táblázat) (212).



10. Ábra. Claudin-1 morphometria, score x intenzitás és Ki67 dot plot

10. a. ábra: Claudin-1 dot plot, morphometria alapján

10. b. ábra: Claudin-1 dot plot, score x intensitas alapján

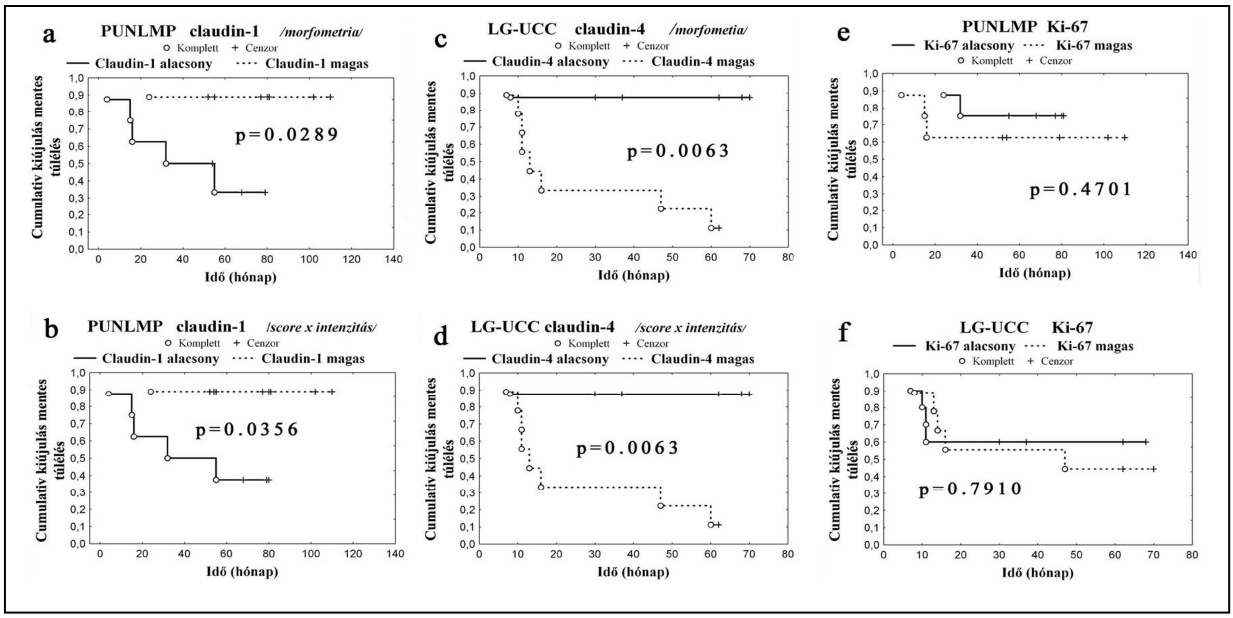
10. c. ábra: Ki67 dot plot

IUP-k significansan emelkedett Claudin-1 expressiót mutattak a többi vizsgált csoporthoz viszonyítva. A LG-UCC-k significansan magasabb Ki67 expressiót mutattak a normálhoz, UP-khoz és IUP-khez képest. A PUNLMP-k significansan emelkedett Ki67 expressiót mutattak az UP-khez viszonyítva. * = $p<0.05$ A morphometria eredménye significansan correlált a semiquantitativ analysis eredményével (Spearman-féle correlatio; $r=0.75$, $p <0.05$).

4.3.2. A vizsgált markerek prognosticai szerepe normál urothelben, benignus, ill. low grade urothelialis daganatokban

Betegeink utánkövetési ideje átlagosan 60 hónap volt (3-126 hónap). A vizsgálati időszak alatt 1 exitus történt, ez azonban nem UCC miatt következett be. Csaknem valamennyi esetben a vizsgált daganat primernek bizonyult – két esetben diagnosztizált PUNLMP recidiv tumorként érkezett. Utánkövetésre 73 eset volt alkalmas: 20 low grade UCC, 20 PUNLMP, 15 invertalt papilloma, ill. 18 urothelialis papilloma. Recidiva 10 low grade UCC esetben, ill. 6 PUNLMP esetben alakult ki. A recidivamentes túlélés átlaga 21 hónapnak bizonyult (4-60 hónap). Nem regisztráltunk recidivát invertalt papilloma, ill. papilloma eseteink között.

Korai intravesicalis chemotherapiában – Mytomycin C instillatioban - két beteg részesült – (low grade UCC esetek). A további, nem korai hólyagöblítéses therapiát 13 beteg kapta, közülük 2 PUNLMP, 11 pedig low grade UCC-ben szenvedett. További 5 beteg (2 PUNLMP, 3 low grade UCC) Pharmorubicin therapiában részesült. Azoknál a betegeknél, akiknek papillomát, ill. invertalt papillomát állapított meg a szövettani vizsgálat, műtét utáni chemotherapiát nem alkalmaztak. Significans correlatiót nem sikerült kimutatni a therapia típusa, ill. a recidiva ténye között, a közvetlen műtét utáni chemo-instillatióban részesült betegek azonban hosszabb recidivamentes túlélést mutattak: 22 contra 16 hónap. A medián alatti Claudin-1 expressiót mutató PUNLMP eseteink rövidebb recidivamentes túlélést mutattak a Kaplan-Meier-analysis során (Log-Rank-teszt, P=0.0.289). A magas Claudin-1 expressio később kialakuló recidivával járt. Ezzel ellenkezőleg, rövidebb recidivamentes túlélés magasabb Claudin-4 expressio mellett volt megfigyelhető. A további vizsgált antitestek expressiója, ill. a recidiva ténye, megjelenése között significans összefüggés nem volt kimutatható (212).



11. a-f. Ábrák. A recidiva mentes túlélés vizsgálata Claudin-1, -4 és Ki67 alapján PUNLMP ill. LG-UCC eseteinkben

11. a., b. ábrák: Recidiva mentes túlélés analysis Claudin-1 alapján PUNLMP-ben; morphometria, score x intenzitás

11. c., d. ábrák: Recidiva mentes túlélés analysis Claudin-4 alapján LG-UCC-ben; morphometria, score x intenzitás

11. e., f. ábrák: A recidiva mentes túlélés elemzése PUNLMP- és LG-UCC esetekben Ki67 expressio alapján

Komplett esemény: a beteg meghalt vagy a daganat recidivált.

Cenzorált esemény: a beteg más betegségben halt meg, vagy véget ért az utánkövetési időszak.

Azon PUNLMP daganatot hordozó betegek, akiknek tumorában a Claudin-1 expressiót a medián alatt találtuk, significansan rövidebb recidivamentes túlélést mutattak a Claudin-1-et a medián felett expressalo PUNLMP daganatos betegekhez képest (Kaplan-Meier-analysis; a.: morfometria, p=0.0289; b.: score x intenzitás, p=0.0356).

Ezzel ellentétesen, a Claudin-4 esetében azon LG-UCC-t hordozó betegek mutattak significansan rövidebb recidivamentes túlélést, akiknek daganata a medián fölött expressálta e fehérjét. (Kaplan-Meier-analysis, p=0.0063, c.: morfometria; d.: score x intenzitás). Ki67 expressióval ilyen összefüggés nem mutatkozott (Kaplan-Meier-analysis, e.: PUNLMP p=0.4701; f.: LG-UCC p=0.7910).

5. MEGBESZÉLÉS

Az urothelsejtes carcinoma világszerte növekvő előfordulású daganatféleség. Míg Magyarországon csaknem 2000, addig Európában mintegy 120000 új megbetegedést észlelnek évente (7). E daganatok 70%-a felszínes, azonban mintegy 50%-uk recidivál, 15% pedig magasabb stádiumú daganattá válik a recidivák során. A hólyagfali izomrostok invasióját mutató daganatot hordozó betegek significansan rosszabb túlélési arányt mutatnak. A felszínes kötőszöveti réteget infiltráló, ill. nem invasiv daganatok 5 éves túlélése 95%, míg izominvasio stádiumában már csak 50%-os 5 éves túlélés várható (47).

A daganat korai felfedezése a túlélés szempontjából döntő jelentőségű. Az urothelsejtes carcinomák általában haematuria formájában jelentkeznek. Tekintettel arra, hogy a haematuria daganatos megbetegedés esetén is spontán szűnhet, egyéb urológiai betegségekkel összekeverhető – pl. haemorrhagiás cystitissel. Mindezek alapján haematuria esetén UCC lehetőségét ki kell zárni. Bár a vizelet cytologiai vizsgálat szenzitivitása nem kielégítő, ennek ellenére vérvizelés esetén cytologiai vizsgálatot kell végezni, ugyanis pozitív esetben számos egyéb vizsgálat végzését szükségtelenné teheti. E módszert csaknem 70 éve kiegészítő vizsgálatként alkalmazzák (8).

Számos kiegészítő, molecularis biológiai alapú teszt látott napvilágot az utóbbi évtizedekben, azonban egyik sem kielégítő specificitású, ezért ma még nem alkalmazhatóak rutin eljárásként (163). A korábban tumor miatt transurethralis resectión átesett betegeknél a cytologiai szűrő – utánkövető - vizsgálatok mellett a cystoscopia a további lehetséges, a beteg követésben szokásos vizsgálat. A cystoscopia mellett szükség esetén szövettani vizsgálat is végezhető.

Daganat esetén a daganat jelenlétének megállapítása, a grade, ill. a stage meghatározása mellett ma már prognosticai markerek vizsgálatára is lehetőség nyílik. Sajnos az eddig vizsgált markerek - oncogénekkel, sejtciklus-szabályozókkal, proliferatiós markerekkel történő vizsgálatok eredményei - nem nyújtottak komoly segítséget az egyes daganatok valódi prognosisának meghatározásában (46, 55, 83, 90,

93, 103, 104, 164), a szövettani grade, stage-nél hatékonyabb prognosis-becslés eddig még nem ismert.

Az urológiai daganatok szövettani osztályozásán belül igen komoly inter, ill. intra (!) observer eltérés mutatkozhat (45). Tekintettel a viszonylag nehéz reprodukálhatóságra, a daganatok grade-jét nem csupán a 2004-es WHO osztályozás alapján kell megnevezni egy-egy leletben, hanem az 1973-as WHO kategóriák alapján is (22, 23, 45, 165). Mindezt annak érdekében kell tenni, hogy az egyes statisztikai vizsgálatok meta-analysise során a régebbi, ill. az újabb cikkekben szereplő eset feldolgozásokat könnyebb legyen összehasonlítani. Meg kell találni ugyanis azt a betegcsoportot, - azokat a betegeket - akiknek a betegsége – hasonló szövettani kép esetén is – intenzívebb kezelést igényel.

Mind az invasiv tumorokat, mind a nem-invasiv tumorokat low, ill. high grade csoportba soroljuk a szövettani megjelenés alapján. Számos olyan eset fordul elő azonban, amelyeknél még a grade meghatározása is igen nehézkes. E nehéz esetek megoldására szükség lenne olyan markerek segítségére, melyekkel objektívebben meg lehet ítélni egy daganat low vagy high grade voltát.

Mivel a sejtkapcsoló struktúrák -nevükhöz híven- a sejtek közötti összeköttetésben, kommunikációban játszanak kiemelt szerepet (109, 130, 166), expressziójuk mennyisége alapján logikus lenne azt gondolni, hogy e struktúrák koncentrációjának csökkenése esetén magasabb grade-ű, - invasio szempontjából komolyabb klinikai kockázatot jelentő - daganattal kell számolnunk.

Az E-cadherin egy Ca^2dependens sejtadhaesiós molekula, ill. tumor suppressorként számon tartott fehérje. Szerepe a daganat áttétek kialakulásában ellentmondásos, hiszen a sejtadhaesióban betöltött funkciója folytán logikusan gondolható, hogy csökkent expressziója esetén az invasio kialakulása könnyebben következik be. Mindez a metastasis képzésben gátló tényező lehet, hiszen a tumorsejtek metastaticus gócokba való kitapadásának is feltétele a sejtek adhesiojának megőrzött képessége. (Az emlő daganatainak diagnosztikájában igen lényeges szerepet játszik, ugyanis az emlő távoli metastasist gyakran adó daganatában, a lobularis carcinomában pl. nem expressalódik (167), e fehérjét a rutin diagnosztikában is használják (168)).

Az E-cadherinek tumorprogressióban betöltött szerepét számos munkacsoport vizsgálta már, azonban valamelyest eltérő eredmények születtek. Expressioját számos

más szerv daganataiban is kutatták: prostata (169), oesophagus (170), emlő (171), gyomor (172, 173). Az E-cadherin fehérje elvesztése segíti a daganatsejtek vándorlását. Távoli metastasisok kialakulását is összefüggésbe hozták a csökkent E-cadherin expressióval (169, 170, 174). Egyes munkacsoportok significans összefüggést találtak a csökkent E-cadherin expressio, illetve a daganat alacsony grade-je, ill. előrehaladott stádiuma tekintetében (174-176). Ezen munkacsoportok többnyire arról számolnak be, hogy a csökkent E-cadherin expressio előrehaladottabb stádiumú, ill. alacsonyabban differencialt daganatok esetén mutatható ki. (Ezen megállapítás logikusnak tűnik, ugyanis a daganatsejtek cohesioját biztosítják a sejtkapcsoló struktúrák, melyek elvesztésére szükség van ahhoz, hogy a daganatsejt „elszabadulva" társaitól, a kötőszöveti rostok felé terjedhessen). A daganatsejtek érinvasiója esetén azonban a vér vagy nyirokáramban való vándorlás után is szükség van sejtfelszíni kapcsoló struktúrákra - az érfalra való kitapadáskor, ill. a metastaticus gócban való megtapadáskor - az új, metastaticus helyen való megtapadáshoz.

Az E-cadherin fehérjének kódoló génje a 16. chromosoma hosszú karján található (22.1 locus). Az expressio elvesztését többféle genetikai ok magyarázhatja: deletio, pontmutatio, ill. a gén promoterének hypermetilatiója. Ez utóbbi jelenség mellett az E-cadherin abnormális expressiója észlelhető urothelialis daganatokban, ami egyes szerzők szerint a szövettani eltérést nem mutató urothelsejtekben is kimutatható. Ennek segítségével a korai recidiva bekövetkezte megjósolható (177).

Mivel az E-cadherin egy sejtadhaesiós molekula, feltételezhető, hogy minél invasivabb egy húgyhólyag carcinoma, annál kevésbé expressalódik a sejtek felszínén (104).

Saját kutatásaink szerint az E-cadherin expressio változása nem mutatott semmiféle összefüggést sem az UCC grade-del, sem a stádiummal, ill. a hosszú távú túlélés tekintetében sem volt kimutatható összefüggés. Gyenge, vagy negativ reakciót észleltünk számos low grade, nem-invasiv tumor esetén, ill. erőteljesebb reakciót invasiv, alacsonyabban differencialt daganatban. Vizsgálataink eredményéhez hasonlót a nemzetközi irodalomban csak elvétve találtunk. Tekintettel arra a tényre, hogy „eredeti" E-cadherin vizsgálatunk még abban az időben történt, amikor immunhistochemiai laborunk még nem automatizált gépekkel működött, és felmerült, hogy következtetéseinket nem teljesen standardizálható, hibás reakció-sorozatra

alapoztuk, megismételtük a vizsgálatainkat. Mivel az eredeti E-cadherin vizsgálatkor használt blokkokból az anyag elfogyott, újabb betegmintákon végeztük az újabb IH vizsgálatokat. Bár jelen alkalommal az E-cadherin expressio tekintetében a korábbitól eltérő eredmény született; valamennyi daganat erőteljes, vagy kifejezett positivitást mutatott (+ ill. ++), - az eredeti megállapítás mégis érvényes maradt: az E-cadherin expressio függetlennek bizonyult a daganat grade-től ill. stage-től, ugyanis egyformán erőteljes volt az E-cadherin expressio low grade, nem invasiv tumorokban, valamint invasiv, high grade daganatokban egyaránt. Néhány olyan eset is szerepelt az újabb E-cadherin vizsgálatban, amely a TUR során eltávolított mintában egy daganat low grade, felszínes részlete mellett a jóval differentialatlanabb, hólyagfali izomrostok között infiltráló részletét is tartalmazta. Ilyen esetben sem mutatkozott különbség a tumorsejtek E-cadherin expressiós mintázatában.

Kísérleteinkhez részben hasonló eredményről számol be egy kínai munkacsoport (178). Szövettani mintán immunhistochemiai reakcióval, ill. vizeletmintában ELISA módszerrel a solubilis E-cadherin szintet vizsgálták. Eredményeik alapján a szövettani mintán az E-cadherin expressio ugyan mutatott összefüggést a tumor grade ill. stage-el, azonban a tumor mérettel, ill. a daganatos focusok számával nem volt kimutatható összefüggés. A solubilis E-cadherin vizsgálattal igen meglepő eredményt észleltek: primer hólyagdaganatok esetén viszonylag magas volt az expressio (magasabb, mint normál control hólyagokban (!!!), ill. a benignus hólyagbetegségekben szenvedő betegek mintáin), significans csökkenés azonban csak recidiva esetén volt kimutatható. Egy japán munkacsoport (179) cystectomián átesett betegek anyagát elemezte multivariáns analysisben (grade, stage, nyirokcsomó status, túlélés). Nem talált összefüggést a túlélési mutatók ill. az E-cadherin expressio, ill. egyéb kapcsolódó molekulák (beta, gamma-cathenin) tekintetében; az esetek 60%-ban normál E-cadherin expressiót találtak! Eredményeik alapján az egyedüli, prognosticus markerként használható molekulának az α-cathenin bizonyult. Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy az E-cadherin elvesztésének szerepe az urothelialis daganatok progressiojában korántsem annyira biztos, mint az a magabiztos közlemények alapján tűnik. További kutatások, ill. az E-cadherin-cathenin-complex egyéb összetevőinek további vizsgálata szükséges, hogy megalapozott következtetéseket vonhassunk le.

A claudinok expressioját számos szerv normál hámjában, ill. számos szervből kiinduló daganatban vizsgálták már, részben diagnosztikus, részben prognosticus szempontból. Ismert tény, hogy cervixben a Claudin-1 fokozottan expressalódik intraepithelialis neoplasia esetén (180). A Claudin-1 expressio a nyelőcsőből kiinduló laphám carcinomák esetében viszont csökkent expressiós mintázatot mutat (120). Emelkedett Claudin-1, ill. -2 expressio colorectalis adenocarcinomákban kedvezőtlen prognosisú esetekben figyelhető meg (181-183). Mivel a Claudin-4, ill. a Claudin-3 a Clostridium perfringens baktérium enterotoxinjának receptoraként is funkcionál, emelkedett expressio esetén target therapia célpontja lehet (ovarium, ill. prostata carcinoma) (131, 184, 185). Csökkent Claudin-7 expressiót mutattak ki invasiv, ill. nem-invasiv emlő carcinomákban (133), fej-nyak eredetű, prostata, ill. colorectalis adenocarcinoma esetekben (145-147). Hepatocellularis carcinomák esetén a Claudin-10 expressio fokozódása rövidebb túléléssel mutatott összefüggést (186). Egyes claudinok diagnosztikus segítséget is nyújtanak: a tüdő adenocarcinomáinak laphám carcinomától való elkülönítését teszi lehetővé a Claudin-5 expressiójának kimutatása: adenocarcinomákban Claudin-5 kimutatható, míg laphám carcinomákban nem (143).

Amellett, hogy a claudinok kimutatása már számos szervben megtörtént, a húgyhólyagban, ill. annak daganataiban még viszonylag kevés kutatási adat áll rendelkezésre e téren. Munkánkban a Claudin-1, -2, -3, -5, -7 és -10 kimutathatóságát vizsgáltuk normál urothelben, ill. urothelsejtes carcinomákban. A nem daganatos mintáink teljesen ép urothelből, ill. cystitisből származó minták voltak. A cystitises mintákban fokozott Claudin-2 expressio volt kimutatható, mely vélhetően a gyulladásos folyamat jelenlétével magyarázható. Ismert tény, hogy a Claudin-2 a hám permeabilitásának fontos tényezője (187-189), ezek alapján nem meglepő, hogy urocystitisből származó mintákban a Claudin-2 fokozott expressiója volt kimutatható. Claudin-2 fokozott expressioját más szerv gyulladásos megbetegedésében is kimutatták: gyulladásos bél betegségekben más munkacsoportok is a Claudin-2 expressio fokozódását észlelték (190-192). Mindezt az interferon 13 indukciójának eredményeképpen magyarázták. Emellett a Claudin-2-nek EGFR transactivatios hatását is leírták (193). Vélhetően ez a magyarázata a colorectalis adenocarcinomákban való fokozott kimutathatóságának. Vizsgálatainkban a többi Claudinnak a gyulladásos folyamatokban nem volt kimutatható szerepe (Claudin-1, -3, -5, -10).

A Claudin-3 expressio tekintetében vizsgálataink alapján mind a low, mind a high grade tumorok csupán elszórt, gyenge intensitású reakciót mutattak. Más munkacsoportok vizsgálata alapján gyenge, ill. negatív claudin expressiót találtak (187, 188). A Claudin-1, -4, ill. -7 tekintetében megfigyelhető volt, hogy igen „sűrű", összepréselődött daganatos papillákból felépülő daganatok esetén az expressiós mintázat segített az összepréselődött papillákon elhelyezkedő sejtek orientációjának megítélésében, ugyanis low grade daganatok esetén az expressiós mintázat megőrizte az eredeti localisatiót (Claudin-1 - basalis sejtek, Claudin-4, -7 - felszínes sejtek).

Claudin-4 tekintetében a high grade tumorok általában intenzív, a hám teljes szélességére localisalódó mintázatot mutattak, segítve ezzel a daganat high grade fokozatának megállapítását kétes esetekben.

A Claudin-5 tekintetében nem észleltünk jelentős eltérést a különböző differencialtságú daganatok között.

A Claudin-1 csökkent expressióját figyeltük meg low grade urothelsejtes carcinomákban (benignus, ill. PUNLMP tumorokkal összehasonlítva), mely adott esetben differenciál-diagnosztikai segítség lehet a PUNLMP, ill. a teljesen benignusnak tartható papillomáktól való elkülönítésben. (Uropathológiai esetek diagnosztizálásában kevésbé jártas olvasó szemében kevéssé érthető lehet e nehézség, hiszen szavakban igen élesen elkülönülő kategóriákról van szó. Valójában azonban kisebb minták elemzésekor nap mint nap felmerül, hogy egy klinikailag daganatnak tűnő elváltozás daganat-e egyáltalán, és ha daganatnak gondoljuk, milyen szövettani altípusba soroljuk).

A Ki67 expressio emelkedett volta szintén diagnosztikus segítségként szolgálhat kétes esetekben (194) (low grade tumorokban is emelkedett az expressiós mintázata az alacsony malignitású PUNLMP, ill. a benignus papillomákhoz képest). Az elkülönítés a diagnosztikai szempontok mellett a beteg további sorsát illetően is igen lényeges, ugyanis a papillomás betegeket nem kell postoperativ kezelésben részesíteni (a primer PUNLMP-t mutató betegeket sem). E stratégia indokoltságát igazolja az a megfigyelésünk is, hogy a papilloma esetek recidivát nem mutattak, míg az UCC esetekben viszonylag magas recidiva arány mutatkozott.

Vizsgálataink alapján reménykedtünk, hogy sikerül megtalálni azt a csoportot is az UCC eseteken belül, amelyeknél ugyan morphologiai eltérés nem látható, azonban korai recidiva jelent meg. A Ki67 expressiós mintázatban lényeges eltérés a PUNLMP,

ill. a low grade UCC esetek között nem mutatkozott. Eiber munkacsoportja significans különbséget mutatott ki Ki67 expressio tekintetében az invertalt növekedési mintázatú UCC, ill. az invertalt papillomák között (195). Ez az eredmény nem meglepő, hiszen az invertalt mintázatú UCC malignus tumor, gyakran high grade UCC-kban fordul elő e mintázat, míg az invertalt papilloma benignus daganat. (Véleményem szerint a napi rutinban e két daganatféleség elkülönítése nem jelent nehézséget gyakorló uropatológusok számára). Saját vizsgálataink alapján is emelkedettnek bizonyult a Ki67 expressio high grade UCC-k esetében. Más munkacsoport correlatiót talált a Ki67 expressiós mintázat, a teljes túlélés, valamint a recidiva mentes túlélés között (194). Saját vizsgálatainkban nem találtunk ilyen összefüggést a statisztikai analysis során.

A CK/5-6 vizsgálat alapján nem mutatkozott különbség az UCC csoportok között. Más közlemények ellentmondó adatokról számolnak be: a CK/5-6, ill. CK20 esetében is olvasható fokozott, ill. csökkent expressio UCC-kben (22, 23, 53, 162, 194). Vizsgálatainkban valamennyi csoportban ingadozó értékeket észleltünk CK/5-6, ill. CK20 tekintetében. Low grade UCC-k esetében azonban gyakrabban volt fokozott CK20 expressio kimutatható a többi csoporthoz viszonyítva.

A különböző Claudinok expressiós mintázata low, ill. high grade tumorban változatos; míg a Claudin-1, -2 alacsonyabban differentiált UCC-k esetében csökkent, addig a Claudin-4 fokozott expressiót mutatott e tumorokban. Mindezek alapján feltételezhető továbbra is, hogy a daganat progressio folyamatában a tight junction-ok átrendeződése fontos tényező lehet. Ennek ellenére high grade UCC-k esetében sem a Claudin-7 expressio csökkenése, sem a Claudin-4 expressio fokozódása nem mutatott összefüggést az izom invasio jelenlétével.

A fokozott Claudin-7 expressio, ill. a rövid recidiva mentes túlélés correlatiót mutattak. A Ki67 proliferatiós markerrel észlelt positivitás emelkedése nem járt hasonló összefüggés kimutathatóságával. Bár vizsgálatainkban a Claudin-7 expressio a recidiva mentes túléléssel összefüggést mutatott, semmiféle correlatio nem mutatkozott a high grade tumorok postoperativ therapiája, ill. recidivamentes túlélése között (BCG vagy chemotherapia, Chi^2). Az az észlelésünk, ill. látszólagos ellentmondás, mely szerint az alacsonyabban differenciált UCC-k alacsonyabb Claudin-7 positivitást mutattak, és mégis, a Claudin-7 magasabb expressioja járt korábbi recidivával, vélhetően a low ill. high grade daganatok kezelése közötti markáns különbséggel függ össze.

A Claudin-7 expressio változása a különböző szervek laphámcarcinomái esetén nem egyformán befolyásolják a prognosist: a nyelv, ill. az oesophagus carcinomáiban a Claudin-7 expressio megszűnése összefüggést mutatott az invasiv hajlammal mind sejtvonalon, mind a műtéti preparátumokon végzett vizsgálatok alapján (196, 197). Ezzel ellentétesen, ovarium carcinomákban a fokozott Claudin-7 termelődés mutat correlatiót a kedvezőtlen prognosissal (198).

A nem-invasiv, low grade urothelialis carcinomákban vizsgálatunk alapján viszonylag magas Claudin-4 expressio mutatkozott, ez a recidivamentes túlélési idő csökkenésével mutatott correlatiót.

Vizsgálatainkban a PUNLMP típusú daganatokban a Claudin-1 expressio csökkenése mutatott hasonló correlatiót. Emellett az invertalt papillomák esetében is emelkedett Claudin-1 expressiót észleltünk a többi daganathoz viszonyítva. A Claudin-1 expressio csökkenését korábban más szervek tumorainak rövidebb recidivamentes túlélésével hozták összefüggésbe (nyelőcsőcarcinoma, valamint HCC (120, 199)). A prostata, ill. emlőcarcinomákban rosszabb prognosissal a Claudin-4 expressio fokozott megjelenését hozták összefüggésbe (135, 136, 200). Korábbi vizsgálatokkal csökkent Claudin-1 expressiót bizonyos szervek carcinomáinak vizsgálata során (emlő, prostata, colon) figyeltek meg (134, 183, 201). Ezen észlelésekkel ellentétben más kutatócsoportok vizsgálatai szerint a Claudin-1 fokozott expressiója a colon tumor carcinogenesisében játszik szerepet (202). Az urothelium vizsgálata során Nakanishi munkacsoportja fokozott Claudin-1, -3, -4 expressiót mutatott ki az urothelium felső szakaszának daganataiban (187). Vizsgálatuk alapján az emelkedett expressio kedvezőtlen prognosissal mutatott összefüggést.

Jelen vizsgálatainkban a low grade UCC esetekben a recidivamentes túlélés rövidebbnek bizonyult a high grade tumorokban észlelteknél. (Más munkacsoportok vizsgálataiban még magasabb recidiva rátát észleltek low grade daganatokban: Miyamoto és mtsainál 50%-nál is magasabb volt a recidivaráta low grade daganatok esetén (203). Ennek oka feltételezéseink szerint az is lehet, hogy a high grade daganatos betegek agresszívebb therapiában részesülnek, mely befolyással lehet a recidiva megjelenésének idejére). Egyes munkacsoportoknál a recidiva hajlam magasabbnak bizonyult high grade daganatokban, mint a low grade UCC-k esetén (204). Megint más munkacsoportok vizsgálata alapján a high grade tumorok recidiva rátája 35%-os volt

BCG therapia után (205). A saját vizsgálatainkban észlelt magasabb recidiva ráta low grade tumorokban a therapia megválasztásával is magyarázható; a high grade daganatos betegeknél gyakrabban alkalmaztak BCG kezelést, mely más közlemények alapján is hosszabb recidiva mentes túléléssel járt. E megfigyelésünk ellenére a statisztikai vizsgálatok alapján nem sikerült összefüggést igazolni a BCG kezelés, ill. a recidiva mentes túlélés között.

Jelen tanulmányban a high grade UCC tumorokban fokozott Claudin-4 expressiót észleltünk. A fokozott Claudin-4 expressio high grade tumorokban messenger RNS, ill. fehérje szinten is kimutathatónak bizonyult, de a low grade UCC-k esetén is rövidebb recidiva mentes túléléssel társult. A Clostridium perfringens enterotoxinja Claudin-3, ill. -4-en keresztül, mint receptoron keresztül hat a sejtekre (206). Hatására a carcinoma sejtvonalakon dózisfüggő cytolysis jön létre (207), melyet állatkísérletekben is sikerült kimutatni (208). In vivo állatkísérletben Claudin-4 positiv daganatsejtek metastasis-képzését sikerült meggátolni egy cytotoxicus fúziós fehérjével (206-210). Ovarium eredetű carcinomákban a Claudin-3, ill. -4 fokozottan mutatható ki (132). Xenograft egerekkel végzett kísérletekben a Clostridium perfringens a daganat progressiojára gátló hatással volt (208).

Pancreas carcinomákban a Claudin-4 expressio emelkedettnek bizonyult (128). Hasonló eredményeket egyéb gastrointestinalis szervek tumoraiban is kimutattak (177, 211). E daganatok kezelésében szintén dózisfüggő cytotoxicus hatás mutatkozott Clostridium perfringens enterotoxin hatására (207, 208). Fentiek alapján ennek urothel sejtes carcinomák esetén is komoly jelentősége lehet.

Saját vizsgálatainkban is fény derült a különböző claudinok expressiós mintázatának különbségére. Ezen eredmények is igazolni látszanak azt a feltételezést, hogy a daganatos progresszió során a sejtkapcsoló struktúrák megváltoznak. Az expressio változása azonban a különböző stádiumokban más és más. A legsignificansabb eltérést Claudin-4 esetében észleltük, mely a high grade tumorokban konzisztensen fokozott emelkedést mutatott. Emellett azonban a Claudin-7 expressiónak csökkenését is észleltük. A Claudin-4 esetében messenger RNS szinten is sikerült igazolni az expressio emelkedését. Bár a Claudin-7 esetében messenger RNS szinten is csökkent expressiót észleltünk, a low grade, ill. high grade csoportok között significans eltérés nem mutatkozott. Erre magyarázatot adhat az, hogy posttranslatiós szinten

különbség van a claudin expressióban, ill. micro RNS-ek is szerepet játszanak a szabályozásban.

A Claudin-4 expressio fokozódását mutatták ki prostata carcinoma magas (113, 131) stádiumú eseteiben, valamint kedvezőtlenebb prognosissal járó RCC esetekben is (118). Jelen vizsgálatban észlelt fokozott claudin expressióval ellentétben Boireau és mtsai az alacsonyan differencialt UCC-ben a Claudin-4 expressio csökkenését észlelték.

Munkájukban a Claudin-4 expressio fokozódása a magasan differentialt, nem-invasiv UCC-kben jelent meg (188). Az ő vizsgálataikban azonban az összehasonlítás nem a különböző differencialtságú daganatos minták között történt, hanem valamennyi tumor átlagos claudin expressióját viszonyították a daganat melletti, morphologiailag ép hámhoz. E vizsgálatok eredményének különbsége tehát valószínűleg abban rejlik, hogy nem „valódi" ép hámot hasonlítottak össze a daganatban észlelt expressióval - hiszen a daganatok környékén jelen lévő, morphologiailag tumormentes hámban már olyan genetikai eltérések mutatkozhatnak, melyek ugyan morphologiai eltérésekkel még nem járnak, azonban genetikai változás már megtörténhetett. Mindez a claudin-expressiós mintázatban (fokozódásban ill. csökkenésben) is megnyilvánulhat.

Vizsgálataink szerint egyéb claudinok: 3, 5, 10 vélhetően nem vesznek részt a carcinogenesisben – az UCC előrehaladott állapotainak kialakításában, ill. fenntartásában.

A claudinok bizonyos típusai tehát az urothelsejtes carcinomákban jellegzetes expressiós változáson mehetnek keresztül, melynek segítségével a különböző szövettani típusok könnyebben elkülöníthetőek. Emellett prognosticai faktorként is használhatóak a jövőben. A claudinok használata mellett a hagyományos szövettani vizsgálat nem kerülhető el, azonban segítségükkel a mai napig subjectiv osztályozás könnyebben kivitelezhető nehéz esetekben.

6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, KÖVETKEZTETÉSEK

1. A korábbiakban megállapítottakkal ellentétben az urothelialis sejtes daganatok esetében nincs összefüggés a tumorsejtek E-cadherin expressiója, ill. a daganat grade-je, stádiuma, valamint a betegség túlélési mutatói között.

2. Bár a Claudin-4, a Claudin-7, ill. a Ki67 eltérések statisztikailag significansak low ill. high grade urothelialis carcinomák esetén, (low grade UCC-ban a Ki67, ill. a Claudin-4 expressio alacsonyabb, a Claudin-7 magasabb a high grade UCC-ban kimutathatónál), az eltérések mértéke alapján ezen markerek napi rutinban való alkalmazhatósága kérdéses.

3. Amennyiben a Claudin-4 expressio low grade UCC-ben emelkedett, megfelelő statisztikai analysist választva rövidebb recidivamentes túlélési adatok várhatóak, azonban a továbbiakban ezt nagyobb beteganyagon kell megvizsgálni annak megállapítására, hogy a napi rutinban is alkalmazható-e.

4. Amennyiben a morphologiai kép alapján felmerül az IP jelenlétének gyanúja, a Claudin-1 expressio vizsgálata segíthet a pontos diagnózis megállapításában.

5. A Claudin-4 localisatiója segíthet az urothelialis papilloma diagnózisának megállapításában.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az urothelsejtes carcinoma (UCC) világszerte növekvő előfordulású daganat. Korai felfedezése, a grade, ill. a stage korrekt meghatározása a megfelelő therapia megválasztása miatt is döntő jelentőségű. E mellett prognosticai markerek vizsgálatára is szükség van, ugyanis hasonló szövettani jellegzetességek mellett eltérő klinikai lefolyású esetek lehetségesek.

Az E-cadherin a Ca-függő sejtadhéziós molekula család tagja, mely a homotípiás sejtkapcsolatok kialakításáért felelős. A hámsejtek felszínén található, az ún. zonula adherens alkotóeleme. Egyes szerzők alacsony expressioját alacsony daganat-differenciatióval, ill. fokozott progressióval hozzák összefüggésbe.

Az E-cadherint immunhistochemiai (IH) reakciókkal vizsgáltuk, kerestük az összefüggést az IH reactió erőssége, ill. a daganat grade-stage, ill. prognózisa között.

Vizsgálatainkban az E-cadherin immunhistochemiai kimutatása alapján a korábbiakban megállapítottakkal ellentétben nincs összefüggés az UCC-k grade-je, stage-je, ill. a betegségmentes túlélés tekintetében.

További vizsgálatainkban UCC esetekben a claudinok expressiós mintázatával foglalkoztunk. A claudinokat már számos egyéb szerv tumoraiban kutatták, különböző munkacsoportok egymással ellentétes eredményre jutottak. Jelen vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy high grade UCC-kben a Claudin-4 fokozottan expressalódik, míg a Claudin-7 kimutathatósága csökken a low grade UCC-kkel összevetve. Emellett saját vizsgálatainkban is igazoltuk a nemzetközi irodalomban már ismert tényt, mely szerint a Ki67 expressio fokozódása észlelhető high grade tumorokban.

A Claudinok prognosissal való összefüggését a következőkben állapítottuk meg: a Claudin-4 expressio fokozódása, ill. a Claudin 1, valamint a Claudin-7 expressio csökkenése rövidebb recidivamentes túléléssel jár. Valamennyi, a claudinok vizsgálatával kapcsolatos eredmény összevetése alapján mindezek közül a Claudin-4 fokozott expressioja lehet figyelemre méltó, de nagyobb beteganyag vizsgálata szükséges e potenciális prognosticai marker megbízhatóságának megerősítéséhez.

A nem-invasiv UCC-khez képest invertalt papillomákban emelkedett Claudin-1 expressiót is kimutattunk. E marker kérdéses esetekben a positivitás erőssége, ill.

basalis sejtes localisatiója alapján segítheti az urothelialis papilloma diagnózisának megállapítását.

Ehhez hasonlóan a Claudin-4 felszínes localisatiója alapján könnyebbé teszi a sűrű szövésű papillomákban a sejtek orientációjának megállapítását, így a papilloma rétegeinek meghatározását, ezzel adott esetben a papilloma diagnózisának meghozatalát.

Fenti következtetések a jövőben remélhetőleg a diagnosztikus munka, ill. a prognosis meghatározásának - egyben a megfelelő módon alkalmazott, hatékony therapia - segítségére lesznek.

8. SUMMARY

The incidence of urothelial cell carcinoma (UCC) worldwide increases. Early and correct histological diagnosis, grading and staging are indispenseble for appropriate treatment. There is a need for finding of prognostic markers as well, since the clinical course of patients having tumors showing similar histological features might show basic difference.

E-cadherin is a member of Ca-dependent cell surface protein family, which plays important role in homotypic cellular communication. It can be found on the cellular surface, making part of the zonula adherens. According to certain authors it's loss is associated with tumor progression and poor differentiation.

We investigated urothelial carcinoma cases with E-cadherin immunohistochemistry and -as opposed to previous statements-, we found no association between low or no E-cadherin expression of the tumor cells with stage, grade, or overall survival in our cases.

In our study, we examined the expression of claudins in urothelial cell tumors. Claudins have already been examined in the tumors of other organs. Different groups found different results. In the present study we found that the expression of Claudin-4 is higher , and Claudin-7 is lower in high grade UCC-s compared to low grade UCC-s. We found the same results as in the literature concerning Ki67; the higher grade the tumor is, the higher is the expression rate of Ki67. Claudin-1 expression is higher in inverted papillomas than in non-invasive UCC-s. The basal localisation of Claudin-4 can help in difficult cases in the diagnosis of urothelial papillomas. Concerning claudin expression and prognosis, the following statements can be drawn: the higher the Claudin-4, and the lower the Claudin-7 expression of urothelial carcinomas, the shorter is the disease-free survival.

Hopefully these findings might help in the future both in the diagnosis of different urothelial tumors, and estimating the prognosis – and the selection of the proper treatment - of the patient.

Irodalomjegyzék

1. Geczi L. (2007) Az invasiv húgyhólyagdaganatok korszerû kemoterápiás kezelése. Magy Onkol, 51(2):1 33-8.
2. Pelucchi C, La Vecchia C. (2009) Alcohol, coffee, and bladder cancer risk: a review of epidemiological studies. Eur J Cancer Prev, 18(1): 62-8.
3. Golijanin DJ, Kakiashvili D, Madeb RR, Messing EM, Lerner SP. (2006) Chemoprevention of bladder cancer. World J Urol, 24(5): 445-72.
4. Riesz P. (2009) Új diagnosztikai és prognosticai vizsgálatok a húgyhólyag rosszindulatú daganatain. Semmelweis Egyetem, Doktori értekezés.
5. Daneshmand S, Becker T. (2012) Epidemiology and etiology of urothelial (transitional cell) carcinoma of the bladder. [cited; Available from: http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-etiology-of-urothelial-transitional-cell-carcinoma-of-the-bladder
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer, 94(2): 153-6.
7. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol;18(3): 581-92.
8. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. (2010) Bladder cancer in 2010: how far have we come? CA Cancer J Clin , 60(4): 244-72.
9. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jockel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P. (2000) Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. Int J Cancer, 86(2): 289-94.
10. Delclos GL, Lerner SP. (2008) Occupational risk factors. Scand J Urol Nephrol Suppl (218): 58-63.
11. Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, Lieberman R, Belldegrun AS, Pantuck AJ. (2006) Prevention of bladder cancer: a review. Eur Urol, 49(2): 226-34.

12. Sandhu JS, Vickers AJ, Bochner B, Donat SM, Herr HW, Dalbagni G. (2006) Clinical characteristics of bladder cancer in patients previously treated with radiation for prostate cancer. BJU Int, 98(1): 59-62.
13. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. (2006) Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. Nat Clin Pract Urol, 3(6): 327-40.
14. Woolcott CG, Maskarinec G, Haiman CA, Henderson BE, Kolonel LN. (2011) Diabetes and urothelial cancer risk: the Multiethnic Cohort study. Cancer Epidemiol, 35(6): 551-4.
15. Shokeir AA. (2004) Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment. BJU Int, 93(2): 216-20.
16. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, Rimm EB, Curhan GC, Willett WC, Giovannucci EL. (1999) Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. N Engl J Med, 340(18): 1390-7.
17. Wakui M, Shiigai T. (2000) Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cell volume distribution. Int J Urol, 7(7): 248-53.
18. Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. (2005) Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol, 288(6): C1231-41.
19. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Bohle A, Palou-Redorta J, Roupret M. (2011) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. Eur Urol, 59(6): 997-1008.
20. Herr HW, Dotan Z, Donat SM, Bajorin DF. (2007) Defining optimal therapy for muscle invasive bladder cancer. J Urol, 177(2): 437-43.
21. 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.
22. Bostwick DG, Cheng L. Urologic Surgical Pathology (Second Edition): Mosby; 2008.

23. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs: WHO Press; 2004.
24. Kunze E, Schauer A, Schmitt M. (1983) Histology and histogenesis of two different types of inverted urothelial papillomas. Cancer,51(2): 348-58.
25. Anderstrom C, Johansson S, Pettersson S. (1982) Inverted papilloma of the urinary tract. J Urol, 127(6): 1132-4.
26. Gould VE, Schmitt M, Vinokurova S, Reddy VB, Bitterman P, Alonso A, Gattuso P. (2010) Human papillomavirus and p16 expression in inverted papillomas of the urinary bladder. Cancer Lett,292(2): 171-5.
27. 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.
28. Witjes JA, van Balken MR, van de Kaa CA. (1997) The prognostic value of a primary inverted papilloma of the urinary tract. J Urol, 158(4): 1500-5.
29. Potts IF, Hirst E. (1963) Inverted Papilloma of the Bladder. J Urol,90: 175-9.
30. 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.
31. 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]. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi,83(12): 2037-43.
32. Castillo O, Hoyos J, Vitagliano G, Arellano L. (2006) [Inverted papilloma of the bladder]. Arch Esp Urol, 59(7): 691-5.
33. Marquez Moreno AJ, Julve Villalta E, Alonso Dorrego JM, Rubio Garrido FJ, Blanes Berenguel A, Matilla Vicente A. (2001) [Multiple bladder inverted papillomas]. Arch Esp Urol, 54(7): 692-4.
34. Geisler CH, Mori K, Leiter E.(1980) Lobulated inverted papilloma of the ureter. J Urol, 123(2): 270-1.
35. Kisbenedek L, Hidvégi J, Romics I. (1984) A húgyútrendszer inverz papillómáiról. Urol Nephrol Szle, 11: 133-4.

36. Szapanidisz J, Vadász G, Kovács A, Szolnoki G, Árpási G. (2003) A húgyhólyag invertált papillomájáról négy eset kapcsán. Magyar Urológia, 15(1): 34-7.
37. Riesz P, Székely E, Majoros A, Romics I. (2005) Invertált papilloma húgyhólyagban. Uroonkológia, 2(3): 86-8.
38. Sung MT, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, Cheng L. (2006) Natural history of urothelial inverted papilloma. Cancer, 107(11): 2622-7.
39. Cheng L, Leibovich BC, Cheville JC, Ramnani DM, Sebo TJ, Nehra A, Malek RS, Zincke H, Bostwick DG. (2000) Squamous papilloma of the urinary tract is unrelated to condyloma acuminata. Cancer, 88(7): 1679-86.
40. Nakazaki N, Zaitsu M, Mikami K, Yui S, Kanatani A, Nakatani T, Ito A, Takeshima Y, Tonooka A, Oka H, Miki T, Takeuchi T. (2012) Coincidence of HPV11-Positive Urethral Condyloma Acuminatum and HPV-Negative Multiple Bladder Papillomas in a Female. Case Report Med, 2012: 602819.
41. Isfoss BL, Majak B, Busch C, Braathen GJ. (2011) Simplification of grading papillary urothelial neoplasia using a reduced set of diagnostic features. Anal Quant Cytol Histol 33(2): 68-74.
42. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA. (2011) Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines. Eur Urol, 59(6): 1009-18.
43. Roupret M, Zigeuner R, Palou J, Boehle A, Kaasinen E, Sylvester R, Babjuk M, Oosterlinck W. (2011) [European guidelines for the diagnosis and management of upper urinary tract urothelial cell carcinomas: 2011 update. European Association of Urology Guideline Group for urothelial cell carcinoma of the upper urinary tract]. Actas Urol Esp, 36(1): 2-14.
44. Svatek RS, Shariat SF, Novara G, Skinner EC, Fradet Y, Bastian PJ, Kamat AM, Kassouf W, Karakiewicz PI, Fritsche HM, Izawa JI, Tilki D, Ficarra V, Volkmer BG, Isbarn H, Dinney CP. (2011) Discrepancy between clinical and pathological stage: external validation of the impact on prognosis in an international radical cystectomy cohort. BJU Int, 107(6): 898-904.
45. May M, Bastian PJ, Brookman-May S, Burger M, Bolenz C, Trojan L, Michel MS, Herrmann E, Wulfing C, Tiemann A, Muller SC, Ellinger J, Buchner A, Stief CG, Tilki D, Wieland WF, Gilfrich C, Hofner T, Hohenfellner M, Haferkamp A,

Roigas J, Zacharias M, Gunia S, Fritsche HM. (2011) Pathological upstaging detected in radical cystectomy procedures is associated with a significantly worse tumour-specific survival rate for patients with clinical T1 urothelial carcinoma of the urinary bladder. Scand J Urol Nephrol, 45(4): 251-7.

46. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. 81994) Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. N Engl J Med, 331(19): 1259-64.
47. Lee R, Droller MJ. (2000) The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. Urol Clin North Am, 27(1): 1-13, vii.
48. Kiemeney LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM. 81993) Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. J Urol, 150(1): 60-4.
49. Pajor G, Sule N, Alpar D, Kajtar 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.
50. 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.
51. Robinson VL, Porter M, Messing E, Fradet Y, Kamat AM, Lotan Y. (2010) BCAN Think Tank session 2: Molecular detection of bladder cancer: the path to progress. Urol Oncol, 28(3): 334-7.
52. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TR, N'Dow J, Nabi G, Cook J, Vale L. (2010) Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. Health Technol Assess, 14(4): 1-331, iii-iv.
53. Chu PG, Weiss LM. (2002) Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. Mod Pathol, 15(1): 6-10.
54. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. (2008) Transmembrane proteins of tight junctions. Biochim Biophys Acta, 1778(3): 588-600.

55. 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(1): 11-20.
56. Shariat SF, Chade DC, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Isbarn H, Fradet Y, Bastian PJ, Nielsen ME, Capitanio U, Jeldres C, Montorsi F, Lerner SP, Sagalowsky AI, Cote RJ, Lotan Y. (2010) Combination of multiple molecular markers can improve prognostication in patients with locally advanced and lymph node positive bladder cancer. J Urol, 183(1): 68-75.
57. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M. (1997) Charytonowicz E, Hu SX, Xu HJ, Reuter VE, Benedict WF. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. Cancer Res, 57(7): 1217-21.
58. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG, Benedict WF. (1998) Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. Cancer Res, 58(6): 1090-4.
59. Van Der Meijden A, Sylvester R, Collette L, Bono A, Ten Kate F. (2000) The role and impact of pathology review on stage and grade assessment of stages Ta and T1 bladder tumors: a combined analysis of 5 European Organization for Research and Treatment of Cancer Trials. J Urol, 164(5): 1533-7.
60. Rotterud R, Nesland JM, Berner A, Fossa SD. (2005) Expression of the epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. BJU Int, 95(9): 1344-50.
61. Villares GJ, Zigler M, Blehm K, Bogdan C, McConkey D, Colin D, Bar-Eli M. (2007) Targeting EGFR in bladder cancer. World J Urol, 25(6): 573-9.
62. Chaux A, Cohen JS, Schultz L, Albadine R, Jadallah S, Murphy KM, Sharma R, Schoenberg MP, Netto GJ. (2012) High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. Hum Pathol,

63. Junker K, van Oers JM, Zwarthoff EC, Kania I, Schubert J, Hartmann A. (2008) Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder tumors correlate with low frequency of chromosome alterations. Neoplasia, 10(1): 1-7.
64. Lindgren D, Liedberg F, Andersson A, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Mansson W, Fioretos T, Hoglund M. (2006) Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. Oncogene, 25(18): 2685-96.
65. Zieger K, Dyrskjot L, Wiuf C, Jensen JL, Andersen CL, Jensen KM, Orntoft TF. ((2005) Role of activating fibroblast growth factor receptor 3 mutations in the development of bladder tumors. Clin Cancer Res, 11(21): 7709-19.
66. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. (2007) FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. J Pathol, 213(1): 91-8.
67. Barbisan F, Santinelli A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, van der Kwast T, Montironi R. (2008) Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. Cancer, 112(3): 636-44.
68. Mhawech-Fauceglia P, Cheney RT, Fischer G, Beck A, Herrmann FR. (2006) FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer. Eur J Surg Oncol, 32(2): 231-7.
69. Miyake M, Sugano K, Kawashima K, Ichikawa H, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto K, Hirao Y. (2007) Sensitive detection of FGFR3 mutations in bladder cancer and urine sediments by peptide nucleic acid-mediated real-time PCR clamping. Biochem Biophys Res Commun, 362(4): 865-71.
70. Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto K, Hirao Y. (2010) Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. Cancer Sci, 101(1): 250-8.

71. 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(10): 1823-9.
72. Garcia-Closas M, Malats N, Real FX, Yeager M, Welch R, Silverman D, Kogevinas M, Dosemeci M, Figueroa J, Chatterjee N, Tardon A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Murta-Nascimento C, Rothman N, Chanock SJ. (2007) Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk. PLoS Genet, 3(2): e29.
73. Vrooman OP, Witjes JA. (2009) Molecular markers for detection, surveillance and prognostication of bladder cancer. Int J Urol, 16(3): 234-43.
74. Youssef RF, Mitra AP, Bartsch G, Jr., Jones PA, Skinner DG, Cote RJ. (2009) Molecular targets and targeted therapies in bladder cancer management. World J Urol, 27(1): 9-20.
75. Sakamoto S, Ryan AJ, Kyprianou N. (2008) Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance. J Cell Biochem, 103(3): 691-708.
76. Millar EK, Graham PH, McNeil CM, Browne L, O'Toole SA, Boulghourjian A, Kearsley JH, Papadatos G, Delaney G, Fox C, Nasser E, Capp A, Sutherland RL. (2011) Prediction of outcome of early ER+ breast cancer is improved using a biomarker panel, which includes Ki-67 and p53. Br J Cancer, 105(2): 272-80.
77. Wolf HK, Stober C, Hohenfellner R, Leissner J. (2001) Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas. Tumour Biol, 22(5): 328-36.
78. Dalbagni G, Parekh DJ, Ben-Porat L, Potenzoni M, Herr HW, Reuter VE. (2007) Prospective evaluation of p53 as a prognostic marker in T1 transitional cell carcinoma of the bladder. BJU Int, 99(2): 281-5.
79. Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Roberta Girardi L, Baroni G, Dal Canto M. (2007) Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer. J Surg Res, 143(2): 422-7.
80. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Konstantinidou AE, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Davaris P. (2000) Cell cycle regulators in bladder cancer: a

multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. Hum Pathol, 31(6): 751-60.

81. Lacoste-Collin L, Gomez-Brouchet A, Escourrou G, Delisle MB, Levade T, Uro-Coste E. (2002) Expression of p27(Kip1) in bladder cancers: immunohistochemical study and prognostic value in a series of 95 cases. Cancer Lett, 186(1): 115-20.
82. Rabbani F, Koppie TM, Charytonowicz E, Drobnjak M, Bochner BH, Cordon-Cardo C. (2007) Prognostic significance of p27Kip1 expression in bladder cancer. BJU Int, 100(2): 259-63.
83. Mitra AP, Birkhahn M, Cote RJ. (2007) p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. World J Urol, 25(6): 563-71.
84. Mudryj M, Reay E, Beckett L, Dandekar S, deVere White R, Gandour-Edwards R. (2007) Novel p53/p130 axis in bladder tumors. Urology, 70(3): 608-12.
85. Hitchings AW, Kumar M, Jordan S, Nargund V, Martin J, Berney DM. (2004) Prediction of progression in pTa and pT1 bladder carcinomas with p53, p16 and pRb. Br J Cancer, 91(3): 552-7.
86. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, Lameiras CR, Lopes P, Bento MJ, Oliveira J, Criado B, Lopes CS. (2003) Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. Eur J Surg Oncol, 29(1): 74-80.
87. Margulis V, Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. (2006) Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. Clin Cancer Res, 12(24): 7369-73.
88. Margulis V, Shariat SF, Ashfaq R, Thompson M, Sagalowsky AI, Hsieh JT, Lotan Y. (2007) Expression of cyclooxygenase-2 in normal urothelium, and superficial and advanced transitional cell carcinoma of bladder. J Urol, 177(3): 1163-8.
89. Menke TB, Boettcher K, Kruger S, Kausch I, Boehle A, Sczakiel G, Warnecke JM. (2004) Ki-67 protein concentrations in urothelial bladder carcinomas are related to Ki-67-specific RNA concentrations in urine. Clin Chem, 50(8): 1461-3.
90. Shariat SF, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Lerner SP, Palapattu GS, Cote RJ, Sagalowsky AI, Lotan Y. (2008) Multiple biomarkers improve prediction of

bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy. Cancer, 112(2): 315-25.

91. Gonul, II, Akyurek N, Dursun A, Kupeli B. (2008) Relationship of Ki67, TP53, MDM-2 and BCL-2 expressions with WHO 1973 and WHO/ISUP grades, tumor category and overall patient survival in urothelial tumors of the bladder. Pathol Res Pract , 204(10): 707-17.
92. Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Farinas S, Lopez-Guerrero JA, Rubio J, Solsona E, Romanenko AM, Vozianov AF, Pellin A, Llombart-Bosch A. (2006) Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. Eur Urol, 50(3): 506-15; discussion 15.
93. Comperat E, Camparo P, Haus R, Chartier-Kastler E, Radenen B, Richard F, Capron F, Paradis V. (2007) Aurora-A/STK-15 is a predictive factor for recurrent behaviour in non-invasive bladder carcinoma: a study of 128 cases of non-invasive neoplasms. Virchows Arch, 450(4): 419-24.
94. Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, Jiang F, Johnston D, Grossman HB, Ruifrok AC, Katz RL, Brinkley W, Czerniak B. (2002) Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. J Natl Cancer Inst, 94(17): 1320-9.
95. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. (2007) Survivin: a promising tumor biomarker. Cancer Lett, 249(1): 49-60.
96. Shariat SF, Karakiewicz PI, Godoy G, Karam JA, Ashfaq R, Fradet Y, Isbarn H, Montorsi F, Jeldres C, Bastian PJ, Nielsen ME, Muller SC, Sagalowsky AI, Lotan Y. (2009) Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study. Clin Cancer Res, 15(22): 7012-9.
97. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, Bajorin DF, Reuter VE, Herr H, Old LJ, Sato E. (2007) CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A , 104(10): 3967-72.
98. Williamson SR, Zhang S, Lopez-Beltran A, Shah RB, Montironi R, Tan PH, Wang M, Baldridge LA, MacLennan GT, Cheng L. (2011) Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. Am J Surg Pathol, 35(4): 474-83.

99. Hilmy M, Campbell R, Bartlett JM, McNicol AM, Underwood MA, McMillan DC. (2006) The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic infiltration and COX-2 expression and survival in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Br J Cancer, 95(9): 1234-8.
100. Moussa M, Omran Z, Nosseir M, Lotfy A, Swellam T. (2009) Cyclooxygenase-2 expression on urothelial and inflammatory cells of cystoscopic biopsies and urine cytology as a possible predictive marker for bladder carcinoma. APMIS, 117(1): 45-52.
101. Wadhwa P, Goswami AK, Joshi K, Sharma SK. (2005) Cyclooxygenase-2 expression increases with the stage and grade in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Int Urol Nephrol, 37(1): 47-53.
102. Gee J, Lee IL, Jendiroba D, Fischer SM, Grossman HB, Sabichi AL. (2006) Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer. Oncol Rep, 15(2): 471-7.
103. 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(14): 3241-5.
104. Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, Hinke A, Schipper J, Rubben 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): 3120-3.
105. Szekely E, Torok V, Szekely T, Riesz P, Romics I. (2006) E-cadherin expression in transitional cell carcinomas. Pathol Oncol Res, 12(2): 73-7.
106. 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 U S A, 96(2): 511-6.
107. Steed E, Balda MS, Matter K. (2010) Dynamics and functions of tight junctions. Trends Cell Biol, 20(3): 142-9.
108. Balda MS, Matter K. (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. Biochim Biophys Acta, 1788(4): 761-7.

109. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol, 2(4): 285-93.
110. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. FEBS Lett, 585(4): 606-12.
111. Lal-Nag M, Morin PJ. (2009) The claudins. Genome Biol, 10(8): 235.
112. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. (2003) Tight junction proteins. Prog Biophys Mol Biol, 81(1): 1-44.
113. Landers KA, Samaratunga H, Teng L, Buck M, Burger MJ, Scells B, Lavin MF, Gardiner RA. (2008) Identification of claudin-4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer. Br J Cancer, 99(3): 491-501.
114. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. (2002) Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol, 283(1): C142-7.
115. 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(1): 455-61.
116. Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. (2002) The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. J Biol Chem, 277(30): 27501-9.
117. 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(6): 1351-63.
118. Lechpammer M, Resnick MB, Sabo E, Yakirevich E, Greaves WO, Sciandra KT, Tavares R, Noble LC, DeLellis RA, Wang LJ. (2008) The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. Mod Pathol, 21(11): 1320-9.
119. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CLDN7ID40099ch17p13.html. [cited; Available from: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CLDN7ID40099ch17p13.html

120. 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.
121. Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, Szabo Z, Kupcsulik P, Paska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. (2005) Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. Virchows Arch, 447(6): 961-8.
122. Nemeth J, Nemeth Z, Tatrai P, Peter I, Somoracz A, Szasz AM, Kiss A, Schaff Z. (2010) High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. Pathol Oncol Res, 16(1): 19-27.
123. Halasz J, Holczbauer A, Paska C, Kovacs M, Benyo G, Verebely T, Schaff Z, Kiss A. (2006) Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. Hum Pathol, 37(5): 555-61.
124. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatziioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature, 446(7137): 801-5.
125. Ersoz S, Mungan S, Cobanoglu U, Turgutalp H, Ozoran Y. (2011) Prognostic importance of Claudin-1 and Claudin-4 expression in colon carcinomas. Pathol Res Pract, 207(5): 285-9.
126. Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, Tauc M, Gonzalez-Mariscal L. (2006) The renal segmental distribution of claudins changes with development. Kidney Int, 62(2): 476-87.
127. 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(2): 77-80.
128. Borka K, Kaliszky P, Szabo E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. Virchows Arch, 450(5): 549-57.
129. 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(1): 195-204.

130. 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(6): 1099-111.
131. Szasz AM, Nyirady P, Majoros A, Szendroi A, Szucs M, Szekely E, Tokes AM, Romics I, Kulka J. (2010) beta-catenin expression and claudin expression pattern as prognostic factors of prostatic cancer progression. BJU Int, 105(5): 716-22.
132. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. (2005) Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. Cancer Res, 65(16): 7378-85.
133. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. (2003) Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. Oncogene, 22(13): 2021-33.
134. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. Breast Cancer Res, 7(2): R296-305.
135. Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, Tokes AM. (2009) Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. Pathol Oncol Res, 15(1): 59-64.
136. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, Jirstrom K, Landberg G, Martin F, Duffy MJ, Gallagher WM. (2009) Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. Int J Cancer, 124(9): 2088-97.
137. Ohtani S, Terashima M, Satoh J, Soeta N, Saze Z, Kashimura S, Ohsuka F, Hoshino Y, Kogure M, Gotoh M. (2009) Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival. Gastric Cancer, 12(1): 43-51.
138. Hsueh C, Chang YS, Tseng NM, Liao CT, Hsueh S, Chang JH, Wu IC, Chang KP. (2010) Expression pattern and prognostic significance of claudins 1, 4, and 7 in nasopharyngeal carcinoma. Hum Pathol, 41(7): 944-50.

139. Lodi C, Szabo E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szijarto A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyes G, Kiss A, Schaff Z. (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. Mod Pathol, 19(3): 460-9.
140. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. J Cell Biol, 147(1): 185-94.
141. Kniesel U, Wolburg H. (2000) Tight junctions of the blood-brain barrier. Cell Mol Neurobiol, 20(1): 57-76.
142. Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T. (2011) Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. Cell Tissue Res, 343(3): 637-48.
143. Paschoud S, Bongiovanni M, Pache JC, Citi S. (2007) Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas. Mod Pathol, 20(9): 947-54.
144. Soini Y. (2005) Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. Histopathology, 46(5): 551-60.
145. Bornholdt J, Friis S, Godiksen S, Poulsen SS, Santoni-Rugiu E, Bisgaard HC, Lothe IM, Ikdahl T, Tveit KM, Johnson E, Kure EH, Vogel LK. (2011) The level of claudin-7 is reduced as an early event in colorectal carcinogenesis. BMC Cancer, 11: 65.
146. Lourenco SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, de Carvalho AC, Lessa RC, Pereira CM, Vettore AL, Carvalho AL, Fregnani JH, Kowalski LP, Soares FA. (2010) Claudin-7 down-regulation is an important feature in oral squamous cell carcinoma. Histopathology, 57(5): 689-98.
147. Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Ross JS. (2007) Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. Hum Pathol, 38(4): 564-9.
148. Sobel G, Szabo I, Paska C, Kiss A, Kovalszky I, Kadar A, Paulin F, Schaff Z. (2005) Changes of cell adhesion and extracellular matrix (ECM) components in cervical intraepithelial neoplasia. Pathol Oncol Res, 11(1): 26-31.
149. Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E. (2007) Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. Prog Histochem Cytochem, 42(1): 1-57.

150. Nemeth Z, Szasz AM, Tatrai P, Nemeth J, Gyorffy H, Somoracz A, Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z. (2009) Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. J Histochem Cytochem, 57(2): 113-21.
151. Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S. (2005) Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 11(2 Pt 1): 551-6.
152. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. J Cell Sci,109 (Pt 9): 2287-98.
153. Forster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, Drenckhahn D. (1996) Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. J Physiol, 565(Pt 2): 475-86.
154. Yoshida T, Kondoh M, Yagi K. (2011) Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. Curr Med Chem, 18(8): 1239-44.
155. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol, 171(6): 939-45.
156. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Friedman TB. (2006) Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. Am J Hum Genet, 79(6): 1040-51.
157. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M. (2011) LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. J Cell Sci, 124(Pt 4): 548-55.
158. Korompay A, Borka K, Lotz G, Somoracz A, Torzsok P, Erdelyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Z, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. (2012) Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 60(6B): E76-86.
159. van Rhijn BW. (2012) Combining molecular and pathologic data to prognosticate non-muscle-invasive bladder cancer. Urol Oncol, 30(4): 518-23.

160. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Jakse G, Kuczyk MA, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA. (2010) [Update of the Clinical Guidelines of the European Association of Urology on muscle-invasive and metastatic bladder carcinoma]. Actas Urol Esp, 34(1): 51-62.
161. Torzsok P, Riesz P, Kenessey I, Szekely E, Somoracz A, Nyirady P, Romics I, Schaff Z, Lotz G, Kiss A. (2011) Claudins and ki-67: potential markers to differentiate low- and high-grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder. J Histochem Cytochem, 59(11): 1022-30.
162. Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. (2001) Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. Am J Clin Pathol, 116(6): 823-30.
163. 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(6): 1975-82.
164. Burger M, van der Aa MN, van Oers JM, Brinkmann A, van der Kwast TH, Steyerberg EC, Stoehr R, Kirkels WJ, Denzinger S, Wild PJ, Wieland WF, Hofstaedter F, Hartmann A, Zwarthoff EC. (2008) Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. Eur Urol, 54(4): 835-43.
165. Chen YB, Tu JJ, Kao J, Zhou XK, Chen YT. (2008) Survivin as a useful adjunct marker for the grading of papillary urothelial carcinoma. Arch Pathol Lab Med, 132(2): 224-31.
166. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J Cell Biol, 141(7): 1539-50.
167. Morrogh M, Andrade VP, Giri D, Sakr RA, Paik W, Qin LX, Arroyo CD, Brogi E, Morrow M, King TA. (2012) Cadherin-catenin complex dissociation in lobular neoplasia of the breast. Breast Cancer Res Treat, 132(2): 641-52.
168. Rosen PP. Rosen's Breast Pathology (Third Edition): Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

169. Koksal IT, Ozcan F, Kilicaslan I, Tefekli A. (2002) Expression of E-cadherin in prostate cancer in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: korreláción with pathological features. Pathology, 34(3): 233-8.
170. 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): 331-8.
171. Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. (2012) Negative/low HER2 expression alone or combined with E-cadherin positivity is predictive of better prognosis in patients with breast carcinoma. Histol Histopathol, 27(3): 377-85.
172. Guilford P, Humar B, Blair V. (2010) Hereditary diffuse gastric cancer: translation of CDH1 germline mutations into clinical practice. Gastric Cancer, 13(1): 1-10.
173. Mastoraki A, Danias N, Arkadopoulos N, Sakorafas G, Vasiliou P, Smyrniotis V. (2011) Prophylactic total gastrectomy for hereditary diffuse gastric cancer. Review of the literature. Surg Oncol, 20(4): e223-6.
174. Giroldi LA, Bringuier PP, Shimazui T, Jansen K, Schalken JA. Changes in cadherin-catenin complexes in the progression of human bladder carcinoma. Int J Cancer 1999;82(1):70-6.
175. Bringuier PP, Giroldi LA, Umbas R, Shimazui T, Schalken JA. (1999) Mechanisms associated with abnormal E-cadherin immunoreactivity in human bladder tumors. Int J Cancer, 83(5): 591-5.
176. 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.
177. Lin HH, Ke HL, Wu WJ, Lee YH, Chang LL. (2012) Hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, and RASSF1A genes in pathologically normal urothelium predict bladder recurrence of bladder cancer after transurethral resection. Urol Oncol, 30(2): 177-81.

178. Shi B, Laudon V, Yu S, Dong D, Zhu Y, Xu Z. (2008) E-cadherin tissue expression and urinary soluble forms of E-cadherin in patients with bladder transitional cell carcinoma. Urol Int, 81(3): 320-4.
179. Kashibuchi K, Tomita K, Schalken JA, Kume H, Takeuchi T, Kitamura T. (2007) The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin in bladder cancer patients who underwent radical cystectomy. Int J Urol, 14(9): 789-94.
180. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Hum Pathol, 36(2): 162-9.
181. Dhawan P, Ahmad R, Chaturvedi R, Smith JJ, Midha R, Mittal MK, Krishnan M, Chen X, Eschrich S, Yeatman TJ, Harris RC, Washington MK, Wilson KT, Beauchamp RD, Singh AB. (2011 Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. Oncogene, 30(29): 3234-47.
182. Kinugasa T, Huo Q, Higashi D, Shibaguchi H, Kuroki M, Tanaka T, Futami K, Yamashita Y, Hachimine K, Maekawa S, Nabeshima K, Iwasaki H. (2007) Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. Anticancer Res, 27(6A): 3729-34.
183. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. (2005) Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. Mod Pathol, 18(4): 511-8.
184. Kato-Nakano M, Suzuki M, Kawamoto S, Furuya A, Ohta S, Nakamura K, Ando H. (2010) Characterization and evaluation of the antitumour activity of a dual-targeting monoclonal antibody against claudin-3 and claudin-4. Anticancer Res, 30(11): 4555-62.
185. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y, Yagi K. (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. Mol Pharmacol,76(4): 918-26.
186. Huang GW, Ding X, Chen SL, Zeng L. (2011) Expression of claudin 10 protein in hepatocellular carcinoma: impact on survival. J Cancer Res Clin Oncol, 137(8): 1213-8.

187. Nakanishi K, Ogata S, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kawai T. (2008) Expression of occludin and claudins 1, 3, 4, and 7 in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. Am J Clin Pathol, 130(1): 43-9.
188. 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.
189. Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, Hinley J, Trejdosiewicz LK, Southgate J. (2006) PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. J Cell Physiol, 208(2): 407-17.
190. Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. (2001) The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. Traffic, 2(2): 93-8.
191. Tsukita S, Furuse M. (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. J Cell Biol, 149(1): 13-6.
192. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. J Cell Sci, 115(Pt 24): 4969-76.
193. Thuijls G, Derikx JP, de Haan JJ, Grootjans J, de Bruine A, Masclee AA, Heineman E, Buurman WA. (2010) Urine-based detection of intestinal tight junction loss. J Clin Gastroenterol, 44(1): e14-9.
194. 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(2): 267-72.
195. Eiber M, van Oers JM, Zwarthoff EC, van der Kwast TH, Ulrich O, Helpap B, Stoerkel S, Blaszyk H, Cheville J, Sauter G, Wild PJ, Stoehr R, Hofstaedter F, Hartmann A. (2007) Low frequency of molecular changes and tumor recurrence in inverted papillomas of the urinary tract. Am J Surg Pathol, 31(6): 938-46.
196. Bello IO, Vilen ST, Niinimaa A, Kantola S, Soini Y, Salo T. (2008) Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. Hum Pathol, 39(8): 1212-20.

197. Lioni M, Brafford P, Andl C, Rustgi A, El-Deiry W, Herlyn M, Smalley KS. (2007) Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. Am J Pathol, 170(2): 709-21.
198. Dahiya N, Becker KG, Wood WH, 3rd, Zhang Y, Morin PJ. (2011) Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion. PLoS One, 6(7): e22119.
199. Higashi Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Nakamura T, Baba S, Reinecker HC, Nakamura S, Konno H. (2007) Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. J Surg Res, 139(1): 68-76.
200. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. (2001) Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. Cancer Res, 61(21): 7878-81.
201. Krajewska M, Olson AH, Mercola D, Reed JC, Krajewski S. (2007) Claudin-1 immunohistochemistry for distinguishing malignant from benign epithelial lesions of prostate. Prostate, 67(9): 907-10.
202. Huo Q, Kinugasa T, Wang L, Huang J, Zhao J, Shibaguchi H, Kuroki M, Tanaka T, Yamashita Y, Nabeshima K, Iwasaki H. (2009) Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. Anticancer Res, 29(3): 851-7.
203. Kakiashvili DM, van Rhijn BW, Trottier G, Jewett MA, Fleshner NE, Finelli A, Azuero J, Bangma CH, Vajpeyi R, Alkhateeb S, Hanna S, Kostynsky A, Kuk C, Van Der Kwast TH, Zlotta AR. (2011) Long-term follow-up of T1 high-grade bladder cancer after intravesical bacille Calmette-Guerin treatment. BJU Int, 107(4): 540-6.
204. May M, Brookman-Amissah S, Roigas J, Hartmann A, Storkel S, Kristiansen G, Gilfrich C, Borchardt R, Hoschke B, Kaufmann O, Gunia S. (2010) Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. Eur Urol, 57(5): 850-8.
205. Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, Hoeltl W, Calais Da Silva F, Powell PH, Prescott S, Kirkali Z, van de Beek C, Gorlia T, de Reijke TM. (2009) Long-term

efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guerin, and bacillus Calmette-Guerin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder. Eur Urol, 57(5): 766-73.

206. McClane BA, Hanna PC, Wnek AP. (1988) Clostridium perfringens enterotoxin. Microb Pathog, 4(5): 317-23.
207. 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(3): 678-84.
208. Santin AD, Cane S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorelli S. (2005) Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin. Cancer Res, 65(10): 4334-42.
209. Offner S, Hekele A, Teichmann U, Weinberger S, Gross S, Kufer P, Itin C, Baeuerle PA, Kohleisen B. (2005) Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy. Cancer Immunol Immunother, 54(5): 431-45.
210. 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 Biol Chem, 272(42): 26652-8.
211. Kwon MJ, Kim SH, Jeong HM, Jung HS, Kim SS, Lee JE, Gye MC, Erkin OC, Koh SS, Choi YL, Park CK, Shin YK. (2011) Claudin-4 overexpression is associated with epigenetic derepression in gastric carcinoma. Lab Invest, 91(11): 1652-67.
212. Székely E, Törzsök P, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Székely T, Lotz G, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Z, Kiss A. (2011) Expression of claudins and their prognostic significance in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. J Histochem Cytochem, 59(10): 932-41.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények: (IF: 6,691)

1. Törzsök P, Riesz P, Kenessey I, Székely E, Somorácz A, Nyirády P, Romics I, Schaff Z, Lotz G, Kiss A. (2011) Claudins and ki-67: potential markers to differentiate low- and high-grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder. J Histochem Cytochem, 59:1022-1030.
   IF: 2,725
2. Székely E, Törzsök P, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Székely T, Lotz G, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Z, Kiss A. (2011) Expression of claudins and their prognostic significance in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. J Histochem Cytochem, 59: 932-941.
   IF: 2,725
3. Székely E, Török V, Székely T, Riesz P, Romics I. (2006) E-cadherin expression in transitional cell carcinomas. Pathol Oncol Res, 12: 73-77.
   IF: 1,241
4. Riesz P, Székely E, Majoros A, Romics I. (2005) Invertált papilloma a húgyhólyagban. Uroonkológia 2: 86-88.

Az értekezés témájában megjelent idézhető absztraktok:

1. Törzsök P, Lotz G, Riesz P**,** Székely E, Somorácz Á, Romics I, Schaff Zs, Kiss A. (2009) Claudinok: a humán húgyhólyag low- és high-grade átmeneti sejtes karcinomái elkülönítésének potenciális markerei. Magy Onkol, 53: 133.
2. Riesz P**,** Majoros A, Szendrői A, Dombovári P**,** Székely E, Törzsök P, Romics I. (2009) Jóindulatú daganat-e a húgyhólyag invertált papilloma? Magy Urol, 21: 149.
3. Törzsök P, Székely E, Korompay A, Székely T, Riesz P, Majoros A, Szendrői A, Nyirády P, Romics I, Timár J, Schaff Zs, Kiss A. (2010) Claudin expresszió a humán húgyhólyag nem invazív daganataiban. Magy Urol, 22: 159.

Az értekezés témájában tartott előadások:

1. Törzsök P, Lotz G, Riesz P**,** Székely E, Somorácz Á, Romics I, Schaff Zs, Kiss A. (2010) Claudinok: a humán húgyhólyag low és high grade átmeneti sejtes karcinómáinak elkülönítésének potenciális markerei. (PhD Tudományos Napok 2010, Semmelweis Egyetem, Budapest, április 15-16, 2010)

2. Törzsök P, Lotz G, Riesz P, Székely E, Somorácz Á, Romics I, Schaff Zs, Kiss A. (2010) Claudinok: a humán húgyhólyag low és high grade átmeneti sejtes carcinomáinak elkülönítésének potenciális markerei. (40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, május 18-21, 2010)
3. Törzsök P**,** Székely E, Korompay A, Székely T, Riesz P, Majoros A, Szendrői A, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Zs, Kiss A. (2011) Claudin expresszió a humán húgyhólyag nem invazív daganataiban. (PhD Tudományos Napok 2011, Semmelweis Egyetem, Budapest, április 14-15, 2011)

Az értekezés témájában bemutatott poszterek:

1. Törzsök P, Lotz G, Riesz P, Székely E, Somorácz A, Romics I, Schaff Zs, Kiss A. (2009) Claudins: potential markers to differentiate low and high grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder (Magyar-Osztrák Patológus Kongresszus, október 1-3, 2009, Sopron) (angol nyelven)

2. Törzsök P, Székely E, Korompay A, Székely T, Riesz P, Majoros A, Szendrői A, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Zs, Kiss A. (2009) Claudin expresszió a humán húgyhólyag nem invazív daganataiban. (Magyar Patológus Kongresszus, szept. 30-okt.2, 2010, Siófok) (magyar nyelven)

Egyéb közlemények: (IF: 16,662)

Idegen nyelven:

1. Balla B, Kósa JP, Tobiás B, Halászlaki C, Takács I, Horváth H, Speer G, Nagy Z, Horányi J, Járay B, Székely E, Lakatos P. (2011) Marked increase in CYP24A1 gene expression in human papillary thyroid cancer. Thyroid, 21: 459-460. *Letter to the Editor*
2. Járay B, Székely E. (2011) Basic cytomorphology of pancreatic lesions: Mini Symposium: Non-gynaecological Cytology. Diagn Histopathol, 17:293-300.
3. Blázovics A, Nyírády P, Békó G, Székely E, Szilvás Á, Kovács-Nagy E, Horváth A, Szűcs M, Romics I, Sárdi É. (2011) Changes in erythrocyte transmethylation Ability are predictive factors for tumor prognosis in prostate cancer. Croatica Chem Acta, 84:127-131.
4. Szendröi A, Szendröi M, Szücs M, Székely E, Romics I. (2010) 11-year survival of a renal cell cancer patient following multiple metastasectomy. Can J Urol, 17: 5475-5477.

   IF: 0,822
5. Szász AM, Nyirády P, Majoros A, Szendrői A, Szűcs M, Székely E, Tőkés AM, Romics I, Kulka J. (2010) Beta-catenin expression and claudin expression pattern as prognostic factors of prostatic cancer progression. BJU Int, 105: 716-722

   IF: 3,19
6. Szendroi A, Majoros A, Székely E, Szucs M, Romics I. (2009) Mucoepidermoid lung tumor appearing as an abscess on the scrotum. Urol Int, 82: 122-124.

   IF: 0,902
7. Romics I, Székely E, Szendroi A. (2008) Signet-ring cell carcinoma arising from the urinary bladder. Can J Urol, 15: 4266-4268.
8. Farkas A, Istók R, Székely E, Glasz T, Kulka J. (2008) Pigmented papilloma carcinoma: a rare tumor of the male breast. Pathol Oncol Res, 14: 341-343.

   IF: 1,260

9. Romics I, Bánfi G, Székely E, Krenács T, Szende B. (2008) Expression p21(waf1/cip1), p27 (kip1), p63 and androgen receptor in low and high Gleason score prostate cancer. Pathol Oncol Res,14: 307-311.

IF: 1,260

10. Pusztai P, Sármán B, Illyés G**,** Székely E, Péter I, Boer K, Tihanyi T, Rácz K.(2006) Hypercalcitoninemia in a patient with a recurrent goitre and insulinoma: a case report. Exp Clin Endocrinol Diabetes,114: 217-221.

IF: 1,356

11. Fuszek P, Horvath HC, Speer G, Papp J, Haller P, Fischer S, Halasz J, Jaray B, Szekely E, Schaff Z, Papp A, Bursics A, Harsanyi L, Lukovich P, Kupcsulik P, Hitre E, Lakatos PL. (2006) Location and age at onset of colorectal cancer in Hungarian patients between 1993 and 2004. The high number of advanced cases supports the need for a colorectal cancer screening program in Hungary. Anticancer Res, 26: 527-531.

IF: 1,479

12. Szendrôi A, Rusz A, Székely E, Riesz P, Kelemen Z. (2003) Renal tumor causing haematuria and sepsis. Pathol Oncol Res, 9: 246-248.

13. Székely E. Hepatocellular carcinoma with lymphoid stroma: 'lymphoepithelioma-like carcinoma'? (2001) Histopathology, 39: 540. *Correspondence*

14. Szekely E. (2001) Lymphoepithelioma-like cholangiocarcinoma (LELC) not associated with Epstein-Barr virus. Am J Surg Pathol, 25: 1464-1466.

IF: 3,691

15. Buzás GM, Illyés G, Székely E, Széles I. (2001) Six regimens for the eradication of Helicobacter pylori (Hp) in duodenal ulcer patients: three consecutive trials (1995-1999). J Physiol Paris, 95: 437-441.

IF: 0,862

16. Szekely E, Schaff Z. (2001) Angiomyolipoma of the liver. Histopathology, 39: 213. *Correspondence*

17. Székely E, Madaras L, Kulka J, Járay B, Nagy L. (2001) Leiomyosarcoma of the female breast. Pathol Oncol Res, 7: 151-153.

18. Járay B, Székely E, Winternitz T, Tarján Z, Tihany TF. (2000) Pancreatic head mass. What can be done? Diagnosis: cytology. JOP,1(Suppl): 118-122.
19. Székely E, Kulka J, Miklós I, Kaliszky P. (2000) Leiomyosarcomas of great vessels. Pathol Oncol Res, 6: 233-236.
20. Székely E, Schaff Z, Madaras L, Kupcsulik P, Zsirka A. (2000) Trabecular angiomyolipoma mimicking hepatic cell carcinoma. Pathol Oncol Res, 6: 224-226.
21. Szekely E, Kulka J. (2000) Primary intimal type leiomyosarcoma with rhabdomyosarcomatous differentiation of the thoracic aorta. Virchows Arch, 437: 208-209.

IF: 1,84

Magyar nyelven:

1. Tóbiás B, Balla B, Kósa P J, Horányi J, Takács I, Bölöny E, Halászlaki C, Nagy Z, Speer G, Járay B**,** Székely E, Istók R, Lakatos P. (2011) Szomatikus onkogén mutációk összehasonlító vizsgálata egészséges és tumoros pajzsmirigyszövetmintákon. Orv Hetil, 152: 672-677.
2. Szűcs M, Telekes A, Nyírády P, Székely E, Romics I. (2010) Emlődaganat húgyhólyag-metasztázisa. Uroonkológia, 7: 10-13.
3. Riesz P, Székely E, Törzsök P, Majoros A, Szendrői A, Dombovári P, Romics I. (2010) Jóindulatú daganat-e a húgyhólyag invertált papillomája? Orv. Hetil 151: 92-95.
4. Kulka J, Tőkés AM, Tóth AI, Szász AM, Farkas A, Borka K, Járay B, Székely E, Istók R, Lotz G, Madaras L, Korompay A, Harsányi L, László Z, Rusz Z, Molnár BA, Molnár IA, Kenessey I, Szentmártoni G, Székely B, Dank M. (2009)

Az emlődaganatok primer szisztémás kemoterápiára adott válasza az immun-hisztokémiai fenotipus tükrében. Magy. Onkol, 53: 335-343.

5. Langmár Z, Harsányi L, Székely E, Járay B, Csömör S, Kazy Z. (2008) A rectrovaginalis sövény elsődleges adenocarcinomája az endometriosis egyidejű jelenléte nélkül. Orv Hetil, 149: 2251-2253

6. Szűcs M, Székely E, Mavrogenis S, Szendrői A, Romics I. (2008) Daganatmetasztázisok urológiai szervekben. Uroonkológia, 5: 34-41.
7. Szendrői A, Székely E, Romics I. (2008) Húgyhólyagból kiinduló pecsétgyűrűsejtes rák.Lege Artis Medicinae,18: 379-381.
8. Bánfi G, Glasz T, Székely E, Romics I. (2007) A prostataspecifikus antigén-vizsgálat első évtizede klinikánkon (1994-2004). Orv Hetil, 148: 121-124.
9. Riesz P, Székely E, Török V, Székely T, Romics I. (2007) E-cadherin-expresszió vizsgálata hólyagrákban. Magy Urol, 19: 159-163.
10. Járay B, Székely E, Istók R, Winternitz T, Tarján Zs, Tóth A, Győri G, Péntek Z, Egyed Zs, Nádor K. (2007) A citopatológus és a radiológus együttműködése a citodiagnosztikában. Lege Artis Medicinae, 17: 233-237.
11. Szűcs M, Székely E, Romics I. (2006) Az ismételt transurethralis resectiók szerepe a felületes hólyagdaganatok kezelésében. 127 beteg követési adatai. Uroonkológia, 3: 9-13.
12. Riesz P, Hamvas A, Szendrői A, Székely E, Romics I. (2006) Vesesejtes karcinoma és ellenoldali oncocytoma. Magy Urol, 18: 50-54.
13. Riesz P, Rusz A, Walter Gy, Székely E, Szűcs M. (2006) Véletlenül felfedezett heredaganat. Uroonkológia, 3: 73-75.
14. Fuszek P, Horváth HCs, Speer G, Papp J, Haller P, Halász J, Járay B, Székely E, Schaff Zs, Papp A, Bursics A, Harsányi L, Lukovich P, Kupcsulik P, Hitre E, Lakatos PL. (2006) A colorectalis rákok lokalizációjának változása Magyarországon 1993 és 2004 között. Orv Hetil,147: 741-746.
15. Szendrői A, Hamvas A, Székely E, Szűcs M, Romics I. (2005) Jóindulatú daganat-e a vese-angiomyolipoma. Uroonkológia, 2: 76-80.
16. Riesz P, Walter Gy, Székely E, Romics I. (2005) Scrotalis leiomyosarcoma többszörös kiújulása. Uroonkológia, 2: 20-22.
17. Riesz P, Nyírády P, Székely E, Szelepcsényi J, Romics I. (2005) Kétoldali vesetumor patkóvesében. Uroonkológia, 2: 53-55.
18. Istók R, Langmár Z, Szabó I, Glasz T, Székely E, Bánhidy F, Acs N, Paulin F, Magyar E, Schaff Z. (2004) Unilateralis Sertoli-sejtes androblastoma fiatal nő petefészkében.Orv Hetil, 145: 693-696.

19. Schaff Z, Székely E, Járay B, Kiss A. (2004) A májdaganatok patológiája. Orv Hetil, 145 Suppl: 368-374.
20. Székely E, Istók R, Járay B. (2004) Az aspirációs citológiai vizsgálatok szerepe a betegségek (köztük a hematológiai betegségek) diagnosztikájában. Hematológia-Transzfuziológia, 37: 257-264.
21. Székely E, Kulka J, Kardos M. (2004) A húgyhólyagbetegségek szövettani diagnosztikája. Uroonkológia, 1: 42-45.
22. Székely E, Tarján Z, Csapó Z. (2001) A pancreas lymphoepithelialis cystája. Orv Hetil, 142: 2201-2203.
23. Kelemen Z, Joós L, Kárpáti S, Kálmán J, Fazakas Z, Székely E, Pajor L, Romics I. (2001) A hímvessző és a herezacskó súlyos szövetelhalásos folyamatai. Orv Hetil, 142: 1049-1054.
24. Gyurkovics E, Nagy Z, Székely E, Harsányi L. (2001) Ritka műtéti javallat: planocellularis gégerák májáttétele. Magy Seb, 54: 256-258.
25. Buzás György M, Székely E, Illyés G, Széles I. (2000) Lanzoprazol- vagy ranitidin bizmut citrát-tartalmú hármas kezelés a Helicobacter pylori-fertőzés eradikációjában nyombélfekélyes betegekben. Orv Hetil, 141: 1711-1714.
26. Hajnal B, Tarján Zs, Székely E. (2000) Leiomyosarcoma női emlőben. Magy Radiol, 74: 81-83.
27. Buzás GM, Székely E. (1999) A Helicobacter pylori eradikációja peptikus fekélybetegekben. Orv Hetil, 140: 121-124.
28. Járay B, Székely E, Tarján Zs, Winternitz T. (1998) Az aspirációs citológia szerepe a gócos májelváltozások diagnosztikájában. Magy Onkol, 42: 239-242.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik az értekezés elkészítésében segítségemre voltak. Intézetvezetőmnek, témavezetőmnek**, Prof. Dr. Tímár Józsefnek**, aki szakmai útmutatásai mellett folyamatosan bátorított nehezebb, elkeseredett pillanatokban. **Schaff Zsuzsa Professzor asszonynak**, aki szintén mindvégig támogatta, egyengette e munka létrejöttét, ill. korábbi szakmai vezetőmként a kezdetektől fogva unszolt és bátorított, hogy e nagy munkának nekikezdjek. **Kádár Anna Professzor asszonynak**, aki még korábbi szakmai vezetőmként bíztatott egy PHD munka elkészítésére. **Kiss András, ill. Lotz Gábor Docens uraknak,** akik a kísérletek megválasztásában ill. véghez vitelében, azok kiértékelésében, ill. a tudományos közlemények megírásában folyamatos segítséget nyújtottak. **Kovács Margit Docens asszonynak,** aki szintén folyamatosan bíztatott e munka megírására, és mind emberileg, mind szakmailag folyamatosan egyengette utamat bármilyen közös munka során. **Török Virágnak**, akivel a dolgozat egyik alaptémájának kísérleteiben az első lépéseket együtt tettük. **Székely Tamásnak**, aki a munka kezdetén még „gyerekként" - hallgatóként – vett részt a kísérletekben, és kész szakorvosként ad tanácsot a munka elkészültekor. **Törzsök Péternek**, akivel együtt vágtunk neki a kísérleteknek, és a vizsgálat-sorozatok ill. a cikkek írása során rengeteget dolgoztunk közösen. **Riesz Péternek**, aki az egyik kísérlet-sorozatban pótolhatatlan segítséget nyújtott, és az évek során végig bátorította és sarkallta e dolgozat létrejöttét.

Romics Imre Professzor úrnak, és az Urológiai Klinika minden orvosának a szakmai kérdésekben nyújtott segítségért. **Pekár Zoltánné Magdinak,** aki a molekuláris biológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésében segített, ill. **Sklánitzné Samodai Erikának, Azumah Francisnének** és **Gregor Viktóriának** az immunhisztokémiai vizsgálatok végzéséért. A II.sz. Pathológiai Intézet valamennyi asszisztensének; **Tordainé Szabó Hedvignek, Szabó Gábornénak, Hadarics Zsuzsának, Bakotay Katalinnak, Podluzsánszky Angélának, Jaczó Csillának, Borsos Mariannak,** akik közül valamennyitől kértem és kaptam segítséget a kísérletsorozatok, fotók számára elkészített szép metszetek formájában. **Seres Jánosné Marának**, aki a dolgozat gépelésében adott pótolhatatlan segítséget. **Gittingerné Balogh Lenkének,** ill. **Kenessey Istvánnak**, aki a dolgozat végső formába öntése során adott komoly segítséget.

Rigóné Kálé Elvirának a fordítások, pályázatok, az adminisztratív teendők során nyújtott segítségért. **Szirtes Ildikónak,** aki a gépelési hibák kigyomlálásában bizonyult nélkülözhetetlennek. **Schönfeld Tibornak,** aki a közleményekben megjelenő táblázatok, statisztikai ábrák, ill. a dolgozat technikai problémáinak megoldásában segített. **Borka Katalinnak, Győrffy Hajnalkának** akik a házi védésen opponensként alaposan átnézték a dolgozatot, és építő javaslataikkal hozzájárultak hibák elkerüléséhez. A II. sz. Pathológiai Intézet orvosainak, **Fintha Attilának, Glasz Tibornak, Halász Juditnak, Hargitai Dórának, Istók Rolandnak, Járay Balázsnak, Kardos Magdolnának, Kovács Attilának, Kovács Istvánnak, Prof. Kulka Janinának, Madaras Lillának, Somorácz Áronnak, Szász Marcellnak**, akiknek biztatása, szeretete szintén komoly lökést adott e munka elkészüléséhez. **Családomnak;** édesapámnak, **Prof. Dr**. **Székely Józsefnek**, édesanyámnak, **Dr. Székely Józsefnének**, akik munkám során biztatásukkal, szeretetükkel halmoztak el. Férjemnek, **Pálos Györgynek**, gyermekeimnek – **Gergőnek, Hannának, Péternek és Katának**, akik biztatásuk mellett sok-sok türelemmel és megértéssel vették tudomásul, hogy e munka miatt a családi élet sokszor háttérbe szorult. Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a név szerinti felsorolásból kimaradtak, de akár szakmai, akár emberi segítségükkel szintén hozzájárultak e munka elkészültéhez.