

Húgyhólyagdaganatok új diagnosztikus és prognosztikus markerei

Doktori értekezés

dr. Törzsök Péter

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss András, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Tóvári József, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Keller Éva, Ph.D., intézetvezető
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Kopa Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

Rövidítés jegyzék	4
I. Bevezetés.....	6
I/1. Húgyhólyagrakokról általában.....	6
I/1.1. Epidemiológia	7
I/1.2. Hajlamosító tényezők.....	8
I/1.3. Tünettan	8
I/1.4. Diagnózis	9
I/1.4.1. UroVysion.....	11
I/1.5. Terápia.....	13
I/1.5.1. Felületes hólyagrak (Ta-T1).....	13
I/1.5.2. Izominvazív hólyagrak (T2-T4).....	13
I/1.6. Lefolyás.....	14
I/1.6.1. Túlélés/kiújulás	14
I/1.6.2. Utánkövetés.....	15
I/2. Húgyhólyagrakok patológiája	16
I/2.1. Szöveti típusok	16
I/2.2. A húgyhólyagrakok stádium szerinti osztályozása – TNM	16
I/2.3. A húgyhólyagrakok differenciáltság szerinti osztályozása	18
I/2.4. Húgyhólyagrak biológiája és prognosztikai markerei.....	19
I/2.4.1. Sejtciklus-szabályozók	20
I/2.4.2. Onkogének	21
I/2.4.3. Proliferációs markerek	22
I/2.4.4. Immunmarkerek	22
I/2.4.5. Extracelluláris mátrix, adhéziós molekulák, sejtfelszíni markerek és sejtkapcsoló-fehérjék	23
I/3. Sejtkapcsoló struktúrák	24
I/3.1. Négy transzmembrán doménnel rendelkező fehérjék	24
I/3.1.1. Occludin	24
I/3.1.2. Tricellulin.....	25
I/3.1.3. Claudinok	25
I/3.1.4.1. Claudinok normál húgyhólyagban és húgyhólyagrakban	29
I/3.2. Egyéb fehérjék	29
II. Célkitűzés.....	30
III. Anyag és módszer.....	32
III/1. Beteganyag	32
III/1.1. Beteganyag 1 – Low grade - High grade UCC-k	32
III/1.2. Beteganyag 2 - Felületes húgyhólyagdaganatok	34
III/1.3. Beteganyag 3 – UroVysion	34
III/2. Szövettan, immunhisztokémia.....	35
III/2.1. Immunhisztokémia kiértékelése:	36
III/2.1.1. Morfometria.....	36

III/2.1.2. Szemi-kvantitatív scoring analízis.....	37
III/2.1.3. Ki-67 kiértékelés	38
III/2.2. Fluoreszcens immunhisztokémia.....	38
III/3. Kvantitatív valós idejű PCR vizsgálat (primerek és PCR reakciók)	39
III/3.1. RNS-izolálás.....	39
III/3.2. RNS reverz transzkripció	39
III/3.3. Valós idejű kvantitatív RT-PCR.....	39
III/4. UroVysion	40
III/4.1. Vizelet előkészítés	40
III/4.2. Kenet készítés, előkezelés	41
III/4.3. FISH (Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció).....	41
III/4.4. Fluoreszcens mikroszkópia	42
III/4.5. Kiértékelés kritériumai	42
III/5. Statisztika	42
IV. EREDMÉNYEK	44
IV/1. Immunhisztokémia és RT-PCR vizsgálat nem-tumoros urotheliumban.....	44
IV/2. Immunhisztokémia és RT-PCR vizsgálat tumorokban	51
IV/3. Utánkövetés – Low grade – High grade UCC-k	57
IV/4. Utánkövetés – Felületes húgyhólyagdaganatok	59
IV/5. Eredmények - UroVysion	61
V. Megbeszélés.....	65
VI. Következtetések.....	75
VII. Új megállapítások	76
VIII. Összefoglalás	77
IX. Summary	78
X. Referenciák	79
XI. Saját közlemények jegyzéke	108
XII. Köszönetnyilvánítás	110
Saját közlemények	112

Rövidítés jegyzék

AZ	Arizona
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BPH	benignus prostata hyperplasia
BTA	Bard féle tumor antigén
CA	Kalifornia
CEP	Chromosome Enumeration Probe
CIS	carcinoma <i>in situ</i>
CK-5/6	citokeratin-5/6
CK-20	citokeratin-20
COX-2	cyclooxygenase-2
CT	ciklus idő PCR-nél
CT	computed tomographia
DAB	diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNS	deoxiribonukleinsav
EAU	Európai Urológus Társaság (European Association of Urology)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancers
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FGFR	fibroblaszt növekedési faktor receptor
FISH	fluoreszcens <i>in-situ</i> hibridizáció
FITC	fluorescein isothiocyanate
FFPE	formalin-fixált paraffinba ágyazott
GYK	gyulladásos kontroll
H&E	haematoxylin eosin festés
HG	high grade
IHK	immunhisztokémia
IUP	invertált urotheliális papilloma
IVI	intravesicalis instilláció
IVU	intravénás urográfia
JAM	junkcionális adhézios molekula
Ki-67	kináz-gátló 67 (kinase inhibitor-67)
KMT	kiújulás mentes túlélés
K-W/DMS teszt	Kruskal-Wallis/Dunn féle többszörös összehasonlító teszt
LG	low grade
LG-UCC	low grade urothelsejtes carcinoma
LSI	locus specific identifier / lókuszt specifikus azonosító
MDCT	multidetektoros CT
MDCTU	multidetektoros CT urográfia
MMC	Mytomicin-C
mRNS	hírvivő RNS (messenger RNS)
MW teszt	Mann-Whitney U teszt

NGYK	nem gyulladássos kontroll
NMP22	nuclear matrix protein 22
OK	Oklahoma
PBS	phosphate-buffer saline / foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
PUNLMP	alacsony malignus potenciálú papilláris urothelialis neoplasia
RNS	ribonukleinsav
SSC	nátrium-klorid és nátrium-citrát
TMA	szöveti multiblokk (tissue microarray)
TPA	tissue polipeptid antigen
TT	teljes túlélés
TUR	transzurethrális reszekció
UCC	urothelsejtes carcinoma (urothelial cell cancer)
UH	ultrahang
UK	United Kingdom / Egyesült Királyság
UP	urothelialis papilloma
USA	Amerikai Egyesült Államok (United States of America)
VEGF	vaszkuláris endothelialis növekedési faktor
WHO	World Health Organization

I. Bevezetés

I/1. Húgyhólyagrakokról általában

A daganatos betegségek gyakorisága hazánkban egyre növekszik ¹. Sajnálatos módon, a testfelszínen látható daganatokon és a jól szűrhető méhnyak és emlőrákon kívül, a daganatok korai felismerése ma is probléma. Nincs olyan diagnosztikus teszt, mellyel a tumoros elváltozás korán, gyorsan, kevés költséggel és a beteg számára kis terheléssel kimutatható lenne, és ez a húgyúti tumorok esetében is igaz ².

A húgyhólyagtumorok diagnosztizálása, prognosztikája valamint a további terápia meghatározása hagyományosan a transzurethrális reszekció (TUR) során vett minta szövettani vizsgálatán alapszik. A terápiát a daganat szövettani tipizálásán túl lényegileg meghatározza a daganat mélységi terjedése: az izominvazív daganatok (az összes eset kb. 30%-a) sokkal rosszabb prognózissal rendelkeznek, s ezáltal radikálisabb terápiát igényelnek, szemben a felületes, nem izominvazív húgyhólyagrakokkal (az összes eset kb. 70%). Azonban annak ellenére, hogy az esetek nagy részében, mint felületes daganat jelentkezik, e felületes tumorok 50-70%-a a kezelés ellenére recidiválni, 10-20%-a progrediálni fog. Kihívást jelent az is, hogy az azonos szövettani megjelenést mutató, akár alacsony, akár magas rizikójú húgyhólyagtumorok közül is lesz ami ki fog újulni, s lesz ami progrediálni fog. Jelenleg nem rendelkezünk olyan önálló markerrel, ami önmagában előre jelezné a tumor várható biológiai viselkedését. Különböző kutatások számtalan molekuláris változást írtak le a hólyag illetve a felső húgyutak urothelsejtes carcinomájában, a normál hám tumoros átalakulásának pontos molekuláris útja még nincs kellőképpen feltérképezve ^{3,4}.

A húgyhólyagdaganatokon belül lényeges az új WHO klasszifikáció (2004) alapján a papillomák, az alacsony malignus potenciállal rendelkező papilláris neoplasiák (PUNLMP-k), a low grade (LG) és a high grade (HG) tumorok elkülönítése ⁵. Az egyes csoportok eltérő kiújulás mentes túléléssel valamint progressziós rátával rendelkeznek, s ezért személyre szabottan agresszívabb kezelésre, szorosabb utánkövetésre van szükség

ezen tumorok esetében. Azonban, az új szövettani leírások sok esetben nem adnak egyértelmű segítséget az egyes entitások elkülönítéséhez: a tumorok 30%-a indokolatlanul kerül a HG csoportba, továbbá a vizsgálók közötti és az egyes vizsgáló leletein belüli eltérés is jelentős⁶. Ezen adatok szintén alátámasztják a további markerek iránti szükségletet, amelyek segíthetnek a húgyhólyagrakok pontosabb szövettani/prognosztikai besorolásában, hozzájárulva a megfelelő terápia kiválasztásához, növelve az életminőséget, s csökkentve a terápiás költségeket.

I/1.1. Epidemiológia

A világon a hólyagrak incidenciája több mint 300,000 és ebből a betegcsoportból több mint 100.000 hal meg évente⁷. Az Egyesült Államokban több mint 70.000 hólyagrakot diagnosztizáltak, valamint közel 15.000-en haltak meg húgyhólyagrakban. A hólyagban előforduló urothelsejtes tumor a negyedik leggyakrabban előforduló daganat Európában, évente közel 120.000 új megbetegedéssel⁸.

Hazánkban évente mintegy 2000 új húgyhólyagrakos esetet diagnosztizálnak. A Magyar Rákregiszter adatai alapján évente körülbelül 8-900 halál történik húgyhólyagrak miatt. 2001 és 2006 között a húgyhólyagrakok incidenciája mind férfiak (30,1→36,3/100.000 fő), mind a nők (13,2→16,1/100.000 fő) között növekvő tendenciát mutatott¹.

A húgyhólyagrak jellemzően az idősebb korosztály betegsége, férfiak között háromszor gyakrabban fordul elő. Előfordulhat a fiatalabb korosztály körében is, de ekkor általában ritkább (nem átmeneti sejtes) szövettani típusú primer, illetve szekunder tumorokkal találkozhatunk¹.

A húgyhólyagrakok kezelése az egyik legköltségesebb a daganatos betegségek között, mivel jellemző a gyakori kiújulás, s ezáltal az altatásban végzett műtétek és a kórházban töltött napok száma is magas⁹.

I/1.2. Hajlamosító tényezők

A legfontosabb ismert hajlamosító tényező a dohányzás, mely ötszörösére emeli a hólyagrák kialakulásának valószínűségét. A hólyagrák okozta halál relatív kockázata dohányzó férfiak körében 3,3, korábban dohányzott férfiak körében 2,2, míg aktívan dohányzó nők körében 2,2, korábban dohányzott nők esetében 1,9⁹. Hosszabb időre (6-10 év) van szükség a folyamat kialakulásához. Négy év dohányzás után a dohányzás felfüggesztése akár 40%-kal is csökkentheti a hólyagrák kialakulásának kockázatát, mely adat hangsúlyozza a dohányzástól való leszokás fontos szerepét a hólyagrák kialakulásának megelőzésében¹⁰.

Szintén emelkedett a hólyagrák kialakulásának lehetősége azoknál, akik rendszeres phenacetin és ismételt adott cyclophosphamid terápiában részesültek, valamint akik rendszeresen többgyűrűs aromás vegyületekkel érintkeznek (pl.: vegyi-, festék-, gumi- és fémiparban, fodrászatokban dolgozók esetén)^{11, 12}. Feltételezik, azonban még nem bizonyították, a túlzott kávé, a tömény alkohol, illetve a mesterséges édesítőszer fogyasztásának esetleges szerepét a húgyhólyag carcinogenesisében^{13, 14}. Kismedencei besugárzást (pl. prosztaták esetén) követően 5-10 év múlva szintén kialakulhat rosszindulatú tumor a hólyagban¹⁵. Húgyúti gyulladás, katéter vagy hólyagkő által okozott krónikus irritáció, valamint a Schistosoma haematobium fertőzés talaján laphámrák alakulhat ki a hólyagban^{16,17}.

A fokozott folyadékbevitel csökkentheti a húgyhólyagrák kialakulásának kockázatát, mivel a fokozott kiválasztás során csökken a rákkeltő anyagok koncentrációja, valamint rövidebb ideig érintkeznek a húgyutak hámborításával^{12, 18}.

I/1.3. Tünettan

A húgyhólyagdaganat gyanúját az esetek 85%-ban felvető tünet a néma (egyéb panasz által nem kísért) vérvizelés¹⁹. Minden vérvizelés urológiai rosszindulatú daganat tüneteként kezelendő, míg a részletes vizsgálatok során a malignitás nem zárható ki, mivel

a panaszok sok esetben spontán szűnnek, megtévesztve mind az orvost, mind a beteget. További, a diagnózist késleltető tényező lehet, hogy számos más ok is állhat a vérvezelés háttérében (pl.: húgyúti gyulladás, kőbetegség, alvadás gátlók túladagolása, vesebetegség)⁹.

Ritkábban jelentkezhet kínzó vizeleti inger, nehézvizezés, vizeleti képtelenség a vérvezeléshez társultan vagy akár önálló tünetként is. Ilyen esetekben fokozottan kell gondolni a tumorhoz társuló vagy önállóan is előforduló *in situ* carcinoma lehetőségére²⁰.

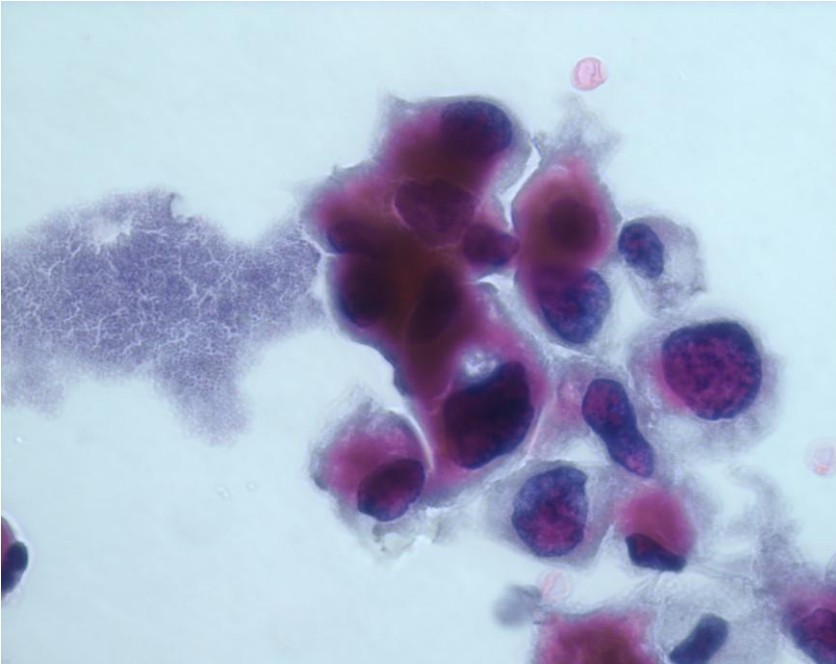
A húgyhólyagrákok egy részét sajnos csak előrehaladott stádiumban fedezik fel. Ilyenkor általános daganatos jelek, mint pl. fogyás, anémia, csontfájdalom, deréktáji fájdalom miatt kezdődnek a vizsgálatok^{21, 22}.

I/1.4. Diagnózis

A részletes anamnézis-felvételt és fizikális vizsgálatot követő vizeletvizsgálat után a telt hólyag mellett végzett kismedencei és hasi ultrahangvizsgálat (UH) az első választandó lépés a húgyhólyagrák diagnosztikájában. Ezen vizsgálattal a nem invazív, 1 cm-nél nagyobb daganatok már nagy valószínűséggel kimutathatóak. Az UH egyben a differenciáldiagnosztikában is használható, ugyanis segítségével elkülöníthetők a vérvezelés egyéb okai (pl.: vesekő, húgyhólyagkő, prosztatabetegség, vesedaganat). Natív hasi felvétellel kombinálva az intravénás urográfiához (IVU) hasonló pontosság érhető el UH segítségével. Az IVU szerepe a mai diagnosztikus stratégiában a CT elterjedése óta jelentősen visszaszorult, mivel az IVU nagyobb sugárterheléssel jár, s kevesebb az információtartalma a CT-énél²³.

Fontos további része a húgyhólyag diagnosztikájának a vizeletcitológia, amely nagy szenzitivitással mutatja ki a HG, CIS tumorokat, azonban alacsony a szenzitivitása a LG tumorok esetében, valamint a negatív eredmény nem zárja ki a tumor lehetőségét (1. ábra). Számos molekuláris markert vizsgáltak a citológia mintákon, melyeknek jó része magasabb érzékenységgel bír a citológiánál, azonban specificitásuk alacsonyabb²⁴.

1. ábra Recurrens T1G3 tumor citológiai képe (H&E, 600x-os nagyítás)



A húgyhólyagrák diagnosztikájának máig legfontosabb eszköze a cisztoszkópia, mely hajlékony vagy merev eszközzel történik. Az ajánlások ezt a módszert tartják a legmegfelelőbbnek a hólyagrák diagnózisának felállítására, illetve az utánkövetésre a terápiát követően²⁵. Ha korábbi vizsgálatok látható terimét igazoltak a hólyagban, akkor a diagnosztikus cisztoszkópiától el lehet tekinteni²³.

A cisztoszkópiás mintavétel felületes hólyagrák esetén a megfelelő diagnózist és egyben terápiát is jelentheti²⁶. A transzurethrális reszekció (TUR) célja Ta-T1-es tumorok esetében a korrekt diagnózis és az összes látható tumor eltávolítása. Az 1 cm-nél kisebb tumorokat egyben el lehet távolítani, azonban a mintának hólyagfali izmot is kell tartalmaznia. Ha a szövettani minta nem tartalmaz izomszövetet; ha a reszekció nem tűnt teljesnek; ha nagy, vagy többszörös tumorról van szó; illetve ha az első reszekció során HG vagy T1-es tumort diagnosztizáltak, akkor szükség van egy második ülésben végzett utóreszekcióra. Az utóreszekció a diagnózis pontosításán túl javítja a recidíva és a progresszió mentes túlélést²³.

A TUR során a véletlenszerű mintavétel a normál kinézetű hámból nem ajánlott, azonban ha tumorgyanús területet látunk, valamint ha a citológia pozitív volt, akkor hideg

biopsziák vétele ajánlott a hólyagból, illetve a prosztatikus húgycsőszakaszról is. CIS gyanú esetén fluoreszcens cisztoszkópia elvégzése javasolt, mely szenzitivitása és specificitása magasabb a hagyományos fehér fényel végzett cisztoszkópiához viszonyítva²³.

Egyelőre nem rendelkezünk olyan markerrel, ami kiválthatná a páciens számára kellemetlen, sokszor fájdalmas cisztoszkópiát, azonban számos kutatócsoport célul tűzte ki ilyen markerek kutatását.

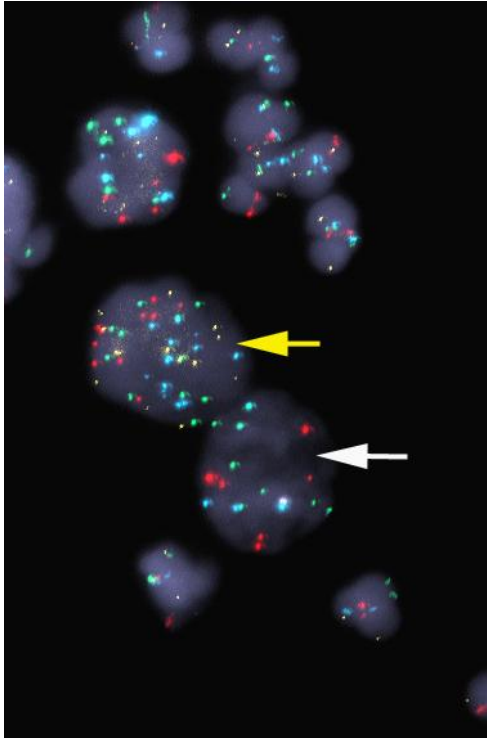
Izominvazív daganatok esetében, ha a stádium meghatározás nem egyértelmű, képalkotó eljárásokat (mellkasi, hasi, kismedencei multidetektoros CT /MDCT/, beleértve a multidetektoros CT urográfiát /MDCTU/ a felső húgyutak komplex vizsgálatára), valamint szükség esetén stádium-meghatározó nyirokcsomó eltávolítást végzünk²⁷.

I/1.4.1. UroVysion

A vizeletcitológia specificitása és érzékenysége fokozható FISH (fluoreszcens *in situ* hibridizáció) vizsgálat segítségével. A specifikus fluoreszcensen jelölt próbák a húgyhólyagrákokra jellemző genetikai eltéréseket mutatják ki²⁸(2. ábra).

A tumor képződés korai stádiumában is megfigyelhető, egyik leggyakoribb elváltozás a 9-es kromoszóma részleges vagy teljes elvesztése, amely a 9p21es pozícióban található p16 (CDKN2A) tumorszupresszor gén inaktiválódását vonja maga után. A daganatprogresszió előrehaladásával a kromoszómális instabilitás és aneuploidia fokozódik a tumorsejtekben, mely leginkább az 1, 3, 7, 9, 11, 17-as kromoszómákat érinti²⁹ (2. ábra).

2. ábra UroVysion FISH



Késői rák, sárga nyíl: 9p21, 3, 7, 17-es poliszómia; fehér nyíl: 9p21 deléció; *CEP3*: SpectrumRed (piros); *CEP7*: SpectrumGreen (zöld), *CEP17*: SpectrumAqua (világoskék); *LSI 9p21*: SpectrumGold (aransárga); DAPI magfestés; eredeti nagyítás: 1000x.

Jelenleg, többek között, a Semmelweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézetében is használt UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit van forgalomban, amelyet az amerikai FDA (Food and Drug Administration) is diagnosztikus eszközként ismer el. Ebben a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák peri-centromérikus régióit, továbbá a 9p21-es lókuszt detektáló próbák keveréke található meg³⁰. A módszer specificitása és érzékenysége megfelel a diagnosztikában elvártaknak, azonban magas költsége, specifikus szakmai háttérigénye korlátozza a klinikumban való használatának szélesebb körű elterjedését.

I/1.5. Terápia

I/1.5.1. Felületes hólyagrák (Ta-T1)

Bár a TUR eltávolítja a teljes Ta-T1 stádiumú tumort, az gyakran kiújul, valamint kis számban izominvazívá progreál. Ezért a jelenlegi ajánlás szerint kötelező minden beteget adjuváns lokális kemoterápiában részesíteni, kivéve ha intra- vagy extraperitonealis perforációt gyanítunk, vagy egyéb kontraindikáció áll fenn.

Alacsony rizikójú betegeknél a műtétet követő egyszeri hólyagban történő instilláció a standard terápia. Az instilláció időzítését minden tanulmány 24 órán belül javasolja, azonban célszerű 6 órán belül elvégezni a kezelést. Mind a Mitomycin C, az Epirubicin, és a Doxyrubicin is jótékony hatást mutat²³. A közepes és magas rizikójú csoportokban további adjuváns intravesicalis terápia szükségességét a prognosztikai faktorok szabják meg³¹.

Magas grade-ű illetve magas rizikójú tumorokban a műtét utáni egyszeri kemoinstillációt követő, legalább egy évig tartó bacillus Calmette-Guérin (BCG) terápia ajánlott. A BCG kezelés a kemoterápiával ellentétben, a kiújuláson túl a progresszió valószínűségét is csökkenti²².

I/1.5.2. Izominvazív hólyagrák (T2-T4)

Izominvazív húghólyagrák esetén a választandó kezelés a betegek többségében a radikális cisztektómia, komplett kismedencei nyirokcsomó-eltávolítással kiegészítve. A ciszplatin alapú kemoterápia kombinálva radikális cisztektómiával és komplett kismedencei nyirokcsomó-disszekcióval hosszabb túlélést biztosít, mint önmagában a cisztektómia^{31, 32}. A cisztektómia elsődleges indikációja az izominvazív hólyagrák: T2-T4a, N0-Nx, M0 stádiuma. Egyéb indikáció a magas rizikójú felületes tumorok: T1 G3 és BCG rezisztens Tis valamint a kiterjedt papilláris formák, melyeket konzervatív módszerekkel uralni nem lehet. Ezen magas rizikójú esetek kiválasztásában segíthet a sejtciklus-szabályozó p53 expresszió vizsgálata^{33, 34, 35}.

I/1.6. Lefolyás

I/1.6.1. Túlélés/kiújulás

A húgyhólyagrákok diagnózisának és terápiájának is meghatározó eleme a tumor diagnosztizálásának időpontján, valamint a tumor patológiai jellemzőin túl a sebész képességei és tapasztalata is³².

A felületes és az invazív tumorok rendkívül eltérő 5 éves túléléssel rendelkeznek (95% viszonyítva az 50%-hoz)³⁶, mely egyben eltérő biológiai viselkedésüket is tükrözi. Az újonnan diagnosztizált urothelsejtes hólyagcarcinomák az esetek 70-80%-ában felszínesek és teljes egészében reszekálhatóak, azonban közel felük a kezelés ellenére mégis recidiválni /döntően a kezelést követő 3 éven belül³⁷/, míg 10-20%-uk progrediálni fog a tumor stádiumát vagy differenciáltságát illetően. TUR után, a beteg klinikopatológiai jellemzőitől függően, melyeket a következő bekezdésben részletezünk, az egy éven belüli kiújulás esélye 15%-tól 70%-ig, míg az 5 éven belüli progresszió esélye 7%-tól 40%-ig terjed felületes hólyagrákok esetén^{38,39}.

A EAU Guideline szerint a nem izominvazív húgyhólyagrákos betegek esélyét a tumor-progresszióra illetve a kiújulásra az úgynevezett EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancers) pontozó rendszer szerint határozhatjuk meg. A multiplex, a nagy (≥ 3 cm) és a gyakran recidiváló (több mint évi egyszer) tumorú betegeknek van a legnagyobb esélye a recidívára, míg a tumor-progresszióra a T1, a G3 és a társuló carcinoma *in situ*-val rendelkező pácienseknek van a legmagasabb rizikója²⁰. Internetes progresszió és recidíva kalkulátor elérhető a <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/> - internetes címen.

Izominvazív tumorok esetén, cisztekтомиát követően 50% az esélye a távoli áttétek megjelenésének, melyek többsége két éven belül fejlődik ki. A stádium és a nyirokcsomó státusz meghatározó prognosztikai faktorok a progresszió tekintetében. Távoli áttétek leggyakrabban a tüdőben, májban és csontokban jelennek meg⁴⁰.

I/1.6.2. Utánkövetés

Az utánkövetés két fontosabb eszköze a cisztoszkópia valamint a vizelet citológia. Az első hólyagtükrözésnek, melyet a TUR után 3 hónappal kell elvégezni, nagyon fontos szerepe van: ha már ekkor recidívát találnak a hólyagban, az rossz prognózist jelent. Az első 3 hónap utáni cisztoszkópiák gyakorisága a daganat klinikopatológiai tulajdonságai alapján meghatározott rizikófaktor csoportoknak megfelelően van meghatározva. A magas rizikójú csoportban, akiknél az első kezelés utáni egy éven belüli recidíva esélye 73% és a további progresszió esélye 25%, tanácsos a rendszeres, először 3 hónaponkénti, majd ritkább utánkövetés cisztoszkópiával⁴¹. Differenciáltabb tumorú (alacsonyabb grade-ű) betegeknél, akiknél kisebb a kiújulás valószínűsége, a cisztoszkópia helyét egyéb non-invazív módszer, például az UroVysion teszt, vehetné át⁴².

A hólyagtükrözés fájdalmas, kellemetlen, költséges beavatkozás. Sajnálatos módon jelenleg nem rendelkezünk olyan vizsgáló eljárással, ami kiválthatná ezt a vizsgálatot. A vizelet citológia használható eljárás szűrésre és utánkövetésre is, azonban eredményét nagyban befolyásolja a vizsgáló tapasztalata, a mintavétel, a mintafeldolgozás, valamint a tumor differenciáltsága is³¹.

Izominvazív daganatok utánkövetése során rendszeres UH, vizeletcitológia, CT/MR valamint labor vizsgálatok végzendőek meghatározott protokoll szerint. A vizsgálatok a daganat stádiumától és klinikopatológiai jellemzőitől függően (leggyakrabban 3 hónaponként) végzendőek el³³.

A pontos ajánlások a www.uroweb.org oldalon megtalálhatóak.

I/2. Húgyhólyagrákok patológiája

I/2.1. Szöveti típusok

A hólyagban leggyakrabban előforduló szövettani típus az urothelsejtes carcinoma (UCC= urothelial cell carcinoma), mely a húgyhólyagrákok 90%-át teszi ki. Ezen felül előfordulnak egyéb szövettani típusok is, mint pl. laphámrák (5%), adenocarcinoma (2%) valamint ritkább szövettani típusok (kissejtes, mikropapilláris, fészkes szerkezetű, sarcomatoid, plazmocitoid carcinoma), amelyek felismerése és elkülönítése lényeges, mivel sokszor agresszívabb biológiai viselkedéssel rendelkeznek^{43, 44, 45}. Az átmeneti sejt carcinoma közel 10%-ában figyelhető meg fokálisan mirigyszerű struktúrák, valamint a tumorok akár 60%-ban fokális laphám irányú differenciáció, azonban ennek klinikai jelentősége egyelőre nem tisztázott^{46, 47}. A kevert szövettani típusú húgyhólyagrákoknak, melyek a hólyagrákok 11%-át teszik ki (ezen belül: laphám 40%, mirigyszerű 18%, sarcomatoid 11%, mikropapilláris 10%, kissejtes 9%, plazmocitoid 1%) nem egyértelmű a megítélése az irodalomban, azonban várható invazívabb viselkedésük miatt agresszívabb kezelést igényelnek⁴⁵.

I/2.2. A húgyhólyagrákok stádium szerinti osztályozása – TNM

A daganatok többségénél alkalmazott TNM-beosztást (T – primer tumor mérete, N – nyirokcsomó státusz, M – áttét) használják húgyhólyagrákok esetében is világszerte. A 2011-es EAU Guideline a húgyhólyagrákok stádiumának meghatározásához az 1. táblázatban feltüntetett 2009-es TNM beosztást ajánlja (TNM7)^{23, 33}.

1. táblázat: A húgyhólyagrákok 2009-es TNM beosztása (TNM7.)

T- Primer tumor	
TX	nem értékelhető a primer tumor
T0	nincs igazolható primer tumor
Ta	nem invazív papilláris carcinoma
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : "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: prosztata, vagina, méh, medence fal, hasfal
T4a	tumor beszúri a prosztatát, a vaginát vagy a méhet
T4b	tumor beszúri a medencefalat vagy a hasfalat
N- nyirokcsomó	
NX	regionális nyirokcsomók nem értékelhetőek
N0	nincs regionális nyirokcsomó áttét
N1	egyetlen kismedencei nyirokcsomó áttét (hipogastricus, obturator, külső iliacalis vagy presacral)
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

I/2.3. A húgyhólyagrákok differenciáltság szerinti osztályozása

Jelenleg kétféle osztályozási rendszer (1973 és 2004, WHO) van használatban. Az új, 2004-es WHO osztályozás a nem invazív (Ta) neoplasiákon belül a papillomákat, invertált papillomákat, alacsony malignus potenciállal rendelkező papilláris neoplasiákat (PUNLMP), low-grade (LG), valamint a high grade (HG) papilláris carcinomákat, míg az invazív neoplasiákon belül a lamina propria inváziót (T1) és a muscularis propria (detrusor izom) inváziót (T2-) különíti el⁵.

Az újabb, 2004-es WHO osztályozás szemben a korábbi, 1973-as, 3-as osztással a húgyhólyagrákokat két fő csoportra bontja: egy rosszul differenciált (High grade, HG) és egy jól differenciált (Low grade, LG) alcsoportra (2. táblázat). Számos vizsgálat alátámasztotta, hogy a korábbi Grade-2-es csoport klinikailag nem jellemezhető egységes biológiai viselkedéssel, ezért a korábbi 3-as csoportosítás módosítására volt szükség⁶. Ezt hivatott a 2004-es WHO osztályozás elősegíteni. A 2011-es EAU Guideline ajánlása alapján, amíg az újabb, 2004-es osztályozás klinikai használhatóságát megfelelő vizsgálatokkal megerősítik, addig mindkét rendszerben osztályozandóak a daganatok³¹.

2. táblázat: 1973-as és 2004-es WHO osztályozás

1973 WHO osztályozás	
Urotheliális papilloma	
Grade 1	jól differenciált
Grade 2	közepesen differenciált
Grade 3	rosszul differenciált
2004 WHO osztályozás	
Urothelialis papilloma	
Alacsony malignus potenciálú papilláris urothelialis neoplasia (PUNLMP)	
Low-grade papilláris urothelialis carcinoma	
High-grade papilláris urothelialis carcinoma	

A jól meghatározott kritériumok ellenére jelentős a vizsgálók közötti, és az egyes vizsgálók leletein belüli eltérés a húgyhólyagrakok differenciáltsági osztályozásában, valamint a lamina propria invázió megítélésében is⁴⁸.

I/2.4. Húgyhólyagrak biológiája és prognosztikai markerei

A húgyhólyagrakokra jellemző a jelentős genetikai heterogenitás mellett két fő fenotípus: a low-grade papilláris és a high-grade invazív típus, melyek eltérő mechanizmusokon keresztül alakulnak ki, és drasztikusan eltérő biológiai viselkedéssel rendelkeznek. A low grade nem invazív tumorokban a HRAS és a FGFR-3 gén mutációi, míg a high grade izominvazív daganatokban a p53 és pRB tumorszupresszor gének hibái gyakoriak⁴⁹.

Összességében elmondható, hogy számos markert vizsgáltak az elmúlt években. Az irodalomban általában egymásnak ellentmondó, az alábbiakban részletezett publikációk jelentek meg az egyes markereket illetően. Ez magyarázható az egyes kutatások eltérő betegösszetételével, a terápia különbözőségével, eltérő statisztikai módszerek használatával.

A jelentős vizsgálók közötti és vizsgálókon belüli különbségek is kiemelik a klasszifikációk további pontosításának jelentőségét, valamint a további kutatások fontosságát. Egyelőre nincs olyan marker, ami önmagában felülmúlná a hagyományos patológiai prognosztikai tényezők használhatóságát (stádium, differenciáltság), azonban több marker használata tovább pontosíthatja a prognosztikát. Az egyes markerek kombinálva izominvazív daganatokban magasabb prediktív értékkel rendelkeznek mind a kiújulás, mind a rák-specifikus túlélés tekintetében, mint önállóan⁵⁰. Például a p53 és a pRb kombinálva sokkal rosszabb prognózissal társul, ha mindkét marker mutáns, mint ha csak az egyik, vagy egyik sem sérült^{51,52}.

I/2.4.1. Sejtciklus-szabályozók

p53: A p53 mutáció prediktív szerepének megítélése ellentmondásos az irodalomban. Számos vizsgálat talált összefüggést a kiújulás mentes túlélés, illetve a teljes túlélés és a p53 immunhisztokémia (IHK) között^{35, 53}. Dalbagni és mtsai ezt nem tudták igazolni⁵⁴. A p53 státusznak a terápiás kezelés hatékonyságának megjóslásában lehet szerepe metothrexat (MTX), vinblastin, adriablastin és cisplatin esetében, ugyanis a p53 mutációt hordozó pácienseknél magasabb halálozási ráta figyelhető meg³⁴.

pRb: A retinoblastoma gén központi szerepet tölt be a húgyhólyagrák korai carcinogenesisében^{55, 56}, valamint a sejtciklus és a programozott sejthalál szabályozásában⁵⁵. A csökkent pRB expresszió előrehaladottabb stádiummal, alacsonyabb differenciáltsági fokkal⁵⁷ és rosszabb klinikai kimenetellel társul mind felületes⁵¹, mind izominvazív daganatok esetében⁵². Azonban, a pRb-t elutasították, mint a felületes húgyhólyagrákok kiújulási és progresszió markerét^{58, 59}. A pRb expresszió pT1G3-as BCG-vel kezelt esetekben megbízhatóan előrejelzi a progressziót és a kiújulást⁶⁰.

p21WAF1/Cip1: A p21 expresszió hiánya önálló prognosztikai erővel bír a kiújulás és a csökkent túlélés szempontjából húgyhólyagrákokban^{61, 62}. Azonban egy 207 esetet vizsgáló tanulmány megállapította, hogy a p21 IHK nem nyújtott semmilyen plusz információt az egyéb prognosztikai faktorokhoz viszonyítva⁶³.

P27/Kip1: A low-grade, felületes, papilláris, lassan proliferáló rákokban magas, míg a rosszul differenciált, izominvazív, magas proliferációs rátával rendelkező tumorokban alacsony p27 expressziót írtak le. Ezen tanulmányokban nem tudták igazolni a p27 ciklin-dependens kinázgátló független prognosztikai faktor szerepét multivariancia analízissel^{64, 65}. A p27 expresszió elvesztése összefügg a kismencedei kiújulással, az áttétek progresziójával és a halálozással, továbbá a p27 expresszió független prognosztikai faktornak bizonyult húgyhólyagrákokban⁶⁶.

P16/INK4a: A 9p21-en található INK4a gén a p16 és p19ARF fehérjéket kódolja, s egyben az egyik leggyakrabban érintett lókuszt^{67, 68}. Felületes húgyhólyagrákokban Bartoletti és

mtsai azt találták, hogy a pozitív p16 fehérje expresszió korrelál a kiújulás mentes túléléssel⁶⁹.

I/2.4.2. Onkogének

FGFR3 (Fibroblaszt növekedési faktor receptor-3): Az FGFR-ek (1-4) szerepet játszanak a sejt-proliferációban, differenciációban és az érképződésben. Az FGFR3 mutáció jellemzően a low-grade papilláris daganatokban fordul elő^{70, 71, 72, 73}, ahol szoros korrelációt mutat a fehérje expressziós szinttel⁷⁴. Az emelkedett FGFR3 expresszió csökkent kiújulási és progressziós hajlammal társult^{75, 76}. A mutáció vizelet-üledékből is kimutatható, s mivel az FGFR3 T2-es tumorokban sokkal kisebb hányadban mutált, ezért alkalmas lehet a vizelet-üledék vizsgálat alapján a Ta-T1/T2-es tumorok elkülönítésére⁷⁷. A felületes, nem izominvazív hólyagrágokban hasznos prognosztikai faktor lehet^{71, 72, 73}.

EGFR (epidermális növekedési faktor receptor): Az EGFR-ek (1-4) tirozinkináz aktivitással rendelkező növekedési receptorok, melyek szerepet játszanak a sejt-proliferációban, motilitásban, differenciálódásban és a túlélésben^{78, 79}. Túltermelődésük jellemzően a húgyhólyagrágok előrehaladottabb stádiumaiban fordul elő, s rossz prognózissal társul. Célzott terápiás célpont lehet az EGFR ellenes kezelés az előrehaladott stádiumú tumorok terápiájában^{79, 80}.

VEGF (vaszkuláris endothelialis növekedési faktor): Húgyhólyagrágokban a VEGF expressziót mind a felületes, mind az izominvazív daganatokban kimutatták. Az emelkedett VEGF expresszió előrehaladott stádiummal és progresszióval asszociált^{81, 82, 83}. A VEGF gén polimorfizmusa esetén a húgyhólyagrág kialakulásának esélye fokozott⁸¹. VEGF gátló gyógyszerek jelenleg klinikai vizsgálat alatt állnak⁸⁴.

bcl-2: Kimutatták, hogy a bcl-2 fokozott expressziója összefügg a hólyagtumor progressziójával a radioterápia folyamán⁸⁵.

mdm-2: Ritkán az mdm-2 gén amplifikációja kimutatható hólyagtumorban⁸⁶.

I/2.4.3. Proliferációs markerek

Kináz gátló 67 (Ki-67): A Ki-67 kináz gátló fehérje, mely a proliferáló sejtek sejtmagjában mutatható ki^{87, 88}. A vizelethől kimutatott Ki-67 RNS korrelál a fehérje expresszióval, s segítségével elkülöníthetők a low-grade és a high-grade tumorok⁸⁹. Emelkedett Ki-67 expresszió összefügg a stádiummal, a differenciáltsággal, a kiújulással, a progresszióval és a túléléssel, valamint független prognosztikai faktor húgyhólyagrákokban^{88, 90, 91, 92}. A Ki-67 emelkedett expressziója a szervre lokalizált tumoros, cisztekтомиán átesett betegek esetében rossz prognózissal társul^{88, 91}. Mindezek ellenére nem kellőképpen tisztázott a Ki-67 és a betegség kimenetele közötti összefüggés, ezért további vizsgálatokra van szükség^{88, 92}.

Aurora-A/STK15: Az Aurora-A gén számos carcinoma esetén fokozottan expresszált illetve amplifikált⁹³. Az Aurora-A expresszió vizsgálata immunhisztokémia segítségével jó prediktív értékkel előrejelzi a kiújulást pTa stádiumú tumorok esetében (PUNLMP és LG tumoroknál jobban használható, mint HG-ben és CIS-ban)⁹⁴. Cisztektomizált valamint reszekált hólyagdaganatos esetekben az emelkedett Aurora-A expresszió erősen összefüggött az invazivitással, a rosszabb differenciáltsággal, az áttétképzéssel és a rosszabb túléléssel egy 205 esetet magába foglaló tanulmányban⁹⁵.

Survivin: A survivinnek szerepe van, többek között, a programozott sejthalál gátlásában, az osztódás szabályozásában, valamint az érékződésben⁹⁶. Normál urotheliumban nem, míg tumorban kimutatható. Cisztekтомиán átesett betegekben a magasabb expresszió multivariáns analízisben (>20%) rosszabb prognózissal társul, továbbá független prognosztikai faktor a recidíva és a túlélés tekintetében⁹⁷.

I/2.4.4. Immunmarkerek

Cyclooxygenase-2 (COX-2): Az utóbbi években felmerült a gyulladási folyamatok esetleges szerepe a húgyhólyagrák kialakulásában⁹⁸. A cyclooxygenase-2 (COX-2) központi szerepet játszik a helyi gyulladási folyamatokban^{99, 100}. Az izominvazív

daganatokban a felületes daganatokhoz képest, valamint a HG tumorokban a LG tumorokhoz képest szignifikánsan magasabb a COX-2 expresszió^{91, 99, 100, 101}. COX-2 gátló szerek kísérletes körülmények között, dóziszfüggő módon, gátolják húgyhólyagrák-sejtvonalak növekedését¹⁰².

CD8+ sejtek: Azon izominvazív húgyhólyagrágok, melyekben magasabb a tumort beszűrő CD8+ sejtek száma, jobb prognózissal társultak¹⁰³.

I/2.4.5. Extracelluláris mátrix, adhéziós molekulák, sejtfelszíni markerek és sejtkapcsoló-fehérjék

E-Cadherin: Csökkent E-Cadherin expresszió általánosan korrelál az izominvazióval és távoli áttétek megjelenésével, úgy mint alacsonyabb differenciáltságú és magasabb stádiumú tumor megjelenésével^{104, 105}. A csökkent E-cadherin expressziót összefüggésbe hozták a túléléssel és a kiújulás nélküli túléléssel is¹⁰⁴. Székely és mtsai nem találtak összefüggést az E-cadherin expresszió és az átmeneti sejtes carcinoma kiújulásának számával, teljes túlélésével¹⁰⁶.

CD44: széleskörűen expresszált sejtfelszíni adhéziós molekula, mely részt vesz mind a sejt-sejt, mind a sejt-mátrix interakciókban. A különböző exonok eltérő mértékben fejeződnek ki az egyes szövetekben. A standard CD44 közeli összefüggésbe hozható a tumor-progresszióval¹⁰⁷.

CK-5/6: magas molekulásúlyú citokeratin, mely a normál urothelium basalis rétegében fejeződik ki¹⁰⁸.

CK-20: alacsony molekulásúlyú citokeratin; a normál urotheliumban az ernyősejtek expresszálják¹⁰⁸. Normáltól eltérő expressziója, melyet a szerzők negatív reakcióban, vagy több mint 10% pozitivitásban határoztak meg, előrehaladottabb stádiummal illetve alacsonyabb differenciációval társul¹⁰⁹. A LG tumorok a normálhoz hasonló expressziót mutatnak. A HG tumorokra jellemző emelkedett, 10% feletti expresszió a kiújulás és a progresszió megjelenésének fokozott esélyével társul^{75, 110}.

I/3. Sejtkapcsoló struktúrák

A hámsejtek alapvető feladata a szöveteket egymástól, illetve a külvilágtól való elválasztása. A húgyutakban mindenütt, így a húgyhólyagban is kiemelten fontos az urothelium a vizelettel kiválasztásra kerülő anyagok szövetközi térbe, valamint a keringésbe történő visszajutásának megakadályozásában ¹¹¹.

A sejtkapcsoló struktúrák közül központi szerepe van az úgynevezett szoros kapcsolatoknak („Tight Junction”, TJ), melyek a sejtek apikális részéhez közel helyezkednek el. Szerepük van, többek között a paracelluláris transzport, a diffúzió, a sejtproliferáció szabályozásában is. Irányítják mind az ionok és molekulák, mind a fehérjék és lipidek transzportját a sejt basalis és apikális régiói között ¹¹².

A TJ-ban mind kortikális, mind transzmembrán proteinek megtalálhatóak. A kortikális fehérjék között PDZ domének, transzkripciós faktorok, tumor szupresszorok és vezikuláris transzportban résztvevő fehérjék találhatóak meg. A TJ fő vázát a négy transzmembrándoménnel rendelkező fehérjék alkotják: occludin, claudin, valamint egy újonnan leírt molekula, a tricellulin. A TJ felépítésében részt vesznek még a juncionális adhéziós fehérjék (JAM), melyek egy transzmembrán doménnel rendelkeznek, s szerepük van a limfociták és a dentritikus sejtek kapcsolatainak fenntartásában ¹¹³. A TJ-k a korábbi elképzelésekkel ellentétben dinamikusan változó struktúrák, melyek felelősek az egyes szövetek áteresztőképességéért, valamint morfológiai jellegzetességeiért ¹¹⁴.

I/3.1. Négy transzmembrán doménnel rendelkező fehérjék

I/3.1.1. Occludin

Az occludin a TJ első ismert tagja, egy kb 60-kDa-os fehérje két sejten kívüli hurokkal, valamint sejten belüli N és C terminális végződéssel. C-terminálisával közvetlenül kötődik a ZO-1, -2 és -3 fehérjékhez, amin keresztül aktin filamentumokkal társul ^{115, 116, 117}. A TJ-ben betöltött pontos szerepe egyelőre nem ismert. Fokozott expressziója csökkenti a hám áteresztőképességét emlős hámsejtekben, de paradox módon

növeli a mannitol hámon keresztüli átjutását^{118, 119}. A TJ formálásában betöltött szerepét igazolja az, hogy ha TJ mentes sejtbe helyezük, akkor a sejtek TJ-szerű filamentumokat hoznak létre¹²⁰. Számos munkacsoport adatai alapján felmerül lehetséges szerepe az egyes jelátviteli utakban^{20, 121, 122}. Az occludin a HCV egyik receptora, újabb kutatások, mint lehetséges terápiás célpontot vizsgálták¹²³.

I/3.1.2. Tricellulin

Jellemzően három sejt találkozási pontjánál található meg¹²⁴. C-terminális vége 32%-os homológiát mutat az occludinnal, míg N-terminális citoplazmatikus vége hosszabb az occludinénál. RNS inhibitorok segítségével kimutatták, hogy a tricellulin szerepet játszik nem csak három, hanem két sejt közötti kapcsolat fenntartásában is. A tricellulin gén recesszív mutációja süketséget okoz¹²⁵. Lokalizációja függ egy újonnan leírt fehérje, a lipolízis-stimulálta lipoprotein receptortól (LSR). Masuda és mtsai munkája alapján a LSR knockdown hámsejtekben nem volt kimutatható a tricellulin a három sejt közötti találkozási pontoknál, és emelkedett a hám áteresztőképessége¹²⁶.

I/3.1.3. Claudinok

A claudin család, melynek elnevezése a latin claudere (zárni) szóból ered, alkotja a TJ-ök fő vázát¹²⁷. Jelenleg 27, 20-34 kDa közötti tagját írták le emlősökben¹²⁸, melyek négy transzmembrán doménnel, két sejten kívüli hurokkal és sejten belüli C- és N-terminálissal rendelkeznek. Az első és a negyedik transzmembrán rész aminosav szekvenciája hasonló, míg a második és harmadik transzmembrán régió inkább eltér a különböző fehérjék között. Az első sejten kívüli hurok számos töltéssel rendelkező aminosavat tartalmaz, aminek szerepe van a sejtek közötti ionáramlás szabályozásában¹²⁹. Feltételezik, hogy a második sejten kívüli hurok a claudinok dimerizációjában vesz részt¹³⁰. A C-terminális vég mutatja a legnagyobb eltérést a claudinokon belül: ez a régió tartalmaz egy PDZ kötő domaint, melyen keresztül kapcsolódik olyan fehérjékhez, mint pl. a MUPP1¹³¹, PATJ¹³², ZO-1, ZO-2, ZO-3 és a MAGUK-ok¹³³.

Az egyes normál valamint tumoros szövetek specifikus claudin expresszióval rendelkeznek, mely lehetőséget ad arra, hogy ezen fehérjéket mint differenciál-diagnosztikai és/vagy prognosztikai markerként, esetleg terápiás célpontként vizsgáljuk ¹³⁴.

A claudinok továbbá szerepet játszanak számos élettani és patológiás folyamatban is, befolyásolhatnak jelátviteli utakat ^{114, 135}, melyeket a következőekben foglaljuk össze:

A **claudin-1** jelen van a normál bőrben. Knockout egér születése után hamarosan elpusztul bőrön keresztüli vízveszteség következményeként ¹³⁶. A HCV koreceptora ^{123, 137}; csökkent expressziója korrelál a kiújulással nyelőcső laphámrákokban ¹³⁸ valamint rossz prognózissal társul májrákokban ¹³⁹. Fokozott az expressziója a cervicalis intraepithelialis neoplasiákban a normál és a tumoros hámphoz viszonyítva is ¹⁴⁰. Világossejtes veserákokban a betegségmentes túlélés független prognosztikai faktora ¹⁴¹. Metasztázis szupresszor és expressziója a klinikai kimenettel korrelál tüdő adenocarcinómában ¹⁴². Csökkent az expressziója a hepatoblastomák embyronális komponensében a főtális komponenshez viszonyítva ¹⁴³. Fokozott az expressziója papilláris pajzsmirigyrákokban, azok nyirokcsomóáttétjeiben a normálhoz, a follikuláris rákhoz valamint a follikuláris adenomához viszonyítva ¹⁴⁴, továbbá nyelőcső laphámrákjában a normál hámphoz viszonyítva ¹⁴⁵.

A **Claudin-2** jelen van a nagy átteresztőképességű hámkokban, pl. vesében a proximális tubulusokban ¹⁴⁶, vagy a plexus choroideus epitheliumában ¹⁴⁷. Fokozott expressziója az EGFR útvonal befolyásolásán keresztül rossz prognózissal társul vastagbélrák esetében ¹⁴⁸. Csökkent az expressziója a hepatoblastomák embyronális komponensében a főtális komponenshez viszonyítva ¹⁴³.

A **Claudin-3** megtalálható a vese proximális és gyűjtő-csatornáiban ¹⁴⁶. Fokozott az expressziója petefészekrákban ^{149, 150} valamint prosztatatarákban ^{151, 152, 153}. A clostridium perfringens toxinjának receptora ¹⁵⁴.

A **Claudin-4** jelen van a normál bőrben ¹³⁶. Expressziója csökkenti a paracelluláris vezetőképességet a nátrium átteresztés szelektív csökkentésével, jelen van a nefron szorosabb részeiben ^{129, 155}. A claudin-3-al együtt a clostridium perfringens enterotoxinjának receptora, így mint terápiás célpont is szóba jön többek között

hasnyálmirigy-rák, prosztaták valamint petefészekrák esetében^{156, 157, 158}. Emelkedett expressziója rossz prognózissal társul emlőrákokban^{159, 160}. Fokozott az expressziója hasnyálmirigy-rákokban¹⁶¹. Csökkent expressziója rossz prognózissal társul, valamint a teljes túlélés független prognosztikai faktora gyomorrákokban¹⁶². Alacsony az expressziója az áttétes orr-garati rákokban¹⁶³. Az epeúti tumorokban található magas claudin-4 expresszió segítheti ezen entitások hepatocelluláris ráktól való elkülönítését¹⁶⁴.

A **Claudin-5** az endothelsejtek, valamint a vér-agy-gát TJ-jeinek fontos alkotóeleme^{165, 166}. Jelen van a podocyták membránjában¹⁵². Tüdő adenocarcinómában kifejeződik, míg a laphámrákokban nem, így mint differenciál-diagnosztikai eszköz használható¹⁶⁷.

A **Claudin-7** jelen van a vese proximális tubulusaiban¹⁴⁶. Emlőrákban mind a rák előtti állapotban, mind az invazív rákban csökkent az expressziója a normál hámphoz képest¹⁶⁸. Csökkent az expressziója colorectális, fejnyaki valamint prosztatákban^{169, 170, 171}.

A **Claudin-10** expressziója a hepatocelluláris májrák kiújulásának független markere¹⁷². Epeúti tumorokban szignifikánsan csökkent az expressziója a normál májhoz képest¹⁷³.

A dolgozat későbbi részében nem tárgyalt claudinokat az 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat: A későbbiekben nem tárgyalt claudinok

Claudin-6	jelen van az embrionális epitheliumban ¹⁷⁴ . Emlő sejtvonalakon fokozott expressziójának tumorszupresszor hatása van ¹⁷⁵ . A HCV koreceptora ¹⁷⁶ .
Claudin-8	jelen van a proximális tubulusban valamint a Henle-kacsban ¹⁴⁶ . A nefron távolabbi részeiből kiinduló veserákok érzékeny markere ¹⁷⁷ .
Claudin-9	hiánya süketséget okoz ¹⁷⁸ . Fokozott expressziója növeli a humán gyomor adenocarcinoma-sejtek invazivitását, migrációs képességét valamint proliferációs rátáját ¹⁷⁹ . A HCV koreceptora ¹⁷⁶ .
Claudin-11	jelen van a herében és az oligodendrocitákban ¹⁸⁰ . Deficiens egér süket lesz a stria vascularisból hiányzó TJ-ök miatt ¹⁸¹ . Fokozott expressziója spermiumképzési zavarral társul ¹⁸² .
Claudin-12	húgyhólyag ernyősejtjein megtalálható ¹⁸³ . Szerepe van az emésztőrendszerben a D vitamin indukálta Ca ²⁺ felszívásban ¹⁸⁴ .
Claudin-13	emberben nem mutatható ki ¹³⁵ .
Claudin-14	knockout homozigóta egér hallászavarban szenved a reticula lamina fokozott ionszelektivitása miatt ¹⁸⁵ .
Claudin-15	endothel sejtekben található ¹⁸⁶ ; elvesztése emésztőrendszeren keresztüli Na ⁺ veszteséget és glükóz felszívódási zavart okoz ¹⁸⁷ .
Claudin-16	szerepe van a vesében a Mg ²⁺ és a Ca ²⁺ transzportban ^{188,189} ; csökkent expressziója rossz prognózissal társul emlőrákokban, fokozott expressziója csökkenti az emlőrák-sejtek invazivitását ¹⁹⁰ .
Claudin-17	egér duodénumban expresszálódik ¹⁹¹ .
Claudin-18	a T/EBP/NKX2.1 homeodomén transzkripciós faktor downstream célgénje. A tüdőben és a gyomorban expresszálódik ¹⁹² .
Claudin-19	elvesztése viselkedési zavarokat okoz egerekben a Schwann sejtek megváltozása következtében ¹⁹³ ; metabolikus acidózisban patkány duodénumban emelkedett az expressziója ¹⁹¹ ; mutációja vesén keresztüli magnézium-vesztéssel, veseelégtelenséggel, valamint súlyos szem érintettséggel jár ¹⁹⁴ .
Claudin-20	retinafejlődés késői szakaszában jelenik meg a retinában ¹⁹⁵ .
Claudin-21	emberben kimutatták ¹³⁵ ; máj szövetben leírták ¹⁹⁶ .
Claudin-22	expressziója emelkedett patkány duodénumban metabolikus acidózisban ¹⁹¹ .
Claudin-23	normál patkány duodénumban mutatták ki ¹⁹¹ .
Claudin-24	emberben kimutatták ¹³⁵ ; jelenlétét bélben leírták ¹⁹⁶ .
Claudin-25-27	a legfrissebben leírt claudinok, melyek expresszióját Mineta és mtsai kimutatták szív, agy, máj, vese, gyomor és bélszöveteken ¹⁹⁶ .

I/3.1.4.1. Claudinok normál húgyhólyagban és húgyhólyagrákban

Az irodalomban kevés adattal rendelkezünk a normál valamint a daganatos húgyhólyag claudin expresszióról. Rickard és mtsai humán húgyhólyagsejteken végzett kutatásaik során a claudin-1, -4, -5, -7, -14 és -16 a membránra, míg a claudin-2, -8 és -12 sejten belülré lokalizálódott¹⁹⁷. Varley és mtsai normál húgyhólyaghámában a claudin-3-t az ernyősejtek találkozási pontjánál, a claudin-4-t, -5-t és -7-t pedig az ernyősejtek membránjában írta le. A claudin-4 és -7 megjelent továbbá a mélyebb rétegekben is, de expressziójuk jellemzően basalis irányba csökkent⁵. Felső húgyúti urotheliumban a claudin-1 a basalis/peribasalis, a claudin-3, -4 és -7 pedig a superficialis rétegekben volt kimutatható. A claudin-3 expressziója szignifikánsan összefüggött felső-húgyúti tumorok növekedési mintázatával, a stádiummal és a differenciáltsággal, míg a claudin-1 és -4 expresszió a stádiummal¹⁹⁸.

Boireau és mtsai claudin-1 és -7 esetében nem találtak lényeges eltérést húgyhólyagdaganatok expressziójában a tumor körüli hámmhoz viszonyítva, míg claudin-4 esetében szignifikáns változást találtak 26 esetben a 39 vizsgált esetből. A jól differenciált daganatokban megtalálható fokozott claudin-4 expressziót a high grade/invazív tumorokban csökkent expresszió váltotta fel, mely szignifikánsan összefüggött a tumorok egy éves túlélésével¹⁹⁹.

I/3.2. Egyéb fehérjék

A JAM-ek (Junkcionális adhéziós molekulák) az immunglobulinok családjába tartozó, glikozilált, egy transzmembrán doménnel, intracitoplazmatikus C-terminálissal, két extracelluláris Ig-szerű doménnel rendelkező fehérjék. Szerepük van a TJ-k barrier-funkciójának fenntartásában, a limfociták aggregációjában, a dentritikus sejtek, a Sertoli sejtek kapcsolatainak fenntartásában, továbbá egyes JAM-ek vírus-receptorként is működnek^{200, 201}.

II. Célkitűzés

Munkacsoportunk célul tűzte ki a claudinok, mint a húgyhólyagrakok új potenciális diagnosztikus markereinek vizsgálatát, mivel jelenleg nem rendelkezünk olyan önálló markerrel, ami önmagában felülmúlná a hagyományos klinikopatológiai jellemzők prognosztikai erejét.

A bevezetésben összefoglalt irodalmi adatok tükrében fel kívántuk tární a claudin és Ki-67 expressziós mintázat összetételét, az expresszió mértékét normál húgyhólyag urotheliumban, gyulladós húgyhólyaghamban valamint a húgyhólyag különböző patológiai stádiumú, differenciáltságú tumoraiban.

A vizsgálatainkkal hozzá kívánunk járulni a humán urotheliumban a claudin expressziós eloszlás feltérképezéséhez. Ezen túlmenően a feltárt adatokkal közelebb kívánunk kerülni a sejtkapcsoló struktúrák és ezen belül a claudinok szerepének megértéséhez a húgyhólyagrak kialakulásában és progressziójában, továbbá fel kívántuk tární a claudinok differenciál-diagnosztikai használhatóságán kívül azok esetleges prognosztikai szerepét is.

Hólyagrak vizeletből történő kimutatására használatos FISH alapú *in situ* hibridizációs technika alkalmazhatóságát kívántuk vizsgálni.

Specifikus célkitűzéseinket az alábbi pontokban fogalmaztuk meg:

- Célunk volt a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 mRNS és fehérje, valamint a Ki-67 fehérje expresszió vizsgálata független, nem tumoros mintákban és különböző stádiumú és differenciáltságú (low grade és high grade) húgyhólyagrakokban.

- Célunk volt a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, CK-5/6, CK-20 és Ki-67 fehérje expresszió lokalizációjának és erősségének vizsgálata urothelialis papillomában (UP), invertált urothelialis papillomában (IUP), PUNLMP-ben és low grade urothelialis carcinomában (LG-UCC).

- Vizsgálni kívántuk az egyes fehérjék esetleges differenciál-diagnosztikai szerepét, valamint a fehérje expresszió és a kiújulás mentes és a teljes túlélés közötti összefüggéseket.
- Célunk volt a hólyagrák vizeletből történő kimutatására használatos FISH alapú *in situ* hibridizációs technika fajlagosságának, érzékenységének vizsgálata.

III. Anyag és módszer

A humán húgyhólyagminták a Semmelweis Egyetem Urológia Klinikájáról származnak. A humán vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának engedélyének birtokában végeztük.

III/1. Beteganyag

Összesen 238 sebészileg eltávolított, formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) humán mintát vizsgáltunk (204 tumoros; 34 kontroll minta). Egyik kontroll esetnek sem volt korábban hólyagdaganata.

III/1.1. Beteganyag 1 – Low grade - High grade UCC-k

Összesen 103 sebészileg eltávolított, formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) humán mintát (86 UCC, 17 nem tumoros urothelium/kontroll/) vizsgáltunk. A nem tumoros eseteket nem gyulladósos (NGYK, 7 eset) valamint gyulladósos csoportokba osztottuk (GYK, 10 eset) /4. táblázat/.

4. táblázat: Nem tumoros minták (n=17)

Mintavétel indikációja	Szöveti diagnózis	
	NGYK (7)	GYK (10)
Visszatérő gyulladás	-	2
Véres vizelet	-	6
BPH	7	-
Hólyag kő	-	1
Vezikokután fisztula	-	1

BPH: Benignus prostata hyperplasia; NGYK: kontroll minták gyulladósos eltérés nélkül;
GYK: gyulladósos kontroll minták

A tumoros mintákat a legújabb, 2004-es WHO klasszifikáció alapján osztályoztuk. A páciensek átlagéletkora 66,5 év (43-91), a férfi:nő arány 2,9:1, az átlagos utánkövetési idő 45,96 (2-10) hónap volt. A teljes túlélést (TT) a kezdeti diagnózistól a vizsgálat végéig, vagy a páciens haláláig eltelt időként, míg a kiújulás mentes túlélést (KMT) a kezdeti diagnózistól a kiújulás megjelenéséig eltelt időként állapítottuk meg (5. táblázat).

5. táblázat: Húgyhólyagrákos minták klinikai és patológia adatai

Betegek patológiai és klinikai adatai	UCCs w/o T2 (Ta-T1)	T2	LG	HG	HG (w/o T2)
Teljes szám 86 (%)	64 (74%)	22 (26%)	27 (31%)	59 (69%)	37 (43%)
Low Grade	27/64(42%)	0	-	-	-
High Grade	37/64 (58%)	22/22(100%)	-	-	-
Dohányzás	29/64 (45%)	12/22 (55%)	14/27 (52%)	27/59 (46%)	15/59 (25%)
Nem (ffl: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)
Életkor (év)	65.38(46-91)	67.59(43-91)	62.89(47-81)	67.34(43-91)	67.18(46-91)
Multifokáltság	28/64 (44%)	6/22 (27.3%)	11/27(41%)	23/59 (39%)	17/59 (29%)
Szolid növekedési mintázat	8/64 (12.5%)	9/22 (41%)	2/27 (7.4%)	15/59 (25%)	4/59 (7%)
Intravesicalis kemoterápia	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%)
Szisztémás kemoterápia	0	5/22 (22.72%)	0	5/59(8%)	0
Cisztéktómia	2/64 (3%)	7/22 (32%)	0	9/59(15%)	7/59(12%)
Tumor kiújulás	20/64 (31%)	3/22 (14%)	13/27 (48%)	10/59 (17%)	7/59 (12%)
Progresszió	3/64 (5%)	0	0	3/59 (5%)	0
Kiújulás 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)
Halál	12(10*)	19(2*)	2(2*)	29(10*)	10(8*)

* halál nem UCC-ből kifolyólag; w/o nélkül (without)

BCG: bacillus Calmette-Guérin; Tumor kiújulás: műtétet követően diagnosztizált recidíva (abban az esetben, ha utóreszekció/második TUR történt, és a két műtét szövettana eltért, akkor a második reszekció szövettanát fogadtuk el végleges szövettannak); Progresszió: ha egy Ta-T1-es tumor izominvazívá (T2) vált; Multifokáltság: ha a tumor több mint egy területre lokalizálódott; Szolid növekedési mintázat: a tumor felszíne szolid (nem papilláris); UCC: urothelsejtes carcinoma (urothelial cell carcinoma)

Korai intravesicalis kemoinstillációt kaptak a betegek (korai IVI; a műtétet követően 6 órán belül), ha nem volt a műtétet követően vérzés, illetve, ha a perforáció

kizárható volt (5 eset: 2 LG és 3 HG). Ha a korai IVI kontraindikált volt és a beteg beleegyezett a kezelésbe, illetve a késői IVI-nek nem állt fenn kontraindikációja, akkor késői IVI kezelést végeztünk. BCG kezelést az aktuális EAU guideline-nak megfelelően a pT1G3, pTaG3, CIS vagy kiújuló/ terápia rezisztens pT1G1-2 tumorok kaptak a következő protokoll szerint: BCG kezelés 5 héten át (egy dózis hetente), amit fenntartó kezelés követett legalább egy éven keresztül²³.

Radikális cisztektómiát végeztünk, ha a beteg beleegyezett, illetve ha nem állt fenn kontraindikáció (7/22 T2 eset, 5. táblázat). A 22 T2-es betegből 5 beteg kapott szisztémás kemoterápiát.

III/1.2. Beteganyag 2 - Felületes húgyhólyagdaganatok

Összesen 80 TUR-ral eltávolított szöveti minta claudin expressziós profilját vizsgáltuk (5 független /nem tumoros/ normál, 15 IUP, 20 UP, 20 PUNLMP és 20 LG-UCC). A független normál minták közül egyik esetben sem volt korábban diagnosztizált hólyagrák.

1994 áprilisa és 2010 decembere között 30 invertált papillomát diagnosztizáltak Intézetünkben. Három esetben carcinoma is társult az invertált papillomákhoz. Ezen 30 eset klinikai adatait munkacsoportunk a Magyar Onkológiában 2010-ben leközölte²⁰². Miután az invertált papillomákat öt patológus (Prof. Schaff Zsuzsa, Prof. Tímár József, Dr. Székely Eszter; Dr. Székely Tamás; Dr. Kiss András) átnézte a 2004-es WHO osztályozás alapján, 15 formalin-fixált paraffinba ágyazott blokk bizonyult alkalmasnak az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésére.

Az átlagos utánkövetési idő 59,79 (3-126) hónap, a páciensek átlagéletkora 60,8 (9-91) év, a férfi:nő arány 1,5:1 (IUP: 2,75:1) volt. A kiújulás mentes túlélést a kezdeti diagnózistól az első, szövettanilag igazolt kiújulásig eltelt időben határoztuk meg.

III/1.3. Beteganyag 3 – UroVysion

Összesen 55 eset (43 szövettanilag igazolt UCC, 6 gyulladás, 2 hyperplasia, 2 papilloma, 2 eltérés nélkül) szövettani és vizeletmintáját elemeztük

III/2. Szövettan, immunhisztokémia

A szövetek 4%-os pufferolt formalinban fixálódtak 24 órán át. A diagnózisokat FFPE-blokkból készült, H&E festett metszetek alapján adtuk meg. FFPE-blokkokból készült 3-4 µm vastag metszeteket használtunk az IHK-hoz.

LG-HG húgyhólyagrágók vizsgálata során deparaffinálás után a metszeteket foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS) mostuk (pH 7,4), majd feltárást végeztünk mikrohullámú sütőben 3 percen át 850 W-on, majd 30 percen át 170 W-on antigén feltáró oldatban (Target Retrieval Solution, DAKO, Glostrup, Dánia). A reakciókat Ventana ES immunfestő-automatán (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA) avidin-biotin peroxidáz technikát, valamint diaminobenzidin festékanyagot használva a gyártó előírásainak megfelelően végeztük el (iView DAB Detection Kit, Ventana).

A felületes húgyhólyagdaganatok vizsgálata során a reakciókat multimer technológiát és diaminobenzidin festéket használó Benchmark XT immunfestő automata segítségével végeztük el a gyártó protokolljának megfelelően, a gyártó által ajánlott reagenseket használva (Ultra View Universal DAB detection Kit, Ventana, Tucson, AZ, USA). 15 IUP, 20 UP, 20 PUNLMP valamint 20 LG-UCC esetből szöveti multi-blokkokat (TMA – tissue microarray) készítettünk. Minden mintából két darab, 2mm átmérőjű hengert szúrtunk ki a TMA készítés során. Három véletlenszerűen kiválasztott esetet mind a négy csoportból, valamint a normál mintákat teljes blokkból készített metszeten is vizsgáltunk. Az IHK reakciókat mind pontozási rendszerrel, mind morfometriai program segítségével kiértékeljük a TMA és a teljes blokkból készült metszeten is. Nem volt eltérés az immunhisztokémiai reakciók eredményeiben a TMA és a teljes blokkból készült metszetek között.

Az antitestek, hígítások és a gyártó által ajánlott pozitív kontrollok a 6., 7. táblázatokban láthatóak (LG-HG 6. táblázat; Felületes húgyhólyagdaganatok 7. táblázat). Negatív kontrollhoz az antitestet elhagytuk és önmagában az antitest-oldószeret használtuk. A reakciók negatívnak bizonyultak.

6. táblázat Antitesthígítások és pozitív kontrollok (Benchmark ES)

Antitest	Hígítás	Pozitív kontroll	Gyártó	Antitest típus
CLDN-1	1:80	bőr	Zymed	nyúl poliklonális
CLDN-2	1:80	vastagbél	Zymed	egér monoklonális
CLDN-3	1:80	vastagbél	Zymed	nyúl poliklonális
CLDN-4	1:100	vastagbél	Zymed	egér monoklonális
CLDN-5	1:120	endothel	Zymed	egér monoklonális
CLDN-7	1:100	emlő	Zymed	nyúl poliklonális
CLDN-10	1:60	vese	Zymed	nyúl poliklonális
Ki-67	1:100	nyirokcsomó	DAKO	egér monoklonális

Zymed, South San Francisco, CA, USA; DAKO, Glostrup, Dánia

7. táblázat Antitesthígítások és pozitív kontrollok (Benchmark XT)

Antitest	Hígítás	Pozitív kontroll	Gyártó	Antitest típus	Lot szám
CLDN-1	1:100	bőr	Invitrogen	nyúl poliklonális	624568A
CLDN-2	1:50	vastagbél	Invitrogen	egér monoklonális	787052A
CLDN-3	1:80	vastagbél	Invitrogen	nyúl poliklonális	760684A
CLDN-4	1:200	vastagbél	Invitrogen	egér monoklonális	716863A
CLDN-7	1:100	emlő	Invitrogen	nyúl poliklonális	673366A
Ki-67	1:100	nyirokcsomó	DAKO	egér monoklonális	00070375
CK-5/6	1:2000	nyirokcsomó	DAKO	egér monoklonális	00033034
CK-20	1:600	vastagbél adenocarcinoma	DAKO	egér monoklonális	00032659

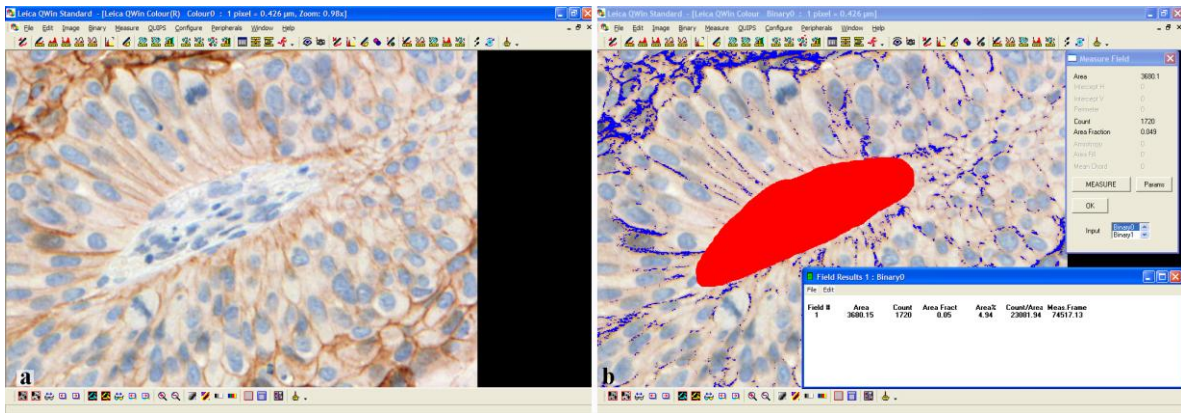
Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; DAKO, Glostrup, Dánia

III/2.1. Immunhisztokémia kiértékelése:**III/2.1.1. Morfometria**

A LG-HG tumorok vizsgálata során minden metszetből 10 (60x objektív, Olympus BX50 mikroszkóp, Olympus Corporation, Tokyo, Japán), míg a felületes húgyhólyagdanatok vizsgálata során, a metszeteket digitalizálása után, 15 egymást át nem fedő képet készítettünk (Mirax Midi metszet-szkennelő rendszer, 3D Histech, Budapest,

Magyarország). A claudin, a CK-5/6 és a CK-20 immunhisztokémia képeit kvantitatívan értékeltünk ki a Leica Qwin V3 morfometriai szoftverrel (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK, 3. ábra). A kiértékelés szempontjából nem releváns területeket nem vettük figyelembe (pl. nekrotikus, megégett területek, kötőszövet, 3. b ábrán piros színnel jelölve). A pozitív területek százalékos arányát (3.b. ábra, kék színnel jelölve a pozitív területet) a teljes vizsgált területhez viszonyítva adtuk meg. Az egyes esetekből készült 10, illetve 15 fotón mért adatok átlagértékével számoltunk a statisztikai analízis során.

3. ábra Morfometria a Leica Qwin V3 morfometriai szoftverrel



3.a. ábra: Claudin-4 immunhisztokémia egy látóterének kiindulási képe

3.b. ábra: A konvertált képen a kékkel jelölt pozitív terület százalékos aránya (4.94 %) a morfometriailag értékelt területen belül (pozitív pixel szám/teljes pixel szám). Piros színnel jelölve a kiértékelésből kivett kötőszövetes terület, mely 10.52 terület %-t képvisel. A kötőszövettel korrigált pozitivitás terület százalékos aránya: $4.94/(100-10.52)= 5.52 \%$. 400x nagyítás.

III/2.1.2. Szemi-kvantitatív scoring analízis

Három (LG-HG) illetve négy (Felületes húgyhólyagdaganatok) független vizsgáló regisztrálta a reakciók pontos lokalizációját és erősségét. Az egyes metszetek egy pontértéket kaptak, mely értéket úgy kaptunk, hogy a reakció intenzitását megszoroztuk a

terület-pozitivitással. A reakcióerősség pontértékei a következők voltak: 0 pont – negatív reakció; 1 pont – gyenge reakció; 2 pont – közepes reakció; 3 pont – erős reakció. Területszázalékos pozitivitás pontértékei a következők voltak: 1 pont (0-5%); 2 pont (6-25%); 3 pont (26-50%); 4 pont (51-75%); 5 pont (76-100%). Így a pontértékek 0 és 15 pont között mozogtak.

III/2.1.3. Ki-67 kiértékelés

A pozitív sejtek arányát az összes sejthez viszonyítva határoztuk meg esetenként 10 (LG-HG) illetve 15 (felületes húgyhólyagdaganatok) egymást nem átfedő látótérben (600x nagyítás).

III/2.2. Floureszcens immunhisztokémia

A vizsgálatokat FFPE blokkokból készült metszeteken végeztük. A nem specifikus fehérjék blokkolását a Protein Block Serum-Free oldattal végeztük (DAKO, Glostrup, Dánia). Ezután az 6. táblázatban található primer claudin-4 és claudin-7 ellenes antitestekkel 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk a metszeteket, majd Alexa Fluor 568 kecske anti-nyúl IgG-t (Invitrogen) PBS-ben 1:200-ra kihígítva használtunk szekunder antitestként szobahőmérsékleten 30 percig sötétben. A metszeteket 4',6-diamino-2 phenylindole (DAPI) magfestést tartalmazó Vectashield fedőanyaggal fedtük (Vector Labs., Burlingame, CA, USA).

Claudin-4 és -7 esetében a 6. táblázatban feltüntetett antitestek segítségével kettős jelölésű immunfluoreszcens reakciót is végeztünk. A metszeteket PBS-sel történő mosást követően Alexa Fluor 568 kecske nyúl-ellenes IgG (Invitrogen; 1:200) és Alexa Fluor 488 számár egér-ellenes (Invitrogen, 1:200) antitesteket használtunk másodlagos antitestként. A reakciókat Leica DM-RXA fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékeltük (Leica, Wetzlar, Germany).

III/3. Kvantitatív valós idejű PCR vizsgálat (primerek és PCR reakciók)

III/3.1. RNS-izolálás

Teljes RNS-t FFPE szövetekből (70 UCC, 4 NGYK és 4 GYK) High Pure RNA Paraffin Kit-tel izoláltunk (Roche, Indianapolis, IN, USA) a gyártó protokolljának megfelelően. A mintákat makrodisszekáltuk a tisztán nem tumoros valamint a tisztán tumoros területek vizsgálatához. A proteináz-K emésztés minden esetben 16 óra volt 55 °C-on.

III/3.2. RNS reverz transzkripció

2 µg teljes RNS-t írtunk át 20µl reakcióelegyben (High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems – ABI, Foster City, CA, USA) a gyártó előírásainak megfelelően: 37 °C-on 60 percig, 95 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd további felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

III/3.3. Valós idejű kvantitatív RT-PCR

A valós idejű PCR reakciókat duplikátumokban végeztük el a Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 (cél gének) és a beta-aktin (referencia gén) esetében. Reakciónként 100 ng cDNS-t használtunk, a teljes reakció végtérfogata 25 µl volt (SYBR Green PCR Master Mix, ABI, AB4309155). A primerszekvenciák a 8. táblázatban vannak feltüntetve. A valós idejű PCR reakciók paraméterei a következők voltak: 2 perc kezdeti denaturálás 95 °C-on, majd 40 ciklus 95 °C-on 20mp-ig, 60 °C-on 30 mp-ig és 72 °C-on 1 percig. A reakciókat ABI Prism 7000 sequence detecting system segítségével végeztük el (Applied Biosystems). Az adatkiértékelés az $E=2^{\Delta CT}$ ($\Delta CT=CT\text{-referencia gén} - CT\text{-cél gén}$) képlettel történt. A duplikátumok átlag CT értékével számoltunk.

8. táblázat Claudinok és a β -actin primerszekvenciái

Gén	3'→5'	5'→3'
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 tgc 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
β -actin	cct ggc acc cag cac aat	ggg ccg gac tgc tca tac

III/4. UroVysion**III/4.1. Vizelet előkészítés**

A Vysis FISH Pretreatment Reagent Kit előírásainak megfelelően a reggeli első valamint második vizelést legfeljebb fél órát követően, a vizelet 33 ml-éhez 17 ml Carbowax oldatot adtunk (2% Polyethylene glycol 1550 [SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország] 50%-os etanolban [Merck KGaA, Darmstadt, Németország]), ami lehetővé tette a minta tárolását 72 óráig 4 °C -on a további feldolgozásig. A mintákat centrifugáltuk (600 g, 10 perc), és a továbbiakban az üledéket használtuk. Ezután 10 ml PBS-ben mostuk, majd újra centrifugáltuk a sejteket (600g, 10 perc). A kiülepített sejteket a kevés visszamaradó felülúszóban reszuszpendáltuk, majd a sejtekhez 5 ml Carnoy fixálót (metanol [Fluka Chemie GmbH, Buch, Svájc]: jégecet [Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Németország] 3:1) hozzáadva -20 C°-on tartottuk a mintákat legalább 30 percig. Újbóli centrifugálás után (600 g, 5perc) a megfelelően tiszta pelletet 500 μ l fixálószerben oldottuk; nem megfelelő tisztaságú pellet esetén a Carnoy fixálás mosást megismételtük.

III/4.2. Kenet készítés, előkezelés

Kenet készítéshez 3 µl, 10 µl, 30 µl sejtszuszpenziót tárgylemezre cseppentve, levegőn szárítva vizsgáltunk mikroszkóp alatt. A megfelelően sejtűs területeket körbejelöltük.

Előkezelés során a megfelelően száradt keneteket 2x SSC (nátrium-klorid és nátrium-citrát) oldatba helyezve inkubáltuk 37 °C-on 60 percig, majd pepszin oldatban (0,5 mg/ml, pH 1.0) mostuk 15 percig 37 °C-on, amit 1x PBS-ben történő mosás követett 5 percig. Ezután utófixálást végeztünk 1%-os formaldehidben 5 percig, 1x PBS-ben 5 percig, 70-85-100% etanolban (Merck KgaA, Darmstadt, Németország) egyenként 1 percig, ezt követően hagytuk megszáradni a keneteket.

III/4.3. FISH (Fluoreszcens *in situ* hibridizáció)

Az UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit (Vysis, Inc.) előírásainak megfelelően a DNS-próba keveréket 3 µl-enként adtuk hozzá a megjelölt sejtűs területekhez, majd fedőlemezzel hermetikusan fedtük a keneteket. A tárgylemezeket ezután egy Eppendorf Master Cycler Gradient PCR gép (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) feltétjére helyeztük a DNS próbák és a sejtek DNS-ének párhuzamos denaturálása céljából (2 perc, 73 °C), majd egy éjszakán át hibridizáltuk 39 °C-on. A fedőlemez eltávolítása után a lemezeket 2 percre 0,4x-es SSC/0,3%-os NP-40 73 °C-os oldatába, majd 1 percig 2x-es SSC/0-1%-os NP-40 szobahőmérsékletű oldatába helyeztük. A készítményeket ezután szobahőmérsékleten, sötétben, levegőn szárítottuk, majd 3 µl DAPI-II magfestéket tartalmazó, elhalványulást gátló anyaggal fedtük a lemezeket. Az UroVysion DNS próba a 3-as, 7-es és 17-es kromoszóma pericentromér régiója (Chromosome Enumeration Probe /CEP/ 3, CEP 7, CEP 17) valamint a 9p21-es lókuszt (Losuc Specific Identifier /LSI/ 9p21) direkt jelölésű próbájából állt. A CEP 3 SpectrumRed (vörös), a CEP 7 SpectrumGreen (zöld), a CEP 17 SpectrumAqua (világoskék), az LSI 9p21 SpectrumGold (aransárga) jelölésű volt.

III/4.4. Fluoreszcens mikroszkópia

A hibridizációs vizsgálatok kiértékelése speciális szűrőkkel felszerelt (SpectrumRed, SpectrumGreen, SpectrumAqua egyszeres szűrők valamint DAPI/FITC/Texas Red három sávú szűrő) motorizált Leica DM RXA (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) fluoreszcens mikroszkóppal történt. A fluoreszcens jeleket 1000x-es nagyításon készült képeken detektáltuk nagy teljesítményű, Leica CW4000 Fish program (Leica Microsystems Imaging Solutions LTD., Cambridge, Anglia) által vezérelt Pieper FK-7512 IQ monokróm kamerával (Pieper GmbH, Schwerte, Németország).

III/4.5. Kiértékelés kritériumai

Pozitívnak vettük a mintát, ha egyáltalán nem volt LSI 9p21 szignál legalább 12 sejtben, vagy, ha a CEP 3, CEP 7 és CEP 17 közül legalább kettő esetében négy vagy több sejtben gain volt kimutatható, azaz 3 vagy több szignál volt sejtenként. Esetenként legalább 25 kóros sejtet vizsgáltunk. Egyéb esetekben addig folytattuk a számolást, amíg az előírásnak megfelelő kritériumok teljesültek, vagy míg az egész mintát végig elemeztük. Kórosnak tekintettünk egy sejtet, ha az UroVysion teszt alapján citológiai atípiát mutatott és/vagy megfelelt az UroVysion Bladder Kit citogenetikai atípiakritériumainak és/vagy egyéb citogenetikai eltérésekkel társult (részleges 9p21 deléció, 9p21 felszaporodás, 3-as, 7-es vagy 17-es kromoszóma deléciója). A citológiai abnormalitást morfológiai eltérések alapján határoztuk meg (magnagyobbodott, abnormális sejtméret, megváltozott sejt:sejtmag arány).

III/5. Statisztika

Normalitás vizsgálat után nem-parametrikus Mann-Whitney U és ANOVA teszttel (Kruskal-Wallis) hasonlítottuk össze az expressziós értékeket az egyes vizsgált csoportok között, mivel a minták nem követték a normál eloszlást. A kategorikus változók vizsgálata

esetén Chi^2 vagy Fisher f?ele exact tesztet haszn?altunk. TT ?s KMT anal?iziseket Kaplan-Meier m?odszerrel v?egezt?uk el. A k?ul?n?b?oz? t?ul?elési g?orb?ek ?sszehasonl?ítás?hoz log-rank tesztet alkalmaztunk. A szemi-kvantitatív ?s a kvantitatív anal?zis eredm?enyei k?oz?tti korrel?áci?ot a Spearman f?ele korrel?ációs tesztel vizsg?altuk. A statisztikai elemz?ést a Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA; LG-HG, fel?ületes h?úgyh?ólyagdaganatok) valamint a GraphPad Prism 2.01-es programokkal v?egezt?uk (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA; UroVysion). $P < 0.05$ val?os?ín?s?égi ?rt?ekeket fogadtuk el szignifik?ansnak.

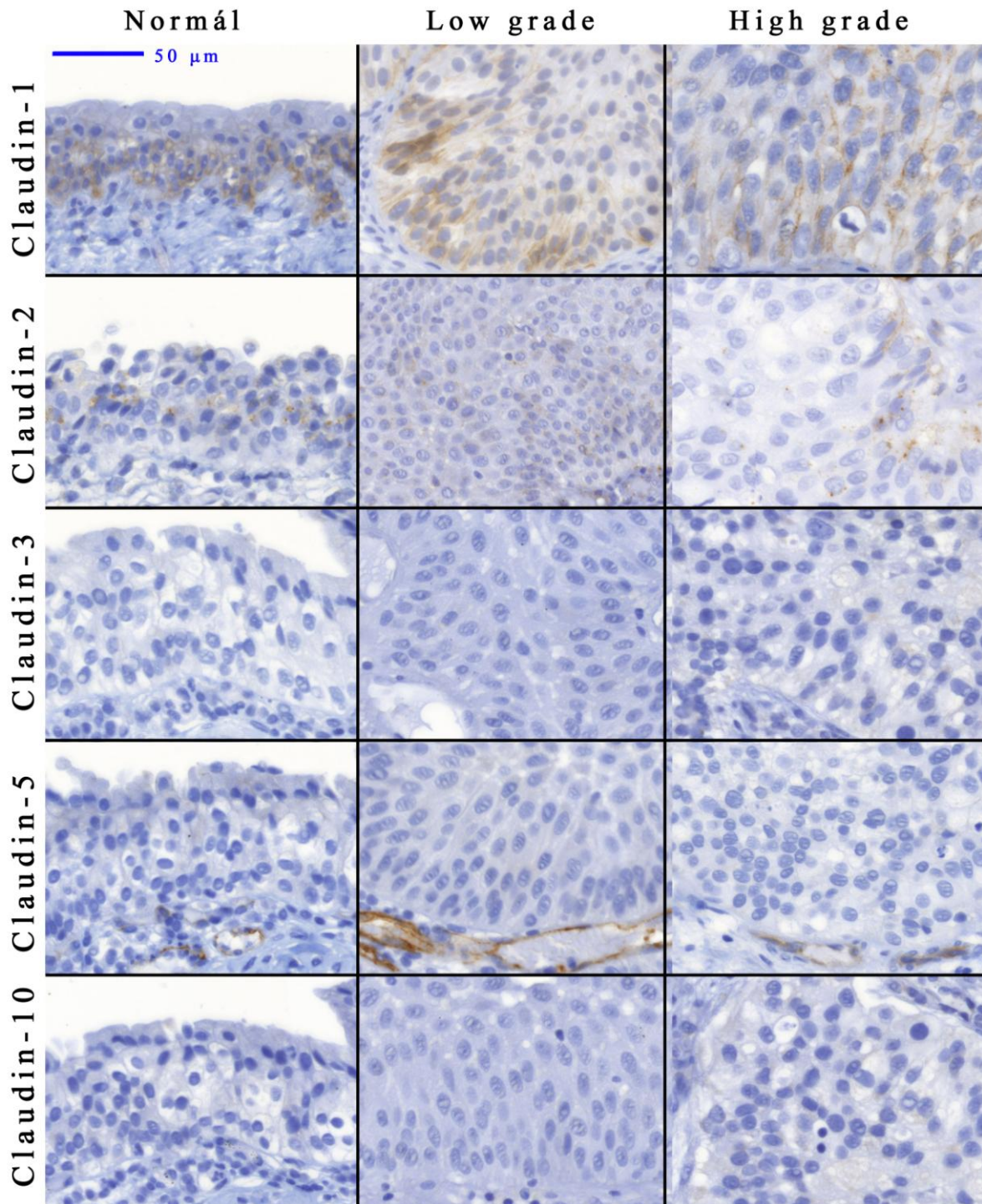
IV. EREDMÉNYEK

IV/1. Immunhisztokémia és RT-PCR vizsgálat nem-tumoros urotheliumban

Az egyes claudinok hámon belüli expressziós mintázata és lokalizációja a vizsgált csoportok esetében hasonló volt az irodalomban korábban közölt adatokhoz^{5, 198, 199}. Claudin-1 membrán-pozitivitás főként az urothel basalis rétegeiben jelent meg (4., 5. ábra). Claudin-2 perimembránózus-citoplazmatikus granuláris reakciót adott a basalis/peribasalis rétegekben (4., 6. ábra). Claudin-3 és -5 gyenge reakciót adott néhány mintában a hám felső rétegeiben (4., 7. ábra). Claudin-5 kimutatható volt az erek endotheljében, s ezt a reakciót mint egy belső pozitív kontrollként is használtuk vizsgálataink során. Claudin-4 és -7 membrán-pozitivitás a hám felső rétegeiben volt detektálható, jellemzően basalis irányban csökkenő intenzitással (5., 6. és 8. ábra). Azonban, a claudin-7 pozitivitás néhány esetben a hám egész terjedelmében megjelent. Claudin-10 nem volt kimutatható (4. ábra). Mind normál, mind a gyulladásos hámban elszórt Ki-67 pozitivitást találtunk (7., 8. ábra).

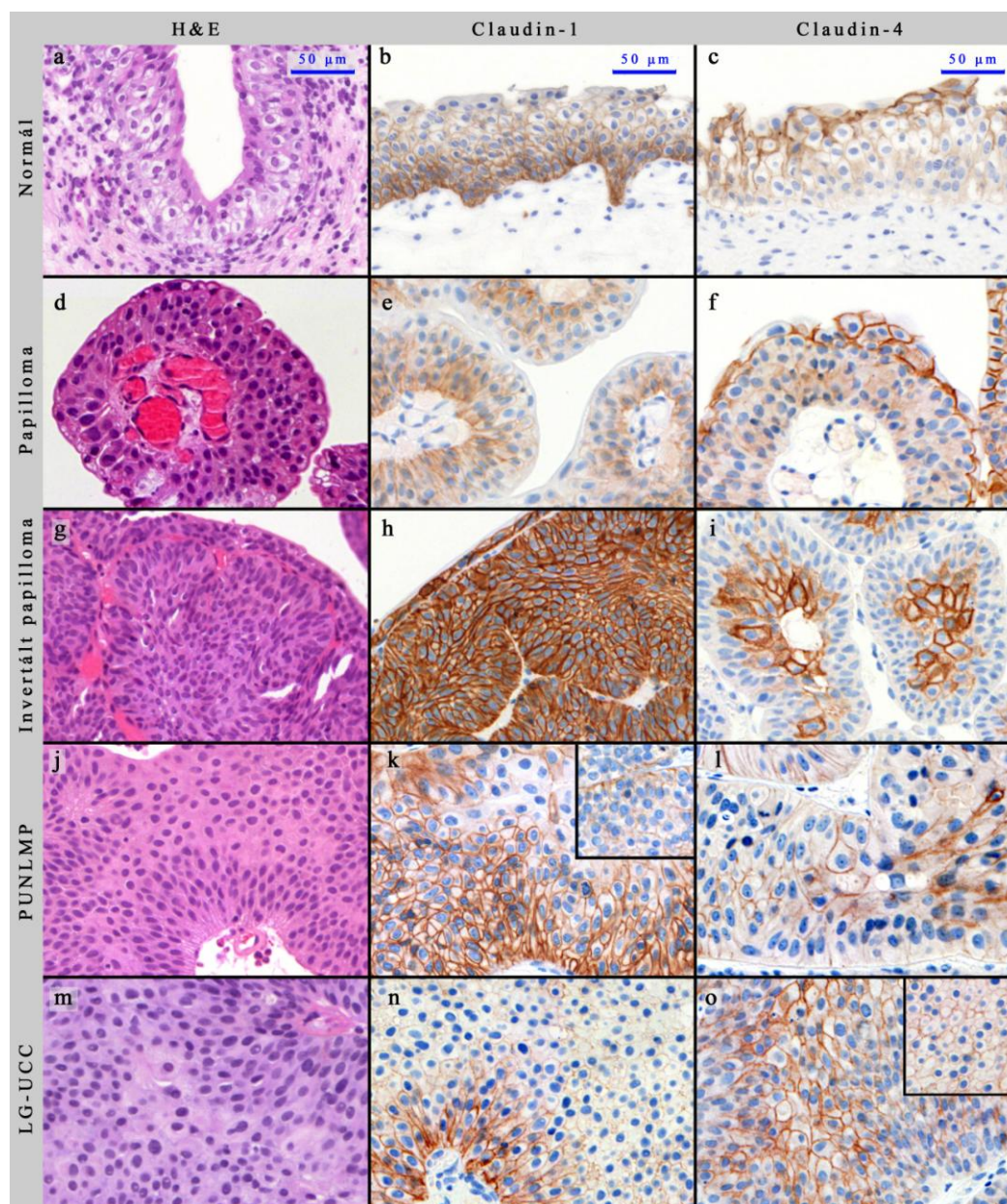
A gyulladásos minták szignifikánsan magasabb claudin-2 (morfometria: $p=0.0007$; scoring analízis: $p=0.034$) és claudin-4 (morfometria: $p=0.039$; scoring analízis: $p=0.014$) fehérje valamint claudin-7 ($p=0.047$) mRNS expressziót mutattak a nem gyulladásos mintákhoz viszonyítva (9.a., b. táblázat).

4. ábra: Claudin-1, -2, -3, -5 és -10 expresszió normál urothelben, low és high grade UCC-ben



A fényképek azonos nagyítással és beállításokkal készültek, lépték: 50μm.

5. ábra: H&E, claudin-1 és -4: normál urothel, UP, IUP, LG-UCC



7. a., d., g., j., m. ábra: H&E festés: normál urothelium; UP; IUP; PUNLMP; LG-UCC

7. b., e., h., k., n. ábra: Claudin-1 festés: normál urothelium; UP; IUP; PUNLMP; LG-UCC

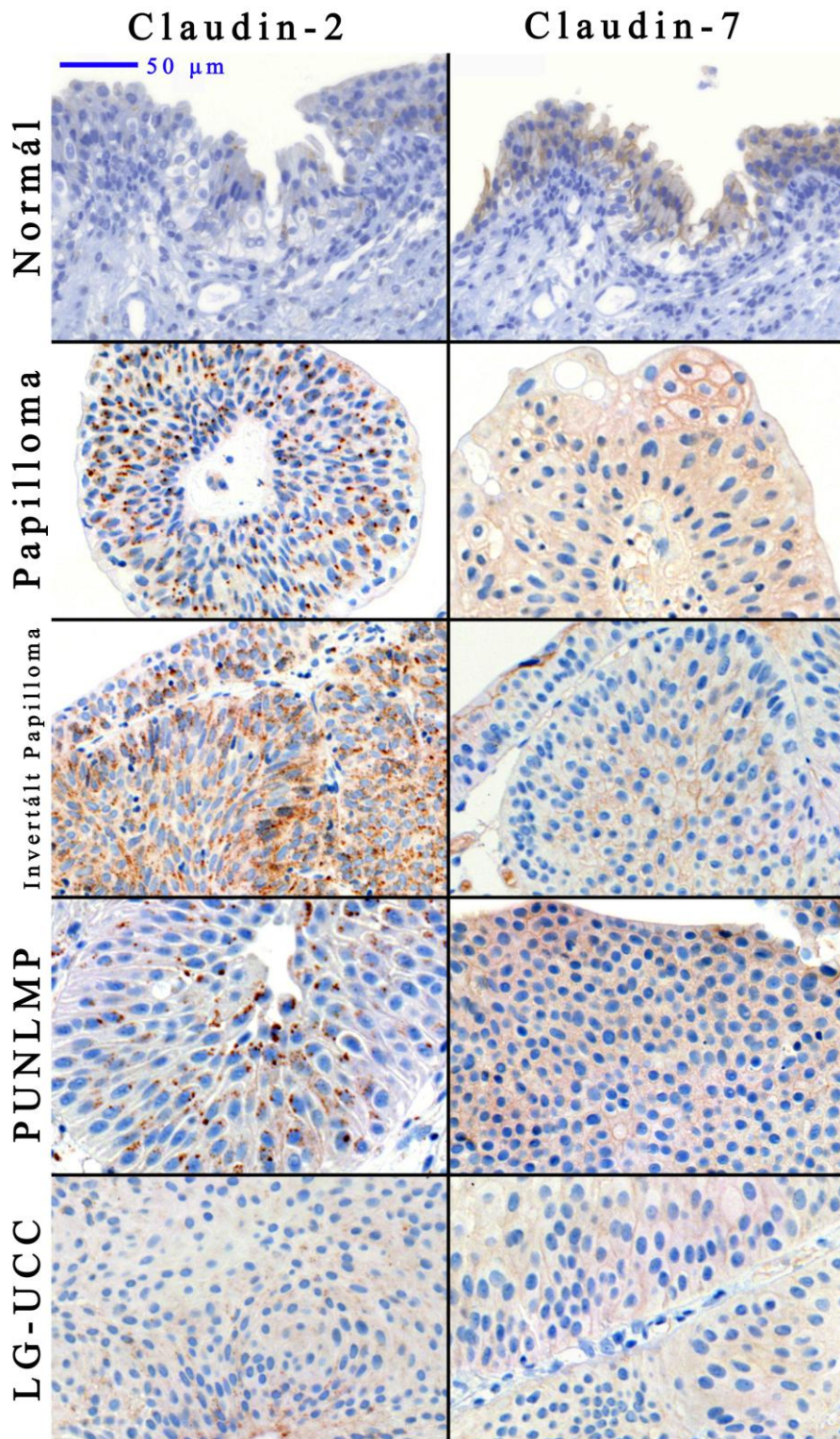
7. c., f., i., l., o. ábra: Claudin-4 festés: normál urothelium; UP; IUP; PUNLMP; LG-UCC

A claudin-4-et a medián felett (o) és a medián alatt (o inzertje) LG-UCC-k

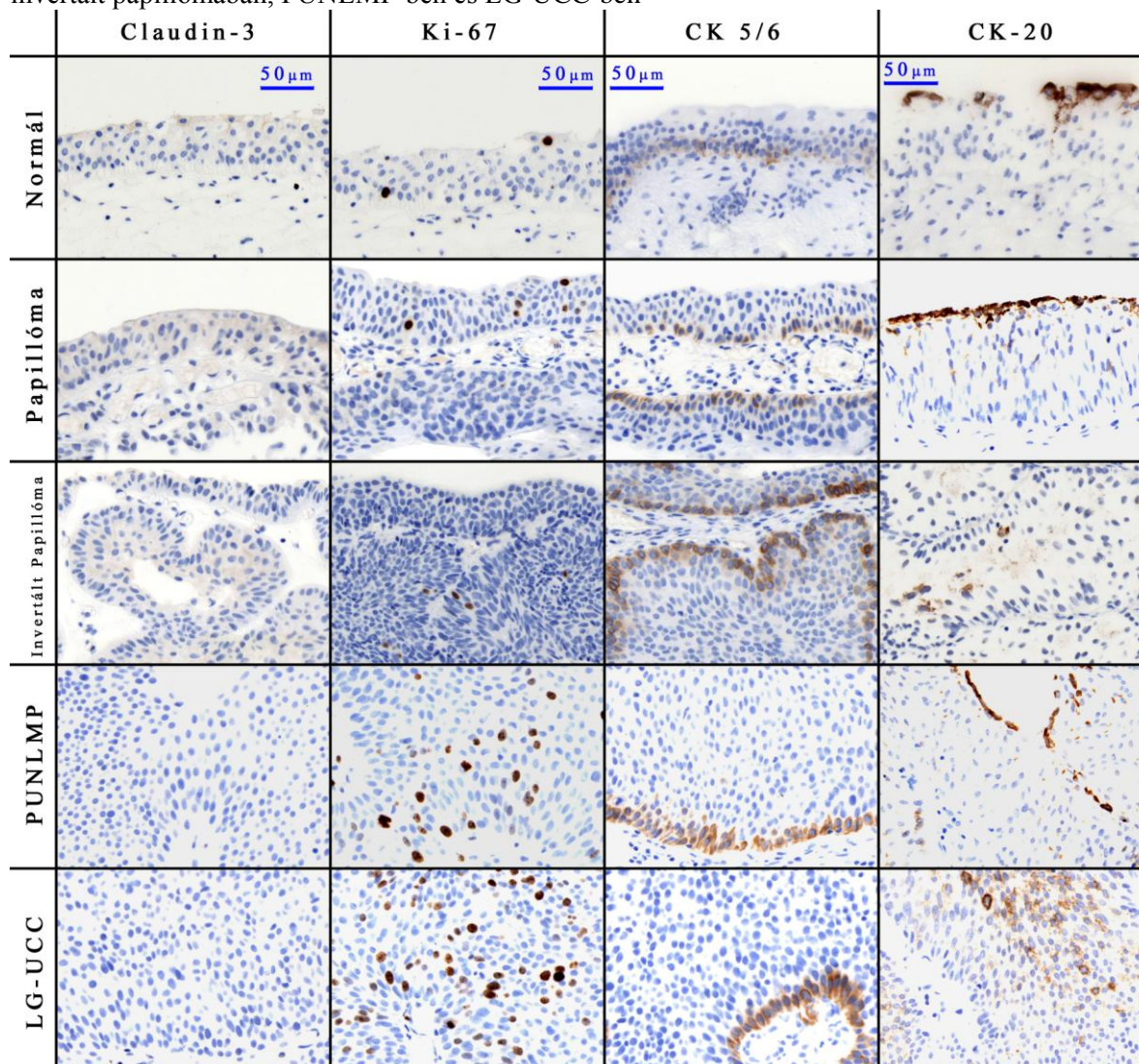
A claudin-1-et a medián felett (k) és a medián alatt (k inzertje) PUNLMP-k

UP: urotheliális papilloma; IUP: invertált urotheliális papilloma; PUNLMP: alacsony malignus potenciálú papilláris urotheliális neoplasia, LG-UCC: low grade urothel sejtes carcinoma
lépték: 50 µm; minden fénykép egységes beállításokkal készült (az inzerteket beleértve).

6. ábra: Claudin-2 és -7 expresszió normál hámban, papillomában, invertált papillomában, PUNLMP-ben és LG-UCC-ben

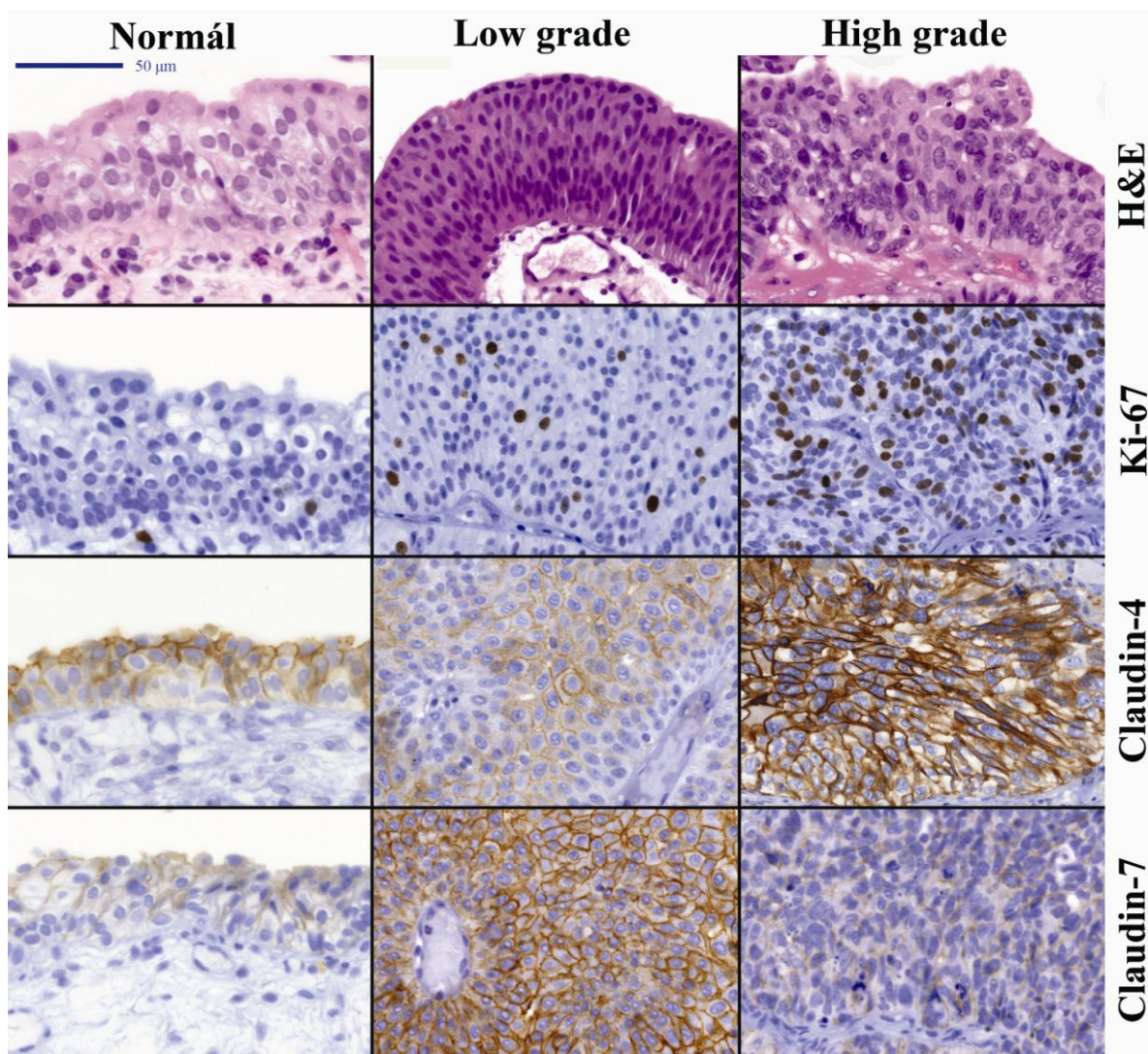


7. ábra: Claudin-3, Ki-67, CK-5/6 és CK-20 expresszió a normál urothelben, papillómában, invertált papillómában, PUNLMP-ben és LG-UCC-ben



Claudin-3 nem, vagy nagyon gyengén volt kimutatható. Ki-67 a normál hámban, a papillómában és az invertált papillómában alacsonyán expresszálódott, általában a basalis hámrétegekben, míg PUNLMP-ben és Ki-67-ben a hám egész terjedelmében. CK-5/6 a hám basalis, míg a CK-20 a hám superficialis rétegeiben jelent meg. CK-20 pozitívítás LG-UCC-k esetén nem az intermedier és basalis rétegekben is megjelent az esetek egy részében.

8. ábra: Claudin-4, -7 és Ki-67 expresszió normál húgyhólyaghámában



A képek azonos nagyítással és beállításokkal készültek, lépték: 50µm.

High grade tumorok szignifikánsan magasabb Ki-67 ($p < 0.0001$), CLDN-4 ($p = 0.037$) és szignifikánsan csökkent CLDN-7 ($p < 0.0001$) fehérje expressziót mutattak a low grade tumorokhoz viszonyítva.

9.a. táblázat: Claudin fehérje, mRNS és Ki-67 fehérje expresszió összehasonlítása a kontroll és tumoros mintákban

	<u>NGYK</u> vs GYK	<u>NGYK</u> vs UCC	<u>GYK</u> vs UCC	<u>LG</u> vs HG*	<u>LG</u> vs HG**
Claudin-1 IHK	↑ (0.386)	↓(0.014)	↓(0.001)	↓(0.078)	↓(0.035)
Claudin-2 IHK	↑ (0.007)	↑(0.489)	↓(0.001)	↑(0.913)	↑(0.337)
Claudin-4 IHK	↑ (0.039)	↑(0.125)	↓(0.082)	↑(0.037)	↑(0.011)
Claudin-7 IHK	↑ (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)
Ki-67	↓(0.245)	↑(0.076)	↑(0.196)	↑(< 0.001)	↑(< 0.001)

9.b. táblázat: Claudin fehérje expresszió összehasonlítása a kontroll és tumoros mintákban szemi-kvantitatív analízissel

	<u>NGYK</u> vs GYK	<u>NGYK</u> vs UCC	<u>GYK</u> vs UCC	<u>LG</u> vs HG*	<u>LG</u> vs HG**
Claudin-1 IHK	↑ (0.337)	↓(0.047)	↓(0.003)	↓(0.914)	↓(0.049)
Claudin-2 IHK	↑ (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 IHK	↑ (0.637)	↑(0.373)	↓(0.081)	↓(0.014)	↓ (0.024)

* T2-vel ;** T2 nélkül;

IHK: immunhisztokémia; *NGYK*: kontroll minta gyulladás nélkül; *GYK*: gyulladással kontroll minta; Szignifikáns eltérések vastagon vannak szedve; vs= viszonyítva /versus/; Mann-Whitney U tesztet használtuk két egymástól független csoport közötti különbség vizsgálatára (Ta-T1 vs T2; LG vs HG) ; A nem aláhúzott csoportokat viszonyítottuk az aláhúzott (referencia) csoportokhoz.

↑ a nem aláhúzott csoportok magasabb expressziót mutatnak a referencia csoporthoz képest.

↓ a nem aláhúzott csoportok alacsonyabb expressziót mutatnak a referencia csoporthoz képest.

() p-értékek;

A gyulladással mintákban az ernyősejtekben is kimutatható volt a claudin-2, míg a nem gyulladással mintákban általában nem láttunk reakciót ezen lokalizációban.

IV/2. Immunhisztokémia és RT-PCR vizsgálat tumorokban

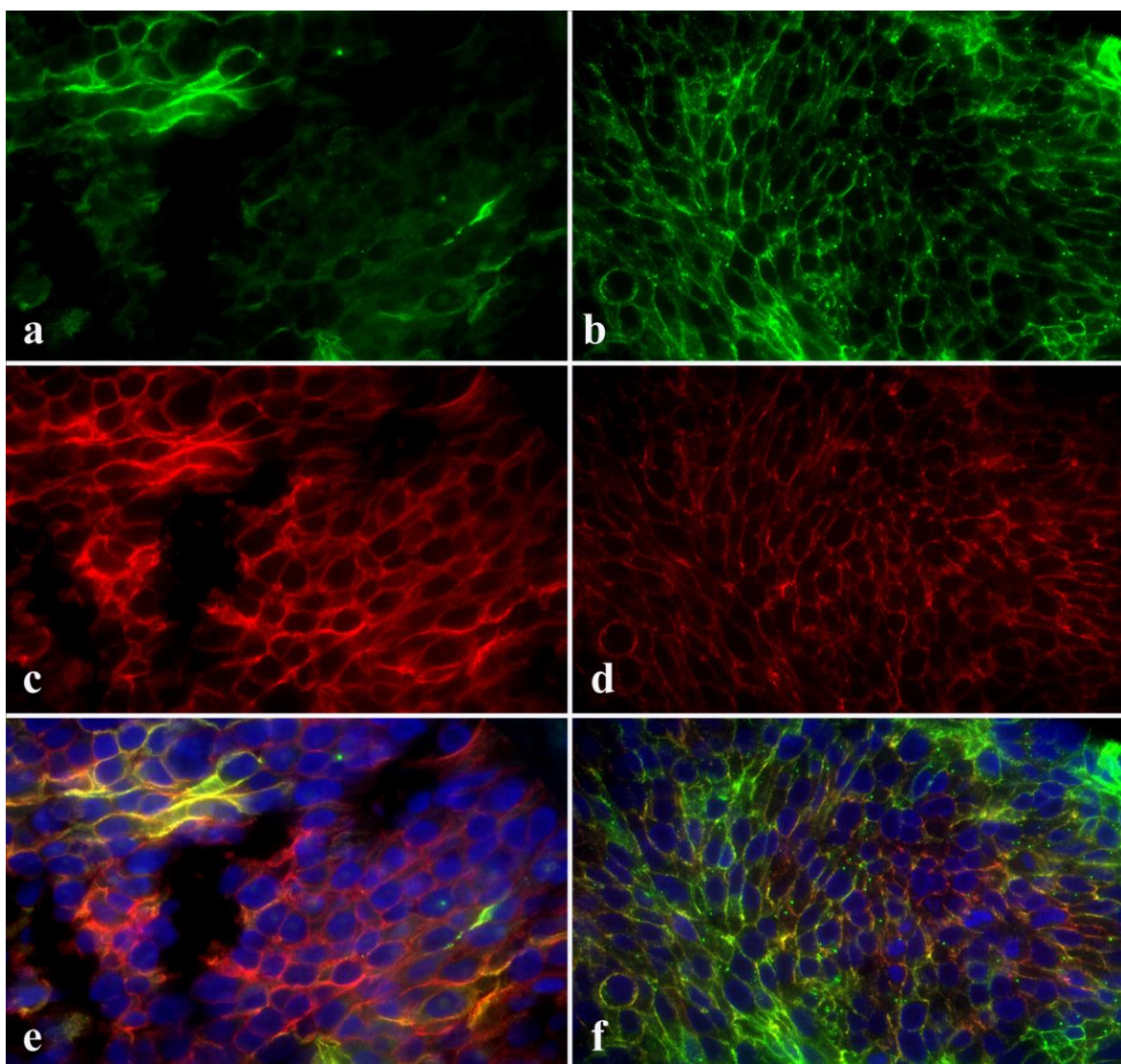
Claudin-1, -2, -4 és -7 kimutatható volt legtöbb esetben. Claudin-3 és -5 csak néhány, többségében jól differenciált tumorban volt detektálható. Claudin-10 nem volt kimutatható. A hám rétegei szerinti eloszlása a claudin-1, -2, -4 és -7-nek a daganatokon belül hasonló volt a normál hámban találtakhoz, míg a claudin-4 az UCC-kben döntően a hám egész terjedelmében megjelent. Invertált papillomákban kérdéses lehet a szöveti orientáció megítélése a H&E metszetek alapján (5. ábra, 46. oldal), ezért is fontos lehet a claudinok standard hámon belüli eloszlása.

A tumoros minták csökkent claudin-1 ($p=0.01$) és emelkedett claudin-2, -4 és -7 valamint Ki-67 fehérje és emelkedett claudin-1, -2, -4 és -7 mRNS expressziót mutattak a nem-gyulladásos kontrollhoz képest (9. táblázat, 50. oldal).

A LG és a HG csoportok összehasonlítása hasonló eredményeket adott mind a T2-es tumorokat belevéve(*), mind kihagyva(**) azokat a HG csoportból (9.a táblázat, 50. oldal).

A HG tumorok szignifikánsan magasabb claudin-4 ($p^*=0.037$; $p^{**}=0.011$; 8. ábra, 49. oldal) és Ki-67 ($p^*<0.001$; $p^{**}<0.001$; 8. ábra, 49. oldal) valamint szignifikánsan alacsonyabb claudin-1 ($p^{**}=0.035$) és claudin-7 ($p^*=0.025$; $p^{**}<0.001$; 8. ábra, 49. oldal) fehérje expressziót mutattak a LG tumorokhoz viszonyítva. A szemi-kvantitatív scoring vizsgálat eredménye hasonló szignifikáns különbségeket adott (9.b táblázat, 50. oldal). Csökkent claudin-1 ($p^*=0.025$; $p^{**}=0.017$) és emelkedett claudin-2 ($p^*=0.002$; $p^{**}=0.009$) és claudin-4 ($p^*<0.001$; $p^{**}<0.001$) mRNS expressziót találtunk a HG UCC-kben a LG UCC-khez képest (9. táblázat, 50. oldal). A HG tumorokban a LG tumorokhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb volt azoknak a tumoroknak az aránya, amelyek a claudin-4-et a tumor egész terjedelmében expresszálták, míg a LG tumorok inkább a normálhoz hasonló lokalizációban, azaz a hám felső rétegeiben expresszálták a claudin-4-et (χ^2 test; $p^*<0.001$; $p^{**}<0.001$).

Fluoreszcens vizsgálatok során az esetek többségében a claudin-4 és claudin-7 kolokalizációja volt megfigyelhető. Az immunfluoreszcens analízis is alátámasztotta a fentebb említett különbséget a LG és HG tumorok között: a HG-ben emelkedett a claudin-4 és csökkent a claudin-7 expresszió (9. ábra).

9. ábra: Claudin-4 és -7 Immunfluoreszcens vizsgálata low és high grade UCC-ben

9.a., c., e. ábra claudin-4, claudin-7 és ko-lokalizációjuk low grade UCC-ben.
 9.b, d., f. ábra. claudin-4, claudin-7 és ko-lokalizációjuk high grade UCC-ben.
 600x nagyítás.

A PUNLMP-k és a LG-UCC-k közül néhány esetben a claudin-1 és -4 a tumor egész terjedelmében pozitivitást mutatott. Az invertált papillomák 73%-ban (11/15) a claudin-1 a daganat teljes terjedelmében pozitív volt (5. ábra, 46. oldal). Claudin-1 és -2 expresszió alacsonyabb volt a LG-UCC-kben a papillomákhöz, invertált papillomákhöz és a PUNLMP-khez képest. Claudin-4 és -7 expresszió nem mutatott jelentős eltérést az egyes

csoportok között. Egyik esetben sem találtunk emelkedett claudin-3 expressziót (10. ábra). Azonban csak a claudin-1 esetében találtunk szignifikáns eltérést az egyes csoportok között: az invertált papillomákban szignifikánsan magasabb volt a claudin-1 expresszió a papillomákhoz, LG-UCC-khez és a PUNLMP-khez viszonyítva, mind a morfometria, mind a szemi-quantitatív kiértékelés eredménye alapján (10.a, b. táblázat; 5. ábra, 46. oldal; 10. ábra, 56. oldal).

10.a. táblázat: Morfometria eredményei

Festés	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	0.001*	1.000	0.040*	1.000	1.000
	UP	20.21	2.09		0.006*	1.000	1.000	
	IUP	34.95	3.74		0.047*	0.002*		
	PUNLMP	22.74	3.14		1.000			
	LG-UCC	18.65	3.46					
claudin-2	Normál	0.44	0.15	0.104	1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	1.27	0.29		1.000	1.000	0.057	
	IUP	1.21	0.56		1.000	1.000		
	PUNLMP	0.81	0.29		1.000			
	LG-UCC	0.33	0.08		1.000			
claudin-4	Normál	2.56	1.20	0.631	1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	4.77	0.77		1.000	1.000	1.000	
	IUP	3.92	1.02		1.000	1.000		
	PUNLMP	4.11	0.51		1.000			
	LG-UCC	4.03	0.66		1.000			
claudin-7	Normál	0.284	0.094	0.162	1.000	1.000	1.000	0.620
	UP	0.15	0.06		1.000	1.000	1.000	
	IUP	0.24	0.10		1.000	1.000		
	PUNLMP	0.21	0.09		1.000	0.720		
	LG-UCC	0.07	0.05		1.000			

10.a. táblázat: morfometria eredményei;

10.b. táblázat: a score x intenzitás vizsgálat eredményei,

10.c. táblázat: Ki-67 vizsgálat eredményei

Átlag, standard hiba (St.Hiba) és a Kruskal-Wallis test p értékei vannak feltüntetve a 10. táblázatban együtt az egyes csoportok közötti fehérje expresszió összehasonlításával (normál, UP, IUP, PUNLMP and LG-UCC). A szignifikáns változások ($p < 0.05$) vastagon vannak szedve és csillaggal (*) vannak megjelölve. UP: urothelialis papilloma; IUP: invertált urothelialis papilloma; PUNLMP: alacsony malignus potenciálú papilláris urothelialis neoplasia; LG-UCC: low grade urothel sejtes carcinoma; vs: versus, viszonyítva

10.b. táblázat: A szemi-kvantitatív (score x intenzitás) vizsgálat eredményei

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

10.c. táblázat: Ki-67 vizsgálat eredményei

Festés	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	<0.001*	1.000	1.000	0.323	<0.001*
	UP	3.27	0.41		1.000	0.038*	<0.001*	
	IUP	5.37	1.55		0.223	<0.001*		
	PUNLMP	9.27	1.87		0.621			
	LG-UCC	17.88	2.87					

11. táblázat A CK-5/6 és CK-20 expresszió morfometria analízisének eredményei

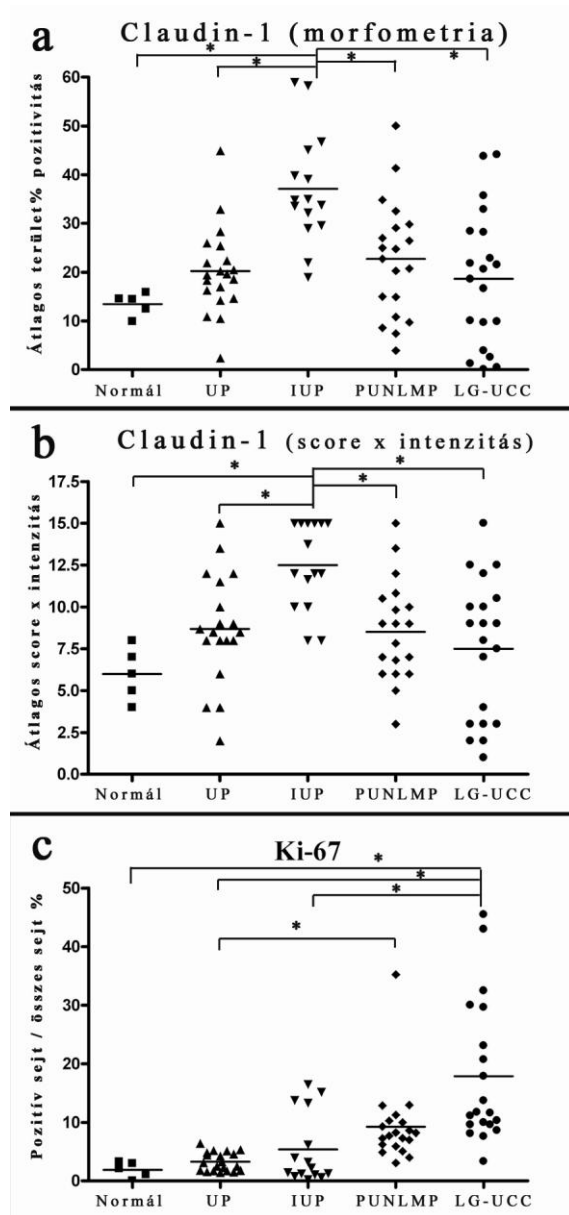
Festés	Csoport	Átlag	St.Hiba	Kruskal-Wallis teszt p érték	vs UP p érték	vs IUP p érték	vs PUNLMP p érték	vs LG-UCC p érték
CK-5/6	Normál	1.12	0.30	0.608	1.000	1.000	1.000	1.000
	UP	1.13	0.46			1.000	1.000	1.000
	IUP	1.10	0.56				1.000	1.000
	PUNLMP	2.72	0.72					1.000
	LG-UCC	2.23	1.05					
CK-20	Normál	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					

Szignifikáns változások vastagon vannak szedve és csillaggal vannak jelölve*

UP: urothelialis papilloma; *IUP*: invertált urothelialis papilloma; *PUNLMP*: alacsony malignus potenciálú papilláris urothelialis neoplasia; *LG-UCC*: low grade urothelsejtes carcinoma

A CK-5/6 a basalis míg a CK-20 pozitívitas az irodalomnak megfelelően a superfitialis rétegekben volt kimutatható (7.ábra, 48. oldal) ^{108, 203}. A diszregulált CK-20 pozitívitas a nem csak superfitialisan elhelyezkedő pozitívitas megjelenésében nyilvánult meg a LG-UCC-k esetében. A PUNLMP-k szignifikánsan csökkent CK-20 expressziót mutattak a normál hámhöz és a LG-UCC-khez képest (11. táblázat). Egyéb vonatkozásban nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között.

LG-UCC-k szignifikánsan magasabban expresszálták a Ki-67-t a normálhoz, a papillomákhoz és az invertált papillomákhoz viszonyítva, valamint a PUNLMP-k az UP-khez viszonyítva (10. táblázat/c.; 7. ábra, 48. oldal; 10. ábra).

10. ábra: Claudin-1 morfológia, score x intenzitás és Ki-67 dot-plot

10.a. ábra: claudin-1 dot-plot, morfológia alapján

10.b. ábra: claudin-1 dot-plot, score x intenzitás alapján

10.c. ábra: Ki-67 dot-plot

Szignifikáns eltérések: * ($p < 0.05$)

A morfológia eredménye szignifikánsan korrelált a szemi-kvantitatív analízis eredményével (Spearman féle korreláció; $r=0.75$).

IV/3. Utánkövetés – Low grade – High grade UCC-k

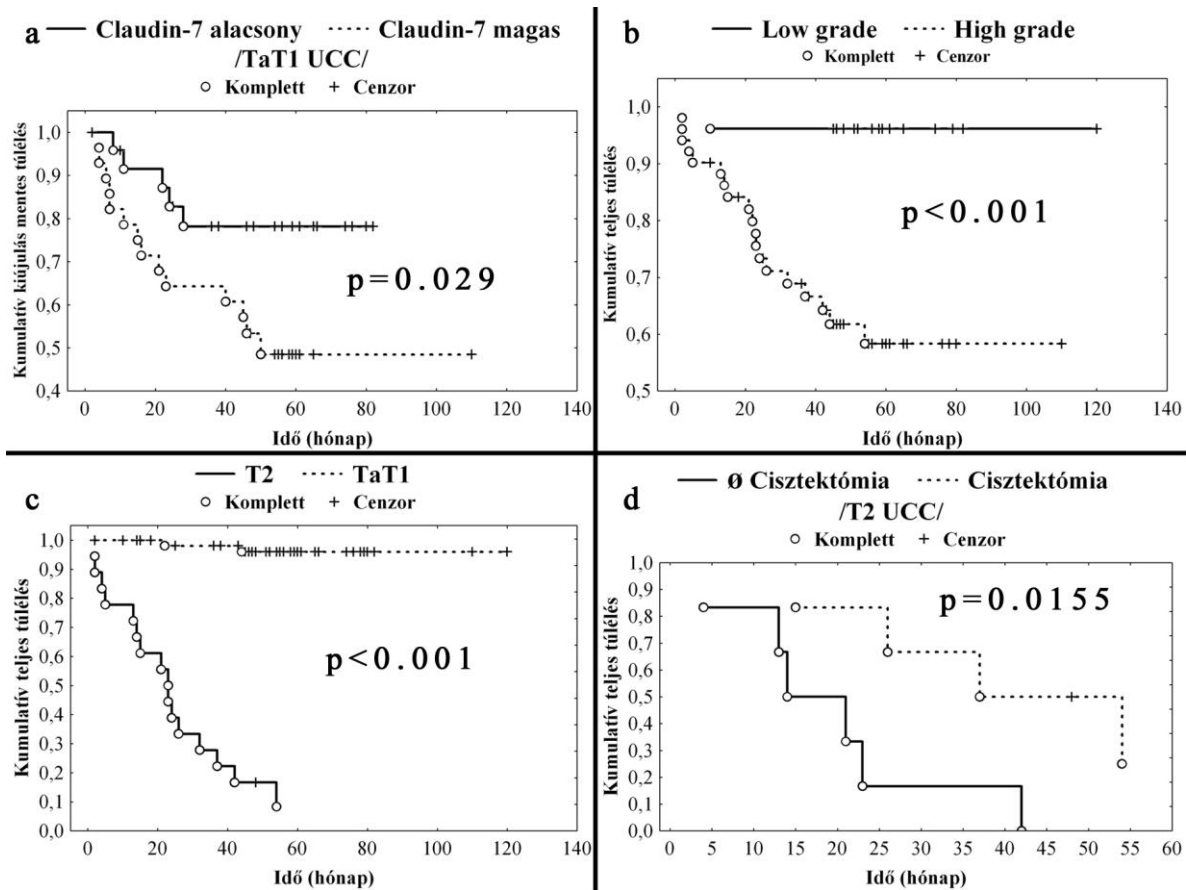
A LG páciensek közül egy sem (0/27), míg a HG betegek közül 19-en (19/57) hunytak el húgyhólyagrák miatt ($p < 0.01$; Fisher-féle exact teszt). Ebből a 19 esetből 17 beteg izominvazív húgyhólyagrákban szenvedett, míg ketten T1 stádiumúak voltak.

Összesen 64 Ta-T1 stádiumú tumor bizonyult alkalmasnak az utánkövetéses vizsgálatra (27 LG és 37 HG). LG esetek közül 13 (48%) míg a HG esetek közül 7 (18%) újult ki. Az átlagos KMT 38 hónap volt a LG-ben, míg 47 hónap a HG-ben. Azok a Ta-T1-es tumorok, melyek magasan, azaz a medián fölött expresszálták a claudin-7 fehérjét szignifikánsan rövidebb KMT-sel rendelkeznek a claudin-7-et alacsonyban, a medián alatt expresszáló tumorokhoz viszonyítva (Kaplan-Meier analízis, $p = 0.029$; 11.a. ábra).

HG-ből 3 eset (ebből kettő húgyhólyagrákban halt meg), míg a LG-ből egy eset sem progrediált izominvazív daganattá.

A HG tumorok (T2-vel) szignifikánsan rosszabb teljes túléléssel rendelkeztek a LG tumorokhoz viszonyítva (Kaplan-Meier analízis, $p < 0.001$, 11.b. ábra). A nemzetközi irodalomnak megfelelően az izominvazív (T2) esetek szignifikánsan rosszabb túléléssel rendelkeztek a felületes (Ta-T1) esetekhez viszonyítva (Kaplan-Meier analízis; $p < 0.001$, 11.c. ábra). A cisztektómiával kezelt izominvazív betegek tovább éltek (48 hónap viszonyítva 14 hónaphoz; Kaplan-Meier analízis, $p = 0.0155$, 11.d. ábra) az egyéb módon kezelt izominvazív daganatos betegekhez viszonyítva.

Multivariáns analízist nem tudtunk végezni a LG-HG csoportokkal, ugyanis míg egyetlen LG beteg sem, addig 19 HG (ezek közül 17 T2-es stádiumú volt) hunyt el urológiai okból (5. táblázat. 33. oldal).

11. ábra: UCC-k túlélés analízise a grade stage és a claudin-7 fehérje expresszió alapján

11.a. ábra: Az alacsony claudin-7 fehérje expresszió (a medián alatt) szignifikánsan hosszabb KMT-el társult a magas (medián fölötti) claudin-7 fehérje expresszióhoz viszonyítva Ta-T1-es tumorokban.

11.b. ábra: A high grade tumorok szignifikánsan rövidebb teljes túlélést mutattak a low grade tumorokhoz viszonyítva.

11.c. ábra: T2-es tumorok szignifikánsan rövidebb teljes túléléssel társultak a Ta-T1-es tumorokhoz viszonyítva.

11.d. ábra: Cisztektómiával kezelt T2-es esetek szignifikánsan hosszabb teljes túléléssel rendelkeztek a nem radikális sebészeti módszerrel kezelt T2-es betegekhez viszonyítva.

Komplett esemény: a páciens meghalt vagy a daganat kiújult

Cenzorált esemény: a páciens egyéb okból elhunyt, vagy véget ért az utánkövetési időszak

UCC: urothel sejtes carcinoma (urothelial cell carcinoma)

IV/4. Utánkövetés – Felületes húgyhólyagdaganatok

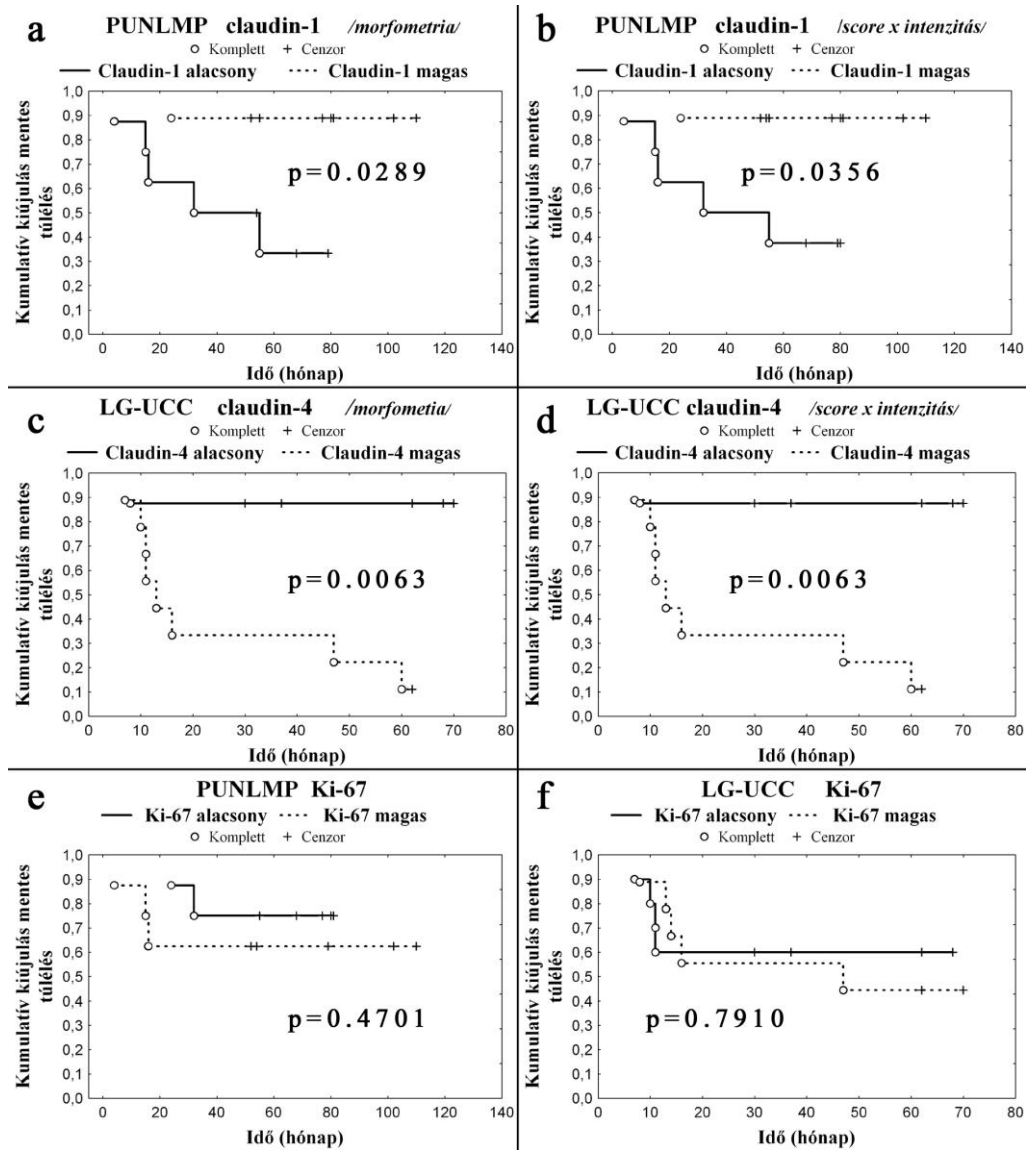
A felületes húgyhólyagdaganatok vizsgálata során az átlagos utánkövetési idő 59,79 (3-126) hónap volt. Egy beteg hunyt el, azonban nem urológiai okból. Két PUNLMP-t leszámítva az összes eset primer tumor volt. Összesen 20 LG-UCC, 20 PUNLMP, 18 papilloma és 15 invertált papilloma bizonyult alkalmasnak az utánkövetéses vizsgálatra. Kiújulás 16 esetben történt (10/20 LG-UCC; 6/20 PUNLMP), az átlagos KMT 21,43 (4-60) volt ezen esetekben. A papillomák és invertált papillomák nem újultak ki.

Két LG-UCC páciens kapott korai, a műtétet hat órán belül követő intravesicalis Mytomicin-C (MMC) instillációt. Tizenhárom beteg részesült 6 széria MMC (2 PUNLMP; 11 LG-UCC), míg 5 beteg 6 széria Farmorubicin (2 PUNLMP; 3 LG-UCC) kezelésben az első műtétet követően. Az invertált papillomák és a papillomák esetében nem volt műtétet követő kemoterápia. Nem volt szignifikáns összefüggés a kiújulás és a műtétet követő terápia között, azonban, azok a páciensek, akik posztoperatív instillációt kaptak, hosszabb KMT-sel rendelkeztek azokhoz a páciensekhez viszonyítva, akik nem kaptak (22 hónap viszonyítva 16 hónaphoz).

A Kaplan-Meier módszerhez az egyes csoportokat kettéválasztottuk a claudin, a CK-5/6, a CK-20 és a Ki-67 expresszió alapján: az egyik csoport, amelyik magasan, a medián fölött expresszálja a claudinokat, a CK-5/6-ot, a CK-20-at vagy a Ki-67-et, míg a másik csoport, amelyik alacsonyan, a medián alatt expresszálja a claudinokat, a CK-5/6-ot, a CK-20-at vagy a Ki-67-et.

A claudin-1-et alacsonyan, azaz a medián alatt expresszáló PUNLMP-k szignifikánsan rövidebb KMT-sel rendelkeznek Kaplan-Meier analízisben (Log-Rank teszt; $p=0.0289$) a claudin-1-et magasan, a medián fölött expresszáló PUNLMP-khez képest (12. a., b. ábra). A claudin-4-et magasan, a medián fölött expresszáló LG-UCC-k szignifikánsan rövidebb KMT-sel rendelkeznek Kaplan-Meier analízisben (Log-Rank teszt; $p=0.0063$) a claudin-4-et alacsonyan, a medián alatt expresszáló LG-UCC-khez viszonyítva (12. c., d. ábra). Claudin-2, -7, CK-5/6, CK-20 és a Ki-67 expresszió nem mutatott összefüggést a KMT-sel (12. e., f. ábra).

12. ábra: KMT vizsgálat claudin-1, -4 és Ki-67 alapján PUNLMP-ben és LG-UCC-ben



12.a., b. ábra: KMT analízis claudin-1 alapján PUNLMP-ben; morfometria, score x intenzitás

12.c., d. ábra: KMT analízis claudin-4 alapján LG-UCC-ben; morfometria, score x intenzitás

12.e., f. ábra: KMT analízis Ki-67 alapján PUNLMP-ben és LG-UCC-ben

Komplett esemény: a daganat kiújult; *Cenzorált esemény:* az utánkövetés véget ért vagy a páciens halála vagy az utánkövetési időszak vége miatt; *KMT:* kiújulás mentes túlélés

IV/5. Eredmények - UroVysion

A vizeletből származó tumorsejtekben az UroVysion segítségével detektált specifikus genetikai eltéréseket hasonlítottuk össze a TUR szövettani eredményével. Az UroVysion teszt pozitivitási kritériumai 34 esetben teljesültek, minden esetben szövettanilag igazolt UCC volt kimutatható a háttérben (12. táblázat).

12. táblázat: FISH eredmények vizeletmintákból

	Diagnózis (szövettan alapján)	FISH eredménye		
		pozitív	negatív	értékelhetetlen
Roszzindulatú	UCC (43)	34	5*	4
Jóindulatú	Gyulladás (6)	-	5	1
	Hyperplasia (2)	-	2	-
	Papilloma (2)	-	2	-
	Eltérés nélkül (2)	-	2	-

* mindegyik Ta UCC

Negatív eredményt 16 esetben kaptunk, melyből 5 eset bizonyult a későbbi szövettan eredményeként felületes, jól differenciált tumornak (13. táblázat).

13. táblázat: FISH eredmények Ta UCC-kben

Diagnózis (szövettan alapján)	FISH eredménye		
	pozitív	negatív	értékelhetetlen
Ta UCC	3*	5**	1
Grade	1 G1; 2 G2	5 G1	1 G2

* mind a három tumor >5 mm vagy multiplex

** 3/5 tumor ≤ 5mm

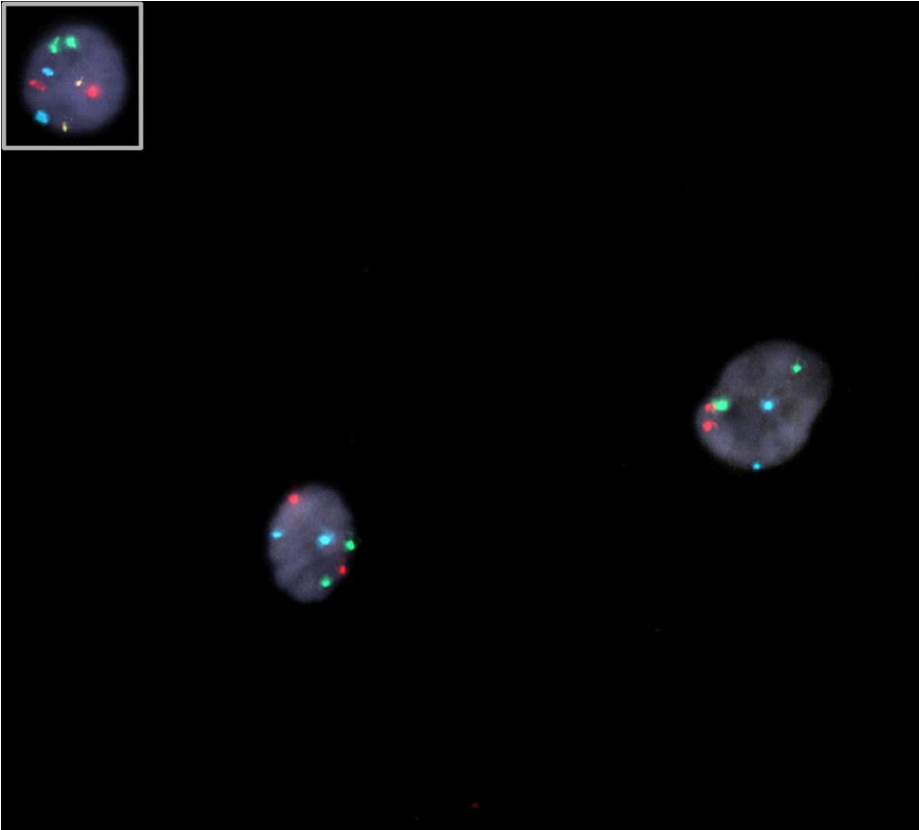
Összességében a FISH vizsgálat fajlagossága a szövettan alapján 100%-nak, míg érzékenysége 87%-nak bizonyult.

Abból a 12 esetből, ahol a reggeli első és második vizeletből is elkészült a FISH, 9 UCC közül 3 esetben mindkét teszt pozitív, négy esetben az egyik teszt pozitív, míg a másik értékelhetetlen, egy esetben az egyik teszt pozitív, míg a másik negatív, míg egy

esetben az egyik teszt negatív a másik értékelhetetlen volt. Ezek szerint 8 minta pozitív (legalább az egyik minta pozitív), egy minta negatív volt. Mind a három malignitástól mentes minta negatívnak bizonyult. Nem volt szignifikáns különbség a reggeli első és második vizeletből készült FISH vizsgálatok eredményei között, valamint az értékelhetetlen esetek egyenlően oszlottak el ezen két csoport között.

A 34 FISH-pozitív UCC közül a 9p21 lókuszt deléciója volt a fő genetikai eltérés két T1-es valamint két T2-es tumorban (12%) /13. ábra/.

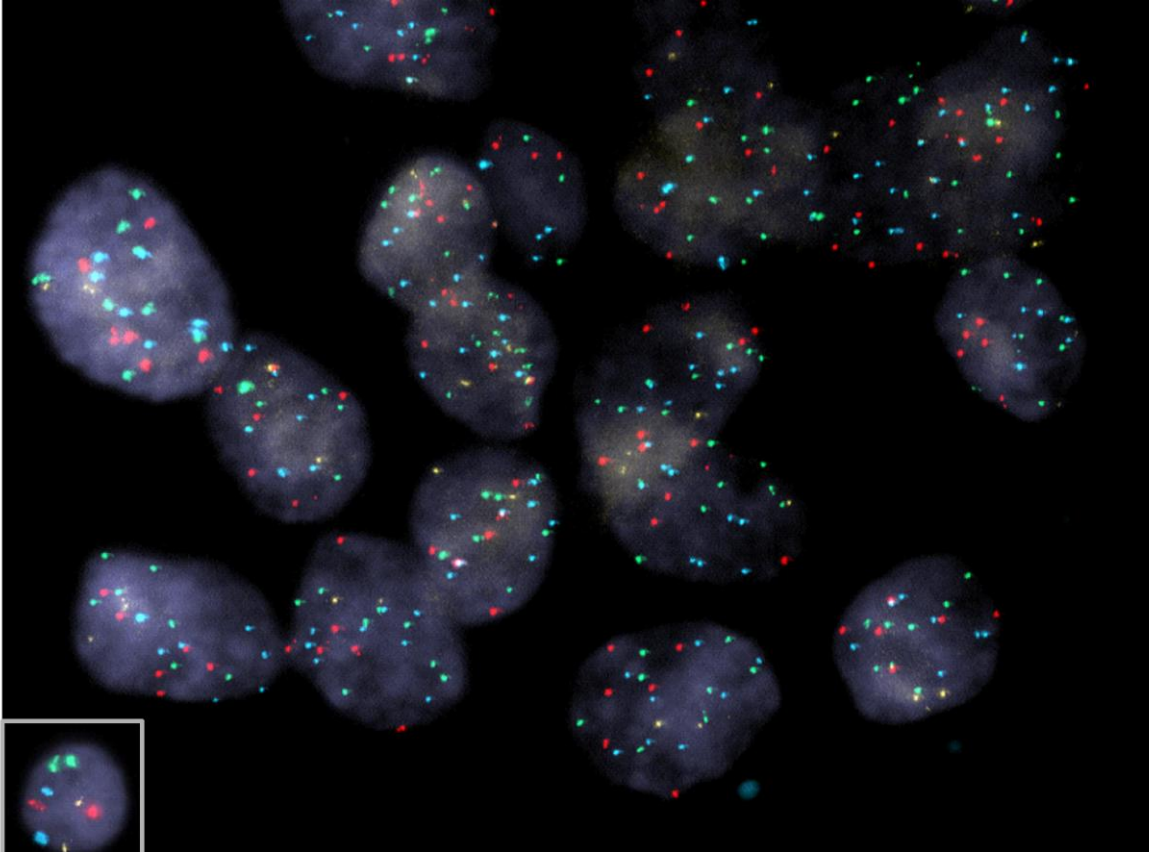
13. ábra. 9p21 deléció /FISH/



A 9p21 lókuszt jelző specifikus SpectrumGold jel hiányzik a sejtmagvakból. Az inzerthben egy normál sejt látható. *CEP3*: SpectrumRed (piros); *CEP7*: SpectrumGreen (zöld), *CEP17*: SpectrumAqua (világoskék); DAPI magfestés; eredeti nagyítás: 1000x

Harminc esetben (88%), ide értve a FISH-sel pozitívnak bizonyult Ta-s tumort, a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák felszaporodása volt kimutatható (14. ábra).

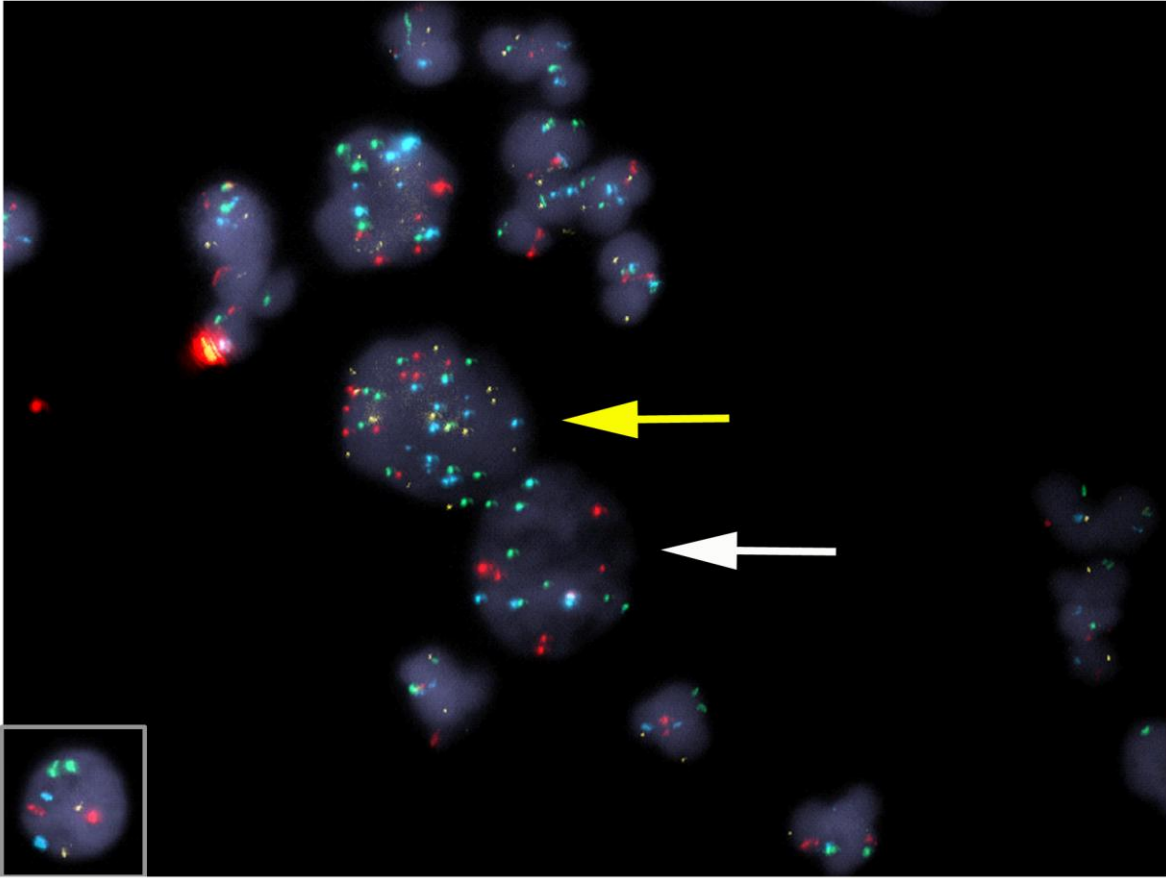
14. ábra: 3-as, 7-es és 17-es kromoszóma felszaporodása /FISH/



A 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák emelkedett számát a sejtmagvankénti kettőnél több piros, zöld és halványkék jel jelzi. A két aranysárga jel, mely a 9p21 jelenlétét jelzi, minden sejtmagban megfigyelhető. Az eltérések a sejtmagok morfológiájában jól megfigyelhetőek: a sejtmagok szabálytalanok és jóval nagyobbak, mint a normál sejtmag. Az inzertben kontrollként egy normál sejt látható. *CEP3*: SpectrumRed (piros); *CEP7*: SpectrumGreen (zöld), *CEP17*: SpectrumAqua (világoskék); *LSI 9p21*: SpectrumGold (aranysárga); DAPI magfestés; eredeti nagyítás: 1000x.

Továbbá két esetben a 9p21 lókuszt gain-je is megtalálható volt. Ezzel szemben, nyolc esetben a 3/7/17-es kromoszómák felszaporodásán túl egy azon sejten belül a 9p21 elvesztése is detektálható volt (15. ábra). Összesen 11 minta mutatott komplett 9p21 deléció (32 %).

15. ábra: 3/7/17 és 9p21 sokszorozódás és 9p21 deléció /FISH/



A 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák emelkedett számát a sejtmagvankénti kettőnél több piros, zöld és halványkék jel mutatja a nyíllal jelölt sejtekben. A sárga nyíl a 9p21-re specifikus arany-sárga jelből kettőnél többet tartalmazó sejtre mutat. A fehér nyíl 9p21 elvesztését tartalmazó sejtet jelöl. Az eltérések a sejtmagok morfológiájában jól megfigyelhetők: a sejtmagok szabálytalanok és jóval nagyobbak, mint a normál sejtmag. Az inzerthben kontrollként egy normál sejt látható. *CEP3*: SpectrumRed (piros); *CEP7*: SpectrumGreen (zöld), *CEP17*: SpectrumAqua (világoskék); *LSI 9p21*: SpectrumGold (arany-sárga); DAPI magfestés; eredeti nagyítás: 1000x.

A felületes (Ta) tumorokban szignifikánsan magasabb volt az UroVysion-nel detektált genetikai eltérést tartalmazó sejtek aránya a T1-es és T2-es tumorokhoz viszonyítva ($p < 0,05$ mind MW, mind K-W/DMC teszttel), míg a T1 és T2 között nem volt szignifikáns eltérés. Szintén pozitív korreláció volt a differenciáltság és a genetikai eltérést mutató sejtek száma között: a G3-as tumorokban szignifikánsan magasabb volt a genetikai eltérést mutató sejtek aránya a G1-es tumorokhoz viszonyítva (K-W/DMC teszt).

V. Megbeszélés

A húgyhólyagrák előfordulása hazánkban az elmúlt években növekvő tendenciát mutat ¹. Magyarországon évente közel 2000, míg Európában több mint 120.000 új esetet regisztrálnak ⁸. Az újonnan diagnosztizált esetek 70%-a felületes tumor, melyek közel fele a kezelés ellenére kiújul, 15% pedig izominvazívá válik. Húgyhólyagrások esetében a terápia, s egyben a prognózis, egyik legfontosabb eleme az, hogy a daganat beszűri-e az izomréteget, vagy sem. Ezen két csoport jelentősen eltérő 5 éves túléléssel rendelkezik: 95% a nem izominvazív, míg 50% az izominvazív tumorok esetében ³⁶. Ebből is következik, hogy a daganat kimenetelét döntően meghatározza a diagnózis időpontja, azaz minél korábbi stádiumban sikerül diagnosztizálni egy tumort, a beteg annál jobb túlélési eséllyel rendelkezik.

A húgyhólyagrások döntő többségében az első tünet a néma, panaszok által nem kísért vérévelés, mely sok esetben spontán megszűnhet, félrevezetve ezzel a kezelőorvost és a beteget is. Éppen ezért, a vérévelést mindaddig rosszindulatú daganat tünetének kell tekinteni, míg ki nem zártuk annak lehetőségét. Egyéb húgyhólyagrák gyanúját felvető tünet lehet még a gyakori vizelet, fájdalmas vizelet, kezelés ellenére nem szűnő gennyvizelet, előrehaladott stádiumban kismencedei fájdalom, nehézlégzés, csontfájdalom és veseelégtelenség tünetei is ^{21, 22}.

Az elmúlt években számos kutatás célja volt egy megbízható, kellően szenzitív prognosztikai/diagnosztikai teszt kifejlesztése. Jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan marker, ami önmagában egyértelműen bizonyítaná a húgyhólyagrák jelenlétét, illetve előre jelezné az egyes esetek várható biológiai viselkedését.

Az utánkövetés során a rendszeres hólyagtükrözés megbízható módszer a kiújulások észlelésére ²³. Hólyagtükrözés során szövettani mintavételre is van lehetőség, mely mintavétel jelenleg más módszerrel rutinszerűen nem kivitelezhető. Továbbá a szövettani vizsgálat során olyan adatokhoz jutunk, amelyeket máshogy egyelőre nem tudunk megszerezni, azaz milyen szövettani típusú daganattal állunk szemben (laphámrák, átmeneti sejtes carcinoma, esetleg adenocarcinoma) illetve, hogy a daganat beszűri-e a lamina-propriát vagy az izomréteget. Azonban a cisztoszkópia egy költséges, a beteget

megterhelő, fájdalmas beavatkozás⁹. Célszerű volna egy olyan módszer kifejlesztése, mely kiválthatná a hólyagtükrözést.

A húgyhólyagdaganatok kimutatására ilyen kézenfekvő, nem invazív lehetőség a vizeletben található sejtek, molekulák vizsgálata. A diagnózis/utánkövetés során kiegészítésként, vagy önállóan használt vizelet-citológiát 1945 óta alkalmazzák magas rizikójú betegek szűrésére²⁰⁴. Annak ellenére, hogy a citológia nem invazív módszerként a rosszul differenciált tumorok esetében megbízható pontossággal és érzékenységgel mutatja ki a daganat jelenlétét, több hátránya is van. A kisméretű, jól differenciált tumorok esetében alacsony az érzékenysége²⁰⁵. Ezen túl pedig a vizsgálat eredménye nagyban függ a vizsgáló tapasztalatától, a minta elkészítésétől, kezelésétől.

A vizeletvizsgálatról szóló publikációk többsége az alábbi tesztekkel kapcsolatos: BTA (Bard-féle tumor antigén), NMP22 (nuclear matrix protein 22), TPA (tissue polipeptid antigen), fibrinbomlási termékek, telomeráz aktivitási mérések, mikroszatellita valamint FISH vizsgálat^{206, 207, 208, 209, 210, 211}. Ezek közül az FDA által is törzskönyvezett a NMP22, a BTA és a FISH alapú UroVysion tesztek, azonban egyik módszer sem terjedt el a rutindiagnosztikában⁹. A BTA teszt az UroVysion-nél gyengébb, de jó érzékenységgel (81% vs. 78%) rendelkezik. Előnye, hogy a citológiánál érzékenyebb, azonban jól differenciált tumoroknál alacsony a fajlagossága. Gyakori az álpozitivitás egyéb urológiai megbetegedésekben, valamint a teszt nem értékelhető jelentős haematuria /proteinuria esetén. Az NMP22 teszt előnye alacsony költsége, emellett relatív magasabb specificitása (75%) segítheti az occult tumorok kimutatását. Alacsony érzékenysége (45%) és az álpozitív esetek aránya azonban egyéb urológiai betegségekben, urológiai beavatkozások után korlátozza használhatóságát²¹².

A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technikát 2000-ben fejlesztették ki, és az FDA 2001 júliusában hagyta jóvá a húgyhólyagrakok diagnosztikájában^{213, 214}. Halling és mtsai a vizsgálat specificitását 96%-nak, míg érzékenységét 81%-nak találták²¹⁵. Saját vizsgálatunkban a FISH vizsgálat specificitása 100%, míg fajlagossága 87%-nak bizonyult. Bollmann és mtsai összefüggést találtak az UroVysion vizsgálattal kimutatható genetikai eltérések súlyossági foka és a tumorok differenciáltsága valamint stádiuma között^{215, 216}. Hasonló tendenciát saját mintáink esetén is találtunk, azaz a pozitívítási kritériumoknak

megfelelő sejtek aránya pozitív korrelációt mutatott a stádiummal (Ta→T1, T2) valamint a differenciáltsággal (G1→G2→G3). Az UroVysion teszttel kiegészített vizeletcitológia kiváló eredményt adott. Jelentős vizsgáló függősége, technikai háttér igénye, valamint magas költsége miatt nem valószínű, hogy klinikai alkalmazása a rutin diagnosztikában széles körben el fog terjedni. Számos előnye ellenére nem tudja kiváltani a hólyagtükrözést²¹⁷. Azonban, nagy segítséget nyújthat a differenciálatlan tumorok, valamint a CIS utánkövetése során, ahol a cisztoszkópia-citológia kombinációnál magasabb szenzitivitást és specificitást mutat a recidívák diagnosztizálása során²¹⁸.

A szövettani lelet prognosztikai értékéhez egyéb immunhisztokémiai/genetikai vizsgálatok is több információt adhatnak, ami lényeges, mivel az azonos szövettani képet mutató tumorok is eltérő prognózissal rendelkezhetnek. Az adatok a húgyhólyagrakok új prognosztikus faktorairól ugyanakkor ellentmondásosak²¹⁹. Nem valószínű, hogy egyetlen marker önmagában képes lesz megjósolni a biológiai viselkedést, azonban markerek kombinációja hozzájárulhat a pontosabb klasszifikációhoz²²⁰. Számos markert, köztük sejtciklus szabályozókat (p53^{35, 53}, pRb^{55, 56}), onkogéneket (FGFR3³⁵, EGFR²²¹), proliferációs markereket (Ki-67², Aurora kináz⁹⁴), extracelluláris mátrix fehérjéket (E-Cadherin^{104, 105}, CD44¹⁰⁷) vizsgálták az elmúlt években. Egyik vizsgált marker sem mutatott a szövettannál jobb diagnosztikus vagy prediktív értéket.

A húgyhólyagrakok kórismézése, terápiája továbbra is döntően a szövettani vizsgálat eredményén alapul, ezért is kiemelten fontos a megfelelő csoportba sorolás²²². Annak ellenére, hogy az adott tumor entitások szövettanilag egységes csoportokat alkotnak (pl. PUNLMP, LG, HG) egyes tumorok ki fognak újulni, míg más tumorok nem, s ezt jelenleg nem tudjuk biztosan megmondani előre. Továbbá léteznek olyan határeseti tumorok, melyek nem, vagy csak bizonytalanul sorolhatóak be az egyes csoportokba. Ismert, hogy a korábbi G2 tumorok nem alkottak egységes csoportot biológiai viselkedés szempontjából, ami indokolja az új, 2004-es WHO osztályozásban a G1-2-3-as osztály helyett a LG-HG osztályozás bevezetését³³. Azonban, míg az új 2004-es WHO osztályozás használhatóságát megfelelő erejű klinikai vizsgálatokkal nem támasztják alá, addig az EAU ajánlása szerint mindkét osztályozást figyelembe véve kell vizsgálni a tumorokat⁶.

További, új markerek iránti igényt fokozó tényező a vizsgálók közötti, valamint az egyes vizsgáló leletein belüli szubjektív megítélés miatti eltérés. A húgyhólyagrakok 30%-a indokolatlanul kerül a HG csoportba, mely felesleges terápia beavatkozásokat von maga után²³.

A LG-HG osztályozás prediktív szerepét támasztja alá az a saját eredményünk, miszerint a LG betegek közül senki, a HG betegek közül pedig 19-en (közülük 2 eset volt Ta-T1) hunytak el húgyhólyagrakban.

A sejtkapcsoló struktúrák központi szerepet töltenek be a szövetek szerkezetének, funkciójának kialakításában. Ezek közül is kiemelten fontosak az úgynevezett szoros kapcsolatok, tight junction-ök (TJ), melyek felépítésében lényegesek a claudinok^{127, 136, 223}. A claudinok a nevüket a latin claudere (zárni) szóból kapták. A claudin családnak jelenleg 27 tagját ismerjük emberben¹⁹⁶. Az egyes szövetek jellegzetes claudin expressziós mintázattal rendelkeznek, mely mintázatok többnyire megfigyelhetők a különböző eredetű daganatos elváltozásokban is. Claudin-1 expressziója emelkedett cervicalis intraepithelialis neoplasiákban a normál és a tumoros hámphoz viszonyítva¹⁴⁰. Csökkent expressziója a betegségmentes túléléssel korrelál nyelőcső laphámrákokban¹³⁸. Claudin-2 emelkedett expressziója vastagbélrákokban rossz prognózissal társul¹⁴⁸. A claudin-3 és -4 a clostridium perfringens enterotoxinjának receptorai, melyek fokozott expressziójuk miatt terápia célpontok lehetnek petefészekrák és prosztatarák esetében^{156, 157, 158}. Claudin-5 segítheti a tüdő adenocarcinómák laphámrákaktól való elkülönítését, mivel míg az előbbiben kifejeződik, addig az utóbbiban nem található expresszió¹⁶⁷. A claudin-7 a normál hámphoz képest csökkent expressziója megtalálható emlőrákban mind a rák előtti állapotban, mind az invazív rákban¹⁶⁸, valamint vastagbél, fejnnyaki és prosztatarákokban^{169, 170, 171}. A Claudin-10 expressziója a betegségmentes túlélés független markere hepatocelluláris májrákokban¹⁷².

A húgyhólyagnak a vizelet tárolásán, valamint ürítésén kívül fontos szerepe a vizelettel kiválasztásra kerülő anyagok a vérbe, illetve a szöveti térbe történő visszajutásának a megakadályozása, melyben kulcsszerepük van az urotheliumban is megtalálható claudinoknak. A claudin expresszióról húgyhólyagban, illetve annak elváltozásaiban kevés adattal rendelkezünk.

A claudinok expressziós mintázata az urotheliumban specifikus eloszlást mutatott a korábbi irodalmi adatokhoz hasonlóan ⁶. Claudin-1 döntően az urothelium basalis/peribasalis valamint intermedier rétegeiben, míg a claudin-3, -4 és -7 a superfitialis rétegekben volt kimutatható. Gyulladásos kontroll esetek a normáltól eltérő claudin expressziót mutattak: claudin-2 és -4 fehérje expresszió szignifikánsan emelkedett volt a gyulladásos eltérést mutató mintákban a nem gyulladt mintákhoz viszonyítva, ami felveti a claudinok szerepét a húgyhólyag gyulladásos folyamataiban. Mint ismert, a claudin-2 fokozott expressziójának szerepe van a membrán áteresztőképességének növelésében ^{5, 198, 199}. Ezt támasztja alá az is, hogy a claudin-2 szintje emelkedett gyulladásos bélbetegségekben is, ahol az interferon-13 indukálja a fokozott expresszióját ^{224, 225, 226}. Sőt, gyulladásos bélbetegségekben az emelkedett claudin-3 expresszió még a vizeletből is kimutatható ²²⁷. Az emelkedett claudin-2 expresszió vastagbélrák sejtekben fokozza a tumorigenitást, valószínűleg EGFR transzaktiváción keresztül ²²⁸. Eredményeink alapján a gyulladásos és a normál húgyhólyaghám között sem fehérje-, sem mRNS-szinten nincs lényeges eltérés a claudin-1, -3, -5, -10 expresszióban. Saját mintáinkban mind a LG-HG, mind a nem invazív tumorok esetében a claudin-3 gyenge, elszórt pozitivitást mutatott. Nakanishi és mtsai gyenge claudin-3 expressziót találtak a felszínes felső húgyúti UCC-kben: 16 eset negatívnak bizonyult (33%; 16/49), 31 eset gyenge reakciót mutatott (<10% pozitivitás; 63%, 31/49), míg csak két felszínes UCC (4%, 2/49) mutatott 10% feletti claudin-3 pozitivitást ¹³⁶. A basalis/superficialis lokalizáció közötti expressziós különbség claudin-1, -4 és -7 esetében segítheti a kis tumorfészkeken belüli helyes vertikális orientációt. Továbbá, a claudinok hozzájárulhatnak a rendszertelenül összetömörült, azonban normál és a valójában megvastagodott, neoplasztikus hám elkülönítéséhez. A normálhoz hasonló claudin-4 expressziós mintázat, azaz a basalis irányba csökkenő intenzitású reakció segítheti továbbá a LG és HG tumorok elkülönítését, mivel a HG tumorok nagy része a hám egész terjedelmében expresszálja a claudin-4-et.

A vizsgált csoportokban a claudin-5 expressziós szintjében nem volt kimutatható jelentős eltérés sem fehérje, sem mRNS szinten. A claudin-5 minden mintában kimutatható volt az endothelsejtek membránjában. Ez a jelenség pozitív belső kontrollként is szolgált.

Az urotheliális nem invazív neoplasiákon belül a LG-UCC-k szignifikánsan csökkent claudin-1 és szignifikánsan emelkedett Ki-67 expressziót mutattak az invertált papillomákhoz képest. Ezek a jellemzők segíthetik a patológusokat a nehéz differenciáldiagnosztikai esetekben. Egy ilyen döntésnek fontos klinikai jelentősége van, hiszen a primer invertált papillomákat nem kezelik az operáció után, míg a LG-UCC-k posztoperatív terápiában részesülnek. A fenti terápiás stratégiát igazolja azon eredményünk is, hogy az invertált papillomák egyáltalán nem újultak ki, míg a LG-UCC-k fele a kezelés ellenére kiújult. Döntően fontos lenne annak megállapítása, hogy mely páciens részesüljön agresszívabb kezelésben, így növelve a kezelés hatékonyságát és a betegségmentes túlélést. Eiber és mtsai szignifikánsan emelkedett Ki-67 expressziót írtak le az invertált növekedést mutató urotheliális carcinomákban az invertált papillomákhoz képest, azonban a CK-20 expresszióban nem volt különbség a két csoport között ¹⁹⁸. Ki-67 magi pozitivitás magasabb volt a LG-UCC-kben mint a PUNLMP-kben, azonban, a különbség nem volt szignifikáns.

Eredményeinkkel összhangban a Ki-67 segítségként szolgálhat a LG és HG UCC-k elkülönítésében ²⁰³. A Ki-67 expresszió a kiújulás mentes túlélés független prognosztikai faktorának bizonyult cisztekтомиával kezelt betegekben ⁶. Santos és mtsai low grade papilláris húgyhólyagrákokban szignifikáns összefüggést találtak a Ki-67 expresszió és a teljes túlélés valamint a kiújulás mentes túlélés között ⁸⁸. Saját vizsgáltunkban, a LG-HG tumorok esetében a Ki-67 expresszió összefüggött a differenciáltsággal és a stádiummal, így nem tudtuk független prognosztikai faktorként vizsgálni.

CK-5/6 vizsgálata nem mutatott szignifikáns különbséget a nem invazív húgyhólyagdaganatok különböző csoportjai között. A CK-5/6 a basalis míg a CK-20 a superficialis rétegekben expresszálódott, mind a normál, mind a tumoros urotheliumban. Az irodalomban szerepelnek adatok a CK-20 és a CK-5/6 expresszió csökkenéséről valamint emelkedéséről is húgyhólyagrákban ²²⁹. CK-20 és Ki-67 expresszió hiányát már invertált papillomákban is leírták ^{110, 230}. Valójában a saját mintáinkban is megtalálhatóak voltak extrém magas és alacsony expressziós értékek minden vizsgált tumor-csoportban. Az emelkedett CK-20 expresszió segítheti a LG-UCC-k PUNLMP-ktől való elkülönítését.

Másrésről, nagyon nehéz a kérdéses eseteket egyértelműen eldöntő általános következtetést levonni.

A LG-UCC-kben a papillomákhoz, invertált papillomákhoz és a PUNLMP-khez viszonyítva csökkent claudin-1 és -2 expresszió, valamint a HG tumorokban a LG tumorokhoz képest emelkedett claudin-4 illetve csökkent claudin-7 expresszió megerősíti azt az elképzelést, miszerint a karcinogenezis és a tumor-progresszió folyamatát megváltozott tight junction összetétel jellemzi. A TJ-ök átstrukturálódása során a claudinok extracelluláris hurka a claudin antitestek számára hozzáférhetővé válhat ¹⁰⁹. Következésképpen egyértelmű és általános megállapítás nem vonható le arról, hogy a tumor-progresszió előrehaladásával párhuzamosan a TJ-k átrendeződése/fellazulása során a claudinok expressziója kizárólag csökkenhet.

Fontos megjegyezni, hogy a HG tumorokban talált csökkent claudin-7 és emelkedett claudin-4 expresszió függetlenek voltak az izominvázio meglététől. A LG-HG összehasonlítások hasonló eredményt adtak a T2-es tumorokat belevéve, valamint kihagyva a HG csoportból. A magas claudin-7 igen, míg a Ki-67 expresszió nem mutatott összefüggést a Ta-T1-es tumorokban a kiújulás mentes túléléssel. Érdekes módon, a claudin-7-et alacsonyan vagy magasán expresszáló tumorok között nem volt szignifikáns különbség a műtétet követő terápiában (pl. BCG kezelés vagy hólyagba történő instilláció; Chi² teszt). Ezekből következően a claudin-7 expresszió volt az egyedüli olyan faktor, ami összefüggést mutatott a nem izominvazív húgyhólyagrakok kiújulás mentes túlélésével.

A nyelv laphámrákjában a megváltozott claudin-7 expresszió – a környező hámphoz képest alacsonyabb vagy magasabb – rosszabb túléléssel társult ²³¹. Csökkent vagy eltűnt claudin-7 expresszió gyakori jelenség a nyelvcső invazív laphámrákjában, valamint a claudin-7 kiütése laphámrák sejtvonalon fokozott inváziót eredményez ²³². Petefészekrákokban épp ellenkezőleg, a fokozott claudin-7 expresszió társul rossz prognózissal ²³³.

A nem invazív húgyhólyagrakokon belül a LG-UCC-k esetében a magas claudin-4, míg a PUNLMP-k esetében az alacsony claudin-1 expresszió rossz prognózissal társul, ugyanis ezen esetek rövidebb kiújulás mentes túlélést mutattak. A claudin-1 expresszió vizsgálata hozzájárulhat az invertált papillomák klasszikus papillomáktól, PUNLMP-ktől és LG-UCC-ktől való elkülönítéséhez, mivel az invertált papillomák szignifikánsan

emelkedett claudin-1 expressziót mutattak a többi csoporthoz viszonyítva. Az emelkedett claudin-4 expresszió prosztatarák^{151, 152, 153}, emlőrák^{159, 160}, míg a csökkent claudin-1 expresszió nyelőcső laphámrák¹³⁸ valamint májrák¹³⁹ esetén rossz prognózissal társul.

Különös módon, a kiújulás mentes túlélés hosszabbnak bizonyult a HG, mint a LG csoportban. Újabb keletű tanulmányok közöltek hasonló eredményeket. A LG tumorok kiújulási rátája több, mint 50% volt Miyamoto és mtsai vizsgálatában²³¹, míg a BCG-vel kezelt T1 HG húgyhólyagrakok hosszú távú utánkövetése során 35%-nak bizonyult a KMT²³⁴. Épp ellenkezőleg, May és mtsai rövidebb KMT-t és magasabb kiújulási rátát találtak a HG papilláris tumorokban a LG tumorokhoz viszonyítva²³⁵. Saját adatainkban a LG tumorok 48%-ban, a HG tumorok 17%-ban újultak ki. A magasabb kiújulási ráta befolyással lehet a KMT-re. Továbbá, a HG tumorokban talált hosszabb KMT kapcsolatban lehet a HG tumorokban alkalmazott BCG terápiával (HG-ben 20, LG-ben 1 esetben alkalmaztunk BCG instillációt). Irodalmi adatok alapján a BCG kezelés megnyújtja a betegség mentes túlélést²³⁶. Ezt a tendenciát saját adatainkban is látni lehetett, bár statisztikailag nem tudtunk szignifikáns összefüggést igazolni a terápia és a KMT között.

A daganatokban a normálhoz képest csökkent claudin-1 expresszió számos carcinomában megtalálható, többek között mell-²³⁷, vastagbél-²³⁸ és prosztatarákban²³⁹. Több munkacsoport viszont azt írta le, hogy a claudin-1 szorosan összefügg a vastagbeldaganatok kialakulásával, valamint, hogy fokozott az expressziója vastagbélrák esetén²⁴⁰. Másrészt, Nakanishi és mtsai emelkedett claudin-1, -3 és -4 expressziót találtak a felső húgyúti UCC-k esetén, mely rossz prognózissal társult^{241, 242, 243}. Saját vizsgálatainkban a nem invazív LG-UCC-k esetén emelkedett claudin-4 expresszió rövidebb kiújulás mentes túléléssel társult, valamint a HG tumorok szignifikánsan emelkedett claudin-4 mRNS és fehérje expressziót mutattak a LG tumorokhoz viszonyítva. Ezen eredményeink megerősítik a fokozott claudin-4 expresszió és a húgyhólyagrakok előrehaladott stádiuma, a progresszió és a karcinogenezis közötti kapcsolatot. Felvetődik, hogy a claudin expressziós mintázat vizsgálata használható lehet az UCC-k biológiai viselkedésének pontosabb előrejelzéséhez.

A közelmúltban a claudin-3-at és -4-et a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának (CPE) receptoraként írták le¹⁹⁸. A CPE-ről már több mint 15 éve ismert, hogy emlős

sejteken gyors, direkt citolízist okoz^{111, 244}. A claudin-3 és -4 overexpresszált ovarium carcinomában. Az ovarium carcinoma dózisdependens citotoxikus reakcióval reagál a CPE kezelésre. Xenograft egérkísérletekben a CPE-nek szignifikáns gátló hatása volt a tumor-progresszióra, valamint a túlélés jelentősen meghosszabbodott²⁴⁵. Hasnyálmirigy tumorok többségében, hasonlóan a többi gasztrointesztinális tumorhoz a claudin-4 expresszió szintje emelkedett. A CPE-val történő kezelés akut dózisdependens citotoxikus hatást vált ki, mely hatás, kizárólag a claudin-4 pozitív sejteken az expresszió mértékétől függő választ vált ki. A pancreas tumor egér xenograft modellben a CPE injektálása tumor lízist okozott²⁴⁶.

Új, in vivo adatok feltételezik, hogy a claudin-4-et kifejező tumorsejtek genetikailag módosított citotoxikus fúziós fehérjék célpontjai lehetnek²⁴⁷. Egy in vivo állatkísérlet igazolta, hogy ez a fúziós fehérje meggátolhatja a claudin-4-et expresszáló tumor-sejtek áttétképzését¹⁵⁷.

Vizsgálatunk alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a tumorok kialakulása, a tumorprogresszió során a sejtkapcsoló-struktúrák átalakulása, fellazulása következik be. A claudin expresszió változásából arra következtetünk, hogy szerepük lehet a húgyhólyagrak karcinogenezisében.

Az mRNS- illetve a fehérje expressziós értékek nem mindenhol azonos irányban változnak a tumor-progresszió során. A HG tumorokban szignifikánsan emelkedett claudin-4 valamint csökkent claudin-7 fehérje expressziót találtunk. Ezt a változás claudin-4 esetében az mRNS expressziós eredményeink is alátámasztották. Claudin-7 esetében, annak ellenére, hogy a HG-ben csökkent mRNS expressziót találtunk, nem tudtuk igazolni a szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között. Az mRNS és fehérje expressziós értékek eltérése egyrészt felveti a claudin fehérje expresszió poszt-transzlációs szabályozásának lehetőségét, mikro-RNS-ek esetleges szerepét. Valószínű, hogy a karcinogenezis során komplex pathobiológiai folyamatok zajlanak, melyek folyamán egyes stádiumokban a sejtadhézió fellazulása, más stádiumokban a sejtadhézió szorosabbá válása következik be. Az RNS izoláláshoz végzett mikrodisszekció során eltérő lehet a tumor/kötőszövet/normál szövet arány, ami szintén befolyásolhatja az eredményeket.

Nem találtunk szignifikáns összefüggést a claudin-1, -2, -3, -5, -10, CK-5/6, CK-20 és Ki-67 expresszió, valamint a kiújulás mentes túlélés között sem. Érdekes módon,

fordított összefüggés mutatható ki világossejtes veserákban a teljes túlélés és a közepes/erős claudin-3 és -4 expresszió között ²⁴⁸. Hasonlóan, a claudin-4 emelkedett expressziója mutatható ki előrehaladott stádiumú prosztatákban, míg a claudin-1 expresszió multivariáns vizsgálatban a kiújulás független előrejelzője ¹³⁴. Az előbbiekkal ellentétben, Boireau és mtsai a rosszul differenciált T1/T2-es tumorok 60%-ában csökkent claudin-4 expressziót találtak a környező nem tumoros hámphoz viszonyítva, míg fokozott claudin-4 expressziót találtak a jól differenciált, felületes (Ta) húgyhólyagrakokban a környező, nem tumoros hámphoz viszonyítva ¹⁷¹. Azonban vizsgálatuk során a claudin expressziót nem a tumorok között hasonlították össze, hanem minden tumor expresszióját a tumor melletti épnek tűnő hám expressziójához viszonyították. Ezt a kiértékelési módszert befolyásolhatta az úgynevezett „field carcinogenesis” / ha egyszer egy hólyagban húgyhólyagrakot mutattak ki, akkor onnantól az a hólyag nem tekinthető normálnak/, illetve a független normál mintákkal való összehasonlítás hiánya. Számos, a húgyhólyagrak carcinogenesisében fontos szerepet betöltő genetikai eltérés jelen lehet a tumor mellett fekvő, normál kinézetű urotheliumban is ¹⁹⁹. Vizsgálatunk alapján a claudin-3, -5, -10 valószínűleg nem játszik lényeges szerepet a húgyhólyagrak progressziójában.

Összefoglalva, a claudinok a húgyúti hámban és daganataiban is specifikus expressziós mintázatot mutatnak, mely jellegzetesen eltér a mirigyhám, illetve laphám eredetű daganatoktól és az egyes húgyúti daganat entitásokat is elkülönítheti egymástól. Ezen túlmenően a vizsgált húgyúti daganatok prognózisát tekintve is informatív lehet a claudin expressziós mintázat.

Továbbra is a patológiai diagnózis és osztályozás a gold standardja a húgyhólyagrakok prognosztikájának és a megfelelő terápia megválasztásának. Jelenleg nincs olyan marker, ami egyértelműen el tudná különíteni egymástól a vizsgált entitásokat. További kutatásokra van szükség az osztályozás pontosításához ¹⁴².

VI. Következtetések

1. Igazoltuk, hogy a claudin és Ki-67 immunhisztokémia segítséget nyújt a különböző stádiumú és differenciáltságú húgyhólyagdaganatok differenciáldiagnosztikájában, valamint plusz prognosztikus információval szolgálhat a kiújulás mentes túlélés tekintetében. A munkánk során használt két értékelési rendszer (szemi-kvantitatív és kvantitatív) megerősítette egymást, ami a mindennapi gyakorlatban való felhasználás lehetőségét is alátámasztja.
2. Bebizonyosodott, hogy a HG tumorokban a LG tumorokhoz viszonyítva jelentősen magasabb a claudin-4 és Ki-67, míg alacsonyabb a claudin-7 fehérje expresszió. A claudin-4 mRNS expresszió esetében a hasonló eltérés mRNS szintű szabályozásra utal.
3. Az emelkedett claudin-1 fehérje expresszió megkönnyíti az invertált papillomák klasszikus papillomáktól, PUNLMP-ktől és LG-UCC-ktől való elkülönítését. Ezen kívül nehezen megítélhető esetekben a claudinok standard lokalizációja segítheti a hám orientációját.
4. Az alacsony claudin-1 expresszió PUNLMP esetében, a magas claudin-4 expresszió LG-UCC-ben, míg a magas claudin-7 fehérje expresszió Ta-T1-es tumorok esetében segíthet a rosszabb prognózissal rendelkező, ezáltal szorosabb utánkövetést igénylő esetek kiválasztásában.
5. Az UroVysion teszt egy megbízható diagnosztikus eszköznek bizonyult magas szenzitivitással és érzékenységgel. Magas költsége és jelentős háttérigénye miatt egyelőre nem képes kiváltani a rendszeres hólyagtükrözés szerepét, azonban kétes esetekben hasznos segítséget nyújthat a húgyhólyagdaganatok utánkövetése illetve diagnózisa során.

VII. Új megállapítások

- A claudin-4 és Ki-67 expresszió szignifikánsan magasabb, míg a claudin-7 expresszió szignifikánsan alacsonyabb a high grade tumorokban a low grade tumorokhoz viszonyítva.
- A magas claudin-7 fehérje expresszió rövidebb kiújulás mentes túléléssel társul Ta-T1-es tumorok esetében.
- Az invertált papillomákban talált szignifikánsan magasabb claudin-1 expresszió segítheti ezen entitás elkülönítését a klasszikus papillomáktól, PUNLMP-ktől és a nem invazív low grade UCC-ktől.
- Az alacsony claudin-1 expresszió PUNLMP-k esetében rövidebb kiújulás mentes túléléssel társul a magas claudin-1 expresszióhoz képest.
- A magas claudin-4 expresszió LG-UCC-ben rövidebb kiújulás mentes túléléssel társul az alacsony claudin-4 expresszióhoz viszonyítva.
- Az UroVysion teszt egy megbízható diagnosztikus eszköz, magas szenzitivitással és érzékenységgel, azonban egyelőre nem képes kiváltani a rendszeres hólyagtükrözés szerepét az utánkövetés során.

VIII. Összefoglalás

A húgyhólyagrákok (UCC) előfordulása hazánkban évről-évre növekszik. A sikeres terápia és a túlélés szempontjából lényeges a korai diagnózis. Jelenleg nem rendelkezünk olyan önálló markerrel, ami az egyes daganatok biológiai viselkedését előre jelezné, valamint helyettesíteni tudná az utánkövetés/diagnózis során a hólyagtükrözést. Jelen értekezés célul tűzte ki a húgyhólyagrákok új prognosztikai és diagnosztikai markereinek vizsgálatát. Az új diagnosztikus módszerek közül a FISH alapú UroVysion tesztet, míg a húgyhólyagrák új, lehetséges prognosztikus markerei közül a tight junction-ök vázát alkotó fehérjét, a claudinokat vizsgáltuk. A claudinok differenciál-diagnosztikai és prognosztikai szerepe számos humán daganatban bizonyított, sőt, ezen fehérjék terápiás célpontok is lehetnek. Kutatásaink során a claudinok vizsgálatát kiegészítettük az irodalmi adatok alapján már ismert prognosztikai és diagnosztikus markerek közül a low grade, high grade tumorok esetében a Ki-67, míg a nem invazív húgyhólyagrákok esetében a Ki-67, CK-5/6 és CK-20 expresszió vizsgálatával. Az UroVysion teszt a hólyagrákok esetében kiváló szenzitivitással és specificitással rendelkező, nem invazív diagnosztikai eszköznek bizonyult. A high grade húgyhólyagrákokban emelkedett claudin-4, Ki-67 és csökkent claudin-7 expressziót találtunk a low grade tumorokhoz viszonyítva. A Ta-T1-es tumorokban az emelkedett claudin-7 expresszió rossz prognózissal társult. A nem invazív húgyhólyagrákok vizsgálata során az invertált papillomák emelkedett claudin-1 expressziót mutattak a klasszikus papillomákhoz, a PUNMLP-hez és a low grade UCC-hez képest. Az emelkedett claudin-4 expresszió low grade UCC-ben, míg a csökkent claudin-1 expresszió PUNLMP-ben rossz prognózissal társult. A claudinok hozzájárulhatnak a patológiai diagnózis pontosításához, valamint további információt adhatnak a klinikai lefolyáshoz. Ezek a jellegzetességek segíthetik az adott betegnek megfelelő, hatékony terápia kiválasztását.

IX. Summary

The incidence of bladder cancer (UCC) is increasing year by year in Hungary. Early diagnosis is important in the aspect of successful therapy and survival. Nowadays we don't have a single marker, that could predict the biological behaviour of the tumour, and could replace cystoscopy. This dissertation aimed to investigate the new potential prognostic and differential diagnostic markers of human urinary bladder cancer. From the new potential diagnostic tools the FISH based Urovysion test, while from the new potential prognostic bladder cancer markers, the tight junction protein claudins were investigated. The prognostic and differential diagnostic value of claudins is proved in many human tumours, moreover, these proteins could be the docking sites for targeted therapy. In our study the analysis of claudins was completed with the investigation of the expression of well known prognostic marker Ki-67 in low grade, high grade UCCs, while with Ki-67, CK-5/6 and CK-20 in non-invasive urothelial neoplasms. In spite of being a non-invasive method, UroVysion test revealed to bear with excellent sensitivity and specificity for bladder cancer. High grade UCCs revealed significantly higher claudin-4 and Ki-67, and significantly lower claudin-7 expression in comparison to low grade UCCs. Ta-T1 UCCs strongly expressing claudin-7 were associated with significantly worse recurrence-free survival in comparison to Ta-T1 UCCs with low claudin-7 expression. In the analysis of non-invasive urothelial neoplasms inverted papillomas revealed significantly higher claudin-1 expression when compared with classic papilloma, PUNLMP or low grade UCC. Increased claudin-4 expression in case of low grade UCCs, while decreased expression of claudin-1 in case of PUNLMPs is associated with significantly shorter recurrence-free survival. The analysis of claudin expression might enhance the accuracy of pathologic diagnosis and might add further information to clinical outcome. These features might help to select personalized, effective therapy.

X. Referenciák

1. Géczi, L., [*Modern chemotherapy of invasive bladder cancer*]. *Magy.Onkol.*, 2007. **51**(2): p. 133-138.
2. Bryan, R.T., M.P. Zeegers, N.D. James, D.M. Wallace, and K.K. Cheng, *Biomarkers in bladder cancer*. *BJU.Int.*, 2010. **105**(5): p. 608-613.
3. Catto, J.W., M. Meuth, and F.C. Hamdy, *Genetic instability and transitional cell carcinoma of the bladder*. *BJU.Int.*, 2004. **93**(1): p. 19-24.
4. Knowles, M.A., *What we could do now: molecular pathology of bladder cancer*. *Mol.Pathol.*, 2001. **54**(4): p. 215-221.
5. Varley, C.L., M.A. Garthwaite, W. Cross, J. Hinley, L.K. Trejdosiewicz, and J. Southgate, *PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation*. *J.Cell Physiol*, 2006. **208**(2): p. 407-417.
6. Chen, Y.B., J.J. Tu, J. Kao, X.K. Zhou, and Y.T. Chen, *Survivin as a useful adjunct marker for the grading of papillary urothelial carcinoma*. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 2008. **132**(2): p. 224-231.
7. Parkin, D.M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. *Int.J.Cancer*, 2001. **94**(2): p. 153-156.
8. Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, and P. Boyle, *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. *Ann Oncol*, 2007. **18**(3): p. 581-92.
9. Jacobs, B.L., C.T. Lee, and J.E. Montie, *Bladder cancer in 2010: how far have we come?* *CA Cancer J.Clin.*, 2010. **60**(4): p. 244-272.
10. Brennan, P., O. Bogillot, S. Cordier, E. Greiser, W. Schill, P. Vineis, G. Lopez-Abente, A. Tzonou, J. Chang-Claude, U. Bolm-Audorff, K.H. Jockel, F. Donato, C. Serra, J. Wahrendorf, M. Hours, A. T'Mannetje, M. Kogevinas, and P. Boffetta, *Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies*. *Int.J.Cancer*, 2000. **86**(2): p. 289-294.

11. Delclos, G.L. and S.P. Lerner, *Occupational risk factors*. Scand.J.Urol.Nephrol.Suppl, 2008(218): p. 58-63.
12. Leppert, J.T., O. Shvarts, K. Kawaoka, R. Lieberman, A.S. Beldegrun, and A.J. Pantuck, *Prevention of bladder cancer: a review*. Eur.Urol., 2006. **49**(2): p. 226-234.
13. Pelucchi, C., C. Bosetti, E. Negri, M. Malvezzi, and C. La Vecchia, *Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer*. Nat.Clin.Pract.Urol., 2006. **3**(6): p. 327-340.
14. Pelucchi, C. and C. La Vecchia, *Alcohol, coffee, and bladder cancer risk: a review of epidemiological studies*. Eur.J.Cancer Prev., 2009. **18**(1): p. 62-68.
15. Sandhu, J.S., A.J. Vickers, B. Bochner, S.M. Donat, H.W. Herr, and G. Dalbagni, *Clinical characteristics of bladder cancer in patients previously treated with radiation for prostate cancer*. BJU.Int., 2006. **98**(1): p. 59-62.
16. Golijanin, D.J., D. Kakiashvili, R.R. Madeb, E.M. Messing, and S.P. Lerner, *Chemoprevention of bladder cancer*. World J.Urol., 2006. **24**(5): p. 445-472.
17. Shokeir, A.A., *Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment*. BJU.Int., 2004. **93**(2): p. 216-220.
18. Michaud, D.S., D. Spiegelman, S.K. Clinton, E.B. Rimm, G.C. Curhan, W.C. Willett, and E.L. Giovannucci, *Fluid intake and the risk of bladder cancer in men*. N.Engl.J.Med., 1999. **340**(18): p. 1390-1397.
19. Wakui, M. and T. Shiigai, *Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cell volume distribution*. Int.J.Urol., 2000. **7**(7): p. 248-253.
20. Yu, A.S., K.M. McCarthy, S.A. Francis, J.M. McCormack, J. Lai, R.A. Rogers, R.D. Lynch, and E.E. Schneeberger, *Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(6): p. C1231-41.
21. Riesz, P., S. Mavrogenis, M. Szucs, and I. Romics, *[Urinary bladder cancer]*. Orv Hetil, 2008. **149**(13): p. 613-5.
22. Babjuk, M., W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. BÅhle, J. Palou-Redorta, and M. RouprÅst, *EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial*

- Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update*. European Urology, 2011. **59**(6): p. 997-1008.
23. Babjuk, M., W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Bohle, J. Palou-Redorta, and M. Roupret, *EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update*. Eur Urol, 2011. **59**(6): p. 997-1008.
 24. Lokeshwar, V.B. and M.G. Selzer, *Urinary bladder tumor markers*. Urol Oncol, 2006. **24**(6): p. 528-37.
 25. Messing, E.M., L. Teot, H. Korman, E. Underhill, E. Barker, B. Stork, J. Qian, and D.G. Bostwick, *Performance of urine test in patients monitored for recurrence of bladder cancer: a multicenter study in the United States*. J.Urol., 2005. **174**(4 Pt 1): p. 1238-1241.
 26. Mahmud, S.M., B. Fong, N. Fahmy, S. Tanguay, and A.G. Aprikian, *Effect of preoperative delay on survival in patients with bladder cancer undergoing cystectomy in Quebec: a population based study*. J.Urol., 2006. **175**(1): p. 78-83.
 27. Stenzl, A., N.C. Cowan, M. De Santis, M.A. Kuczyk, A.S. Merseburger, M.J. Ribal, A. Sherif, and J.A. Witjes, *Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines*. European Urology, 2011. **59**(6): p. 1009-1018.
 28. Pajor, G., N. Sule, D. Alpar, B. Kajtar, M. Kneif, D. Bollmann, L. Somogyi, and L. Pajor, *Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical preselection of uroepithelial cells*. Cytometry A, 2008. **73**(3): p. 259-65.
 29. Lotan, Y., K. Bensalah, T. Ruddell, S.F. Shariat, A.I. Sagalowsky, and R. Ashfaq, *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, 2008. **179**(6): p. 2164-9.
 30. Steiner, H., M. Bergmeister, I. Verdorfer, T. Granig, G. Mikuz, G. Bartsch, B. Stoehr, and A. Brunner, *Early results of bladder-cancer screening in a high-risk population of heavy smokers*. BJU Int, 2008. **102**(3): p. 291-6.

31. Babjuk, M., W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Böhle, J. Palou-Redorta, and M. Rouprêt, *EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update*. European Urology, 2011. **59**(6): p. 997-1008.
32. Herr, H.W., Z. Dotan, S.M. Donat, and D.F. Bajorin, *Defining optimal therapy for muscle invasive bladder cancer*. J.Urol., 2007. **177**(2): p. 437-443.
33. Stenzl, A., N.C. Cowan, M. De Santis, M.A. Kuczyk, A.S. Merseburger, M.J. Ribal, A. Sherif, and J.A. Witjes, *Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines*. European Urology, 2011. **In Press, Corrected Proof**.
34. Sarkis, A.S., D.F. Bajorin, V.E. Reuter, H.W. Herr, G. Netto, Z.F. Zhang, P.K. Schultz, C. Cordon-Cardo, and H.I. Scher, *Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC*. J.Clin.Oncol., 1995. **13**(6): p. 1384-1390.
35. Esrig, D., D. Elmajian, S. Groshen, J.A. Freeman, J.P. Stein, S.C. Chen, P.W. Nichols, D.G. Skinner, P.A. Jones, and R.J. Cote, *Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer*. N.Engl.J.Med., 1994. **331**(19): p. 1259-1264.
36. Lee, R. and M.J. Droller, *The natural history of bladder cancer. Implications for therapy*. Urol.Clin.North Am., 2000. **27**(1): p. 1-13, vii.
37. Kiemeny, L.A., J.A. Witjes, R.P. Heijbroek, A.L. Verbeek, and F.M. Debruyne, *Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer*. J.Urol., 1993. **150**(1): p. 60-64.
38. Allard, P., P. Bernard, Y. Fradet, and B. Tetu, *The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index*. Br.J.Urol., 1998. **81**(5): p. 692-698.
39. Kurth, K.H., L. Denis, C. Bouffieux, R. Sylvester, F.M. Debruyne, M. Pavone-Macaluso, and W. Oosterlinck, *Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours*. Eur.J.Cancer, 1995. **31A**(11): p. 1840-1846.
40. Bchner, B.H., J.E. Montie, and C.T. Lee, *Follow-up strategies and management of recurrence in urologic oncology bladder cancer: invasive bladder cancer*. Urol Clin North Am, 2003. **30**(4): p. 777-89.

41. Sylvester, R.J., A.P. van der Meijden, W. Oosterlinck, J.A. Witjes, C. Bouffoux, L. Denis, D.W. Newling, and K. Kurth, *Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials*. Eur.Urol., 2006. **49**(3): p. 466-5.
42. Fradet, Y., *Recent advances in the management of superficial bladder tumors*. Can.J.Urol., 2002. **9**(3): p. 1544-1550.
43. Rogers, C.G., G.S. Palapattu, S.F. Shariat, P.I. Karakiewicz, P.J. Bastian, Y. Lotan, A. Gupta, A. Vazina, A. Gilad, A.I. Sagalowsky, S.P. Lerner, and M.P. Schoenberg, *Clinical outcomes following radical cystectomy for primary nontransitional cell carcinoma of the bladder compared to transitional cell carcinoma of the bladder*. J.Urol., 2006. **175**(6): p. 2048-2053.
44. Sternberg, C.N. and F. Calabro, *Chemotherapy and management of bladder tumours*. BJU.Int., 2000. **85**(5): p. 599-610.
45. Wasco, M.J., S. Daignault, Y. Zhang, L.P. Kunju, M. Kinnaman, T. Braun, C.T. Lee, and R.B. Shah, *Urothelial carcinoma with divergent histologic differentiation (mixed histologic features) predicts the presence of locally advanced bladder cancer when detected at transurethral resection*. Urology, 2007. **70**(1): p. 69-74.
46. Black, P.C., G.A. Brown, and C.P. Dinney, *The impact of variant histology on the outcome of bladder cancer treated with curative intent*. Urol.Oncol., 2009. **27**(1): p. 3-7.
47. Zhai, Q.J., J. Black, A.G. Ayala, and J.Y. Ro, *Histologic variants of infiltrating urothelial carcinoma*. Arch.Pathol.Lab Med., 2007. **131**(8): p. 1244-1256.
48. Van Der Meijden, A., R. Sylvester, L. Collette, A. Bono, and F. Ten Kate, *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, 2000. **164**(5): p. 1533-7.
49. Wu, X.R., *Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways*. Nat.Rev.Cancer, 2005. **5**(9): p. 713-725.

50. Shariat, S.F., D.C. Chade, P.I. Karakiewicz, R. Ashfaq, H. Isbarn, Y. Fradet, P.J. Bastian, M.E. Nielsen, U. Capitanio, C. Jeldres, F. Montorsi, S.P. Lerner, A.I. Sagalowsky, R.J. Cote, and Y. Lotan, *Combination of multiple molecular markers can improve prognostication in patients with locally advanced and lymph node positive bladder cancer*. J.Urol., 2010. **183**(1): p. 68-75.
51. Cordon-Cardo, C., Z.F. Zhang, G. Dalbagni, M. Drobnjak, E. Charytonowicz, S.X. Hu, H.J. Xu, V.E. Reuter, and W.F. Benedict, *Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors*. Cancer Res., 1997. **57**(7): p. 1217-1221.
52. Cote, R.J., M.D. Dunn, S.J. Chatterjee, J.P. Stein, S.R. Shi, Q.C. Tran, S.X. Hu, H.J. Xu, S. Groshen, C.R. Taylor, D.G. Skinner, and W.F. Benedict, *Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53*. Cancer Res., 1998. **58**(6): p. 1090-1094.
53. Wolf, H.K., C. Stober, R. Hohenfellner, and J. Leissner, *Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas*. Tumour.Biol., 2001. **22**(5): p. 328-336.
54. Dalbagni, G., D.J. Parekh, L. Ben Porat, M. Potenzoni, H.W. Herr, and V.E. Reuter, *Prospective evaluation of p53 as a prognostic marker in T1 transitional cell carcinoma of the bladder*. BJU.Int., 2007. **99**(2): p. 281-285.
55. Mitra, A.P., M. Birkhahn, and R.J. Cote, *p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer*. World J.Urol., 2007. **25**(6): p. 563-571.
56. Shariat, S.F., P.I. Karakiewicz, R. Ashfaq, S.P. Lerner, G.S. Palapattu, R.J. Cote, A.I. Sagalowsky, and Y. Lotan, *Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy*. Cancer, 2008. **112**(2): p. 315-325.
57. Mudryj, M., E. Reay, L. Beckett, S. Dandekar, W.R. deVere, and R. Gandour-Edwards, *Novel p53/p130 axis in bladder tumors*. Urology, 2007. **70**(3): p. 608-612.
58. Hitchings, A.W., M. Kumar, S. Jordan, V. Nargund, J. Martin, and D.M. Berney, *Prediction of progression in pTa and pT1 bladder carcinomas with p53, p16 and pRb*. Br.J.Cancer, 2004. **91**(3): p. 552-557.

59. Santos, L.L., T. Amaro, S.A. Pereira, C.R. Lameiras, P. Lopes, M.J. Bento, J. Oliveira, B. Criado, and C.S. Lopes, *Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder*. Eur.J.Surg.Oncol., 2003. **29**(1): p. 74-80.
60. Cormio, L., I. Tolve, P. Annese, A. Saracino, R. Zamparese, F. Sanguedolce, P. Bufo, M. Battaglia, F.P. Selvaggi, and G. Carrieri, *Retinoblastoma protein expression predicts response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in patients with T1G3 bladder cancer*. Urol.Oncol., 2010. **28**(3): p. 285-289.
61. Migaldi, M., A. Sgambato, L. Garagnani, R. Ardito, P. Ferrari, C. De Gaetani, A. Cittadini, and G.P. Trentini, *Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers*. Clin.Cancer Res., 2000. **6**(8): p. 3131-3138.
62. Stein, J.P., D.A. Ginsberg, G.D. Grossfeld, S.J. Chatterjee, D. Esrig, M.G. Dickinson, S. Groshen, C.R. Taylor, P.A. Jones, D.G. Skinner, and R.J. Cote, *Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer*. J.Natl.Cancer Inst., 1998. **90**(14): p. 1072-1079.
63. Liukkonen, T., P. Lipponen, M. Raitanen, E. Kaasinen, M. Ala-Opas, P. Rajala, and V.M. Kosma, *Evaluation of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. Finbladder Group*. Urol.Res., 2000. **28**(5): p. 285-292.
64. Korkolopoulou, P., P. Christodoulou, A.E. Konstantinidou, E. Thomas-Tsagli, P. Kapralos, and P. Davaris, *Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27Kip1*. Hum.Pathol., 2000. **31**(6): p. 751-760.
65. Lacoste-Collin, L., A. Gomez-Brouchet, G. Escourrou, M.B. Delisle, T. Levade, and E. Uro-Coste, *Expression of p27(Kip1) in bladder cancers: immunohistochemical study and prognostic value in a series of 95 cases*. Cancer Lett., 2002. **186**(1): p. 115-120.
66. Rabbani, F., T.M. Koppie, E. Charytonowicz, M. Drobnjak, B.H. Bochner, and C. Cordon-Cardo, *Prognostic significance of p27Kip1 expression in bladder cancer*. BJU.Int., 2007. **100**(2): p. 259-263.

67. Gallucci, M., E. Vico, R. Merola, C. Leonardo, I. Sperduti, A. Felici, S. Sentinelli, R. Cantiani, G. Orlandi, and A. Cianciulli, *Adverse genetic prognostic profiles define a poor outcome for cystectomy in bladder cancer*. *Exp.Mol.Pathol.*, 2007. **83**(3): p. 385-391.
68. Toncheva, D. and B. Zaharieva, *Coexistence of copy number changes of different genes (INK4A, erbB-1, erbB-2, CMYC, CCND1 and ZNF217) in urothelial tumors*. *Tumour.Biol.*, 2005. **26**(2): p. 88-93.
69. Bartoletti, R., T. Cai, G. Nesi, G.L. Roberta, G. Baroni, and M. Dal Canto, *Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer*. *J.Surg.Res.*, 2007. **143**(2): p. 422-427.
70. Hernandez, S., E. Lopez-Knowles, J. Lloreta, M. Kogevinas, A. Amoros, A. Tardon, A. Carrato, C. Serra, N. Malats, and F.X. Real, *Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas*. *J.Clin.Oncol.*, 2006. **24**(22): p. 3664-3671.
71. Junker, K., J.M. van Oers, E.C. Zwarthoff, I. Kania, J. Schubert, and A. Hartmann, *Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder tumors correlate with low frequency of chromosome alterations*. *Neoplasia.*, 2008. **10**(1): p. 1-7.
72. Lindgren, D., F. Liedberg, A. Andersson, G. Chebil, S. Gudjonsson, A. Borg, W. Mansson, T. Fioretos, and M. Hoglund, *Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q*. *Oncogene*, 2006. **25**(18): p. 2685-2696.
73. Zieger, K., L. Dyrskjot, C. Wiuf, J.L. Jensen, C.L. Andersen, K.M. Jensen, and T.F. Orntoft, *Role of activating fibroblast growth factor receptor 3 mutations in the development of bladder tumors*. *Clin.Cancer Res.*, 2005. **11**(21): p. 7709-7719.
74. Tomlinson, D.C., O. Baldo, P. Harnden, and M.A. Knowles, *FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer*. *J.Pathol.*, 2007. **213**(1): p. 91-98.
75. Barbisan, F., A. Santinelli, R. Mazzucchelli, A. Lopez-Beltran, L. Cheng, M. Scarpelli, K.T. van der, and R. Montironi, *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, 2008. **112**(3): p. 636-644.
76. Mhawech-Fauceglia, P., R.T. Cheney, G. Fischer, A. Beck, and F.R. Herrmann, *FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer.* Eur.J.Surg.Oncol., 2006. **32**(2): p. 231-237.
 77. Miyake, M., K. Sugano, K. Kawashima, H. Ichikawa, K. Hirabayashi, T. Kodama, H. Fujimoto, T. Kakizoe, Y. Kanai, K. Fujimoto, and Y. Hirao, *Sensitive detection of FGFR3 mutations in bladder cancer and urine sediments by peptide nucleic acid-mediated real-time PCR clamping.* Biochem.Biophys.Res.Comm., 2007. **362**(4): p. 865-871.
 78. Rotterud, R., J.M. Nesland, A. Berner, and S.D. Fossa, *Expression of the epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium.* BJU.Int., 2005. **95**(9): p. 1344-1350.
 79. Villares, G.J., M. Zigler, K. Blehm, C. Bogdan, D. McConkey, D. Colin, and M. Bar-Eli, *Targeting EGFR in bladder cancer.* World J.Urol., 2007. **25**(6): p. 573-579.
 80. Wallerand, H., R.R. Reiter, and A. Ravaud, *Molecular targeting in the treatment of either advanced or metastatic bladder cancer or both according to the signalling pathways.* Curr.Opin.Urol., 2008. **18**(5): p. 524-532.
 81. Garcia-Closas, M., N. Malats, F.X. Real, M. Yeager, R. Welch, D. Silverman, M. Kogevinas, M. Dosemeci, J. Figueroa, N. Chatterjee, A. Tardon, C. Serra, A. Carrato, R. Garcia-Closas, C. Murta-Nascimento, N. Rothman, and S.J. Chanock, *Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk.* PLoS.Genet., 2007. **3**(2): p. e29.
 82. Vrooman, O.P. and J.A. Witjes, *Molecular markers for detection, surveillance and prognostication of bladder cancer.* Int.J.Urol., 2009. **16**(3): p. 234-243.
 83. Youssef, R.F., A.P. Mitra, G. Bartsch, Jr., P.A. Jones, D.G. Skinner, and R.J. Cote, *Molecular targets and targeted therapies in bladder cancer management.* World J.Urol., 2009. **27**(1): p. 9-20.

84. Sakamoto, S., A.J. Ryan, and N. Kyprianou, *Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance*. J.Cell Biochem., 2008. **103**(3): p. 691-708.
85. Pollack, A., C.S. Wu, B. Czerniak, G.K. Zagars, W.F. Benedict, and T.J. McDonnell, *Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer*. Clin.Cancer Res., 1997. **3**(10): p. 1823-1829.
86. Habuchi, T., H. Kinoshita, H. Yamada, Y. Kakehi, O. Ogawa, W.J. Wu, R. Takahashi, T. Sugiyama, and O. Yoshida, *Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification*. J.Natl.Cancer Inst., 1994. **86**(17): p. 1331-1335.
87. Margulis, V., Y. Lotan, P.I. Karakiewicz, Y. Fradet, R. Ashfaq, U. Capitanio, F. Montorsi, P.J. Bastian, M.E. Nielsen, S.C. Muller, J. Rigaud, L.C. Heukamp, G. Netto, S.P. Lerner, A.I. Sagalowsky, and S.F. Shariat, *Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer*. J.Natl.Cancer Inst., 2009. **101**(2): p. 114-119.
88. Margulis, V., S.F. Shariat, R. Ashfaq, A.I. Sagalowsky, and Y. Lotan, *Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease*. Clin.Cancer Res., 2006. **12**(24): p. 7369-7373.
89. Menke, T.B., K. Boettcher, S. Kruger, I. Kausch, A. Boehle, G. Sczakiel, and J.M. Warnecke, *Ki-67 protein concentrations in urothelial bladder carcinomas are related to Ki-67-specific RNA concentrations in urine*. Clin.Chem., 2004. **50**(8): p. 1461-1463.
90. Gonul, I.I., N. Akyurek, A. Dursun, and B. Kupeli, *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., 2008. **204**(10): p. 707-717.
91. Margulis, V., S.F. Shariat, R. Ashfaq, M. Thompson, A.I. Sagalowsky, J.T. Hsieh, and Y. Lotan, *Expression of cyclooxygenase-2 in normal urothelium, and*

- superficial and advanced transitional cell carcinoma of bladder. J.Urol.*, 2007. **177**(3): p. 1163-1168.
92. Yurakh, A.O., D. Ramos, S. Calabuig-Farinas, J.A. Lopez-Guerrero, J. Rubio, E. Solsona, A.M. Romanenko, A.F. Vozianov, A. Pellin, and A. Llombart-Bosch, *Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. Eur.Urol.*, 2006. **50**(3): p. 506-515.
 93. Zhou, H., J. Kuang, L. Zhong, W.L. Kuo, J.W. Gray, A. Sahin, B.R. Brinkley, and S. Sen, *Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. Nat.Genet.*, 1998. **20**(2): p. 189-193.
 94. Comperat, E., P. Camparo, R. Haus, E. Chartier-Kastler, B. Radenen, F. Richard, F. Capron, and V. Paradis, *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.*, 2007. **450**(4): p. 419-424.
 95. Sen, S., H. Zhou, R.D. Zhang, D.S. Yoon, F. Vakar-Lopez, S. Ito, F. Jiang, D. Johnston, H.B. Grossman, A.C. Ruifrok, R.L. Katz, W. Brinkley, and B. Czerniak, *Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. J.Natl.Cancer Inst.*, 2002. **94**(17): p. 1320-1329.
 96. Duffy, M.J., N. O'Donovan, D.J. Brennan, W.M. Gallagher, and B.M. Ryan, *Survivin: a promising tumor biomarker. Cancer Lett.*, 2007. **249**(1): p. 49-60.
 97. Shariat, S.F., P.I. Karakiewicz, G. Godoy, J.A. Karam, R. Ashfaq, Y. Fradet, H. Isbarn, F. Montorsi, C. Jeldres, P.J. Bastian, M.E. Nielsen, S.C. Muller, A.I. Sagalowsky, and Y. Lotan, *Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study. Clin.Cancer Res.*, 2009. **15**(22): p. 7012-7019.
 98. Michaud, D.S., *Chronic inflammation and bladder cancer. Urol.Oncol.*, 2007. **25**(3): p. 260-268.
 99. Hilmy, M., R. Campbell, J.M. Bartlett, A.M. McNicol, M.A. Underwood, and D.C. McMillan, *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, 2006. 95(9): p. 1234-1238.*
100. Moussa, M., Z. Omran, M. Nosseir, A. Lotfy, and T. Swellam, *Cyclooxygenase-2 expression on urothelial and inflammatory cells of cystoscopic biopsies and urine cytology as a possible predictive marker for bladder carcinoma. APMIS, 2009. 117(1): p. 45-52.*
 101. Wadhwa, P., A.K. Goswami, K. Joshi, and S.K. Sharma, *Cyclooxygenase-2 expression increases with the stage and grade in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Int.Urol.Nephrol., 2005. 37(1): p. 47-53.*
 102. Gee, J., I.L. Lee, D. Jendiroba, S.M. Fischer, H.B. Grossman, and A.L. Sabichi, *Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer. Oncol.Rep., 2006. 15(2): p. 471-477.*
 103. Sharma, P., Y. Shen, S. Wen, S. Yamada, A.A. Jungbluth, S. Gnjatic, D.F. Bajorin, V.E. Reuter, H. Herr, L.J. Old, and E. Sato, *CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2007. 104(10): p. 3967-3972.*
 104. Bringuier, P.P., R. Umbas, H.E. Schaafsma, H.F. Karthaus, F.M. Debruyne, and J.A. Schalken, *Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. Cancer Res., 1993. 53(14): p. 3241-3245.*
 105. Otto, T., W. Birchmeier, U. Schmidt, A. Hinke, J. Schipper, H. Rubben, and A. Raz, *Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. Cancer Res., 1994. 54(12): p. 3120-3123.*
 106. Szekely, E., V. Torok, T. Szekely, P. Riesz, and I. Romics, *E-cadherin expression in transitional cell carcinomas. Pathol Oncol Res, 2006. 12(2): p. 73-7.*
 107. Matsumura, Y., M. Sugiyama, S. Matsumura, A.J. Hayle, P. Robinson, J.C. Smith, and D. Tarin, *Unusual retention of introns in CD44 gene transcripts in bladder cancer provides new diagnostic and clinical oncological opportunities. J.Pathol., 1995. 177(1): p. 11-20.*

108. Castillo-Martin, M., J. Domingo-Domenech, O. Karni-Schmidt, T. Matos, and C. Cordon-Cardo, *Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis*. Urol Oncol, 2010. **28**(4): p. 401-8.
109. Jones, T.D., S. Zhang, A. Lopez-Beltran, J.N. Eble, M.T. Sung, G.T. MacLennan, R. Montironi, P.H. Tan, S. Zheng, L.A. Baldrige, and L. Cheng, *Urothelial carcinoma with an inverted growth pattern can be distinguished from inverted papilloma by fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and morphologic analysis*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(12): p. 1861-7.
110. van Oers, J.M., P.J. Wild, M. Burger, S. Denzinger, R. Stoehr, E. Roskopf, F. Hofstaedter, E.W. Steyerberg, M. Klinkhammer-Schalke, E.C. Zwarthoff, T.H. van der Kwast, and A. Hartmann, *FGFR3 mutations and a normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumours*. Eur Urol, 2007. **52**(3): p. 760-8.
111. Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita, *Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1999. **96**(2): p. 511-516.
112. Steed, E., M.S. Balda, and K. Matter, *Dynamics and functions of tight junctions*. Trends Cell Biol., 2010. **20**(3): p. 142-149.
113. Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada, *Transmembrane proteins of tight junctions*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 588-600.
114. Balda, M.S. and K. Matter, *Tight junctions and the regulation of gene expression*. Biochim.Biophys.Acta, 2009. **1788**(4): p. 761-767.
115. Furuse, M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita, *Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions*. J.Cell Biol., 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1617-1626.
116. Haskins, J., L. Gu, E.S. Wittchen, J. Hibbard, and B.R. Stevenson, *ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin*. J.Cell Biol., 1998. **141**(1): p. 199-208.

117. Itoh, M., K. Morita, and S. Tsukita, *Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin*. J.Biol.Chem., 1999. **274**(9): p. 5981-5986.
118. Balda, M.S., J.A. Whitney, C. Flores, S. Gonzalez, M. Cereijido, and K. Matter, *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. J.Cell Biol., 1996. **134**(4): p. 1031-1049.
119. McCarthy, K.M., I.B. Skare, M.C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R.A. Rogers, R.D. Lynch, and E.E. Schneeberger, *Occludin is a functional component of the tight junction*. J Cell Sci, 1996. **109** (Pt 9): p. 2287-98.
120. Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita, *A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts*. J.Cell Biol., 1998. **143**(2): p. 391-401.
121. Matter, K., S. Aijaz, A. Tsapara, and M.S. Balda, *Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 453-8.
122. Wang, Z., K.J. Mandell, C.A. Parkos, R.J. Mrsny, and A. Nusrat, *The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth*. Oncogene, 2005. **24**(27): p. 4412-20.
123. Yoshida, T., M. Kondoh, and K. Yagi, *Promising targets for anti-hepatitis C virus agents*. Curr Med Chem, 2011. **18**(8): p. 1239-44.
124. Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, and S. Tsukita, *Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells*. J Cell Biol, 2005. **171**(6): p. 939-45.
125. Riazuddin, S., Z.M. Ahmed, A.S. Fanning, A. Lagziel, S. Kitajiri, K. Ramzan, S.N. Khan, P. Chattaraj, P.L. Friedman, J.M. Anderson, I.A. Belyantseva, A. Forge, and T.B. Friedman, *Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(6): p. 1040-51.

126. Masuda, S., Y. Oda, H. Sasaki, J. Ikenouchi, T. Higashi, M. Akashi, E. Nishi, and M. Furuse, *LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells*. J Cell Sci, 2011. **124**(4): p. 548-555.
127. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions*. Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 2001. **2**(4): p. 285-293.
128. Mineta, K., Y. Yamamoto, Y. Yamazaki, H. Tanaka, Y. Tada, K. Saito, A. Tamura, M. Igarashi, T. Endo, K. Takeuchi, and S. Tsukita, *Predicted expansion of the claudin multigene family*. FEBS Lett, 2011. **585**(4): p. 606-12.
129. Colegio, O.R., C.M. Van Itallie, H.J. McCrea, C. Rahner, and J.M. Anderson, *Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C142-7.
130. Piontek, J., L. Winkler, H. Wolburg, S.L. Muller, N. Zuleger, C. Piehl, B. Wiesner, G. Krause, and I.E. Blasig, *Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins*. FASEB J, 2008. **22**(1): p. 146-58.
131. Hamazaki, Y., M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita, *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., 2002. **277**(1): p. 455-461.
132. Roh, M.H., C.J. Liu, S. Laurinec, and B. Margolis, *The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27501-9.
133. Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita, *Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins*. J.Cell Biol., 1999. **147**(6): p. 1351-1363.
134. Lechpammer, M., M.B. Resnick, E. Sabo, E. Yakirevich, W.O. Greaves, K.T. Sciandra, R. Tavares, L.C. Noble, R.A. DeLellis, and L.J. Wang, *The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms*. Mod Pathol, 2008. **21**(11): p. 1320-9.
135. Lal-Nag, M. and P.J. Morin, *The claudins*. Genome Biol., 2009. **10**(8): p. 235.1-235.7.

136. Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita, *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice*. *J.Cell Biol.*, 2002. **156**(6): p. 1099-1111.
137. Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice, *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. *Nature*, 2007. **446**(7137): p. 801-5.
138. Miyamoto, K., T. Kusumi, F. Sato, H. Kawasaki, S. Shibata, M. Ohashi, K. Hakamada, M. Sasaki, and H. Kijima, *Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma*. *Biomed.Res.*, 2008. **29**(2): p. 71-76.
139. Higashi, Y., S. Suzuki, T. Sakaguchi, T. Nakamura, S. Baba, H.C. Reinecker, S. Nakamura, and H. Konno, *Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma*. *J Surg Res*, 2007. **139**(1): p. 68-76.
140. Sobel, G., C. Paska, I. Szabo, A. Kiss, A. Kadar, and Z. Schaff, *Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma*. *Hum.Pathol.*, 2005. **36**(2): p. 162-169.
141. Fritzsche, F.R., B. Oelrich, M. Johannsen, I. Kristiansen, H. Moch, K. Jung, and G. Kristiansen, *Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(21): p. 7035-42.
142. Chao, Y.C., S.H. Pan, S.C. Yang, S.L. Yu, T.F. Che, C.W. Lin, M.S. Tsai, G.C. Chang, C.H. Wu, Y.Y. Wu, Y.C. Lee, T.M. Hong, and P.C. Yang, *Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma*. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 2009. **179**(2): p. 123-133.
143. Halasz, J., A. Holczbauer, C. Paska, M. Kovacs, G. Benyo, T. Verebely, Z. Schaff, and A. Kiss, *Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma*. *Hum.Pathol.*, 2006. **37**(5): p. 555-561.

144. Nemeth, J., Z. Nemeth, P. Tatrai, I. Peter, A. Somoracz, A.M. Szasz, A. Kiss, and Z. Schaff, *High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis*. *Pathol Oncol Res*, 2010. **16**(1): p. 19-27.
145. Gyorffy, H., A. Holczbauer, P. Nagy, Z. Szabo, P. Kupcsulik, C. Paska, J. Papp, Z. Schaff, and A. Kiss, *Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma*. *Virchows Arch*, 2005. **447**(6): p. 961-8.
146. Reyes, J.L., M. Lamas, D. Martin, N.M. del Carmen, S. Islas, J. Luna, M. Tauc, and L. Gonzalez-Mariscal, *The renal segmental distribution of claudins changes with development*. *Kidney Int.*, 2002. **62**(2): p. 476-487.
147. Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, S. Liebner, and B. Engelhardt, *Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse*. *Neurosci.Lett.*, 2001. **307**(2): p. 77-80.
148. Dhawan, P., R. Ahmad, R. Chaturvedi, J.J. Smith, R. Midha, M.K. Mittal, M. Krishnan, X. Chen, S. Eschrich, T.J. Yeatman, R.C. Harris, M.K. Washington, K.T. Wilson, R.D. Beauchamp, and A.B. Singh, *Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation*. *Oncogene*, 2011.
149. Kleinberg, L., A. Holth, C.G. Trope, R. Reich, and B. Davidson, *Claudin upregulation in ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival*. *Hum.Pathol.*, 2008. **39**(5): p. 747-757.
150. Rangel, L.B., R. Agarwal, T. D'Souza, E.S. Pizer, P.L. Alo, W.D. Lancaster, L. Gregoire, D.R. Schwartz, K.R. Cho, and P.J. Morin, *Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas*. *Clin.Cancer Res.*, 2003. **9**(7): p. 2567-2575.
151. Long, H., C.D. Crean, W.H. Lee, O.W. Cummings, and T.G. Gabig, *Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium*. *Cancer Res.*, 2001. **61**(21): p. 7878-7881.
152. Koda, R., L. Zhao, E. Yaoita, Y. Yoshida, S. Tsukita, A. Tamura, M. Nameta, Y. Zhang, H. Fujinaka, S. Magdeldin, B. Xu, I. Narita, and T. Yamamoto, *Novel*

- expression of claudin-5 in glomerular podocytes.* Cell Tissue Res, 2011. **343**(3): p. 637-48.
153. Coutinho-Camillo, C.M., S.V. Lourenco, F.P. da Fonseca, and F.A. Soares, *Claudin expression is dysregulated in prostate adenocarcinomas but does not correlate with main clinicopathological parameters.* Pathology, 2011. **43**(2): p. 143-8.
154. Sonoda, N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi, and S. Tsukita, *Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier.* J.Cell Biol., 1999. **147**(1): p. 195-204.
155. Van Itallie, C., C. Rahner, and J.M. Anderson, *Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability.* J.Clin.Invest, 2001. **107**(10): p. 1319-1327.
156. Szasz, A.M., P. Nyirady, A. Majoros, A. Szendroi, M. Szucs, E. Szekely, A.M. Tokes, I. Romics, and J. Kulka, *beta-catenin expression and claudin expression pattern as prognostic factors of prostatic cancer progression.* BJU.Int., 2010. **105**(5): p. 716-722.
157. Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, S. Tsunoda, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Tsutsumi, Y. Horiguchi, and K. Yagi, *A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule.* Mol Pharmacol, 2009. **76**(4): p. 918-26.
158. Kato-Nakano, M., M. Suzuki, S. Kawamoto, A. Furuya, S. Ohta, K. Nakamura, and H. Ando, *Characterization and evaluation of the antitumour activity of a dual-targeting monoclonal antibody against claudin-3 and claudin-4.* Anticancer Res, 2010. **30**(11): p. 4555-62.
159. Kulka, J., A.M. Szasz, Z. Nemeth, L. Madaras, Z. Schaff, I.A. Molnar, and A.M. Tokes, *Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas.* Pathol.Oncol.Res., 2009. **15**(1): p. 59-64.
160. Lanigan, F., E. McKiernan, D.J. Brennan, S. Hegarty, R.C. Millikan, J. McBryan, K. Jirstrom, G. Landberg, F. Martin, M.J. Duffy, and W.M. Gallagher, *Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer.* Int.J.Cancer, 2009. **124**(9): p. 2088-2097.

161. Nichols, L.S., R. Ashfaq, and C.A. Iacobuzio-Donahue, *Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target*. *Am.J.Clin.Pathol.*, 2004. **121**(2): p. 226-230.
162. Ohtani, S., M. Terashima, J. Satoh, N. Soeta, Z. Saze, S. Kashimura, F. Ohsuka, Y. Hoshino, M. Kogure, and M. Gotoh, *Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival*. *Gastric Cancer*, 2009. **12**(1): p. 43-51.
163. Hsueh, C., Y.S. Chang, N.M. Tseng, C.T. Liao, S. Hsueh, J.H. Chang, I.C. Wu, and K.P. Chang, *Expression pattern and prognostic significance of claudins 1, 4, and 7 in nasopharyngeal carcinoma*. *Hum Pathol*, 2010. **41**(7): p. 944-50.
164. Lodi, C., E. Szabo, A. Holczbauer, E. Batmunkh, A. Szijarto, P. Kupcsulik, I. Kovalszky, S. Paku, G. Illyes, A. Kiss, and Z. Schaff, *Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas*. *Mod.Pathol.*, 2006. **19**(3): p. 460-469.
165. Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita, *Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells*. *J.Cell Biol.*, 1999. **147**(1): p. 185-194.
166. Kniesel, U. and H. Wolburg, *Tight Junctions of the Blood–Brain Barrier*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2000. **20**(1): p. 57-76.
167. Paschoud, S., M. Bongiovanni, J.C. Pache, and S. Citi, *Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(9): p. 947-54.
168. Kominsky, S.L., P. Argani, D. Korz, E. Evron, V. Raman, E. Garrett, A. Rein, G. Sauter, O.-P. Kallioniemi, and S. Sukumar, *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*, 2003. **22**(13): p. 2021-2033.
169. Bornholdt, J., S. Friis, S. Godiksen, S. Poulsen, E. Santoni-Rugiu, H. Bisgaard, I. Lothe, T. Ikdahl, K. Tveit, E. Johnson, E. Kure, and L. Vogel, *The level of claudin-7 is reduced as an early event in colorectal carcinogenesis*. *BMC Cancer*, 2011. **11**(1): p. 65.

170. Lourenço, S.V., C.M. Coutinho-Camillo, M.E.C. Buim, A.C. De Carvalho, R.C. Lessa, C.M. Pereira, A.L. Vettore, A.L. Carvalho, J.H. Fregnani, L.P. Kowalski, and F.A. Soares, *Claudin-7 down-regulation is an important feature in oral squamous cell carcinoma*. *Histopathology*, 2010. **57**(5): p. 689-698.
171. Sheehan, G.M., B.V. Kallakury, C.E. Sheehan, H.A. Fisher, R.P. Kaufman, Jr., and J.S. Ross, *Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(4): p. 564-9.
172. Cheung, S.T., K.L. Leung, Y.C. Ip, X. Chen, D.Y. Fong, I.O. Ng, S.T. Fan, and S. So, *Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 551-6.
173. Nemeth, Z., A.M. Szasz, P. Tatrai, J. Nemeth, H. Gyorffy, A. Somoracz, A. Szijarto, P. Kupcsulik, A. Kiss, and Z. Schaff, *Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers*. *J Histochem Cytochem*, 2009. **57**(2): p. 113-21.
174. Turksen, K. and T.C. Troy, *Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium*. *Dev Dyn*, 2001. **222**(2): p. 292-300.
175. Wu, Q., Y. Liu, Y. Ren, X. Xu, L. Yu, Y. Li, and C. Quan, *Tight junction protein, claudin-6, downregulates the malignant phenotype of breast carcinoma*. *Eur J Cancer Prev*, 2010. **19**(3): p. 186-94.
176. Zheng, A., F. Yuan, Y. Li, F. Zhu, P. Hou, J. Li, X. Song, M. Ding, and H. Deng, *Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus*. *J Virol*, 2007. **81**(22): p. 12465-71.
177. Truong, L.D. and S.S. Shen, *Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms*. *Arch Pathol Lab Med*, 2011. **135**(1): p. 92-109.
178. Nakano, Y., S.H. Kim, H.M. Kim, J.D. Sanneman, Y. Zhang, R.J. Smith, D.C. Marcus, P. Wangemann, R.A. Nessler, and B. Banfi, *A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(8): p. e1000610.

179. Zavala-Zendejas, V.E., A.C. Torres-Martinez, B. Salas-Morales, T.I. Fortoul, L.F. Montano, and E.P. Rendon-Huerta, *Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate*. *Cancer Invest*, 2011. **29**(1): p. 1-11.
180. Morita, K., H. Sasaki, K. Fujimoto, M. Furuse, and S. Tsukita, *Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis*. *J.Cell Biol.*, 1999. **145**(3): p. 579-588.
181. Kitajiri, S., T. Miyamoto, A. Mineharu, N. Sonoda, K. Furuse, M. Hata, H. Sasaki, Y. Mori, T. Kubota, J. Ito, M. Furuse, and S. Tsukita, *Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 21): p. 5087-96.
182. Nah, W.H., J.E. Lee, H.J. Park, N.C. Park, and M.C. Gye, *Claudin-11 expression increased in spermatogenic defect in human testes*. *Fertil Steril*, 2011. **95**(1): p. 385-8.
183. Acharya, P., J. Beckel, W.G. Ruiz, E. Wang, R. Rojas, L. Birder, and G. Apodaca, *Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(2): p. F305-18.
184. Christakos, S., P. Dhawan, D. Ajibade, B.S. Benn, J. Feng, and S.S. Joshi, *Mechanisms involved in vitamin D mediated intestinal calcium absorption and in non-classical actions of vitamin D*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. **121**(1-2): p. 183-7.
185. Ben-Yosef, T., I.A. Belyantseva, T.L. Saunders, E.D. Hughes, K. Kawamoto, C.M. Van Itallie, L.A. Beyer, K. Halsey, D.J. Gardner, E.R. Wilcox, J. Rasmussen, J.M. Anderson, D.F. Dolan, A. Forge, Y. Raphael, S.A. Camper, and T.B. Friedman, *Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(16): p. 2049-61.

186. Kiuchi-Saishin, Y., S. Gotoh, M. Furuse, A. Takasuga, Y. Tano, and S. Tsukita, *Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments*. J.Am.Soc.Nephrol., 2002. **13**(4): p. 875-886.
187. Tamura, A., H. Hayashi, M. Imasato, Y. Yamazaki, A. Hagiwara, M. Wada, T. Noda, M. Watanabe, Y. Suzuki, and S. Tsukita, *Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes na(+) deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 913-23.
188. Simon, D.B., Y. Lu, K.A. Choate, H. Velazquez, E. Al Sabban, M. Praga, G. Casari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad, and R.P. Lifton, *Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption*. Science, 1999. **285**(5424): p. 103-106.
189. Satoh, J. and M.F. Romero, *Mg²⁺ transport in the kidney*. Biometals, 2002. **15**(3): p. 285-95.
190. Martin, T.A., G.M. Harrison, G. Watkins, and W.G. Jiang, *Claudin-16 reduces the aggressive behavior of human breast cancer cells*. J Cell Biochem, 2008. **105**(1): p. 41-52.
191. Charoenphandhu, N., K. Wongdee, K. Tudpor, J. Pandaranandaka, and N. Krishnamra, *Chronic metabolic acidosis upregulated claudin mRNA expression in the duodenal enterocytes of female rats*. Life Sciences, 2007. **80**(19): p. 1729-1737.
192. Niimi, T., K. Nagashima, J.M. Ward, P. Minoo, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, and S. Kimura, *claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing*. Mol.Cell Biol., 2001. **21**(21): p. 7380-7390.
193. Miyamoto, T., K. Morita, D. Takemoto, K. Takeuchi, Y. Kitano, T. Miyakawa, K. Nakayama, Y. Okamura, H. Sasaki, Y. Miyachi, M. Furuse, and S. Tsukita, *Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice*. J Cell Biol, 2005. **169**(3): p. 527-38.
194. Konrad, M., A. Schaller, D. Seelow, A.V. Pandey, S. Waldegger, A. Lesslauer, H. Vitzthum, Y. Suzuki, J.M. Luk, C. Becker, K.P. Schlingmann, M. Schmid, J. Rodriguez-Soriano, G. Ariceta, F. Cano, R. Enriquez, H. Juppner, S.A. Bakkaloglu,

- M.A. Hediger, S. Gallati, S.C. Neuhaus, P. Nurnberg, and S. Weber, *Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement*. *Am J Hum Genet*, 2006. **79**(5): p. 949-57.
195. Rizzolo, L.J., X. Chen, M. Weitzman, R. Sun, and H. Zhang, *Analysis of the RPE transcriptome reveals dynamic changes during the development of the outer blood-retinal barrier*. *Mol Vis*, 2007. **13**: p. 1259-73.
196. Mineta, K., Y. Yamamoto, Y. Yamazaki, H. Tanaka, Y. Tada, K. Saito, A. Tamura, M. Igarashi, T. Endo, K. Takeuchi, and S. Tsukita, *Predicted expansion of the claudin multigene family*. *FEBS Letters*, 2011. **585**(4): p. 606-612.
197. Rickard, A., N. Dorokhov, J. Ryerse, D.J. Klumpp, and J. McHowat, *Characterization of tight junction proteins in cultured human urothelial cells*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008. **44**(7): p. 261-7.
198. Nakanishi, K., S. Ogata, S. Hiroi, S. Tominaga, S. Aida, and T. Kawai, *Expression of occludin and claudins 1, 3, 4, and 7 in urothelial carcinoma of the upper urinary tract*. *Am.J.Clin.Pathol.*, 2008. **130**(1): p. 43-49.
199. Boireau, S., M. Buchert, M.S. Samuel, J. Pannequin, J.L. Ryan, A. Choquet, H. Chapuis, X. Rebillard, C. Avances, M. Ernst, D. Joubert, N. Mottet, and F. Hollande, *DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(2): p. 246-258.
200. Guo, Y.L., R. Bai, C.X. Chen, D.Q. Liu, Y. Liu, C.Y. Zhang, and K. Zen, *Role of junctional adhesion molecule-like protein in mediating monocyte transendothelial migration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(1): p. 75-83.
201. Makino, A., M. Shimojima, T. Miyazawa, K. Kato, Y. Tohya, and H. Akashi, *Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus*. *J Virol*, 2006. **80**(9): p. 4482-90.
202. Riesz, P., E. Szekely, P. Torzsok, A. Majoros, A. Szendroi, P. Dombovari, and I. Romics, *[Can inverted papilloma in urinary bladder be considered as a benign tumor]*. *Orv.Hetil.*, 2010. **151**(3): p. 92-95.

203. Eiber, M., J.M. van Oers, E.C. Zwarthoff, T.H. van der Kwast, O. Ulrich, B. Helpap, S. Stoerckel, H. Blaszyk, J. Cheville, G. Sauter, P.J. Wild, R. Stoehr, F. Hofstaedter, and A. Hartmann, *Low frequency of molecular changes and tumor recurrence in inverted papillomas of the urinary tract*. *Am.J.Surg.Pathol.*, 2007. **31**(6): p. 938-946.
204. Glas, A.S., D. Roos, M. Deutekom, A.H. Zwinderman, P.M. Bossuyt, and K.H. Kurth, *Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review*. *J Urol*, 2003. **169**(6): p. 1975-82.
205. Yutkin, V., B. Nisman, and D. Pode, *Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance?* *Expert Review of Anticancer Therapy*. **10**(6): p. 787-790.
206. Grossman, H.B., *New methods for detection of bladder cancer*. *Semin Urol Oncol*, 1998. **16**(1): p. 17-22.
207. Slaton, J.W., C.P. Dinney, R.W. Veltri, C.M. Miller, M. Liebert, G.J. O'Dowd, and H.B. Grossman, *Deoxyribonucleic acid ploidy enhances the cytological prediction of recurrent transitional cell carcinoma of the bladder*. *J Urol*, 1997. **158**(3 Pt 1): p. 806-11.
208. van Poppel, H., J. Billen, H. Goethuys, A.A. Elgamal, M. Gerits, L. Mortelmans, N. Blanckaert, and L. Baert, *Serum tissue polypeptide antigen (TPA) as tumor marker for bladder cancer*. *Anticancer Res*, 1996. **16**(4B): p. 2205-7.
209. Zhang, F.F., D.A. Arber, T.G. Wilson, M.H. Kawachi, and M.L. Slovak, *Toward the validation of aneusomy detection by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer: comparative analysis with cytology, cytogenetics, and clinical features predicts recurrence and defines clinical testing limitations*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(12 Pt 1): p. 2317-28.
210. Mao, L., M.P. Schoenberg, M. Scicchitano, Y.S. Erozan, A. Merlo, D. Schwab, and D. Sidransky, *Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis*. *Science*, 1996. **271**(5249): p. 659-62.

211. Steiner, G., M.P. Schoenberg, J.F. Linn, L. Mao, and D. Sidransky, *Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine*. Nat Med, 1997. **3**(6): p. 621-4.
212. Smrkolj, T., M. Mihelič, A. Sedlar, I. Sterle, J.k. Osredkar, and B. Sedmak, *Performance of nuclear matrix protein 22 urine marker and voided urine cytology in the detection of urinary bladder tumors*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. **49**(2): p. 311-316.
213. Halling, K.C., W. King, I.A. Sokolova, R.J. Karnes, R.G. Meyer, E.L. Powell, T.J. Sebo, J.C. Cheville, A.C. Clayton, K.L. Krajnik, T.A. Ebert, R.E. Nelson, H.M. Burkhardt, S. Ramakumar, C.S. Stewart, V.S. Pankratz, M.M. Lieber, M.L. Blute, H. Zincke, S.A. Seelig, R.B. Jenkins, and D.J. O'Kane, *A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine*. J.Urol., 2002. **167**(5): p. 2001-2006.
214. Halling, K.C., W. King, I.A. Sokolova, R.G. Meyer, H.M. Burkhardt, A.C. Halling, J.C. Cheville, T.J. Sebo, S. Ramakumar, C.S. Stewart, S. Pankratz, D.J. O'Kane, S.A. Seelig, M.M. Lieber, and R.B. Jenkins, *A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma*. J.Urol., 2000. **164**(5): p. 1768-1775.
215. Halling, K.C., W. King, I.A. Sokolova, R.G. Meyer, H.M. Burkhardt, A.C. Halling, J.C. Cheville, T.J. Sebo, S. Ramakumar, C.S. Stewart, S. Pankratz, D.J. O'Kane, S.A. Seelig, M.M. Lieber, and R.B. Jenkins, *A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma*. J Urol, 2000. **164**(5): p. 1768-75.
216. Halling, K.C., W. King, I.A. Sokolova, R.J. Karnes, R.G. Meyer, E.L. Powell, T.J. Sebo, J.C. Cheville, A.C. Clayton, K.L. Krajnik, T.A. Ebert, R.E. Nelson, H.M. Burkhardt, S. Ramakumar, C.S. Stewart, V.S. Pankratz, M.M. Lieber, M.L. Blute, H. Zincke, S.A. Seelig, R.B. Jenkins, and D.J. O'Kane, *A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine*. J Urol, 2002. **167**(5): p. 2001-6.

217. Gudjonsson, S., B.L. Isfoss, K. Hansson, A.M. Domanski, J. Warenholt, W. Soller, L.M. Lundberg, F. Liedberg, M. Grabe, and W. Mansson, *The value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer*. Eur Urol, 2008. **54**(2): p. 402-8.
218. Fritsche, H.M., M. Burger, W. Dietmaier, S. Denzinger, E. Bach, W. Otto, M. Doblinger, S. Schwarz, H. Buchner, and A. Hartmann, *Multicolor FISH (UroVysion) facilitates follow-up of patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder*. Am J Clin Pathol. **134**(4): p. 597-603.
219. Rosenblatt, R., S. Jonmarker, R. Lewensohn, L. Egevad, A. Sherif, K.M. Kalkner, S. Nilsson, A. Valdman, and A. Ullen, *Current status of prognostic immunohistochemical markers for urothelial bladder cancer*. Tumour Biol, 2008. **29**(5): p. 311-22.
220. Bollmann, M., H. Heller, A. Bankfalvi, H. Griefingholt, and R. Bollmann, *Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer?* BJU Int, 2005. **95**(9): p. 1219-25.
221. Burger, M., M.N. van der Aa, J.M. van Oers, A. Brinkmann, T.H. van der Kwast, E.C. Steyerberg, R. Stoehr, W.J. Kirkels, S. Denzinger, P.J. Wild, W.F. Wieland, F. Hofstaedter, A. Hartmann, and E.C. Zwarthoff, *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, 2008. **54**(4): p. 835-43.
222. Kramer, C., K. Klasmeyer, H. Bojar, W.A. Schulz, R. Ackermann, and M.O. Grimm, *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor isoforms and epidermal growth factor receptor/ErbB1 expression in bladder cancer and their relation to clinical outcome*. Cancer, 2007. **109**(10): p. 2016-24.
223. Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita, *Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. J.Cell Biol., 1998. **141**(7): p. 1539-1550.
224. Heiskala, M., P.A. Peterson, and Y. Yang, *The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport*. Traffic., 2001. **2**(2): p. 93-98.

225. Tsukita, S. and M. Furuse, *Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores*. J.Cell Biol., 2000. **149**(1): p. 13-16.
226. Amasheh, S., N. Meiri, A.H. Gitter, T. Schoneberg, J. Mankertz, J.D. Schulzke, and M. Fromm, *Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4969-76.
227. Hering, N.A. and J.D. Schulzke, *Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease*. Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 450-4.
228. Thuijls, G., J.P. Derikx, J.J. de Haan, J. Grootjans, A. de Bruine, A.A. Masclee, E. Heineman, and W.A. Buurman, *Urine-based detection of intestinal tight junction loss*. J Clin Gastroenterol, 2010. **44**(1): p. e14-9.
229. Santos, L., T. Amaro, C. Costa, S. Pereira, M.J. Bento, P. Lopes, J. Oliveira, B. Criado, and C. Lopes, *Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification*. Int.J.Cancer, 2003. **105**(2): p. 267-272.
230. Kaufmann, O., E. Fietze, J. Mengers, and M. Dietel, *Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas*. Am J Clin Pathol, 2001. **116**(6): p. 823-30.
231. Jones, T.D., M. Wang, J.N. Eble, G.T. MacLennan, A. Lopez-Beltran, S. Zhang, A. Cocco, and L. Cheng, *Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis*. Clin.Cancer Res., 2005. **11**(18): p. 6512-6519.
232. Bello, I.O., S.T. Vilen, A. Niinimaa, S. Kantola, Y. Soini, and T. Salo, *Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue*. Hum.Pathol., 2008. **39**(8): p. 1212-1220.
233. Lioni, M., P. Brafford, C. Andl, A. Rustgi, W. El Deiry, M. Herlyn, and K.S. Smalley, *Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells*. Am.J.Pathol., 2007. **170**(2): p. 709-721.
234. Miyamoto, H., F. Brimo, L. Schultz, H. Ye, J.S. Miller, D.A. Fajardo, T.K. Lee, J.I. Epstein, and G.J. Netto, *Low-grade papillary urothelial carcinoma of the urinary*

- bladder: a clinicopathologic analysis of a post-World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification cohort from a single academic center.* Arch Pathol Lab Med, 2010. **134**(8): p. 1160-3.
235. Kakiashvili, D.M., B.W. van Rhijn, G. Trottier, M.A. Jewett, N.E. Fleshner, A. Finelli, J. Azuero, C.H. Bangma, R. Vajpeyi, S. Alkhateeb, S. Hanna, A. Kostynsky, C. Kuk, T.H. Van Der Kwast, and A.R. Zlotta, *Long-term follow-up of T1 high-grade bladder cancer after intravesical bacille Calmette-Guerin treatment.* BJU Int, 2011. **107**(4): p. 540-6.
236. May, M., S. Brookman-Amisshah, J. Roigas, A. Hartmann, S. Storkel, G. Kristiansen, C. Gilfrich, R. Borchardt, B. Hoshcke, O. Kaufmann, and S. Gunia, *Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications.* Eur Urol, 2010. **57**(5): p. 850-8.
237. Offner, S., A. Hekele, U. Teichmann, S. Weinberger, S. Gross, P. Kufer, C. Itin, P.A. Baeuerle, and B. Kohleisen, *Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy.* Cancer Immunol.Immunother., 2005. **54**(5): p. 431-445.
238. Tokes, A.M., J. Kulka, S. Paku, A. Szik, C. Paska, P.K. Novak, L. Szilak, A. Kiss, K. Bogi, and Z. Schaff, *Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study.* Breast Cancer Res., 2005. **7**(2): p. R296-R305.
239. Resnick, M.B., T. Konkin, J. Routhier, E. Sabo, and V.E. Pricolo, *Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study.* Mod.Pathol., 2005. **18**(4): p. 511-518.
240. Krajewska, M., A.H. Olson, D. Mercola, J.C. Reed, and S. Krajewski, *Claudin-1 immunohistochemistry for distinguishing malignant from benign epithelial lesions of prostate.* Prostate, 2007. **67**(9): p. 907-10.
241. Huo, Q., T. Kinugasa, L. Wang, J. Huang, J. Zhao, H. Shibaguchi, M. Kuroki, T. Tanaka, Y. Yamashita, K. Nabeshima, and H. Iwasaki, *Claudin-1 protein is a major*

- factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer*. Anticancer Res, 2009. **29**(3): p. 851-7.
242. Kinugasa, T., Q. Huo, D. Higashi, H. Shibaguchi, M. Kuroki, T. Tanaka, K. Futami, Y. Yamashita, K. Hachimine, S. Maekawa, K. Nabeshima, and H. Iwasaki, *Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer*. Anticancer Res, 2007. **27**(6A): p. 3729-34.
243. Mees, S.T., R. Mennigen, T. Spieker, E. Rijcken, N. Senninger, J. Haier, and M. Bruewer, *Expression of tight and adherens junction proteins in ulcerative colitis associated colorectal carcinoma: upregulation of claudin-1, claudin-3, claudin-4, and beta-catenin*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(4): p. 361-8.
244. Katahira, J., H. Sugiyama, N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda, and N. Sugimoto, *Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo*. J.Biol.Chem., 1997. **272**(42): p. 26652-26658.
245. McClane, B.A., P.C. Hanna, and A.P. Wnek, *Clostridium perfringens enterotoxin*. Microb.Pathog., 1988. **4**(5): p. 317-323.
246. Santin, A.D., S. Cane, S. Bellone, M. Palmieri, E.R. Siegel, M. Thomas, J.J. Roman, A. Burnett, M.J. Cannon, and S. Pecorelli, *Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin*. Cancer Res., 2005. **65**(10): p. 4334-4342.
247. Michl, P., M. Buchholz, M. Rolke, S. Kunsch, M. Lohr, B. McClane, S. Tsukita, G. Leder, G. Adler, and T.M. Gress, *Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 678-684.
248. Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, K. Matsuhisa, A. Takahashi, H. Suzuki, Y. Kakamu, A. Watari, and K. Yagi, *A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis*. J.Pharmacol.Exp.Ther., 2010. **334**(2): p. 576-582.

XI. Saját közlemények jegyzéke

A dolgozat témájában közöl publikációk:

Törzsök P, Riesz P, Kenessey I, Székely E, Somorác A, Nyirády P, Romics I, Schaff Z, Lotz G, Kiss A. Claudins and ki-67: potential markers to differentiate low- and high-grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY* 59:(11) pp. 1022-1030. (2011) **IF: 2.381**

Székely E, **Törzsök P**, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Székely T, Lotz G, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Zs, Kiss A. Expression of claudins and their prognostic significance in non-invasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. *JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY* 59: pp. 932-941. (2011) **IF: 2.381**

Riesz P, Lotz G, Páska C, Szendrői A, Majoros A, Németh Zs, **Törzsök P**, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Zs, Romics I, Kiss A. Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique. *PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH* 13: pp. 187-194. (2007) **IF: 1.272**

A dolgozat témájában közölt magyar nyelvű közlemény:

Riesz P, Székely E, **Törzsök P**, Majoros A, Szendrői A, Dombóvári P, Romics I
[Can inverted papilloma in urinary bladder be considered as a benign tumor].
ORVOSI HETILAP 151:(3) pp. 92-95. (2010)

A doktori munka témájától független publikáció:

Zádori G, Gelley F, **Törzsök P**, Sárváry E, Doros A, Deák AP, Nagy P, Schaff Zs, Kiss A, Nemes B. Examination of claudin-1 expression in patients undergoing liver transplantation

owing to hepatitis C virus cirrhosis. *TRANSPLANTATION PROCEEDINGS* 43: pp. 1267-1271. (2011) **IF: 0.993**

A doktori munka témájától független magyar nyelvű közlemény:

Riesz P, Nyirády P, Szűcs M, Szendrői A, Majoros A, Bánfi G, Kiss A, Lotz G, **Törzsök P**, Kelemen Z, Romics I. Hímveszto-daganatos betegek kezelésével szerzett tapasztalataink. *ORVOSI HETILAP* 148:(37) pp. 1751-1756. (2007)

XII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Schaff Zsuzsa és Prof. Dr. Tímár József egyetemi tanároknak, a II.sz. Patológiai Intézet volt és jelenlegi Igazgatóinak, hogy munkámat lehetővé tették és támogatták, valamint az elmúlt hat évben mindvégig mellettem álltak.

Kiemelkedően hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Kiss András egyetemi docens úrnak, aki mind TDK, mind PhD hallgatói munkám során mindvégig nagy odafigyeléssel irányított, mind szakmailag, mind emberileg maximálisan támogatott és biztosította a lehetőséget, hogy a laboratóriumában dolgozzam.

Munkatársaim közül külön kiemelten szeretném megköszönni Dr. Székely Eszter és Dr. Lotz Gábor egyetemi adjunktusoknak a vizsgálatok során nyújtott segítségüket, útmutatásukat. Köszönöm Dr. Kenessey Istvánnak a statisztikai számításokban nyújtott irányítást, segítséget, továbbá Dr. Borka Katalin adjunktus asszonynak, Dr. Glasz Tibor egyetemi docens úrnak, Dr. Gyórfy Hajnalka adjunktus asszonynak és Dr. Schönfeld Tibor tudományos főmunkatársnak az évek során nyújtott támogatást, segítséget.

Hálával tartozom Prof. Dr. Romics Imre egyetemi tanárnak, az Urológia Klinika igazgatójának, Dr. Nyirády Péter egyetemi docens úrnak, Dr. Riesz Péter egyetemi adjunktus úrnak, amiért ittlétem hat esztendeje alatt mindvégig érdeklődéssel és támogató szándékkal fordultak munkám felé, és igyekeztek minden olyan szükséges szakmai és emberi támogatást megadni, amellyel nem csak a kutatásban, hanem a mindennapokban is segítségemre voltak.

Különösen hálás vagyok Azumah Erzsébet, Gregor Viktória, Pekár Zoltánné, Samodainé Erika asszisztenseknek, akik mindig rendkívül készségesen segítettek a vizsgálatok elvégzése során és gyakorlati tudásom szélesítésében is fontos szerepet játszottak.

Szeretném megköszönni a fordítások, pályázatok, az adminisztratív teendők során kapott segítséget Rigóné Kálé Elvirának, valamint Balogh Lenkének és Seres Jánosnénak az irányomba megnyilvánuló jóindulatát, segítőkészségét.

Köszönet illeti a II.sz. Patológiai Intézetben dolgozó PhD hallgató társaimat, kollégáimat – Dr. Bathmunk Enkhjargalt, Dr. Fintha Attilát, Garay Tamást, Dr. Gyöngyössy Benedeket, Dr. Holczbauer Ágneszt, Dr. Korompay Annát, Dr. Németh Zsuzsannát, Dr. Patonai Attilát, Dr. Réti Andreát, Dr. Somoráczy Áront, Dr. Szabó Erzsébetet, Dr. Szász Marcellt –, akikre mindig támaszkodhattam kísérleteink és vizsgálataink kivitelezésekor, megvitatásakor.

Továbbá szeretném megköszönni a II.sz. Patológiai Intézet valamennyi dolgozójának a türelmét, segítőkészségét!

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Szüleimnek, Családomnak, Barátaimnak, akik nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka.

Saját közlemények