

A felületes hólyagtumorok kezelésének legújabb módszerei

Doktori tézisek

Dr. Horváth András

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyirády Péter egyetemi docens
az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Miklós egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Bajory Zoltán egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kovalszky Ilona egyetemi tanár
az MTA doktora
Dr. Kiss András főorvos, Ph.D.

Budapest
2012

Bevezetés

A hólyagrák az ötödik leggyakoribb malignus megbetegedés férfiakban. Évente mintegy 2600 új eset kerül diagnosztizálásra Magyarországon. A betegek 70%-nál a diagnózis felállítása során felületes hólyagtumor igazolódik. A felületes hólyagtumrok kezelésében általában alkalmazott módszer a transurethralis (húgycsővön keresztüli) rezekció, adjuváns intravesicalis kemo- vagy immunoterápiával kombinálva. A felületes hólyagtumrok kiújulásának és progressziójának 5 éves aránya 31-78%. Mindezek alapján új kezelési módszerek szükségesek a jelenlegi terápia hatékonyságának javítására.

Számos onkolitikus herpes simplex vírus (HSV) bízató eredményeket mutatott különböző daganat típusok esetében *in vitro* és *in vivo* kísérletes, valamint klinikai vizsgálatok során (colorectális, fej-nyaki, emlő-, prosztatadaganat, valamint melanoma és glioma esetén). Az Oncovex^{GALV/CD} egy harmadik generációs herpes simplex vírus 1 (HSV-1), mely kombinálja a vírus saját onkolitikus aktivitását egy prodrug (“előanyag”) aktiváló gén (citozin deamináz (CD)/uracil foszforibozil transzferáz enzim) és a gibbon ape leukémia vírus (GALV) egy, a sejtek fúzióját elősegítő membrán glükoproteinjének expressziójával. Emellett az Oncovex^{GALV/CD} vírus tartalmaz más mutációkat is, melyek tovább fokozzák annak hatékonyságát. Így az ICP34.5 vég törlődése tumor szelektív osztódáshoz vezet, az ICP47 vég törlése pedig a tumor elleni immunválaszt fokozza. Korábbi az Oncovex^{GALV/CD} vírussal végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok fokozott tumorsejt pusztulást mutattak fej-nyaki, vastagbél, hasnyálmirigy, tüdő és glioma eredetű daganatokban.

A hólyagtumor ideális tumor modell lehet új terápiás módszerek vizsgálatára, hiszen az intravesicalis út lehetővé teszi nagy mennyiségű vírus bejuttatását a tumorsejtekbe. Emellett a hólyagnyálkahártya felszíni rétegét adó esernyő-sejtek lassan osztódnak, és ez által rezisztensek lehetnek az osztódásra képes onkolitikus vírusokra, melyek szelektíven képesek megfertőzni és szaporodni a gyorsan osztódó sejtekben.

Célkitűzés

- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus hatékonyságának vizsgálta *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon (EJ, RT112, T24, VMCUB-I, TCCSUP-G, 5637, KU19-19).
 - Oncovex^{GALV/CD} vírussal történő kezelés során az expresszáldó GALV membrán fehérje hatásának vizsgálata *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon.
 - Oncovex^{GALV/CD} vírussal történő kezelés során expresszáldó citozin deamináz (CD)/uracil foszforibozil transzferáz enzimek hatásának vizsgálata *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon.
- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus más kemoterápiás anyagokkal történő együttes adásának vizsgálta *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon (EJ, T24, TCCSUP-G, KU19-19).
- Egy stabil, reprodukálható orthotopikus patkány hólyagtumor modell felállítása a különböző terápiák hatékonyságának *in vivo* vizsgálata céljából.
- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus hatékonyságának vizsgálta *in vitro* a patkány hólyagtumor modellben alkalmazott patkány hólyagtumor sejt kultúráján (AY-27).
- QRT-PCR hatékonyságának vizsgálata vizelet- és szövetmintákon a tumor növekedésének detektálására *in vivo* a patkány hólyagtumor modellen.
- A bioluminescens képalkotó eljárás hatékonyságának vizsgálata a tumor növekedésének detektálására *in vivo* a patkány hólyagtumor modellen.
- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus hatékonyságának vizsgálta *in vivo* a patkány hólyagtumor modellben.

Módszerek

Vizsgálataink során a korábban Simpson és munkatársai által leírt Oncovex^{GALV/CD} és kontrollként az Oncovex^{GFP} herpes simplex vírusokat használtuk. A vizsgált sejtkultúrák átmeneti sejtes hólyagdaganatok (EJ, T24, RT112, VMCUB-I, TCCSUP-G, 5637, KU19-19) és egy patkány hólyagtumor sejtípus (AY-27) voltak.

Fúziós gén vizsgálata során humán átmeneti sejtes hólyagdaganatokat fertőztünk különböző mennyiségű (MOI) Oncovex^{GALV/CD} és Oncovex^{GFP} vírusokkal, és 48 óra inkubációs idő után a sejteket vagy glutáraldehiddel fixáltuk, és kristályibolyával festettük vagy MTS reagenssel kezelve denzitométerrel értékeltük.

A prodrug aktivációs gén vizsgálata során humán átmeneti sejtes hólyagdaganatokat fertőztünk Oncovex^{GALV/CD} és Oncovex^{GFP} vírusokkal, majd 30 perc után a vírusokat eltávolítottuk, és különböző koncentrációjú 5-FC tartalmú tápoldatot adagoltunk a tumorsejtekhez. 48 óra inkubációs idő után a sejtek felülűszóját centrifugálás és 60°C-os hőkezelés után ismét friss tumorsejtekhez adagoltuk, majd újabb 48 óra inkubációs idő után a sejteket vagy glutáraldehiddel fixáltuk, és kristályibolyával festettük vagy MTS reagenssel kezelve denzitométerrel értékeltük.

Az Oncovex^{GALV/CD} vírus és kemoterápiás szerek kölcsönhatását isobologram analízis segítségével, a kombinációs index (CI) meghatározásával végeztük. Chou és Talalay által leírt középátlag-hatékonyság elv alapján a CI kvantitatív módon meghatározza két szer közötti kölcsönhatás mértékét. Ha CI 1 akkor additív, ha CI >1 akkor antagonista, ha CI <1 akkor szinergista hatásról beszélünk. A vizsgálatokat az *in vitro* túlélési görbék meghatározásához hasonló módszerekkel végeztük, mely során a vizsgált szerek (Oncovex^{GALV/CD} és kemoterapeutikumok) számított ED50 értékének 4, 2, 1, 0,5 és 0,25-szörös konstans hígításait vegyítettük, majd hozzáadtuk a hólyagdaganat sejtekhez. 48 óra inkubációs idő után a sejteket MTS reagenssel kezelve denzitométerrel értékeltük, a kombinációs index (CI) meghatározásához CalcuSyn szoftvert használtunk.

Orthotopikus patkány hólyagtumor modell felállításához és az *in vivo* vizsgálatokhoz Fischer F344 nőtény patkányokat használtunk. Az

állatokat háton fekvő pozícióban inhalációs Isofluránnal altattuk. Katétert (18-gauge BD Venflon) helyeztünk be a hólyagba a húgycsövön keresztül. A tumorbeültetés elősegítésére a hólyagnyálkahártyát 0.1N sósav instillációjával roncsoltuk, melyet 0.1N nátriumhidroxid instillációjával semlegesítettünk. A hólyag ötszöri PBS-vel történő átmosását követően AY-27 HVEM patkány hólyagtumor sejteket ($1.5\text{--}2.5 \times 10^6$) instilláltunk, melyet egy órán keresztül tartottunk benn a hólyagban. Egy óra után a katéter eltávolításra került, és a patkányok spontán vizeltek.

A hólyagtumor növekedésének detektálására vizeletgyűjtést végeztünk a patkányoknál. Az állatokat vizeletgyűjtésre alkalmas ketrecbe helyeztük 1 órára a 0-, 4-, 7-, 11-, 14-ik napokon. A gyűjtött vizeleten és a 28. napon eltávolított húghólyag szövetmintákon QRT-PCR-t végeztünk (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction).

A hólyagtumor növekedésének bioluminescens képalkotó eljárással történő vizsgálatához 1×10^6 AY-27 HL-S (luciferáz enzimet kódoló) patkány hólyagtumorsejtet injektáltunk a patkányok bőre alá. Szentjánosbogár D-Luciferin kalium só (150 mg/kg) adását követően bioluminescencia elvén alapuló nem-invazív IVIS kamera segítségével detektáltuk a luciferáz enzim aktivitását, mely eredményeket Xenogen szoftver segítségével elkészített fényképeken értékeltük.

Az Oncovex^{GALV/CD} vírus hatékonyságának *in vivo* vizsgálata során a tumorbeültetést (0. nap) követően az állatokat 3 randomizált csoportban kezeltük, a következő módon: Oncovex^{GALV/CD}+5-FC (**N°=10**) vagy Oncovex^{GALV/CD} +PBS (**N°=10**) vagy PBS+5-FC (**N°=8**) (PBS: semleges anyag.) Az intravesicalis Oncovex^{GALV/CD} kezeléseket a 7, 14 és 21 napokon, az 5-FC intravesicalis kezeléseket pedig a 8, 9, 15, 16, 22 és 24 napokon végeztük (a tumor beültetéséhez hasonló módszerrel). A húghólyag a 28. napon került eltávolításra, és makroszkópos valamint patológiai feldolgozásra.

Eredmények

Humán átmeneti sejtes hólyagtumrok (TCC) érzékenyek a HSV oncolitikus hatására, mely tovább fokozható GALV membrán fehérje expressziójával.

Hét különböző TCC sejttípust vizsgáltunk *in vitro* a HSV oncolitikus hatása szempontjából. Nagy mértékű oncolitikus HSV vírus osztódás volt észlelhető mind a hét hólyagtumor sejttípus esetében. A HSV vírus osztódása pedig erős tumor citotoxicitást eredményezett már alacsony (0.001MOI) víruskoncentráció esetében is.

Hétből négy TCC hólyagtumor típusnál (EJ, T24, VMCUB-I és 5637 sejtek) az Oncovex^{GALV/CD} vírussal történő kezelés során a GALV membrán fehérje expressziója tovább fokozta a tumorszelektív sejtpusztulást. A GALV gén expressziója a tumorsejtek fúziójához, egy úgynevezett sokmagvú szincícia képződéséhez vezet. Az *in vitro* MTS vizsgálatok során a sokmagvú szincícia képződés hatására a túlélő tumorsejtek aránya jelentősen csökkent az Oncovex^{GALV/CD} vírussal kezelt csoportban szemben a kontroll csoporttal. EJ sejtek 42-54% (P < 0.000), T24 sejtek 35-45% (P < 0.000), VMCUB-I sejtek 36-37% (P < 0.000), 5637 sejtek 35% (P < 0.000) csökkenést mutattak a tumorsejtek túlélésében. Mindez alátámasztja, hogy a GALV gén hatása fokozza a tumoros sejtpusztulást.

A citozin deamináz (CD)/uracil foszforibozil transzferáz gén expressziója átalakítja az 5-fluorocitozint 5-fluorouracillá, mely aktív kemoterápiás hatást mutat a humán TCC hólyagtumor sejtekben *in vitro*.

A citozin deamináz (CD)/uracil foszforibozil transzferáz enzimek együtt még hatékonyabban alakítják át az 5-FC-t, mint bármelyik enzim egyedül. Az 5-FC metabolitok tumorsejt pusztító hatásának vizsgálatára 7 különböző TCC sejttípust vizsgáltunk Oncovex^{GALV/CD} és kontroll Oncovex^{GFP} vírusok adása során 5-FC jelenlétében és hiányában.

EJ hólyagtumorsejtek esetén a kontroll Oncovex^{GFP} vírussal kezelt csoportban nem volt igazolható a tumorsejtek pusztulása 5-FC jelenlétében és hiányában sem. Ezzel szemben Oncovex^{GALV/CD} és 5-FC együttadása esetén hatékony tumorsejt pusztulás volt észlelhető. Hasonló eredményt tudunk igazolni RT112, TCCSUP-G, 5637 és

KU19-19 sejtek esetén. Az *in vitro* MTS vizsgálatok során EJ sejtek esetén 78% ($P < 0.000$), RT112 és KU19-19 sejtek esetén 70% ($P < 0.000$), TCCSUP-G és 5637 sejtek esetén 53% ($P < 0.000$) csökkenés volt észlelhető a tumorsejtek túlélésében. Ezek az eredmények igazolták hétből öt TCC hólyagytumor típus esetén az 5-FC metabolitokkal szembeni érzékenységet Oncovex^{GALV/CD} infekcióját követően.

Oncovex^{GALV/CD} és Mitomycin C kemoterapeutikum együttes adása szinergista hatást mutatott TCC hólyagytumor sejteken *in vitro*, ezzel szemben Cisplatin és Gemcitabinnal végzett kombináció antagonista volt.

A jelenleg a hólyagytumorok kezelésében alkalmazott kemoterápiás szerek közül a Mitomycin C (MMC), a Cisplatin és Gemcitabin hatékonyságát vizsgáltuk Oncovex^{GALV/CD} vírussal kombinációban. (EJ, T24, TCCSUP-G és KU19-19 hólyagytumor sejteket vizsgáltunk.) Szinergista tumorsejt pusztító hatást észleltünk Oncovex^{GALV/CD} és MMC együttes adása esetén EJ (ED_{50} 0.77 +/- 0.05), T24 (ED_{50} 0.65 +/- 0.07) és KU19-19 (ED_{50} 0.78 +/- 0.01) sejteken. Oncovex^{GALV/CD} és Cisplatin vagy Gemcitabin együttes adása pedig antagonista volt EJ, T24 és TCCSUP-G sejteken.

***In vivo* patkány orthotopikus hólyagytumor modell felállítása és vizsgálata Oncovex^{GALV/CD} ± 5-FC kezelés során.**

Xiao és munkatársai által korábban leírt patkány orthotopikus hólyagytumor modellt alkalmaztuk *in vivo* vizsgálataink során. AY-27 patkány hólyagytumorsejteket vizsgáltunk, azonban tekintettel arra, hogy a HSV nem volt képes megfertőzni a patkány hólyagytumorsejteket, így az AY-27 sejtek egy új stabil klónját készítettük el, melybe beültetésre került a HSV sejtbe történő bejutásához szükséges receptor (HVEM).

In vitro vizsgálatokat végeztünk az új AY-27 HVEM sejtklónnal, mely során 30%-os csökkenés volt észlelhető a tumorsejtek túlélésében a fúziós (GALV) gén hatására Oncovex^{GALV/CD} kezelés után. További AY-27 HVEM sejteken végzett *in vitro* vizsgálatok során az Oncovex^{GALV/CD} vírus aktív metabolitokra bontotta az 5-fluorocitozint, mely 81%-os csökkenést eredményezett a tumorsejtek túlélésében.

In vivo patkány hólyagytumor modell felállításához az AY-27 HVEM tumorsejteket, a hólyag nyálkahártya savas, majd neutralizáló lúgos

előkezelését követően beültették a hólyagba, melyet követően vizsgáltuk a kifejlődő daganatok dinamikáját. A tumorbeültetést követően mintegy 95%-ban észleltük a tumorsejtek sikeres megtapadását és a hólyagtumor kialakulását. Összességében a tumor beültetését a patkányok jól tolerálták, és a tumor beültetése nagy százalékos arányban reprodukálható volt.

A hólyagtumor növekedésének *in vivo* vizsgálatához gyűjtött vizeletből QRT-PCR-t végeztünk, mely nem volt hatékony módszer a hólyagdaganat kimutatására, de a húgyhólyag patológiai feldolgozása során nyert szövetmintákban jelenlévő tumor kimutatására alkalmazható volt.

A biolumineszcencia elvén alapuló nem-invazív IVIS kamera (képalkotó eljárás) szintén nem volt hatékony módszer a hólyagtumor növekedésének *in vivo* kimutatására az orthotopikus patkány hólyagtumor modellen, ami az állat luciferáz enzim elleni immunválaszának köszönhető.

Az Oncovex^{GALV/CD} vírus hatékonyságának *in vivo* vizsgálata során a tumorbeültetést követően az állatokat 3 randomizált csoportban kezeltük, a következő módon: Oncovex^{GALV/CD}+5-FC vagy Oncovex^{GALV/CD}+PBS vagy PBS+5-FC. Eredményeink alapján az Oncovex^{GALV/CD}+5-FC csoportban 84,5%-os szignifikáns csökkenés volt észlelhető az átlagos tumortömegben szemben a kontroll csoporttal (**P = 0,001**) vagy az Oncovex^{GALV/CD} monoterápiában részesülő csoporttal (**P = 0,034**). Kisebb mértékű nem szignifikáns különbség volt észlelhető az Oncovex^{GALV/CD} monoterápia és a kontroll csoport összehasonlítása során, ahol 46,4%-os tumorcsökkenést észleltünk (**P = 0,13**). Hasonló eredményeket kaptunk a teljes húgyhólyag tömeg vizsgálata során. Emellett az állatok átlagos testtömege ugyan nem szignifikánsan, de 11,5 grammal nehezebb volt az Oncovex^{GALV/CD}+5-FC csoportban, mely e csoport jobb általános egészségügyi állapotára utalhat.

Következtetések

- Oncovex^{GALV/CD} vírussal történő kezelés során az expresszáldó GALV membrán fehérje hatására tumorsejt fúzió és pusztulás észlelhető *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon.
- Oncovex^{GALV/CD} vírussal történő kezelés során expresszáldó citozin deamináz (CD)/uracil foszforibozil transzferáz enzimek átalakítják az 5-fluorocitozint 5-fluorouracillá, mely aktív kemoterápiás hatású mutagén, és tumorsejt pusztulás észlelhető *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon.
- Valamennyi vizsgált humán hólyagtumorsejtnél észlelhető volt az Oncovex^{GALV/CD} herpes simplex vírus onkolitikus aktivitása, emellett legalább az egyik beültetett gén (GALV vagy CD) hatékonysága is igazolható volt, mely tovább fokozta a tumorsejtek pusztulását.
- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus 3-as kombinált támadáspontjának köszönhetően (onkolitikus hatás, sejt-fúziós GALV gén hatás, előanyag aktiváló CD gén hatás) a tumor kontroll tovább fokozható *in vitro*.
- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus és Mitomycin C együttes adása szinergista hatású *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon.
- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus és Gemcitabin vagy Cisplatin együttes adása antagonistikus hatású *in vitro* humán hólyagtumor sejt kultúrákon.
- Oncovex^{GALV/CD} vírus nem képes megfertőzni az AY-27 patkány hólyagtumorsejteket.
- A herpes simplex vírus receptorának (HVEM) AY-27 patkány hólyagtumorsejtekbe történő beültetését követően az Oncovex^{GALV/CD} vírus képes megfertőzni az AY-27 HVEM patkány hólyagtumorsejteket.
- AY-27 HVEM patkány hólyagtumorsejtek Oncovex^{GALV/CD} vírussal történő kezelése során az expresszáldó GALV membrán fehérje hatására tumorsejt fúzió és pusztulás észlelhető *in vitro*.
- AY-27 HVEM patkány hólyagtumor sejtek Oncovex^{GALV/CD} vírussal történő kezelése során az expresszáldó citozin deamináz (CD)/uracil

foszforibozil transzferáz enzimek átalakítják az 5-fluorocitozint 5-fluorouracillá, mely tumorsejt pusztulást okoz *in vitro*.

- Egy stabil, reprodukálható orthotopikus patkány hólyagtumor modell jött létre az AY-27 HVEM patkány hólyagtumorsejtek felhasználásával, mely alkalmas különböző terápiák hatékonyságának *in vivo* vizsgálatára. A tumorbeültetést követően mintegy 95%-ban észleltük a tumorsejtek sikeres megtapadását és a hólyagtumor kialakulását.
- QRT-PCR nem volt hatékony módszer *in vivo* a hólyagtumor növekedésének vizeletből történő kimutatására, de a húgyhólyag patológiai feldolgozása során nyert szövetmintákban jelenlévő tumor kimutatására alkalmazható.
- A biolumineszcencia elvén alapuló nem-invazív IVIS kamera nem hatékony képalkotó eljárás a hólyagtumor növekedésének *in vivo* kimutatására az orthotopikus patkány hólyagtumor modellen.
- Az Oncovex^{GALV/CD} vírus 5-fluorocitozinal történő kombinált intravesicális adása hatékony módszer *in vivo* a patkány hólyagtumor modellben, melynek köszönhetően csökken a beültetett tumorok mérete.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Horváth A**, Mostafid AH. (2009) Therapeutic options in the management of intermediate risk non muscle invasive bladder cancer. British Journal of Urology International, 103(6): 726-729. **Impakt Faktor: 2.865**
2. Simpson GR[£], **Horvath A**[£], Annels NE, Pencavel T, Metcalf S, Seth R, Peschard P, Price T, Coffin RS, Mostafid H, Melcher AA, Harrington KJ, Pandha HS, [£]*These authors have contributed equally to this work.* (2012) Combination of a fusogenic glycoprotein, pro-drug activation and oncolytic HSV as an intravesical therapy for superficial bladder cancer. British Journal of Cancer, 106: 496-507 doi:10.1038/bjc.2011.577. **Impakt Faktor: 4.831**
3. **Horváth A**, ChanawaniM, Mostafid AH. (2008) Immediate post operative administration of intravesical Mitomycin in theatre for non-muscle invasive bladder cancer. British Journal of Urology International, Website: Atlas of Surgery and Surgical Devices 2008.08

Nem az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Horváth A.** (2005) A kőképződés, mint anyagcsere betegség -a recidív köves betegek kivizsgálása. Családorvosi Fórum, 11: 9-12.
2. Mavrogenis S, Filkor G, **Horváth A.** (2005) ESWL kezelés. Családorvosi Fórum, 11: 16-19.
3. **Horváth A**, Majoros A, Mavrogenis S, Istók R, Romics I. (2007) Lymphoepithelioma-szerű hólyag carcinoma ritka esete. Uroonkológia, 4(2): 59-61.
4. **Horváth A**, Majoros A, Romics I. (2007) A recidíva várható valószínűségének meghatározására használt nomogram-kalkulátor alkalmazása klinikánkon radikális prostatectomián átesett betegeinkben. Magyar Urológia, 19(1): 65-69.
5. **Horváth A**, Mavrogenis S, Majoros A, Romics I. (2008) Négy különböző szövettani típusú és lokalizációjú tumor esete. Uroonkológia, 5(2): 49-50.

6. Keszthelyi A, Szűcs M, Majoros A, **Horváth A**, Romics I. (2008) Proszttatarák HIFU kezelése, első magyarországi tapasztalatok. Orvostudományi Értesítő, 81(1): 31-33.
7. Chanawani M, **Horváth A**, Mostafid AH. (2009) Distal ureterectomy and ureteric reimplantation using the Psoas Hitch technique. British Journal of Urology International, Website: Atlas of Surgery and Surgical Devices 2009.04.
8. Nyirády P, Sárdi E, Bekő G, Szűcs M, **Horváth A**, Székely E, Szentmihályi K, Romics I, Blázovics A. (2010) A Beta vulgaris L. ssp. esculenta var. rubra bioaktív vegyületeinek hatása metasztatikus prosztatarákban. Orvosi Hetilap, 151(37):1495-503.
9. **Horváth A**. (2010) Kommentár - J.R. Brill: Férfiak húgycsőgyulladásának felismerése és kezelése - című cikkére. Orvostovábbképző Szemle, XVII (12)
10. Blázovics A, Nyirády P, Bekő G, Székely E, Szilvás Á, Kovács-Nagy E, **Horváth A**, Szűcs M, Romics I, Sárdi É. (2011) Changes in Erythrocyte Transmethylation Ability are Predictive Factors for Tumor Prognosis in Prostate Cancer. Croatica Chemica Acta, 84(2): 127-131. **Impakt Faktor: 0.713**
11. **Horváth A**. A benignus prosztata hiperplázia pathogenezeise. In: Romics I (szerk.), A prosztata betegségei. Budapest White Golden Book 2005:92-96.