

A MIKROSZATELLITA ALLÉLVESZTÉS- VIZSGÁLAT DIAGNOSZTIKAI ÉS AZ ANGIOGÉN FAKTOROK EXPRESSZIÓJÁNAK PROGNOSZTIKAI SZEREPE HÚGYHÓLYAGRÁKBAN

Szarvas Tibor

Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Budapest

A húgyhólyagrák a második leggyakrabban előforduló urológiai jellegű tumoros megbetegedés. A mai gyakorlatban kezelésének módját és a beteg várható életkilátásait szinte kizárólag a szövettani diagnózis határozza meg. A tumor invazivitásának megítélése azonban gyakran nehézségekbe ütközik. Újabb molekuláris vizsgálatok lehetőséget nyújthatnak e betegség korai felfedezésére, kérdéses esetekben a szövettani diagnózis megerősítésére, illetve a tumor várható viselkedésének előrejelzésével segíthetnek a terápia optimalizálásában. Az e disszertációban bemutatott vizsgálatok a hólyagrákok aktuális diagnosztikai és prognosztikai problémáira keresnek válaszokat. Ehhez pedig a molekuláris biológia modern módszereit hívják segítségül. Munkánk során 334 hólyagtumoros beteg és 117 kontroll személy tumor-, vér- és/vagy vizeletmintáit vizsgáltuk. A hólyagtumor genetikai eltéréseit PCR-alapú mikroszatellita-allélvesztés vizsgálattal (12 marker felhasználásával) illetve FISH-technikával (4 DNS-próba alkalmazásával) diagnosztikai céllal kerestük vizeletben. A tumormintákból elvégzett teljes genomi mikroszatellita-allélvesztés vizsgálat – melyhez 400 markert használtunk – az invazivitással korreláló markerek kiválasztása által a szövettani diagnózis megerősítését célozta. Továbbá vizsgáltuk a VEGF, Ang-1, Ang-2 és a Tie2 prognosztikus értékét. Megállapítottuk, hogy a vizeletből történő mikroszatellita-allélvesztés vizsgálat és a FISH-vizsgálat érzékeny és specifikus módszer a hólyagtumor nem invazív kimutatására. A teljes genom mikroszatellita-allélvesztés vizsgálata során összeállítottunk egy olyan négy tagból álló markerkombinációt, mellyel az összes vizsgált tumor azonosítható volt. Kiválasztottuk azokat a mikroszatellita-markereket, melyek a tumor invazivitásával mutatnak összefüggést. Megállapítottuk, hogy a tumor indukálta angiogenezisben részt vevő molekulák expressziójának és szérumkoncentrációjának meghatározása alkalmas eszköz lehet a betegség várható viselkedésének pontosabb előrejelzésére. Magyar Onkológia 53:385–389, 2009

Kulcsszavak: húgyhólyagrák, mikroszatellita-analízis, angiogenezis, prognózis

Bladder cancer is the second most common malignancy affecting the urinary system. Currently, histology is the only tool that determines therapy and patients' prognosis. As the treatment of non-invasive (T_a/T₁) and muscle invasive (T₂–T₄) bladder tumors are completely different, correct staging is important, although it is often hampered by disturbing factors. Molecular methods offer new prospects for early disease detection, confirmation of unclear histological findings and prognostication. Applying molecular biological methods, the present study is searching for answers to current diagnostic and prognostic problems in bladder carcinoma. We analyzed tumor, blood and/or urine samples of 334 bladder cancer patients and 117 control individuals. Genetic alterations were analyzed in urine samples of patients and controls, both by PCR-based microsatellite loss of heterozygosity (LOH) analysis using 12 fluorescently labeled primers and by DNA hybridization based UroVysion FISH technique using 4 probes, to assess the diagnostic values of these methods. Whole genome microsatellite analysis (with 400 markers) was performed in tumor and blood specimens of bladder cancer patients to find chromosomal regions, the loss of which may be associated with tumor stage. Furthermore, we assessed the prognostic value of Tie2, VEGF, Angiopoietin-1 and -2. We concluded that DNA analysis of voided urine samples by microsatellite analysis and FISH are sensitive and non-invasive methods to detect bladder cancer. Furthermore, we established a panel of microsatellite markers that could differentiate between non-invasive and invasive bladder cancer. However, further analyses in a larger cohort of patients are needed to assess their specificity and sensitivity. Finally, we identified high Ang-2 and low Tie2 gene expression as significant and independent risk factors of tumor recurrence and cancer related survival. Szarvas T. The diagnostic value of microsatellite LOH analysis and the prognostic relevance of angiogenic gene expression in urinary bladder cancer. Hungarian Oncology 53:385–389, 2009

Keywords: bladder cancer, microsatellite analysis, FISH, angiogenesis, prognosis

Közlésre érkezett:

2009. augusztus 28.

Elfogadva:

2009. szeptember 20.

Levelezési cím:

Dr. Szarvas Tibor
Semmelweis Egyetem
I. sz. Patológiai
és Kísérleti Rákkutató
Intézet

1085 Budapest
Üllői út 26.

E-mail:
sztibusz@gmail.com

Témavezető:

Dr. Kovalszky Ilona

BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint világszerte évente mintegy 330 000, Magyarországon pedig 2000 új húgyhólyagrákos megbetegedést diagnosztizálnak. 2002-ben összesen 178 850 ember vesztette életét hólyagrák miatt, közülük 809-en Magyarországon. Ezek alapján a hólyagtumor az előfordulás tekintetében a tizedik, a halálozást figyelme véve pedig a tizennegyedik helyet foglalja el a daganatos betegségek között.

A mai gyakorlatban mind a kezelés módját, mind pedig a betegek életkilátásait a szövettani diagnózis határozza meg. Ez alapján a húgyhólyagrákok klinikailag hagyományosan két csoportba sorolhatók: felületes (nem invazív) és izomra terjedő daganatok. A felületes tumorokban szenvedők több mint 90%-a 5 évnél hosszabb ideig él, míg az izomra terjedő tumorok esetében ez az arány már csak 30% körüli. Ez a betegség korai stádiumban történő felismerésének fontosságát hangsúlyozza.

A húgyhólyagrák előfordulási gyakoriságát számos tényező befolyásolja, közülük elsősorban a vizeletbe ürülő karcinogénnel kell számolni. A legfontosabb ismert rizikófaktor a dohányzás, de ismertek olyan, főleg a festék- és kábelgyártásban használatos kémiai ágensek is (2-naftil-amin, benzidin), melyekkel történő érintkezés szintén kockázatot jelent. Létezik tehát egy többé-kevésbé jól körülhatárolható csoport, melynél – a korai felismerés reményében – érdemes lenne szűrővizsgálatot végezni.

A jelenlegi gyakorlat szerint – megbízható molekuláris illetve képalkotó vizsgálat hiányában – az urológus a terápia tervezésénél szinte kizárólag a szövettani diagnózisra hagyatkozhat. A kimetszett minta azonban gyakran nehezen értékelhető. A lézeres reszekció (TUR) során gyakran fellépő hókárosodás főleg a kisebb méretű tumorok esetében nehezíti meg a szövettani diagnózis felállítását. Másfelől előfordul, hogy a műtéti reszekció vonalának mélysége nem éri el a tumor inváziójának rétegét, azaz nem sikerül ép szövetben kimetszeni a tumort. Ilyenkor az invázió mértéke nem állapítható meg, második műtetre (utóreszekcióra) van szükség. Ilyen esetekben az adekvát kezelés késedelmet szenved, ami a sikeres terápia esélyeit csökkenti. Egy, a tumor invazivitásával korreláló marker segítené megerősíteni a bizonytalan szövettani diagnózist, segítve ezzel a fent említett probléma elkerülését.

A húgyhólyagrák korai felismerése mellett fontos volna a betegség várható viselkedésének pontosabb előrejelzése is. A felületes tumorok 70%-a a műtét után kiújul. A recidíváképződés szempontjából magasabb kockázatú csoport már az első diagnózis idején agresszívabb kezelést kaphatna (pl.: BCG), amivel a műtéti beavatkozások száma csökkenthető lenne. A felületes tumorok 5–15%-a progrediál, ezzel párhuzamosan az érintett betegek életkilátásai erősen romlanak. A progresszió veszélyének előrejelzése lehetőséget nyújthat

annak mind gyógyszeres, mind sebészi úton történő megelőzésére.

Az invazív tumorok esetében a túlélési esélyeket főként az határozza meg, hogy a daganat képes-e más szervekre terjedni. Míg az invazív (és áttétet nem képző) hólyagtumorok esetében az 5 éves túlélés valószínűsége 39%, addig áttétes rákok esetében ez az arány már csak 12%. Ezért nagy szükség van egy olyan vizsgálómódszere, amely az áttétképzés valószínűségét képes lenne meghatározni.

A genetikai instabilitás általánosan jellemző a tumorokra, irányító szerepe van azok kialakulásában és progressziójában, valamint felelős heterogenitásukért is. Hólyagrákok esetében ismert, hogy a vizeletben tumorsejtek jelennek meg, melyek örökítőanyaga – megfelelő érzékenységgel módszer alkalmazásával – vizsgálható. A mikroszatellita-allévesztés vizsgálata egy tandem ismétlődő, polimorf régiók analízisén alapuló módszer, mely a genetikai instabilitás és a kromoszómák delécióinak kimutatására alkalmas. Nagyfokú érzékenysége miatt különösen alkalmas hólyagtumor vizeletből történő detektálására. Az eddigi kutatások főleg a hólyagtumor jelenlétének nem invazív módon történő kimutatására irányultak, nem ismertek viszont azok a kromoszómaregiók, melyek elvesztése a tumor invazivitásával mutat összefüggést.

A tumorok egy meghatározott (1–2 mm-es) átmérő elérése után már nem képesek pusztán diffúzió útján kielégíteni oxigén- és tápanyagigényüket. Ezért a daganat túlélésének és továbbnövekedésének feltétele egy megfelelő érhálózat kialakítása. E folyamatot a hypoxia-indukált angiogén faktorok irányítják. Az angiogenezist gátló és serkentő ágensek addigi dinamikus egyensúlya megbomlik („angiogenic switch”), ennek következtében a környező szövetek erei a tumor irányába növekednek, így biztosítva annak megfelelő oxigén- és tápanyagellátását. A fent említett angiogén egyensúly megbomlásában szerepet játszó citokinek közül a VEGF-nek és az angiopoietineknek (Ang-1, Ang-2) valamint receptoruknak (Tie2) kulcsszerepük van. E faktorok expressziójának a recidíva-, illetve metasztázisképződésre gyakorolt hatása máig ismeretlen.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkánk első részében a húgyhólyagrákok genetikai eltéréseinek tumorszövetből és vizeletből történő kimutatását tűztük ki célul.
 - Összefüggéseket kerestünk az egyes genetikai eltérések jelenléte és a tumor előfordulása között (nem invazív tumorkimutató).
 - A mutációk közül megpróbáltuk kiválasztani azokat, amelyek a tumor nagyobb malignitásával és invazív növekedési hajlamával mutatnak összefüggést (szövettani diagnózis támogatása molekuláris biológiai módszerrel).
- Ehhez kétféle vizsgálómódszert alkalmaztunk.

- Mikroszatellita-allévesztés vizsgálatot: 12, irodalmi adatok alapján kiválasztott markerrel a módszer alkalmazhatóságát teszteltük; 400, az egész genomot 10 cM felbontásban lefedő markerrel a tumor jelenlétével és szövettani megjelenésével legerősebben korreláló markerek kiválasztása céljából.
 - Fluoreszcens in situ hibridizációt (FISH): UroVysion Kit
2. Munkánk második felében a tumor indukálta angiogenezisben résztvevő faktorok (VEGF, Ang-1, Ang-2, Tie2) szöveti mRNS-expressziójának, valamint szérumkoncentrációjának prognosztikus értékét vizsgáltuk.

forgalomban kapható – in situ hibridizáció elvén működő módszerrel. A vizeletvételt követően a mintákat a gyártó előírásainak megfelelően kezeltük. A négy hibridizációs próba közül három centroméra-jelölt (3-as, 7-es, 17-es kromoszóma), egy pedig deléció-specifikus (9p21). A kiértékelés során a gyártó útmutatásaiban szereplő kritériumokat követtük. Ezek alapján legalább 25 rendellenes sejtre vonatkozóan azokat az eseteket értékeltük pozitívnak, melyekben legalább 12 sejt esetében hiányzik az LSI 9p21 sárga szignálja, vagy legalább 4 sejtben látható egyszerre kettő a 3-as, 7-es vagy 17-es kromoszóma eltéréseiből.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mikroszatellita-allévesztés vizsgálata (12 markerrel)

Vizsgálatainkhoz 44, a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján hólyagtumor miatt operált beteg (13 nő, 31 férfi, átlagéletkor 74 év) vér-, vizelet- és tumoros szövetmintáit használtuk. Vér- és vizeletmintákat gyűjtöttünk továbbá 16 egészséges (normális kontroll) és 20 más – nem tumoros – urológiai betegségben szenvedő személytől (urológiai kontroll) is. A szövettani diagnózis felállítása a WHO hólyagtumorkra vonatkozó 2004-es irányelvei alapján történt.

A vizeletmintákat centrifugálással szétválasztottuk felülúszóra és üledékre, majd e mintákból a vér- és tumormintákkal együtt DNS-t izoláltunk. Ezt követően irodalmi adatok alapján kiválasztott 12 mikroszatellita-régiót fluoreszcens primer alkalmazásával polimeráz láncreakcióval (PCR) minden mintában amplifikáltuk. A keletkező termékeket nagy felbontást biztosító kapilláris-elektroforézissel választottuk el. A kérdéses mintában (vizelet, tumor) a két allélnak megfelelő csúcs magasságának arányát viszonyítottuk a kontrollként használt vérmintában talált csúcsmagassághoz. Ötven százalék feletti eltérés esetén az adott régió delécióját állapítottuk meg.

Mikroszatellita-allévesztés vizsgálata (400 markerrel)

Ebben a kísérletben 17, az Essen-Duisburgi Egyetem Urológiai Klinikáján hólyagtumor miatt műtött beteg vér- és tumormintáját vizsgáltuk. Ehhez 400 mikroszatellita-specifikus primerpárt használtunk, melyek az egész genomot 10 cM felbontásban fedték le. A DNS-izolálás, a PCR-reakció, a kapilláris-elektroforézis és az eredmények kiértékelése az előző pontban leírtakkal megegyezően történt.

UroVysion FISH-vizsgálat

43 hólyagrákban szenvedő és 12 más, nem tumoros eredetű urológiai betegségben szenvedő kontroll személy vizeletmintáit elemeztük egy – a kereskedelmi

Angiogén faktorok génexpressziós vizsgálata

Ehhez a kísérlethez az Essen-Duisburgi Egyetem Urológiai Klinikáján hólyagrák miatt operált 113 beteg és 5 nem rákos betegség miatt műtött személy szövetmintáját használtuk. Valamennyi minta esetében reverz transzkripciót követő valós-idejű kvantitatív PCR (Q-RT-PCR) analízissel, a $\Delta\Delta C_T$ módszert alkalmazva végeztük el a VEGF, az Ang-1 és -2, valamint a Tie2 mRNS-ének mennyiségi meghatározását.

EREDMÉNYEK

Mikroszatellita-allévesztés vizsgálata (12 marker)

A vizsgált 44 hólyagtumoros esetből 41-ben sikerült legalább egy mintában (vizelet-felülúszó, vizeletüledék, tumor) legalább egy deléciót kimutatni, ami 93%-os érzékenységet jelent. A két vizeletfrakció mind a szenzitivitás, mind pedig a specificitás tekintetében különbséget mutatott. A felülúszóból elvégzett analízis érzékenyebbnek bizonyult, mint a vizeletüledékből elvégzett (80% vs. 68%). A specificitás viszont a vizeletüledék esetében volt kedvezőbb, mind a nem tumoros urológiai beteg kontroll (95% vs. 80%), mind pedig az egészséges kontroll csoport esetében (88% vs. 81%).

Mikroszatellita-allévesztés vizsgálata (400 marker)

Tizenhárom Ta ill. 4 T1 stádiumú tumor vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy melyek azok a kromoszómaregiók, melyek már a betegség korai szakaszában deléciót szenvednek. Az allévesztések egyenetlen eloszlása arra utal, hogy a betegség patogenezisében a 9-es kromoszóma rendellenességei meghatározó szerepet játszanak. A 16 leggyakrabban allévesztést mutató mikroszatellita-régió közül 15 a 9-es kromoszómán található, egy pedig a 11-esen (D11S905). A T1-es húgyhólyagrakok esetében szignifikánsan ($p=0,05$) több deléciót detektáltunk, mint Ta stádiumúaknál. Ezzel összhangban 9 olyan mikroszatellita-markert sikerült azonosítani (D4S403, D5S422, D5S436, D5S641, D9S164,

D9S1682, D11S338, D11S904, D17S799), melyek Ta tumorokban nem, T1 tumorban viszont gyakorta mutatnak allélvesztést, és így alkalmasak lehetnek a patológiai diagnózis megerősítésére, pontosítására. Emellett meghatároztunk egy 4 markerből álló kombinációt, mellyel mind a 17 vizsgált eset azonosítható volt.

Az UroVysion FISH-vizsgálat

A vizsgált 43 hólyagtumoros betegtől származó vizelet közül a korábban ismertetett kritériumok szerint 34 bizonyult pozitívnek, 4 nem volt értékelhető, 5 pedig negatív volt. Ez alapján a módszer érzékenysége 87% (34/39). A kontroll minták minden esetben negatívak voltak, így a specificitás 100% (34/34). Az 5 negatívnak talált hólyagtumor mindegyike Ta stádiumú (4 db G1 és 1 db G2) volt.

Angiogén faktorok génexpressziós vizsgálata

Az analizált mintákban a VEGF, az Ang-1, az Ang-2 és a Tie2 RNS-szintű expresszióját mértük. A VEGF szignifikáns ($p=0,031$), négyszeres emelkedést mutatott az egészségeshez képest. Az Ang-1 esetében pedig még nagyobb eltérést; 137-szeres, szignifikáns csökkenést tapasztaltunk ($p<0,001$). Ugyanakkor az Ang-2 és a Tie2 tumorban és kontrollban mért értékei nem tértek el lényegesen egymástól ($p=0,510$, $p=0,106$). A génexpressziós értékeket betegkövetési adatokkal (recidívaképződés, metsztázisképződés, tumor miatti halálozás) összevetve, az Ang-2 magas abundanciája felületes húgyhólyagrakoknál a recidívaképződés szignifikáns rizikófaktornak bizonyult (HR=10,18, 95% CI 2,69–38,49, $p<0,001$). Invazív rákoknál pedig a Tie2 alacsony kifejeződése jelentett kockázati tényezőt a metasztázisképződésre (HR=0,31, 95% CI 0,11–0,89, $p=0,029$) ill. a tumorfüggő halálzásra nézve (HR=0,25, 95% CI 0,10–0,62, $p=0,003$).

MEGBESZÉLÉS

Jelen munkánkban a hólyagtumorok aktuális diagnosztikai és prognosztikai kérdéseire kerestünk válaszokat. A diagnosztikai alkalmazások során a vizeletből történő DNS-károsodások kimutatására koncentráltunk. Beállítottuk az UroVysion FISH- és a mikroszatellita-allélvesztés vizsgálatot, meghatároztuk azok saját laboratóriumi körülményeink között elérhető érzékenységét és specificitását. Megállapítottuk, hogy a vizelet-felületről a sejtmentes DNS-en elvégzett mikroszatellita-vizsgálatok nagyobb érzékenységet biztosítanak e módszer számára, mint a vizeletüledékből történő kimutatás. Egy, az egész genomot lefedő marker-gyűjteménnyel sikerült olyan primerkombinációt összeállítanunk, mellyel az eredetileg használt 12 helyett akár 4 primerpár együttes használatával is 100%-os érzékenység érhető

el. Ez nagyban javítja a módszer alkalmazhatóságának esélyeit. Azonosítottunk továbbá olyan kromoszómaregiókat, melyek deléciói összefüggést mutatnak a tumorok invazivitásával és malignitásával. Ennek főleg olyan esetekben lehet jelentősége, melyekben a szövettani vizsgálat nem ad egyértelmű eredményt.

A molekuláris sajátságai alapján a tumorok várható viselkedése pontosabban kiszámítható. Ez utat nyithat az egyén igényeihez pontosabban igazodó terápia számára, javítva annak hatékonyságát. Az angiogenezis prognosztikus szerepét mind morfológiai, mind molekuláris biológiai bizonyítékok alátámasztják.

Olyan angiogén faktorok szöveti mRNS-expresszióját és szérumszintjét határoztuk meg, melyek irányító szerepet töltenek be a tumor indukálta angiogenezisben. Ezeket az értékeket a betegek követési adataival összevetve állapítottuk meg azok prognosztikai értékét. Ilyen módon a felületes hólyagtumorok fokozott recidívaképződésére utaló faktorként azonosítottuk a magas VEGF- és Ang-2-génexpressziót. Előrehaladott (izomra terjedő) húgyhólyagrakoknál a VEGF magas mRNS-szintje kockázati tényezőnek, míg a Tie2 abundanciája kedvező prognosztikus jelnek bizonyult a tumor metasztázisképző képességének vonatkozásában. A Tie2 magas szöveti szintje összefüggést mutatott a hosszabb túléléssel.

A génexpressziós mintázat tumor-normális illetve invazivitás függvényében történő összehasonlítása erős angiogén szignál jelenlétét bizonyítja felületes hólyagtumorokban. Ennek főbb jellemzői a magas VEGF- és erősen lecsökkent Ang-1-kifejeződés. A progresszió során azonban az angiogén jel egyre csökken.

Ugyanezen angiogén faktorok szérumszintjei közül a Tie2 extracelluláris doménjének magas szérumszintje kockázati tényezőt jelentett a hólyagtumor áttétképző képességének szempontjából. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Tie2 fontos szerepet játszik a tumor metasztázisképző képességének visszaszorításában, amit valószínűleg ér-stabilizáló hatásán keresztül valósít meg.

A fent kifejtett eredmények igazolják, hogy az angiogenezisben szerepet játszó faktorok expressziója szignifikánsan befolyásolja a húgyhólyagrakos betegek életkilátásait. Ez alapján az antiangiogén terápia e tumorban való hatékonysága várható. Az új gyógyszerek alkalmazása pedig olyan vizsgálómódszerek kifejlesztését igényli, melyekkel azonosítható a betegek azon csoportja, melyben a kezelés magasabb hatékonysága várható. Másrészt szükség lehet olyan markerek felkutatására is, melyek segítségével a terápia hatékonysága követhető.

KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők

1. A vizeletből történő mikroszatellita-allélvesztés- és FISH-vizsgálat érzékeny, nem invazív módszer a húgyhólyagrak kimutatására.

2. A nagyszámú mikroszatellita-markerrel elvégzett vizsgálatok megmutatták, hogy léteznek olyan kromoszómarégiók, melyek deléciói a betegség progressziójával hozhatók összefüggésbe. E régiók vizsgálata újabb, a tumor invazív növekedése szempontjából fontos szuppresszor géneket azonosíthat, valamint az invazivitással korrelálva pontosabb diagnózis felállítását teszi lehetővé.
3. A citokinek kontroll- és tumormintákban talált szöveti expressziós mintázata arra utal, hogy a felületes hólyagrakok erőteljes angiogenezist serkentő hatást fejtenek ki, mely a tumorprogresszió során csökken.
4. A tumor indukálta angiogenezis irányításában résztvevő faktorok segítenek a hólyagtumor várható viselkedésének pontosabb leírásában, prognosztikus értékük jelentős:
 - a. Az Ang-2 és a VEGF magas szöveti mRNS-expressziója a felületes húgyhólyagrakok recidíváképződésének szempontjából kockázati tényezőként jelent.
 - b. A VEGF magas és a Tie2 alacsony szöveti expressziója invazív hólyagrakokban a magasabb átértékelődési valószínűséggel mutat összefüggést.
 - c. A Tie2 csökkent szöveti mRNS-expressziója a magasabb tumortól függő halálozás kockázati tényezője.
 - d. A szérumban mért magas sTie2-koncentráció a metasztázisképződés rizikófaktora invazív hólyagrakokban.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni elsősorban szüleimnek és családomnak, akik szerető gondoskodása végigkísért eddigi pályám során.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kopper Lászlónak és Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, hogy az általuk vezetett intézetben folytathattam Ph.D. tanulmányaimat, valamint Prof. Dr. Jeney Andrásnak folyamatos támogatásáért.

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Kovalszky Ilnának, hogy befogadott munkacsoportjába, és tudományos ténykedéseimet messzemenően támogatta.

Köszönöm Prof. Dr. Romics Imrének, amiért szakmai fejlődésemet segítő figyelemmel kísérte. Köszönet illeti az Urológiai Klinika többi munkatársát is, különösen Dr. Szendrői Attilát, Dr. Riesz Pétert és Dr. Majoros Attilát a kitartó mintagyűjtésért.

Köszönöm Dr. Bödör Csabának az értekezésem alapos áttanulmányozását és hasznos észrevételeit, me-

lyekkel nagyban hozzájárult mind a dolgozat tartalmának, mind pedig külsejének javításához.

Hálás köszönettel tartozom a II. Patológiai Intézet dolgozóinak, Dr. Kiss Andrásnak és Dr. Lotz Gábornak a FISH-vizsgálatok elvégzéséért, valamint a GenoID Kft. munkatársainak, Dr. Jeney Csabának és Dr. Szőke Melindának, amiért a mikroszatellita-allélvesztés vizsgálatot laboratóriumukba fogadták.

A molekuláris diagnosztika laboratórium minden dolgozójának szeretném megköszönni az önzetlen szakmai segítséget, és azt, hogy munkánk mindig kellemes, baráti légkörben zajlott. Név szerint: Bedi Katalinnak, Dr. Füle Tibornak, Egedi Krisztinának és Oláh Juliannának. Külön köszönöm László Viktóriának türelmét, kitartását és munkámban nyújtott segítségét.

Az értekezésben bemutatott eredmények egy része az Essen-Duisburgi Egyetem Urológiai Klinikájának kutatólaboratóriumában született. Köszönet a Klinika igazgatójának, Prof. Herbert Rübhennek, hogy figyelemmel kísérte munkámat, továbbá a laboratórium munkatársainak, Jacqueline Wittschiernek és Stephanie Abrahamnak értékes segítségükért.

IRODALOM

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

1. Szarvas T, Kovalszky I, Majoros A, et al. A hólyagtumorkok szűrésének és nyomonkövetésének lehetősége multiplex mikroszatellita vizsgálattal. *Magyar Urológia* 14:321–325, 2002
2. Szarvas T, Kovalszky I, Bedi K, et al. Deletion analysis of tumor and urinary DNA to detect bladder cancer: urine supernatant versus urine sediment. *Oncol Rep* 18:405–409, 2007
3. Riesz P, Lotz G, Páska C, et al. Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique. *Pathol Oncol Res* 13:187–194, 2007
4. Szarvas T, Jäger T, Droste F, et al. Serum levels of angiogenic factors and their prognostic relevance in bladder cancer. *Pathol Oncol Res* 15:193–201, 2009
5. Szarvas T, Jäger T, Tötsch M, et al. Angiogenetic switch of angiopoietins-Tie2-system and its prognostic value in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 14:8253–8262, 2008

Doktori értekezéstől független közlemények

1. Füle T, Máthé M, Suba Z, et al. The presence of human papillomavirus 16 in neural structures and vascular endothelial cells. *Virology* 348:289–296, 2006
2. Jäger T, Szarvas T, vom Dorp F, et al. Use of silicon chip technology to detect protein-based tumor markers in bladder cancer. *Urologe A* 46:1152–1156, 2007
3. Schenck M, Szarvas T, Ruebben H, Jaeger T. The revival of “uroscopy”: an easy way to evaluate the anastomotic region after radical retropubic prostatectomy. *Urologe A* 47:331–336, 2008