

Új biomarkerek a konvencionális veserák progressziójának megítélésére

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Szerző: Dr. Jávorházy András

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ
Urológiai Klinika



Pécs, 2017

Doktori iskolavezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezetők: Prof. Dr. Kovács Gyula

Prof. Dr. Farkas László

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AWOD	alive without disease = tumormentes túlélő
<i>CD14</i>	cluster of differentiation 14
CI	konfidencia intervallum
<i>CXCL1</i>	Chemokine Ligand 1
<i>CXCL8</i>	Chemokine Ligand 8
DOD	dead of disease = veserák következtében elhunyt.
EMT	epithel-mesenchyma transzformációnak
<i>FPRL1</i>	formyl peptide receptor like-1
<i>HNF1A</i>	hepatic nuclear factor 1 alfa
<i>IL1A</i>	Interleukin 1-alfa
<i>IL1B</i>	Interleukin 1-béta
<i>IL6</i>	Interleukin 6
<i>LBP</i>	Lipopolysaccharide binding protein
<i>MMP12</i>	mátrix metallopeptidáz 12
<i>MMP2</i>	mátrix metallopeptidáz 2
<i>MMP9</i>	mátrix metallopeptidáz 9
MODY	maturity-onset diabetes of the young
MTA1	Manual Tissue Arrayer
MTSCC	mucinózus tubuláris és orsósejtes karcinóma (mucinous tubular and spindle cell carcinoma)
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<i>p38</i>	Mitogen Activated Protein Kinase p38
RCC	renocelluláris karcinóma (renal cell cancer)
RR	reletív rizikó
<i>SAA1</i>	szérum amiloid A1
<i>SLC6A19</i>	Solute carrier family 6 member 19
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
<i>TLR4</i>	toll-like receptor 4
TMA	tissue microarray
<i>TMEM27</i>	transzmembrán protein 27

1. BEVEZETÉS

A renocelluláris karcinóma (RCC) az összes daganatos megbetegedés 2-3 százalékát teszi ki, incidenciája a nyugati országokban magasabb. Európában 2012 folyamán 84000 új esetet diagnosztizáltak, metasztatikus betegség következtében 35000 haláleset fordult elő. A veserák típusai közül leggyakoribb az összes vesedaganat mintegy 75 százalékát kitevő, magas mortalitású konvencionális típusú RCC. Az ide sorolható betegek körülbelül harmadánál észlelhető metasztázis már felismeréskor, vagy a nyomonkövetés során. A veserák elsődleges kezelési módja továbbra is a radikális vagy parciális nefrektómia. Teljes gyógyulást csak a szervre lokalizált esetekben, időben elvégzett műtéti kezelés eredményezhet. A közelmúltban bevezetett, metasztatikus esetekben alkalmazható tirozin kináz gátló kezeléssel a túlélési idő növelhető, azonban komplett remisszió már nem érhető el. A modern képpalkotó eljárások széleskörű alkalmazásának köszönhetően a korai stádiumban felfigyelt, kisméretű daganatok aránya növekszik. A korai diagnózis ellenére a szervre lokalizált, kuratív szándékkal operált esetek mintegy 15 százalékánál jelentkezik metasztázis 5 éven belül. Emiatt nagy igény mutatkozik olyan biomarkerek iránt, melyek alkalmasak a posztoperatív progresszió szempontjából magas rizikójú esetek azonosítására. A veserák kimenetelével összefüggésbe hozható biomarkerek használhatóak a progresszió előrejelzésére önállóan vagy más molekuláris és klinikai faktorokkal együtt integrált prognosztikai rendszerekbe ágyazva.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatunk célja olyan új biomarkerek azonosítása, melyek alkalmasak a szervre lokalizált konvencionális veserák posztoperatív prognózisának előrejelzésére. A rosszindulatú tumorok progressziója a daganat és mikrokörnyezet közti kapcsolat megváltozásával és a tumorsejtek dedifferenciálódásával függ össze. Ezen tényezők vizsgálatára három gént választottunk ki:

A, A tumor strómában lezajló gyulladáshoz kapcsolódó folyamatoknak fontos szerepe van a progresszióban. Ennek vizsgálatára kiválasztottunk egy akut fázis fehérjét, az *SAAI*-t kódoló gént.

B, A környező stroma átalakítása, lebontása egyik előfeltétele a tumor sejtek mozgásának. Ennek vizsgálatára a szarkomatooid veserákban kifejeződő metalloproteináz 12 (*MMP12*) kifejeződését vizsgáltuk konvencionális veserákban.

C, A progresszió során a legtöbb daganat elveszíti polarizált hám jellegét és sok esetben polarizálatlan szarkomatooid formát vesz fel. A daganatsejtek mozgásához szükség van erre az átalakulásra. Ennek a sejtváltozásnak a vizsgálatára a *TMEM27* gén kifejeződését néztük meg, amely kizárólag a proximális tubulusban mint strukturális fehérje található meg.

A dolgozatban tárgyalt biomarkerek kiválasztása a progrediáló és nem progrediáló konvencionális, valamint a szarkomatooid jellegű mutató veserák mintákon előzetesen elvégzett globális génexpresszió analízis (Affymetrix) és az azt követő reverz transzkripció PCR eredményeinek figyelembe vételével történt meg. Ezen vizsgálatok a Heidelbergi Ruprecht-Karls-Egyetemen Prof. Kovács Gyula vezetésével működő Molekuláris Onkológiai Laboratóriumban és a szintén Heidelbergben működő European Molecular Biology Laboratory genomikai részlegén zajlottak.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek és szövetminták

A Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikán 2000. január és 2010. december között konvencionális veserák miatt radikális vagy parciális nefrektómián átesett betegek közül a jó nyomonkövetési adatokkal rendelkező esetek retrospektív módon kerültek beválasztásra. A nyomonkövetési és halálozási adatokat a PTE Urológiai Klinika dokumentációs rendszereiből (Betegregiszter, Intramed, eMedSol) nyertük. Nyomonkövetési időnek a műtéttől az utolsó dokumentált kontrollvizsgálatig vagy a beteg veserák következtében bekövetkezett haláláig eltelt időt tekintettük. A vesetumortól független okból kifolyólag elhunyt betegeket a nyomonkövetési idő kiszámításánál nem vettük figyelembe. Staging céljából a műtét előtt minden esetben mellkas RTG, has és kismedencei CT vizsgálat történt. Agyi vagy csont metasztázis jelenlétére utaló klinikai tünetek fennállása esetén csontscintigráfia és koponya CT vizsgálatot is végeztünk. Nyirokcsomó érintettség megállapításánál a szövettani eredményt, távoli áttéteknél a képalkotó vizsgálatok eredményeit vettük alapul. A műtétet követő nyomonkövetés során hathavonta végeztünk hasi ultrahang vizsgálatot, mellkas röntgent és laborvizsgálatot, évente hasi és kismedence CT vizsgálatot. A szövettani diagnózis minden esetben uropatológus (K.Gy.) által felülvizsgálatra került a heidelbergi klasszifikációs rendszernek megfelelően. A TNM stádium megállapítását a 2009-es TNM klasszifikáció szerint végeztük. A nukleáris grádus meghatározása háromfokozatú rendszer alkalmazásával történt. A szövetminták gyűjtését és feldolgozását a PTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyének birtokában végeztük (Etikai engedély száma: 5343/2014).

3.2. Tissue microarray

A vizsgálat során főtális és felnőtt egészséges vese szövetet, valamint konvencionális és más típusú renocelluláris karcinómát tartalmazó paraffin blokkokat használtunk fel tissue microarray (TMA) készítéséhez. A tumoros blokkokból készített hematoxin-eozin festett metszetek áttekintése során került kijelölésre a mintavétel helye. Ezt követően a kijelölt területnek megfelelően a paraffinba ágyazott szövetblokkból Manual Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, USA) készülék segítségével 0.6 mm átmérőjű szövethengereket emeltünk ki. Különböző morfológiájú vagy grádusú területekkel rendelkező tumorokból több (2-4) mintát vettünk. Az így nyert szövethengereket az MTA1 készülék segítségével egy közös paraffin blokkba ágyaztuk be, lehetővé téve 100-150 különböző minta egy metszeten történő egyidejű vizsgálatát. Az antitest festődés ellenőrzése céljából a TMA készítésekor egészséges főtális és felnőtt vese mintákat is beépítettünk.

3.3. Immunhisztokémia

A TMA-kból készített 4 µm vastagságú metszetekből a paraffint xilol segítségével eltávolítottuk, majd a metszeteket leszálló etanol sorozatban rehidráltuk. Ezt követően az antigén feltárás az *SAA1*, *MMP12* és *TMEM27* esetén 10 mM nátrium-citrát pufferben (pH 6,0), a *HNF1A* esetén TE pufferben (pH 9,0) történő forralással értük el, amit a 2100-Retriever (Pick-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia) készülékben végeztünk el. Az endogen peroxidáz aktivitás és a nem specifikus kötőhelyek blokkolása 1% normal ló szérumot tartalmazó 0,3%-os hidrogénperoxidban történt szobahőmérsékleten 10 percig. Ezt követően a metszeteket éjszakán át nedves kamrában 4°C-on inkubáltuk. A következő antitesteket használtuk fel: nyúl anti-SAA1 antitest (ab655, Abcam, Cambridge, UK), 1:100

hígításban; nyúl anti-TMEM27 antitest (ab200664, Abcam, Cambridge, UK), 1:1000 hígításban; nyúl anti-HNF1A antitest (PA5-22310, Thermo Fisher Scientific, Budapest, Hungary), 1:500 hígításban; nyúl anti-MMP12 antitest (NBP1-31225, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), 1:250 hígításban. Harminc percig történő HRP conjugált anti-nyúl másodlagos antitest (MACH4 Universal HRP-Polymer, Biocare Medical, Concord, USA) alkalmazását követően az előhívás AEC szubsztrát és DAB (DAKO) segítségével történt, majd a metszeteket Mayer hematoxilinnel festettük. Végül a metszetek kétszeres kiértékelése történt a klinikai adatok ismerete nélkül.

3.4. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai feldolgozása az SPSS Statistics szoftver 23.0 verzió (IBM, 35 Armonk, NY, USA) segítségével történt. A vizsgált gének expressziója és a klinikopatológiai paraméterek közti összefüggéseket a khi-négyzet próba alkalmazásával elemeztük. A különböző változók (életkor, nem, tumor méret, TNM klasszifikáció, nukleáris grádus, stádium, metasztázis jelenléte és a vizsgált gén expressziója) túlélési időre gyakorolt hatását Kaplan-Meier analízis segítségével mértük fel, a túlélési görbék összehasonlítását log-rank teszt alkalmazásával végeztük. A túlélésre gyakorolt hatás egyváltozós és többváltozós analízise a Cox regressziós modell segítségével történt. A vizsgálat lezárultakor életben lévő és tumormentes betegeket cenzoráltuk. A különbséget 0,05-nél kisebb p érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. SAA1

4.1.1. Az SAA1 expresszió immunhisztokémiai vizsgálata

Az *SAA1* expresszió vizsgálatát 429 betegnél végeztük el. Felismeréskor valamennyi esetben a betegség szervre lokalizált volt. Az átlagos nyomonkövetési idő $73,53 \pm 4,6$ hónap volt. A nyomonkövetés során 78 betegnél (18%) alakult ki progresszió. A férfi: nő arány 266:163 (62% és 38%), az átlagos életkor $61,4 \pm 11,2$ év volt. Az átlagos tumorméret $50,1 \pm 25,5$ mm volt.

Az immunhisztokémiai vizsgálat során főtális és felnőtt normál veseszöveten SAA1 festődés nem volt észlelhető. Az veserák minták nagy többsége szintén SAA1 negatívnak bizonyult. A 429 tumoros minta közül csupán 20 mutatott különböző intenzitású SAA1 festődést. A pozitív esetekben az SAA1 fehérje időnként kisméretű csomókat formálva a sejtfalban halmozódott, azonban az intenzívebb reakciót mutató esetekben citoplazmatikus festődés is előfordult. A szolid tumorszövetben megfigyelhetőek voltak kisméretű, tumorsejtekkel szegélyezett ciszták, melyek SAA1 pozitív folyadékot tartalmaztak. Néhány esetben gyenge citoplazmatikus festődés mellett nagyméretű SAA1 pozitív intracitoplazmatikus zárványok alakultak ki.

4.1.2. Az SAA1 expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel

Az SAA1 expresszió és a klinikopatológiai változók, mint a daganatspecifikus halálozás, a tumor méret, a nukleáris grádus és a T-stádium közötti viszony statisztikai elemzése során mindegyik paraméter tekintetében szignifikáns összefüggés volt kimutatható ($p < 0,001$) (1. táblázat).

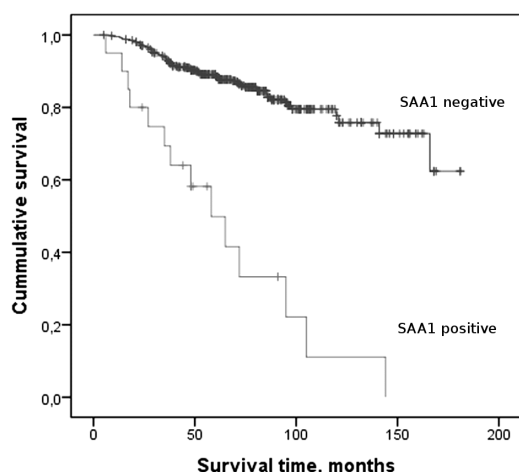
1. Táblázat. Az SAA1 expresszió és a konvencionális veserák klinikopatológiai jellemzői közötti összefüggések

	Esetek száma(429)	SAA1		P-érték
		+	-	
Státusz				
AWOD	351	6	345	P<0,001
DOD	78	14	64	
Tumor méret				
<4cm	192	2	190	P<0,001
4-7cm	153	5	148	
> 7cm	84	13	71	
Grade				
G1	278	2	276	P<0,001
G2	116	10	106	
G3	35	8	27	
T-stádium				
1a-b	294	4	290	P<0,001
2	37	4	33	
3a-b-c	97	12	85	

AWOD: alive without disease = tumormentes túlélő, DOD: dead of disease = veserák következtében elhunyt.

4.1.3. Az SAA1 expresszió és a túlélési adatok közötti összefüggés

A log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis az SAA1 antitesttel pozitívan festődő tumorok esetén lényegesen rövidebb daganatspecifikus túlélést igazolt (1. ábra). A medián túlélési idő az SAA1 pozitív betegeknél 58 hónap (33-82, 95% CI) volt. Egyváltozós analízis (2. táblázat) alapján az SAA1 pozitív tumorral rendelkező betegeknél a daganatspecifikus halálozás kockázata szignifikánsan magasabb (RR 6,61; 95% CI-3,70-11,83). Az SAA1 festődés független prognosztikai értékének meghatározása érdekében többváltozós analízist is végeztünk az ismert klinikopatológiai prognosztikai változókat figyelembe véve (10. táblázat). Többváltozós analízis során az SAA1 expresszió - a T-stádium és a nukleáris grádus mellett - független prognosztikai faktornak bizonyult (RR-2,11; 95% CI-1,14-3,92; p=0,017).



1. **Ábra** Log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis SAA1 negatív és SAA1 pozitív tumorról rendelkező betegek esetén.

2. **Táblázat.** A klinikopatológiai paraméterek és az SAA1 expresszió összefüggése a daganatspecifikus túléléssel Cox regressziós analízis során

Paraméterek	Egyváltozós analízis		Többváltozós analízis	
	Relatív rizikó (95%CI)	P érték	Relatív rizikó (95% CI)	P érték
Kor (év)	1,02 (1,00-1,04)	0,088	1,01 (0,99-1,03)	0,234
Nem (ffi/nő)	1,12 (0,73-1,71)	0,578	1,00 (0,63-1,59)	0,986
T-stádium T1a-b		<0,001		<0,001
T2	4,95 (2,50-9,80)	<0,001	4,36 (2,09-9,07)	<0,001
T3a-b-c	8,74 (5,36-14,25)	<0,001	6,19 (3,50-10,93)	<0,001
Grade (G1 / G2-3)	3,84 (2,49-5,94)	<0,001	2,33 (1,39-3,91)	0,001
Tumor méret (cm)	1,02 (1,02-1,03)	<0,001	1,00 (0,99-1,01)	0,314
SAA1 (+ / 0)	6,61 (3,70-11,83)	<0,001	2,11 (1,14-3,92)	0,017

4.2. MMP12

4.2.1. Az MMP12 expresszió immunhisztokémiai vizsgálata

Az MMP12 expresszió vizsgálatát 492 betegnél végeztük el (1. csoport), melyek közül 429 betegnél volt a betegség felismeréskor szervre lokalizált (2. csoport). Metasztázis a műtét idején 63 betegnél volt jelen, míg a felismeréskor nem metasztatikus betegek közül 85 esetben volt észlelhető progresszió a nyomonkövetés során. Összesen 148 betegnél (30,1%) alakult ki végzetes progresszió. A férfi:nő arány 314:178 (63,8% és 36,2%), az átlagos életkor 61,52 év volt. Az átlagos tumorméret a vizsgálat végéig elhunyt betegeknél 87 mm volt, míg a túlélő betegek csoportjánál 51 mm.

Az MMP12 antitesttel megfestett metszetek értékelése során a pozitívan festődő mintákban a tumorsejtek legalább 80%-a festődött, így a pozitívan festődő sejtek számát értékelendő

paraméterként nem vettük figyelembe. A festődés mértékének osztályozása során elkülönítettünk nem festődő, gyengén festődő, közepesen festődő és erősen festődő eseteket. Az MMP12 expresszió vizsgálatát normál főtális és felnőtt veseszöveten is elvégeztük. Érdekes módon, normál vesén kizárólag a distalis tubulus sejtek mutattak erős MMP12 festődést. A 492 konvencionális típusú veserák minta MMP12 antitesttel történő immunhisztokémiai vizsgálata során 116 esetben főként gyenge és közepes, néha erős festődés volt megfigyelhető, míg 376 tumor nem mutatott MMP12 festődést. Az immunreakció intenzitását figyelembe vevő első statisztikai feldolgozás során a daganatspecifikus halálózásra nézve nem volt kimutatható lényegi különbség a gyengén és a közepes mértékben festődő tumorok között. Emiatt végül úgy döntöttünk, hogy az immunhisztokémia értékelése során csupán az MMP12 expresszió szempontjából pozitív és negatív eseteket különítjük el egymástól.

4.2.2. Az MMP12 expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel

Az MMP12 expresszió és a klinikopatológiai változók, mint a veserák következtében bekövetkezett halálózás, a tumor méret, a nukleáris grádus, a T-stádium, a TNM-stádium, a koagulációs nekrozis jelenléte és a műtét idején fennálló metasztázis közötti viszony statisztikai elemzése során mindegyik paraméter tekintetében szignifikáns összefüggés volt kimutatható ($p < 0,001$) (3. táblázat).

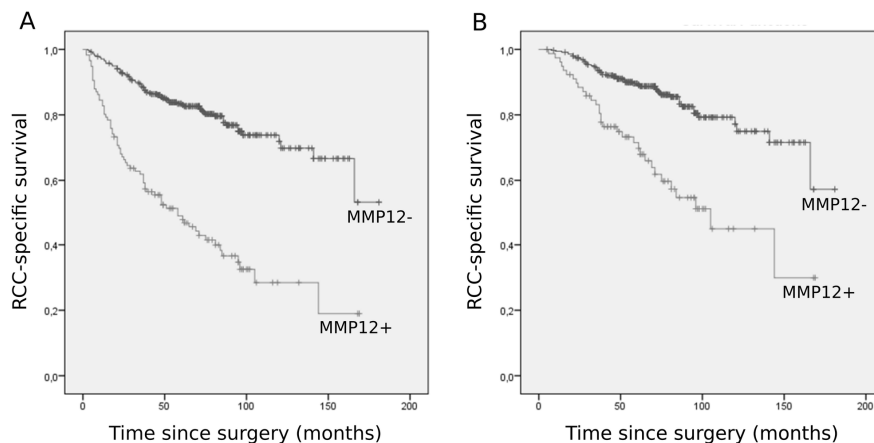
4.2.3. Az MMP12 expresszió és a túlélési adatok közötti összefüggés

A daganatspecifikus túlélést külön értékeltük az összes beteg (1-es csoport) és a műtét idején metasztázissal nem bíró betegek (2-es csoport) esetén. A medián túlélési idő az MMP12 pozitív betegeknél az 1-es csoportban 58 hónap volt (2.A. ábra), míg a 2-es csoportban 105 hónap (2.B. ábra). A log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis mindkét csoportban az MMP12 antitesttel pozitívan festődő tumorok esetén szignifikánsan rövidebb túlélést igazolt ($p < 0,001$). Egyváltozós analízis során az ismert klinikai változók (a tumor méret, a nukleáris grádus, a T-stádium, a TNM-stádium, a koagulációs nekrozis jelenléte és a műtét idején fennálló metasztázis) és az MMP12 expresszió szignifikáns összefüggést mutattak a túléléssel. Többváltozós analízis során (4. táblázat) a 1-es csoportban a T1-T2 stádium, a nukleáris grádus, a TNM-stádium, a nekrozis jelenléte, a műtét idején meglévő metasztázis és a tumor mérete bizonyult a daganatspecifikus túlélés előrejelzése szempontjából szignifikáns negatív paraméternek, mely az MMP12 expresszióról nem mondható el. Azonban a 2-es csoportba sorolt, a műtét idején nem metasztatikus eseteket vizsgálva az MMP12 expresszió független prognosztikai faktornak bizonyult, mely alkalmas posztoperatív relapszus előrejelzésére ($p=0,048$).

3. Táblázat. Az MMP12 expresszió és a konvencionális veserák klinikopatológiai jellemzői közötti összefüggések

	Esetek száma 492	MMP12		P-érték
		+	-	
Státusz				
AWOD	344	46	298	<0,001
DOD	148	70	78	
Tumor méret				
< 4 cm	190	19	171	<0,001
4-7 cm	171	43	128	
> 7 cm	131	54	77	
Grade				
G1	272	22	250	<0,001
G2	140	44	96	
G3	80	50	50	
T-stádium				
T1a-b	296	41	255	<0,001
T2	40	11	29	
T3a-b-c	148	59	89	
T4	8	5	3	
Stage				
I/II	320	448	272	<0,001
III/IV	172	68	104	
Nekrózis				
van	431	84	347	<0,001
nincs	61	32	29	
Metasztázis *				
van	63	38	25	<0,001
nincs	429	78	351	

*a műtét idején, AWOD: alive without disease = tumormentes túlélő, DOD: dead of disease = veserák következtében elhunyt.



2. ábra. A.: Log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis az MMP12 negatív és MMP12 pozitív tumorral rendelkező betegek esetén, a teljes beteganyagon. **B.:** Log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis az MMP12 negatív és MMP12 pozitív, felismeréskor szervre lokalizált tumorral rendelkező betegeknél.

4. Táblázat. A klinikopatológiai paraméterek és az MMP12 expresszió összefüggése a daganatspecifikus túléléssel Cox regressziós analízis során

Többváltozós analízis	Összes beteg (492)		Metasztázis nélküli betegek* (429)	
	Relatív rizikó (95%CI)	P érték	Relatív rizikó (95% CI)	P érték
Kor (év)	1,008 (0,991-1,024)	0,367	1,007 (0,986-1,028)	0,522
Nem (ffi/ nő)	0,958 (0,667-1,377)	0,819	0,927 (0,591-1,454)	0,743
T stádium T1a-b		0,01		<0,001
T2	2,815 (1,477-5,367)	0,02	4,040 (1,974-8,268)	<0,001
T3a-b-c	1,636 (0,819-3,270)	0,164	6,040 (3,540-10,304)	<0,001
T4	2,570 (0,977-6,763)	0,056		
Grade (G1/G2-3)	2,006 (1,257-3,200)	0,003	2,180 (1,307-3,638)	0,003
Stádium (I-II/III-IV)	3,492 (1,638-7,444)	0,001	2,635 (0,345-20,131)	0,350
Nekrózis (van/nincs)	1,833 (1,239-2,711)	0,002	1,550 (0,859-2,799)	0,146
Metasztázis* (van/nincs)	5,805 (3,814-8,837)	<0,001		
Tumor méret (cm)	1,006 (1,001-1,012)	0,028	1,002 (0,993-1,012)	0,631
MMP12 (0 / +)	1,260 (0,874-1,816)	0,216	1,612 (1,004-2,589)	0,048

CI: konfidencia intervallum, *a műtét idején

4.3. TMEM27

4.3.1. TMEM27 expresszió immunhisztokémiai vizsgálata

TMEM27 expresszió vizsgálatára 486 beteg (1. csoport) került beválasztásra retrospektív módon. Az 1. csoportból 422 beteg (2. csoport) a diagnózis felállítása idején nem rendelkezett metastázissal. Az 1. csoportba sorolt betegek 13 százalékánál volt észlelhető metastázis a műtét időpontjában. A 2. csoportban a betegek 17 százalékánál jelentkezett progresszió a nyomonkövetés során. Az összes beteg 29 százalékánál alakult ki metastatikus állapot. Az átlagos nyomonkövetési idő $65,5 \pm 37,1$ hónap volt. A férfi:nő arány 313:173 (64,4% és 35,6%), az átlagos életkor 61,3 év volt. Az átlagos tumorméret a vizsgálat végéig elhunyt betegek esetén 86 mm volt, míg a túlélő betegek csoportjánál csak 52 mm.

Immunhisztokémiai vizsgálatra azért választottuk ki a TMEM27 gént, mivel ez kizárólagosan a proximális tubulusban fejeződik ki, mely a konvencionális veserák kiindulási helyének tekinthető. Főtális vesében immunhisztokémia során a TMEM27 halvány, membránhoz kötött expressziót mutatott a proximális tubulusok luminális felszínén. Felnőtt vesében a TMEM27 szintén proximális tubulusok luminális felszínén fejeződött ki, azonban a festődés jelentősen intenzívebb volt. A vizsgálat során 486 beteg paraffin blokkjaiból esetenként kiemelt 1-4 szövethenger felhasználásával készített TMA-t festettük meg TMEM27 antitesttel. Változatos intenzitású, kizárólag membránhoz kötött festődést észleltünk 356 tumornál, míg 130 eset TMEM27-negatívnak bizonyult.

Ugyanabból a tumorból nyert, különböző grádusú illetve megjelenésű területeket reprezentáló többes minták esetén, amennyiben pozitív és negatív festődés is előfordult, az eredményt negatívnak tekintettük.

Annak érdekében, hogy alátámasszuk a TMEM27 festődés specificitását, a vizsgálatot egyéb típusú vesetumor mintákon is elvégeztük. A vizsgált 54 papilláris veserák mintából 9 esetben a minta kis területein gyenge pozitív festődés volt észlelhető a sejtek felszínén, főként a jobban differenciálódott, a proximális tubulus sejtekre hasonlító eozinofil sejtekben. A vizsgált 21 kromofób veserák, 33 vese onkocitóma, hét mucinózus tubuláris és orsósejtes karcinoma (MTSCC), hat metanefrikus adenoma és kilenc Wilms-tumor minta egyike sem mutatott pozitív festődést TMEM27 antitesttel.

A rendelkezésre álló experimentális irodalmi adatok arra utalnak, hogy a *HNF1A* transzkripciós aktivátor szabályozza a *TMEM27* expresszióját [Fukui et al. 2005]. Ennek ismeretében anyagunkon megvizsgáltuk HNF1A kifejeződését. Eredményeink alapján normál veseszövetben mind a két gén a proximális tubulusokra lokalizálódik, azonban konvencionális veserákokban nem találtunk összefüggést a két gén expressziója között.

4.3.2. A TMEM27 expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel

A TMEM27 fehérje expresszió és a klinikopatológiai jellemzők viszonyát a 5. táblázat foglalja össze. A TMEM27 expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel, a tumor mérettel, a grádussal, a T stádiummal, a TNM stádiummal és a műtét időpontjában a metasztázis jelenlétével.

4.3.3. Az TMEM27 expresszió és a túlélési adatok közötti összefüggés

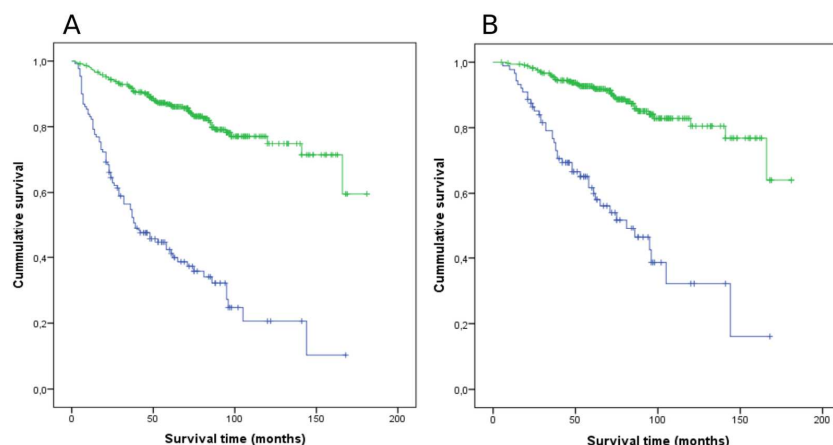
Az átlagos nyomonkövetési idő $65,5 \pm 37,1$ hónap volt. A log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis a TMEM27 negatív tumorral rendelkező betegek esetén rossz daganat specifikus túlélést mutatott mindkét betegcsoportban (3. ábra). A TMEM27 kifejeződésének hiánya az 1-es csoportban 39 hónap (23,6-54,4, 95% CI), a 2-es csoportban 58 hónap (53-108, 95% CI) medián túlélési idővel járt együtt. Egyváltozós analízis során az 1-es és 2-es csoportba tartozó TMEM27 negatív tumorral rendelkező betegeknél a daganatspecifikus halálozás rizikója szignifikánsabb magasabb volt a TMEM27 pozitív esetekhez képest. A TMEM27 festődés független prognosztikai értékének meghatározása érdekében többváltozós analízist végeztünk az ismert klinikopatológiai prognosztikai változókat figyelembe véve (6. táblázat).

Az 1-es csoportban a T-stádium, a tumor méret, a metasztázis felismeréskori jelenléte és a TMEM27 expresszió bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (RR-2,76; 95% CI-1,91-3,99; $p < 0,001$). A 2-es csoportba sorolt, a műtét idején nem metasztatikus eseteknél csak a T-stádium és a TMEM27 expresszió volt szignifikáns (RR-2,95; 95% CI-1,81-4,80; $P < 0,001$). Tehát a TMEM27 expresszió hiánya független negatív biológiai prognosztikai faktornak tekinthető, mely kedvezőtlen daganatspecifikus túléléssel jár együtt konvencionális RCC esetén.

5. Táblázat. A TMEM27 expresszió és a konvencionális veserák klinikopatológiai jellemzői közötti összefüggések.

	Esetek száma (486)	TMEM27		P-érték
		+	-	
Kor átlag		60,8	61,5	0,567
Nem férfi nő	313 173	230 126	83 47	0,877
Státusz AWOD DOD	339 147	293 63	46 84	<0,001
Tumor méret < 4 cm 4-7 cm > 7 cm	181 175 130	156 131 69	25 44 61	<0,001
Grade G1 G2 G3	265 140 81	239 95 22	26 45 59	<0,001
T-stádium T1a-b T2 T3a-b-c T4	293 40 145 8	252 28 75 1	41 12 70 7	<0,001
Stádium I/II III/IV	316 170	270 86	46 84	<0,001
Metasztázis * van nincs	64 422	22 334	42 88	<0,001

*a műtét idején, AWOD: alive without disease = tumormentes túlélő, DOD: dead of disease = veserák következtében elhunyt.



3. Ábra. A.: Log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis a TMEM27 negatív (alsó görbe) és TMEM27 pozitív (felső görbe) tumorral rendelkező betegek esetén, a teljes beteganyagban. **B.:** Log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélés analízis a TMEM27 negatív (alsó görbe) és TMEM27 pozitív (felső görbe), felismeréskor szerve lokalizált tumorral rendelkező betegeknél.

6. Táblázat. Klinikopatológiai paraméterek és a TMEM27 expresszió összefüggése a daganatspecifikus túléléssel Cox regressziós analízis szerint.

Többváltozós analízis	Összes beteg (486)		Metasztázis nélküli betegek* (422)	
	Relatív rizikó (95% CI)	P érték	Relatív rizikó (95% CI)	P érték
Kor (év)	1,01 (0,99-1,03)	0,088	1,02 (0,99-1,04)	0,064
Nem (ffi/nő)	0,94 (0,65-1,36)	0,768	0,83 (0,52-1,33)	0,451
T1a-b		0,025		<0,001
T2	2,08 (1,06-4,07)	0,032	4,16 (2,03-8,52)	<0,001
T3a-b-c	0,75 (0,36-1,57)	0,455	5,15 (2,95-8,97)	<0,001
T4	1,08 (0,39-2,96)	0,873		
Grade (G1/G2-3)	1,55 (0,94-2,54)	0,081	1,72 (0,99-2,99)	0,051
Stádium (I-II/III-IV)	5,18 (2,48-10,82)	<0,001	2,35 (0,31-17,87)	0,407
Metasztázis* (van/nincs)	5,97(3,92-9,09)	<0,001		
Tumor méret (cm)	1,00 (1,00-1,01)	0,003	1,00 (0,99-1,01)	0,255
TMEM27 (+ / 0)	2,76 (1,91-3,99)	<0,001	2,95 (1,81-4,80)	<0,001

CI: konfidencia intervallum, *a műtét idején

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. SAA1 és a konvencionális veserák prognózisa

Többváltozós analízis során az SAA1 expressziója a tumorsejtek citoplazmájában daganat specifikus halálozás rizikójával társult és független prognosztikai biomarkernek bizonyult. Az akut fázis fehérje SAA1 gyulladás esetén, válaszként az *IL1A*, *IL1B* and *IL6* fokozott kifejeződésére a májban termelődik és a szérumban kimutatható [Kovacevic et al. 2008]. Ugyanakkor, az SAA1 fehérje felerősíti az immunválaszt a tumor mikrokörnyezetében az *IL6*, *CXCL8* and *CXCL1*, valamint a metalloproteinázok aktiválásával [de Seny et al. 2013]. Tehát az SAA1 az úgynevezett “pro-inflammatory amplification loop” egyik komponense, amely fontos szerepet tölt be a tumorok mikrokörnyezetének változásában és így a tumorok progressziójában. Továbbá, az SAA1 elősegíti a tumor sejtek migrációját az *MMP-9* expresszió indukálásával [Paret et al.2010]. Az SAA1 molekulának számos receptora van, amelyekhez kötődve különböző sejtfunkciókban játszik szerepet. A G proteinhez társult *FPRL1* gén részt vesz a cytokinek indukciójában és az SAA1 kemotaktikus funkciójában. Újabb adatok szerint az SAA1 a TLR4-p38 foszforiláció-NF-kB jelátviteli rendszeren keresztül fejti ki hatását [Sandri et al. 2008]. Az LBP-CD14 komplex az említett jelátvitel aktiválásával felerősíti az *MMP-2* valamint a beta-integrin kifejeződését és ezen az úton is hozzájárul a tumorsejtek invazív tulajdonságához [Harmey et al. 2002]. Mindezek a gyulladásos folyamatok olyan irányban változtatják meg a tumor környezetét, ami a sejtek proliferációját, túlélését, gyógyszer rezisztenciáját valamint a neoangiogenezist segítik elő [Mantovani et al. 2008].

Az SAA1 emelkedett szérum szintje összefüggést mutat a tumorok klinikai és patológiai paramétereivel [Wood et al. 2010]. Azonban ezeket az adatokat önmagukban óvatosan kell kezelni, mert az SAA1 szérum szintjének emelkedése nem daganat, hanem gyulladás specifikus. Ezért az emelkedett szérum szint kiértékelésénél feltétlenül ismerni kell a beteg általános állapotát és ki kell zárni bármilyen bakteriális vagy nem bakteriális gyulladás jelenlétét. A konvencionális veserák prognózisának megítélésében az SAA1 kifejeződése a tumor sejtek citoplazmájában egy szolid biomarkernek tekinthető.

5.2. MMP12 és a konvencionális veserák prognózisa

Az előzetes vizsgálatok során az MMP12 fokozott expressziója volt észlelhető a magas malignitású szarkomatooid RCC mintákban. Az immunhisztokémiai vizsgálat az MMP12 fehérje gyenge és közepes kifejeződését igazolta a konvencionális típusú RCC minták 31 százalékában. Általánosan elfogadott, hogy a konvencionális típusú veserák a proximális tubulusokból indul ki. Meglepő módon normál főtális és felnőtt veseszöveten MMP12 expresszió kizárólag a distalis tubulus sejtekben volt megfigyelhető. Ez arra enged következtetni, hogy a cRCC minták vizsgálata során tapasztalható MMP12 pozitívitas de novo tumorspecifikus génexpresszió következtében jön létre. A citoplazmatikus MMP12 expresszió a progresszió magas kockázatával társul a műtét idején szervre lokalizált daganattal rendelkező betegcsoportban. A Kaplan-Meier analízis szintén szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) jelzett a túlélés tekintetében az MMP12 negatív és pozitív eseteket összehasonlítva. Eredményeink az mutatják, hogy az MMP12 fokozott expressziója konvencionális típusú veserákban összefüggésben áll a kedvezőtlen kimenetellel.

A cinkfüggő endopeptidázok közé tartozó mátrix-metalloproteinázok alapvető szerepet játszanak az extracelluláris mátrix lebontásában [Nagase et al. 1999], mely az olyan fiziológiás folyamatok, mint az embrionális fejlődés, a sebgyógyulás és a szöveti remodelláció mellett a daganatok invazív növekedésében és szóródásában is meghatározó

jelentőségű [Lyu et al. 2005; Shuman Moss et al. 2012; Werb et al. 1992]. Az extracelluláris mátrix lebontása kiemelkedően fontos a tumor progresszió és a metasztázis képződés szempontjából. Az áttét kialakulásához vezető folyamat egyik első lépése a bazálmembrán degradációja, melyben a mátrix-metalloproteinázok működnek közre. Az extracelluláris mátrixot alkotó fehérjék, mint a kollagén, a fibronectin és a laminin proteázok általi átalakítása erősen befolyásolja a tumor progresszió folyamatát [Kessenbrock et al. 2010]. A mátrix-metalloproteinázok módosíthatják az extracelluláris mátrixot, mely különböző jelátviteli utakon keresztül tumor progresszióhoz vezet [Nguyen-Ngoc et al. 2012]. A mátrix-metalloproteinázok számos bioaktív molekula átalakítására képesek, ezáltal elősegítve a sejt migrációt, a proliferációt, az angiogenezist és a gyulladáshoz kapcsolódó reakciókat, melyek mindegyike szükséges a tumor progresszióhoz [Butler et al. 2009].

Az MMP12, másnéven makrofág-metalloproteináz fehérje inaktív formája 54 kDa méretű, melyből az N- és C-terminál lehasítását követően alakul ki a 22 kDa méretű aktív forma [Shapiro et al. 1993]. Az MMP12 tumorbiológiában játszott szerepe meglehetősen ellentmondásos. Attól függően, hogy milyen típusú tumoron vizsgálják, az MMP12 mutathat daganatkeltő és daganatellenes hatást egyaránt. Az MMP12 expresszió összefüggést mutat számos daganattípus, mint a tüdő, fej-nyak, bőr, nyelőcső, prosztata és a hasnyálmirigy rák, valamint eredményeink alapján a konvencionális típusú veserák progressziójával [Lv et al. 2015; Yang et al. 2012; Ding et al. 2002; Nabha et al. 2008; Kerkelä et al. 2002; Balaz et al. 2002]. Az MMP12 elősegíti a nazofaringeális karcinóma sejtek migrációját és invázióját [Chung et al. 2014]. A fentiekkel ellentétben, az MMP12 expresszió tumorelles hatással bír hepatocelluláris, gyomor és kolorektális karcinóma esetén [Cheng et al. 2010; Yang et al. 2001, Gorrin Rivas et al. 1998]. Az MMP12-t termelő tumorkok jobb prognózist bizonyos tumorkokban azzal magyarázzák, hogy az MMP12 szerepet játszik az angiosztatin plazminogénné történő átalakításában, ezáltal gátolja az endotheliális sejtek proliferációját, mely szükséges a tumor növekedéséhez és a metasztázis képződéséhez [Gorrin Rivas et al. 2000].

5.3. TMEM27 és a konvencionális veserák prognózisa

Vizsgálatunk során az irodalomban elsőként igazoltuk, hogy a TMEM27 expresszió hiánya konvencionális veserák esetén összefüggésben van a szarkomatoid szövettani elváltozásokkal és a betegség végzetes progressziójával. A nefrektómia idején nem metasztatikus betegek TMEM27 negatív daganat esetén legalább háromszor nagyobb valószínűséggel haláloznak el a veserák progressziója következtében, mint a TMEM27 pozitív tumorról bízók betegek. A Kaplan-Meier analízis alapján látható, hogy a TMEM27 expresszió hiánya negatív és független prognosztikai faktornak tekinthető a renocelluláris karcinóma progressziójának előrejelzésében. Az összes beteget (1-es csoport) számításba véve a medián túlélés 39 hónap (95% CI) volt, míg a 2-es csoportba sorolt, a nefrektómia idején nem metasztatikus betegeknél a medián túlélés 81 hónap (95% CI) volt. Tehát a TMEM27 expresszió értékes prognosztikai faktorként szolgál a posztoperatív tumormentes túlélés előrejelzésében a diagnosis felállításakor nem metasztatikus betegeknél. A többváltozós Cox regressziós model kimutatta, hogy a tumorsejtek a TMEM27 expressziójának hiánya szignifikáns kapcsolatban van a betegség halálos kimenetelével a 2-es betegcsoportban. A TMEM27 expresszió és a tumor T-stádiuma (mindkettőnél $p < 0,001$) szignifikáns összefüggést mutat a daganatspecifikus túléléssel többváltozós Cox regressziós analízis során. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a TMEM27 immunhisztokémia a T klasszifikációval kombinálva jó markerként használható a konvencionális típusú RCC progressziójának előrejelzésében.

A TMEM27-t először a vese gyűjtőcsatornában azonosították [Zhang et al. 2001], emiatt kapta a kollektin nevet. Helyes lokalizációja és funkciója napjainkra tisztázódott. A *TMEM27* gén által kódolt transzmembrán fehérje fontos szerepet játszik az aminosav transzportereknek a proximális tubulusok apikális kefeszegélyére történő eljuttatásában. [Verrey et al. 2009]. Az *SLC6A19* aminosav transzporter expressziója függ a TMEM27 sejtfalban való jelenlététől [Danilczyk et al. 2006]. A TMEM27 gén az X kromoszóma rövid karjának 22-es régiójára, a pszeudo-autoszomális területen kívülre lokalizálódik, így az Y kromoszómán nincs homológja. Figyelemre méltó, hogy 18 Turner szindrómás, XO genotípussal rendelkező beteg fenotípus vizsgálata során 14 betegnél észleltek vese malformációt, főként patkóvesét, mely a normál populációban csak 1:400 gyakorisággal fordul elő [Pasquali et al. 2009; O Brian et al. 2008].

A TMEM27 szerepet játszik az inzulin exocytosis vezérlésében a SNARE (the soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) komplex szabályozásával a hasnyálmirigyben, a Langerhans szigetek béta sejtjeiben. A cukorbetegség ritka formája, a MODY (maturity-onset diabetes of the young) esetén jellemző a beta sejtekben a glükóz stimulálta inzulin szekréció elégtelensége [Fajans et al. 2001]. A betegségnek hat különböző formája ismert, melyek különböző gének mutációja révén alakulnak ki. A transzkripciós faktort kódoló HNF1A (hepatic nuclear factor 1 alfa) gén mutációja felelős a 3-as típusú MODY kialakulásában [Yamagata et al. 1996]. A vesében és a hasnyálmirigyben a TMEM27 és a HNF1A azonos sejtekben lokalizálódik, melynek alapján feltételezték, hogy a HNF1A transzkripciós faktor downstream célgénje a TMEM27 [Fukui et al. 2005; Yamagata et al. 2007]. Vizsgálataink során megerősítettük, hogy mind TMEM27 és a HNF1A a normál vese szövet proximális tubulusaiban fejeződik ki. A TMEM27 a proximális tubulusok kefeszegélyében, a HNF1A transzkripciós faktor pedig a proximális tubulusok sejtmagjaiban volt azonosítható. Azonban konvencionális veserákokban nem találtunk összefüggést a két fehérje pozitív festődése között.

A rendelkezésre álló szűkös irodalmi adatokban nincs arra utaló adat, hogy a TMEM27 szerepet játszana a daganatképződést illetve progressziót szabályozó molekuláris folyamatokban. Habár a TMEM27 expressziót egerekben összefüggésbe hozták a béta sejtek proliferációjával [Akpınar et al. 2005], más szerzők ennek lehetőségét egyenesen kizárták [Altirriba et al. 2010]. Azonban Zhang és mtsai small interferáló RNS silencing módszerrel végzett kísérleteik alapján felvetették, hogy a TMEM27 szerepet játszik a vese epithelium csillószőreinek és polaritásának fenntartásában [Zhang et al. 2007]. Vizsgálataink arra utalnak, hogy magas malignitású veserák sejtjeiben a TMEM27 fehérje sejtfalból történő eltűnése együtt jár a sejtek polaritásának elvesztésével. Ezek a tumorok epithel-mesenchyma transzformáción mennek át, ezáltal biológiai malignitásuk jelentősen emelkedik, mely fokozottabb progresszióval és metasztázis képződéssel jár együtt.

6. TÉZISEK

Az utóbbi évtizedekben a képkalkoló eljárások széleskörű használata a veserák alacsonyabb stádiumban történő felismeréséhez vezetett. Az incidentálisan felismert T1a, T1b és T2 tumorok száma a legtöbb urológiai centrum műtéti statisztikájában emelkedő tendenciát mutat. Bár ezek a tumorok alacsonyabb gyakorisággal progresszióznak, mint a magasabb stádiumú (T3, T4) tumorok, azonban körülbelül 15-20 százalékuknál a nyomonkövetés során metasztázis jelentkezik. Ezen magas rizikójú betegcsoport csoport felismerésére kevés marker ismert. Vizsgálaink során három, a daganat progresszióját elősegítő illetve jelző markert azonosítottunk:

A. Igazoltuk, hogy az SAA1 akut fázis protein kifejeződése a tumorsejtek citoplazmájában szignifikánsan társul azon daganatok posztoperatív progressziójával, amelyek a felismeréskor még a vesére lokalizálódtak. Adataink megerősítik a konvencionális vese tumorok mikro környezetében lezajló gyulladásos folyamatok szerepét a tumor progresszióban.

B. Továbbá igazoltuk, hogy az MMP12 citoplazmatikus expressziója konvencionális veserákban összefüggésben áll a posztoperatív metasztázis képződéssel és a rövidebb daganatspecifikus túléléssel. Ez annak tükrében érthető, hogy nemcsak a gyulladásos folyamatok felerősítése, hanem a tumor stroma leépítése, lebontása is szükséges a sejtek szabad mozgásához és így a metasztázisok kialakulásához. Ebben a folyamatban az MMP12-nek jelentős szerepe van.

C. Az invázióhoz és sejtmozgáshoz szükséges a normalis epitheliális forma átmeneti feladása, azaz az epithel-mesenchyma-tranzíció (EMT). Ennek során a sejtek átalakítják belső szerkezetüket. Pl. a normális epithel sejtekre jellemző keratin 8 és 18 mellett megjelenik a keratin 7 és 19 expressziója, vagy más, a sejtek plaszticitását megváltoztató gének kifejeződése. Mivel a TMEM27 struktúrfehérje a proximális tubulus polarizált epithelének a funkciójához elengedhetetlen, ennek elvesztése az EMT-n átesett magas malignitású tumorokban érthető. Bár nem függ össze közvetlenül a daganat progresszióval, egy megbízható marker a posztoperatív daganatspecifikus túlélés előrejelzésére felismeréskor klinikailag szervre lokalizált konvencionális veserákban szenvedő betegeknél.

Összefoglalva, az *SAA1*, *MMP12* és *TMEM27* gének kitűnő biomarkerként használhatók, amelyek alkalmasak a posztoperatív daganatspecifikus túlélés előrejelzésére felismeréskor klinikailag szervre lokalizált konvencionális veserákban szenvedő betegeknél. Az immunhisztokémiai vizsgálat megbízható és alacsony költségű módszer. A további munka során igazolt markerekkel a jövőben használhatóak lesznek a progresszió előrejelzésére önmagukban, vagy egymással, ill. más biomarkerekkel és klinikai változókkal kombinálva egy integrált prognosztikai rendszer részeként. Az így létrehozott új integrált prognosztikai rendszer prediktív képességének értékeléséhez természetesen belső és külső validálás is szükséges. Az új prognosztikai rendszerrel azonosított magas rizikójú esetek fokozott intenzitású ellenőrzése biztosíthatná a relapszus korai felismerését, ezáltal lehetővé téve a további sebészi kezelés (lokális recidíva műtéti eltávolítása, metasztázis műtéti eltávolítása) elvégzését és a target terápia elindítását még a beteg általános állapotának leromlása előtt. A rizikóhoz adaptált nyomonkövetés feltehetően fokozná a másodlagos kezelés hatékonyságát, ezáltal túlélési előnyt biztosítva az érintett betegeknél.

7. KÖZLEMÉNYEK

7.1. A értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

Andras Javorhazy, Nelli Farkas, Tamas Beothe, Csaba Pusztai, Arpad Szanto, Gyula Kovacs. Lack of TMEM27 expression is associated with postoperative progression of clinically localized conventional renal cell carcinoma.

J Cancer Res Clin Oncol 2016;142:1947-1953.

IF: 3.14

Gyula Kovacs, Nina Kaerger Billfeldt, Nelli Farkas, Timea Dergez, **Andras Javorhazy**, Daniel Banyai, Csaba Pusztai, Arpad Szanto. Cytoplasmic expression of β -catenin is an independent predictor of progression of conventional renal cell carcinoma: a simple immunostaining score.

Histopathology 2017;70:273-280.

IF: 3.42

Andras Javorhazy A, Nelli Farkas N, Laszlo Farkas, Arpad Szanto, Gyula Kovacs. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 12 expression in conventional renal cell carcinoma.

Oncol Letters (in press)

IF: 1.55

7.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Buzogány I., Magyarlaki T., **Jávorházy A.**, Sükösd F. A HLA-class I és HLA-class II expresszió veserák szövetben. Magyar Urológia, XVII. Évfolyam, 3.szám (2005) 137-143.

2. Pusztai Cs., Bagheri F., **Jávorházy A.**, Bányai D., Farkas L. Korai hilus ellátás bal oldali laparoszkópos radikális nephrectomia során. Magyar Urológia, XX. Évfolyam, 2.szám (2008) 64-68.

3. Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaki T, Pal J, Banati M, **Javorhazy A**, Szekeres-Bartho J, Szereday L, Illes Z. Invariant Valpha7.2-Jalpha33 TCR is expressed in human kidney and brain tumors indicating infiltration by mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. Int Immunol. 2008 Dec;20(12):1517-25. **IF: 3.181**

4. Magyari L, Kovesdi E, Sarlos P, **Javorhazy A**, Sumegi K, Melegh B. Interleukin and interleukin receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases susceptibility. World J Gastroenterol. 2014 Mar 28;20(12):3208-22. **IF: 2.369**

5. Sarlos P, Kovesdi E, Magyari L, Banfai Z, Szabo A, **Javorhazy A**, Melegh B. Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature. World J Gastrointest Pathophysiol. 2014 Aug 15;5(3):304-21.

6. Magyari L, Varszegi D, Kovesdi E, Sarlos P, Farago B, **Javorhazy A**, Sumegi K, Banfai Z, Melegh B. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications. World J Orthop. 2014 Sep 18;5(4):516-36.

7. Pusztai Cs., Bányai D., **Jávorházy A.**, Kenyeres B., Sarlós D.P., Szántó Á. Laparoszkópos parciális nephrectomia a technikailag komplex vesetumorok sebészi ellátásában. Magyar Urológia, XXVII. Évfolyam, 4.szám (2015) 148-153.

8. Tamas A, **Javorhazy A**, Reglodi D, Sarlos DP, Banyai D, Semjen D, Nemeth J, Lelesz B, Fulop DB, Szanto Z. Examination of PACAP-Like Immunoreactivity in Urogenital Tumor Samples. J Mol Neurosci. 2016 Jun;59(2):177-83. **IF: 2.352**

7.3. Posztterek

1. **Jávorházy A.**, Buzogány I., Magyarlaki T., Farkas L. A mellékhatások kezelésének lehetőségei vesesejtes rák biokemoterápia esetén MUT XII. Kongresszusa, Szeged, 2003.09.11-13.
2. Buzogány I., Magyarlaki T., **Jávorházy A.**, Farkas L. A veserák biokemoterápiája (subcutan IL-2 + IFN + iv. 5-FU) MUT XII. Kongresszusa, Szeged, 2003.09.11-13.
3. Buzogány I., Magyarlaki T., **Jávorházy A.**, Farkas L. Áttétes vesedaganatok immuno- és kemoimmunoterápiájának indikációja és eredményei MUT XII. Kongresszusa, Szeged, 2003.09.11-13.
4. **Jávorházy A.**, Bagheri F., Pusztai Cs., Farkas L. Iuxtaglomeruláris sejtes vesetumor : irodalmi áttekintés és műtéti kezelés Magyar Urológia 18:(3) p. 183. (2006) MUT XIII. Kongresszusa, Siófok, 2006.11.02-04.
5. Buzogány I., Bagheri F., Süle N., Magyarlaki T., Kalmár Nagy K., Farkas L., **Jávorházy A.** Transzplantált vese karcinoszarkómája MUT XIII. Kongresszusa, Siófok, 2006.11.02-04.
6. **Jávorházy A.**, Bagheri F., Pusztai C., Bányai D., Farkas L. Laparoscopic varicocelectomy: Outcomes of 300 cases of laparoscopic mass ligation compared with 100 cases of open Palomo European Urology Meetings 2007;2(7):135
7. **Jávorházy A.**, Fábos Z., Farkas L.M. Nitinol stents in the treatment of recurrent urethral strictures: Experience in 26 patients European Urology Meetings 2008 EAU 8th Central European Meeting, 24-25 Oct. 2008, Warsaw, Poland
8. Pusztai Cs, Bagheri F., Bányai D., **Jávorházy A.**, Farkas L.M. Early Renal Pedicle Control in Left Sided Laparoscopic Radical Nephrectomy European Urology Meetings 2008 EAU 8th Central European Meeting, 24-25 Oct. 2008, Warsaw, Poland
9. Bagheri F., Pusztai Cs., Szántó Á., Fábos Z., Beöthe T., **Jávorházy A.**, Bányai D., Farkas L.M Laparoscopic Nephron Sparing Surgery: Impact of resected volume on renal function European Urology Meetings 2008 EAU 8th Central European Meeting, 24-25 Oct. 2008, Warsaw, Poland
10. **Jávorházy A.**, Fábos Z., Farkas L.M. Management of complications after nitinol intraurethral stent implantation European Urology Supplements, Volume 9, Issue 6, September 2010, Page 626 **IF: 2.139**
11. Pusztai C., Benko T., Bagheri F., Bányai D., **Jávorházy A.**, Farkas L.M. Possible role of the PADUA score in selecting patients with small renal mass for laparoscopic or open partial nephrectomy European Urology Supplements, Volume 11, Issue 4, October 2012, Page 113 **IF: 2.162**
12. Tamas A, **Jávorházy A.**, Csanaky K, , Ragnhildstveit E, Vikjord SA, Sarlos PD, Sarszegi Zs, Zapf I, Szanto Z, Faludi B, Molnar T, Nemeth J, Banki E, Lelesz B, Reman Gy, Reglodi D Examination of PACAP-like immunoreactivity in different pathological clinical samples The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides 27-31 August Pécs, Hungary

7.4 Kongresszusi előadások

1. Buzogány I., **Jávorházy A.**, Magyarlaki T., Farkas L. A vesesejtes rák és az uraemiás állapot Magyar Nephrológus Társaság XVIII. Kongresszusa, Siófok, 2002.09.15-17.
2. **Jávorházy A.**, Pytel Á., Farkas L. Advantage of extra anatomical nephro-vesical stent 6th Congress of the Central European Association of Urology Debrecen, 9th-11th September 2004
3. Szántó Á., **Jávorházy A.** Szempontok a BPH konzervatív kezeléséhez V. Huth Tivadar Urológus Napok, Pécs, 2005.06.23-24.

4. Bagheri F., Pusztai Cs., Buzogány I., **Jávorházy A.**, Farkas L. Laparoszko­pos parciális nephrectomia: kezdeti tapasztalataink és eredményeink Magyar Urológia 18:(3) p. 150. (2006) MUT XIII. Kongresszusa, Siófok, 2006.11.02-04.
5. Pusztai Cs., Bagheri F., Farkas L., Szántó Á., **Jávorházy A.**, Laparoszko­ppal asszisztált nephro-ureterectomia MUT XIII. Kongresszusa, Siófok, 2006.11.02-04.
6. Buzogány I., Magyarlaki T., Nagy J., **Jávorházy A.**, Hunyady A., Zóber T. A pVHL a tumor szuprimáló fehérje, mint lehetséges target terápia alapja MUT XIII. Kongresszusa, Siófok, 2006.11.02-04.
7. **Jávorházy A.**, Fábos Z., Damásdi M., Farkas L. Nitinol húgycsősztent implantációt követően észlelt szövőd­mények kezelése Magyar Urológia 22:(3) p. 122. (2010)
8. Péterfi L., Pusztai Cs., Bányai D., **Jávorházy A.**, Farkas L. A „tapasztalati pontszám” (XP), mint a laparoszko­pos gyakorlat egyik lehetséges mutója Magyar Urológia 22:(3) p. 154. (2010)
9. Pusztai Cs., Bányai D., Bagheri F., **Jávorházy A.**, Farkas L. Endophyticus vesedaganatok laparoszko­pos rezekciója Magyar Urológia 22:(3) p. 133-134. (2010)
10. Pusztai Cs., Bányai D., Benkő T., **Jávorházy A.**, Farkas L. Posztkemoterápiás laparoszko­pos retroperitoneális lymphadenectomia Magyar Urológia 22:(3) p. 132. (2010)
11. **Jávorházy A.**, Pusztai Cs., Balló A., Horváth B., Farkas L. Chronicus myeloproliferatív betegség talaján kialakult spontán subcapsularis haematoma szervmeg­tartó műtéti kezelése oxidált cellulóz háló alkalmazásával MUT XVII. Kongresszusa 2012.10.18-20. Szeged
12. **Jávorházy A.**, Pusztai Cs., Bányai D., Balló A., Kenyeres B., Farkas L. Laparoszko­pos ureterocutaneostomia MUT XIX. Kongresszusa 2014.10.16-18. Siófok
13. Bányai D., Pusztai Cs., **Jávorházy A.**, Koppán M., Farkas L., Szántó Á. A mélyen infiltráló endometriosis minimál invazív kezelése multidiszciplináris együttműködésben a Pécsi Tudományegyetemen MUT XIX. Kongresszusa 2014.10.16-18. Siófok
14. Bányai D., Pusztai Cs., **Jávorházy A.**, Szántó Á. Vesedaganat terhességben – Esetbemutatás MUT XX. Kongresszusa 2015.11.05-07. Budapest
15. **Jávorházy A.**, Farkas N., Beöthe T., Pusztai Cs., Szántó Á., Kovács Gy. TMEM27 expresszió: új prognosztikai faktor szerve lokalizált konvencionális típusú veserákban MUT XXI. Kongresszusa 2016.10.27-29. Debrecen

Összegzés:

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények impakt faktora:	8.11	
Kumulatív impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül):		16.012
Idézhető absztraktok impakt faktora:		4.301

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkát a PTE KK Urológiai Klinikán végeztem. Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kovács Gyula professzor úrnak, hogy a lehetővé tette a téma kutatásába történő bekapcsolódásomat, tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította. Sokat köszönhetek társ –témavezetőmnek, az Urológiai Klinika korábbi igazgatójának, Dr. Farkas László professzor úrnak, aki elindított a klinikai pályán és azóta is folyamatosan biztat és támogat. Hálával tartozom az Urológiai Klinika igazgatójának, Dr. Szántó Árpád tanár úrnak, mert lehetővé tette, hogy betegellátási és oktatási feladataim mellett a kutatómunkára is tudjak időt szakítani.

Köszönettel tartozom a Heidelbergi Egyetem Molekuláris Onkológiai Labor munkatársainak az előzetes vizsgálatok elvégzéséért és az eredmények átengedéséért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Pajor László professzor úrnak és Dr. Semjén Dávidnak a munka során felhasznált vese tumorok paraffin blokkjainak átengedéséért illetve egyes patológiai paraméterek közléséért. Külön köszönet illeti a Pathológiai Intézet munkatársait, Halas Zsuzsannát és Szilágyi Imréné Juditot a metszetek elkészítéséért.

Köszönet minden társszerzőnek, hogy munkájukkal, javaslataikkal hozzájárultak az eredmények közléséhez. Külön köszönettel tartozom Kissné Török Anikónak a nyomkövetési adatok összegyűjtése során nyújtott segítségéért.

Ezúton is szeretném megköszönni a Magyar Urológus Társaságnak a munkám elvégzéséhez nyújtott anyagi támogatását.

Végezetül köszönöm családom megértő türelmét és támogatását, hogy szeretetükkel biztosították számomra a nyugodt háttérrel.