Az urachus carcinoma molekuláris hátterének vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Módos Orsolya

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők:
Dr. Nyirády Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Szarvas Tibor, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók:
Dr. Bödör Csaba, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Ács Nándor, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kiss András, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

2 BEVEZETÉS 6

2.1 Az urachus kialakulása és visszafejlődése 6

2.2 Az urachus carcinoma epidemiológiája 7

2.3 Az urachus carcinoma patológiája 7

2.4 Az urachus carcinoma stádiumbeosztása 8

2.5 Az urachus carcinoma prognosztikája 10

2.6 Az urachus carcinoma tünetei 10

2.7 Az urachus carcinoma diagnosztikája 11

2.8 Az urachus carcinoma diagnosztikus kritériumai 12

2.9 Az urachus carcinoma kezelése 14

2.9.1 Sebészi kezelési lehetőségek 14

2.9.2 Kemoterápiás kezelési lehetőségek 15

2.9.3 Célzott terápiás kezelési lehetőségek 16

2.10 Az urachus carcinoma molekuláris háttere 19

2.10.1 Az urachus carcinoma szérum markerei 19

2.10.2 Az urachus carcinoma immunhisztokémiai markerei 20

3 CÉLKITŰZÉSEK 22

4 MÓDSZEREK 23

4.1 Irodalomkutatás 23

4.2 Az EGFR-jelátviteli útvonal mutáció analízise 23

4.2.1 Mintagyűjtés ... 23

4.2.2 DNS izolálás ... 24

4.2.3 PCR reakció és piroszekvenálás ... 24

4.2.4 A pirogram kiértékelése: ... 28

4.2.5 Statisztikai kiértékelés ... 29

4.2.6 A különböző tumorentitások mutációs mintázatának összehasonlítása ... 29

4.3 Az UrC immunhisztokémiai vizsgálata ... 30

4.3.1 Mintagyűjtés ... 30

4.3.2 Immunhisztokémia ... 30

4.3.3 Statisztikai kiértékelés ... 31

5 EREDMÉNYEK ... 33

5.1 Az irodalomkutatás eredményei ... 33

5.1.1 Az urachus carcinomás betegek klinikai paraméterei és diagnosztikája . 33

5.1.2 Az urachus carcinoma patológiai paraméterei ... 33

5.1.3 Az urachus carcinoma prognosztikus tényezői ... 35

5.1.4 Az urachus carcinoma sebészi kezelése ... 39

5.1.5 Az urachus carcinoma kemoterápiás kezelése ... 40

5.2 Az EGFR jelátviteli útvonal mutációinak vizsgálata ... 42

5.2.1 Vizsgált minták ... 42

5.2.2 Az UrC-ás betegek követési és túlélési karakterisztikája ... 43

5.2.3 Az EGFR jelátviteli útvonal mutációinak gyakorisága ... 43

5.2.4 A mutációk jelenléte valamint a betegek klinikopatológiai adatai és túlélése közötti összefüggés 44

5.2.1 A különböző tumorentitások mutációs mintázatainak összehasonlítása .. 44

5.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok 49

5.3.1 Vizsgált minták 49

5.3.2 A betegek követési és túlélési adatai 49

5.3.3 Hisztopatológiai eredmények 49

5.3.4 Az immunhisztokémiai eredmények összefüggése a klinikopatológiai adatokkal 51

5.3.5 Az immunhisztokémiai eredmények összefüggése a túlélési adatokkal ... 52

6 MEGBESZÉLÉS 53

7 KÖVETKEZTETÉSEK 64

8 ÖSSZEFOGLALÁS 65

9 SUMMARY 66

10 IRODALOMJEGYZÉK 67

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 75

11.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények 75

11.2 Egyéb témában megjelent közlemények 75

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 76

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-FU	5-fluorouracil
ADC	adenocarcinoma
AFP	alfa-foetoprotein
BGN	biglikán
CA 15-3	cancer antigén 15-3
CA 19-9	cancer antigén 19-9
CA 125	cancer antigén 125
CEA	carcino-embrionális antigén
CK 7	citokeratin 7
CK 20	citokeratin 20
CRC	colorectális
CT	computer tomográfia
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
IMP3	inzulinszerű növekedési faktor II, mRNS-kötő fehérje 3
IVU	intravénás urográfia
LDH	laktát dehidrogenáz
MMP-7	mátrix metalloproteináz-7
MR	mágneses rezonancia
MSI	mikroszatellita instabilitás
NSE	neuronspecifikus enoláz
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PET	pozitron emissziós topográfia
PIK3CA	foszfoinozitid-3-kináz
RHAMM	hialuronsav receptor (receptor for hyaluronic acid-mediated motility)
TCC	transitiocelluláris carcinoma
TUR	transzuretrális reszekció
UH	ultrahang
UrC	urachus carcinoma

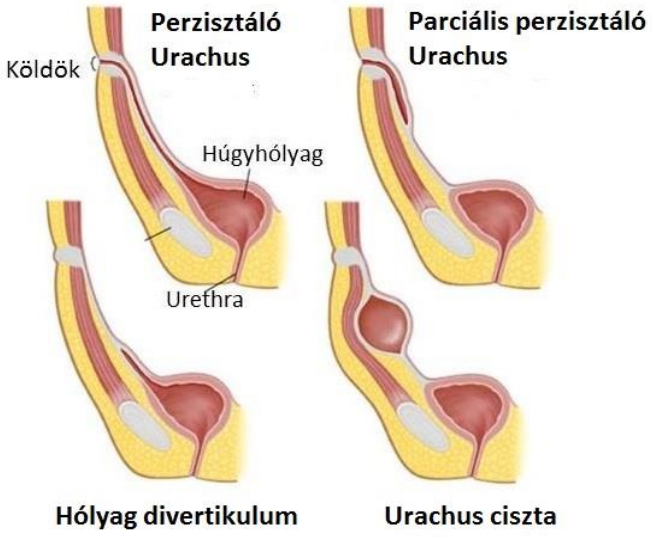
2 BEVEZETÉS

2.1 Az urachus kialakulása és visszafejlődése

Az urachus a sinus urogenitalis fejlődési maradványa, mely a magzati élet során a köldököt köti össze a húgyhólyag kupolájával. Kialakulása az embrionális fejlődés 3-7. hetében kezdődik, amikor a cloaca egy elülső sinus urogentialis-ra és egy hátulsó canalis analis-ra osztódik. A sinus urogenitalis felső része a 4-5. hónap során lesüllyed a kismedencébe magával húzva egy tubuláris köteget, az urachust. Az urachus a magzat fő kiválasztó szerve, mely a nitrogenózus vegyületeket távolítja el húgyhólyagból. Ez a képlet a magzati fejlődés során fokozatos kötőszövetesedés eredményeként a ligamentum umbilicale medianum-má alakul, melynek feladata a felnőtteknél a húgyhólyag rögzítése a köldökhöz. A ligamentum umbilicale medianum a hólyag detrusor izmának összehúzódásakor a hólyag tartalmának kiürítését is segíti [1, 2].

A felnőttek mintegy harmadában az urachus kötőszövetes degradációja tökéletlenül megy végbe, ilyenkor az úgynevezett urachus-maradvány marad vissza, melyben az eredeti/magzati szöveti struktúra megtartott. Ennek néhány jellegzetes formája a perzisztáló urachus (ilyenkor az urachus csatorna lumene megmarad, a hólyaggal és/vagy a köldökkel kommunikál), a hólyag divertikulum (mely esetén a ligamentum umbilicale medianum alsó, a hólyaggal összeköttetésben álló része nyitva marad), vagy az urachus ciszta (amikor is az urachus egy felsőbb szakasza nem kötőszövetesedik el, hanem folyadék tartalmú üreget képezve kiöblösödik) (1. ábra) [3].

Az urachus fejlődéstanáról, anatómiájáról és szövettani szerkezetéről szóló első részletes leírás 1930-ból Begg tollából származik [1]. Az urachus bármely szövettani rétegéből kiinduló daganatot urachus daganatnak (UrC) nevezzük. Az UrC a ligamentum umbilicale medianum mentén vagy intramurálisan terjedve elsősorban a húgyhólyagot involválja, így eleinte főleg vizelési panaszokat okoz, mellyel a betegek legtöbbször urológushoz fordulnak. Nem árt azonban szem előtt tartani azt a tényt, hogy bár az UrC-át – gyakori húgyhólyag lokalizációja miatt – a hólyagdaganatok közé soroljuk, fejlődéstani eredete miatt az UrC a vastagbélrendszerrel áll közelebbi rokonsági fokban.



1. ábra: Az urachus maradány néhány jellegzetes formája

(forrás: http://www.medbullets.com/step1-embryology/3008/umbilical-cord-and-remnants)

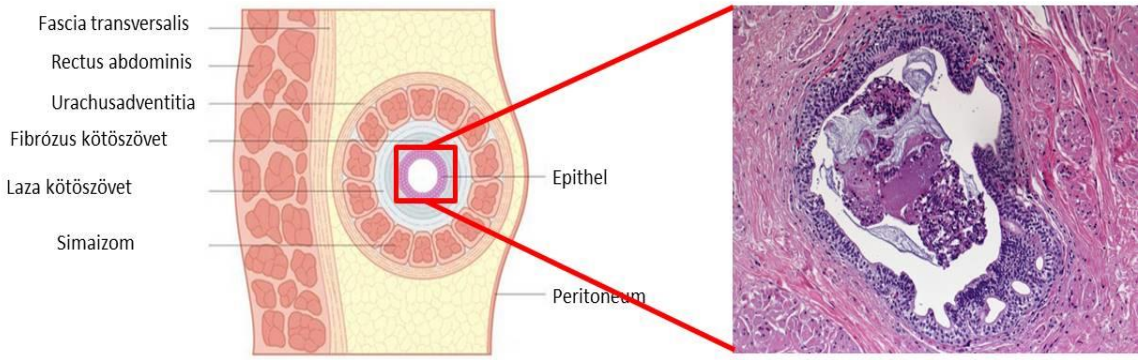
2.2 Az urachus carcinoma epidemiológiája

Az UrC egy rendkívül ritka malignus betegség, melynek incidenciája 1:5.000.000 [4]. A húgyhólyagdaganatoknak mindössze 0,2-0,7%-át, a hólyag adenocarcinomáinak 10-35%-át, a gyermekkori daganatoknak pedig 0,01%-át teszi ki [5-8]. Szemben a húgyhólyag urothelsejtes daganatával, mely elsősorban a 60 év feletti korosztályt érinti [9], az UrC-t leggyakrabban az 50 év körüli korban diagnosztizálják[10], bár néhány esettanulmány beszámol négy [11] és hét [12] hónapos korban történő megjelenéséről is. Előfordulásának nemek szerinti eloszlása egyenlőtlen, a férfiak körében 1,4-szer gyakrabban alakul ki, mint a nőknél [5]. (Érdekes, hogy amíg a húgyhólyag urothelsejtes carcinomája szintén gyakoribb a férfiaknál, addig ezzel ellentétben a húgyhólyag primer adenocarcinomái (ADC) gyakrabban fordulnak elő nőknél [13].) Az UrC rizikófaktorai egyelőre ismeretlenek.

2.3 Az urachus carcinoma patológiája

Az esetleges elégtelen kötőszövetesedés következtében fennmaradt urachus csatornát a húgyhólyagra is jellemző több rétegű urothelium béleli, mely alól azonban a húgyhólyag szövettani szerkezetére jellemző bazális membrán hiányzik. Az urotheliumot körül ölelő kötőszöveti rétegben kisebb vér- és nyirokerek futnak, kívülről

pedig egy körkörös simaizom réteg övezi, mely a musculus detrusos vesicae folytatása (2. ábra) [1]. Az UrC az urachus bármely szövetrétegének bármely sejttípusából kiindulhat, emiatt szövettani megjelenése is változatos lehet. Az UrC leggyakoribb, az esetek több, mint 90%-ában előforduló szövettani formája az adenocarcinoma (ADC).



2. ábra: Az urachus csatorna szövettani szerkezete

(forrás: [14])

Az UrC kialakulásának pathomechanizmusa egyelőre nem tisztázott. Egyes feltevések szerint ennek hátterében az urachus urotheliumának fokális glanduláris metapláziája áll, mely az intesztinális típusú daganatoknak kialakulásához vezet [13]. Egy másik elképzelés szerint a fejlődés során a cloaca-ból visszamaradt enterális sejtek (melyek migrációja az epigasztriumba elmaradt) képezik az UrC-ADC-jának talaját [1, 15, 16]. Ezzel összhangban több tanulmány is igazolta az intesztinális-típusú daganatokra jellemző Goblet sejtek jelenlétét [1, 7, 13, 17]..

Az UrC-ADC szövettani megjelenése rendkívül változatos. A leggyakoribb enterális típusú ADC-án kívül előfordul mucinózus illetve pecsétgyűrű sejtes mintázat is. Az ún. nonglanduláris UrC-ák előfordulási aránya kevesebb, mint 10%. Ide tartoznak a már említett urothélsejtes carcinóma, a sarcoma, valamint a kissejtes, a squamosus sejtes valamint a neuro-endokrin tumorok [15, 17].

2.4 Az urachus carcinoma stádiumbeosztása

Az UrC helyes terápiájának megválasztásához, továbbá a klinikai kimenetel előre jelzéséhez elengedhetetlen támpontot nyújt a daganat stádiumbeosztása. A klinikai

gyakorlatban több stádiumrendszer is ismert, melyek közül az ún. Sheldon- [8] illetve a Mayo-féle [18] stádiumbeosztást használják a leggyakrabban (1. táblázat). Az UrC első stádiumbeosztását Sheldon fogalmazta meg 1984-ben. Sheldon beosztása szerint az I stádiumcsoportba kerülnek azok a betegek, akik daganata az urachus mucosájára korlátozódik. A II stádium eseteinél a daganat a submucosa rétegét is érinti, de nem terjed túl az urachus csatornán. A III stádiumban az UrC ráterjed a húgyhólyagra és/vagy az elülső hasfalra, a peritoneumra vagy a hólyagon kívüli más parenchymás szervekre. A IV stádiumban az UrC metasztázist ad a nyirokcsomókba, esetleg távolabbi szervekbe is.

1. táblázat: Az urachus carcinoma stádiumbesorolása

Sheldon-stage [8]	Leírás
Stage I	A tumor urachalis mucosára korlátozódik
Stage II	A tumor magára az urachusra korlátozódik, a submucosa rétegeit involválja
Stage IIIA	A tumor kiterjed a húgyhólyagra
Stage IIIB	A tumor eléri a hasfalat
Stage IIIC	A tumor kiterjed a peritoneumra
Stage IIID	A tumor a húgyhólyagon kívül más parenchymás szervet is érint
Stage IVA	Metasztázis a nyirokcsomókba
Stage IVB	Metasztázis a távoli szervekbe

Mayo-stage [18]	Leírás
Stage I	A tumor az urachust és/vagy a húgyhólyagot érinti
Stage II	A tumor eléri az urachus és/vagy a húgyhólyag izomrétegét
Stage III	A tumor infiltrálja a környéki nyirokcsomókat
Stage IV	A tumor infiltrálja a távoli nyirokcsomókat vagy más szerveket

A Sheldon-féle stádiumbesorolással szembeni leggyakoribb kritika, hogy annak alkalmazása során a betegek különböző stádiumok közötti eloszlása túlságosan egyenetlen, hisz a legtöbb beteg a diagnózis felállításkor a III stádiumba kerül. Ezzel szemben a Molina által javasolt ún. Mayo-féle stádium rendszer egy egyszerűbb besorolását tesz lehetővé, melyben a betegek egyes stádiumcsoportok közötti eloszlása egyenletesebb [15]. A Mayo I stádiumban a tumor az urachusra és/vagy a húgyhólyagra lokalizálódik, II stádiumban a tumor az izomréteget is infiltrálja. A III stádiumban a

regionális nyirokcsomók, a IV stádiumban a távolabbi nyirokcsomók és/vagy szervek is érintettek.

A húgyhólyagdaganatok esetében alkalmazott TNM stádiumbeosztás UrC-ában nem használható, mivel az UrC a húgyhólyagra kívülről terjed. További kevésbé ismert és alkalmazott módszer az Ontario-stádiumrendszer [19].

2.5 Az urachus carcinoma prognosztikája

Az UrC prognózisa általában kedvezőtlen, melynek legfőbb oka, hogy az első tünetek többnyire későn jelentkeznek, amikor a daganat már a húgyhólyagot is infiltrálja. Irodalmi adatok szerint az öt éves túlélési arány 50% körüli [5, 16, 18, 20], míg a tíz éves túlélés a 30%-ot sem éri el [5, 21, 22]. Az UrC, a húgyhólyag urothelsejtes és primer ADC túlélésének összehasonlításával idáig mindössze néhány publikáció foglakozott [20, 23], és érdekes módon azt találták, hogy az UrC túlélése a rossz prognózisa ellenére is kedvezőbbnek tűnik a másik két tumorentitás hasonló invazivitású tumorainál. Az UrC-ákat azonban többnyire késői stádiumban diagnosztizálják, ennek köszönhető összességében rosszabb túlélésük.

A klinikai kimenetel megjóslására többnyire csupán néhány, kisebb esetszámot felölelő retrospektív vizsgálat érhető el. Ezek közül magasabb esetszámával kitűnik Bruins retrospektív, regiszter alapú kutatása, melyben 152 beteg klinikai adatainak vizsgálatakor a Sheldon-stádiumot, a daganat a differenciáltsági fokát, a nyirokcsomó érintettséget, a távoli metasztázisok jelenlétét valamint a pozitív sebészi szél jelenlétét igazolta prognosztikus faktorként [5]. Eredményeit Kim és munkatársai is megerősítették, valamint további prognosztikus faktorként a Mayo-stádiumot és az öt centiméter feletti tumor méretet azonosították [24].

2.6 Az urachus carcinoma tünetei

Az urachus rejtett anatómiai elhelyezkedésének köszönhetően az UrC sokáig tünetmentes marad, ezért a betegek általában csak akkor fordulnak orvoshoz, amikor a daganat már előrehaladott stádiumot ért el. A tumor növekedése során jellemzően először a Retzius-térbe terjed [1], s ilyenkor egy bizonyos méret meghaladásával az elülső hasfalon keresztül tapinthatóvá válhat, valamint vizelési nehézségeket és

fájdalmat okozhat. A későbbiekben jellemzően a húgyhólyag falát involválja és a hólyag lumenébe is betör, melynek következtében a leggyakoribb kezdeti tünetként ismert mikroszkópos vagy makroszkópos haematuria alakul ki [8, 16]. Minthogy az urachus a hólyag kupoláját a köldökkel köti össze, így jellemző, de kevésbé gyakori tünet lehet a köldök körüli fájdalom és a köldökön keresztül vér, vizelet vagy mucus ürülése is [16]. UrC ritkább tünetei közé a mucosuria, a bacteruria, a pollakisuria, a pyuria, valamint az általános daganatos tünetek úgy, mint hirtelen testsúly csökkenés, láz, hányinger és hányás tartoznak [15]. A daganat nagysága felfedezésekor átlagosan négy centiméter [25], bár az irodalom olykor akár húsz centimétert is elérő tumorokról is beszámol [26, 27].

2.7 Az urachus carcinoma diagnosztikája

Az anamnézis felvétele és a fizikális vizsgálat után következő diagnosztikai lépés a hólyagtükrözés. Ennek segítségével leggyakrabban a hólyag kupolájában vagy az elülső hólyagfalon lehet felfedezni az UrC-t, mely megjelenhet széles alapú ulceratív elváltozásként, de az intramurális terjedés során akár az is előfordulhat, hogy a korai stádiumú daganatot még normál mucosa fedi, ezért a tükrözés során láthatatlan marad [17]. Ilyenkor az alhasra nyomást gyakorolva mucus ürülést provokálhatunk, mely felfedi a daganat rejtett lokalizációját [10]. A cisztoszkópia az UrC-ás esetek körülbelül 80%-ában ad pozitív eredményt [25]. A következő lépés a tumorból történő mintavétel, melyet rendszerint transzuretrális reszekcióval (TUR) végeznek.

Az ultrahang (UH) kép jellemzően inhomogén és szabálytalan tömeget mutat a húgyhólyag felett rendszerint a középvonalban. Ahogy a mucinózus colorectalis ADC-ák, úgy az UrC is gyakran termel mucint és mutat kalcifikációt, mely megjelenhet az UH-on kőjelként és hangárnyékot is vethet [28]. A computer tomográfia (CT) illetve a mágneses rezonancia (MR) vizsgálatok az UH-kép eredményeit rendszerint megerősítik, ezen felül információt nyújtanak a lokális kiterjedésről valamint a nyirokcsomó és a távoli áttétek jelenlétéről. A karakterisztikus CT-képet a hypodens mucin-öblök jelentik, a daganat perifériáján pedig patognómikus jelként pontszerűen vagy körkörösen kalcifikáció jelenhet meg [29]. A mucin jelenléte esetén a T2-súlyozott MR-képen látható legerősebben az UrC jele [29]. További képalkotó eljárás a pozitron

emissziós topográfia (PET) melyet a CT-képpel kombinálva kaphatjuk meg a legpontosabb információt az UrC stádiumáról, mielőtt műtétre kerülne sor [10]. A távoli áttétek feltérképezése céljából a teljes kivizsgáláshoz hozzá tartozik a mellkas ábrázolása röntgen vagy CT kép segítségével.

Mivel az UrC kívülről terjed a húgyhólyagra, a vizelet citológia csak abban az esetben lehet pozitív, amikor a daganat már betört a hólyag lumenébe, így diagnosztikus eszközként kevéssé használható, legfeljebb a daganat után követésére, kiegészítő eljárásként. Összességében elmondható, hogy minden urachus elváltozás esetén - függetlenül annak malignus vagy benignus voltától - műtéti eltávolítás ajánlott azzal a céllal, hogy egy esetleges UrC-át mindenképp eltávolítsunk.

2.8 Az urachus carcinoma diagnosztikus kritériumai

Az UrC diagnózisának felállítása esetenként bizonytalan lehet, melynek fő oka a colorectalis carcinomától (CRC) valamint a húgyhólyag primer ADC-áitól történő nehéz elkülöníthetőség. Ezért az UrC diagnózisának egyik feltétele e két tumorentitás kizárása, ami viszont csakis a klinikai és patológiai leletek együttes figyelembe vételével lehetséges. Az UrC diagnózisának felállítására több kritérium rendszer is létezik, azonban ezidáig nem született megegyezés arról, hogy melyik rendszer a legalkalmasabb. A leggyakrabban használt kritérium rendszereket a 2. táblázat foglalja össze. Elsőként Wheeler és Hill [30] 1954-ben írta le az UrC diagnózisának feltételeit, de azt a túlzott szigorúsága miatt 1984-ben Sheldon [8] átdolgozta.

Más szerzők a Sheldon-féle kritérium rendszert is túlságosan szigorúnak tartották és rámutattak arra, hogy Sheldon kritériumai a gyakorlatban alkalmazva az UrC-ák egy részét tévesen kizárják a diagnózisból [18]. Ezért Gopalan [13] egy egyszerűbb diagnosztikus rendszert javasolt (2. táblázat).

Herr [6] fogalmazta meg a legkevésbé szigorú kritériumokat. Ő az UrC diagnózisához elegendőnek látta a szövettanilag igazolt ADC-ának a hólyag kupolájában való lokalizációját, bár egy későbbi tanulmány a kupolában elhelyezkedő adenocarcinómákat csak 34%-ban igazolta UrC-aként, rámutatva a Herr féle kritériumrendszer alkalmatlanságára [13].

A Sheldon-féle kritérium rendszert a későbbiekben is érték kritikák, mivel az figyelmen kívül hagyta, hogy az UrC az urachus teljes hosszában és annak bármely szakaszából kiindulhat és így nem feltétlenül terjed a hólyagra [33]. Ezen felül az

2. táblázat: Az urachus carcinoma diagnosztikai kritériumrendszerei

Sheldon (1984) [8]	Herr (2007) [6]	Gopalan (2009) [13]	Anderson Cancer Center (2012) [16]
A tumor a hólyag kupolájában helyezkedik el	Az ADC a hólyag kupolájában helyezkedik el	A tumor a hólyag kupolájában vagy az elülső falán helyezkedik el	A tumor a hólyag kupolájában vagy a hólyagfal középvonalában található
Cystitis cystica / glandularis jelenléte kizárható		A tumor centruma a húgyhólyag falában van	A tumor és a húgyhólyag epitheliumának felszínét vékony demarkációs vonal választja el
A tumor a hólyag mélyebb izomrétegébe betör		Cystitis cystica / glandularis jelenléte kizárható	A szövettan ADC-át igazol
A tumor és a húgyhólyag epitheliumának felszínét vékony demarkációs vonal választja el		Egyéb primer tumor jelenléte kizárható	A szövettan az urothel sejtes metapláziát vagy az átmeneti sejtek hiányát igazolja
Az urachus maradvány fellelhető			A cystitis cystica / glandularis átmenete a tumorba kizárható
A tumor a hólyag elülső falára, a Retzius-térbe vagy a köldökre terjed			Egyéb primer ADC kizárható
A húgyhólyagon kívül egyéb primer tumor jelenléte kizárható			

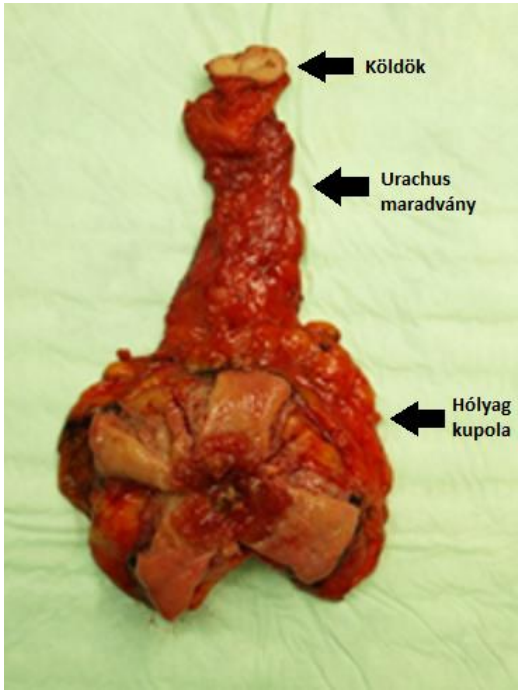
urachus maradvány megtalálása sokszor nehézségekbe ütközik (például azért, mert a tumor a teljes UrC maradványt benövi) [31]. Továbbá a Sheldon-féle rendszerben az UrC-t kizáró tényezőként használt cystitis cystica és a cystitis glandularis az UrC-val együttesen is előfordulhat [32]. E kritikákat szem előtt tartva a texasi MD Anderson Cancer Center munkatársai [16] egy gyakorlatiasabb kritérium rendszert dolgoztak ki (2. táblázat).

A fent említett kritériumok mind az UrC-ADC-ákra vonatkoznak, de nem alkalmazhatóak a nem-ADC típusú UrC-ákra. Ezért Paner [33] felállított egy új kritérium rendszert a jóval ritkább típusú nem-ADC UrC-ák diagnosztizálásához:

2.9 Az urachus carcinoma kezelése

2.9.1 Sebészi kezelési lehetőségek

Az UrC lokális eseteiben elsődlegesen a sebészi terápia választandó, mely napjainkig az egyedüli kuratív kezelés. A leggyakrabban alkalmazott műtét a parciális cystectoma, mely a húgyhólyag érintett részén túl magába foglalja a ligamentum umbilicale medianum és a köldök *en-bloc* eltávolítását is (3. ábra). A radikális cystectomia – tehát a húgyhólyag teljes eltávolítása - csak abban az esetben indikált, ha nem lehet elegendő egészséges húgyhólyag maradványt megtartani ahhoz, hogy abból vizelettárolót alakítsunk ki [34]. A parciális cystectomia azért élvez előnyt a radikális cystectomiával szemben, mert az onkológiai kimenetel azonos mindkét műtéti eljárás esetén, de a parciális cystectomia jobb életminőséget és kisebb szövődmény rátát kínál [5, 22, 25, 35]. A daganat szóródásának veszélye miatt (akár egy mucinózus cysta ruptúrájával) a nyitott sebészet preferált a laparoszkópos eljárásokkal szemben [36, 37]. Szintén fontos, hogy a sebészi szélek negatívak legyenek, mivel annak pozitivitása bizonyítottan összefügg a daganat relapszusával [8, 22, 25].



3. ábra: Parciális cystectomia műtéti preparátuma

(forrás: Duisburg-Esseni Egyetem, Németország. Operatőr: Christian Niedworok)

A nyirokcsomóeltávolítás hatása a daganat specifikus túlélésre máig tisztázatlan [5, 38]. Bár a metasztatikus-UrC-ák esetén elsősorban a szisztémás kezelés javasolt, a szoliter vagy kis volumenű, sebészileg elérhető metasztázisok műtéti eltávolítása kedvező hatással lehet az onkológiai kimenetelre [6, 39]. A metasztázisok tipikusan a tüdőt, a csontokat, a bélrendszert, az agyat és a májat érintik [18].

Amennyiben a műtét utáni rizikófaktorok negatívnak bizonyulnak, az UrC műtét utáni hosszú távú túlélése körülbelül 50% [34]. A pozitív sebészi szél [6, 25, 35], a köldök valamint a ligamentum umbilicale medianum eltávolításának elmaradása [25, 35], a peritoneum [5, 18, 25, 35] illetve a nyirokcsomók daganat általi beszűrtsége [5, 6, 18, 25, 35] mind összefüggésben állnak a kedvezőtlen prognózissal. Ha a fent említett rizikófaktorok bármelyike is pozitív, a kiújulás esélye 75% fölé nő [34], ami elég magas ahhoz, hogy az adjuváns terápia megkezdése indokolt legyen.

2.9.2 Kemoterápiás kezelési lehetőségek

A betegség késői felfedezéséből adódóan az UrC-ás betegek 20-30%-át metasztatizált betegséggel diagnosztizálják. Ebben a stádiumban a korai kiújulás valószínűsége meghaladja a 30%-ot [15]. Ilyenkor hatékony sugárkezelés hiányában egyedüli lehetőségként a szisztémás terápia kínálkozik. Az UrC ritka előfordulásából adódóan nagy esetszámot felölelő klinikai tanulmányok nem állnak rendelkezésünkre, ezért a kemoterápiára vonatkozó irányelvek sem fogalmazódtak meg. Ennek következménye, hogy az UrC kezelése általában egyéni döntések alapján, rendkívül heterogén módon történik. A klinikusok egy része a húgyhólyag érintettsége miatt a hólyag urothel sejtes daganatában is használatos ciszplatin alapú kemoterápiát választja. Ezzel összhangban Molina számolt be hat betegénél az MVAC (metotrexát, vinblasztin, doxorubicin és ciszplatin) kezeléssel elért pozitív eredményeiről [18]. Hasonlóan bíztató eredményeket mutatott fel Galsky, akinek hat betege közül négy stabil betegséggel egy pedig parciális válasszal reagált a ciszplatin-alapú kemoterápiás kezelésre [40]. A klinikusok másik része az urachus és a colorectalis rendszer közös fejlődéstani kiindulópontja valamint az UrC-ának a CRC-ához való klinikai és szövettani hasonlósága miatt a vastagbél tumorok esetén használt 5-fluorouracil (5-FU) alapú kezeléseket részesíti előnyben. Logothetis már 1985-ben kezelt doxorubicin, mitomycin-C és 5-FU (DMF) kombinációjával UrC betegeket, s bár a nyolc betegből öt

teljes vagy parciális választ adott, egy esetben pedig a betegség stabil maradt, a gyakorlatban mégsem terjedt el e kezelés alkalmazása annak gyakori és súlyos mellékhatásai miatt [41]. Egy frissebb tanulmány szintén az 5-FU alapú kezelések hatékonyságát igazolja, ahol a négy UrC páciens 50%-os válaszadási arányt mutatott [42]. Ígéretes eredményeket publikált Siefker-Radtke, amikor hat UrC beteg kombinált 5-FU-ciszplatin alapú kemoterápiás kezelésekor 30-40% közötti radiológiai válasz jelentkezett [35]. Egy másik kombinált kezelés, az IFEP (ifoszfamid, 5-FU, etoposzid és ciszplatin) használatával Tatokoro négyből három betegénél ért el teljes vagy parciális választ [43]. A szakirodalom esetenként egyéb, nem ciszplatin vagy 5-FU alapú kemoterápiák használatáról is beszámol (paclitaxel, [35], taxán származékok, gemcitabin vagy irinotecan [42]), melyeknek eredményei általában kevesebb sikerrel járnak.

Látható, hogy az UrC kemoterápiás kezelése rendkívül változatos, és annak egységesítésére még nem született konszenzus. A metasztatikus UrC-ák 5 éves túlélése kevesebb, mint 20%, ami rámutat kemoterápiás kezelés jelenleg gyenge hatékonyságára [5, 25]. A fent leírt adatok igen kis, többnyire tíz alatti esetszámú vizsgálatokból származnak, melyek még a legegyszerűbb statisztikai kiértékelést sem teszik lehetővé. Ezért láttuk szükségesnek az összes elérhető irodalmi adat szisztematikus összegzésével metaanalízist végezni.

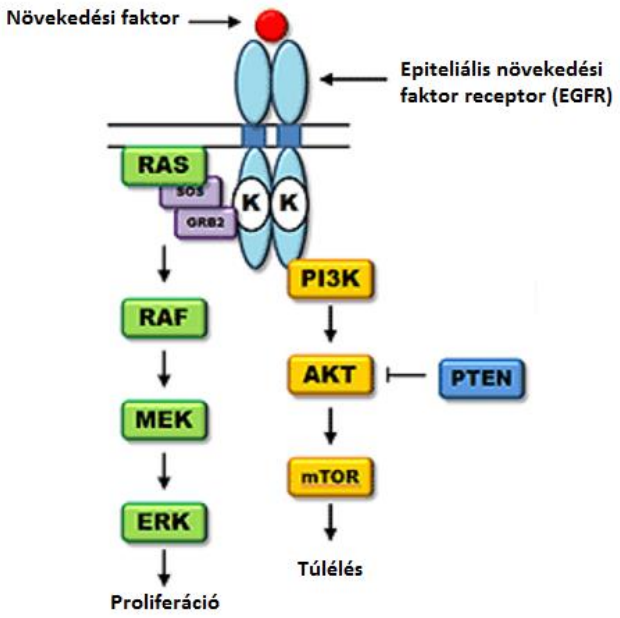
2.9.3 Célzott terápiás kezelési lehetőségek

Az UrC prognózisa a különböző kemoterápiás kezelések használata ellenére is rendkívül rossz, ami hatékonyabb kezelési lehetőségek kidolgozását sürgeti. Mivel az UrC szisztémás kezelésére vonatkozó terápiás irányelvek hiányoznak, ezért a daganat genetikai hátterének feltérképezése során azonosított eltérések korrigálására bevetett célzott kezelések ígéretes alternatívát nyújthatnak az előrehaladott stádiumú UrC-ás betegek kezelésére. Az UrC célzott kezelésével kapcsolatban eddig csupán négy publikáció jelent meg [44-47].

Hisztológiai- és immunfenotípusát valamint molekuláris hátterét tekintve az UrC igen sok hasonlóságot mutat a CRC-ához. Ebből kiindulva elsősorban azon célzott terápiás szerek alkalmazása tűnik indokoltnak, melyeket CRC-ában sikerrel

alkalmaznak. Ilyen az anti-EGFR terápia, mely a CRC esetében másodvonalbeli standard kezelésnek számít.

E terápia tervezése során az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR – epidermal growth factor receptor) intracelluláris szakaszának mutációi a terápiás döntéshozatalt merően befolyásolják. Az EGFR jelátviteli útvonal aktivációja a növekedési faktorok (ligandok) az EGFR extracelluláris részéhez való kötődésével valósul meg, mely a receptor intracelluláris részének heterodimerizációját eredményezi. Az EGFR így aktiválódó intracelluláris doménje tirozin-kináz aktivitásán keresztül foszforilálja és ezáltal beindítja az EGFR-jelátviteli útból kiinduló további három fő szignálutat: a RAS-RAF-MAPK, a PI3AK-AKT és a JAK-STAT szignálutakat, melyek a sejtek proliferációját, növekedését és túlélését serkentik (4. ábra). Az EGFR szignálút alsóbb szintjein bekövetkező ún. aktiváló mutációk kialakulása ligand bekötődése nélkül is a szignálút aktiválódását eredményezi, mely a sejtek fokozott proliferációjához, növekedéséhez és túléléséhez valamint daganatos elfajulásához vezethet. E mutációk leggyakrabban az EGFR gén 18-21 exonját, a KRAS gén 2-4 exonját, a BRAF gént, az NRAS gén 2-4 exonját és a PIK3CA gén 9-es és 20-as exonját érintik, klinikai jelentőségük pedig az EGFR-inhibitor kezelés hatékonyságának predikciójában rejlik.



4. ábra: *Az EGFR jelátviteli út*

(forrás: http://www.institut-oncologie-thoracique.com/archives/mutation/quest-ce-que-akt1)

Az EGFR-inhibitorok az EGFR gátlásán keresztül elérhetik, hogy a daganat osztódásának és növekedésének üteme lassuljon, azonban ha az EGFR-szignálút egy lejjebb elhelyezkedő tagja aktiváló mutációt szenved (pl. KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA), akkor az EGFR-inhibitorok már nem képesek kikapcsolni a mutáció által aktivált jelátviteli útvonalat. Így tehát míg az EGFR gén mutációi, valamint amplifikációja pozitív prediktora az anti-EGFR terápiának, addig a szignálút lejjebb elhelyezkedő tagjainak aktiváló mutációi az EGFR-inhibitor kezelést kontraindikálják.

Az UrC anti-EGFR kezelésével kapcsolatban eddig két esettanulmány jelent meg. Az egyik egy metasztatikus UrC-ában szenvedő fiatal beteg esetét írta le, akinél többvonalbeli kemoterápiás kezelés is kudarcot vallott. A beteg primer tumorszövetét teljes exom szekvenálásnak vetették alá, mely EGFR amplifikációt és vad típusú KRAS gént azonosított, ami egyértelmű indikációt jelent az EGFR-inhibitor kezelésre. A CRC-ában is használatos anti-EGFR (cetuximab) terápiával e betegnél nyolc hónapon át tartó parciális regressziót sikerült elérni [44].

Egy korábbi fázis 1-es klinikai vizsgálat során Goss és munkatársai egy másik EGFR-gátló, a gefitinib hatékonyságát 28 beteg 7 különböző szolid daganatnál hasonlította össze. A vizsgálatba bevont huszonnyolc beteg közül a legerősebb terápiás választ a vizsgálatba bevont egyetlen UrC-ás beteg adta. Az UrC mérete 55%-os csökkenést mutatott, ezen felül a kezelés előtt és után vett tumor biopsziák összehasonlító vizsgálata a Ki67 proliferációs index szignifikáns csökkenését mutatta, sejtszinten is alátámasztva az anti-EGFR terápia hatékonyságát [45].

Egy további esetleírás egy multikináz inhibitor a sunitinib UrC-ában történt alkalmazásáról számol be [47]. Ennek során egy terminális állapotban lévő fiatal női beteg esetén a sunitinib alkalmazása a daganat részleges visszafejlődéséhez vezetett, melyet a beteg alhasi fájdalmának jelentős csökkenése kísért. A kezelést végül mellékhatásként metrorrhagia miatt kellett elhagyni. Egy további beszámoló két UrC-ás beteg tirozin-kináz gátlókkal történő kezelésének eredményeit írja le. Az egyik beteget sorafenib, trametinib és sunitinib terápia kombinációjával sikerült ideiglenesen stabilizálni, melyet a későbbiekben a késleltetett sebgyógyulás miatt függesztettek fel. A másik UrC-ás beteg esetén a molekuláris genetikai vizsgálat a KRAS, a GNAS és a TP53 gének érintettségét igazolta. A KRAS és GNAS mutáció miatt trametinib terápiát

alkalmaztak, de azt idejekorán el kellett hagyni a súlyos fulladásos mellékhatás miatt, így a trametinibre adott terápiás válasz ez esetben ismeretlen maradt [46].

A célzott terápia időzítése fontos kérdés, mivel a kemoterápia hatására a daganat mutáció státusza folyamatosan változik [48-50]. A citosztatikus kezelés hatására egyre inkább kiszelektálódnak azok a genetikai mutációt hordozó tumorsejtek, melyek idővel a többi sejtet túlnőve kialakítják a kemoterápiarezisztens daganatot. Ezek alapján a mutációs státusz meghatározására a kemoterápiás kezelés után vett minta megfelelőbbnek tűnik, mint az első diagnóziskor vett kemoterápia naív tumor szövet. Nem szabad azonban megfeledkezni a daganat heterogenitásról sem, ezért számolni kell azzal a veszéllyel, hogy a bioptátumból történő analízis során egyes, a daganatban potenciálisan jelenlévő mutációk azonosítatlanok maradhatnak [51].

2.10 Az urachus carcinoma molekuláris háttere

2.10.1 Az urachus carcinoma szérum markerei

Az UrC különböző daganatokkal való szövettani hasonlósága miatt elsősorban a többi tumorentitásnál jól ismert szérum markereket érdemes monitorozni. Az emésztőszervi daganatoknál gyakran vizsgált carcino-embrionális antigén (CEA), a petefészekrákoknál ismert cancer antigén 125 (CA 125) és az elsősorban hasnyálmirigyrákoknál megemelkedő ún. cancer antigén 19-9 (CA 19-9) Siefker-Radtke [35] tanulmányában az UrC betegeknél 40-60%-ban mutatott emelkedett szérum szintet. A CRC szérum markereinek UrC-ában történő emelkedéséről más publikációk is tanúskodnak [38, 52]. Az UrC ritkább típusát képező laphámrákok esetén a squamosus cell carcinoma antigén (SCC) szérumszintjeinek vizsgálata bizonyult eredményesnek a betegség követésére [52]. Szintén informatív lehet a szekunder máj áttéteket is jelezni képes laktát-dehidrogenáz (LDH) [52, 53], az emlőrákok esetén vizsgált cancer antigén 15-3 (CA 15-3) [47, 54, 55] és a máj- és csírasejtes daganatokra jellemző alfa-foetoprotein (AFP) [20, 55-58] mérése. A legfiatalabbakat érintő UrC-ák is produkálhatnak megnövekedett biomarker szinteket: egy hét hónapos csecsemőnél az urachus yolk sac tumorát az azzal gyakran együtt járó AFP szint megemelkedése által fedezték fel [12], míg egy hat hónapos csecsemőnél az urachus neuroblastomáját

diagnosztizálták melyet a neuronspecifikus enoláz (NSE) magas szérum szintje kísért [59].

A kemoterápiás kezelés hatására a tumormarkerek szérumszintjei gyakran csökkenéssel reagálnak, így a kezelésre adott válasz monitorozhatóvá válik [16]. Ezzel összhangban Siefker-Radtke a citosztatikus kezelést követően öt UrC betegnél mutatta ki a szérum CEA-szint csökkenését [35].

A tumormarkerek meghatározása a diagnózis felállításában ritkán nyújt támpontot, ám a daganat eltávolítását követően szérumszintjük jellemzően drasztikusan leesik, ezért folyamatos monitorozásukkal a tumor lokális kiújulása vagy a távoli metasztázisok megjelenése idejekorán jelezhető.

2.10.2 Az urachus carcinoma immunhisztokémiai markerei

A húgyhólyagban felfedezett ADC urachális, primer húgyhólyag illetve szekunder, elsősorban vastagbél áttét eredetének elkülönítése egyelőre megoldatlan. A legfontosabb differenciáldiagnosztikai problémák, melyek döntően befolyásolják a terápiás döntéshozatalt az alábbiak szerint osztályozhatók:

1) Az UrC elkülönítése a CRC potenciális húgyhólyagot érintő inváziójától vagy metasztázisától. Ez azért is fontos, mert a CRC szekunder megjelenésének kizárása az UrC diagnózisának feltétele.

2) Az UrC elkülönítése a hólyag primer ADC-ától. E kérdés megválaszolása alapvetően fontos a terápia helyes megválasztása szempontjából, hiszen a két tumorentitás sebészi terápiája eltér egymástól; az UrC parciális, míg a primer hólyagdaganat radikális cystectomiával kezelendő.

3) Ismeretlen eredetű mucinózus ADC esetleges urachális eredetének igazolása. Az UrC gyakorta ad áttéteket, főleg a csontokba, a tüdőbe és a májba. Az UrC-ára specifikus biomarkerek felfedezése segíthet az ismeretlen eredetű mucinózus ADC-ák urachális eredetének igazolásában.

4) Az UrC inváziójának elkülönítése a primer petefészek daganatoktól. Az UrC szekunder megjelenése a petefészekben hasonló lehet a primer petefészek rákok megjelenéséhez.

Az UrC esetleges immunhisztokémiai markereinek kutatásáról csak szórványosan lelhetők fel publikációk, melyek elsősorban az ADC-ák esetén ismert leggyakoribb markerek, a citokeratin 7 (CK7), a CK20, a CDX2, a β-catenin és a CK-34βE12 expressziójával foglalkoznak.

Összességében elmondható, hogy az UrC a CRC-áktól és a hólyag primer ADC-áktól történő elkülönítése egyelőre megoldatlan. Az UrC immunhisztokémiai sajátságai napjainkig csupán csekély mértékben ismertek. Egyelőre annyit tudunk, hogy a CK20+, CK7+/-, a citoplazmatikus β-catenin és a CK-34βE12 diffúz expressziója felveti az adott ADC urachalis eredetét.

3 CÉLKITŰZÉSEK

1) Irodalomkutatáson alapuló vizsgálataink célja az volt, hogy aktuális és átfogó képet kapjunk az UrC klinikopatológiájáról, prognosztikájáról és kezeléséről, ezért - az esettanulmányok kivételével - az irodalomban fellelhető összes UrC-ával foglalkozó publikációt összegyűjtöttük és a közölt adatok felhasználásával több, mint 1000 UrC beteg adatain metaanalízist végeztünk.

2) Célul tűztük ki, hogy egy nemzetközi kooperáció életre hívásával a lehető legnagyobb számú UrC szövetmintát és klinikai adatot gyűjtsük össze. A vizsgálatok lezárultáig 5 egyetemi klinikáról (Budapest, Essen, Krakkó, Rennes, Vancouver) összesen 31 UrC beteg klinikai adatait és paraffinba ágyazott szövetmintáit gyűjtöttük össze. Laboratóriumi vizsgálataink egyik része az UrC genetikai hátterének feltérképezésére irányult. Ehhez a CRC-ában gyakran mutálódott gének; a KRAS, az NRAS, a BRAF, valamint az EGFR és a PIK3CA mutációs forrópontjait analizáltuk.

   Összefüggéseket kerestünk a mutációk jelenléte és a betegek klinikopatológiai adatai (Sheldon-stádium, Mayo-stádium, malignitás, nyirokcsomó áttét jelenléte, kalcifikáció jelenléte és pecsétgyűrűsejtes fenotípus) között. Ezen kívül vizsgáltuk a mutációk jelenléte és a betegek túlélése közötti esetleges összefüggéseket.

3) További célunk volt, hogy eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve összehasonlítsuk az UrC mutációs profilját a CRC, az urothel sejtes carcinoma és a hólyag primer ADC mutációs mintázatával.

4) Az UrC molekuláris hátterének további feltérképezése céljából immunhisztokémiai vizsgálattal 15 UrC mintán elemeztük az urothel sejtes carcinomában valamint a CRC-ában ismert prognosztikus markerek, a RHAMM, BGN, MMP-7, IMP3, TP53 valamint a Ki67 szöveti expressziójának prognosztikus értékét.

4 MÓDSZEREK

4.1 Irodalomkutatás

Az adatgyűjtés során szisztematikus PubMed keresést végeztünk az alábbi keresőszavak használatával: „urachal cancer” és „urachal carcinoma”, s az így fellelhető összes publikációt összegyűjtöttük a 2015-ös év novemberével bezárólag. A keresésünk az esettanulmányok kizárása után összesen 29 tanulmányt eredményezett, melyek közül további ötöt zártunk ki; hármat a kifogásolható beteg kiválasztási kritériumok, kettőt pedig nem angol nyelvű publikálás miatt. Így összesen 25 tanulmányt válogattunk be vizsgálatunkba, melyek együttesen 1010 UrC-ás beteg adatait dolgozták fel. Ezek közül két publikáció tumorregiszter alapú vizsgálatot közölt, további 23 pedig egy-egy intézet eseteit dolgozta fel. Az UrC prognosztikai faktorainak vizsgálata során statisztikai megfontolásból csak azokat a publikációkat vettük figyelembe, melyek legalább 20 beteg adatait dolgozták fel. Azokat a tanulmányokat, melyek betegeiket egy határozott vizsgálat szempontjából célzottan választották ki (például a kemoterápiára fókuszáló tanulmányok többnyire az előrehaladott állapotú, metasztázissal rendelkező betegeket gyűjtötték össze), csak azon paraméterek vizsgálatára válogattuk be, melyek analízisére az adott tanulmányt tervezték.

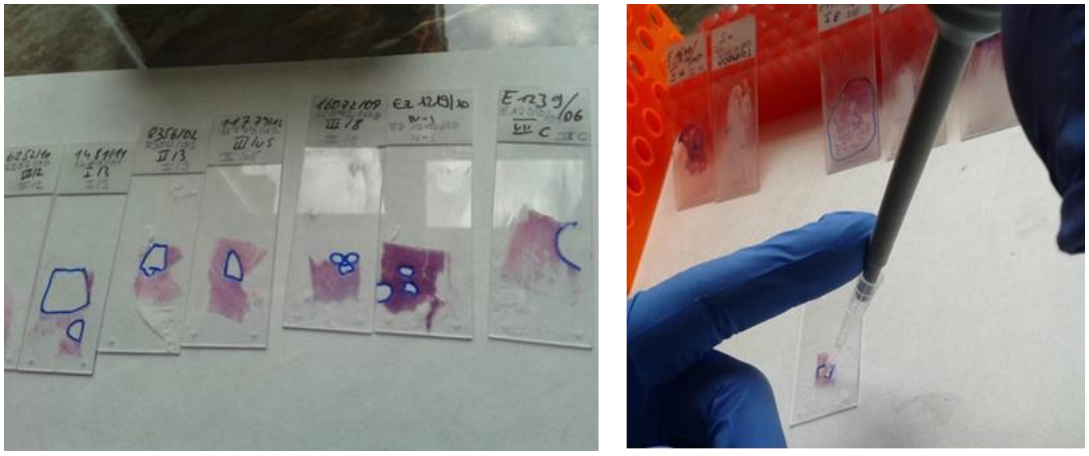
4.2 Az EGFR-jelátviteli útvonal mutáció analízise

4.2.1 Mintagyűjtés

Az UrC ritka megjelenése miatt nagyobb számú minta összegyűjtése csakis több intézmény összefogásával lehetséges. Egy nemzetközi kooperáció eredményeként 31 formalinnal fixált, paraffinba ágyazott UrC szöveti blokkot gyűjtöttünk össze öt különböző egyetemi klinikáról. A Semmelweis Egyetemről 5 UrC-ás beteg paraffinba ágyazott szövetmintáját gyűjtöttük össze, míg a németországi Duisburg-Esseni Egyetem 11, a lengyel Jagelló Egyetem 3, a francia Rennes-i Egyetem 4, a kanadai Vancouveri Prosztatarák Centrum pedig 8 beteg mintáit bocsájtotta rendelkezésünkre. A beválogatási kritériumok között szerepelt a tumornak az urachus fisztulára és/vagy a húgyhólyag kupolájára való lokalizációja, az ADC jelenlétének szövettani megerősítése. Kizáró tényező volt azonban a CRC jelenléte.

4.2.2 DNS izolálás

A blokkokból 4 µm vastagságú natív metszetek készültek, melyeken hematoxilin-eozin festést követően patológus jelölte be a tumoros szöveti részeket. A metszetekről a fedőlemezt egy 24 órás, xilolban történő áztatás során leúsztattuk, majd a bejelölt tumoros szöveteket makrodisszekcióval leemésztettük, különösen figyelve arra, hogy a tumoros részek ne kontaminálódjanak normál szövettel (5. ábra). A daganat DNS-ének izolálását és tisztítását az erre a célra kifejlesztett kittel végeztük (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Mannheim, Németország) követve a gyártó által a termék leírásában tett utasításokat. Az így izolált DNS koncentrációját NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 készülékkel mértük meg (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, Amerikai Egyesül Államok).



5. ábra: Makrodisszekció

(forrás: saját anyag)

4.2.3 PCR reakció és piroszekvenálás

A DNS felsokszorosítása polimeráz lánc reakcióval (polymerase chain reaction – PCR) történt, mely során a KRAS gén 2, 3 és 4-es exonját, az NRAS gén 2, 3 és 4-es exonját, a BRAF gént, az EGFR gén 18, 19, 20 és 21-es exonját, valamint a PIK3CA gén 9 és 20-as exonját amplifikáltuk az Applied Biosystems Veriti™ 96 well Thermal Cycler készülékével (Applied Biosystems, Foster City, Amerikai Egyesült Államok). A PCR kondíciókat a 3.táblázat foglalja össze.

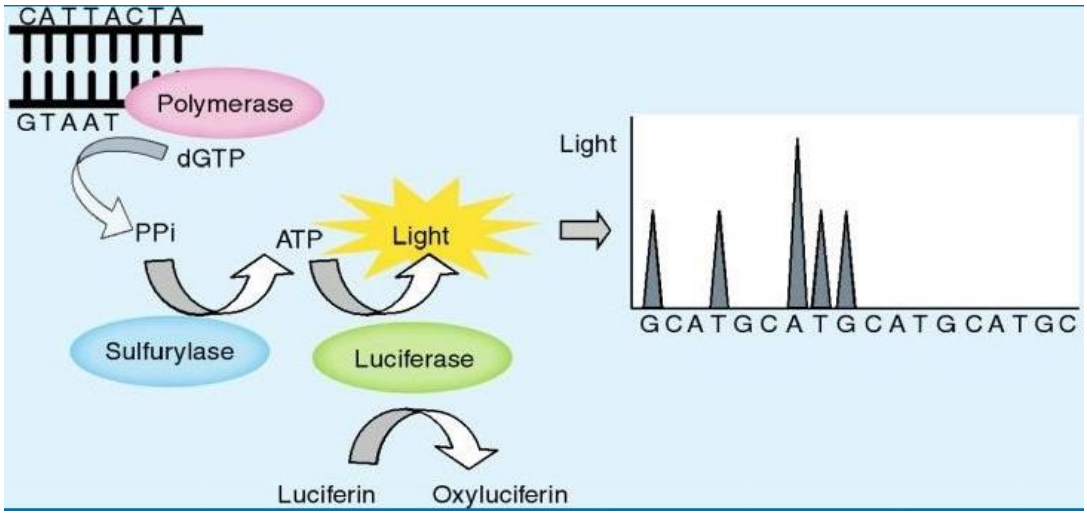
3. Táblázat: PCR reakciók kondíciói

Gének és exonok	KRAS exon 2			KRAS exon 3,4;			NRAS exon 2,3,4		
	Hő (°C)	Idő		Hő (°C)	Idő		Hő (°C)	Idő	
Kezdeti denaturálás	95	12 perc		95	10 perc		95	10 perc	
Ciklus	95	10 sec	42x	95	30 sec	40x	95	30 sec	40x
	55	20 sec		58	30 sec		58	30 sec	
	72	20 sec		72	30 sec		72	30 sec	
Meghosszabbítás	72	5 perc		72	5 perc		72	5 perc	
Tárolás	4			4			4		
Gének és exonok	**BRAF**			**EGFR**			**PIK3CA**		
	Hő (°C)	Idő		Hő (°C)	Idő		Hő (°C)	Idő	
Kezdeti denaturálás	95	12 perc		95	15 perc		95	10 perc	
Ciklus	95	10 sec	40x	95	20 sec	40x	95	30 sec	40x
	55	20 sec		53	30 sec		52	30 sec	
	72	30 sec		72	20 sec		72	20 sec	
Meghosszabbítás				72	5 perc		72	5perc	
Tárolás	10			4			4		

A PCR termékek szekvenálását Pyromark Q24 analyzer gépen végeztük PyroMark Q24 Software 2.0. használatával (Qiagen, Hilden, Németország). A szekvenálás során a KRAS gén 12, 13, 59, 61 és 146-os kodonját, az NRAS gén 12, 13, 59, 61, 117 és 146-os kodonját, a BRAF gén 600-as kodonját, az EGFR gén 719, 744-750, 768, 790 és 858-861 kodonját, valamint a PIK3CA gén 542, 545 és 1047-es kodonját vizsgáltuk. A primer szekvenciákat az 4. táblázat foglalja össze. Minden mutáció jelenlétét egy ismételt PCR reakcióval és piroszekvenálással erősítettük meg.

A piroszekvenálás az újgenerációs szekvenálás egy formája, ahol az egyes nukleotid bázisok beépülését fényfelvillanás jelzi. A PCR reakcióban keletkezett egyszálú DNS templátról a piroszekvenálás során komplementer szálat szintetizálunk a nukleotidok egyesével történő adagolásával. A komplementer nukleotid beépülésével pirofoszfát keletkezik (a módszer erről kapta a nevét), amit egy luciferáz nevű kemolumineszcens enzim hasít el fényfelvillanás kíséretében (6. ábra). Ha olyan nukleotidot adunk a reakcióhoz, amely a komplementaritás hiánya miatt nem tud beépülni, akkor nem detektálunk fényjelenséget. Kemolumineszcencia tehát csak a komplementer bázis beépülésekor jön létre, a kamera pedig az egyes felvillanásokat

detektálja. A piroszekvenálás előnye, hogy a mutációt külön csúcs jelzi, így az adott mutációról mennyiségi információ is nyerhető. Piroszekvenálás során először a DNS templátot egy streptavidin-tartalmú mix segítségével polisztirén gyöngyök felületére rögzítjük (szilárdfázisú piroszekvenálás). A PCR minta hígítása biztosítja, hogy egy gyöngyhöz általában csak egy DNS-fragmens kötődjön. Ezt követően a gyöngyöket olaj/víz emulzióhoz adjuk, ahol egy vízcseppben egy gyöngy fér el, majd az erre kialakított egység (PyroMark Q24 Vacuum Workstation; Qiagen, Hilden, Németország) felületén a gyöngyöket egy olyan speciális plate-re visszük fel (PyroMark Q24 plate), melynek reakció csöveibe előzetesen a megfelelő primereket bemértük, s melynek felszíne milliónyi nanométeres mélyedést tartalmaz, amiben egy-egy gyöngy fér el. A plate-et két percen keresztül 80 ^{o}C-os felületen melegítjük (ekkor történik az anelláció, a primereknek a DNS templáthoz való tapadása), majd öt percig szobahőmérsékleten hűtjük. Ezt követően a plate-et behelyezzük a PyroMark Q24 analyzer gépbe. A készülék ezután egyesével adagolja a reakcióhoz a nukleotidokat, továbbá hozzáadja a DNS-polimerázt (mely a komplementer szál szintézisét végzi), az ATP-szulfurilázt (mely a nukleotid beépülésekor felszabaduló pirofoszfátot ATP-vé szintetizálja), az adenozin-5'-foszfoszulfátot (mely az ATP-szulfuriláz szubsztrátja), az apirázt (mely a nukleotidok és az ATP lebontásáért felel), a luciferázt (mely fényfelvillanással hasítja az ATP-t) és a luciferint (mely szintén szubsztrátja a luciferáz enzimnek). Végül minden egyes fényfelvillanást a száloptika a detektorhoz vezeti.



6. ábra: A piroszekvenálás mechanizmusa

(forrás: http://www.suggest-keywords.com/cHlyb3NlcXVlbmNpbmcgY29zdA)

4. táblázat: A piroszekvenáláshoz használt primerek

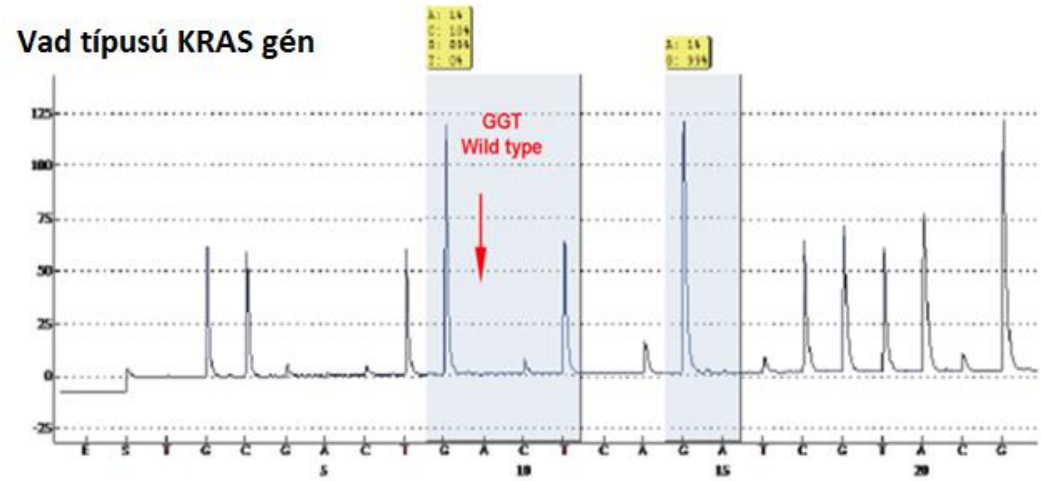
Név	Szekvencia (5'-3')	Kodon(ok)
KRAS exon2 forward	GGCCTGCTGAAAATGACTGA	12, 13
KRAS exon2 reverz*	AGCTGTATCGTCAAGGCACTCT	
KRAS exon2 szekvencia	AAACTTGTGGTAGTTGGA	
KRAS exon3 forward	CAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCA	59, 61
KRAS exon3 reverz*	GTCCTCATGTACTGGTCCCTCATT	
KRAS exon3 szekvencia	CCTGTCTCTTGGATATTCT	
KRAS exon4 forward	GGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTT	146
KRAS exon4 reverz*	ADCATAATTGAGAGAAAAACTGATA	
KRAS exon4 szekvencia	AATTCCTTTTATTGAAACAT	
NRAS exon2 forward	GGTGTGAAATGACTGAGTACAAACTGG	12, 13
NRAS exon2 reverz*	CATATTCATCTACAAAGTGGTTCTGGA	
NRAS exon2 szekvencia	CAAACTGGTGGTGGTTGGAG	
NRAS exon3 forward	GATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAGAT	59, 61
NRAS exon3 reverz*	GCAAATACACAGAGGAAAGCCTTCG	
NRAS exon3 szekvencia	CTGTTTGTTGGACATACTG	
NRAS exon4 forward	AGACTCGGATGATGTACCTATGG	146
NRAS exon4 reverz*	CCAGAGTTAATCAACTGATGCAAA	
NRAS exon4 szekvencia	TTCCATTCATTGAAACC	
NRAS exon4 szekvencia_2	TGGTGCTAGTGGAA	117
BRAF exon15 forward	TGAAGACCTCACAGTAAAAATTAGG	600
BRAF exon15 reverz*	TCCAGACAACTGTTCAAACTGAT	
BRAF exon15 szekvencia	TGATTTTGGTCTAGCTACA	
EGFR exon18 forward	GTTCTTGTCCCCCCCAGCTT	719
EGFR exon18 reverz*	GCCTGTGCCAGGGACCTTAC	
EGFR exon18 szekvencia	AAAAAGATCAAAGTGCTG	
EGFR exon19 forward	GCATGTGGCACCATCTCA	744-750
EGFR exon19 reverz*	AAAAGGTGGGCCTGAGGTTC	
EGFR exon19 szekvencia	TAAAATTCCCGTCGC	
EGFR exon20 forward	GCTTTTCCTCCATGAGTACGTATT	768
EGFR exon20 reverz*	CTTTGTGTTCCCGGACATAGTC	
EGFR exon20 szekvencia	AAGCCTACGTGATGGC	
EGFR exon20 szekvencia_2	ACCGTGCAGCTCATC	790
EGFR exon21 forward	TGTCCCTCACAGCAGGGTCTT	858-861
EGFR exon21 reverz*	GCCTCCTTCTGCATGGTATTCTT	
EGFR exon21 szekvencia	AGATCACAGATTTTGGG	
PIK3CA exon9 forward*	AACAGCTCAAAGCAATTTCTACACG	542,545
PIK3CA exon9 reverz	ACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTT	
PIK3CA exon9 szekvencia	TAGAAAATCTTTCTCCTGCT	
PIK3CA exon20 forward*	CAAGAGGCTTTGGAGTATTTCA	1047
PIK3CA exon20 reverz	CAATCCATTTTTGTTGTCCA	
PIK3CA exon20 szekvencia	GTTGTCCAGCCACCA	

∗ 5' biotinilált primer

4.2.4 A pirogram kiértékelése:

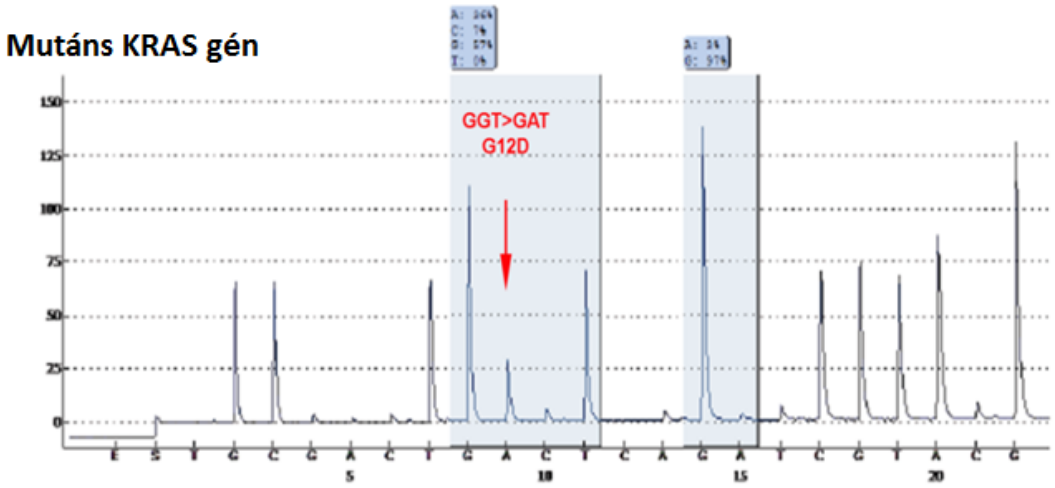
A piroszekvenálás során kapott pirogramok kiértékelését a PyroMark Q24 Software 2.0. verziójával végezzük. A pirogramon megjelenő csúcsok mindegyike egy-egy bázisnak a beépülését jelzi. A vizsgált gének bázissorrendjének megfelelően adagolt nukleotidok egy, az adott génre jellemző csúcs mintázatot rajzolnak ki, a csúcsoknak pedig mind a megjelenési helyét (x-tengely), mind pedig csúcsmagasságát (y-tengely) elemezzük. A normális, vad típusú mintára jellemző, hogy a csúcsok vagy egyenlő magasságúak, ha azonos nukleotidok ismétlődnek egymás után, úgy a csúcsmagasságok egymás egész számú többszörösét érik el (7. ábra – KRAS gén kettes exon vad típusának példája). A mutáns mintára jellemző, hogy nem várt helyen egy extra csúcs jelenik meg, melynek mérete megegyezik egy, a normális csúcs magasságának méretbeli veszteségével (8. ábra).

A pirogramról nemcsak a mutáció pontos helye, hanem annak százalékban megadott mértéke (mutációt tartalmazó sejtek aránya) is leolvasható, melyet a kiértékeléskor gondosan összevetünk az adott minta szövettani elemzésekor a patológus által megbecsült tumorszázalékkal.



7. ábra: Normál, vad típusú KRAS gén pirogramja

(forrás: saját anyag)



8. ábra: Mutáns KRAS gén pirogramja

A KRAS gén kettes exonján elhelyezkedő GGT>GAT mutáció esetében a G12D pozícióban a guanin helyett adenin épült be, így a piroszekvenálás során adenin adásakor megjelenő extra csúcs az előtte elhelyezkedő, a guanin adásakor megjelenő csúcs méretének az extra csúcs méretével megegyező csökkenését okozta.

(forrás: saját anyag)

4.2.5 Statisztikai kiértékelés

Eredményeinket a betegek klinikopatológiai adataival (Sheldon-stádium, Mayo-stádium, malignitási fok, nyirokcsomó áttét jelenléte, kalcifikáció és pecsétgyűrűsejtes fenotípus jelenléte) valamint progresszió-mentes és teljes túlélésével korreláltattuk. A mutációk jelenléte és a klinikopatológiai adatok közötti összefüggést χ^2-próbával vizsgáltuk. A túlélési adatokat elemzésekor a Cox univariancia analízist, valamint a Kaplan-Meier módszert és a log-rank tesztet alkalmaztuk. A statisztikai kiértékeléseket az SPSS version 20.0. szoftverrel (SPSS, Chicago, Amerikai Egyesült Államok) végeztük. A szignifikancia szintet $p<0.05$-re állítottuk be.

4.2.6 A különböző tumorentitások mutációs mintázatának összehasonlítása

Harmincegy UrC mintán határoztuk meg az EGFR-jelátviteli út mutációinak gyakoriságát, melyeket további, az UrC mutációira irányuló publikált adatokkal összegeztünk. Az így összegzett mutációgyakorisági adatokat a következő lépésben

összehasonlítottuk a CRC-ában valamint a hólyag urotheliális és primer ADC-ában publikált mutációgyakorisági adataival.

4.3 Az UrC immunhisztokémiai vizsgálata

4.3.1 Mintagyűjtés

E vizsgálat időben megelőzte a mutációanalízis elvégzését, amikor még csak 15 UrC beteg mintái álltak rendelkezésünkre. Magyarországról a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikájáról 5, míg az Essen-Duisburgi Egyetemről 10 UrC beteg mintáját vizsgáltuk.

4.3.2 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia a szövetek antigénjeinek kimutatását szolgáló specifikus immunológia módszer, mellyel a fehérjék szöveten és sejten belüli elhelyezkedését tesszük láthatóvá. Az eljárás *in situ* módon történik, vagyis az antigén jelenlétét megtartott szöveti környezetben tudjuk vizsgálni. Specificitását az antigén-antitest kötődés hivatott biztosítani. Az antitest gyártása során, a vizsgált antigént egy másik immunológiailag adaptív fajba (általában nyúl vagy egér oltják be, mely szervezetének az antigén idegen, így a vizsgált antigénre specifikus (elsődleges) antitestet termel. Az indirekt immunhisztokémia során a jelöletlen primer antitesthez egy enzimmel jelölt antitestet kapcsolunk, majd egy kromogén szubsztrátot hozzáadva az enzim aktivitásának következtében keletkező színes csapadék árulkodik a vizsgálandó antigén helyéről.

Vizsgálatunk során a formalinban fixált paraffinba ágyazott tumormintákból 4-5 μm vastagságú metszeteket készítettünk. A RHAMM, a BGN, az MMP-7 és az IMP3 ellenanyagokkal történő immunfestés első lépéseként az antigén feltárását magas hőmérséklet segítségével végeztük, ahol 20-25 percen át 95°C-os vízfürdőt és 6,2-es pH-jú citrát puffert használtunk. Az elsődleges ellenanyagok adatait az 5. táblázat foglalja össze. Az elsődleges ellenanyaggal való inkubálás 4 ^{o}C-on egy éjszakán át tartott, melyet másnap egy 5 perces blokkolás követett 3%-os hidrogén-peroxiddal. A másodlagos ellenanyagot egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, melyet az

inkubálás után háromszor öblítettünk. A detektáláshoz diamino-benzidint (DAB) használtunk. Fényképezéskor a Leica® DM2000 (Leica-Camera AG, Wetzlar, Németország) készülékkel legalább három reprezentatív szöveti részt fotóztunk le. Negatív kontroll az elsődleges ellenanyagok elhagyásával minden vizsgálat esetén készült.

5. táblázat: Az immunhisztokémiai kísérletek során használt ellenanyagok

Ellenanyag	Gyártó	Higítás
RHAMM	Amsbio®	1:100
BGN	Dr. Larry Fishertől kapott ellenanyag[72]	1:250
MMP-7	RnD Systems	1:600
IMP3	DakoCytomation	1:100

Az immunhisztokémiai eredmények kvantitatív és a kvalitatív analízisét két patológus végezte egymástól függetlenül, a klinikai és a követési adatok ismerete nélkül. A festés intenzitását a patológusok 0, 1, 2 vagy 3 ponttal értékelték attól függően, hogy a vizsgált minta az ellenanyaggal nem festődött, gyenge, közepes vagy erős festődést mutatott. A további szemikvantitatív kiértékeléshez a „H-score”-t alkalmaztuk, melyet az alábbiak szerint számoltunk ki: ha a minta 30%-a erősen, 20%-a közepesen 10%-a pedig gyengén festődött, akkor a minta 30 x 3 + 20 x 2 + 10 x 1 pontot kapott. Ez alapján egy minta maximálisan 300 pontot érhetett el.

A Ki67 és a p53 ellenanyagokkal az immunhisztokémiai festés automatizált módon történt a Dako Autostainer Plus System (DakoCytomation, Carpinteria, Amerikai Egyesült Államok) készülékével, melyhez az anti-egér IgG EnVision Plus detection kitet (DakoCytomation) használtuk. A reakció végtermékét diamino-benzidinnel (DAB) jelenítettük meg. Az értékelés a pozitív tumormagok százalékos becslésével történt, melyet szintén két patológus állapított meg egymástól függetlenül.

4.3.3 Statisztikai kiértékelés

Vizsgálatunk során a RHAMM, a BGN, az MMP-7, az IMP3, a TP53 valamint Ki67 szöveti expressziójának prognosztikus értékét a túlélés tekintetében vizsgáltuk. A

teljes és progresziómentes túlélés statisztikai analíziséhez a Cox-regressziót, valamint a Kaplan-Meier módszert és a log-rank tesztet alkalmaztuk. A statisztikai kiértékeléseket az SPSS szoftverrel (SPSS version 21, Chicago, Amerikai Egyesült Államok) végeztük. A szignifikancia szintet $p<0.05$-re állítottuk be.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Az irodalomkutatás eredményei

5.1.1 Az urachus carcinomás betegek klinikai paraméterei és diagnosztikája

Irodalomkutatásunkat követően összesen 1010 UrC-ás – 604 férfi (60%) és 406 nő (40%) – beteg adatait értékeltük.A férfi:nő arány 1,50:1, a medián életkor pedig 52 év volt (20-90 év). A leggyakoribb tünetek között a makroszkópos vagy mikroszkópos haematuria (394/540; 73%), az alhasi fájdalom (54/396; 14%), a dysuria (29/229; 13%) valamint a mucosuria (35/353; 10%) szerepelt. A tumor medián mérete (melyet a leghosszabb átmérő alapján határoztunk meg) 3,0 és 6,3 cm közötti értéket ért el. Cisztoszkópos vizsgálat elvégzéséről összesen 276 beteg esetében számoltak be, mely 245 esetben pozitív eredményt hozott (89%). Az ultrahangos vizsgálat 142 eset közül 45-nél írta le kalcifikáció jelenlétét (32%). A vizeletcitológia mindössze 29%-ban mutatott pozitivitást (30/102). A betegek tüneteivel valamint a diagnosztikus eljárásokkal kapcsolatos eredményeket a 6. táblázat foglalja össze.

5.1.2 Az urachus carcinoma patológiai paraméterei

A legtöbb tanulmányban az UrC definíciójának kritériuma a szövettanilag igazolt ADC jelenléte, melynek következtében a glanduláris UrC-ák aránya a nem-glanduláris UrC-ákhoz képest a valóságosnál magasabbnak mutatkozik. Ezért annak érdekében, hogy ezt az adattorzulást elkerüljük, e csoportok összehasonlítása során csak azt a 11 tanulmányt vettük figyelembe, melyek mind glanduláris, mind pedig nem-glanduláris UrC-ákat is tartalmaztak. Így összesen az UrC daganatok 91%-a bizonyult ADC-ának (477/527).

A daganat malignitási fokára vonatkozó adatok 5 tanulmány esetén voltak elérhetőek, melyek alapján a tumorok 18%-a (33/186) alacsony malignitású (grade 1), 48%-a (90/186) közepes malignitású (grade 2), míg 34%-a (63/186) magas malignitású (grade 3) volt.

6. táblázat: Az urachus carcinomás betegek diagnosztikus adatai

Tanulmány	Ref.	N	Férfi	Nő	Átlag életkor (év)	Haematuria	Alhasi fájdalom	Tapintható tumor	Mucosuria	Dysuria	Kalcifikáció	Pozitív cisztoszkópia	Pozitív citológia
Johnson	32	14	9	5	55 (38-76)								
Grignon	61	24	13	11	52	22/24			4/24				
Henly	31	38	28	10	57 (28-88)	30/38	8/38	1/38	6/38			34/38	6/12
Santucci	62	17	8	9	55 (25-77)								
Dandekar	63	21	9	12	X								
Siefker-Radtke	35	42	22	20	47 (23-76)								
Thali-Schwab	64	25	13	12	48 (21-69)	13/22	3/22	1/22	2/22	1/22	18/25		
Ashley	25	66	46	20	61 (57-64)	53/66	16/66	6/66	6/66	8/66	9/26	54/66	13/32
Pinthus	22	40	23	17	51								
Wright	20	151	83	68	X								
Molina	18	49	33	16	58 (42-76)	42/49	4/49	8/49	8/49			45/53	
Chen	10	14	9	5	52 (24-75)	13/14	0/14	1/14	1/14	6/14	5/14	12/14	
Gopalan	13	24	15	9	52 (26-68)	17/24	0/24	1/24	1/24	1/24			
Bruins	5	152	88	64	58 (20-90)								
Yazawa	38	10	8	2	55 (31-70)	8/10						10/10	2/8
Meeks	65	65	42	23	51	49/65							7/34
Cho	66	17	13	4	46	12/17	1/17	1/17	1/17	1/17			
Kim	24	41	24	17	X	32/41	10/41	7/41		8/41	3/35	31/35	
Chen	39	17	10	7	50 (37-77)	14/17		2/17		1/17	7/15	16/17	1/5
Jung	42	28	19	9	46 (26-67)	18/28	3/28	3/28	0/28	3/28	3/27	15/19	0/16
Amin	117	55	23	32	49 (24-83)	6/25	3/25	8/25	3/25				
Niedworok	21	26	15	11	48 (32-73)	15/26	3/26						1/5
Dhillon	23	46	30	16	53 (28-82)	29/46	6/46		3/46				
Hayashi	52	28	21	7	52 (46-57)	21/28						28/28	
Összesen		**1010**	**604**	**406**	**52**	**394/540**	**54/396**	**39/341**	**35/353**	**29/229**	**45/142**	**245/276**	**30/102**
						73%	**14%**	**11%**	**10%**	**13%**	**32%**	**89%**	**29%**

A Sheldon-féle stádiumbesorolás 13 tanulmányban összesen 532 beteg esetén volt hozzáférhető. E szerint az I-es stádiumú csoportba 3 beteg (0,6%), a II-es és III-as csoportba 40 (8%) illetve 363 (68%) beteg, míg a IV-es stádiumú csoportba 126 (24%) beteg került (8. táblázat). A Mayo-féle stádiumbesorolást 6 tanulmány összesen 221 UrC-ás beteg esetén alkalmazta. Ennek során 73-an (33%) az I-es, 88-an (40%) a II-es, 15-en (7%) a III-as és 45-en (20%) a IV-es stádium csoportba kerültek (8. táblázat).

A diagnózis felállításakor 646 beteg közül 136-nak (21%) volt távoli áttétte. A primer nyirokcsomó metasztázisok jelenlétének meghatározásakor csak azokat a tanulmányokat analizáltuk, ahol a sebészi kezelés nyirokcsomó eltávolítással egészült ki, így a nyirokcsomó pozitivitás az esetek 17%-ban igazolódott (41/239). A műtéti kezelés után a betegek 21%-ánál (73/349) igazoltak pozitív rezekciós szélt. A patológiai paramétereket a 7. táblázat foglalja össze.

5.1.3 Az urachus carcinoma prognosztikus tényezői

Az UrC prognosztikus faktorainak feltérképezését számos tanulmány tűzte ki célul, melyek közül a leggyakrabban vizsgált paraméterek között a következők szerepeltek: kor, nem, Sheldon és Mayo stádium, malignitási fok, nyirokcsomó státusz, metasztázisok hiánya vagy jelenléte, pozitív sebészi szél, a tumor mérete, pecsétgyűrűsejtes fenotípus jelenléte vagy hiánya, mucin termelés, peritoneális érintettség, köldök és a nyirokcsomók eltávolítása vagy azoknak hiánya, parciális és radikális cystectomia és az Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) kritériumai szerint megállapított, státusz, mely a betegek általános állapotát hivatott leíni. A különböző tanulmányok összehasonlítását számos tényező nehezítette. Ezek közül kiemelendő, hogy a vizsgált paramétereket az egyes tanulmányok álatalában eltérő módon csoportosították. Az olyan folytonos változók, mint a tumor méret, az életkor, a staging és a grading analízise során különbözőképpen beállított határértéket használtak, ami a tanulmányok eredményeinek közvetlen összehasonlítását lehetetlenné tette. További problémát jelentettek az eltérő vizsgálati végpontok (úgy, mint a teljes vagy betegség-specifikus illetve progresszió-mentes túlélés), melyek ugyancsak jelentősen megnehezítették a tanulmányok összevetését.

7. táblázat: Az urachus carcinomás betegek patológiai paraméterei

Tanulmány	Ref	N	Adeno	G1	G2	G3	SheldonI	SheldonII	SheldonIII	SheldonIV	MayoI	MayoII	MayoIII	MayoIV	R1	N+	M+
Johnson	32	14	14														
Grignon	61	24	24														
Henly	31	38	36				2		31	5							9
Santucci	62	17	14				0	1	14								2
Dandekar	63	21	21														
Siefker-Radtke	35	42	42				0		27	12					5	5	7
Thali-Schwab	64	25	25													2	8
Ashley	25	66	61				0	5	42	19	28	19	6	13	18	10	13
Pinthus	22	40	25	12	11	11	1	5	22	0					12		
Wright	20	151	151														46
Molina	18	49	44														
Chen	10	14	13				0	1	10	3						0	3
Gopalan	13	24	24				0	2	20	2					1	1	1
Bruins	5	152	143	13	38	34	0	22	85	45					15	15	30
Yazawa	38	10	10													2	1
Meeks	65	65	62												7	8	
Cho	66	17	17	0	23	8					3	12	1	0	5	1	
Kim	24	41	38				0	0	33	8	18	14	4	5	4		
Chen	39	17	14				0	2	11	4					1	2	1
Jung	42	28	27	3	6	1					10	13	2	3			3
Amin	117	55	55														
Niedworok	21	26	26	5	12	9	0	0	18	6	8	9	1	6	5		7
Dhillon	23	46	46				0	0	27	19	6	21	1	18			
Hayashi	52	28	28				0	2	23	3							2
Összesen		**1010**	**477/527**	**33/186**	**90/186**	**63/186**	**3/532**	**40/532**	**363/532**	**126/532**	**73/221**	**88/221**	**15/221**	**45/221**	**73/349**	**41/239**	**136/646**
			91%	**18%**	**48%**	**34%**	**0,6%**	**8%**	**68%**	**24%**	**33%**	**40%**	**7%**	**20%**	**21%**	**17%**	**21%**

Több publikációban az alacsony betegszámhoz képest túl sok változót vizsgáltak, ami csökkentette a statisztikai modellek megbízhatóságát. Ez utóbbi probléma kiküszöbölésére csak azokat a tanulmányokat vontuk be a prognosztikai faktorok vizsgálatába, melyek legalább 25 beteg adatait dolgozták fel. Így összesen 10 tanulmány 620 betegének összehasonlítását tudtuk elvégezni.

Az egyes tanulmányok univariencia analíziseinek összehasonlítása során szignifikáns összefüggést találtunk a Sheldon IIIB< és IIIC< stádiumok és a rövid túlélési idő között. A Mayo-féle beosztás szerinti II-es stádium feletti betegek szintén szignifikánsan rövidebb ideig éltek. Ezenfelül a Mayo-féle stádiumbesorolás a magasabb szignifikancia alapján megbízhatóbbnak bizonyult mint a Sheldon-féle rendszer. A multivariencia analízisek mindkét stádium rendszert független prognosztikus faktorként azonosították a túlélés tekintetében. A tumor malignitási foka az univariencia analízisben prognosztikus faktornak bizonyult, ám a multivariencia vizsgálatok e faktor független prognosztikai értékét nem támasztották alá. A nyirokcsomók érintettsége és a távoli metasztázisok jelenléte mind az univariencia, mind pedig a multivariencia analízisek során szignifikáns kockázati tényezőknek bizonyultak. A pozitív sebészi szél prognosztikus értékét összesen 4 tanulmány támasztja alá. Az eredményekből kiolvasható, hogy a radikális cystectomia alkalmazása nem biztosított túlélési előnyt a parciális cystectomiával szemben. A tumor mérete és a pecsétgyűrűsejtes fenotípus jelenlétének prognosztikus értéke nem egyértelmű, míg a mucin megjelenése a daganat szövetben nem mutatkozott prognosztikusnak. Végül, az ECOG státusz prognosztikus szerepét az univariencia és a multivariencia vizsgálatok is alátámasztották. A prognosztikus faktorokat a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat: Az urachus carcinoma prognosztikus tényezői

		Bruins [5]				Ashley [25]				Kim [24]				Jung [42]				Niedworok [21]			
	N	152				66				41				28				26			
		UV		MV		UV		MV		UV		MV		UV		MV		UV		MV	
		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)		HR (95% CI)	
Kor		N.A.	NS	-	-	1.2(0.6-2.4)	NS	-	-	1.0(0.9-2.8)	NS	-	-	N.A.	NS	-	-	0.5 (0.2-1.4)	NS	-	-
Nem		N.A.	NS	-	-	1.1(0.4-1.9)	NS	-	-	-	-	-	-	N.A.	NS	-	-	2.4 (0.9-8.9)	NS	-	-
Sheldon	>IIIA	N.A.	S	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.3 (0.9-19.8)	NS	2.2 (0.5-11.2)	NS
	>IIIB	N.A.	S	5.1(2.5-10.3)	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5 (0.8-8.1)	NS	-	-
	>IIIC	-	-	-	-	-	-	-	-	4.6(1.5-14.1)	S	3.4(0.9-12.7)		-	-	-	-				
Mayo	<II	-	-			-	S	-	NS	11.9(3.8-37.4)	S	18.3(4.0-84.3)	S	N.A.	S	2.3(1.8-43.9)	S	-	-	-	-
Grade		N.A.	S	-	NS	3.6(1.7-7.7)	S	3.7(1.7-7.9)	S	-	-	-	-	N.A.	S	1.5(0.4-5.5)	NS	1.1 (0.4-3.2)	NS	-	-
LN+		N.A.	S	1.7(1.2-2.6)	S	1.5(0.7-2.8)	S	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M+		N.A.	S	5.3(2.8-9.9)	S	3.3(1.6-6.8)	S	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R+		N.A.	S	5.2(1.2-21.9)	S	4.7(2.2-9.8)	S	3.8(1.9-7.5)	S	-	-	-	-	-	-	-	-	6.1 (1.7-22.0)	S	4.7 (1.2-17.9)	S
Méret		-	-	-	-	1.5(0.7-3.0)	NS	-	-	4.9(1.1-22.0)	S	6.6(1.3-33.1)	S	N.A.	NS	-	-	-	-	-	-
Pecsétgyűrű sejt		N.A.	S	-	NS	1.4(0.4-4.5)	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1(0.7-6.6)	NS	-	-
Mucin		N.A.	NS	-	-	-	-	-	-	3.8(1.3-10.3)	S	2.7(0.9-8.6)	NS	-	-	-	-	-	-	-	-
Part CE / RadCE		-	-	-	-	2.1(0.9-4.5)	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECOG		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.A.	S	15.3(1.8-43.9)	S	-	-	-	-

5.1.4 Az urachus carcinoma sebészi kezelése

Az UrC sebészi kezeléséről készült metaanalízisünk összesen 22 tanulmányt foglal magába, mely során 957 UrC-ás beteg adatait dolgoztuk fel. A legtöbben az elsődleges műtéti kezelésnek a parciális cystectomiát választották (633/957; 66%), ezt követte a radikális cystectomia (117/957; 12%), majd a transzuretrális műtét (49/957, 5%). A köldök eltávolításával kapcsolatos adatok 429 esetben voltak elérhetőek, ebből 287 esetnél (67%) végezték el a köldök valamint a ligamentum umbilicale medianum teljes eltávolítását. A regionális nyirokcsomók eltávolítását a referált 647 UrC-ás esetből 248 betegnél (38%) végezték el. A sebészi kezeléssel kapcsolatos adatokat a 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat: Az urachus carcinomás betegek műtéti adatai

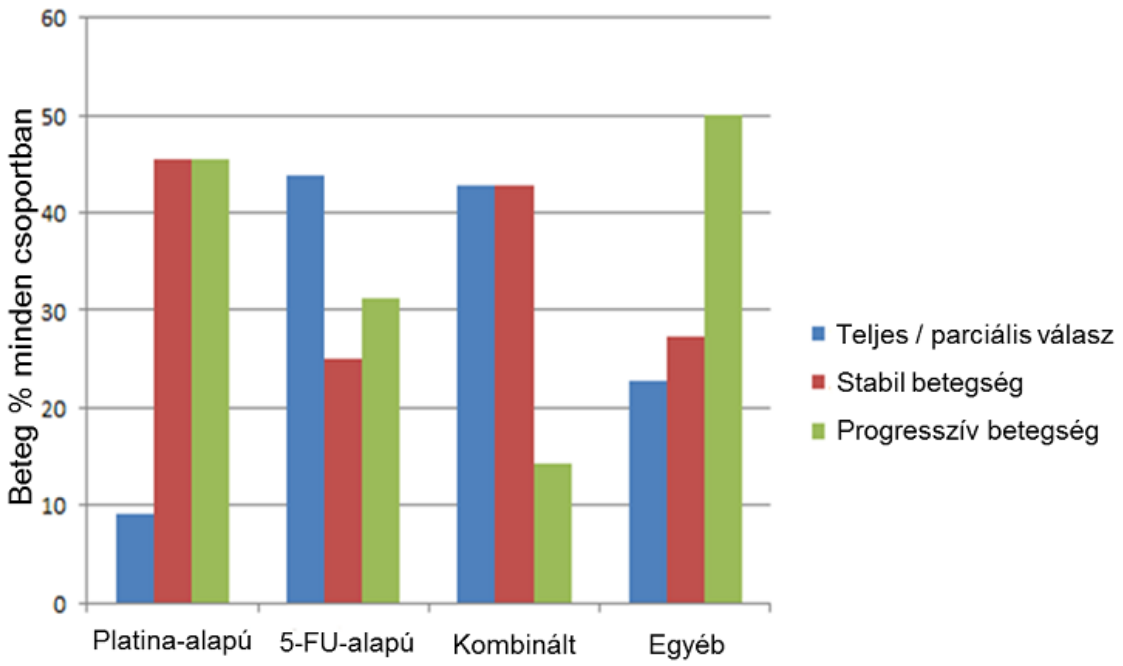
Tanulmány	Ref	N	Parciális CE	Radikális CE	TUR	Köldök eltávolítás	Nyirokcsomó eltávolítás
Johnson	32	14	11	1	0	X	X
Grignon	61	24	16	4	1	X	X
Henly	31	38	30	4	2	34	X
Santucci	62	17	14	0	2	X	X
Dandekar	63	21	10	9	0	X	X
Siefker-Radtke	35	42	28	7	0	19	19
Ashley	25	66	46	14	0	32	20
Pinthus	22	40	28	4	0	X	X
Wright	20	151	71	17	19	X	45
Molina	18	49	43	3	0	42	12
Chen	10	14	8	3	0	X	X
Gopalan	13	24	20	3	1	11	14
Bruins	5	152	81	20	17	X	43
Yazawa	38	10	5	4	0	9	9
Meeks	65	65	59	0	0	50	51
Cho	66	17	16	1	0	16	3
Kim	24	41	29	5	3	X	X
Chen	39	17	12	2	1	13	5
Amin	117	55	40	0	3	32	X
Niedworok	21	26	21	4	0	X	10
Dhillon	23	46	33	7	0	29	X
Hayashi	52	28	12	5	0	X	17
Összesen		**957**	**633/957**	**117/957**	**49/957**	**287/429**	**248/647**
			66%	**12%**	**5%**	**67%**	**38%**

5.1.5 Az urachus carcinoma kemoterápiás kezelése

Azért, hogy a különböző kemoterápiás kezelések hatékonyságát összehasonlítsuk, az irodalomban fellelhető összes olyan publikált esetet összegyűjtöttük, melyekben UrC-ás betegek kemoterápiával történő kezeléséről számoltak be. Figyelembe véve a betegek heterogén kezelési módját (különös tekintettel a kemoterápia előtti kezelésekre), a igen eltérő általános állapotát (ECOG státusz) és a rövid követési időket, végpontként a túlélés helyett inkább a radiológiai választ használtuk. Azokat az eseteket, ahol a radiológiai válasz hiányzott, kizártuk a vizsgálatból. Így összesen 74 UrC-ás beteg adatait dolgoztuk fel, akiket a radiológiai válaszaik alapján 3 csoportba soroltunk: a teljes vagy parciális választ adók, a stabil betegséggel, valamint a progresszív betegséggel bírók csoportjába. A kemoterápiás kezelés szerint 4 csoportot hoztunk létre, ezek pedig a platina-alapú, az 5-FU-alapú, a kombinált, valamint az egyéb kezelésben részesülő betegek csoportjai voltak (10. táblázat). A 74 beteg közül 22-en kaptak platina-alapú, 16-an 5-FU alapú, 14-en kombinált platina- és 5-FU alapú, valamint 22-en egyéb, nem platina- és/vagy 5-FU alapú kemoterápiás kezelést. A radiológiai válaszok alapján a betegek hasonlóan reagáltak az 5-FU alapú kezelésre, mint a kombinált platina–5-FU alapú kezelésre, hisz mindkét csoportban a reagálók aránya 40% feletti értéket mutatott (44% és 43%). Ez az arány a platina-alapú kezelést kapott betegcsoportban csupán ennek negyedét (10%) érte el. A legalacsonyabb progressziós arányt azoknál a kezeléseknél lehetett megfigyelni, ahol a platina-alapú szereket 5-FU kezeléssel kombinálták (14%). Az 5-FU kezelésben részesülő betegek 31%-a mutatott progressziót, míg a platina-alapú és az egyéb kezelésen átesett betegeknél gyakrabban fordult elő progresszió (45 és 50%) (9. ábra). A legmagasabb arányban terápiás választ kiváltó, míg a legalacsonyabb progressziós rátát mutató kezelés az 5-FU-platina kombinációja volt, melyet a Fisher-féle egzakt teszt is megerősített (p=0,043).

10. táblázat: A kemoterápiás kezelésekre adott radiológiai válaszok

Kemoterápiás szer	Teljes / parciális válasz		Stabil betegség		Progresszív betegség		∑
	N	%	N	%	N	%	N
Platina-alapú	2	10	10	45	10	45	22
5-FU-alapú	7	44	4	25	5	31	16
Kombinált terápia (Platina – 5-FU)	6	43	6	43	2	14	14
egyéb (nem platina- vagy 5-FU-alapú)	5	23	6	27	11	50	22
∑	20	27	26	35	28	38	74



9. ábra: Az urachus carcinomás betegek radiológiai válasza a különböző típusú kemoterápiás kezelések hatására

5.2 Az EGFR jelátviteli útvonal mutációinak vizsgálata

5.2.1 Vizsgált minták

A vizsgált 31 beteg közül 19 férfi és 12 nő volt (1,6:1). A diagnózis felállításakor az életkor középértéke 51 év volt (24-77 év). A szövettani leírás minden esetben ADC-át igazolt, mely 6 esetnél pecsétgyűrű-sejtes fenotípust, 4 esetben pedig kalcifikációt is mutatott (egy esetnél az adatok hiányoztak). A Sheldon-féle kritériumoknak megfelelően [8] 16 beteg a IIIA stádium, 7 a IIIB stádium, 1 a IIIC stádium, 2 a IIID és 4 pedig a IVA stádiumcsoportba került. A Mayo-stádium [18] szerint 7 beteg került az I-es, 13 a II-es, 7 a III-as és 3 a IV-es stádium csoportba (egy betegnél a stádium adatok hiányoztak). A diagnózis felállításakor 5 beteg rendelkezett nyirokcsomó vagy távoli áttéttel (16%). Elsődleges sebészi kezelésnek 21 esetben parciális cystectomia, 8 betegnél radikális cystectomia, 2 esetben pedig TUR műtét volt. A primer műtét 17 betegnél (55%) egészült ki a köldök és 21 betegnél (68%) a nyirokcsomók eltávolításával. A két TUR műtéttel kezelt betegen később cystectomiát végeztek. A műtét előtt kemoterápiás és/vagy sugárkezelésben egyik beteg sem részesült (11. táblázat).

11. táblázat: A betegek klinikopatológiai adatai

	N = 31
Életkor	
55≤	12
55>	19
Nem	
Férfi	19
Nő	12
Szövettan	**Hiányzó adat: 1**
ADC pecsétgyűrűsejtes fenotípussal	6
ADC pecsétgyűrűsejtes fenotípus nélkül	24
Kalcifikáció	**Hiányzó adat: 1**
Jelenléte	4
Hiánya	26
Sheldon-stádium	**Hiányzó adat: 1**
I	0
II	0
IIIA	16
IIIB	7
IIIC	1
IIID	2
IVA	4
IVB	0
Mayo-stádium	**Hiányzó adat: 1**
I	7
II	13
III	7
IV	3
Áttét diagnóziskor	
Igen	5
Nem	26
Műtéti kezelés	
Parciális cystectomia	21
Radikális cystectomia	8
TUR	2
Köldök eltávolítása	**Hiányzó adat: 2**
Igen	17
Nem	12
Nyirokcsomó eltávolítása	
Igen	21
Nem	10

5.2.2 Az UrC-ás betegek követési és túlélési karakterisztikája

Vizsgálatunk során a 31 beteg közül a daganat lokális kiújulása a műtéti kezelés után 3, metasztázis megjelenése 4 és lokális kiújulás valamint metasztázis együttes megjelenése 5 betegnél fordult elő. A sebészi kezeléstől a progresszió megjelenéséig eltelt idő medián értéke 18 hónap volt (a progresszióval kapcsolatos adatok 5 esetben hiányoztak). Az adatok feldolgozásának időpontjában a 31 UrC beteg közül 20 volt életben, 10 pedig elhunyt. A medián túlélés 49 hónap volt (a túlélési adatok 1 esetben hiányoztak).

5.2.3 Az EGFR jelátviteli útvonal mutációinak gyakorisága

Harmincegy UrC-ás beteg mintáiban vizsgáltuk a KRAS, NRAS, a BRAF, EGFR és PIK3CA gének leggyakrabban előforduló patogén mutációit. Összesen 14 mutációt találtunk 13 (42%) betegnél. A leggyakrabban a KRAS gén mutálódott (8/31; 26%), melyet a BRAF (5/31; 16%) és az NRAS (1/31; 3%) gének követtek. Egy esetben mind a BRAF, mind pedig az NRAS génben mutációt találtunk. Az EGFR és a PIK3CA gének minden esetben vad típusúnak bizonyultak. A mutációkkal kapcsolatos információkat a 12. táblázat foglalja össze.

12. táblázat: Az azonosított mutációk típusai és előfordulási gyakoriságuk

Gén	Exon	Kodon	Pont mutáció	Kodon változás	Pozíció	Aminosav csere	N
KRAS	2	12	c.35G>A	GGT→GAT	p.G12D	Gly→Asp	1
	2	12	c.35G>T	GGT→GTT	p.G12V	Gly→Val	3
	3	61	c.182A>T	CAA→CTA	p.Q61L	Gln→Leu	1
	4	146	c.437C>T	GCA→GTA	p.146AV	Ala→Val	2
	4	146	c.436G>A	GCA→ACA	p.A146T	Ala→Thr	1
	∑						**8/31**
NRAS	3	61	c.183>T	CAA→CTA	p.Q61H	Gln→Hus	1
	∑						**1/31**
BRAF	15	660	c.1799T>A	GTG→GAG	p.V600E	Val→Glu	5
	∑						**5/31**

5.2.4 A mutációk jelenléte valamint a betegek klinikopatológiai adatai és túlélése közötti összefüggés

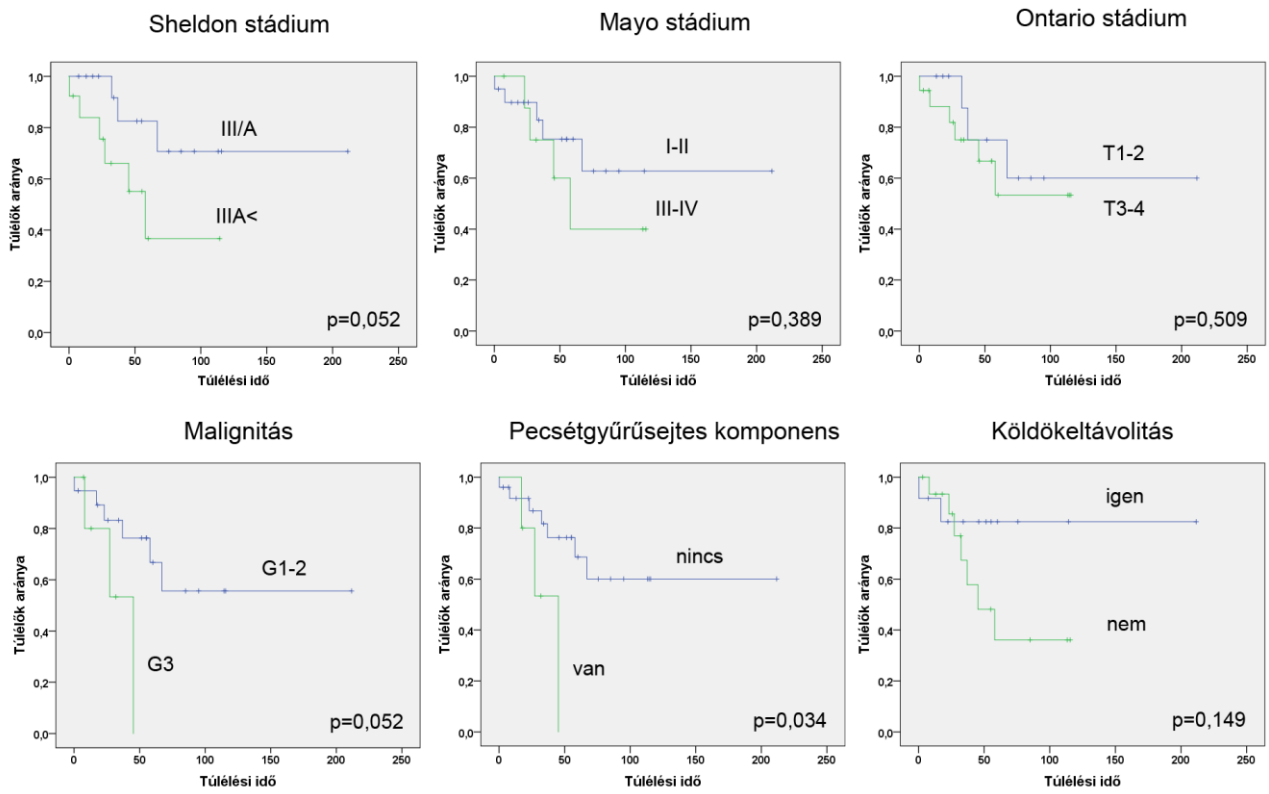
A mutációk jelenléte, valamint a betegek klinikopatológiai adatai között (Sheldon-stádium, Mayo-stádium, malignitás, nyirokcsomó áttét jelenléte, kalcifikáció jelenléte és pecsétgyűrűsejtes fenotípus) nem találtunk összefüggést. Érdekes módon a KRAS mutációval rendelkező nyolc betegünk egyike sem rendelkezett nyirokcsomó vagy távoli áttéttel, ennek ellenére a mutációk és a metasztázisok jelenléte közötti összefüggés mégsem érte el a szignifikancia szintet (p=0,108).

Sem a mutációk jelenléte, sem pedig a betegek klinikopatológiai adatai és a teljes túlélése között nem találtunk összefüggést (13. táblázat). Néhány ismert rizikótényező prognosztikus értéke megközelítette a szignifikancia küszöböt: a Sheldon szerinti IIIA-nál magasabb stádiumú (p=0,069), valamint a magas malignitású (grade 3) (p=0,071) és pecsétgyűrűsejtes komponenst tartalmazó tumorok (p=0,051) rövidebb túlélési időkkel mutattak összefüggéseket, melyek azonban nem érték el a szignifikancia küszöböt. Az egyes klinikopatológiai változók és a teljes túlélés összefüggését ábrázoló Kaplan-Meier görbék a 10. ábrán láthatók. A mutációk előfordulását a betegek adatai szerint csoportosítva a 14. táblázat mutatja.

5.2.1 A különböző tumorentitások mutációs mintázatainak összehasonlítása

Az UrC, a CRC, valamint húgyhólyag urothel sejtes és primer ADC mutációs profiljainak összehasonlításakor saját eredményeinket vetettük össze az irodalomban fellelhető adatokkal (15. táblázat).

A CRC és az UrC mutációs mintázatainak összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a KRAS gén érintettsége mindkét tumorban gyakori (28% vs. 41%). További hasonlóság mutatkozott az UrC és a CRC között a BRAF gén mutációinak összehasonlításakor (8% vs. 10%), míg az NRAS és az EGFR gének ritkán érintettek mindkét tumor entitásban. Az UrC és a CRC mutációs mintázata között különbséget csupán a PIK3CA gén esetében láttunk, ugyanis e gén mutációi viszonylag gyakorinak számítanak CRC-ában (15%), UrC-ában viszont az esetek mindössze 2%-ában volt kimutatható.



10. ábra: A klinikopatológiai változók valamint az urachus carcinomás betegek teljes túlélését ábrázoló Kaplan-Meier görbék

A CRC-ától eltérően az UrC és a hólyag urothel sejtes carcinomájának mutációs gyakoriságai között egyértelmű különbségeket találtunk. Egyrészt az UrC-ában gyakori KRAS mutációk urothel sejtes daganatokban ritkák (3%), ezzel szemben a PIK3CA urothel sejtes daganatokban gyakori (20%), míg UrC-ában ritka eseménynek számít.

Az UrC és a hólyag primer ADC mutációs mintázata nagymértékben hasonlít egymásra: a KRAS gén mutációja viszonylag gyakran érintett mindkét tumorentitásban (UrC-ában 28%, primer ADC-ában pedig 18%), melyet a BRAF gén érintettsége követ (mindkét tumorban 8%), míg az NRAS és az EGFR gének érintettsége e két tumorféleségben alig, vagy egyáltalán nem fordul elő.

13. táblázat: A mutációk jelenléte valamint az urachus carcinomás betegek klinikopatológiai adatai közötti összefüggések

		Teljes túlélés		
		HR	95% KI	P
Èletkor	≤ 50	ref.		
	> 51	0,712	0,200-2,542	0.601
Nem	nő	ref.		
	férfi	0,543	0,156-1,890	0,338
Sheldon stádium	IIIA	ref.		
	>IIIA	3,786	0,903-15,865	0,069
Mayo stádium	I - II	ref.		
	III - IV	1,772	0,474-6,625	0,395
Ontario stádium	I - II	ref.		
	III - IV	1,598	0,393-6,492	0,512
Malignitás	alacsony (G1-2)	ref.		
	magas (G3)	4,116	0,884-19,171	0.071
Pecsétgyürüsejtes komponens	nem	ref.		
	igen	4,374	0,996-19,206	0,051
Kalcifikáció	nem	ref.		
	igen	0,891	0,109-7,284	0,914
Metasztázis (M/N)	negatív	ref.		
	pozitív	2,142	0,530-8,661	0,285
Köldökeltávolítás	nem	ref.		
	igen	3,016	0,623-14,591	0,170
Nyirokcsomóeltávolítás	nem	ref.		
	igen	0,774	0,216-2,771	0,694
KRAS mutáció	nem	ref.		
	igen	0,917	0,193-4,351	0,914
K-, NRAS v. BRAF mutáció	nem	ref.		
	igen	1,022	0,287-3,640	0,973

14. táblázat: A mutációk jelenlétének eloszlása a betegek karakterisztikája szerint

		Betegek		KRAS	NRAS	BRAF
		n	%	n	n	n
Kor	< 55	12	39	4	1	4
	≥ 55	19	61	4	0	1
Nem	Férfi	19	61	2	1	4
	Nő	12	39	6	0	1
Szövettan	ADC pecsétgyűrűsejtes fenotípussal	6	20	1	0	2
	ADC pecsétgyűrűsejtes fenotípus nélkül	24	80	7	1	3
	Hiányzó adat	1				
Kalcifikáció	Jelenléte	4	13	2	0	0
	Hiánya	26	87	6	1	5
	Hiányzó adat	1				
Sheldon-stádium	I-II	0	0	0	0	0
	IIIA	16	53,3	3	1	3
	IIIB	7	23,3	4	0	1
	IIIC	1	3,3	0	0	0
	IIID	2	7	0	0	0
	IVA	4	13,3	1	0	1
	IVB	0	0	0	0	0
	Hiányzó adat	1				
Mayo-stádium	I	7	23,3	1	0	0
	II	13	43,3	4	1	4
	III	7	23,3	2	0	0
	IV	3	3,3	1	0	1
	Hiányzó adat	1				
Áttét diagnóziskor	N0/M0	5	16	8	1	4
	N+/M+	26	84	0	0	1
Műtéti kezelés	Parciális cystectomia	21	68	7	0	3
	Radikális cystectomia	8	26	1	0	1
	TUR	2	6	0	1	1
Köldök eltávolítása	Igen	17	59	5	0	3
	Nem	12	41	3	1	2
	Hiányzó adat	2				
Nyirokcsomó eltávolítása	Igen	21	68	5	0	3
	Nem	10	32	3	1	2
Kemoterápia	Igen	7	28	2	1	2
	Nem	18	72	6	0	3
	Hiányzó adat	6				
Progresszió	Lokális kiújulás	3	12	0	1	1
	Távoli áttét	4	15	1	0	0
	Mindkettő	5	19	2	0	1
	Nem progrediált	14	54	4	0	3
	Hiányzó adat	5		1		

15. táblázat: EGFR szignálút tagjait érintő mutációk gyakoriságainak összehasonlítása a különböző tumorentitásokban

Mutációk	Urachus cc		Hólyag primer ADC		Urothel sejtes cc		Colorectalis cc	
KRAS	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
	8/31*	26	2 / 21 [87]	10	10/234 [95]	4	3410/8350 [90]	41
	3/7[99]	43	4/12[98]	33	3/105 [96]	3	613/1487 [93]	41
	1/5[87]	20			4/218 [97]	2	124/277 [83]	45
	1/7[100]	14			4/98 [94]	4	92/194 [92]	47
	2/9[44]	22			0/128[85]	0	71/164 [91]	43
	5/12[98]	42					119/27681	43
∑	**20/71**	**28**	**6/33**	**18**	**21/783**	**3**	**4429/10748**	**41**
NRAS	1/31*	3	0/12[98]		2/105 [96]	2	17/644 [107]	3
	0/7[100]	0			0/218 [97]	0	14/282 [83]	5
	1/9[44]	11			4/98 [94]	4	7/194 [92]	4
	0/12[98]	0			0/128[85]	0	25/276[81]	9
∑	**2/59**	**3**	**0/12**	**0**	**6/549**	**1**	**63/1396**	**5**
BRAF	5/31*	16	1/12[98]	8	0/145 [97]	0	1288/11955 [106]	11
	0/7 [99]	0			0/128[85]	0	18/243 [83]	7
	0/7[100]	0					10/194 [92]	5
	0/9[44]	0					26/164 [91]	16
	0/12[98]						22/276[81]	8
∑	**5/66**	**8**	**1/12**	**8**	**0/273**	**0**	**1342/12832**	**10**
EGFR	0/31*	0	0/28 [87]	0	0/21 [86]	0	17/236 [82]	7
	0/7[100]	0			0/75 [84]	0	3/280 [83]	1
	0/9[44]	0			0/128[85]	0	11/276[81]	4
∑	**0/47**	**0**	**0/28**	**0**	**0/224**	**0**	**31/792**	**4**
PIK3CA	0/31*	0			61/257 [116]	24	108/743 [107]	15
	0/7[100]	0			19/105 [96]	18	24/255 [83]	9
	1/9[44]	11			37/218 [97]	17	32/194 [92]	16
					26/128[85]	20	50/276[81]	18
∑	**1/47**	**2**	**-**	**-**	**143/708**	**20**	**214/1468**	**15**

*saját eredmények

5.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok

5.3.1 Vizsgált minták

A vizsgált betegek közül 9 férfi és 6 nő volt (1,5:1), az életkor középértéke a diagnózis felállításkor 49 év volt (32-66 év). Mind a 15 beteg tumormintája a szövettani elemzés során urachus ADC-át igazolt, mely három esetnél pecsétgyűrűsejtes fenotípust mutatott. Kalcifikáció két beteg mintájában fordult elő. A Sheldon-féle beosztás szerint [8] 5 beteg a IIIA stádium, 6 a IIIB stádium, 1 a IIIC stádium, 1 a IIID és 1 a IVA stádium csoportjába került. A Mayo-féle kritériumoknak megfelelően [18] 2 beteg került az I-es stádium csoportjába, még 7 a II-es, 3 a III-as és 2 a IV-es stádium csoportjába sorolódott (a tumor stádiumával kapcsolatos adatok 1 beteg esetén hiányosak voltak). A diagnózis felállatásakor 2 beteg rendelkezett nyirokcsomó vagy távoli metasztázissal (13%). A leggyakrabban választott sebészi kezelés a parciális cystectomia volt, melyben 10 beteg részesült, radikális cystectomiával 4, TUR műtéttel 1 beteget kezeltek. A sebészi terápia 9 esetben a köldök, 10 esetben a területi nyirokcsomók teljes eltávolításával egészült ki. A TUR műtéttel kezelt beteg a későbbiekben cystectomián esett át. A műtét előtt egyik beteg sem kapott kemoterápiás és/vagy sugárkezelést.

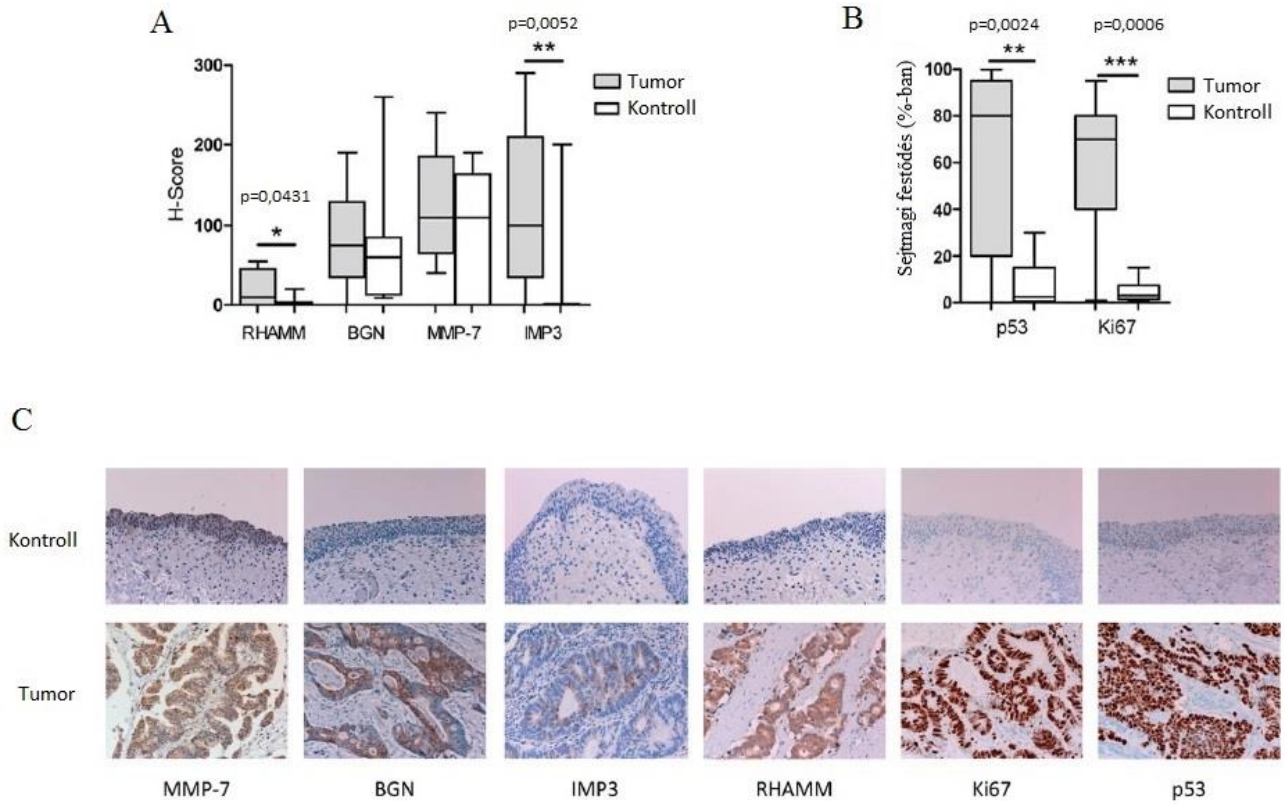
5.3.2 A betegek követési és túlélési adatai

E vizsgálat elvégzésének idején 15 UrC-ás beteg mintái álltak rendelkezésünkre. Közülük 1-1 esetben lokális kiújulás vagy metasztázis megjelenésével progrediált a betegség. Öt betegnél a progresszió során a daganat helyi kiújulása valamint áttét megjelenése együttesen fordult elő. A progresszióval kapcsolatos adatok egy beteg esetén hiányoztak. Az műtéttől a progresszióig eltelt idő középértéke 24 hónap volt. Az adatok kiértékelésekor 8 beteg volt életben, 7 pedig elhalálozott. Az UrC-ás betegek medián túlélési ideje 52 hónap volt.

5.3.3 Hisztopatológiai eredmények

Két patológus egymástól függetlenül elemezte az MMP-7, BGN, RHAMM és IMP3 festődés intenzitását, melyekből a hisztológiai pontszámot (*H-score*) kiszámolva a következő eredményekhez jutottunk: a medián pontszám az MMP-7 esetén 110 (40-

240 pont), a BGN-nél 75 (0-190 pont), a RHAMM esetén 10 (0-55 pont) és az IMP3-nál 100 (0-290 pont) értékeket érte el. Ezek közül a RHAMM és az IMP3 szignifikánsan erősebb festődést mutatott a tumor szövetekben, mint a kontrollként használt tumor környéki normál szövetben (p=0,0431 és p=0,0052, 11. ábra). A Ki67 és a p53 festődés intenzitásának analízise szignifikáns emelkedést eredményezett a tumor szövetekben mindkét immunreakció esetén (p=0,0006 és p=0,0024, 11. ábra). Az MMP-7, a BGN, a RHAMM és az IMP3 UrC esetén kizárólag a citoplazmában mutatott immunreaktivitást (11. ábra).

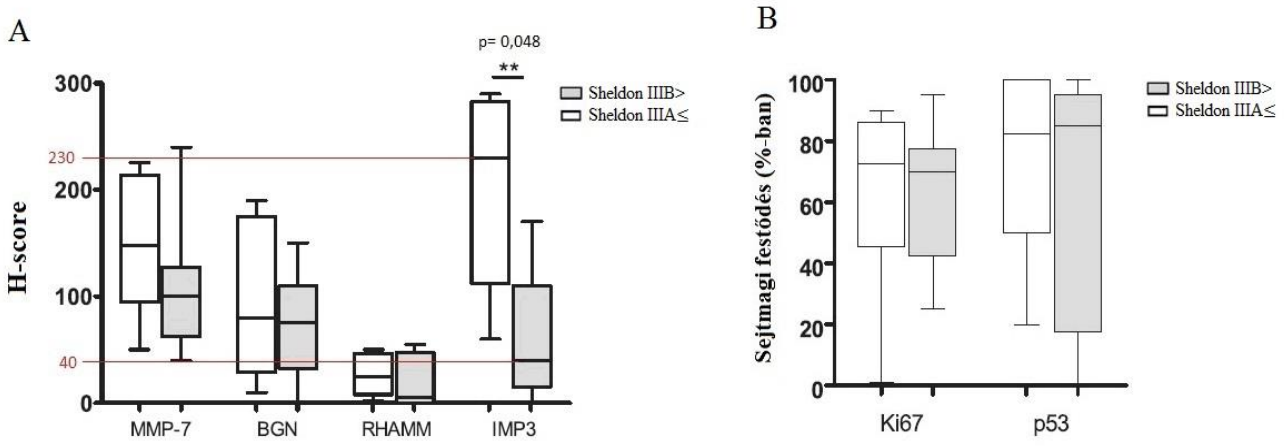


10. ábra: A RHAMM, a BGN, az MMP-7 és az IMP3 immunexpressziója az urachus carcinomás betegek tumor és normál szövetében.

A) RHAMM és az IMP3 festődése szignifikáns emelkedést mutat a tumoros mintákban (p=0,0431 és p=0,0052).
B) A p53 és a Ki67 sejtmagi festődésének százalékos értékei. Mindkét immunmarker festődése a tumorszövetekben szignifikánsabb erősebb volt a kontroll szövetekhez képest (p=0,0024 és p=0,0006).
C) Az MMP-7, a BGN, az IMP3, a RHAMM, a Ki67 és a p53 jellegzetes festődései az urachus carcinomás mintákon és a kontroll tumormentes urotheliumban.

5.3.4 Az immunhisztokémiai eredmények összefüggése a klinikopatológiai adatokkal

A Sheldon-féle stádiumbesorolás szerinti IIIA csoportba került UrC-ás minták szignifikánsan erősebb IMP3 festődést mutattak szemben a Stage IIIB illetve az előrehaladottabb stádiumú UrC-ás daganatokkal (medián H-score: 230 vs. 40, p=0,0048, 12. ábra). A RHAMM, a BGN, az MMP-7, az IMP3, a Ki67 valamint a p53 immunreaktivitása valamint a daganat stádiuma, malignitási foka (grade), illetve a betegek neme és életkora között összefüggést nem találtunk.



11. ábra: Az MMP-7, a BGN, a RHAMM és az IMP3 immunexpressziója az urachus carcinomás betegek tumor szövetében.

A) Az IMP3 festődése szignifikánsan magasabb korai stádiumú urachus dagantos mintákban az elörehaladott stádiumúakhoz képest (p=0,048).
B) A p53 és a Ki67 sejtmagi festődésének százalékos értékei nem térnek el egymástól.

5.3.5 Az immunhisztokémiai eredmények összefüggése a túlélési adatokkal

A Cox regressziós analízis segítségével az immunreakciók és a betegek teljes, betegség-specifikus és progresszió-mentes túlélése között nem találtunk szignifikáns összefüggést (16. táblázat).

16. táblázat: A vizsgált immunhisztokémiai markerek összefüggése az urachus carcinomás betegek túlélésével

				Teljes Túlélés				Progressziómentes Túlélés		
		n		HR	95% CI	P-érték		HR	95% CI	P-érték
MMP-7	Gyengén festődő (H-Score≤110)	9		ref.				ref.		
	Erősen festődő (H-Score>110)	6		1.305	0.290 - 5.872	0.729		1 046	0.249 - 4.398	0.951
RHAMM	Gyengén festődő (H-Score≤10)	8		ref.				ref.		
	Erősen festődő (H-Score>10)	7		1.576	0.352 - 7.061	0.552		1 446	0.359 - 5.825	0.604
IMP3	Gyengén festődő (H-Score≤100)	8		ref.				ref.		
	Erősen festődő (H-Score>100)	7		0.703	0.155 - 3.184	0.648		0.751	0.179 - 3.159	0.696
BGN	Gyengén festődő (H-Score≤75)	8		ref.				ref.		
	Erősen festődő (H-Score>75)	7		1.393	0.306 - 6.337	0.668		0.402	0.081 - 2.002	0.266
p53	Gyengén festődő (H-Score≤80%)	8		ref.				ref.		
	Erősen festődő (H-Score>80%)	7		2.187	0.484 - 9.881	0.309		1 917	0.474 - 7.762	0.362
Ki67	Gyengén festődő (H-Score≤70%)	10		ref.				ref.		
	Erősen festődő (H-Score>70%)	5		0.374	0.045 - 3.126	0.364		0.163	0.020 - 1.338	0.091

6 MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmányban célul tűztük ki, hogy az irodalmi adatokat feldolgozva az UrC klinikai, patológiai és prognosztikai vonatkozásairól átfogó és aktuális képet nyerjünk. További célunk volt, hogy az UrC genetikai és immunhisztokémiai tulajdonságainak feltérképezésével közelebb kerüljünk e betegség molekuláris hátterének megértéséhez. Ehhez egyrészt a „PubMed" adatbázisban az UrC-ával kapcsolatos publikációkat összegyűjtve metaanalízist végeztünk, másrészt egy nemzetközi kooperáció keretei között összegyűjtött UrC mintákon az EGFR szignálút gyakori mutációinak analízisét végeztük el. Vizsgáltuk továbbá hat - a CRC-ában és az urothel sejtes carcinomában igazoltan - prognosztikus immunhisztokémiai marker (p53, Ki67, MMP7, BGN, RHAMM, IMP3) expresszióját is.

Az UrC incidenciája rendkívül alacsony [4], ebből kifolyólag az elérhető közlemények száma is igen kevés. Az adatok szegényességéből adódóan nem meglepő, hogy e betegség kezelésével kapcsolatban számos bizonytalanság tapasztalható. A rendelkezésre álló tanulmányok legnagyobb része egy-egy beteg adatait feldolgozó esettanulmány, melyek bár általában részletes klinikai és patológiai leírást tartalmaznak, a rendszerint rövid követési idő miatt a prognosztikai faktorok vizsgálatára kevésbé alkalmasak. A publikációk további – bár az esettanulmányoknál jóval kisebb számban publikált – típusában egy-egy intézmény retrospektív adatait dolgozzák fel. E publikációk kielégítő részletességgel adnak meg klinikai és patológiai adatokat és a követési idő általában megfelelő hosszúságú, de az esetszámok jellemzően 10-20 körüliek, ami nem teszi lehetővé megbízható statisztikai analízis elvégzését. A publikációk harmadik csoportja – amibe mindösszesen két tanulmány tartozik – tumorregiszterek adatait használja fel [5, 20, 67]. Ezekben az esetszámok jellemzően száz felettiek, ami a statisztikai kiértékelhetőség szempontjából kedvező ugyan, de a vizsgálható klinikai és patológiai paraméterek száma az ilyen tanulmányokban jellemzően igen alacsony. A különböző típusú tanulmányok előnyeit és hátrányait mérlegelve a legnagyobb esetszám mellett a legtöbb paraméter vizsgálatát abban az esetben tudjuk elvégezni, ha az egy-egy intézmény adatait feldolgozó publikációk eredményeit összesítjük metaanalízis formájában, a legáltalánosabb paraméterek (stádium, malignitás, életkor, nemek szerinti megoszlás) megítéléséhez pedig a regiszter

alapú vizsgálatokat is felhasználjuk. Az e megfontolások szerint kiválasztott tanulmányok összesen 1010 UrC-ás beteg adatait tartalmazták.

Metaanalízisünk során az átlag életkor a diagnózis felállításakor 52 év volt, mely szerint az UrC több, mint tíz évvel korábban alakul ki, mint a húgyhólyag urothel sejtes daganata [9, 10]. Munkánk folyamán az is kiderült, hogy az UrC másfélszer gyakrabban fordul elő a férfiak körében, mint a nőknél. A leggyakoribb – az esetek 73%-ában megfigyelt – tünet a vérvizelés. Ritkábban jelentkező és a vérvizeléshez hasonlóan aspecifikus tünet az alhasi fájdalom (14%), valamint a nehezített és fájdalmas vizelés (dysuria) (13%). További jellemző tünet a vizelettel, vagy ritkábban a köldökön át ürülő nyák megjelenése, mely az esetek mintegy 10%-ában figyelhető meg. A hólyagtükrözés az UrC-ás beteg kivizsgálásakor a diagnózis felállításának elsődleges eszköze. Összesített adataink szerint e módszer nagy valószínűséggel (89%) igazolni tudja a daganat jelenlétét. Az UrC és az urothel sejtes carcinoma hólyagon belüli lokalizációja között jellemző eltérés mutatkozik. Az urothel sejtes carcinoma általában a hólyagalapon illetve az ureter szájadékoknál alakul ki, megjelenése pedig lehet papilláris, polypoid, szesszilis vagy kifekélyesedő. Ezzel szemben az UrC az urachus maradványról, felülről terjed a húgyhólyagra, így általában annak kupolájában vagy elülső falán, lapos, vöröses elváltozásként jelenik meg. Az UrC patognomikus tünetének számít az ultrahang képen megjelenő echodús jel, ami az UrC-ában megjelenő kalcifikáció jelenlétével magyarázható. Bár e meszesedés jelenléte merőben segíti az UrC diagnózisának felállítását, metaanalízisünk az esetek mindössze 32%-ában írta le annak diagnóziskori jelenlétét. Összesítő eredményeink a vizelet citológia alacsony szenzitivitására utalnak, hiszen e vizsgálat a betegek csupán 29%-ánál mutatott pozitivitást.

A húgyhólyag urothel sejtes carcinomájának TNM stádiumbeosztása nem alkalmazható UrC esetén, mivel az urothel sejtes daganat a hólyag belsejéből terjed a hasüreg felé, míg az UrC a hólyag külső rétegei felől terjed annak lumene felé, ezért UrC esetén külön staging rendszerre van szükségünk. Konszenzus hiányában napjainkban két UrC-ára szabott stádiumbesorolást, a Sheldon- [8] illetve Mayo-féle [18] stádiumrendszert is alkalmazzák. A Sheldon- és a Mayo-féle stádiumbesorolás prognosztikai értékével és klinikai alkalmazhatóságával kapcsolatban megoszlanak a vélemények. A Sheldon-féle stádiumbesorolást érő leggyakoribb kritika, hogy a betegek

eloszlása az egyes stádium csoportokban igen egyenetlen, ugyanis a legtöbb frissen diagnosztizált UrC a Sheldon III stádiumába sorolódik. Ezzel szemben a Mayo-rendszerben a betegek eloszlása a különböző stádium csoportokban sokkal kiegyensúlyozottabb, így a gyakorlatban könnyebben alkalmazható. A kétféle stádiumrendszer prognosztikus erejének összevetését négy független tanulmány felhasználásával végeztük el, melyekben összesen 179 UrC-ás beteg adatait dolgoztuk fel. E tanulmányok szerint mindkét stádiumbesorolási rendszer szignifikáns összefüggést mutat a betegek túlélésével és így alkalmas a betegség prognózisának előrejelzésére. Mindezekkel együtt a Mayo-féle stádiumrendszer használata mégis kézenfekvőbbnek bizonyult: egyrészt a betegek besorolása a különböző tumor stádiumokba jóval átláthatóbb, másrészt a prognosztikus értéke a multivariencia vizsgálatokban erősebbnek bizonyult a Sheldon-féle stádiumrendszerrel szemben [20, 23, 25, 26].

Az általunk mutációanalízisnek alávetett 31 UrC beteg adatait feldolgozva a Sheldon-stádium, a malignitási fok, a pecsétgyűrűsejtes komponens és a köldökeltávolítás mutatott összefüggést a betegek túlélésével, bár ezek az összefüggések – feltehetően az statisztikai szempontból alacsony esetszámból adódóan – nem bizonyultak szignifikánsnak.

Az UrC kedvezőtlen prognózisú betegség, melynek legfőbb oka, hogy rejtett anatómiai elhelyezkedése miatt többnyire csak előrehaladott állapotban mutat tüneteket, ezért felismerése általában későn történik meg, amikor a hólyag falát áttörve eléri annak lumenét. A nagyobb esetszámú publikációk szerint a diagnózistól számított öt évet a betegek körülbelül fele [5, 18, 20, 35], míg a tíz évet mintegy harmada éli túl [5, 21, 22]. Az UrC prognosztikus tényezőinek vizsgálatakor összesen 10 tanulmány 620 UrC-ás betegének adatait összesítettük [5, 21, 24, 25, 42]. E tanulmányokban a következő paraméterek prognosztikus értékét vizsgálták: (1) életkor, (2) nem, (3) Sheldon-stádium, (4) Mayo-stádium, (5) malignitás fok, (6) nyirokcsomó státusz, (7) távoli áttétek jelenléte, (8) pozitív sebészi szél, (9) tumor méret, (10) peritoneum érintettség, (11) pecsétgyűrűsejtes komponens jelenléte, (12) tumor nyáktermelése, (13) nyirokcsomóeltávolítás és (14) köldökeltávolítás hatása, (15) radikális műtét hatása, (16) a betegek általános állapota (ECOG-státusz).

A fenti klinikai és patológiai adatok közül a legalább egy tanulmány univariancia analízisében a túléléssel szignifikáns összefüggést mutató paraméterek a következők voltak: (1) Sheldon-stádium, (2) Mayo-stádium, (3) a tumor malignitási foka, (4) nyirokcsomó érintettség, (5) pozitív sebészi szél, (6) a betegek álltalános állapota (ECOG-státusz). A pecsétgyűrűsejtes komponens prognosztikai értékét két tanulmány vizsgálta ellentmondásos eredménnyel [5, 21].

A fenti klinikai és patológiai változók közül a multivariancia analízisben a (1) Sheldon- és a (2) Mayo-stádium, a (3) nyirokcsomó pozitivitás, a (4) pozitív sebészi szél és (5) a betegek ECOG besorolás szerinti állapota bizonyult független prognosztikai tényezőnek.

Az elsődlegesen választandó terápia az UrC nem metasztatizált eseteiben a sebészi kezelés. A leginkább ajánlott módszer a parciális cystectoma, mely a húgyhólyag érintett részén túl magába foglalja a ligamentum umbilicale medianum és a köldök en-bloc eltávolítását is.

A nyirokcsomók eltávolításának jelentősége jelenlegi ismereteink szerint ugyan nem bizonyított, azonban a limpfadenektomia elvégzése hasznos lehet, hiszen a nyirokcsomó pozitivitást patológiai vizsgálattal lehet a legmegbízhatóbban megállapítani. Még ha a nyirokcsomó eltávolítás önmagában nem is nyújt közvetlen onkológiai hasznot – a mikrometasztázisok korai felfedezése lehetőséget nyújthat a kemoterápiás kezelés korai megkezdéséhez növelve a betegek túlélési esélyeit. A nyirokcsomóeltávolítás azonban sokszor elmarad; összesített adataink szerint a betegeknek csupán 38%-ánál végezték el (248/647).

Egyértelműbbnek tűnik a helyzet a köldök eltávolításával kapcsolatban, hiszen ezen eljárás onkológiai hasznossága több vizsgálatban is egyértelműen kimutatható volt. Összefoglaló vizsgálatunk tanulsága szerint azonban a köldökeltávolítása napjainkig nem terjedt el kellő mértékben hiszen fontossága ellenére is csak a műtétek mindössze 67%-ában (287/429) végezték el.

A hólyag primer ADC-ájának sebészi terápiája a teljes hólyageltávolítás, míg az UrC esetében a részleges hólyageltávolítás ajánlott, ezért e két tumorentitás egymástól történő megkülönböztetése rendkívül fontos a terápiás döntések szempontjából. Az UrC és a hólyag primer ADC, valamint a CRC elkülönítése pusztán a szövettani kép alapján nem lehetséges. E differenciáldiagnosztikai probléma leküzdésének egyik lehetséges

módszere az immunhisztokémia [7, 68]. A fenti három tumorféleség elkülönítésére a CEA, a CK-7 és CK-20, a CDX2, a β-catenin és a CK-34βE12 tűnik a legalkalmasabbnak, a CRC és az UrC elkülönítésekor pedig a β-catenin lehet a segítségünkre.

Az UrC immunfenotípusáról e néhány markertől eltekintve egyelőre igen keveset tudunk. Immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz egyrészt olyan fehérjéket választottunk ki, melyeket széles körben, akár a mindennapi rutinban is gyakran vizsgálnak (Ki67, p53), másrészt olyan fehérjéket kerestünk, melyeket korábbi vizsgálatinkban az urothel sejtes carcinoma prognosztikus faktoraiként azonosítottuk (RHAMM, BGN, MMP-7, IMP3) [69-72], és amelyek colorectalis ADC-ában is relevánsnak bizonyultak [73-76].

A p53 a tumorszupresszor gének családjába tartozik, a „genom őrzőjének" is nevezik, mely mutációit eddig a daganatok több mint felénél találták meg. Feladata a daganatos sejtek kialakulásának megakadályozása a sejtciklus leállítása vagy apoptózis révén. A p53 sérülése a fehérjének a sejtmagban való felhalmozódását eredményezi, melyet rizikófaktorként azonosítottak több malignus betegségben is. Vizsgálataink a p53 kifejeződésének szignifikáns emelkedését mutatta ki a tumorszövetben ellentétben a tumort körülvevő stróma szövettel, ahol expressziója alacsonynak bizonyult. Jelen vizsgálataink nem igazolták a p53 prognosztikus értékét UrC-ában.

Egy másik, számos daganatban ismert prognosztikus fehérje a Ki67, mely a proliferáló sejtek magjában halmozódik fel. Mintáinkon a Ki67 erős sejtmagi akkumulációt mutatott a tumorsejtekben, ami a normál sejtekben nem volt megfigyelhető. A Ki67 fokozott expressziója valamint a túlélés között azonban nem találtunk összefüggést.

A RHAMM egy intracelluláris fehérje, mely citokinek hatására a sejt felszínére helyeződik, és a CD44-hez kötődve a MAPK-útvonal aktiválásán keresztül a sejt motilitását fokozza. Emelkedett expressziója és befolyása a kedvezőtlen kimenetelre ismert emlő-, prosztata- és húgyhólyagrák esetén [69]. Erős szöveti kifejeződését vizsgálataink UrC-ában is kimutatták, a sejteknek kizárólag a citoplazmája festődött, azonban a RHAMM festődés intenzitásának prognosztikus értékét nem tudtuk igazolni.

Egy másik, kutatócsoportunk által korábban vizsgált fehérje a BGN gén által kódolt byglican fehérje, mely az SLRP-k (small leucine repeated proteoglycan) családjába tartozik [70]. A tumorgenezist elsősorban a daganat progresszióját kontroll

alatt tartó biológiai mechanizmusok modulálásával segíti elő; módosítja az immunválaszt, megváltoztatja az extracelluláris mátrix összetételét és befolyással van a különböző növekedési faktorok aktivitására is. Prognosztikus hatása a gyomor-bélrendszer és a húgyhólyag daganatai esetén is bizonyítottak [70]. Immunhisztokémiai vizsgálataink UrC-ában a BGN gyenge citoplazmatikus festődését mutatták, azonban az expressziós szintek és a túlélés közötti összefüggést nem azonosították.

A mátrix metalloproteinázok családjának legkisebb méretű tagjaként ismert MMP-7 számos funkcióval támogatja a daganat progresszióját és a különböző citosztatikus terápiák iránti rezisztencia kialakulását. Korábbi vizsgálataink során az MMP-7 a prosztata- és a hólyagrákos mintáinkon is emelkedett expressziós szinteket mutatott az invazív tumorfronton, szöveti, szérum és vizelet szintjei pedig összefüggést mutattak a húgyhólyagrák kedvezőtlen túlélésével [77-80]. Urachus tumor mintáinkban azonban az MMP-7 nem mutatott fokozott kifejeződést és a túlélési adatokkal sem állt összefüggésben.

Az IMP3 egy onkofötális fehérje, mely normálisan csak embrionális korban termelődik, de egészséges felnőtt szervezetben nem jelenik meg. Néhány daganatban az IMP3 azonban erős expressziót mutat. Kutatócsoportunk egy korábbi munkájában izom-invazív hólyag daganatos mintáinkon az IMP3 emelkedett szintjét független prognosztikus faktorként azonosította [71], jelen tanulmányban pedig az IMP3 szöveti expresszióját szignifikáns mértékben emelkedettebbnek találta az urachus mintáink tumoros sejtjeiben az egészséges sejtekhez képest. Ezen felül a korai, szervre lokalizált (Sheldon IIIA vagy alacsonyabb stádiumú) urachus tumorok esetén az IMP3 expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint az előrehaladottabb stádiumú UrC szöveti minták esetében. Ez arra enged következtetni, hogy az IMP3 a korai daganatképzésben játszhat szerepet, a progresszió során azonban expressziója visszaszorul.

Az UrC jellemzően késői diagnózisából következően a daganat általában már progrediált állapotban kerül felfedezésre, amikor szisztémás terápiára van szükség. A diagnózis felállításakor metaanalízisünk szerint az UrC betegek 17%-a rendelkezett nyirokcsomó és 21%-a távoli áttéttel, emellett a műtétileg kezelt betegek 21%-ánál bizonyult a sebészi szél pozitívnak. Hatékony sugárkezelés hiányában az UrC-ás betegek jelentős hányada szorul szisztémás kezelésre. Az UrC ritkaságából kifolyólag

idáig nem született irányelv a különböző kemoterápiás szerek használatát illetőleg és a betegség alacsony incidenciája miatt előreláthatólag a jövőben sem számíthatunk nagy esetszámot felölelő, prospektív klinikai vizsgálatokra. Az ebből fakadó bizonytalanságot jól jellemzi, hogy az UrC-ás betegek kemoterápiás kezelésekor egyesek a daganat húgyhólyag érintettsége miatt az urothel sejtes carcinómában használatos platina-alapú szereket választják (22/74), míg mások a CRC-ával való szövettani hasonlósága miatt inkább az 5-FU alapú szereket részesítik előnyben (16/74). Metaanalízisünk során az 5-FU kezelésben részesült és a kombinált platina-5-FU kezelést kapó betegek mindkét csoportja magas arányban reagált a kezelésre (44% vs. 43%), ezen felül az 5-FU-t kapó betegek csoportjában a válaszadók aránya négyszer magasabb volt, mint a platina-alapú kezelést kapók csoportjában (44% vs. 10%). Ez alapján a platina-alapú, de 5-FU-t nem tartalmazó kezelések alkalmazását UrC-ában kerülendőnek tartjuk. A platina-5FU kombinált kezelés hatékonysága szignifikánsan jobb volt, mint a többi kezelési típusé. Mindezekből arra következtetünk, hogy a CRC-ában használt 5-FU-platina kombinációs kezelések hatékonyak UrC-ában, ezzel szemben az urothel sejtes carcinómában alkalmazott platina-alapú kezelések hatékonysága alacsony. Elmondható tehát, hogy a CRC kezelésére használt kemoterápiás módszerek felülmúlják az urothel sejtes daganatok kezelésében használatos kemoterápiák hatékonyságát, ami az UrC CRC-ával való közelebbi rokonságát támasztja alá az urothel daganatokkal szemben.

Az UrC előrehaladott stádiumú eseteiben a kemoterápiás kezeléseken túl felmerül a célzott kezelések alkalmazása is. Egy-egy kemoterápiás szer hatékonysága nagy esetszámot felölelő, prospektív klinikai vizsgálatok során tapasztalati úton határozható meg, ám egy olyan ritka daganatnál, mint az UrC, ilyen típusú vizsgálatok elvégzésére a jövőben sem nyílik lehetőség. A célzott terápiák egy-egy sérült szignálút elemeit célozzák meg, melyeknek érintettsége az adott tumorban molekuláris módszerekkel előre meghatározható, támpontot nyújtva az adott szer adott tumor elleni hatékonyságának vonatkozásában. Ezért a ritka tumorok esetén a célzott terápiák jelentősége még inkább felértékelődik. Ehhez azonban az adott tumorféleség molekuláris hátterének feltérképezésre van szükség. A korábban említett szövettani és molekuláris hasonlóságok alapján az UrC esetében érdemes azon szignálutakra koncentrálni, melyek CRC-ában gyakran érintettek. Az EGFR-jelátviteli út tagjainak

mutációi fontos terápiás támpontot jelentenek a metasztatikus CRC anti-EGFR kezelésében. Az irodalomból eddig két UrC-ás beteg anti-EGFR kezelése ismert. Az egyik tanulmányban molekuláris vizsgálat elvégzése nélkül egy UrC beteg esetében sikerült 55%-os parciális remissziót elérni, melyet a tumor Ki67 proliferációs indexének szignifikáns csökkenése kísért [45]. Egy másik, közelmúltban publikált UrC betegnél a molekuláris vizsgálatok EGFR gén amplifikációt és vad típusú KRAS gént mutattak ki, ami alapján anti-EGFR (cetuximab) kezelés kezdődött, mely a tumor méretének csökkenéséhez és a beteg állapotának javulásához vezetett [44]. Ezek az eredmények tehát bíztatóak az UrC anti-EGFR kezelésére vonatkozóan. Az EGFR-inhibitor iránti rezisztencia gyakran együtt jár a vad-típusú EGFR gén jelenlétével és az EGFR-ből kiinduló valamely szignálút egyik tagjának aktiváló mutációjával. Ezért CRC esetén az EGFR elleni célzott terápia (cetuximab) alkalmazhatóságának feltétele, hogy az EGFR alatti szignál transzdukciós út tagjaiban (KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA) ne legyen jelen ilyen mutáció. A leggyakrabban érintett a RAS-RAF-MAPK jelátviteli út, mely mutálódásakor – a receptor aktivitásától függetlenül – a sejtosztódás és sejtnövekedés kontrolálhatatlanná válik, ami végül a sejt daganatos elfajulásához vezet. Molekuláris genetikai vizsgálatunkban az EGFR szignálút mutációs mintázatának UrC-ában történő feltérképezését tűztük ki célul. Ehhez 31 beteg tumor mintáján piroszekvenálással határoztuk meg az EGFR-szignálút tagjaiban (EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA) a leggyakoribb forrópont mutációk jelenlétét. E vizsgálat segítségével az UrC EGFR-inhibitorokkal szembeni várható hatékonyságát szerettük volna megbecsülni. Ezen túlmenően a vizsgált gének mutációinak UrC-ában előforduló gyakoriságait az urothel sejtes daganatokban, a CRC-ában és primer hólyag ADC-ában előforduló gyakoriságaival összevetve molekuláris taxonómiai képet kaphatunk az UrC e tumorféleségekkel való rokonsági fokáról. Ezért a fenti gének érintettségének frekvenciáit összevetettük az irodalomban fellelhető, a CRC-ában valamint a hólyag urothel és primer ADC-ájában publikált mutáció gyakorisági adatokkal.

Az EGFR-gén mutációja ritka eseménynek számít CRC esetén (~4%) [81-83], míg a hólyag urothel sejtes [84-86] és primer ADC-ájában [87] az EGFR mutációk nem jellemzőek. Vizsgálataink hasonló eredményt hoztak UrC esetén is, ugyanis az EGFR-gén egyetlen minta esetén sem tartalmazott mutációt.

A KRAS a G-fehérjék közé tartozik, melynek vad típusa jellemzően egy rövid aktivációs időt követően deaktiválódik. Ezzel szemben az aktiváló mutációt szenvedett KRAS gén egy olyan fehérjét termel, mely deaktiválódása elmarad, s így folyamatosan bekapcsolt állapotban tartja a szignálutat, ezáltal ligand kötődése nélkül is szüntelen osztódási és proliferációs jelet küld a sejtnek [88, 89]. Ennek eredményeképpen a daganat rezisztenssé válik az anti-EGFR terápiára, ezért a KRAS gén aktiváló mutációinak vizsgálat útján történő kizárása különösen fontos, amikor egy beteg anti-EGFR terápiáját tervezzük. A CRC-ák majdnem felénél (~40%) fordul elő a KRAS gén aktiváló mutációja [81, 83, 90-93], azonban a hólyag urothel sejtes [85, 94-97] és primer ADC-ájánál [87, 98] ezen eltérések ritkább eseménynek számítanak (3% és <18%). UrC-ában a KRAS gén érintettségét eddig öt kisebb tanulmány összesen 71 betegen vizsgálta, melyek közül 20 esetben (28%) találtak aktiváló KRAS mutációt [44, 87, 98-100]. Saját vizsgálataink ezen eredményekkel egybehangzóan az esetek 26%-ában (8/31) azonosították a KRAS gén mutációját. Ezek alapján elmondható, hogy a KRAS gén érintettsége UrC esetén ugyanúgy gyakori, mint a hólyag primer ADC-ájában illetve CRC esetén, szemben a hólyag urothel sejtes carcinomájával. Érdekes különbség azonban az UrC és a CRC KRAS mutációi között, hogy míg a CRC esetén ritkának számít a 61-es és 146-os kodon érintettsége (<5%), vizsgálataink az UrC-ás betegek felénél találtak eltérését az említett kodonokon. A CRC betegek körében a KRAS gén aktiváló mutációját hordozó betegeknél a nyirokcsomók érintettsége és a távoli áttétek jelenléte szignifikánsan gyakrabban fordul elő, mint vad típusú társaiknál [101-103]. Ennek alapján azt várnánk, hogy a KRAS gén érintettsége UrC-ában is előre vetíti a daganat korai szóródásának lehetőségét. Ezzel szemben Sirintrapun eredményei azt mutatták, hogy az összesen vizsgált hét UrC-ás beteg közül az a három mutatott hosszabb túlélést, melyek KRAS mutációt hordoztak [99]. Egy frissen publikált esettanulmányban a szerzők egy KRAS mutáns UrC-ás beteg esetében több, mint 3 év progresszió mentes túlélést találtak, ami szintén a KRAS mutáció pozitív esetek kedvezőbb prognózisát támasztja alá [104]. Hasonló tendenciát figyeltünk meg az általunk vizsgált 31 UrC beteg esetében; a 8 KRAS mutációt hordozó beteg egyikénél sem fordult elő metasztázis, míg a vad típusú KRAS-t hordozó 23 beteg közül 6-nál fordult elő nyirokcsomó pozitivitás vagy távoli metasztázist. Ez arra utal, hogy a KRAS gén mutációja UrC esetén inkább kedvező prognosztikai jelnek tekinthető. Ennek

megerősítésére azonban további független beteganyagon elvégzett vizsgálatra lenne szükség.

CRC esetében megfigyelték, hogy a vad típusú KRAS gént hordozó betegek körülbelül fele nem reagál az anti-EGFR terápiára [105]. Ilyen esetekben előfordulhat, hogy a BRAF vagy az NRAS gén tartalmaz aktiváló mutációt. A BRAF érintettsége viszonylag gyakori CRC-ás betegeknél (10%) [81, 83, 91, 92, 106], a hólyag urothel sejtes daganatainál azonban BRAF mutáció nem fordul elő [85, 97], a primer ADC-ában előforduló BRAF mutációk jelenlétéről pedig összesen egy friss tanulmány áll rendelkezésünkre, mely 12 beteg közül egynél (8%) írta le a BRAF gén mutációját [98]. Vizsgálatunkban az UrC-ás betegek 16%-ánál találtunk BRAF mutációt, mely így hasonlóan gyakori a CRC-ában közölt értékekkel. Az NRAS gén vizsgálatakor mindössze egy mintában találtunk mutációt (3%), mely hasonlóan ritka előfordulásra utal, mint CRC-ában (~5%) [81, 83, 92, 107] vagy az urothel sejtes carcinomában (~1%) [85, 94, 96, 97].

A PIK3CA a PI3K jelátviteli út tagjaként alapvető feladatot lát el a sejt növekedésében, túlzott működése pedig a sejtek apoptózisának gátlásán keresztül elősegíti a daganatok kialakulását. Az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztenciának a kialakulásában a PIK3CA-gén aktiváló mutációja is szerepet játszhat. Ezen felül számos tanulmány a ciklooxigenáz-2 (COX-2) gátlóknak (mint például az aszpirinnek) a protektív hatásáról számol be a CRC-ás betegeknél. Az aszpirin csökkenti a vastagbélben a polipképződést, ezzel a CRC későbbi kialakulásának esélyét is [108, 109]. Továbbá az aszpirinnek a CRC diagnózisának felállítását követően is ismert a jótékony hatása: az ilyenkor elkezdett rendszeres aszpirin szedés a betegek túlélésére kedvezően hat, így az aszpirint gyakran alkalmazzák adjuváns terápiaként [110-113]. Az aszpirin a PI3K jelátviteli útvonal aktivitását csökkenti, gátolva ezzel a daganatsejtek növekedést és elősegítve azok programozott sejthalálát. Így nem meglepő, hogy számos vizsgálat célozta a PIK3CA-gén aktiváló mutációval rendelkező illetve a vad típusú CRC betegek klinikai paramétereinek összehasonlítását az aszpirin kezelés hatására. E kutatások eredményei azt hangsúlyozzák, hogy azoknál a CRC-ás betegeknél, akik PIK3CA mutációval rendelkeznek, az aszpirin rendszeres szedése kedvezőbb hatású, mint azoknál, akiknek PIK3CA génje vad típusú [108, 114, 115]. A CRC-ában a PIK3CA gén aktiváló mutációi a 9-es és 20-as exonon viszonylag gyakran

fordulnak elő (~15%) [81, 83, 92, 107], ám urothel sejtes carcinomában sem ritka a megjelenésük (~20%) [85, 96, 97, 116]. Ezzel szemben saját UrC-ás mintáink analízisekor egyik mintában sem találtunk PIK3CA mutációt.

Összességében elmondhatjuk, hogy mind az UrC, mind pedig a CRC esetén gyakori a KRAS és a BRAF gének mutációja, még az NRAS és az EGFR gének mutációi mindkét tumorban ritkán fordulnak elő.

A fenti eredményekből az a következtetés vonható le, hogy az UrC mutációs mintázata sok hasonlóságot mutat a CRC-ával, míg az urothel sejtes daganat mutációs profiljától jelentősen eltér.

Az UrC és a CRC molekuláris és genetikai hátterében tehát nagymértékű hasonlóságot találtunk, melyet metaanalízisünk és mutáció analízisünk is alátámasztott. Mindez arra utal, hogy a CRC-ánál használt citosztatikus és célzott kezelések (azaz az 5-FU-alapú kemoterápia és az anti-EGFR terápia) hatékonyak lehetnek UrC esetén is. Eredményeink megmutatták, hogy az EGFR-jelátviteli út tagjainak mutációi gyakoriak UrC esetén, ezért mindenképp célszerű elvégezni az EGFR-jelátviteli út mutáció analízisét, ha UrC betegünk EGFR-inhibitor kezelését tervezzük.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

1) Metaanalízisünk megmutatta, hogy a CRC-ában alkalmazott 5-FU-alapú kemoterápiás kezelések hatékonyabbak UrC-ában, mint az urothel sejtes carcinomában használt ciszplatin-alapú kezelések. A leghatékonyabb kemoterápiás kezelésnek az 5-FU és ciszplatin kombinációja tűnik.

2) Az UrC és a CRC genetikai hasonlósága megerősíti azt az elképzelésünket, hogy a CRC-ában használt kezelési lehetőségek – például az EGFR-gátlók – hatékonyak lehetnek UrC esetén is. Vizsgálataink megmutatták, hogy UrC-ában az EGFR-szignálút tagjaiban gyakran fordulnak elő aktiváló génmutációk, ami az EGFR-szignálút mutációanalízisének fontosságát hangsúlyozza azokban az esetekben, amikor UrC-ás betegek EGFR-gátló terápiáját tervezzük.

3) Összehasonlítva az UrC, a CRC és az urothel sejtes carcinoma mutációs mintázatát megállapítottuk, hogy az UrC mutációi lényeges átfedést mutatnak a CRC és a hólyag primer ADC mutációs mintázatával, míg az urothel sejtes daganatétól markánsan eltérnek.

4) Immunhisztokémiai vizsgálataink a RHAMM, az IMP3, a Ki67 és a p53 fehérje expressziójának normál szövetekhez képesti emelkedését mutatták ki a tumorszövetben. Az IMP3 ezen felül szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a korai stádiumú (Sheldon >IIIA) eseteknél, amiből arra következtetünk, hogy az IMP3 a korai karcinogenezisben játszhat szerepet.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Az urachus carcinoma (UrC) egy ritka és kedvezőtlen prognózisú betegség, mely klinikai viselkedéséről és molekuláris jellemzőiről keveset tudunk. Jelen értekezés e betegség aktuális klinikai kérdéseit, valamint molekuláris és genetikai hátterét vizsgálja.

A különböző kemoterápiás kezelések hatékonyságának összehasonlítása céljából irodalomkutatást végeztünk. Megállapítottuk, hogy az UrC-ás betegek az 5-FU-alapú kezelésekre jobban reagálnak, mint a platina-alapú kezelésekre, ám a legjobb terápiás válasz a két kemoterápiás szer kombinált alkalmazásával érhető el.

Az UrC genetikai hátterét vizsgálva összesen 31 UrC mintán végeztük el az EGFR-szignálút mutációanalízisét, mely során a KRAS és a BRAF gének gyakori érintettségét igazoltuk. Eredményeinket irodalmi adatokkal összegezve összehasonlítottuk a különböző tumorentitások mutációs profilját és megállapítottuk, hogy az UrC mutációs mintázata nagymértékben hasonlít a colorectalis carcinoma (CRC) és a hólyag primer adenocarcinomájának mutációs mintázatára. Eredményeink azt mutatták, hogy a KRAS és BRAF gének UrC-ában gyakran hordoznak aktiváló mutációkat, ezért fontos az EGFR-jelátviteli út tagjainak mutációanalízisét elvégezni, ha UrC-ás betegek EGFR-inhibitor kezelését tervezzük.

Az UrC molekuláris hátterének további feltérképezése céljából CRC és urothel sejtes carcinomában is ismert prognosztikus fehérjemarkerek szöveti expresszióját vizsgáltuk. Vizsgálataink a RHAMM, az IMP3, a Ki67 és p53 markerek kifejeződését a tumorsejtek citoplazmájában erőteljesebbnek találták a nem tumoros szövetekhez képest. Továbbá emelkedett IMP3 szöveti expressziót találtunk a korai tumorstádiumú betegeknél, mely az IMP3 korai tumorképződés szakaszában betöltött szerepét veti fel.

Eredményeink alapján a szisztémás kezelést igénylő UrC-ás betegeknek elsővonalbeli 5-FU-platina kombinált kezelést javaslunk, másodvonalban pedig az EGFR szignálút mutációanalízisének eredményétől függően EGFR-inhibitorok alkalmazását javasoljuk.

9 SUMMARY

Urachal cancer (UrC) is a rare disease with poor prognosis. Our knowledge on it's clinical behaviour and molecular features is limited. In this study, we aimed to gain a detailed insight into the clinical and molecular features of UrC. For this, we performed a literature review and a meta-analysis of the published data of UrC. Moreover with molecular genetic methods we performed the mutation analysis of the EGFR pathway.

We found that 5-FU-based chemotherapies are superior to platinum-based regimens. The best therapy response can be achieved when combining 5-FU with platinum.

In the present study, we collected 31 UrC tumor samples and performed the DNA tumor sequencing of the most commonly affected EGFR-pathway genes. Our analysis revealed the frequent occurrence of KRAS and BRAF mutations in UrC. Determined mutational frequencies highlighted a clear similarity between the mutational patterns of CRC and UrC. Anti-EGFR therapy seems to be a reasonable alternative for those UrC patients who do not respond to chemotherapy.

In a further analysis, we immunohistochemically assessed the tissue expressions of five proteins (Ki67, p53, MMP7, IMP3, RHAMM, BGN) with proven prognostic value in urothelial and colorectal carcinoma. Ki67, p53, IMP3 and RHAMM showed higher expressions in UrC compared to adjacent normal tissue. In addition, IMP3 were stronger expressed in lower stage UrC suggesting a role for IMP3 in the earlier stages of UrC.

Our results provide clinically relevant information for both chemotherapeutic and targeted treatment of UrC. For UrC patients requiring systemic treatment, we recommend the combination of 5-FU with cisplatin as a first-line. Upon failure of chemotherapy, an anti-EGFR therapy should be considered based on prior molecular analysis of the mutation status of the EGFR-pathway.

10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Begg, R.C. (1930) The Urachus: its Anatomy, Histology and Development. J Anat, 64: 170-83.
2. Rowe, P.C. and J.P. Gearhart. (1993) Retraction of the umbilicus during voiding as an initial sign of a urachal anomaly. Pediatrics, 91: 153-4.
3. Austin, P.F., *Pediatric Urology - Surgical complications and management*, P.P.G. Duncan T Wilcox, Martin A Koyle, Wiley-Blackwell, New Jersey, 2008: 92-96.
4. Lee, S.R., H. Kang, M.H. Kang, Y.D. Yu, C.I. Choi, K.H. Choi, D.S. Park and Y.K. Hong. (2015) The Youngest Korean Case of Urachal Carcinoma. Case Rep Urol, 2015: 707456.
5. Bruins, H.M., O. Visser, M. Ploeg, C.A. Hulsbergen-van de Kaa, L.A. Kiemeney and J.A. Witjes. (2012) The clinical epidemiology of urachal carcinoma: results of a large, population based study. J Urol, 188: 1102-7.
6. Herr, H.W., B.H. Bochner, D. Sharp, G. Dalbagni and V.E. Reuter. (2007) Urachal carcinoma: contemporary surgical outcomes. J Urol, 178: 74-8;.
7. Paner, G.P., J.K. McKenney, G.A. Barkan, J.L. Yao, W.L. Frankel, T.J. Sebo, S.S. Shen and R.E. Jimenez. (2011) Immunohistochemical analysis in a morphologic spectrum of urachal epithelial neoplasms: diagnostic implications and pitfalls. Am J Surg Pathol, 35: 787-98.
8. Sheldon, C.A., R.V. Clayman, R. Gonzalez, R.D. Williams and E.E. Fraley. (1984) Malignant urachal lesions. J Urol, 131: 1-8.
9. Hurle, R., M. Lazzeri, P. Colombo, N. Buffi, E. Morenghi, R. Peschechera, L. Castaldo, L. Pasini, P. Casale, M. Seveso, S. Zandegiacomo, G. Taverna, A. Benetti, G. Lughezzani, G. Fiorini and G. Guazzoni. (2016) "En Bloc" Resection of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: A Prospective Single-center Study. Urology, 90: 126-30.
10. Chen, Z.F., F. Wang, Z.K. Qin, Y.P. Dai, F.J. Zhou, H. Han, Z.W. Liu, S.L. Yu, Y.H. Li and Y.L. Ye. (2008) [Clinical analysis of 14 cases of urachal carcinoma]. Ai Zheng, 27: 966-9.
11. Tareen, F., D.T. McDowell, M. O'Sullivan and A. Mortell. (2013) Urachal carcinoid--a new presentation. Eur J Pediatr Surg, 23: e1-2.
12. Huang, H.Y., S.F. Ko, J.H. Chuang, Y.M. Jeng, M.T. Sung and W.J. Chen. (2002) Primary yolk sac tumor of the urachus. Arch Pathol Lab Med, 126: 1106-9.
13. Gopalan, A., D.S. Sharp, S.W. Fine, S.K. Tickoo, H.W. Herr, V.E. Reuter and S. Olgac. (2009) Urachal carcinoma: a clinicopathologic analysis of 24 cases with outcome correlation. Am J Surg Pathol, 33: 659-68.
14. David Bostwick, L.C., *Urologic Surgical Pathology*, Elsevier, Amsterdam, 2014: 976.
15. Behrendt, M.A., D.E.J. J and V.A.N.R. BW. (2016) Urachal cancer: contemporary review of the pathological, surgical, and prognostic aspects of this rare disease. Minerva Urol Nefrol, 68: 172-84.
16. Siefker-Radtke, A. (2012) Urachal adenocarcinoma: a clinician's guide for treatment. Semin Oncol, 39: 619-24.
17. Zhang, J. and J. Wu. (2013) Options for diagnosis and treatment of urachal carcinoma. Asia Pac J Clin Oncol, 9: 117-22.
18. Molina, J.R., J.F. Quevedo, A.F. Furth, R.L. Richardson, H. Zincke and P.A. Burch. (2007) Predictors of survival from urachal cancer: a Mayo Clinic study of 49 cases. Cancer, 110: 2434-40.
19. Marta Biedka, E.Z., Bogdan Malkowski, Roman Makarewicz. (2011) Carcinoma of the urachus and the role of PET-CT in disease recurrence - case report. Contemporary Oncology 15: 111-114.

20. Wright, J.L., M.P. Porter, C.I. Li, P.H. Lange and D.W. Lin. (2006) Differences in survival among patients with urachal and nonurachal adenocarcinomas of the bladder. Cancer, 107: 721-8.
21. Niedworok, C., M. Panitz, T. Szarvas, H. Reis, A.C. Reis, A. Szendroi, P. Nyirady, A.M. Szasz, O. Modos, H. Rubben and F. Vom Dorp. (2016) Urachal Carcinoma of the Bladder: Impact of Clinical and Immunohistochemical Parameters on Prognosis. J Urol, 195: 1690-6.
22. Pinthus, J.H., R. Haddad, J. Trachtenberg, E. Holowaty, J. Bowler, A.M. Herzenberg, M. Jewett and N.E. Fleshner. (2006) Population based survival data on urachal tumors. J Urol, 175: 2042-7; discussion 2047.
23. Dhillon, J., Y. Liang, A.M. Kamat, A. Siefker-Radtke, C.P. Dinney, B. Czerniak and C.C. Guo. (2015) Urachal carcinoma: a pathologic and clinical study of 46 cases. Hum Pathol, 46: 1808-14.
24. Kim, I.K., J.Y. Lee, J.K. Kwon, J.J. Park, K.S. Cho, W.S. Ham, S.J. Hong, S.C. Yang and Y.D. Choi. (2014) Prognostic factors for urachal cancer: a bayesian model-averaging approach. Korean J Urol, 55: 574-80.
25. Ashley, R.A., B.A. Inman, T.J. Sebo, B.C. Leibovich, M.L. Blute, E.D. Kwon and H. Zincke. (2006) Urachal carcinoma: clinicopathologic features and long-term outcomes of an aggressive malignancy. Cancer, 107: 712-20.
26. Gore, D.M., S. Bloch, W. Waller and P. Cohen. (2006) Peritoneal mucinous cystadenocarcinoma of probable urachal origin: a challenging diagnosis. J Clin Pathol, 59: 1091-3.
27. O'Leary, M. and M. Foley. (2004) A case of urachal carcinoma. J Obstet Gynaecol, 24: 332-3.
28. Ceylan, C.B., O; Keklik, T T; Doluoglu, O G. (2012) Urachal cancer in a 47-year-old patient: a case report and a literature review. British Journal of Medicine & Medical Research, 2: 693-700.
29. Koster, I.M., P. Cleyndert and R.W. Giard. (2009) Best cases from the AFIP: urachal carcinoma. Radiographics, 29: 939-42.
30. Wheeler, J.D. and W.T. Hill. (1954) Adenocarcinoma involving the urinary bladder. Cancer, 7: 119-35.
31. Henly, D.R., G.M. Farrow and H. Zincke. (1993) Urachal cancer: role of conservative surgery. Urology, 42: 635-9.
32. Johnson, D.E., G.B. Hodge, F.W. Abdul-Karim and A.G. Ayala. (1985) Urachal carcinoma. Urology, 26: 218-21.
33. Paner, G.P., G.A. Barkan, V. Mehta, S.J. Sirintrapun, T. Tsuzuki, T.J. Sebo and R.E. Jimenez. (2012) Urachal carcinomas of the nonglandular type: salient features and considerations in pathologic diagnosis. Am J Surg Pathol, 36: 432-42.
34. Siefker-Radtke, A.O., *Urachal and Non-urachal Adenocarcinomas of the Bladder*, L. Pagliaro, Springer International Publishing AG Switzerland Cham, 2016: 143-150.
35. Siefker-Radtke, A.O., J. Gee, Y. Shen, S. Wen, D. Daliani, R.E. Millikan and L.L. Pisters. (2003) Multimodality management of urachal carcinoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. J Urol, 169: 1295-8.
36. Elser, C., J. Sweet, S.K. Cheran, M.A. Haider, M. Jewett and S.S. Sridhar. (2012) A case of metastatic urachal adenocarcinoma treated with several different chemotherapeutic regimens. Can Urol Assoc J, 6: E27-31.
37. Wadhwa, P., S.B. Kolla and A.K. Hemal. (2006) Laparoscopic en bloc partial cystectomy with bilateral pelvic lymphadenectomy for urachal adenocarcinoma. Urology, 67: 837-43.

38. Yazawa, S., E. Kikuchi, T. Takeda, K. Matsumoto, A. Miyajima, K. Nakagawa and M. Oya. (2012) Surgical and chemotherapeutic options for urachal carcinoma: report of ten cases and literature review. Urol Int, 88: 209-14.
39. Chen, D., Y. Li, Z. Yu, Z. Su, L. Ni, Y. Gui, S. Yang, B. Shi and Y. Lai. (2014) Investigating urachal carcinoma for more than 15 years. Oncol Lett, 8: 2279-2283.
40. Galsky, M.D., A. Iasonos, S. Mironov, J. Scattergood, S.M. Donat, B.H. Bochner, H.W. Herr, P. Russo, M.G. Boyle and D.F. Bajorin. (2007) Prospective trial of ifosfamide, paclitaxel, and cisplatin in patients with advanced non-transitional cell carcinoma of the urothelial tract. Urology, 69: 255-9.
41. Logothetis, C.J., M.L. Samuels and S. Ogden. (1985) Chemotherapy for adenocarcinomas of bladder and urachal origin: 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin-C. Urology, 26: 252-5.
42. Jung, H.A., J.M. Sun, S.H. Park, G.Y. Kwon and H.Y. Lim. (2014) Treatment outcome and relevance of palliative chemotherapy in urachal cancer. Chemotherapy, 60: 73-80.
43. Tatokoro, M., S. Kawakami, J. Yonese, Y. Fujii, Y. Okubo, S. Yamamoto, H. Takeshita, Y. Komai, Y. Ishikawa and I. Fukui. (2008) Preliminary report of multimodal treatment with ifosfamide, 5-fluorouracil, etoposide and cisplatin (IFEP chemotherapy) against metastatic adenocarcinoma of the urachus. Int J Urol, 15: 851-3.
44. Collazo-Lorduy, A., M. Castillo-Martin, L. Wang, V. Patel, G. Iyer, E. Jordan, H. Al-Ahmadie, I. Leonard, W.K. Oh, J. Zhu, R.B. McBride, C. Cordon-Cardo, D.B. Solit, J.P. Sfakianos and M.D. Galsky. (2016) Urachal Carcinoma Shares Genomic Alterations with Colorectal Carcinoma and May Respond to Epidermal Growth Factor Inhibition. Eur Urol.
45. Goss, G., H. Hirte, W.H. Miller, Jr., I.A. Lorimer, D. Stewart, G. Batist, D.A. Parolin, P. Hanna, S. Stafford, J. Friedmann, W. Walsh, S. Mathews, L. Douglas and L.K. Seymour. (2005) A phase I study of oral ZD 1839 given daily in patients with solid tumors: IND.122, a study of the Investigational New Drug Program of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Invest New Drugs, 23: 147-55.
46. Loh, K.P., E. Mondo, E.A. Hansen, L. Sievert, C. Fung, D.M. Sahasrabudhe and E. Guancial. (2016) Targeted Therapy Based on Tumor Genomic Analyses in Metastatic Urachal Carcinoma. Clin Genitourin Cancer, 14: e449-52.
47. Testa, I., E. Verzoni, P. Grassi, M. Colecchia, F. Panzone and G. Procopio. (2014) Response to targeted therapy in urachal adenocarcinoma. Rare Tumors, 6: 5529.
48. Docs, O., F. Fazakas, N.L. Horvath, L. Toth, C. Andras, Z. Horvath and G. Mehes. (2015) Changes of KRAS Exon 2 Codon 12/13 Mutation Status in Recurrent Colorectal Cancer. Pathol Oncol Res, 21: 399-404.
49. Zahreddine, H. and K.L. Borden. (2013) Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. Front Pharmacol, 4: 28.
50. Antonarakis, E.S., C. Lu, B. Luber, H. Wang, Y. Chen, M. Nakazawa, R. Nadal, C.J. Paller, S.R. Denmeade, M.A. Carducci, M.A. Eisenberger and J. Luo. (2015) Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. JAMA Oncol, 1: 582-91.
51. Gerlinger, M., A.J. Rowan, S. Horswell, J. Larkin, D. Endesfelder, E. Gronroos, P. Martinez, N. Matthews, A. Stewart, P. Tarpey, I. Varela, B. Phillimore, S. Begum, N.Q. McDonald, A. Butler, D. Jones, K. Raine, C. Latimer, C.R. Santos, M. Nohadani, A.C. Eklund, B. Spencer-Dene, G. Clark, L. Pickering, G. Stamp, M. Gore, Z. Szallasi, J. Downward, P.A. Futreal and C. Swanton. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med, 366: 883-92.

52. Hayashi, T., T. Yuasa, S. Uehara, Y. Inoue, S. Yamamoto, H. Masuda, Y. Fujii, I. Fukui and J. Yonese. (2016) Clinical outcome of urachal cancer in Japanese patients. Int J Clin Oncol, 21: 133-8.
53. Sekine, H., K. Ohya, S. Kojima and K. Mizuguchi. (2002) Dermatomyositis associated with urachal adenocarcinoma. J Urol, 168: 1488-9.
54. Koyama, I., Y. Yamazaki, R. Nakamura, R. Yago, M. Nakamura, H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Ichikawa and H. Toma. (1995) [A case of urachal carcinoma associated with elevated levels of CA19-9]. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 86: 1587-90.
55. Nakamura, K., N. Terada, Y. Shimizu, T. Kobayashi, Y. Sugino, T. Yamasaki, Y. Matsui, M. Imamura, K. Okubo, T. Kamba, K. Yoshimura and O. Ogawa. (2013) [Pseudomyxoma peritonei arising from urachal carcinoma]. Hinyokika Kiyo, 59: 657-62.
56. Kise, H., H. Kanda, N. Hayashi, K. Arima, M. Yanagawa and J. Kawamura. (2000) Alpha-fetoprotein producing urachal tumor. J Urol, 163: 547.
57. Jo, E.J., C.H. Choi, D.S. Bae, S.H. Park, S.R. Hong and J.H. Lee. (2011) Metastatic urachal carcinoma of the ovary. J Obstet Gynaecol Res, 37: 1833-7.
58. Bratu, O., V. Madan, C. Ilie, F. Rusu, C. Ghilic, C. Farcas and D. Mischianu. (2009) About the urachus and its pathology. A clinical case of urachus tumor. J Med Life, 2: 232-6.
59. Clapuyt, P., C. Saint-Martin, P. De Batselier, B. Brichard, F.X. Wese and S. Gosseye. (1999) Urachal neuroblastoma: first case report. Pediatr Radiol, 29: 320-1.
60. Berendsen, A.D., L.W. Fisher, T.M. Kilts, R.T. Owens, P.G. Robey, J.S. Gutkind and M.F. Young. (2011) Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan. Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 17022-7.
61. Grignon, D.J., J.Y. Ro, A.G. Ayala, D.E. Johnson and N.G. Ordonez. (1991) Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic analysis of 72 cases. Cancer, 67: 2165-72.
62. Santucci, R.A., L.D. True and P.H. Lange. (1997) Is partial cystectomy the treatment of choice for mucinous adenocarcinoma of the urachus? Urology, 49: 536-40.
63. Dandekar, N.P., A.V. Dalal, H.B. Tongaonkar and M.R. Kamat. (1997) Adenocarcinoma of bladder. Eur J Surg Oncol, 23: 157-60.
64. Thali-Schwab, C.M., P.J. Woodward and B.J. Wagner. (2005) Computed tomographic appearance of urachal adenocarcinomas: review of 25 cases. Eur Radiol, 15: 79-84.
65. Meeks, J.J., H.W. Herr, M. Bernstein, H.A. Al-Ahmadie and G. Dalbagni. (2013) Preoperative accuracy of diagnostic evaluation of the urachal mass. J Urol, 189: 1260-2.
66. Cho, S.Y., K.C. Moon, J.H. Park, C. Kwak, H.H. Kim and J.H. Ku. (2013) Outcomes of Korean patients with clinically localized urachal or non-urachal adenocarcinoma of the bladder. Urol Oncol, 31: 24-31.
67. Mylonas, K.S., O.M. P, I.A. Ziogas, L. El-Kabab and D. Nasioudis. (2017) Malignant urachal neoplasms: A population-based study and systematic review of literature. Urol Oncol, 35: 33 e11-33 e19.
68. Torenbeek, R., J.H. Lagendijk, P.J. Van Diest, H. Bril, F.J. van de Molengraft and C.J. Meijer. (1998) Value of a panel of antibodies to identify the primary origin of adenocarcinomas presenting as bladder carcinoma. Histopathology, 32: 20-7.
69. Niedworok, C., I. Kretschmer, K. Rock, F. Vom Dorp, T. Szarvas, J. Hess, T. Freudenberger, A. Melchior-Becker, H. Rubben and J.W. Fischer. (2013) The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder. PLoS One, 8: e75681.
70. Niedworok, C., K. Rock, I. Kretschmer, T. Freudenberger, N. Nagy, T. Szarvas, F. Vom Dorp, H. Reis, H. Rubben and J.W. Fischer. (2013) Inhibitory role of the small leucine-rich proteoglycan biglycan in bladder cancer. PLoS One, 8: e80084.

71. Szarvas, T., F. vom Dorp, C. Niedworok, A. Melchior-Becker, J.W. Fischer, B.B. Singer, H. Reis, A. Bankfalvi, K.W. Schmid, I. Romics, S. Ergun and H. Rubben. (2012) High insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP3) protein expression is associated with poor survival in muscle-invasive bladder cancer. BJU Int, 110: E308-17.
72. Szarvas, T., T. Jager, M. Becker, S. Tschirdewahn, C. Niedworok, I. Kovalszky, H. Rubben, S. Ergun and F. vom Dorp. (2011) Validation of circulating MMP-7 level as an independent prognostic marker of poor survival in urinary bladder cancer. Pathol Oncol Res, 17: 325-32.
73. Gu, X., Y. Ma, J. Xiao, H. Zheng, C. Song, Y. Gong and X. Xing. (2012) Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers. Clin Exp Med, 12: 195-9.
74. Koskensalo, S., J. Louhimo, S. Nordling, J. Hagstrom and C. Haglund. (2011) MMP-7 as a prognostic marker in colorectal cancer. Tumour Biol, 32: 259-64.
75. Li, D., D. Yan, H. Tang, C. Zhou, J. Fan, S. Li, X. Wang, J. Xia, F. Huang, G. Qiu and Z. Peng. (2009) IMP3 is a novel prognostic marker that correlates with colon cancer progression and pathogenesis. Ann Surg Oncol, 16: 3499-506.
76. Lugli, A., I. Zlobec, U. Gunthert, P. Minoo, K. Baker, L. Tornillo, L. Terracciano and J.R. Jass. (2006) Overexpression of the receptor for hyaluronic acid mediated motility is an independent adverse prognostic factor in colorectal cancer. Mod Pathol, 19: 1302-9.
77. Szarvas, T., M. Becker, F. vom Dorp, C. Gethmann, M. Tötsch, A. Bánkfalvi, K.W. Schmid, I. Romics, H. Rübben and S. Ergün. (2010) Matrix metalloproteinase-7 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in bladder cancer. Cancer Sci, 101: 1300-8.
78. Szarvas, T., T. Jaeger, M. Becker, S. Tschirdewahn, C. Niedworok, I. Kovalszky, H. Ruebben, S. Erguen and F. vom Dorp. (2011) Validation of Circulating MMP-7 Level as an Independent Prognostic Marker of Poor Survival in Urinary Bladder Cancer. Pathology & Oncology Research, 17: 325-332.
79. Szarvas, T., G. Kramer, J. Hess, S. Tschirdewahn, H. Reis, I. Romics, S. Sevcenco, M. Toetsch, H. Ruebben and F.V. Dorp. (2012) TISSUE MMP-7 EXPRESSION PREDICTS SURVIVAL IN BLADDER CANCER PATIENTS TREATED WITH CISPLATIN-BASED CHEMOTHERAPY. Journal of Urology, 187: E575-E575.
80. Szarvas, T., B.B. Singer, M. Becker, F.V. Dorp, T. Jaeger, A. Szendroi, P. Riesz, I. Romics, H. Ruebben and S. Erguen. (2011) Urinary matrix metalloproteinase-7 level is associated with the presence of metastasis in bladder cancer. Bju International, 107: 1069-1073.
81. Cancer Genome Atlas, N. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature, 487: 330-7.
82. Metzger, B., L. Chambeau, D.Y. Begon, C. Faber, J. Kayser, G. Berchem, M. Pauly, J. Boniver, P. Delvenne, M. Dicato and T. Wenner. (2011) The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain. BMC Med Genet, 12: 144.
83. Peeters, M., K.S. Oliner, A. Parker, S. Siena, E. Van Cutsem, J. Huang, Y. Humblet, J.L. Van Laethem, T. Andre, J. Wiezorek, D. Reese and S.D. Patterson. (2013) Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res, 19: 1902-12.
84. Blehm, K.N., P.E. Spiess, J.E. Bondaruk, M.E. Dujka, G.J. Villares, Y.J. Zhao, O. Bogler, K.D. Aldape, H.B. Grossman, L. Adam, D.J. McConkey, B.A. Czerniak, C.P. Dinney and M. Bar-Eli. (2006) Mutations within the kinase domain and truncations of the epidermal

growth factor receptor are rare events in bladder cancer: implications for therapy. Clin Cancer Res, 12: 4671-7.
85. Cancer Genome Atlas Research, N. (2014) Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. Nature, 507: 315-22.
86. Chaux, A., J.S. Cohen, L. Schultz, R. Albadine, S. Jadallah, K.M. Murphy, R. Sharma, M.P. Schoenberg and G.J. Netto. (2012) High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. Hum Pathol, 43: 1590-5.
87. Alexander, R.E., A. Lopez-Beltran, R. Montironi, G.T. MacLennan, K.M. Post, S.A. Bilbo, T.D. Jones, W. Huang, Q. Rao, J.D. Sen, K. Meehan, A. Cornwell, L. Miravalle and L. Cheng. (2012) KRAS mutation is present in a small subset of primary urinary bladder adenocarcinomas. Histopathology, 61: 1036-42.
88. Chen, J., X.F. Huang and A. Katsifis. (2010) Activation of signal pathways and the resistance to anti-EGFR treatment in colorectal cancer. J Cell Biochem, 111: 1082-6.
89. Jimeno, A., W.A. Messersmith, F.R. Hirsch, W.A. Franklin and S.G. Eckhardt. (2009) KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. J Clin Oncol, 27: 1130-6.
90. Adelstein, B.A., T.A. Dobbins, C.A. Harris, I.C. Marschner and R.L. Ward. (2011) A systematic review and meta-analysis of KRAS status as the determinant of response to anti-EGFR antibodies and the impact of partner chemotherapy in metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer, 47: 1343-54.
91. Ahn, T.S., D. Jeong, M.W. Son, H. Jung, S. Park, H. Kim, S.B. Bae, H.J. Kim, Y.W. Jeon, M.S. Lee and M.J. Baek. (2014) The BRAF mutation is associated with the prognosis in colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol, 140: 1863-71.
92. Foltran, L., G. De Maglio, N. Pella, P. Ermacora, G. Aprile, E. Masiero, M. Giovannoni, E. Iaiza, G.G. Cardellino, S.E. Lutrino, M. Mazzer, M. Giangreco, F.E. Pisa, S. Pizzolitto and G. Fasola. (2015) Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. Future Oncol, 11: 629-40.
93. Mao, C., Y.F. Huang, Z.Y. Yang, D.Y. Zheng, J.Z. Chen and J.L. Tang. (2013) KRAS p.G13D mutation and codon 12 mutations are not created equal in predicting clinical outcomes of cetuximab in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Cancer, 119: 714-21.
94. Jebar, A.H., C.D. Hurst, D.C. Tomlinson, C. Johnston, C.F. Taylor and M.A. Knowles. (2005) FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. Oncogene, 24: 5218-25.
95. Ouerhani, S., K. Bougatef, I. Soltani, A.B. Elgaaied, S. Abbes and S. Menif. (2013) The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer. Mol Biol Rep, 40: 4109-14.
96. Serizawa, R.R., U. Ralfkiaer, K. Steven, G.W. Lam, S. Schmiedel, J. Schuz, A.B. Hansen, T. Horn and P. Guldberg. (2011) Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. Int J Cancer, 129: 78-87.
97. Sjodahl, G., M. Lauss, S. Gudjonsson, F. Liedberg, C. Hallden, G. Chebil, W. Mansson, M. Hoglund and D. Lindgren. (2011) A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. PLoS One, 6: e18583.
98. Hang, J.F. and C.C. Pan. (2017) Absence of GNAS and BRAF mutations but presence of KRAS mutation in urachal adenocarcinoma. Pathology, 49: 316-317.

99. Sirintrapun, S.J., M. Ward, J. Woo and A. Cimic. (2014) High-stage urachal adenocarcinoma can be associated with microsatellite instability and KRAS mutations. Hum Pathol, 45: 327-30.
100. Singh, H., Y. Liu, X. Xiao, L. Lin, J. Kim, P. Van Hummelen, C.L. Wu, A.J. Bass and P.J. Saylor. (2016) Whole exome sequencing of urachal adenocarcinoma reveals recurrent NF1 mutations. Oncotarget, 7: 29211-5.
101. Li, W., T. Qiu, W. Zhi, S. Shi, S. Zou, Y. Ling, L. Shan, J. Ying and N. Lu. (2015) Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. BMC Cancer, 15: 340.
102. Kim, M.J., H.S. Lee, J.H. Kim, Y.J. Kim, J.H. Kwon, J.O. Lee, S.M. Bang, K.U. Park, D.W. Kim, S.B. Kang, J.S. Kim, J.S. Lee and K.W. Lee. (2012) Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer. BMC Cancer, 12: 347.
103. Cejas, P., M. Lopez-Gomez, C. Aguayo, R. Madero, J. de Castro Carpeno, C. Belda-Iniesta, J. Barriuso, V. Moreno Garcia, J. Larrauri, R. Lopez, E. Casado, M. Gonzalez-Baron and J. Feliu. (2009) KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. PLoS One, 4: e8199.
104. Shelekhova, K.V., A.S. Zhuravlev, D.D. Krylova, A.S. Konstantinov, L.V. Shtan and V.A. Kheinshtein. (2017) Pseudomyxoma Peritonei as a First Manifestation of KRAS-Mutated Urachal Mucinous Cystadenocarcinoma of the Bladder: A Case Report. Int J Surg Pathol: 1066896917707041.
105. Wilson, P.M., M.J. Labonte and H.J. Lenz. (2010) Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer. Cancer J, 16: 262-72.
106. Chen, D., J.F. Huang, K. Liu, L.Q. Zhang, Z. Yang, Z.R. Chuai, Y.X. Wang, D.C. Shi, Q. Huang and W.L. Fu. (2014) BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS One, 9: e90607.
107. De Roock, W., B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilas, K.T. Kalogeras, V. Kotoula, D. Papamichael, P. Laurent-Puig, F. Penault-Llorca, P. Rougier, B. Vincenzi, D. Santini, G. Tonini, F. Cappuzzo, M. Frattini, F. Molinari, P. Saletti, S. De Dosso, M. Martini, A. Bardelli, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, J. Tabernero, T. Macarulla, F. Di Fiore, A.O. Gangloff, F. Ciardiello, P. Pfeiffer, C. Qvortrup, T.P. Hansen, E. Van Cutsem, H. Piessevaux, D. Lambrechts, M. Delorenzi and S. Tejpar. (2010) Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol, 11: 753-62.
108. Liao, X., P. Lochhead, R. Nishihara, T. Morikawa, A. Kuchiba, M. Yamauchi, Y. Imamura, Z.R. Qian, Y. Baba, K. Shima, R. Sun, K. Nosho, J.A. Meyerhardt, E. Giovannucci, C.S. Fuchs, A.T. Chan and S. Ogino. (2012) Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. N Engl J Med, 367: 1596-606.
109. Sandler, R.S., S. Halabi, J.A. Baron, S. Budinger, E. Paskett, R. Keresztes, N. Petrelli, J.M. Pipas, D.D. Karp, C.L. Loprinzi, G. Steinbach and R. Schilsky. (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. N Engl J Med, 348: 883-90.
110. Chan, A.T., S. Ogino and C.S. Fuchs. (2009) Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. JAMA, 302: 649-58.
111. Chia, W.K., R. Ali and H.C. Toh. (2012) Aspirin as adjuvant therapy for colorectal cancer--reinterpreting paradigms. Nat Rev Clin Oncol, 9: 561-70.

112. Neugut, A.I. (2009) Aspirin as adjuvant therapy for colorectal cancer: a promising new twist for an old drug. JAMA, 302: 688-9.
113. Neugut, A.I. (2014) Aspirin as adjuvant therapy for stage III colon cancer: standard of care? JAMA Intern Med, 174: 739-41.
114. Paleari, L., M. Puntoni, M. Clavarezza, M. DeCensi, J. Cuzick and A. DeCensi. (2016) PIK3CA Mutation, Aspirin Use after Diagnosis and Survival of Colorectal Cancer. A Systematic Review and Meta-analysis of Epidemiological Studies. Clin Oncol (R Coll Radiol), 28: 317-26.
115. Amatu, A., K. Bencardino, A. Sartore-Bianchi and S. Siena. (2013) Aspirin for colorectal cancer with PIK3CA mutations: the rising of the oldest targeted therapy? Ann Transl Med, 1: 12.
116. Kompier, L.C., I. Lurkin, M.N. van der Aa, B.W. van Rhijn, T.H. van der Kwast and E.C. Zwarthoff. (2010) FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. PLoS One, 5: e13821.
117. Amin, M.B., S.C. Smith, J.N. Eble, P. Rao, W.W. Choi, P. Tamboli and R.H. Young. (2014) Glandular neoplasms of the urachus: a report of 55 cases emphasizing mucinous cystic tumors with proposed classification. Am J Surg Pathol, 38: 1033-45.

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **O. Modos,** H. Reis, C. Niedworok, H. Rübben, A. Szendrői, A.M. Szász, J. Tímár, K. Baghy, I. Kovalszky, T. Golabek, P. Chlosta, K. Okon, B. Peyronnet, R. Mathieu, S.F. Shariat, P. Hollósi, P. Nyirády and T. Szarvas (2016) Mutations of KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, and PIK3CA genes in urachal carcinoma - occurence and prognostic significance. Oncotarget 7:39293-39301.
   IF: 5.008

2. C. Niedworok, M. Panitz, T. Szarvas, H. Reis, A.C. Reis, A. Szendroi, P. Nyirady, A.M. Szasz, **O. Modos**, H. Rubben and F. Vom Dorp. (2016) Urachal Carcinoma of the Bladder: Impact of Clinical and Immunohistochemical Parameters on Prognosis. J Urol, 195: 1690-6.
   IF: 4.700

3. T. Szarvas, **O. Modos**, C. Niedworok, H. Reis, A. Szendrői, A.M. Szász and P. Nyirády. (2016) Clinical, prognostic, and therapeutic aspects of urachal carcinoma-A comprehensive review with meta-analysis of 1,010 cases. Urol Oncol. 34:388-98.
   IF: 2.921

11.2 Egyéb témában megjelent közlemények

1. **O. Modos**, A. Keszthelyi and A. Majoros (2014) *Radikális cystectomia szövődményei magas kockázatú betegek esetében*. Uroonkológia, 19:35-40.

2. T. Szarvas, **O. Modos**, A. Horváth and P. Nyirády (2016) Why are upper tract urothelial carcinoma two different diseases? Transl Androl Urol. 5:636-647.

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Nyirády Péter Professzor Úrnak, a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika igazgatójának, hogy a tudományos munkára az első pillanattól fogva lelkesen ösztönzött és biztosította annak körülményeit. Köszönöm neki, hogy sosem felejtette el megkérdezni a külföldi kollégáktól, van-e urachus daganat mintájuk, így sikerült a világon az egyik legnagyobb urachus carcinoma szövet bankot összegyűjtenünk.

Köszönettel tartozom másik témavezetőmnek, Dr. Szarvas Tibornak, aki számomra egy merőben új világ ajtaját tárta ki. Bevezetett a laboratóriumi munka rejtelmeibe, megtanított néhány műfogásra, amiket a kutatások során alkalmazni tudtam. Segítségével és önzetlenségével arra is lehetőségem nyílt, hogy megtapasztaljam, milyen a laboratóriumi munka külföldön, hisz eltölthettem majd' egy hónapot mellette Essenben, Németországban. Ezen felül számos előadásra rendületlenül felkészített, s a sokadjára felmondott beszédeket is fáradhatatlanul hallgatta végig. Megtanultam mellette cikket írni, melyeket rendkívüli alapossággal és figyelemmel korrektúrázott, s így azok színvonalas lapokban jelenhettek meg. Továbbá nem győzöm elégszer megköszönni, hogy a nehéz helyzetekben is mindig mellettem állt, s ilyenkor nemcsak szakmailag, hanem emberileg is támogatott.

Köszönetemet szeretném kifejezni Kovalszky Ilona Professzor Asszonynak, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratórium vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy a kutatásaimat a laboratóriumában végezhessem el. S bár az urachus carcinoma szövettani értékelése sokszor rendkívül körülményes, Professzor Asszony mindig segítőkész volt, amikor a metszeteimen meg kellett keresni és bekarikázni a tumoros területeket.

A laboratórium munkatársainak nem győzőm eléggé megköszönni, hogy kezdőként mindig türelemmel és időt nem sajnálva foglalkoztak velem. Császár Krisztinának és Egedi Krisztinának külön köszönöm, hogy megtanítottak többek között nukleinsavat izolálni és tisztítani. Mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk, ha kérdések merültek fel bennem. Ezen felül egy olyan bensőséges környezetet teremtettek meg a laboratóriumban, amely miatt minden nap örömmel jártam be elvégezni a

kísérleteket. Köszönöm Dr. Baghy Kornéliának, Dr. Hollósi Péternek és Dr. Oláh Lászlónénak a piroszekvenálással járó rengeteg munkát és a pirogrammok kiértékelésének segítését, mely merőben hozzájárult e dolgozat létrejöttéhez.

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Sebestyén Annának, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Tumorbiológia laboratórium vezetőjének, hogy nemcsak a kísérleteim gondos megtervezésében volt segítségemre, hanem mindig volt egy-két építő jellegű ötlete, mely azokat előrébb lendítette. Külön köszönöm dr. Hujber Zoltán Ph.D. hallgatónak a kitartását a sokszor több hetet is igénybe vevő analíziseim elvégzése során. Szintén szeretnék köszönetet mondani Dankó Titanilla TDK hallgatónak a segítőkészségéért.

A doktori képzésem utolsó évében társat is kaptam magam mellé Keresztes Dávid TDK hallgató személyében, kinek segítségével munkánk jóval gördülékenyebbé vált. Köszönöm neki, hogy szorgalmával és lelkességével az urachus carcinomás mintáink rendszerezése és feldolgozása kezelhetőbbé vált, és köszönöm neki, hogy vidámságával még élvezetesebbé tette a laboratórium mindennapjait.

Szeretném kifejezni hálámat az esseni munkacsoport tagjainak, Dr. Christian Niedworok-nak és Dr. Henning Reis-nak az immunhisztokémiai kísérletek gondos elvégzéséért.

A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika urachus carcinomás betegeinek felkutatásáért köszönet illeti Dr. Szendrői Attila egyetemi Adjunktus Urat.

Dr. Keszthelyi Attilának, a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika igazgatóhelyettes Docens Úrának is szeretnék köszönetet mondani azért, mert a kutató munka mellett ügyelt arra, hogy az egyetem alatt megszerzett klinikusi szakmai tudásom ne révülhessen el. Tanításai és odafigyelése, amiben az Urológiai Klinika műtőjében és a szakrendelőben eltöltött néhány alkalom során részesülhettem segít abban, hogy a jövőben ne teljesen kezdőként kezdjem el a rezidensi pályafutásom.

Köszönet illeti azokat, akik állandó jelleggel a háttérből biztattak és tartották bennem a lelket, amikor mind nagyobb és nagyobb megmérettetések elé kerültem. Barátnőim, Antal Emese és Dr. Kapi Zsófia sosem engedték, hogy félelmeim eluralkodjanak rajtam és mindig tartották bennem a lendületet, hogy az akadályokat meg tudjam ugrani. Testvérem, Máté a rengeteg teendője közepette is mindig fordított időt arra, hogy felvidítson, amikor szükségem volt rá.

S végül azoknak mondanék köszönetet, kiknek a legtöbbet köszönhetem: a Szüleimnek. Köszönöm, hogy szeretetben és biztonságban neveltetek fel. Köszönöm, hogy mindig kiálltatok mellettem, támogattatok, bíztatok bennem, hogy mindig számíthattam Rátok. Olyan példát mutattatok nekem, amit én is igyekszem tovább vinni és adni is másoknak. Köszönöm, hogy türelmetek és jóakaratotok elkísért idáig és megteremtettétek azt a nyugodt környezetet, melyben e dolgozatot megírhattam.