

# **A POLIAMIN ANYAGCSERE JELENTŐSÉGE AGYDAGANATOKBAN**

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés**

Klekner Álmos

Témavezető: Prof. Dr. Csécsi György

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügyi Centrum

Idegsebészeti Klinika

*2001*

## TARTALOM

oldalszám:

1. BEVEZETÉS.....	3
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1. A poliaminok biológiai szerepe.....	8
3.2. Poliamin anyagcsere kutatásainak eredményei agydaganatokban.....	12
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	14
4.1. Anyag.....	14
4.2. Módszer.....	16
4.2.1.Szövetteni feldolgozás.....	16
4.2.2. Biokémiai vizsgálatok.....	17
5. EREDMÉNYEK.....	20
5.1. Ependimómák vizsgálatának eredményei.....	20
5.2. Asztrocitómák vizsgálatának eredményei.....	23
5.3. Meningeómák vizsgálatának eredményei.....	25
6. MEGBESZÉLÉS.....	27
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	35
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	37
10. KÖZLEMÉNYEK.....	48

## 1. BEVEZETÉS

Az intrakraniális daganatok terápiájának megválasztásában a szövettani besorolásnak döntő szerepe van. A rutin szövettani osztályozás különböző festési eljárásokból és immunhisztokémiai reakciókat követő fénymikroszkópos vizsgálatokból áll. E hagyományosnak mondható vizsgálatok során a daganatnak ill. sejtjeinek aktuális megjelenését döntően morfológiai jellemzők szerint értékelik. Ennek a megközelítési módnak hiányosságai közé tartozik, hogy a funkcionális tulajdonságokról kevés információt nyújt. Ilyen tulajdonságok közé tartozhat pl. a sejtosztódáshoz szükséges enzimek aktivitása, a sejtproliferációhoz szükséges faktorok transzportrendszerének aktivitása vagy egyes növekedési faktorok szignálrendszerének aktiválódása. Továbbá, lényeges információkhoz juthatunk a tumorsejtek genetikai állományának vizsgálatával a daganatban a műtéti eltávolításkor még nem manifesztálódott proliferációs készségről, hiszen bizonyos gének hiperexpressziójával később megvalósuló tumorprogresszió valószínűségének meghatározása prognosztikai szempontból nagy jelentőséggel bírhat. Előfordulhat ugyanis, hogy azonos fénymikroszkópos megjelenési forma mellett két tumorminta genomja az onkogének aktivitása szempontjából jelentős eltéréseket tartalmaz.

Mivel a mai gyakorlatban alkalmazott és hagyományosnak tekinthető pathológiai vizsgálati módszerek a morfológiai jellemvonásokra szorítkozva állapítják meg a daganatok szövettani besorolását, az adekvátnak tűnő terápia elégtelennek bizonyulhat. Fennáll tehát az igény további, olyan tumormarkerek felkutatására, melyek részben az aktuális malignitási fokról nyújtanak pontosabb információt, részben pedig a genetikailag meghatározott progresszióra való hajlamot is felderítenék.

A valósághoz valószínűleg akkor járunk közel, ha ennek a problémának a megoldását nem egyetlen paraméternek a "felfedezésétől" várjuk, hanem többirányú

elemzések során meghatározott biokémiai (pl. enzimaktivitások), biofizikai (pl. transzmembrán transzport, vagy sejtfelszíni markerek), molekulárbiológiai (pl. onkogének expressziója) stb. tulajdonságokból kialakuló komplex minta alapján igyekszünk egy adott tumortípus konkrét, valóság-hű dignitását és malignitási potenciálját, azaz progresszióra való hajlamát meghatározni.

Ennek az elvnek szolgálva a DEOEC Idegsebészeti Klinikán elméleti társintézetekkel kollaborálva (Pathológiai Intézet, Biofizikai Intézet, Biokémiai Intézet) és a Kölni Idegsebészeti Klinikával együttműködve igyekeztünk az intrakraniális daganatokat multifaktoriális szempontból megközelíteni.

Természetesen ennyi szakterületen nem lehet egyidejűleg kellő szinten elmélyült kutatómunkát folytatni, így a legígéretesebbnek tűnő területen továbbhaladva, a tumorsejtek poliamin-anyagcseréjének vizsgálatát próbáltuk minél részletesebben kielemezni. Jelentős kutatási eredményekre jutottunk a Kölni Idegsebészeti Klinika Neuroonkológiai Laboratóriumával történő együttműködés során az intrakraniális daganatok kvantitatív biokémiai elemzésével a poliamin-anyagcsere aktivitásának meghatározásával. Ennek során humán agydaganatokban az egyes poliaminok intratumorális koncentrációját, a poliamin-bioszintézis kulcsenzimének (ornitin-dekarboxiláz, ODC) aktivitását és génjének expresszióját mértük meg és összefüggést kerestünk a poliamin anyagcsere aktivitása és a tumoros sejtproliferáció között. Glia eredetű (asztrocitómák és ependimómák) és mezenchímális eredetű tumorok (meningeómák) vizsgálatával jutottunk legmesszebb, így jelen disszertáció gerincét is e vizsgálatok eredményei képezik.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

I. Az endimómákat a poliamin anyagcsere szempontjából még nem vizsgálták, és bár az intrakraniális gliómák 5-6 %-át adó daganatok az esetek többségében jóindulatúnak bizonyulnak (57), anaplasztikus formájuk igen rossz klinikai kimenetelt eredményez: az átlagos túlélési idő 12-20 hónap közé tehető és a 3 éven belüli mortalitási arány egyes statisztikákban eléri a 100 %-ot. Magas arányú kiújulási hajlamuk mellett kezelésüket a likvorkeringés útján adott gyakran többszörös metasztatizáló tulajdonságuk is megnehezíti (13), hiszen a multiplex daganat műtéti eltávolítása sokszor lehetetlennek bizonyul és a sugárkezelés rizikója is jelentősen megnő. Mivel ezek a tumorok sugárérzékenyek (38), a sugárkezelés indikációjának meghatározása fontos kérdés a kimenetel szempontjából, mivel az irradiációs kezelés e daganattípus esetében az 5 éves túlélést 41 %-ra emelheti (57). Első lépésként tehát ezekben a kevésbé gyakori intrakraniális tumorokban igyekeztünk a poliamin anyagcsere aktivitásának meghatározásával az aktuális malignitási fok megállapításához további adatokat szolgáltatni.

II. Az endimómák vizsgálatával nyert eredmények alapján a gliómák legnagyobb csoportját, az asztrocitómákat is érdemesnek tartottuk biokémiai szempontból a poliamin anyagcsere vonatkozásán kielemezni, hiszen a leggyakoribb intraaxiális primer agydaganatot az asztrocitómák képezik, az USA-ban évente 12.000 új esetet diagnosztizálnak (24). Az asztrocitómák malignitás szempontjából a WHO ajánlása alapján követett grádusrendszer szerint I-IV kategóriákra oszthatók, melyekből az I-II, ún. alacsony grádusú asztrocitómák a benignus tumorokra jellegzetes hosszú túlélési adatokkal jellemezhetők (az I. grádusúnak nevezett juvenilis pilocitás asztrocitóma 10 éves túlélése eléri a 94 %-ot), míg a III. grádusú, anaplasztikus asztrocitóma (AA), és a IV. grádusú

glioblasztóma multiforme (GBM) a magas grádusú gliómák összefoglaló néven malignus daganattípust képviselnek (24). Tumoreltávolítást követő posztoperatív sugárkezelés és kemoterápia mellett az 1 éves túlélés AA esetén 60-73 %, GBM esetében 35-36 %, míg a két éves túlélés az előbbi esetében 38-50 %-ra ill. 8-12 %-ra csökken (9). Az AA és a GBM a középkorú korosztályt érinti, a betegek életkorának átlaga diagnóziskor 46 ill. 56 év (46). Ma már ismert tényként kezelhető az asztrocitómákban előforduló progresszióra való hajlam, és a II. vagy III. grádusú tumorok igen gyakran nagyobb grádusú recidivával jelentkeznek ismét. Emellett a GBM az egyébként is nagy gyakoriságú asztrocitómák között a legnagyobb arányt képviseli, és az összes primer agydaganat tekintetében is a 15-20 %-os előfordulási aránnyal a leggyakoribb intrakraniális tumornak tekinthető (38). Nem véletlen tehát, hogy a tumorkutatók érdeklődése régóta nagy figyelemmel irányul az asztrocitómák tumorcsoportjára. Egyik legnagyobb kihívást az alacsony grádusú tumorok biztos diagnosztizálása és a progresszióra való hajlam prognosztizálása jelenti, hiszen a mai gyakorlatban irradiáció nélkül kezelt II. grádusú asztrocitómák egy részének anaplasztikus tumorrá történő progrediálása az időben megállapított proliferációs potenciál alapján indikált radikális műtéttel és postoperatív sugárkezeléssel esetleg megelőzhető lenne. Kutatási célkitűzéseink is ennek az igénynek a kielégítésére ill. ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására irányultak.

III. A primer intracerebrális tumorok mellett a nem kevésbé gyakori extracerebrális tumorok vizsgálata is célkitűzéseink között szerepelt. A nem-glia eredetű intrakraniális tumorok közül leggyakoribb daganat a meningeóma: az összes intrakraniális primer tumor 15-20 %-át teszi ki (77). A meningeómák osztályozása szintén hisztopathológiai jellemzőkön alapszik, azonban ezek a jellemzők nem mindig bizonyultak elégségesnek az atípusos és a malignus meningeómák közötti különbségtételhez (1, 71). Többnyire benignus

megjelenési formájuk és sokszor sikeres teljes eltávolításuk ellenére a típusos meningeómák recidíváinak aránya 2-9 %, míg az atípusos formáé 29-50 % közé tehető (52, 72). Az infiltratív, malignus növekedési jegyeket nélkülöző szövettani kép mellett észlelhető relatíve nagy kiújulási hajlamuk további vizsgálatokat indikál. A poliamin anyagcsere aktivitásának meghatározásával a kiújulási potenciállal kapcsolatban kerestünk prognosztikai szempontból is hasznosítható összefüggéseket.

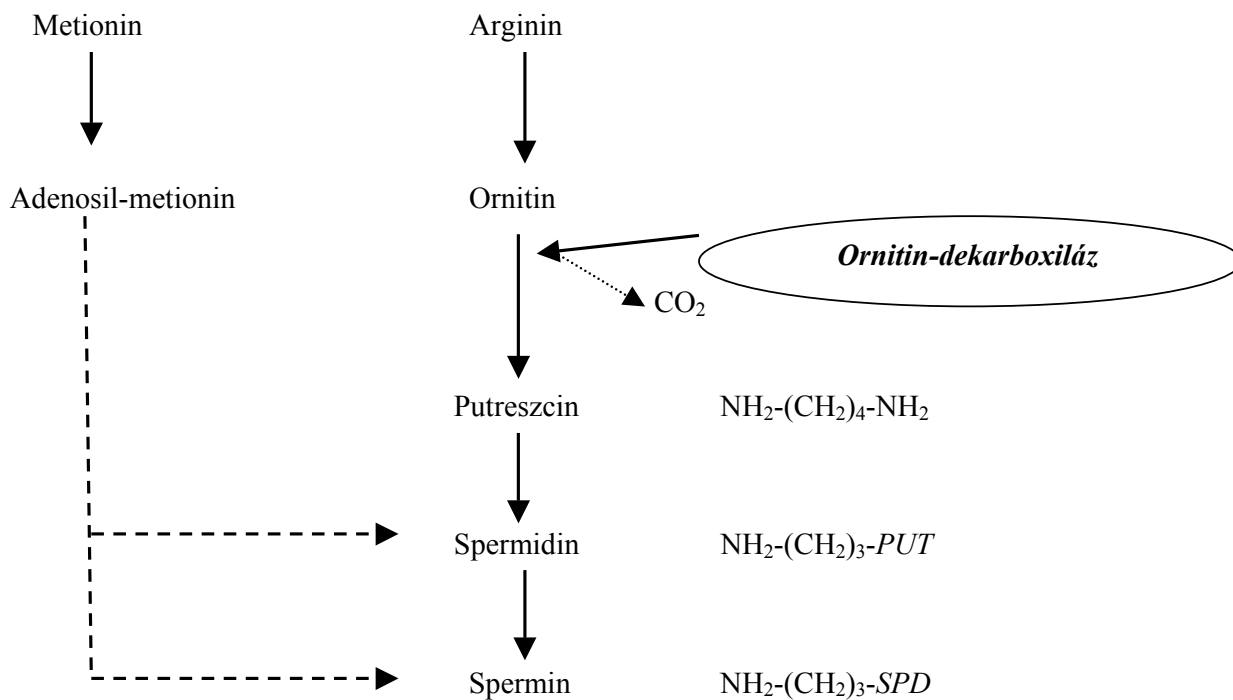
Vizsgálataink során a tumoros sejtszaporodáshoz nélkülözhetetlen poliaminoknak és bioszintézisük kulcsenzimének, az ornitin-dekarboxiláznak (ODC) az intrakraniális daganatok diagnózisának pontosítását szolgáló, és a tumorprogresszióra és a recidívaképzési hajlamra utaló szerepét tűztük ki célul felderíteni. Ennek során először az egyes poliaminok koncentrációját és az aktuális enzimaktivitást vizsgáltuk a primer agydaganatok közül ependimómákban, majd az ODC aktivitást és az ODC gén expresszióját meghatározva igyekeztünk asztrocitómákban és meningeómákban további következtetésekre jutni. A multifaktoriális megközelítési elvnek megfelelően a fenti paramétereket Ki-67 proliferációs markerrel és a szövettani képpel (mitózis-számmal) összevetve próbáltuk a meningeómákat prognosztikai szempontból értékelni.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A poliaminok biológiai szerepe

A poliaminok alifás szénhidrogén láncon 2-3-4 amino-, ill. iminocsoporttal rendelkező molekulák, melyek fiziológias pH-n pozitív töltésű kationként funkcionálva vonzzák a negatív töltésű sejtkomponenseket. Minden eukarióta sejtben jelen vannak, beleértve a központi idegrendszer sejtjeit is (29, 47, 84). A poliaminok már régen felkeltették a kutatók érdeklődését, hiszen az első irodalmi adat 1678-ból származik és a spermin kristályok szerkezetét taglalja. A poliaminok bioszintézisének vázlatát az 1. ábra szemlélteti.

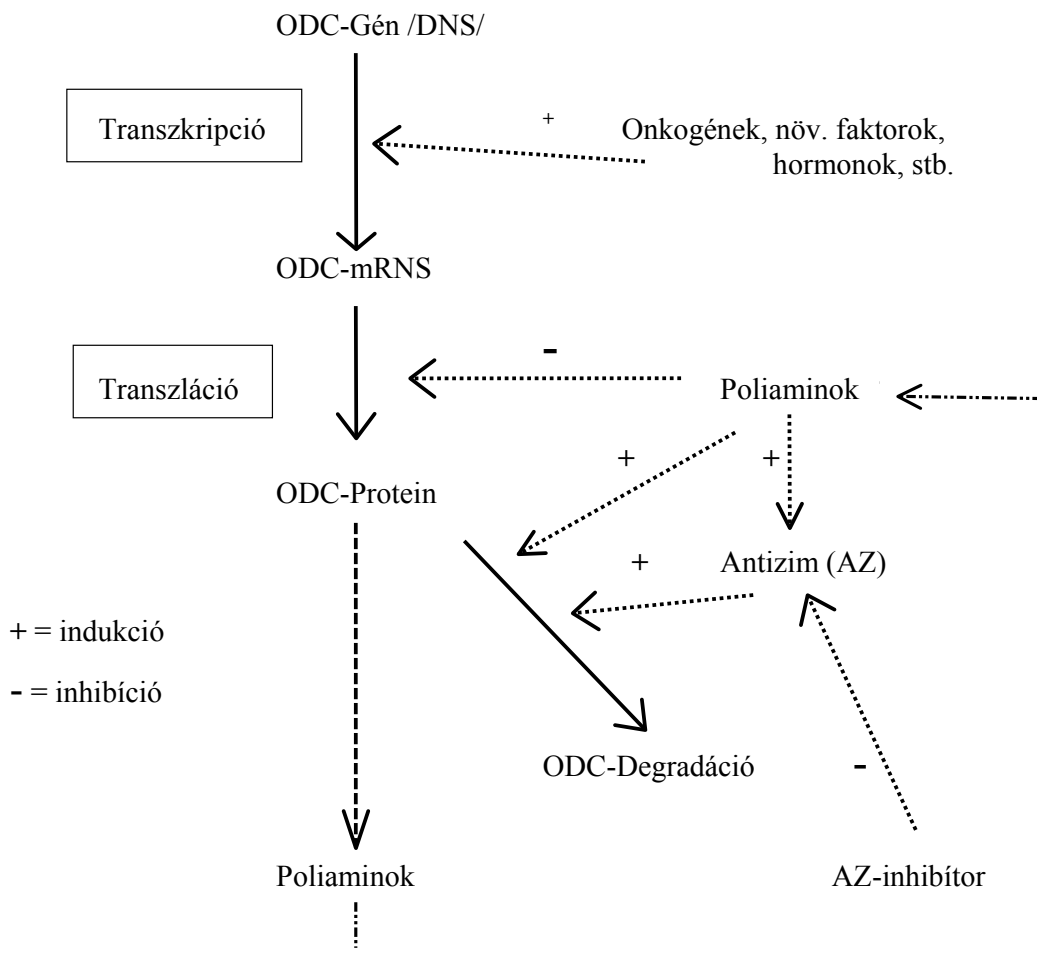
1. ábra  
A poliaminok bioszintézisének vázlatja



A poliamin-bioszintézis kulcsenzime az ornitin-dekarboxiláz enzim (ODC) mely egyedülálló az emlősök sejtjeiben: féléletideje kevesebb mint fél óra (az átlagos humán enzimek féléletideje általában napokban mérhető) (17). A poliaminok (spermidin, spermin és metabolikus prekursoruk, a putreszcin) bioszintézisének szabályozása döntően a kulcsenzim, az ODC aktivitásának változásain keresztül valósul meg. Ez az enzim az ornitin (aminosav) putreszcinné (diamin) dekarboxilálását katalizálja (56, 69). Az ODC szabályozását a 2. ábra szemlélteti.

2. ábra

Az ornitin dekarboxiláz (ODC) szintézise: szabályozási mechanizmusok



Az ODC gén expressziója és az ODC effektivitása igen sokrétű szabályozó mechanizmusok befolyása alatt áll. Számos faktor serkentőleg hat az ODC szintézisre (onkogének (98), növekedési faktorok (35, 36, 37, 45), hormonok (33), míg a poliaminok (29, 42, 43, 96) és az ún. antizim protein (7, 55, 62) gátló hatásúnak bizonyultak. A szabályozási mechanizmusok sokrétűségét jellemzi, hogy ez utóbbi fehérje pedig az antizim-inhibitor molekula gátló hatása alatt áll (23, 63).

A molekuláris biológiai kutatások érdekes összefüggést tártak fel: az ODC aktív génje a hetedik kromoszóma rövid karján található és szomszédos génjei a ribonukleotid-reduktáz (DNS szintézisben szereplő enzim) és az N-myc-oncogén - e három gén gyakran együtt sokszorozódik (39, 92). Bizonyítást nyert az is, hogy az ODC kóros expressziója szükséges faktor az onkogenezishez (3), így maga az ODC proto-onkogén szerepe is felmerült (26, 70).

A poliaminok biológiai szerepének alapja az, hogy relatíve kis méretűnek és többszörös pozitív töltésűnek köszönhetően igen sok sejtkomponenssel léphetnek kapcsolatba. Elsősorban proteinekhez és nukleinsavakhoz való kötődésük révén megvalósuló szerteágazó szerepük még ma sem teljesen tisztázott. Biológiai funkcióiknak kutatása során kiderült, hogy a poliaminok egyes mikroorganizmusok számára esszenciális növekedési faktort jelentenek. *Sacharomyces cerevisiae* sejteken pedig az ODC-gén eliminációjával létrehozott poliaminhiány a sejtosztódás G1 fázisban történő leállítását eredményezi: nagy és szabálytalan alakú sejtek jönnek így létre (22, 83). A poliaminok biológiai funkciójának összefoglalásaként megállapították, hogy e molekulák eukarióta sejtekben is esszenciális faktorai a sejtproliferációnak. Bizonyítást nyert az is, hogy poliaminok nélkül e sejtek osztódása az S-fázisban leáll, DNS-szintézisük csökken és a

mitózisba lépés blokkolódik (74), hiszen bizonyos minimális mennyiségű poliamin-molekula szükséges a G1-fázisból az S fázisba lépéshez (6, 44).

A poliaminok DNS-szerkezetre ill. kondenzációra, valamint a B-DNS Z-DNS-sé alakulására gyakorolt hatása nemcsak töltésük révén, hanem a több metil-csoport adta speciális szerkezeti adottságuk révén is megvalósulhat. A poliaminoknak tehát alapvető szerepük van a sejt differenciálódás, növekedés és regeneráció szabályozásában (29). Korábbi kutatások adatai szerint a poliamin-szintézis regulációja transzkripció ill. transláció-poszttranszlációs szinten is megvalósulhat (22).

A szerteágazó megfigyelések alapján a poliaminok következő, a sejtosztódásban játszott biológiai szerepeit tárták fel eddig (39):

1. A poliaminok segítik a komplementer DNS-szálak összekötődését a sok negatív töltés (foszfát csoportok) révén: ezáltal segítik a DNS-lánc horizontális stabilitását.
2. Elektrosztatikus kölcsönhatás révén a DNS vertikális stabilizálásához is szükségesek.
3. Stimulálják az RNS-polimerázt, növelik az rRNS szintézist.
4. A tRNS komformációjára gyakorolt hatás következtében az aminosavak fehérjékbe történő inkorporálását gyorsítják.
5. Hozzájárulnak a transláció hűségének (fidelitásának) növeléséhez, segítik a kodon-antikodon felismerést.
6. Az aktin polimerizációjára gyakorolt hatásuk révén befolyásolják a citoskeleton elrendeződését, ami a normális sejtosztódáshoz nélkülözhetetlen.

Ezeknek a funkcióknak és összefüggéseknek a felismerése kapcsán indult meg az egyes poliaminok mennyiségének és az ODC aktivitásának daganatos betegek eseteiben

történő meghatározása, hiszen a proliferációhoz szükséges molekulák természetüktől fogva a kórosan szaporodó szövetek markerei lehetnek (34, 60, 61).

### 3.2. Poliamin anyagcsere kutatásainak eredményei agydaganatokban

Patkányban kísérletesen indukált malignus glióma esetén az ODC-aktivitás megemelkedett, a putreszcin-, a spermidin- és a spermin-szint az enzimaktivitáshoz hasonlóan szintén magasabb a kontroll agyszövetben meghatározott értékeknél. Mindemellett azonban a tumorról szomszédos agyterületen is mindhárom poliamin szintje meghaladta a kontroll értékeket, amit a perifokális ödémával megjelenő nagyobb intenzitású vízáramlással magyaráztak (17, 54).

Hipofízis adenóma esetén az acetil-spermidin-, a putreszcin- és a spermidinszint alacsony, és az ODC-aktivitás is alig haladja meg a normál értékeket (19). Meningeómák esetében is hasonlóan alacsony értékeket mértek, de recidív tumorokban az ODC-aktivitás a glioblasztóma multiformében mért ODC-aktivitást közelíti meg, valamint az ODC-aktivitáshoz hasonlóképpen a putreszcinszint emelkedése is megfigyelhető (18).

Emelkedett ODC aktivitást detektáltak anaplasztikus gliómákban, összehasonlítva őket alacsony grádusú gliómákkal (19). Feltételezések szerint az ODC aktivációja a malignitás kialakulásának egyik korai eseménye lehet (5). Asztrocitómákat vizsgálva megállapították, hogy az acetin-spermidin koncentráció a malignitási fokkal együtt nő, és az ODC-aktivitás és a putreszcinszint korrelál a malignitással. Az azonos grádusú asztrocitóma és oligodendroglióma ODC-aktivitása azonos, míg a pilocitás asztrocitóma putreszcinszintje megegyezik a normál agyszövetével (19, 25). A legmagasabb putreszcinszintet és ODC-aktivitást a glioblasztóma multiformében detektálták. Asztrocitómákban meghatározott ODC-aktivitás tekintetében szignifikáns különbség a primer és a recidív tumor értékei között csak akkor van, ha a tumor időközben malignizálódott. Gliómákban szignifikánsan

magasabb a spermidinszint mint normál agyban, de a spermidinszint nem korrelál a malignitással (53). A sperminszt szintén magasabb gliómákban mint a kontroll agyszövetben, de a spermidinszinthez hasonló szignifikáns különbség nem igazolható és a spermidin-spermin arány sem függ össze a malignitással. (16) Tumorcisztákban: malignus tumor szolid részeiben a poliaminok szintje magas, így például az acetil-spermidinszt szignifikáns eltérést mutat a benignus tumorok cisztáihoz képest, malignus tumorok cisztáiban viszont a poliaminok szintje kifejezetten alacsony. Az eddigi vizsgálatok eredményeképpen a cisztákban magasabb a poliaminszt mint a likvorban (99).

Nekrotikus tumorállományban az ODC aktivitás alacsony és ehhez hasonlóan a poliaminok szintjei is alacsonyak maradnak (25).

Általánosságban megállapítható, hogy a poliaminok koncentrációja, és a bioszintézisük kulcsenzimének, az ODC-nek az aktivitása a központi idegrendszeri primer tumorok proliferációs aktivitásával összefügg.

Összefoglalva megállapították, hogy a poliaminok bioszintézise szorosan összefügg a sejtsztintű növekedési folyamatokkal, beleértve mind a fiziológiás, mind pedig a neoplasztikus sejtproliferációt (4, 5, 34, 38), és a daganatos, gyorsan proliferáló szövetekben az ODC aktivitás a normál szövetekhez képest magasabb (20, 81). Bizonyítást nyert tehát, hogy a poliaminok hasznos biokémiai markerek lehetnek rosszindulatú daganatos betegségek diagnózisának felállításában és követésében (34, 38, 79).

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. ANYAG

Háromféle tumor esetében végeztünk vizsgálatokat. A glia eredetű tumorok közül a leggyakoribb tumortípus, az asztrocitómák mellett az endimómákat és a legnagyobb arányban előforduló, nem-glia eredetű intrakraniális daganattípust, a meningeómákat választottuk ki méréseinkhez.

A szövettani mintákat a kölni és a debreceni Idegsebészeti Klinikán 1991, ill. 1995 és 1998 között műtét közben eltávolított és folyékony nitrogénben lefagyasztott, majd az alább részletezett feldolgozásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt tumorszövet alkotta. A betegek felvilágosítása és beleegyezésük kikérése a Helsink-i egyezmény etikai kívánalmai szerint történt. Lehetőleg minél több (max. 5 db) szövettani minta kivétele volt a cél az intratumorális heterogenitás miatti téves eredmények kiszűrése végett, ugyanis az egyes daganatok malignitási szempontból történő hisztopathológiai megítélése a tumor leginkább rosszindulatú részének figyelembe vételén alapul. Ezért az egy betegből (ill. egy tumorból) származó több minta feldolgozásával kapott eltérő eredmények közül a statisztikai feldolgozáshoz mindig a legmagasabb értékeket vettük figyelembe.

I. Ependimómák: Az endimómákból intraoperatív vett tumormintákat (11 db) egyéb gliómákkal (69 db) és nem-tumoros, kontrollként szolgáló agyszövetmintákkal (52 db) hasonlítottuk össze. Az endimómák közé a hagyományos szövettani vizsgálat során csak II. grádusúnak bizonyult tumorokat válogattunk. A glióma csoportba asztrocitómák, oligodendroglómák és kevert, oligo-asztrocitómák tartoztak. Az ún. egyéb gliómák

csoportjába tartozó tumorminták mindegyike a szövettani feldolgozás során egyértelműen gliá eredetűnek és II. grádusú daganatnak bizonyult.

II. Asztrocitómák esetében 24 db tumormintát vizsgáltunk meg, melyeket a hisztopathológiai vizsgálat során megállapított grádus szerinti beosztás alapján csoportosítottunk. Ennek során asztrocitóma II. grádus (A II, 8 db), asztrocitóma III grádus (A III, 8 db) és glioblasztóma multiforme (GBM, 8 db) minta eredményeit vetettük össze kontrollként szolgáló 5 db tumormentes agyszövet eredményeivel. Kontroll mintának a peritumorális agyszövetből származó mintákat tekintettük, melyek a mikroszkópos szövettani vizsgálat során tumorsejttől mentesnek bizonyultak.

III. A meningeómák vizsgálatához 22 betegből származó tumormintát vizsgáltunk meg. Három csoportot hasonlítottunk össze, melyek a következők:

1. Meningeómák, melyek 8.4 év átlagos követési idő (min.:3.4, max.: 9.7 év) alatt nem újultak ki (M-R), esetszám: 8.
2. Meningeómák, melyek később recidiváltak (M + R). Átlagos követési idő 3,0 év (min.: 0.6, max.: 5,9 év), esetszám: 14.
3. A 2. csoport recidív tumorjai (R), esetszám 14.

A recidívát a primer tumor teljes eltávolítása utáni ismételt tumornövekedésként, vagy részleges reszekció utáni tumorprogresszióként definiáltuk.

## 4.2. MÓDSZER

Az ependimómák esetében összehasonlítottuk az egyes poliaminok (spermidin, spermin, putreszcin) intratumorális koncentrációját, valamint az ODC aktivitást.

A meningeómák és az asztrocitómák esetében az ODC aktivitást, az ODC mRNS relatív mennyiségét, a Ki-67 indexet és a mitózisindexet hasonlítottuk össze.

### 4.2.1. Szövetteni feldolgozás

A szövetteni klasszifikáció a több, reprezentatív tumorrészletből származó formalinfixált és parafinba ágyazott tumormintából a World Health Organization (WHO) 2000 évi szövetteni besorolása és graduálási ajánlása szerint (C 19) történt. Ez alapján osztályoztuk a gliómákat és az ependimómákat a II. grádusú tumorok kiválasztásához, valamint ennek megfelelően történt az asztrocitómák grádus szerinti besorolása is. A vizsgálatainkhoz felhasznált meningeómákat is a WHO rendszerezése alapján osztottuk a következő szövetteni csoportokra: klasszikus meningeóma (I. grádus), atípusos meningeóma (II. grádus, melynek kritériumaként legalább 2.5 mitózis/mm<sup>2</sup>, vagy három jellemző a következőkből: makronukleólusz, hipercellularitás, mikronekrózis vagy kissejtképzés szerepelt). A harmadik csoportba az egyértelműen anaplasztikus jellemvonásokat mutató infiltratíván növekvő meningeómák tartoztak (III. grádus). A meningeómák szövetteni feldolgozásánál az egységnyi területre eső mitózisok számát is meghatároztuk.

A hisztolopatológiai vizsgálathoz a tumorszöveteket hematoxin-eozinnal festettük, immunhisztokémiai vizsálatként pedig a Ki-67 antigén reakciót alkalmaztunk. Mindkét eljáráshoz 10 µm vastag kriosztát metszeteket használtunk, melyeket a biokémiai

vizsgálatokhoz kivett szövetminta helyéről készítettünk. A kifejezetten angiomatózus, fibrotikus, nekrotikus, koagulációtól károsodott vagy nagy mésztartalmú szövetmintákat nem vettünk figyelembe.

A Ki-67 jelöléshez a metszeteket 2 órán át szobahőmérsékletű levegőn szárítottuk, majd 10 percig hideg acetonban fixáltuk. Ezután Tris pufferbe helyeztük őket, majd a háttérfestődés kiküszöbölésére 3%-os normál sertésszérumban történő preinkubáció következett. Ezután a metszeteket poliklonális, 1:10 arányban hígított Ki-67 ellenanyaggal (A 0047) 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az ellenanyag-kötődést alkalikus foszfatáz antialkalikus foszfatáz (APAAP) vagy sztreptavidin-peroxidáz (ABC) módszerrel és aminoetilcarbazol kromogénnel ill. hematoxin alapfestéssel határoztuk meg (C 18). Az immunhisztokémiai vizsgálathoz szükséges vegyszerek a Dako Diagnosztika (Hamburg, Németország) termékei voltak. A jelölési indexet a reakció szempontjából leginkább pozitív területet figyelembe véve legalább 1000 tumorsejt megszámlálásával állapítottuk meg. Érfali, gyulladással vagy xanthomatózus sejteket nem vettünk figyelembe. A kiértékelést vakon végeztük, azaz a számláláskor egyéb vizsgálatok eredményei még ismeretlenek voltak.

#### 4.2.2. Biokémiai vizsgálatok

A biokémiai vizsgálatokat a tumormintának abban a részében végeztük el, ahonnan a szövettani vizsgálatokhoz a metszeteket készítettük.

##### *A poliaminszintek meghatározása*

A poliaminszintek meghatározásához a tumormintákat 0.1 N HCl-el  $-20^{\circ}\text{C}$ -on etanolban homogenizáltuk. A homogenizátumokat 0.6 N HClO<sub>4</sub>-el kétszer extraháltuk.

Centrifugálás után a felülúszót 3 N KOH-al neutralizáltuk. O-ftalaldehiddel történő derivatizálás után a poliaminokat reverz fázisú Partisil 10 ODS 3 HPLC oszlopon szeparáltuk, majd a poliaminok mennyiségét fluoreszcens detektorral határoztuk meg.

#### *Az ODC aktivitás meghatározása*

A szövetmintákat 4°C-on 25 vols (w/v) 50 mM, 7.2-es pH Tris/HCL pufferben (melyet 5 mM dithiothreitol (DTT)-vel és 0.1 mmol/l EGTA-val egészítettük ki) homogenizáltuk. A kontroll próbához a 4 mg tumorszövet-homogenizátumot Tris/DTT pufferbe tettük, melyet 54 µM piridoxál foszfáttal és 74 µmol/l L[1-<sup>14</sup>C]ornitinnel (specifikus aktivitás 55 mCi/mmol, Biotrend, Köln, Németország) egészítettünk ki (B 33). A teljes térfogatot 130 µl-re állítottuk be. A lezárt kémcsöveket 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd az ODC aktivitást a felszabadult <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> mennyiségének folyadék szcintillációs számlálóban történő meghatározásával állapítottuk meg.

#### *Az ODC mRNA tartalom meghatározása*

A vizsgált szövetmintákban az ODCmRNA mennyiséget kvantitatív kompetitív RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction (C 21, 22)) módszerrel határoztuk meg. Ehhez β-aktin gént, mint *'house keeping gene'*-t használtunk belső standardnak. Az amplifikálendő DNS-szakasz ODC esetében 401, β-aktinnál 440 bázispár (bp) volt. A kompetitorok létrehozásához SOE-PCR (splicing by overlap extension PCR(C 23)) és egy egyszeri bázismutáció segítségével egy rövid, specifikus szekvenciát inzertáltunk mind az ODC, mind a β-aktin exonba: az ODC esetében a 209. bp-nál (GGATCC), és a Bam HI restrikciós endonukleáz felismeri helye lett, míg β-aktinnál a 207. bp-nál (AGATCT) és a Bgl II restrikciós endonukleáznak jelent hasításhoz azonosítási szekvenciát. A tumorminták teljes RNS-ét az RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) izoláltuk, és az RNS-

mennyiséget spektrofotométerrel 260 nm-en meghatároztuk. 1 µg RNS-hez mintánként 20 egység AMV (avian myeloblastosis virus) reverz transzkriptázt (1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Roche, Mannheim, Németország) adtunk. Az így nyert cDNS-t a kompetitor cDNS-ből készített hígítási sorral kombináltuk.

A PCR-hoz 50 µl-es volumeneket készítettünk 10 µl hígított tumorból származó ill. kompetitor cDNS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, egyenként 0.2 mM minden szükséges deoxinukleotidból, 0.2 µM 'sense', ugyanennyi 'antisense primer' és 0.6 egység DyNAzyme DNS polimeráz (Biometra, Göttingen, Németország) összeadásával. A mikrotubulusokat 3 percre 95 °C-ra hevítettük, majd 31 ciklus következett, melyek 30 sec 95 °C, 40 sec 60 °C, 40 sec 72 °C váltakozásából álltak. Leállító lépésként 7 percig 72 °C-on tartottuk a tubulusokat.

Minden reakcióelegyből azonos mennyiséget ODC esetében Bam HI-vel vagy B-aktinnál Bgl II-vel emésztettünk, ill. negatív és enzimből túladagolt kontrollokat is készítettünk. Ezt követően a reakcióelegyet 2 %-os agaróz géltre helyeztük és elektroforetikusan szeparáltuk. A mintában lévő DNS-mennyiséget etidium bromid festéssel és nagy-energiájú ultraviola megvilágítást alkalmazó számítógépvezérelt digitalizált képmegjelenítő rendszerrel határoztuk meg. Az ODC mRNS mennyiséget az ugyanabban a mintában megmért β-aktin mRNS mennyiséghez viszonyítva állapítottuk meg.

A vizsgálataink során nyert adatokat ± standard eltéréssel (SD) adtuk meg. Gliómák esetében a statisztikai analízishez páratlan T-próbát alkalmaztunk, míg meningeómáknál a különböző csoportok közötti szignifikanciát (M-R) és (M+R) esetében páratlan Mann-Whitney's U teszttel analizáltuk. Az (M+R) csoport és saját recidíváinak (R) összehasonlításakor páros Wilcoxon 'signed-rank' tesztet használtunk.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Ependimómák vizsgálatának eredményei

Az ependimómák vizsgálata során összesen 132 emberi agyszövetmintában határoztuk meg a poliaminok (putreszcin, spermidin, spermin) szintjét ill. a metabolizmusuk kulcsenzimének, az ODC-nek az aktivitását. A minták szövettani megoszlása a következő volt: 11 db II. grádusú ependimóma, 52 db nem-tumoros agyszövet és 69 db II. grádusú egyéb glióma.

Az ODC aktivitás tekintetében jelentős különbséget találtunk az egyes szövettani csoportok értékei között. Az igen alacsony nem-tumoros agyszövet értékei mellett ( $0.9 \pm 0.6$  nmol/g/h) hasonlóan alacsony, bár számszerűleg magasabbak a II. grádusú gliómák értékei ( $3.3 \pm 4.4$  nmol/g/h). Szembetűnő viszont az ODC aktivitásának fokozódása a II. grádusú ependimómákban ( $11.3 \pm 13.8$  nmol/g/h) mely érték szignifikánsan különbözik mind a nem-tumoros agyszövetétől ( $p \leq 0.0001$ ), mind pedig a II. grádusú gliómákétól is ( $p \leq 0.001$ ). Számításaink szerint tehát a II. grádusú ependimómák ODC aktivitása jelentősen meghaladja a velük egy grádus-beosztásba eső egyéb gliómák ODC aktivitását. Az *1. diagramon* megfigyelhető, hogy az ODC aktivitás különbözött a két, egyaránt II. grádusú tumorcsoport között, és jó korrelációt mutatott a proliferáció mértékével, amennyiben a legalacsonyabb értékeket a nem tumoros agyszövetmintákban érte el.

A nem-tumoros agyszövetek, az ependimómák, és a II. grádusú gliómák poliaminszintjeinek összehasonlításakor minden esetben a putreszcin, a spermidin és spermin szinteket határoztuk meg.

1. diagram  
II. grádusú ependimómák és egyéb gliómák ODC aktivitása



A *putreszcinszint* vizsgálatakor azt találtuk, hogy a II. grádusú ependimómák putreszcinszintje ( $139.4 \pm 118.7$  nmol/g) szignifikánsan magasabb a nem-tumoros agyszövetek értékéhez képest ( $47.6 \pm 27.9$  nmol/g,  $p \leq 0.0001$ ), ami korrelál a két vizsgált csoport között a proliferációs készségbeli eltéréssel. Nem találtunk viszont számottevő különbséget a putreszcinszintet illetően a II. grádusú ependimómák és a II grádusú egyéb gliómák között ( $122.4 \pm 106.1$  nmol/ g).

A *spermidinszintek* mérésekor megállapítottuk, hogy mind a II. grádusú ependimómák ( $308.6 \pm 251.0$  nmol/g), mind a II. grádusú gliómák ( $339.9 \pm 167.9$  nmol/g) magasabb értékeket mutattak mint a nem tumoros agyszövet ( $247.6 \pm 122.0$  nmol/g), azonban ez a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsan eltérőnek.

A *sperminsintek* meghatározásakor azt találtuk, hogy várakozásunknak megfelelően a II. grádusú ependimómák értéke ( $188.8 \pm 151.7$  nmol/g) szignifikánsan emelkedettebb volt a nem-tumoros agyszövet értékéhez képest ( $91.7 \pm 46,1$  nmol/g,  $p \leq 0.01$ ). Ennél

szembetűnőbb azonban, hogy a II. grádusú endimidómák sperminszintje a II. grádusú gliómák sperminszintjét ( $77.6 \pm 81.2$  nmol/g,  $p \leq 0.05$ ) is szignifikánsan meghaladja.

Az endimidómák vizsgálata kapcsán mért eredményeinket az 1. táblázat tartalmazza, míg a poliaminok szintjét a 2. diagram szemlélteti.

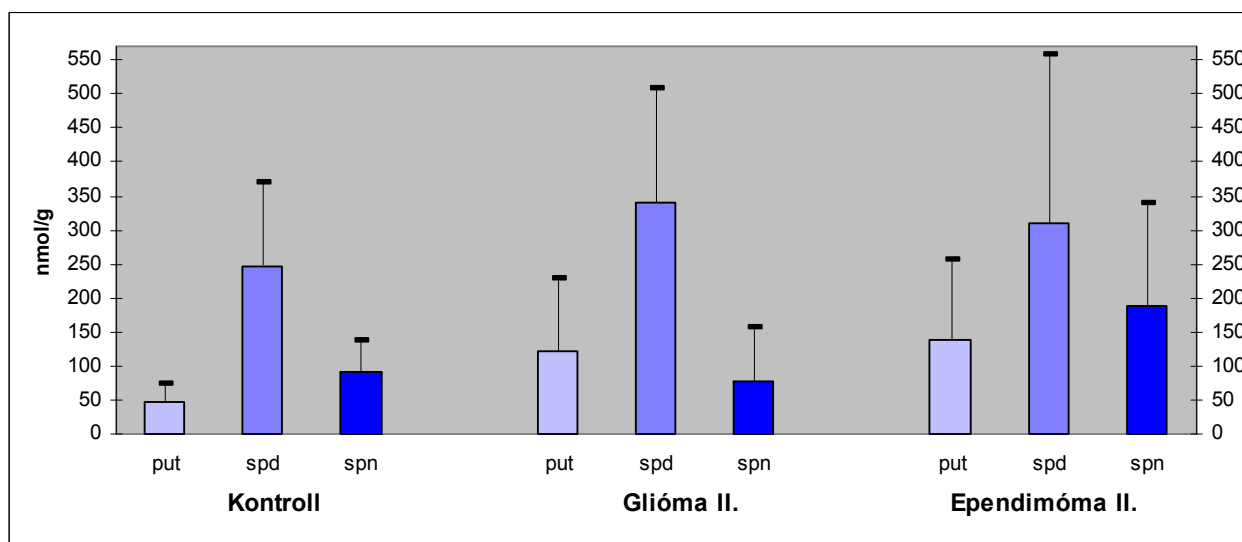
1. táblázat  
II. grádusú endimidómák és egyéb gliómák ODC aktivitása és poliaminszintjei

	n	ODC-akt. (nmol/g/h)	Putreszcín (nmol/g)	Spermidin (nmol/g)	Spermin (nmol/g)
kontroll:	5	$0,9 \pm 0,6$	$47,6 \pm 27,9$	$247,6 \pm 122$	$91,7 \pm 46,1$
endimidóma G II:	11	$11,3 \pm 13,8$	$139,4 \pm 118,7$	$308,6 \pm 251$	$188,8 \pm 151,7$
glióma G II:	69	$3,3 \pm 4,4$	$122,4 \pm 106,1$	$339,9 \pm 167,9$	$77,6 \pm 81,2$

n: esetszám

A feltüntetett értékek  $\pm$  szórással szerepelnek.

2. diagram  
II. grádusú endimidómák és egyéb gliómák poliamin szintjei



A három vizsgált szövettani tumortípus közül az ependimómákat vizsgáltuk meg először. A poliaminszintekkel kapcsolatos megfigyeléseink a korábbi irodalmi adatokkal összhangban kevés egyértelmű összefüggést tártak fel, így további vizsgálataink során leginkább az ODC-vel kapcsolatos változásokra koncentráltunk.

## 5.2. Asztrocitómák vizsgálatának eredményei

Az ODC aktivitást vizsgálva megállapíthattuk, hogy a magas grádusú tumorokban mért átlagos aktivitás szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoport értékéhez képest (AIII:  $7.9 \pm 4.4$  nmol/g/h,  $p \leq 0.01$ , GBM:  $26.5 \pm 15.7$  nmol/g/h,  $p \leq 0.01$ , kontroll:  $0.9 \pm 0.3$  nmol/g/h). Az egyes tumorcsoportokat összehasonlítva azt találtuk, hogy míg a II. grádusú asztrocitómákban mért enzimaktivitás ( $2.0 \pm 1.5$  nmol/g/h) a nem-tumoros agyszövetétől nem tért el jelentős mértékben, addig a III. grádusú tumorokhoz ( $p \leq 0.05$ ) és a glioblasztómákhoz ( $p \leq 0.001$ ) képest e tekintetben szignifikánsan alacsonyabb értékeket képvisel. Emellett pedig statisztikailag szignifikáns eltérés igazolódott a III. grádusú asztrocitómák és a glioblasztóma multiforme között is ( $p \leq 0.01$ ).

Asztrocitómák különböző grádusú csoportjainak vizsgálata során szignifikánsan magasabb ODC mRNA mennyiséget mértünk a II. grádusú tumorokban ( $3.2 \pm 1.5$  mU/U  $\beta$ -aktin), mint a kontroll, nem-tumoros agyszövetben ( $1.4 \pm 0.3$  mU/U  $\beta$ -aktin,  $p \leq 0.05$ ). A glioblasztómákban meghatározott érték is hasonlóan szignifikáns eltérést eredményeztek ( $4.9 \pm 3.6$  mU/U  $\beta$ -aktin,  $p \leq 0.001$ ) a kontroll csoport értékéhez képest. A III. grádusú, anaplasztikus asztrocitómák magas ODC mRNA tartalma ( $4.7 \pm 3.7$  mU/U  $\beta$ -aktin) azonban a nagy szórás miatt statisztikai szempontból nem különbözött szignifikánsan a többi

csoportban meghatározott értékektől. Az asztrocitómák elemzése során mért értékeket a 2. táblázat foglalja össze és a 3. diagram szemlélteti.

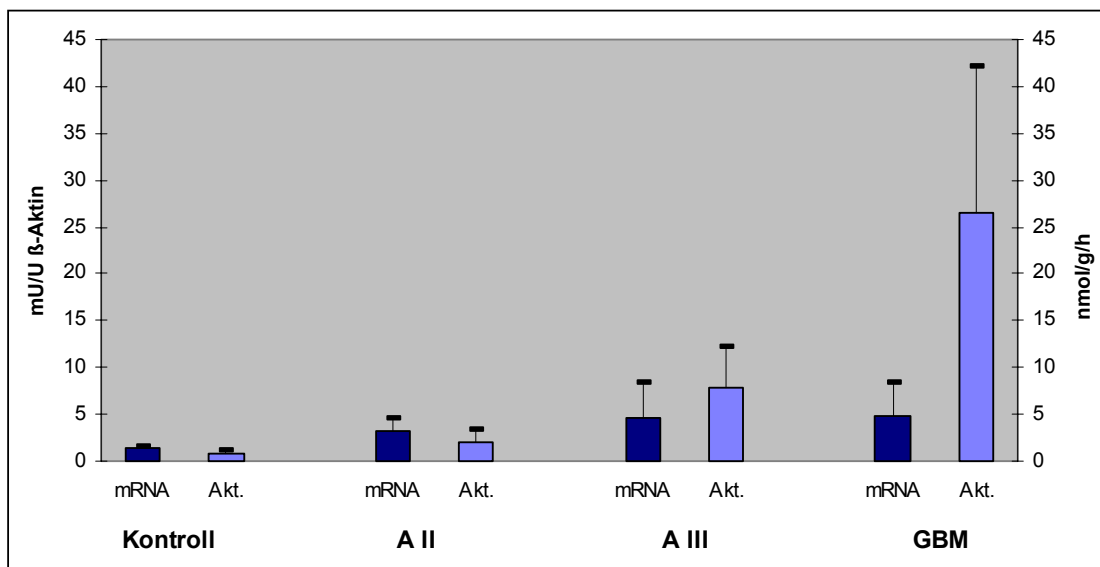
2. táblázat  
ODC mRNS tartalom és enzimaktivitás asztrocitómákban

	n	ODC mRNS (mU/U $\beta$ -aktin)	ODC aktivitás (nmol/g/h)
kontroll:	5	$1.4 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.3$
asztrocitóma G II:	8	$3.2 \pm 1.5$	$2.0 \pm 1.5$
asztrocitóma G III:	8	$4.7 \pm 3.7$	$7.9 \pm 4.4$
glioblasztóma m.:	8	$24.9 \pm 3.6$	$26.5 \pm 15.7$

n: esetszám

A feltüntetett értékek  $\pm$  szórással szerepelnek.

1. diagram  
ODC mRNS tartalom és enzimaktivitás asztrocitómákban



Kontroll: peritumorális agyszövet

A II: II. grádusú asztrocitóma, A III: III. grádusú asztrocitóma, GBM: glioblasztóma multiforme

### 5.3. Meningeómák vizsgálatának eredményei:

Nem volt szignifikáns különbség az ODC aktivitás tekintetében a később kiújuló ( $6.9 \pm 6.6$  nmol/g/h), és a ki nem újult meningeómák ( $3.7 \pm 3.8$ ) között. Emellett azonban a primer tumorokat recidíváikkal összehasonlítva, az ODC aktivitás a recidív tumorokban szignifikánsan magasabbnak bizonyult ( $13.4 \pm 13.7$  nmol/g/h,  $p \leq 0.001$ ).

Az átlag ODC mRNS szint szignifikánsan magasabb volt azokban a meningeómákban, melyek később recidiváltak, ( $7.1 \pm 5.2$  mU/U  $\beta$ -aktin,  $p \leq 0.001$ ,  $n = 14$ ) mint azokban a tumorokban, melyek a követési időszak alatt nem újultak ki ( $2.1 \pm 1.0$  mU/U  $\beta$ -aktin,  $n = 8$ ). A recidív tumorok ODC mRNS tartalma viszont szignifikánsan kisebb volt, mint a hozzájuk tartozó primer tumoroké ( $5.5 \pm 4.2$  mU/U  $\beta$ -aktin,  $p \leq 0.01$ ,  $n = 14$ ).

Az átlag Ki-67 index a recidívát nem okozó meningeómákban volt a legalacsonyabb ( $2.5 \pm 1.7$  %). A később kiújuló tumorokban ennél magasabb értéket találtunk ( $6.8 \pm 6.9$  %), míg a recidívákban mért érték a legkisebbhez képest szignifikánsan magasabb volt ( $8.2 \pm 6.0$  %,  $p \leq 0.001$ ).

A mitózisszám a Ki-67 index emelkedésével szinkron változott: recidíva nélküli tumorokban  $0.7 \pm 0.5$  /mm<sup>2</sup>, később kiújuló meningeómákban  $3.6 \pm 6.4$ /mm<sup>2</sup> és a recidív daganatokban  $5.1 \pm 9.5$ /mm<sup>2</sup> volt, de szignifikáns különbségeket a statisztikai feldolgozás nem igazolt.

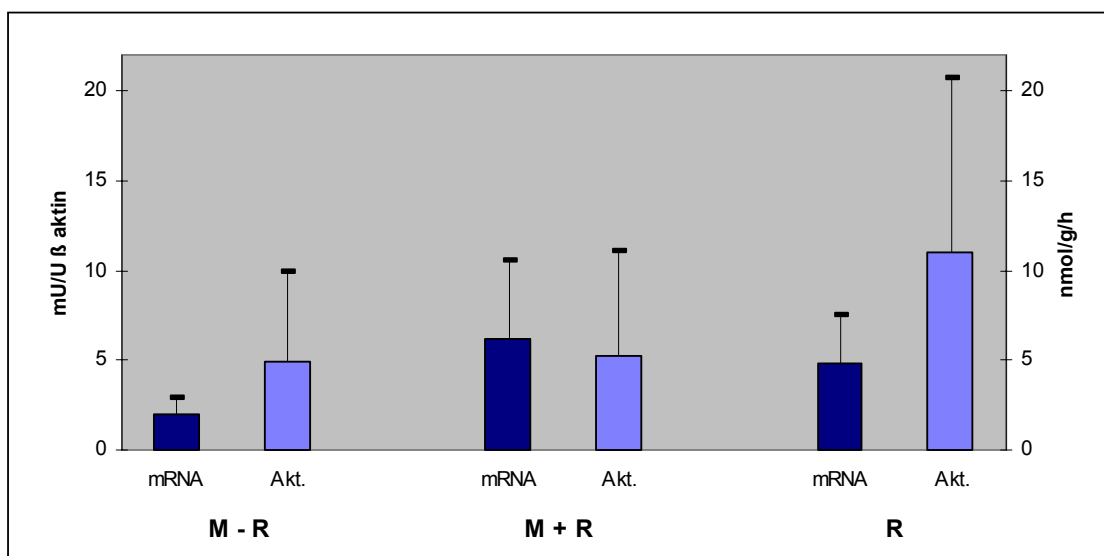
A meningeómák feldolgozása során kapott adatokat a 3. táblázat foglalja össze és a 4. diagram ábrázolja.

3. táblázat  
ODC mRNS tartalom, enzimaktivitás, Ki-67 index és mitózisszám meningeómákban

	n	ODC mRN (mU/U $\beta$ -aktin)	ODC aktivitás (nmol/g/h)	Ki-67 index (%)	Mitózisszám (db/mm <sup>2</sup> )
M – R:	8	2.1 $\pm$ 1.0	3.7 $\pm$ 3.8	2.5 $\pm$ 1.7	0.7 $\pm$ 0.5
M + R:	14	7.1 $\pm$ 5.2	6.9 $\pm$ 6.6	6.8 $\pm$ 6.9	3.6 $\pm$ 6.4
R:	14	5.5 $\pm$ 4.2	13.4 $\pm$ 13.7	8.2 $\pm$ 6.0	5.1 $\pm$ 9.5

n: esetszám. A feltüntetett értékek  $\pm$  szórással szerepelnek.

4. diagram  
ODC mRNS tartalom és enzimaktivitás meningeómákban



M – R: recidíva nélküli meningeómák, M + R: recidiváló meningeómák, R: M + R csoport kiújult tumorai.

Ahogy a 4. diagram demonstrálja, az ODC mRNS a recidív daganatok csoportjában csökkent, míg az ODC aktivitás, a KI-67 index és a mitózisszám a primer tumor és a recidíva között emelkedő tendenciát mutatott.

## 6. MEGBESZÉLÉS

Amióta Herbst és Snell 1949-ben leírta a putreszcin növekedési faktor szerepét a haemophilus parainfluenzae-ban (31), számos közlemény született a poliamin anyagcsere aktivitásának és a sejtproliferáció összefüggésének a vizsgálatáról (összefoglalásként ld. Tabor és Tabor 1976 (88), Jänne és tsai 1978 (38) és Williams-Ashman és tsai 1980 (96).

A poliaminok (putreszcin, spermidin és spermin) szükségesek a DNS replikációhoz, proliferációhoz és a sejt homeosztázishoz (68). Az ornitin dekarboxiláz (ODC) a poliamin bioszintézis első kulcsenzime egyike a legszorosabb szabályozás alatt álló eukarióta enzimeknek (29). Számos faktor indukálhatja az ODC aktivitást (50, 98), és hatásukra a gyorsan proliferáló ép (39), vagy tumoros sejtekben (67) megnő a celluláris poliamin felvétel.

Kimutatták, hogy az ODC indukálódása a sejtciklus G1 fázisának univerzális markere, a G1 fázisból S fázisba lépésnek pedig szigorú velejárója (8, 27, 28, 78). Különböző növekedési stimulusok erősen fokozzák az ODC aktivitását, amit egyes szerzők az enzim proto-onkogén szerepének jeleként értékelték. (3, 45). Eukarióta sejtekben végzett utatások alapján megállapították, hogy szaporodó sejtekben az ODC mennyisége a nyugvó sejtben mért mennyiség 500-szorosát is elérheti (29). További kutatások ezen túlmenően igazolták, hogy az ODC-gén, mely a 7-es kromoszómán található, más onkogének szomszédságában (39) mint proto-onkogén funkcionál a sejtnövekedés és a malignus sejtranszformáció szabályozásában (3, 85, 90).

Különböző extraneurális malignus agydaganat esetében már korábban bizonyították, hogy a poliamin bioszintézis a humán daganatokban aktivált állapotba kerül (5, 34). Experimentális és humán gliómákon az ODC aktivitás és a malignitás között pozitív korreláció igazolódott (34, 79), és feltételezték, hogy az ODC aktivációja a malignitás korai

kifejeződése lehet (5). Számos sejtbiológiai vizsgálatot végeztek a meglehetősen bonyolult ODC szabályozás feltárása érdekében (98, 45). Részletes molekulár-biológiai elemzések során az ODC-gén szerkezetét is feltárták már (58) és az ODC mRNS pontos bázissorrendje is ismertnek tekinthető (41). Elitsur és tsai (14) rákos kolonocitákban a normál kolonocitákhoz képest magasabb ODC mRNS szintet találtak, ami az ODC aktivitás poszt-transzkripciós szinten megvalósuló szabályozásra utal. Jóllehet mások emellett igazolni tudták, hogy az ODC transzkripciós (45, 98), translációs (86) és poszt-transzlációs (95) szinten is szabályozódik, a pontos mechanizmust teljes részletességgel a mai napig sem sikerült feltárni.

Kutatásaink során a poliamin-anyagcsere változásai és az intrakraniális tumorok növekedése közötti összefüggést kerestük. Vizsgálataink a leggyakoribb intracerebrális daganattípus, az asztrocitómák mellett a leggyakoribb intrakraniális, de extracerebrális tumorokra, a meningeómákra irányultak, ill. a gliómák egy csoportját, az endimómákat külön is részletesen elemeztük.

Tanulmányunkban először az endimómák proliferációs képességét vizsgáltuk meg funkcionális szempontból a poliamin metabolizmus aktivitásának meghatározásával. A kapott eredményeket II. grádusú egyéb gliómák (II. grádusú asztrocitómák és kevert, oligoasztrocitómák) és nem-tumoros agyszövet eredményeivel hasonlítottuk össze. Mindhárom csoport esetében megmértük a poliaminok közül a putreszcin, a spermidin és spermin szinteket, ill. a poliamin metabolizmus kulcsenzimének, az ODC-enzimnek az aktivitását (*1. táblázat*).

Számításaink megerősítették azt az elképzelést, miszerint a poliamin anyagcsere aktivitásának mértéke a proliferációval összefüggve tumorokban magasabb értékeket

eredményez, mint a nem-tumoros agyszövetben. Ez az összefüggés az ependimómákra is igaznak bizonyult, hiszen a II. grádusú ependimómák ODC aktivitása és putreszcin valamint spermin szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a nem-tumoros, kontroll csoport értékeinél (1. és 2. diagram).

Megvizsgálva a gliómák csoportján belül az ependimómákra és az egyéb gliómákra jellemző poliamin metabolizmus aktivitását, azt találtuk, hogy az azonos grádusbeli beosztás ellenére az ependimómákban az ODC aktivitás és a spermin szint szignifikánsan magasabb volt az egyéb gliómák értékeihez képest. Mindez az ependimómák proliferációs készségének emelkedett voltára és ezen keresztül e daganattípus gliómákon belüli különleges szerepére hívja fel a figyelmet, melyet talán az ependimális és subependimális sejtréteg nagyobb proliferációs potenciáljával lehet összefüggésbe hozni.

Az ODC aktivitásának változásai szorosabban összefüggtek a malignitás fokával, mint a poliaminok szintjei. Korábbi tanulmányok eredményeivel (25, 48, 64) szemben a mi vizsgálataink szerint a poliaminok szintjének intratumorális meghatározása nem szolgál egyértelműen a malignitás biokémiai markereként (20). Azonban egyes szerzőkkel összhangban (Kurihara és tsai [48]) meglepően magas ODC aktivitást és poliaminszintet találtunk a II. grádusú ependimómákban. Ezek a tumorok ependimális sejtekből erednek, melyek közvetlenül a velőcsőből származnak (76). Az idegszövet fejlődése is részben az ODC-poliamin rendszer befolyása alatt áll (11), így feltételezhető, hogy az ependimómákban mért magas ODC aktivitás és poliaminszint az ependimális és subependimális sejttájomány fejlődési jellegzetességét és proliferációs potenciálját jellemzi.

Mivel az ependimómák sugárérzékeny daganatok, (38) és posztoperatív kezelésük a terápiás irányelvek felállításának ma is képlékeny részét képezi, jelen kutatási eredmények

a tumoreltávolítást követő irradiációs kezelés indikációjának megállapításához nem elhanyagolható segítséget nyújthatnak.

A leggyakoribb intrakraniális daganatok, az asztrocitómák (24) molekulár-biológiai vizsgálata során elvégzett genetikai elemzésekkel kimutatták, hogy a IV. grádusú asztrocitóma, a glioblasztoma multiforme az esetek 66 %-ban alacsonyabb grádusú daganat progressziójával jön létre (49). Az alacsony grádusú asztrocitómák kezeléséről eltérő vélemények léteznek, hiszen míg egyes szerzők a radikális therápia hívei (29), addig mások ellenzik azt (100). Ezt az ellentétet tovább színezi a műtéti beavatkozás lehetősége mellett adható irradiációs kezelés megítélése is. Vizsgálataink eredményeivel mindezen ellentétek feloldásához kívántunk további ismeretekkel hozzájárulni.

Az asztrocitómák vizsgálata során II., III. és IV. grádusú (GBM) daganatokból származó minta ODC mRNS tartalmát és enzimaktivitását hasonlítottuk össze nem tumoros, kontroll agyszövetminta értékeivel. Az átlagos ODC aktivitás szignifikánsan magasabb volt minden grádusú gliómában a peritumorális nem-tumoros agyszövethez képest, sőt, az enzimaktivitás szignifikánsan magasabb volt a magas, mint az alacsony grádusú gliómákban. Míg az ODC aktivitás a már korábban is leírt, malignitással együtt emelkedő összefüggése nem jelentett meglepő eredményt, addig a GBM-ben tapasztalt, III. grádusú asztrocitómákhoz képest lényegesen nem változó ODC mRNS mennyiség (2. táblázat, 3. diagram) további következtetéseket eredményezett. Az eltérő grádusú daganatokban detektált közel azonos mennyiségű mRNS melletti szignifikánsan eltérő enzimaktivitás az ODC regulációjának poszt-transzkripciós szinten történő megvalósulására hívja fel a figyelmet. Ennek további elemzése érdekes eredményekre vezethet, hiszen magyarázatot nyújthatna arra, hogy a II. és III. grádusú asztrocitómákban már meglévő relatíve nagy ODC mRNs mennyiség miért nem tud kifejeződésre jutni? Amennyiben konkrét – feltehetően

szupresszor - mechanizmusra derülne fény, ennek részletesebb megismerése nemcsak a kutatásban, hanem esetleg a daganat-therápiában is hasznosítható információt jelenthetne.

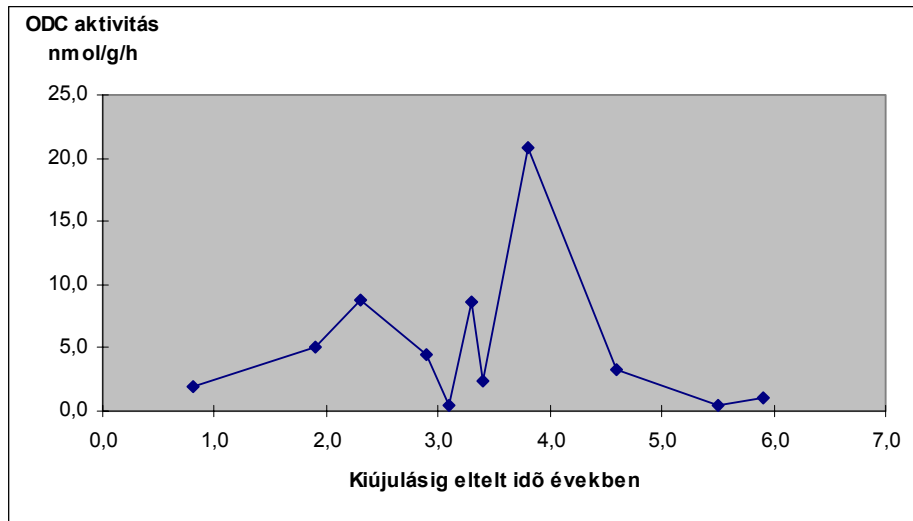
A meningeómák morfológiai jellemzőit már részletesen leírták, de a szövettani diagnózis önmagában nem mindig nyújt elegendő információt a várható prognózis felállításához. Perry és tsai (72) egy átfogó klinikai tanulmány során relatíve magas kiújulási arányt észleltek e rendszerint jóindulatú daganatok között: a klasszikus meningeómák 12 %-a, az atípusos tumorok 41 %-a, és az agyállományt is infiltráló daganatok 56 % recidivált. Ezek az adatok megmagyarázzák a meningeómák prognosztikai faktorait kutatók ambícióit. Számos faktort vizsgáltak már eddig is, ilyen pl. a maghoz kötődő Ki-67 proliferációs index (19, 82), a mitózis szám (72), a brómdeoxiuridin jelölés (97), a szöveti nem specifikus alkalikus foszfatáz (65) vagy számos, specifikus primer ill. szekunder genetikai eltérés (pl. az 1. kromoszóma rövid karjának deléciója) is ezek közé a faktorok közé tartozik (94). Néhány markert sikerült már a meningeómák kiújulási gyakoriságával összefüggésbe hozni (30), de a kérdéskör még korántsem tekinthető minden szempontból megválaszoltnak.

A Ki-67 a sejtproliferációs folyamatokban jelen lévő protein, mely a sejtosztódás összes fázisában a G0 fázist kivéve megtalálható (41). A tumorkutatásban a proliferáció meghatározására elterjedten használják. Gyermekkori ependimómákban prognosztikai faktorként értékelték (21). Meningeómákban a Ki-67 jelölési index a szövettani grádussal pozitív korrelációt mutatott (87), de a prognózissal kapcsolatban összefüggéseket nem sikerült feltárni (11). Infiltratív asztrocitómák vizsgálata során a hisztopathológiai paraméterek standardizálására a mitózis-index és a Ki-67 együttes meghatározását ajánlják (80).

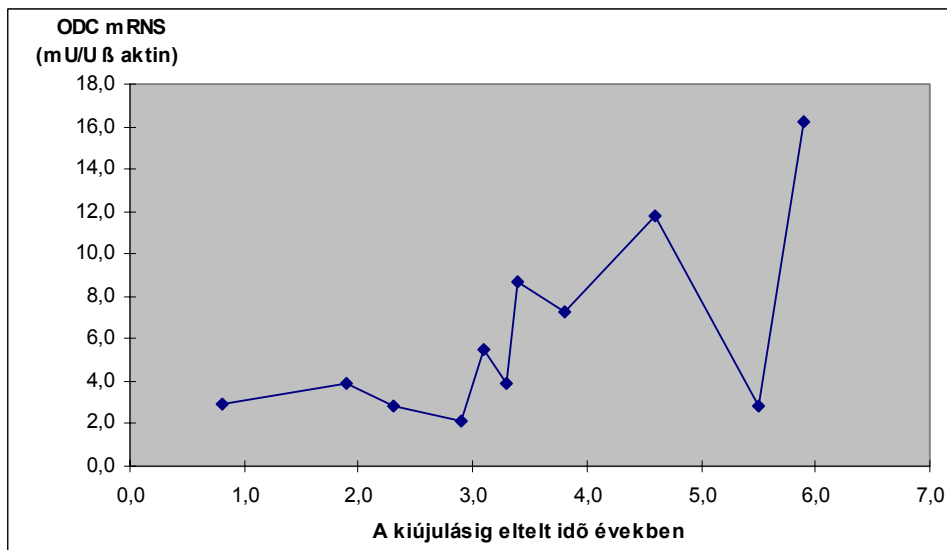
Vizsgálataink során az ODC gén expressziójának a meningeómák recidíva képzésében betöltött lehetséges szerepének tisztázását célozva az ODC mRNS szintet, az enzimaktivitást, a Ki-67 indexet és a mitózisszámot határoztuk meg. Az ODC aktivitás és a Ki-67 index között szoros összefüggés nem igazolódott, ami arra utal, hogy a két paraméter a tumoros sejtproliferációt más és más szempontból jellemzi. Jelen vizsgálati anyagban az ODC aktivitás és a Ki-67 index a recidív tumorokban magas értékeket képviselt, de az mRNS szint az astrocitómákban tapasztaltakhoz hasonlóan nem mutatott velük szinkron emelkedést (3. táblázat, 4. diagram). Ezek az eltérések az ODC szabályozó mechanizmusainak a kiújult meningeómákban is poszt-transzkripciós szinten történő megvalósulását támasztják alá. Mafune és tsai (51) magas ODC mRNS szintet mutattak ki primer nyelőcsőrákban, ami a squamózus sejtes karcinóma prognosztikai markere lehet. Mi a kiújult meningeómák primer tumoraiban szignifikánsan magasabb ODC mRNS szintet találtunk a recidívát nem eredményező tumorokhoz képest. Ezek az eredmények aláhúzzák az ODC gén expressziójának a meningeómák kiújulásában betöltött szerepét. A különböző csoportok közötti átfedések sajnos egyenlőre nem engedik meg a fenti vizsgálatok klinikumban kívánatos individuális alkalmazását, így ehhez még további vizsgálatok szükségesek.

Vizsgálataink során összefüggést kerestünk a primer meningeómák ODC aktivitása és mRNS tartalma ill. a kiújulásig eltelt idő között. Az eredményt az 5. és a 6. diagram szemlélteti. Ez alapján bár az eltelt idővel valamelyest együtt emelkedő ODC mRNS-t találtunk, egyértelmű szoros korreláció egyik paraméterrel kapcsolatban sem állapítható meg. Ezek alapján tehát úgy tűnik, hogy az ODC aktivitás és mRNS tartalom meghatározásával a progresszió mentes túlélés időtartamára következtetni nem lehet.

5. diagram  
ODC aktivitás primer meningeómákban



6. diagram  
ODC mRNS tartalom primer meningeómákban



A klinikai felhasználhatóságot a költséges eljárások és a tumor heterogenitásából adódó mintavételi hibalehetőség sajnos még korlátozzák. Hasonló problémák jelentkeztek a poliaminok vérből (10, 15, 59, 61) és likvorból (2, 59, 65, 73, 89) történő meghatározása

során is. A kvantitatív biokémia szintjén ma még nem lehetséges a poliamin metabolizmus aktiváltságát sem autoradiographiás (91, 93), sem pozitron emissziós tomográfiával (PET) (32, 75) *in vivo* mérésekkel meghatározni. A későbbiekben további molekulár-biológiai vizsgálatok segíthetnek tisztázni az ODC gén esetleges onkogén szerepét az agydaganatok növekedésében (4).

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen tanulmányban biokémiai módszerekkel az ODC aktivitást, az ODC gén expresszióját ill. a poliaminok szintjeit együtt vizsgáltuk meg humán agydaganatok esetében és eredményeinket a szövettani leletekkel vetettük egybe.

1. Eredményeinkkel demonstrálni tudtuk, hogy a poliamin anyagcsereependimómákban fokozódik, és ennek a mértéke az azonos grádusbeli és hasonlóan glia eredetű daganatokhoz képest nagyobb proliferációs készséget jelent
2. Azependimómák kvantitatív biokémiai vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a poliaminszintek változásai a tumoros sejtszaporodással kapcsolatban egyértelműen szoros összefüggést nem jelentettek.
3. Az ODC aktivitás asztrocitómákban a grádussal együtt emelkedett, melyet az ODC mRNS tartalom nem követett. Ezt, az ODC aktivitás növekedésétől elmaradó mRNS tartalmat meningeómák esetében is tapasztaltuk, ami az ODC regulációjának döntően poszt-transzlációs szinten történő megvalósulásaként értékelhető.
4. Az ODC mRNS szint a később recidiváló meningeómákban szignifikánsan magasabb volt, így megállapítható, hogy az ODC mRNS szint a meningeómák eltávolítása után a lokális kiújulás lehetőségének meghatározásához prognosztikai faktorként szolgálhat. Az általunk meghatározott biokémiai paraméterek a kiújulás várható időtartamával összefüggést nem mutattak.
5. Végezetül összefoglalásként megállapítható, hogy míg az ODC aktivitás a malignitás aktuális fokának markereként használható, az ODC mRNS a tumorok sejtproliferációs potenciálját jellemzi.

## **8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Jelen tudományos munka elvégzésének lehetőségéért elsősorban Dr. Csécei György és Dr. Norfrid Klug Professzor Uraknak tartozom köszönettel. Munkám technikai megvalósításában Dr. Gabriele Röhn és Dr. Gerhard Schillinger ezúton nyújtott önzetlen és pótolhatatlan segítséget. Dr. Ralf-Ingo Ernestust és Dr. Molnár Péter Professzor Urat a kutatómunkám során nyújtott szakmai jellegű tanácsaiért és támogató irányításáért illeti megkülönböztetett köszönet.

Mindannyiuk segítségét és e disszertáció létrehozásában való közreműködését ezúton is szeretném őszinte tisztelettel megköszönni.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abramovich C.M., Prayson R.A.: Histopathologic features and MIB-1 labeling indices in recurrent and nonrecurrent meningiomas. *Arch Pathol Lab Med* 123: 793-800, 1999
2. Albright A.L., Marton L.J., Lubich W.P., Reigel D.H.: CSF polyamines in childhood. *Arch Neurol* 40: 237-240, 1983
3. Auvinen M., Paasinen A., Andersson L.C., Hölttä E.: Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360: 355-358, 1992
4. Auvinen M.: Cell transformation, invasion, and angiogenesis: a regulatory role for ornithine decarboxylase. *J Natl Canc Inst* 85: 533-537, 1997
5. Bachrach U.: polyamines as chemical markers of malignancy. *Ital J Biochem* 25:77-93, 1976
6. Balasundaram, D., Tyagi, A.K.: Polyamine-DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol. Cell. Biochem.* 100, 2: 129-140, 1991
7. Blagbrough I.S., Brackley P.T.H., Bruce M., Bycroft B.W., Mather A.J., Millington S., Sudan H.L., Usherwood P.N.R.: Arthropod toxins as leads for novel insecticides: an assessment of polyamine amids as glutamate antagonists. *Toxicon* 30: 303-322, 1992
8. Brooks W.H.: Polyamine involvement in the cell cycle, apoptosis, and autoimmunity. *Med Hypothesis* 44: 331-338, 1995
9. Burger, P.C., Vogel, F.S., Green, S.B. et al.: Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma: pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56: 1106-1111, 1985

10. Chatel M., Darcel F., Quemener V., Hercouet H., Moulinoux J.-P.: Red blood cell polyamines as biochemical markers of supratentorial malignant gliomas. *Anticancer Res* 7: 33-38, 1987
11. Demirtas E., Ersahin Y., Yilmaz F., Mutluer S., Veral A.: Intracranial meningeal tumours in childhood: a clinicopathologic study including MIB-1 immunohistochemistry. *Pathol Res Pract* 196(3): 151-8, 2000
12. Dorn A., Müller M., Bernstein H.-G., Pajunen A., Järvinen M.: Immunohistochemical localization of L-ornithine decarboxylase in developing rat brain. *Int J Dev Neurosci* 5: 145-150, 1987
13. Duffner, P.K., Cohen, M.E., Freeman, A.I.: Pediatric brain tumors: an overview. *Cancer* 35: 287-301, 1985
14. Elitsur Y., Moshier J.A., Murthy R., Barbish A., Luk G.D.: Polyamine levels, ornithine decarboxylase (ODC) activity, and ODC-mRNA expression in normal and cancerous human colonocytes. *Life Sci* 50: 1417-1724, 1992
15. Elworthy P., Hitchcock E.: Red blood cell polyamines as a diagnostic indicator of glioma presence and recurrence. *J Neuro-Oncol* 7: 31-38, 1989
16. Ernestus, R.-I., Röhn, G., Schröder, R., Klug, N., Hossmann, K.-A., Paschen, W.: Activity of ornithine decarboxylase (ODC) and polyamine levels as biochemical markers of malignancy in human brain tumors. *Acta histochem.* XLII, S: 159-164, 1992
17. Ernestus, R.-I., Röhn, G., Hossmann, K.-A., Paschen, W.: Polyamine metabolism in experimental brain tumors of rat. *J. Neurochem.* 60, 2: 417-422, 1993
18. Ernestus, R.-I., Schröder, R., Röhn, G., Klug, N., Hossmann, K.A., Paschen, W.: Activity of ornithine decarboxylase and ki-67 index in meningiomas. *Adv. Neurosurg.* 21: 307-311 1993

19. Ernestus, R.-I., Röhn, G., Schröder, R., Els, T., Lee, J.-Y., Klug, N., Paschen, W.: Polyamine metabolism in gliomas. *J. Neuro-oncol.* 29: 167-174, 1996
20. Ernestus RI, Röhn G, Schröder R, Els T, Klekner A, Paschen W, Klug N: Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 88-92, 2001
21. Figarella-Branger D., Civatte M., Bouvier-Labit C., Gouvernet J., Gambarelli D., Gentet J.C., Lena G., Choux M., Pellissier J.F.: Prognostic factors in intracranial ependymomas in children. *J Neurosurg* 93(4): 605-13, 2000
22. Fredlund, J.O., Johansson, M.C., Dahlberg, E., Oredsson, S.M.: Ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression during the cell cycle of Chinese hamster ovary cells. *Exp. Cell. Res.* 216, 1: 86-92, 1995
23. Fujita K., Murakami Y., Hayashi S.: A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase. *Biochem j* 204: 647-652, 1982
24. Greenberg, M.S.: *Handbook of Neurosurgery*. 4<sup>th</sup> Ed. Greenberg Graphics, Inc., Lakeland, US. 244-256, 1997
25. Harik S.I., Sutton C.H.: Putrescine as a biochemical marker of malignant brain tumors. *Cancer Res* 39: 5010-5015, 1979
26. Hayashi, S...*Biochem j* 306: 1-10, 1995
27. Heby O., Gray J.W., Lindl P.A., Marton L.J., Wilson C.B.: Changes in L-ornithine decarboxylase activity during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 99-105, 1976
28. Heby O.: Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1-20, 1981
29. Heby O., Persson L.: Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 15: 153-158, 1990

30. Henn W., Urbschat S.: Genetische Grundlagen der Entstehung von Hirntumoren. *Radiologe* 38: 898-903, 1998
31. Herbst E.J., Snell E.E.: Putrescine and related compounds as growth factors for *Hemophilus parainfluenzae*. *J Biol Chem* 181: 47-54, 1949
32. Hiesiger E.M., Fowler J.S., Logan J., Brodie J.D., MacGregor R.R., Christman D.R., Wolf A.P.: Is [ $^{11}\text{C}$ ]putrescine useful as a brain tumor marker? *J Nucl Med* 33: 192-199, 1992
33. Holt, J.T., Gopal T.V., Moulton A.D., Nienhuis A.W.: Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4794-4798, 1986
34. Horn Y., Beal S.L., Walach N., Lubich W.P., Spigel L., Marton L.J.: Further evidence for the use of polyamines as biochemical markers for malignant tumors. *Cancer Res* 42: 3248-3251, 1982
35. Hunt S.P., Pini a., Evan G.: Induction of c-fos-like protein in spinal cord nervous following sensory stimulation. *Nature* 328: 632-634, 1987
36. Ito E., Sonnenberg J.L., Narayanan R.: Nerve growth factor induced differentiation in PC-12 cells is blocked by fos oncogene. *Oncogene* 4: 1193-1199, 1989
37. Jain J., McCaffrey P.G., Valge-Archer V.E., Rao A.: Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 356: 801-804, 1992
38. Jänne J., Pösö H., Raina A.: Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochem Biophys Acta* 473: 241-293, 1978
39. Jänne J., Alhonen L., Leinonen P.: Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann Med* 23: 241-259, 1991
40. Jansson A., Sun X.F.: Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS* 105(9): 730-4, 1997

41. Kahana C., Nathans D.: Nucleotide sequence of murine ornithine decarboxylase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1673-1677, 1985
42. Kahana C., Nathans D.: Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase by polyamines. *J Biol Chem* 260, 29: 15390-15393, 1985
43. Kameji, T., Pegg A.E.: Inhibition of translation of mRNAs for ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase by polyamines. *J Biol Chem* 262, 6: 2427-2430, 1987
44. Kaminska, B., Kaczmarek, L., Grzelakowska-Sztabert, B.: The regulation of G0-S transition in mouse T lymphocytes by polyamines. *Exp. Cell. Res.* 191, 2, 1990
45. Katz, A., Kahana C.: Transcriptional activation of mammalian ornithine decarboxylase during stimulated growth. *Mol Cell Biol* 7: 2641-2643, 1987
46. Kopelson, G., Linggood, R.: Infratentorial glioblastoma: the role of neuraxis irradiation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 8: 999-1003, 1982
47. Kremzner L.T., Barrett R.E., Terrano M.J.: Polyamine metabolism in the central and peripheral nervous system. *Ann N Z Acad Sci* 171: 735-748, 1970
48. Kurihara H., Matsuzaki S., Yamazaki H., Tsukahara T., Tamura M.: Relationship between tissue polyamine levels and malignancy in primary brain tumours. *Neurosurgery* 32: 372-375, 1993
49. Lang F.F, Miller D.C., Koslow M., Newcomb E.W.: Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molekular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81: 427-436, 1994
50. Legraverend C., Potter A., Hölttä E., Alitalo K., Andersson L.C.: Interleukin-2 induces a rapid increase in ornithine decarboxylase mRNA in a cloned murine T lymphocytic cell line. *Exp Cell Res* 181: 273-281, 1989

51. Mafune K., Tanaka Y., Mimori K., Mori M., Takubo K., Makuuchi M.: Increased expression of ornithine decarboxylase messenger RNA in human esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 4073-4078, 1999
52. Mahmood A., Caccamo D.V., Tomecek F.J., Malik G.M.: Atypical and malignant meningiomas: a clinicopathological review. *Neurosurgery* 33: 955-963, 1993
53. Mirzoian, R.A., Promyslow, M.Sh.: Contents of putrescine, spermidine and spermine in tissue of the human brain glial tumors. *Ukr. Biokhim. Zh.* 51, 5: 474-476, 1979
54. Mirzoian, R.A., Promyslow, M.Sh.: Putrescine and polyamines in human and rat cerebral gliomas. *Vopr. Med. Khim.* 26, 3: 379-381, 1980
55. Mitchell, J.L.A., Choe C., Judd G.G.: Feedback repression of ornithine decarboxylase synthesis mediated by antizyme. *Biochem J* 320: 755-760, 1996
56. Morgan D.M.L.: Polyamines. *Essays Biochem* 23: 82-115, 1987
57. Mork, S.J., Loken, A.C.: Ependymoma: a follow-up study of 101 cases. *Cancer* 40: 907-915, 1977
58. Moshier J.A., Gilbert J.D., Skunca M., Dosescu J., Almodovar K.M., Luk G.D.: Isolation and expression of a human ornithine decarboxylase gene. *J Biol Chem* 265, 9: 4884-4892
59. Moulinoux J.-P., Quemener V., Le Calve M., Chatel M., Darcel F.: Polyamines in human brain tumors. A correlative study between tumor, cerebrospinal fluid and red blood cell free polyamine levels. *J Neuro-Oncol* 2: 153-158, 1984
60. Moulinoux, J.P., Delamaire, D., Beau, B., Quemener, V., Brissot, P., Le Calve, M., Deugnier, Chambon, Y., Bourel, M.: Diagnostit value of erythrocyte-free polyamines and histaminemia in malignant hepatic tumors and in liver cirrhosis. *Clin. Chim. Acta* 145: 77-87, 1985

61. Moulinoux J.-P., Quemener V., Havouis R., Guille F., Martin C., Seiler N.: Accumulation of polyamine analogs in red blood cells: A potential index of tumor proliferation rate. *Anticancer Res* 11: 2143-2146, 1991
62. Murakami Y., Tanaka K., Matsufuji S., Miyazaki Y., Hayashi S.: Antizyme, a protein induced by polyamines, accelerates the degradation of ornithine decarboxylase in Chinese-hamster ovary-cell extracts. *Biochem J.* 283: 661-664, 1992
63. Murakami Y., Ichiba T., Matsufuji S., Hayashi S.: Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 271: 3340-3342, 1996
64. Nakagawa H., Kubo S., Murasawa A., Nakajima S., Nakajima Y., Izumoto S., Hayakawa T.: Measurements of CSF biochemical tumor markers in patients with meningeal carcinomatosis and brain tumors. *J Neuro-Oncol* 12: 111-120, 1992
65. Niedermayer I., Feiden W., Henn W.: Loss of alkaline phosphatase activity in meningiomas: A rapid histochemical technique indicating progression-associated deletions on the distal part of the short arm of chromosome 1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 879-886, 1997
66. Pásztor, E., Vajda, J.: *Idegsebészet. Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest.* 106-123, 1995
67. Pegg A.E., Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res* 48: 759-774, 1988
68. Pegg A.E., McCann P.P.: Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243: C212-C221, 1982
69. Pegg A.E.: Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234: 249-262, 1986

70. Pegg A.E., Shantz L.M., Coleman C.S.: Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation. *Biochem Soc Trans* 22:846-852, 1994
71. Penella A., Ferri C., Lettini T., Serio G., Cimmino A., Caniglia D.M., Giangaspero F., Ricco r.: Atypical meningioma: Morphometric analysis of nuclear pleomorphism. *Pathologica* 92: 25-31, 2000
72. Perry A., Stafford S.L., Scheithauer B.W., Suman V.J., Lohse C.M.: Meningioma grading: An analysis of histological parameters. *Am J Surg Pathol* 21: 1455-1465, 1997
73. Phillips P.C., Kremzner L.T., De Vivo D.C.: Cerebrospinal fluid polyamines: Biochemical markers of malignant childhood brain tumors. *Ann Neurol* 19: 360-364, 1986
74. Pohjanpelto, P., Nordling, S., Knuutila, S.: Flow cytometric analysis of the cell cycle in polyamine-depleted cells. *Cytometry* 16, 4: 331-338, 1994
75. Roelcke U.: PET: Brain tumor biochemistry. *J Neuro-Oncol* 22: 275-279, 1994 –B36
76. Rubinstein L.J.: Tumors of the central nervous system. In: *Atlas of Tumor Pathology*. 2<sup>nd</sup> ser., fasc. 6. Armed Forces Institute of Pathology Washington, D.C, 1972
77. Russel D.S., Rubinstein L.J.: *Pathology of tumours of the nervous system*. London: Edward Arnold, 452-506, 1989
78. Russell D.H., Haddox M.K.: Cyclic AMP-mediated induction of ornithine decarboxylase in normal and neoplastic growth. *Adv Enzyme Regul* 17: 61-79, 1978
79. Russell D.H.: Clinical relevance of polyamines. *Crit Rev Clin Lab Sci* 18: 261-311, 1983
80. Sallinen P.K., Sallinen S.L., Helen P.T., Rantala I.S., Rautiainen E., Helin H.J., Kalimo H., Haapasalo H.K.: Grading of diffusely infiltrating astrocytomas by quantitative histopathology, cell proliferation and image cytometric DNA analysis.

- Comparison of 133 tumours in the context of the WHO 1979 and WHO 1993 grading schemes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26(4): 319-31, 2000
81. Scalabrino G., Ferioli M.E.: Degree of enhancement of polyamine biosynthetic decarboxylase activities in human tumors: A useful index of degree of malignancy. *Cancer Detect Prev* 8: 11-46, 1985
  82. Schröder R., Bien K., Kott R., Meyers I., Vössing R.: The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time. *Acta Neuropathol* 82: 389-394, 1991
  83. Schwartz, B., Hittelman, A., Daneshvar, L., Basu, H.S., Marton, L.J., Feuerstein, B.G.: A new model for disruption of the ornithine decarboxylase gene, SPE1, in *Saccharomyces cerevisiae* exhibits growth arrest and genetic instability at the MAT locus. *Biochem. J.* 312, 1: 83-90, 1995
  84. Seiler N.: Polyamine metabolism and function in brain. *Neurochem Int* 3: 95-110, 1981
  85. Shantz L.M., Pegg A.E.: Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation. *Cancer Res* 54: 2313-2316, 1994
  86. Shantz L.M., Pegg A.E., Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 107-122, 1999
  87. Strojjan P., Popovic M., Jereb B.: Secondary intracranial meningiomas after high-dose cranial irradiation: report of five cases and review of the literature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48(1): 65-73, 2000
  88. Tabor C.W., Tabor H.: 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann Rev Biochem* 45: 285-306, 1976

89. Takue Y., Nishioka K., van Eys J.: Evaluation of polyamine levels in cerebrospinal fluid of children with brain tumors. *J Neuro-Oncol* 3: 327-333, 1986
90. Vendrell M., Zawia N.H., Serratos J., Bondy S.C.: C-fos and ornithine decarboxylase gene expression in brain as early markers of neurotoxicity. *Brain Res* 544: 291-296, 1991
91. Volkow N., Goldman S.S., Flamm E.S., Cravioto H., Wolf A.P., Brodie J.D.: Labeled putrescine as a probe in brain tumors. *Science* 221: 673-675, 1983
92. Wagner, A.J., Meyers, C., Laimins, L.A., Hay, N.: C-myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase. *Cell Growth Differ.* 4, 11: 879-883, 1993
93. Warnick R.E., Pietronigro D.D., McBride D.Q., Flamm E.S.: In vivo metabolism of radiolabeled putrescine in gliomas: implications for positron emission tomography of brain tumors. *Neurosurgery* 23: 464-469, 1988
94. Weber R.G., Boström J., Wolter M., Baudis M., Collins V.P., Reifenberger G., Lichter P.: Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: Toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14719-14724, 1997
95. Wetters T.v.D., Macrae M., Brabant M., Sittler A., Coffino P.: Polyamine-mediated regulation of mouse ornithine decarboxylase is posttranslational. *Mol Cell Biol* 5484-5490, 1989
96. Williams-Ashman H.G., Canellakis Z.N.: Transglutaminase mediated covalent attachment of polyamines to proteins: mechanisms and potential physiological significance. *Physiol Chem Phys* 12: 457-472, 1980
97. Wilson C.B.: Meningiomas: Genetics, malignancy, and role of radiation in induction and treatment. *J Neurosurg* 81: 666-675, 1994

98. Wrighton, C., Busslinger M.: Direct transcriptional stimulation of the ornithine decarboxylase gene by fos in PC12 cells but not in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 4657-4669, 1993
99. Yamazaki, H., Tsukahara, T., Uki, J., Matsuzaki, S.: Elevated levels of free putrescine and N1-acetylspermidine in cyst fluids of malignant brain tumors. *J. Neurol. Neurosur. Psych.* 49: 209-210, 1986
100. Zawia N.H., Bondy S.C.: Electrically stimulated rapid gene expression in the brain: ornithine decarboxylase and c-fos. *Mol Brain Res* 7:243-247, 1990

## 10. KÖZLEMÉNYEK

1. Ernestus RI, Röhn G, Schröder R, Els T, Klekner A, Paschen W, Klug N: Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 88-92, 2001  
IF: 2,735
2. Klekner A, Röhn G, Schillinger G, Schröder R, Klug N, Ernestus RI: ODC mRNA as a prognostic factor for recurrence in meningiomas. *J Neuro-oncol. Közlésre elfogadva*, 2001  
IF: 1,655
3. Csécsei Gy, Klekner A, Sikula J: Posterior lumbar interbody fusion (PLIF) using the bony elements of the dorsal spinal segment. *Acta Chir Hun*, 36 (1-4): 54-56, 1997
4. Csécsei Gy, Klekner A, Dobai J, Lajgut A, Sikula J: Posterior interbody fusion using laminectomy bone and transpedicular screw fixation in the treatment of lumbar spondylolisthesis. *Surg Neurol*, 53 (2-7): 2000  
IF: 1,04
5. Csécsei Gy.I., Székely Gy.Jr., Szabó S., Mikó L., Berényi E., Gyarmati J., Klekner Á.P.: Radical removal of meningiomas invading superior sagittal sinus. In: *Book of proceedings* (p: 491-494). Openbook Publishers, Adelaide, South Australia

Közlemények impact factor: 5,43