

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Tüdőrák agyi metasztázisa és intrakraniális agydaganatok peritumorális invazivitásának összehasonlítása az extracelluláris mátrix komponensek expressziójának vizsgálatával

Dr. Varga Imre

Témavezető: Dr. Klekner Álmos, PhD



DEBRECENI EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tüdőrák agyi metasztázisa és intrakraniális agydaganatok peritumorális invazivitásának összehasonlítása az extracelluláris mátrix komponensek expressziójának vizsgálatával

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Varga Imre

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Klekner Álmos, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Mikós, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora
Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet könyvtára, 2014. május
29. 11 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Csánky Eszter, PhD
Dr. Hortobágyi Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Mikós, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora
Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Csánky Eszter, PhD
Dr. Hortobágyi Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet könyvtára, 2014. május
29. 13 óra

1. Bevezetés

„Korunk pestise”, ezzel a kifejezéssel számos betegséget illettek már, de talán legjobban a rosszindulatú daganatokra illik. Közöttük is kiemelkedő helyet foglal el a tüdőrák, gyakori (és egyre gyakoribb) előfordulása, nehéz szűrhetősége, más daganatokétól elmaradó terápiás esélyei és kiemelkedő mortalitása miatt.

A terápiás kudarcok fő oka általában az elkésett felismerés, a gyógyulás reményével egyedül kecsegtető sebészi megoldás gyakori kivitelezhetetlensége. Az inoperabilitás háttérben nemritkán távoli áttét áll. A különbség a két fő sejtípus, a kissejtes és a nem-kissejtes rák agyi áttétképzésében, hogy a metasztázisok a kissejtes hörgőrák esetében gyorsabban létrejönnek és gyakrabban multiplex jellegűek. A rendelkezésre álló adatok szerint a nem-kissejtes tüdőrákon belül leggyakrabban az adenokarcinoma agyi áttéjével találkozhatunk.

A másik oldalról nézve megállapíthatjuk, hogy a metasztázis a leggyakoribb rosszindulatú agydaganat, ez felel az összes tumoros haláleset 20%-áért. Az agyban talált metasztatikus daganatok leggyakoribb forrása a primer tüdőrák..

Az agyi áttét a betegség kórlefolyását, kezelhetőségét és prognózisát is alapjaiban érinti, ezért nagyon fontos ezen áttétek időben történő kimutatása. Sajnos, nem egyszer látjuk, hogy a tünetmentes primer hörgőrák mellett az áttét okozta központi idegrendszeri tünetek jelentkeznek legelőször.

Ezek a tünetek kezdetben nagyon hasonlóak lehetnek a primer agytumороk okozta tünetekhez.

Közismert idegsebészeti tapasztalat és dilemma, hogy míg a gliómák radikális sebészi megoldása az infiltratív növekedés miatt az esetek döntő többségében kivitelezhetetlen, addig a tüdőrák áttétjeinek teljes eltávolítása általában rutin idegsebészeti beavatkozásnak számít. Természetesen ez a megállapítás csak a szoliter és könnyen hozzáférhető tumorgócokra igaz, a multiplex megjelenésű áttétek sebészileg ez esetben sem kezelhetők.

Az elsődleges agytumороk és a metasztázisok nagy valószínűséggel történő elkülönítésére egy egyszerű képalkotó, a koponya CT vagy MRI vizsgálat is alkalmas lehet. Az elkülönítés alapja az, hogy amíg a primer agydaganat maga körül az agy állományát mélyen infiltrálja, attól kevésbé élesen választható el, szabálytalan alakú és kiterjedésű ödémás gyűrű övezi, addig az áttét az agyállománytól általában élesen elválasztható, közel szabályos gömb alakú és körülötte gyakran típusos perifokális ödémás gyűrű is látható.

A tüdőrák agyi áttétjeinek ismerete tünetmentes góccok esetén is döntő kérdés, hiszen a primer folyamat műtéti megoldása és az egész prognózis is alapvetően ettől függ. Önmagában operálható primer folyamat és szoliter agyi áttét megfelelő kezeléssel még gyógyítható lehet, s ez nem utolsósorban annak a ténynek köszönhető, hogy az agyi áttétek növekedése nem, vagy csak minimális invazivitást mutat. Az igen széles körű nemzetközi kutatásokról beszámoló irodalmi adatok a peritumorális inváziót egyértelműen az extracelluláris mátrix (ECM) komponenseivel hozzák szoros kapcsolatba. A glioma és a tüdőrák áttét között tapasztalható jelentősen különböző reszekabilitást eredményező intracerebrális invázió oka tehát döntően a két tumortípus extracelluláris mátrixának eltérő szerkezetében, az ott található makromolekulák tulajdonságaiban keresendő.

A többsejtű élőlényeknek olyan sejtközötti állományra van szükségük, amely biztosítja a sejtek kapcsolódását, kommunikációját, együttműködését, vándorlását, védelmét és a szükségnek megfelelő fejlődését is. Ezt az állományt extracelluláris mátrixnak nevezzük. Az ECM alkotói a sejten belül keletkeznek, és exocitózis útján jutnak a környezetbe, illetve egy részük a membránba épül be. Ha tehát ECM-alkotó molekulák után kutatunk, azokat megtalálhatjuk sejten belül és kívül, vagy akár a sejt membránjában is.

Jelen munkánkban gliomák és tüdő adenokarcinoma agyi áttétek ECM (extracelluláris mátrix) komponenseinek RNS- és proteinszintű analízisével a két különböző daganattípus eltérő inváziós hajlamának molekuláris hátterét vizsgáltuk.

2. Kérdésvetések/célkitűzések

- a. Az irodalmi előzmények alapján az igen nagyszámú, peritumorális invázióban definitív szereppel bíró ECM komponensek összeválogatása, egy ún. „inváziós panel” létrehozása.
- b. Az inváziós panel RNS- és egyes molekulák proteinszintű vizsgálatával a glioblasztóma és a tüdőrák agyi áttétei közötti különbségek meghatározásával az igen eltérő inváziós aktivitásért leginkább felelős molekulák meghatározása.
- c. Az anaplasztikus tumorokat képviselő glioblasztóma elemzését követően a benignus tulajdonságokkal bíró, de mégis infiltratív primer agydaganat, az asztrocitóma WHO grade II esetében az invázióban leginkább szerepet játszó molekulák azonosítása.
- d. Egyszerű mikroszkópos rutineljárás kidolgozása az ECM alkotók azonosítására, a későbbi klinikai felhasználás segítése céljából.

3. Szövetminták és módszerek

a. Szövetminták

Szövetmintáink a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikán működő Idegsebészeti Szövet- és Agydaganatbankból származtak: műtét során eltávolított és folyékony nitrogén felszínén azonnal lefagyasztott majd -80°C -on tárolt mintákon végeztünk méréseket. A Debreceni Idegsebészeti Szövet- és Agydaganatbank a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) engedélyével rendelkezik, és a kutatási célú mintagyűjtés a betegek írásos beleegyezésével történt. A vizsgálatokhoz csak a terápia célú beavatkozások során eltávolított szövetmintákat használtuk, így a beteg számára semmilyen, a rutin kezeléstől eltérő kockázat nem keletkezett.

A fenti célkitűzések megvalósításához négy fázisban végeztük el méréseinket.

Az első fázisban az irodalom áttekintése alapján összeállítottuk azoknak a molekuláknak a listáját, melyek a peritumorális invázióban szerepet játszhatnak. Ezeknek a géneknek az mRNA expresszióját meghatároztuk 5 glioblasztóma, 5 peritumorális normál agyszövet és 5 tüdő adenokarcinoma intracerebrális áttétekből származó szövetmintában. Ezután az mRNA expressziós értékeket a különböző szövettani csoportok között összehasonlítva meghatároztuk azoknak a molekuláknak a körét, melyek szignifikáns eltérést mutatva a nagyobb esetszámú vizsgálatokhoz további mérések céljára érdemesnek találtunk. Az előzetes mérések alapján az egyes tumorcsoportok nagyobb számú analíziséhez összeállított molekulák listáját **inváziós panel**nek neveztük el.

A második fázisban az előzetes mérések alapján megállapított inváziós panelt vizsgáltuk 8 szövetmintán: 4 glioblasztóma és 4 tüdő adenokarcinoma agyi áttéti daganatában 23 invázióban szerepet játszó ECM molekula mRNA expressziós szintjét határoztuk meg és közülük 5 molekula esetében IHC vizsgálatot is végeztünk.

A harmadik fázisban elvégzett mérésekhez 30 szövetmintát elemeztünk: 11 glioblasztómát, 10 tüdő eredetű adenokarcinoma szoliter agyi áttétét és 9 peritumorális agyszövetmintát válogattunk össze, melyeknél 30 inváziós molekula mRNA expresszióját mértük meg és 7 molekula immunhisztokémiai (IHC) analízisét végeztük el.

A negyedik méréshez összesen 36 szövetmintát vizsgáltunk: 9 asztrocitóma grade II, 10 tüdő adenokarcinoma agyi metasztázis, 8 schwannoma és 9 tumormentes peritumorális agyszövetmintát dolgoztunk fel. Ebben a fázisban az inváziós panel 26 molekulából állt és 4 molekulán végeztünk IHC vizsgálatot.

Az RNS analízisre szánt mintákból előbb metszeteket készítettünk szövettani diagnózishoz és immunhisztokémiai vizsgálatokra, majd a maradék szövetdarabot RNS izolálásra továbbítottuk. A szövettani diagnózist a klinikumtól független sorsú kódolt mintákon gyakorlott neuropatológus állapította meg.

b. mRNS analízis

A kiválasztott molekulacsoport mRNS expresszióját egyedi rendelés alapján előállított ún. „DNS-kártya” segítségével végeztük el („Micro Fluidic Card” - Applied Biosystems, USA). Az inváziós panelt alkotó sejtfelszíni receptorokat és ligandjaikat vizsgáltuk. A mérésekhez QRT-PCR (quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction) technikát alkalmaztunk.

A kiválasztott molekulacsoport mRNS expresszióját egyedi rendelés alapján előállított ún. „DNS-kártya” segítségével végeztük el („Micro Fluidic Card” - Applied Biosystems, USA).. A tumor eredetét igazoló markereket (*glial fibrillary acidic protein* [GFAP] és citokeratin 18,19), a Ki-67 proliferációs markert és belső standardként a beta-aktin és glicerin aldehid 3-foszfát dehidrogenáz [GAPDH] expresszióját szintén vizsgáltuk.

TaqMan Low Density Array (TLDA) kísérleteket végeztünk Applied Biosystems 7900HT real-time PCR rendszer segítségével Micro Fluidic Card upgrade-ben (Applied Biosystems, USA). A Micro Fluidic Card format a mintánkénti 40 gén analízisét teszi lehetővé. Minden mintáról másolat is készült, amit szintén analizáltunk. A Micro Fluidic Card-dal nyert eredményeket SDS 2.1 software segítségével elemeztük ki. Ezen software-rel automatikus küszöbérték mellett és a már meghatározott C_T értéket használva határoztuk meg a mintákban jelenlévő cDNS mennyiségét. Minden esetben meghatároztuk a housekeeping GAPDH gén expressziós mértékét is. GAPDH mutatott a legkisebb variációt az egyes minták között és referencia génként szolgált a dC_t értékek kiszámításánál.

Expressziós értékeket a comparative C_T method segítségével határoztuk meg, ahogy azt az irodalomban már leírták korábban (Livak és Schmittgen, 2001). Röviden, feltételezve, hogy a PCR hatékonysága bármely gén esetében TLD-Assay felhasználva az 1-hez közelít,

egy tumoros vagy normál (kalibrátor) mintában a gén mRNS expresszióját össze lehet hasonlítani a következő egyenlet segítségével:

$$X_{\text{tumor}} = 2^{-dCT_{\text{tumor}}} \text{ és } X_{\text{normal}} = 2^{-dCT_{\text{normal}}}$$

2^{-dCT} értékét GeneSpring 7.3 software (Silicon Genetics, Redwood City CA, USA) segítségével határoztuk meg; így megkaptuk az egyedi, individuális mRNS expressziós (X) különbségeket a mintákon belüli kategóriákban.

c. Statisztikai analízis

A mérések pontosítása és a statisztikai analízis érdekében minden mérést kétszer végeztünk el. Mintáink statisztikai elemzése során az egyes gének expressziós szintjei közötti különbség meghatározásához a **Mann-Whitney féle U-próbát** alkalmaztuk. A $p \leq 0.05$ esetén az eredményt szignifikánsnak tekintettük.

d. Immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok

Az első fázisban IHC vizsgálatokat nem végeztünk.

A második fázisban (minek alapján) 5 molekula IHC festődési intenzitását vizsgáltuk: neurokán, szindekán, vezikán, MMP-2 és MMP-9.

A harmadik fázisban történt méréseknél a mRNS meghatározás eredményeinek értékelése után hét molekulát választottunk ki és vizsgáltunk fehérjeszinten immunhisztokémiailag: az agrint, a neurokánt, a szindekánt, a vezikánt, a MMP-2-t és 9-et, valamint a hialuronant.

A negyedik fázisban a mRNS eredmények értékelése után a brevikán, neurokán, tenaszcin-C és a vezikán került kiválasztásra proteinszintű immunhisztokémiai vizsgálatra.

Az immunhisztokémiai reakciók intenzitásának kiértékelését három különböző, szövettani vizsgálatokban jártas szakember egymástól függetlenül végezte el. Minden metszeten három különböző területen 0-4-ig osztályoztuk a festődési intenzitást, majd eredményeinket átlagolva jutottunk a végleges értékekhez. Fagyasztott mintákat fixáltunk *Saint Marie's fixative* (Sainte-Marie, 1962; Tuckett és Morriss-Kay, 1988) oldatban 24 órán keresztül 4°C-on. A fixáció és dehidráció után a mintákat viaszba ágyasztuk és 5- μ m vastag szeleteket készítettünk. A mintákat haematoxylin-eosin festékkel festettük meg, de emellett immunhisztokémiai eljárást is alkalmaztunk.

Az immunhisztokémiai metszeteket három különböző, tapasztalt kutató elemezte ki és értékelte a 2. fázisban 1-től 4-ig, a 3. fázisban a különbségek észlelésének finomítása érdekében 1-től 5-ig terjedő skálán.

4. Eredmények

a. mRNS expressziós eredmények

1. fázis

Az első fázisban az irodalmi áttekintés alapján összeválogatott, tumoros invázióban szerepet játszó 96 molekula mRNS expressziós szintjét határoztuk meg glioblasztóma, tüdő adenokarcinoma agyi áttéti és peritumorális agyszövet mintákon. A mérések alapján határoztuk meg azoknak a molekuláknak a körét, melyek a tapasztalt eltérések alapján nagyobb számú szövetmintán való további vizsgálatra is érdemesnek találtunk. Az így kialakult célmolekulák csoportját inváziós panelnek neveztük el.

2. fázis

A tumormarkerek a megfelelő daganattípusra jellegzetesen minden minta esetében jelentős eltérést illetve specifikus mRNS-emelkedettséget mutattak, ami a minták eltérő szövettani típusát egyértelműen megerősítették. A Ki67 minden esetben egymáshoz hasonló magas értéket eredményezett, bizonyítva ezzel a minták magas proliferációs aktivitását és a szövetminta megfelelően sejtdús – és nem nekrotikus jellegét.

A két különböző eredetű daganatban mért mRNS expressziós értékek összehasonlítása során a glioblasztóma mintákban az adenokarcinoma áttétéhez képest szignifikánsan magasabb szintet mértünk a brevikán, a neurokán, a neuroglükán-C, a szindekán-2, a tenaszcin-C, a verzikán, és az MMP-2 esetében.

A szindekán-1 és 4 mRNS expressziós szintje az áttéti daganatban bizonyult statisztikailag igazolhatóan magasabbnak.

A többi vizsgált molekula mRNS szintjeinek esetében nem volt szignifikáns különbség a glioblasztóma és az áttéti daganat között.

3. fázis

A harmadik fázisban harminc szövetmintát vizsgáltunk három különböző homogén szövetcsoportban: tizenegy GBM mintát, melyek a tumor által infiltrált marginális zónából származtak, további tíz mintát intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisból, kilencet pedig normál agyszövetből. A tumormarkerek és a Ki67 proliferációs marker mRNS expressziója megerősítette a szövettani diagnosist

3.a. GBM versus normál agyszövet

Az agrin, fibronectin, laminin α 4, β -1 és β -2, perlekán, szindekán-1, tenaszcin-C, CD44, CD168, HAS-2, MMP-2 és -9 mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett volt GBM-ban összehasonlítva a normál agyszövettel, miközben a szindekán-4, tenaszcin-R és HAS-1 mRNS expressziója statisztikailag alacsonyabb volt GBM-ban. A többi vizsgált molekula mRNS szintjei nem különböztek lényegesen a normál agyszövetben és GBM-ban.

3.b. Intracerebrális tüdőeredetű adenokarcinoma metasztázisok és normál agyszövet

Jelentősen csökkent mRNS expressziót mértünk brevikán, laminin α -1, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C, szindekán-2, tenaszcin-R, és HAS-1 esetében a tüdő adenokarcinoma metasztázisban a normál agyszövettel összevetve. Ezzel szemben az agrin, fibronectin, laminin β -1, β -2 és γ -1, perlekán, szindekán-1 és -4, CD168 and MMP-9 mRNS szintje statisztikailag magasabb volt a metasztatikus tumorban, a normál agyszövethez viszonyítva. Nem volt látható különbség az aggregkán, laminin α -2, -4, matrilin-1, tenaszcin-C, verzikán, CD44, kondroitinázok, HAS-2, -3, MMP-2 és -8 mRNS szintjét tekintve a két szövettípus között.

3.c. GBM és tüdő adenokarcinoma metasztázis

A különböző eredetű anaplasztikus tumorokat összehasonlítva, az mRNS expresszió brevikán, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C, tenaszcin-C és R, CD44, HAS-2 és MMP-2 esetében jelentősen magasabb volt GBM-ben mint tüdő adenokarcinoma metasztázisban. A szindekán-1 és szindekán-4 transzkriptumai lényegesen emelkedtek az adenokarcinoma agyi áttétje esetében. Nem észleltünk statisztikailag jelentős különbségeket a többi vizsgált molekula esetében.

4. fázis

A negyedik lépésben elvégzett mérések során 3 különböző eredetű és dignitású tumor eredményeit hasonlítottuk össze egymással és a peritumorális agyszövet eredményeivel.

Összehasonlítva a génextpressziót NSCLC agyi áttétjében és a grade II asztrocitómában a kadherin-3, kollagen type I, III és IV, fibronektin, perlekán, szindekán-1 and -4 és a MMP-9 expressziója volt jelentősen magasabb a metasztázisban. Ezzel szemben, a brevikán, kadherin-2, laminin alpha-4 and beta-2, matrillin-2, neurokán, szindekán-3, tenaszcin-C and -R, verzikán, HAS-2, and MMP-2 szintjeit az asztrocitómában találtuk magasabbnak.

Az NSCLC agyi áttétjeiben magasabb mRNS szinteket találtunk kadherin-3, neurokán, szindekán-1 és MMP-9 tekintetében, összevetve a schwannomával, míg a schwannomában magasabb volt a kadherin-2, kollagen IV és VIII, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2, matrillin-2, neuroglükán-C, perlekán, szindekán-3, HAS-2 és MMP-2 szintje.

Összehasonlítva a schwannoma és az asztrocitóma mintákat, a kollagen alpha -1, kollagen III, IV és VIII, fibronektin, perlekán, matrillin-2, szindekán-4, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2 magasabbnak találtatott schwannomában, míg a brevikán, neuroglükán-C, tenaszcin-C és -R, neurokán és verzikán inkább az asztrocitómában expresszálódott.

Az asztrocitóma minták és a normál agyszövetből valók összehasonlítása feltárta, hogy az agrin, brevikán, kadherin-2, kollagen I, III és IV, fibronektin-1, laminin alpha-4 és beta-2, matrillin-2, neurokán, perlekán, szindekán-3, tenaszcin-C, verzikán, HAS-2, és MMP-2 és -9 mRNS szintjei jelentősen magasabbak voltak az asztrocitóma mintákban. Ezzel ellentétben a szindekán-4 és a HAS-1 mRNA szintjei a normál agyszövetben bizonyultak magasabbnak.

A schwannoma mintákban az agrin, a kollagen I, III IV és VIII típusok, a fibronektin, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2, matrillin-2, perlekán, szindekán-3 és -4, HAS-2 és MMP-2 mRNS értékeit mérték magasabbnak a normál agyszövethez viszonyítva, míg a normál agyból vett mintákban a brevikán, neurokán, neuroglükán-C és tenaszcin-R mRNS-ének magasabb értékeit mérték.

Az agrin, kadherin-3, a kollagen I, III, IV és VIII típusok, a fibronektin, a laminin beta-1 és beta-2, perlekán, szindekán-1 és -4, valamint a MMP-9 mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztázisokban, mint a normál agyszövetben. Ezzel ellentétben a brevikán, kadherin-2, neurokán, neuroglükán-C, matrillin-2, szindekán-3, tenaszcin-R és a HAS-1 sokkal alacsonyabb volt a metasztázisokban, mint a normál agyszövetben.

b. Immunhisztokémiai eredmények

1. fázis

Az első fázisban nem végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat.

2. fázis

Öt molekula esetében (neurokán, verzikán, szindekán mátrix-metalloproteináz-2 és 9) vizsgáltuk az immunhisztokémiai reakció intenzitását. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a neurokán, a verzikán és a MMP-2 esetében a glioblasztómában az áttéti daganathoz képest egyértelműen magasabb értékeket állapítottunk meg. A szindekán és az MMP-9 az adenokarcinómában mutatott intenzívebb festődési reakciót (4. ábra).

3. fázis

A harmadik fázisban glioblasztóma, adenokarcinoma áttét és peritumorális agyszövetmintákon végeztünk immunhisztokémiai festést és összehasonlító elemzést 7 molekulára vonatkozóan: agrin, hialuronan, neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 és 9. Az immunhisztokémiai és HA hisztokémiai reakciókat a 5. ábrán foglaltuk össze. A morfológiai értékelésnek megfelelően az immunreaktivitás a legkifejezettebb az agrin, neurokán, szindekán, és verzikán esetében a sejtmembránon és az extracelluláris térben volt, míg a MMP-k erős immunreaktivitást mutattak a sejtmembránon és intracellulárisan. A legerősebb immunfestődés az agrin, szindekán és MMP-9 esetében a tüdő adenokarcinoma metasztázisban volt megfigyelhető, míg a MMP-2, neurokán és hialuronan a legmagasabb értékeket GBM mintákban mutatta. A tumor markerek és a Ki-67 festődési intenzitása megfelelt a szövettannak.

4. fázis

A vizsgálatunk utolsó fázisában 4 különböző szövettani csoportban (asztrocitóma grade II, adenokarcinoma agyi áttéte, schwannoma és peritumorális agyszövet) végeztünk IHC festést 4 molekula esetében: brevikán, neurokán, tenaszcin-C és verzikán.

A brevikán, neurokán, tenaszcin-C és a verzikán immunreaktivitása a legintenzívebb volt a sejtmembránon és az extracelluláris térben. A legintenzívebb festődést minden molekula esetében az asztrocitóma szövetekben észlelték. A normál agyszövetben kevésbé kifejezett immunfestődést találtak neurokán, tenaszcin-C és verzikán esetében, a schwannoma minták pedig gyengébb immunfestődést mutattak brevikán és neurokán tekintetében. A

metasztatikus szövetek mutatták a a leghalványabb immunfestődést verzikánra. A tenascin-C festődés nagyon gyenge volt mind a schwannomában, mind NSCLC-ben. A tumormarkerek és a Ki-67 festődési intenzitása összhangban állt a hisztológiai diagózissal.

5. Megbeszélés

a. Az ECM szerepe agydaganatokban, különös tekintettel a tüdőrák áttéteire

Nincs biztos végleges következtetés abban a tekintetben, hogy mely ECM összetevők pontosan milyen módon felelősek a tumorok invazivitásáért. Az általunk vizsgált két malignus tumortípus ebből a szempontból két végpontot képvisel: az asztrocitóma metasztázist nem ad, de rendkívüli invazivitásával hívja fel magára a figyelmet, a pulmonális adenokarcinoma pedig könnyen, gyorsan metasztatizál – nemcsak az agyba, de oda különösen gyakran. Mindezen jelenségek okait jelentős részben az ECM szerkezete és működése rejtheti. A tumor-eltávolítás kiterjedése határozza meg az onkoterápia hatékonyságát. Ez különösen igaz a primer agytumorokra, ahol a peritumorális invázió rendszerint lehetetlenné teszi a radikális reszekciót. A peritumorális infiltrációt nemcsak a malignus gliomákban, hanem az alacsony grádusú tumorokban, így a II. grádusú asztrocitómákban is megfigyelték (43, 44). Ezzel szemben a NSCLC agyi metasztázisai csak mérsékelten invazívak, így a radikális kiirtásuk általában rutin idegsebészeti beavatkozás.

A különböző tumorok minden egyes ECM alkotója megtalálható az irodalomban, de a molekulák széles spektrumának egyidejű elemzése egyetlen jellemző jelenség alapján, mint az agytumorok invazivitása, eddig még nem látott napvilágot. A tanulmány célja elsősorban a különböző eredetű agytumorok invázióval összefüggésbe hozható molekulái expressziós mintázatának meghatározása és összehasonlítása volt. Másodsorban pedig azonosítani kívántuk azokat a molekulákat, amelyek elsődlegesen felelősek a grade II asztrocitóma peritumorális invazivitásáért. Mivel a tumorinvázió nagyban függ a meglehetősen nagyszámú ECM komponens és a tumorsejtek közötti interakcióktól, megvizsgáltuk egy kiválasztott 96 tagú ECM-alkotó csoport molekuláit, melyekről korábban már igazolódott, hogy aktívan részt vesznek a peritumorális infiltrációban. Az előzetes mérések során ezekből a molekulákból célzott vizsgálatokkal az intrakraniális daganatokra jellemző molekulák körét, az un. **inváziós panelt** határoztuk meg (1. fázis), és további mRNS expressziós méréseinkhez a különböző daganatok összehasonlításakor már ennek a panelnek a tagjait vizsgáltuk.

b. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában és glioblasztómában

A tüdőkarcinoma agyi áttétei és a glioblasztóma összehasonlításakor (2-3. fázis) összesen 30 ECM-komponens génextpresszióját határoztuk meg, hogy az eltérő invazivitás molekuláris hátteréhez közelebb kerüljünk. 21 ECM komponens, hét proteáz, a hialuronsav membrán-receptor (CD44) és a CD168 esetében végeztünk kvantitatív RT-PCR-t. Az mRNS analízis eredményei alapján a fentiek közül hét molekula (agrin, neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 MMP-9 és a hialuronsav) immunhisztokémiai festődését is vizsgáltuk.

A mi méréseink az irodalomban közölt eredményeket részben megerősítették, részben kiegészítették, amennyiben jelentős különbséget észleltünk a normál agy és a GBM között a fibronektin, laminin β -1, perlekán, szindekán-1, -4, tenaszcin-C, -R, CD44, CD168, HAS-1, -2, és MMP-2 és -9 mRNS profilja tekintetében.

Nincs kielégítő adat az irodalomban asztrocitómák esetében az aggregánról, matrilinről, perlekánról, neuroglükán-C-ről, neurokánról, CD168-ről vagy a kondroitinázról. Megfigyelésünk szerint azonban a CD-168 és a perlekán mRNS expressziója szignifikánsan magasabb a glioblasztómában a normál agyszövethez képest, míg a többi tekintetében nem volt nyilvánvaló különbség a kettő között.

Saját méréseink során összehasonlítva az intracerebralis tüdő adenokarcinoma metasztázisokat a normál agyszövettel, a vizsgált 30 molekula közül 18 esetében jelentős különbségeket észleltünk. Néhány molekula az eredeti szövetre jellemző (pl. a brevikán, neurokán, a neuroglükán C az agyszövetmintákban), míg mások valószínűleg a peritumorális invázióban játszanak fontos szerepet (fibronektin, szindekán-1, 4, CD-168 és MMP-9). Az agrin, laminin β -1, β -2, γ -1 és a perlekán intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisban megnövekedett expressziójának magyarázatához még további kutatásokra van szükség.

Eredményeink szerint 11 molekula mRNS expressziója szignifikánsan különbözött a GBM és az adenokarcinoma metasztázisok között. Mivel a brevikán, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C és a tenaszcin-R magasabb mRNS expressziót mutatott mind a normál agyszövetben, mind pedig a GBM-ban a metasztatikus tumorokhoz viszonyítva, ezeket a molekulákat a gliaszövetre specifikus molekuláknak tekinthetjük. Másrészt a tenaszcin-C, CD44, HAS-1 és a MMP-2 mRNS expressziója a metasztázishoz hasonlítva csak a GBM-ban volt emelkedett. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy az előbbi, GBM-ben és normál agyszövetben egyaránt magasabb szintet mutató molekulák a primer agydaganat és a peritumorális agyállomány nagyfokú hasonlóságát eredményezi, így a GBM tumorsejtjei

“otthonosan érezve” magukat a környező agyállományban, azt mélyen infiltrálni képesek. A többi szövetmintához képest a GBM-ben észlelt magasabb expressziót mutató molekulák pedig valószínűleg a tumor inváziójához szükséges és azt előmozdító komponensként szerepelnek.

Végül méréseink szerint a tüdő adenokarcinoma agyi metasztázisában magas volt a szindekán-1 és -4 expressziója, de ez úgy látszik, az “idegen” környezetben elégtelennek bizonyul a peritumorális agyszövetbe történő invázióhoz. Ebből az a következtetés szűrhető le, hogy a szindekán-1 és -4 intracerebrális peritumorális invázióban jelentős szerepet valószínűleg nem játszik.

Az mRNS-expressziós eredmények poszt-transzlációs szintű manifesztálódásának meghatározásához valamint morfológiai információnyerés céljából immunhisztokémiai analízist végeztünk hét molekula esetében (agrin, neurokán, szindekán, verzikán, matrix metalloproteináz 2 [MMP-2], MMP-9, és hialuronsav).

A három szövetminta-csoport immunfestődési intenzitásában meglévő különbségek jól korreláltak a verzikán, agrin, szindekán és a MMP-2 mRNS-expressziójában észlelt eltérésekkel. Az immunhisztokémiai analízis során az agrin, a szindekán és a MMP-9 predominánsnak bizonyult a hörgő eredetű adenokarcinómában, míg a MMP-2, a neurokán és a hialuronsav a legerősebb immunfestődést a GBM-ban mutatta.

Érdekességgéppen, a legerősebb agrin festődési intenzitást és mRNS expressziót a metasztázis csoportban mértük. Az agrin fontos komponense a vér-agy-gátnak (75, 76) de jelentőségét és szerepét a az intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisokban még nem tisztázták.

Az MMP-9 a legerősebb immunfestődési intenzitást a tüdő adenokarcinoma metasztázisaiban mutatta, de a legerősebb mRNS expressziót a GBM csoportban mértük. Bár a legmagasabb neurokán mRNS-expressziót normál agyszövetben találtuk, de az immunhisztokémia a tumorokban mutatott kissé emelkedett festődési intenzitást. Ezek az eltérések valószínűleg poszt-transzkripciós eseményekhez köthetők és pontos tisztázásukhoz további vizsgálatok szükségesek.

A hialuronsav leginkább GBM-ban volt jelen. Mivel receptorának, a CD44-nek ugyancsak magasabb mRNS expresszióját mértük, általános szerepük az invázió folyamatában megerősíthető.

c. Konklúziók

A 30 invázióval összefüggő molekula mRNS expressziójának GBM-ben, normál agyszövetben és intracerebrális adenokarcinoma metasztázisban történő összehasonlításával sikerült néhány olyan molekulát azonosítani, melyek valószínűleg részt vesznek a GBM extrém magas inváziós aktivitásában. Vizsgálataink szerint a tenaszcin-C, CD44, és MMP-2 látszanak a leginkább érintettnek a GBM peritumorális infiltrációjában, de a fibronektin és a szindekánok korábbi közleményekben felvetett pozitív szerepét a különböző infiltrációs aktivitás tekintetében nem tudtuk megerősíteni. Az eddig közölt adatokhoz további új eredményként hozzájárulva a brevikán, neurokán, neuroglükán-C és a matrillin-2 glioblasztómák invazívitásában betöltött lehetséges szerepét tudtuk igazolni.

A 4. fázisban az inváziós panel génexpresszióját infiltratív szemibenignus grade II asztrocitóma, non-infiltratív és benignus schwannoma és a non-infiltratív, de malignus nem kissejtes tüdőkarinoma (NSCLC) agyi metasztázisából származó szövetmintákon vizsgáltuk. A 26 invázióval összefüggő molekula mRNS expressziójának meghatározásával az egyes csoportokra jellemző expressziós mintázatot sikerült alkotni. Cluster analízis útján vizsgáltuk ezeknél a molekuláknál az expressziós mintázatban bekövetkezett változások jellemző voltát (6. ábra). E statisztikai teszt által világosan kimutatható, hogy minden egyes szövetcsoportnak megvan a maga jellegzetes inváziós molekula-mintázata (**inváziós spektruma**), ami arra utal, hogy ennek a 26 molekulának az mRNS expressziós mintázata az illető tumorszövetre erősen jellemző. A brevikán, neurokán, neuroglükán, tenaszcin, verzikán és a MMP-2 a normal agyszövetre és a grade II asztrocitómára voltak jellemzőek, míg a schwannoma és az adenokarcinoma extracelluláris mátrixa döntően kollagéneket, fibronektint, szindekánokat, laminineket és kadherineket tartalmazott. Ezek a jellegzetes inváziós spektrumok jelentős mennyiségű kötőszövetes állományra utalnak a schwannomában és a metasztázisban, míg a gliomás szövetekben a saját jellemző GAG-ok és proteoglikánok jelennek meg. A meglepően nagyfokú hasonlóság a grade II asztrocitóma és a normál agy között magyarázatul szolgál a glioma sejtek környező agyszövetbe történő kiterjedt migrációjára. Ugyanakkor a jelentős különbség az adenokarcinoma és a normál agy inváziós spektruma között segít megérteni a csökkent peritumorális infiltrációt a metasztázis esetében.

Az immunhisztokémiai eredmények megerősítették, hogy a brevikán, a neurokán, a tenaszcin-C és a verzikán nagy mennyiségben van jelen asztrocitómában. Ezek a proteinek normál agyszövetben is előfordulnak, de csekély mennyiségben találhatóak schwannomában és

a metasztatikus szövetekben, ami nem tette lehetővé, hogy e szövetek tekintetében is statisztikai összehasonlítást végezzünk.

Az inoperábilisnak tekintett, áttétet adó szolid tumorok esetében alkalmazott, hagyományos nem-sebészi eljárások – a kemoterápia és a sugárterápia – korlátai ma már világosan láthatók. Ezen eljárások – bár tumor-szelektivitásuk még némileg növelhető – az ép testi sejtekre, szövetekre is hatnak, ami alkalmazható dózisukat limitálja, a kuratív hatás elérését pedig – legalábbis tüdőrák esetében – gyakorlatilag lehetetlenné teszi. Vannak, lesznek is még a jövőben a mainál hatásosabb sejtmérgek, a céltér fogat jobb bemérését lehetővé tevő sugárterápiás eszközök, de nem kétséges, hogy a jobb gyógyeredmények érdekében új utakon kell a daganatterápiában is elindulnunk.

Napjainkban a tüdőrák kezelésében bevetett több új lehetőséggel együtt a tüdőrák úgy látszik „feladja a leckét”: ha potenciálisan nőttek is a túlélési esélyek, ezek számottevő javulást a nemzetközi statisztikák szerint eddig nem hoztak. Ennek egyik oka mindenképpen a tüdőrák rendkívül erős áttétképzési hajlama. A korai áttétképzés miatt romlanak a radikális műtét esélyei, más kuratív célú standard eljárás pedig jelenleg nincs. Ilyen körülmények között felértékelődik minden olyan új eredmény, eljárás és gyógyszer, amely a metasztázisok képződését, fejlődését gátolni képes.

6. Összefoglalás, új eredmények

Jelen munkánkban egy olyan új lehetőségre kívántunk rávilágítani, mellyel az áttétek kialakulása és növekedése a jövőben gátolható lenne. Mivel sok molekuláról ismert, hogy részt vesz az áttétképzésben és a tumorinvázióban, nem könnyű targetet választani az anti-inváziós terápia számára. A mi összehasonlításunk, melyet a különböző ECM molekulák expressziós mintáival végeztünk, segíthet leszűkíteni a lehetséges célmolekulák számát. Az általunk vizsgált ECM molekulák különböző mintázatot mutattak a gliomák és az adenokarcinoma áttétek esetében. Feltehetően az egyes primer tumorokra jellemző, de egymástól különböző molekuláris összetétel lehetőséget teremt a tumorok szelektív „célbavételére”. Az első lépés az ECM invázióért felelős molekulái expressziójának meghatározása a különböző intracerebrális daganatokban. Az igen nagyszámú molekula közül ezáltal kiszűrhető az a néhány potenciális molekula, melyek további vizsgálatával az onkoterápiához konkrétan hasznosítható targetmolekulák identifikálhatók. Vizsgálataink során először 96 ECM komponens mRNS expressziós szintjét mértük meg, majd

eredményeink alapján meghatároztuk a további analízisre érdemes molekulák csoportját, és belőlük ún. inváziós panelt képeztünk. Ezzel a fenti célon túl azt is elértük, hogy az inváziós panelt alkotó molekulák mRNS-szintjeiből daganatspecifikus inváziós spektrumot lehetett képezni, mely a cluster analízis szerint az általunk vizsgált 4 különböző daganattípusra is igen nagymértékű specificitást mutat. Ezzel igazolni tudtuk, hogy a különböző daganatok eltérő invázivitásáért valóban az ECM-komponensek jól meghatározható molekulacsoportja felelős.

További méréseink során a különböző eredetű intracerebrális tumorok inváziós spektrumának elemzésével 4 olyan molekulát szűrtünk ki, mely a gliomák és a tüdőrák agyi metasztázisának eltérő infiltrációs aktivitásáért konkrétan felelősnek mondható. A statisztikai analízis alapján megállapítható, hogy a brevikán, neurokán, tenaszcin-C és verzikán tehát a jövőben az antiinvazív terápiához targetként felhasználható.

Új eredmények

1. Az ECM molekulái közül az irodalom áttekintése után összeválogatott 96 molekula expresszióját meghatároztuk különböző inváziós potenciált mutató intracerebrális daganatokban, és eredményeink alapján **meghatároztunk egy inváziós panelt**. Az inváziós panel tartalmazza azokat az invázivitásban szerepet játszó ECM komponenseket, melyek eltérő expressziója összefüggésbe hozható a tüdőrák agyi áttéte és a gliomák eltérő invázivitásával.
2. Az inváziós panel négy különböző eredetű intrakraniális daganatban és nontumoros agyszövetben történő meghatározásával **az egyes szövettani diagnózisokra jellegzetes inváziós spektrumokat azonosítani tudtuk**. Az inváziós spektrum az egyes daganatokra igen nagyfokú specificitást mutat, igazolva ezzel az invázióért felelős ECM komponensek expressziójának daganatspecifikus jellegét.
3. Vizsgálataink során **négy olyan molekulát tudtunk azonosítani (brevikán, neurokán, tenaszcin-C és verzikán), melyek a tüdőrák intracerebrális áttéte és a gliomák közötti jelentősen különböző peritumorális invázióért leginkább felelősek** és az antiinvazív onkoterápiához a jövőben targetként szolgálhatnak.

Köszönetnyilvánítás

A PhD dolgozat a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 kutatási projekt támogatásával készült el. A témavezetőt a kutatómunkájában a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.



Iktatószám: DEENKÉTK/58/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Varga Imre

Neptun kód: ZJA2WN

Doktori Iskola: Ideg tudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, I.**, Hutóczki, G., Szemcsák, C.D., Zahuczky, G., Tóth, J., Adamecz, Z., Kenyeres, A., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma. *Pathol. Oncol. Res.* 18 (2), 413-420, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9461-0>
IF:1.366
2. **Varga, I.**, Hutóczki, G., Petrás, M., Scholtz, B., Mikó, E., Kenyeres, A., Tóth, J., Zahuczky, G., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Expression of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in Human Glioblastoma Versus Intracerebral Lung Adenocarcinoma Metastasis. *Cent. Eur. Neurosurg.* 71 (4), 173-180, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249698>
IF:0.472

További Közlemények

3. Klekner Á., **Varga I.**, Bognár L., Hutóczki G., Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B.: Különböző invazivitású agydaganatok extracelluláris mátrixának expressziója. *Ideggyógy. Szle.* 63 (1-2), 38-43, 2010.
IF:0.236
4. Bágyi, K., Haczkó, A., Márton, I., Szabó, J., Gáspár, A., András, M., **Varga, I.**, Tóth, J., Klekner, Á.: Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery. *BMC Infect. Dis.* 9, 104-113, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-9-104>
IF:2.55



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



5. Petrás M., Hutóczki G., **Varga I.**, Jr. Vereb G., Szöllösi J., Bognár L., Ruszthi P., Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B., Klekner Á.: Különböző eredetű malignus agydaganatok invazivitásának panelszerű vizsgálata.
Magyar Onkol. 53 (3), 253-258, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/MOnkol.53.2009.3.3>
6. Bágyi, K., Márton, I., Szabó, J., András, M., Gáspár, A., **Varga, I.**, Bognár, L., Klekner, Á.: Efficacy of pre-operative cephalosporin prophylaxis in controlling pathogenic oral bacterial growth in comatose patients.
J. Med. Microbiol. 57 (Pt1), 128-129, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47381-0>
IF:2.19
7. Jenei M., Veres I., Schmidt E., **Varga I.**, Remenyik É.: Az erythrodermáról és rühatkafertőzésről scabies norvegica két esete kapcsán.
Orv. Hetil. 149 (47), 2229-2235, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28479>
8. **Varga I.**, Dezső B., Horváth Á., Kiss S.S.: A tüdő, a mellhártya és a mediastinum daganatai.
In: Klinikai onkológia a gyakorlatban. Szerk.: Szántó János, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 129-157, 2005.
9. **Varga I.**, Szűcs M.Z., Moldvay J., Jáger M., Szűcs G., Bordás M., Molnár L., Szilasi M., Strausz J.: A bronchoszkópia szerepe a nyelőcsődaganatok kivizsgálásában és kezelésében.
Orv. Hetil. 145 (45), 2285-2288, 2004.
10. **Varga I.**, Brugós L., Farkas M., Szilasi M.: Bronchoszkópia az intenzív osztályokon.
Orv. Hetil. 145 (18), 957-961, 2004.
11. Czirják, L., Koncz, A., **Varga, I.**, Dévényi, K., Kumánovics, G., Szűcs, G.: Investigation of the alveolar macrophages and T lymphocytes in 15 patients with systemic sclerosis.
Clin. Rheumatol. 18 (5), 357-363, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s100670050119>
IF:0.615
12. **Varga I.**, Koncz A., Brugós L., Szilasi M., Szakács É.: Első tapasztalataink a légúti stent-tel.
Med. Thorac. 51 (4), 154-157, 1998.





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



13. Koncz A., **Varga I.**, Kollár J., Winkler I.: Többszörös kerekárnyék radiológiai képével jelentkező pulmonális tuberkulózis esete.
Med. Thorac. 46 (7), 241-246, 1993.
14. Koncz A., Herman K., **Varga I.**, Szabó Z., Szilasi M.: Sürgős bronchológiai vizsgálatok indikációja és kivitelezése szívűtétek perioperatív időszakában.
Med. Thorac. 46 (12), 467-474, 1993.
15. Dobrán I., Móroczi I., Vezendi S., **Varga I.**: Endobronchialis szemcsés-sejtes tumor: Abrikossof myoblastoma.
Med. Thorac. 44 (11), 487-491, 1991.
16. Faragó E., Szilasi M., Csontos Z., **Varga I.**, Mihóczy L.: Antibiotikum szint mérések hörgőkarcinomás betegek köpetében.
Med. Thorac. 43 (6), 249-258, 1990.
17. Szilágyi J., Bene J., **Varga I.**: Új módszer az orrlégzés vizsgálatára.
Pneumonol. Hung. 41, 57-63, 1988.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7.429

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 1.838

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.24

