

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Különböző grádusú astrocytomák extracelluláris  
mátrix összetételének vizsgálata**

Dr. Virga József

Témavezető: Dr. Klekner Álmos



DEBRECENI EGYETEM  
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2018.

# TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	2
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. Epidemiológia.....	6
2.1.1. Leíró epidemiológia .....	6
2.1.2. Etiológia és rizikótényezők .....	8
2.2. Tünettan és Diagnosztika.....	9
2.3. Csoportosítás .....	10
2.3.1. Szövetteni csoportosítás .....	10
2.3.2. Molekuláris csoportosítás.....	13
2.4. Kezelés.....	15
2.5. Prognózis és prognózist befolyásoló tényezők .....	16
2.6. Az extracelluláris mátrix és a gliómainvázcióban betöltött szerepe .....	18
3. Célkitűzés .....	20
4. Módszertan .....	21
4.1. Betegek és tumorminták .....	21
4.1.1. Különböző eredetű malignus KIR daganatok ECM összetételének vizsgálata..	21
4.1.2. Különböző grádusú astrocytomák ECM összetételének vizsgálata .....	23
4.1.3. Különböző prognózisú glioblastomás minták ECM összetételének vizsgálata .	24
4.2. mRNS expresszió mérése .....	25
4.3. Proteinek szintjének mérése .....	26
4.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok .....	26
4.5. Statisztikai módszerek .....	27
6. Eredmények.....	28
6.1. Primer és szekunder malignus agydaganatok ECM összetételének összehasonlítása	28
6.1.1. mRNS expresszió vizsgálat eredményei .....	28
6.1.2. Fehérje expressziós vizsgálat eredményei.....	30
6.2. Különböző grádusú astrocytomák ECM összetételének vizsgálata .....	33
6.2.1. mRNS expresszió vizsgálat eredményei .....	33
6.2.2. Fehérje expresszió vizsgálat eredményei .....	36
6.3. Eltérő prognózisú grade IV astrocytoma (glioblastoma) minták ECM összetételének vizsgálata.....	37

6.3.1.	A mintákat adó betegek klinikai paramétereinek vizsgálati eredményei .....	37
6.3.2.	Immunhisztokémia .....	37
6.3.3.	mRNS expresszió vizsgálat eredményei .....	38
6.3.4.	Fehérje expresszió vizsgálat eredményei .....	39
7.	Megbeszélés .....	41
7.1.	A primer és szekunder malignus agydaganatok inváziós spektruma markánsan eltér egymástól .....	42
7.2.	Az azonos szövettani csoportba tartozó, de eltérő grádusú astrocytómák ECM alkotóinak expressziós mintázata jellegzetes különbségeket mutat .....	43
7.3.	Az inváziós spektrum összefüggést mutat a prognózissal glioblastomás betegeknél .....	45
7.4.	A gliómainvázcióban kulcsszerepet betöltő extracelluláris mátrix molekulák .....	47
8.	Összefoglalás .....	49
8.1.	Új tudományos eredmények .....	50
9.	Summary .....	51
9.1.	Novel scientific findings .....	52
10.	Irodalomjegyzék .....	53
11.	Tárgyszavak .....	61
12.	Köszönetnyilvánítás .....	61
13.	Függelék .....	62

## 1. BEVEZETÉS

A központi idegrendszer (KIR) daganatos megbetegedései a betegség kiindulási helye alapján alapvetően két csoportra bonthatóak.<sup>1,2</sup> Elsődleges (primer) daganatos betegségnek nevezzük a KIR-ben kialakuló daganatos elváltozásokat, másodlagos (szekunder) daganatoknak pedig az egyéb szervek daganatos megbetegedéséből származó KIR áttéteket (metastasis) tekintjük. A leggyakoribb rosszindulatú primer KIR daganatok a gliomák, az összes rosszindulatú KIR daganat közel 75%-a gliális eredetű. Ezen a csoporton belül is kiemelkedő az astrocytomák aránya: az összes malignus primer agydaganat közel 2/3-a astrocytoma.<sup>3</sup> A daganatok előfordulása, a betegek epidemiológiai jellemzői a szövettani típustól függően változnak (1. TÁBLÁZAT). A betegségcsoport jelentőségét elsősorban nem a gyakoriságuk adja – bár relatív gyakoriságuk elég magas –, hanem a betegség egyéb jellemzői. Az astrocytomáknak nincsenek korai vagy specifikus tünetek, így viszonylag későn kerülnek felismerésre. A tumorok túlnyomó többsége diffúz növekedést mutat, emiatt sebészi eltávolításuk, különösen magasabb grádus esetén, rendkívül nehéz feladat. Ezen felül tumorsejtek a sugár- és kemoterápiára kevésbé érzékenyek, így onkológiai ellátásuk szintén kihívást jelent. Fontos továbbá, hogy a betegek jelentős része aktív keresőképes korban van, így az astrocytomák nem csupán egészségügyi, hanem társadalmi-gazdasági szempontból is komoly jelentőséggel bírnak.<sup>4,5</sup>

A jelen doktori értekezést megalapozó kutatás elsődleges célja a leggyakoribb, és egyben a legrosszabb indulatú, primer malignus agydaganat, a glioblastoma (GBM) vizsgálata volt. A glioblastomás betegek kezelése az elmúlt évtizedben jelentős változáson, fejlődésen esett át, a betegek túlélési esélyei javultak, összességében azonban a GBM továbbra is egy, a beteg, a család és a kezelő egészségügyi személyzet számára komoly kihívást jelentő, a betegek életminőségét nagy mértékben lerontó, sajnálatos módon elkerülhetetlenül a beteg halálához vezető betegség.<sup>6,7</sup> Megfigyelhető azonban a betegek között egy – a daganatos betegségek

között is meglepően jelentős – heterogenitás, bizonyos betegek a kezelésre jobban reagálnak, progressziómentes és teljes túlélésük is az átlag fölötti. Jelenleg nincs azonban egyetlen megbízható módja sem annak, hogy a kezelőorvos a betegség prognózisát valamilyen mértékben megbecsülje. Ismertek bizonyos tényezők, amelyek a kedvezőbb betegségkimenetelt valószínűsítik, ezek azonban nehezen alkalmazhatóak egyéni lebontásban.<sup>8,9</sup>

A GBM agresszív klinikai viselkedésének hátterében – a kismértékű radio-kemoszenzitivitás mellett – a daganatsejtek igen nagymértékű inváziós képessége áll. A daganatsejtek e tulajdonságának forrása jelentős részben a tumor extracelluláris mátrixában (ECM) keresendő. Az ECM mennyiségi és minőségi változásai számos daganattípusban, így GBM-ben is igazoltak, és hozzájárulnak egy *pro-cancer niche* kialakulásához, melyben az astrocytoma sejtek képesek a környező agyszövet beszűrésére. A peritumorális infiltráció azonban nem csak a GBM-re, hanem alacsonyabb grádusú astrocytomákra is jellemző.<sup>1,10-12</sup> Éppen ezért a kutatásba különböző grádusú astrocytomából származó tumormintákat vontunk be és ezek molekuláris összetételét vizsgáltuk különböző szempontok alapján. A mérések során nem csupán astrocytomákban mértük meg különböző, a gliomainvázcióban szerepet játszó ECM alkotók mennyiségét, az eredmények helyes értelmezéséhez más szövettani csoportba tartozó malignus daganatból, agyi metastasisból származó mintákat is elemeztünk, kontrollként pedig minden esetben nem tumoros agyszövetet is használtunk. Eredményeink értelmezését mindig a klinikai hasznosíthatóság vezette, a molekuláris biológia módszereit felhasználva próbáltunk választ adni a klinikusokat foglalkoztató kérdésekre, így az elvégzett kutatás a transzlációs medicina körébe tartozik, és egyfajta hidat igyekszik képezni az alapozó és klinikai orvostudomány között.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. EPIDEMIOLÓGIA

#### 2.1.1. LEÍRÓ EPIDEMIOLÓGIA

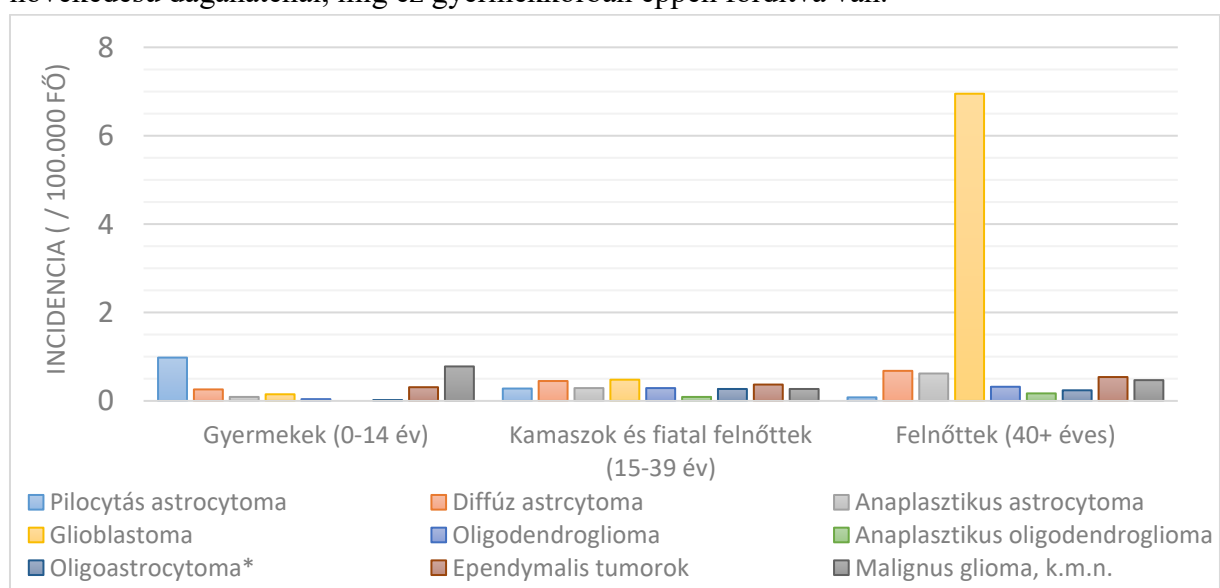
A primer KIR daganatok körülbelül 32%-a malignus daganat. Mint az a bevezetésben is említésre került, a malignus daganatok kb. 75%-a gliális eredetű, ezek korhoz igazított incidencia rátája 5,78/100.000 fő. Az összes astrocytoma incidencia rátája 4,5/100.000 fő.<sup>3</sup> Az egyes szövettani típusok általános epidemiológiai jellemzői eltérnek. (1. TÁBLÁZAT). Nem azonos az egyes korcsoportokban az egyes szövettani csoportok előfordulási gyakorisága, hiszen gyermekkorban a benignusabb gliómák a jellemzőbbek, a leggyakoribb típus (37%) a pilocytás astrocytoma (WHO grade I astrocytoma), felnőttkorban azonban a magas grádusú gliómák dominálnak, a daganatok 67%-a GBM (WHO grade IV astrocytoma).<sup>3</sup> Általánosságban elmondható, hogy az életkor előrehaladtával a daganatok incidenciája növekszik. (1. ÁBRA)

**1. TÁBLÁZAT Gliális tumorok epidemiológiai jellemzői.** A diagnózis idején jellemző életkor és a betegek túlélése jelentős különbségeket mutat a különböző grádusú tumorok között. (Ostrom et al. 2014. nyomán, \* = a WHO 2016-os klasszifikációjában a diagnózis használatát már nem javasolják; k.m.n. = külön megnevezés nélkül)

SZÖVETTAN	WHO GRÁDUS	INCIDENCIA /100.000 fő	MEDIÁN ÉLETKOR év	1 ÉVES TÚLÉLÉS %	5 ÉVES TÚLÉLÉS %
Pilocytás astrocytoma	I	0,35	12	98	94,2
Diffúz astrcytoma	II	0,51	48	74,4	49,7
Anaplasztikus astrocytoma	III	0,39	53	64,4	29,7
Glioblastoma	IV	3,20	64	39,3	5,5
Oligodendroglioma	II	0,25	43	94,3	80,9
Anaplasztikus oligodendroglioma	III	0,10	50	81,7	56,7
Oligoastrocytoma*	II-III	0,20	41	88,8	63,6
Ependymalis tumorok	I-III	0,43	44	94,3	84,2
Malignus glioma, k.m.n.	II-IV	0,47	36	65,1	48,5

Megállapítható továbbá, hogy az astrocytomák gyakoribbak férfiakban; incidencia ráta: 5,44/100.000 fő vs. 3,7/100.000 fő.<sup>3</sup> Az életkor és a nemek aránya mellett a gliómák gyakorisága jelentős különbségeket mutat a világban. A gazdaságilag fejlettebb területeken (pl. Észak-Európa) sokszorosa a betegség incidenciája a máshol tapasztalhatónak (11/100.000 fő a skandináv államokban, Indiában vagy a Fülöp-szigeteken 2-4/100.000 fő).<sup>13</sup> Ugyanakkor érdekes, egyben a földrajzi, kulturális-életmódbeli és/vagy genetikai hajlamosító tényezők enyhe, jelenleg nem teljesen értett és tisztázott befolyásoló hatására utal, hogy a gazdaságilag szintén fejlett Japánban az európai előfordulási gyakoriság fele a betegség incidenciája.<sup>14</sup> Ugyancsak egyéb hajlamosító tényezőkre utal, hogy az USA-ban az afroamerikai népesség körében szintén gyakoribb a gliómák aránya a fehérekhez képest.<sup>3</sup> Az utóbbi néhány évtizedben általános jelenséggént elmondható, hogy növekedett a gliómák incidenciája, ez azonban feltehetőleg elsősorban a megnövekedett átlagos élettartam, a hatékonyabb diagnosztikai eljárások és az idősebb korosztály kivizsgálása során megváltozott orvosi hozzáállás következménye, és nem a fokozott daganatképződésé.<sup>15</sup>

**1. ÁBRA A különböző gliómák gyakorisága az életkor és a korcsoport függvényében.** Az ábrán jól látszik, hogy a glioblastoma incidenciája messze meghaladja felnőttkorban az összes többi daganat incidenciáját. Látható emellett, hogy felnőttkorban (és fiatal felnőttkorban) az infiltratív növekedésű daganatok gyakorisága szintén 2-3x nagyobb a nem infiltratív növekedésű daganaténál, míg ez gyermekkorban éppen fordítva van.



### 2.1.2. ETIOLÓGIA ÉS RIZIKÓTÉNYEZŐK

A gliómák kialakulásának pontos oka nem ismert. A jelenleg legelfogadottabb szemlélet szerint számos genetikai és epigenetikai elváltozás felhalmozódása szükséges ahhoz, hogy a tumor kialakulhasson.<sup>16</sup> Régóta ismert azonban néhány örökletes kórkép vagy szindróma, amelyek jelentősen növelik a gliómák kialakulásának kockázatát. Ilyen kórképek a Li-Fraumeni szindróma (*TP53* gén mutációja), a neurofibromatózis 1 és 2 (*NF 1* és *2* gének), Lynch szindróma (*MSH2*, *MLH1* gének) vagy Ollier-betegség/Mallier-betegség (*IDH1/IDH2* gének). Fontos azonban leszögezni, hogy ezen betegségcsoport következményeként kialakult daganatok csupán a gliómák nagyon kis hányadát teszik ki.<sup>15,17</sup>

Genom szintű asszociációs vizsgálatok (GWAS) során azonosítottak továbbá több olyan egyponos nukleotid-polimorfizmust (SNP), amelyek a csírvonalban találhatóak és gyakoribbak gliómás betegekben. Összesen 8 ilyen locusról sikerült igazolni a kapcsolatot a fokozott gliómaképződéssel, a locusok a *TERT*, *TERC*, *EGFR*, *CCDC26*, *CDKN2A*, *PHLDB1*, *RTEL1*, *TP53* géneknek megfelelően helyezkednek el.<sup>18</sup>

A környezeti tényezők közül a nagy-dózisú ionizáló sugárzás szerepe egyértelműen bizonyított (magasabb előfordulás az atombomba támadások túlélői, illetve valamilyen daganat miatt koponya besugározáson átesett betegek között).<sup>19,20</sup> Alacsony dózis esetén azonban az egészségügyi ellátás során használt ionizáló sugárzás által hordozott csekély kockázat csupán pozitív családi anamnézis, így feltételezett genetikai hajlam esetén jelent veszélyt.<sup>21</sup> A mobiltelefonhasználat és az ezzel járó elektromágneses sugárzás IARC 2B kategóriába tartozó rizikótényező, azaz *„lehetséges, hogy karcinogén az emberre. Az emberre vonatkozóan korlátozott, az állatkísérletek eredményei alapján viszont kevesebb, mint elegendő bizonyíték áll rendelkezésre a karcinogenitásra”*. A besorolás epidemiológiai tanulmányokat alapul véve nem tudta kizárni a kapcsolatot, a tanulmányok eredményei inkonzisztensek voltak. A besorolást követően a gliómák és mobiltelefonhasználat kapcsolatát vizsgáló tanulmányok

egyike sem igazolt bármilyen összefüggést, azonban az igen jelentős mértékű használatnövekedés és a tumor kialakulásához szükséges hosszú látenciaidő miatt egyelőre a hivatalos álláspont nem változhat.<sup>22,23</sup>

Érdekes módon az allergiás megbetegedések, pl. asthma bronchiale, eczema vagy ételallergiák, az epidemiológiai vizsgálatok alapján csökkentik a gliómák kialakulásának rizikóját. A gliómás betegekben alacsonyabb az IgE szint is. A rizikócsökkenés feltételezett hatásmechanizmusa az IL-4 és IL-13 hatásán keresztül valósulhat meg.<sup>23</sup>

## **2.2. TÜNETTAN ÉS DIAGNOSZTIKA**

A gliómák által okozott tünetek elsősorban az idegrendszeren belüli puszta jelenlétükből fakadnak, hiszen a koponyűrben rendelkezésre álló tér limitált. A tünetek kialakulása szempontjából fontos a tumor elhelyezkedése (érint-e elokvens területet), a tumor mérete, a növekedés mértéke és minősége (diffúz vagy nem diffúz), a tumort övező oedema mértéke, az intrakraniális folyadék szabad áramlásának megléte.<sup>24</sup> A tünettán nem teljesen független azonban a szövettani diagnózistól sem, hiszen az epilepsziás rohamok jellemzőbbek bizonyos alacsony grádusú gliómákban.<sup>24,25</sup>

A tünetek egy része generalizált, általános jellegű. Ilyen tünetek a fejfájás, hányinger, zavartság, epilepsziás rohamok, agyi nyomásfokozódás. A tünetek egy másik része a tumor agyon belüli elhelyezkedéséből következik, és az érintett központok zavarának képében jelentkezik. Occipitalis elhelyezkedés esetén tipikusak a látási zavarok, a parietalis lebeny érintettsége esetén előfordulhatnak tapintási zavarok, frontális lokalizációnál pedig például személyiségváltozás.<sup>24,26</sup>

Gyanú esetén képalkotó eljárások segítségével igazolható a térfoglalás léte, a radiológiai képből és a beteg kórtörténetéből pedig jelentős részben el is különíthetőek a lehetséges kórképek (alacsony grádusú primer tumorok, magas grádusú primer tumorok, agyi áttétek, tályog, stb.). Az MRI és a CT egyaránt alkalmas a daganatok diagnosztizálására. Az MRI pontosabb képet

ad az elváltozásról és a hátsó scala daganatok esetében is alkalmas a diagnózis felállítására. Ezen felül a kisebb elváltozások is hamarabb észrevehetőek, így a betegek posztoperatív követésére, recidívák detektálására MRI felvételeket használunk. Abban az esetben, ha a daganat inoperabilis, sztereotaxiás mintavételezéssel jutunk szövettanhoz, a végleges diagnózis ugyanis minden esetben a szövettani kép alapján kerül megállapításra. <sup>26-28</sup>

## **2.3. CSOPORTOSÍTÁS**

### *2.3.1. SZÖVETTANI CSOPORTOSÍTÁS*

A gliális tumorok heterogén betegségecsoportot alkotnak. Astrocytomák, oligodendrogliomák, oligoastrocytomák és egyéb daganatok alkotják ezt az összetett csoportot. A WHO klasszifikáció alapja egészen a legutóbbi időkig pusztán a szövettani kép volt. 2016-ban került bevezetésre az integrált diagnózis fogalma, amely egyesíti az elmúlt évtizedekben felhalmozott tudást a daganatok molekuláris onkológiájáról a tradicionális kórszövettani vizsgálattal, ezáltal egymástól jobban elkülöníthető, a betegség prognózisával is kapcsolódó csoportokat alakítottak ki.<sup>1</sup> (2. TÁBLÁZAT) A 2007-es klasszifikáció alapja az volt, hogy a tumorsejtek melyik nem neoplasztikus sejtípushoz hasonlítanak leginkább, így a jelen értekezést megalapozó kutatásokba bevont astrocytoma minták egy csoportból (astrocytaer tumorok) kerültek ki.<sup>29</sup> A 2016-os csoportosításban azonban a pilocytás astrocytoma (WHO grade I) a többi astrocytomától elkülönül, melyet a WHO grade II-III-IV astrocytomák diffúz növekedési mintázata indokol. A 2007-es és 2016-os változat között fontos különbség az IDH státus meghatározás. További immunhisztokémiai vizsgálatok révén majd mindig elkülöníthetőek az oligodendrogliomák és astrocytomák, így kevert oligoastrocytoma elnevezés a jövőben a lehetőségekhez mérten kerülendő.

**2. TÁBLÁZAT A központi idegrendszeri daganatok WHO szerinti klasszifikációja.** (Rövidített összefoglalás a 4. kiadás 2016-ban frissített változata nyomán) A WHO 2016-os csoportosítása először építi bele a diagnózisba a molekuláris vizsgálatok eredményeit. Emellett a korábbi csoportosításból elhagy olyan entitásokat, amelyek önálló létezése a molekuláris vizsgálatok alapján nem indokolt (pl. gliomatosis cerebri, protoplazmás astrocytoma, fibrillaris astrocytoma). Fontos különbség a korábbi változatoktól, hogy a gliális daganatokat a morfológiai hasonlóság/feltételezett kiindulási sejtfeleség helyett a növekedési mintázat alapján bontja a tumorokat alcsoportokra. A táblázatban jelölt számok a BNO morfológiai besorolás szerinti kódokat jelölik, melyben a törtvonal (/) mögötti számok a klinikai viselkedésre utalnak az alábbiak szerint: 0 – benignus, 1 – bizonytalan viselkedésű, borderline vagy nem meghatározott, 2 – carcinoma in situ vagy grade III intraepithelialis neoplázia, 3 – malignus tumor. A \*-gal jelölt kódszámok a 2016-os klasszifikációban szerepelnek először. A dőlt betűvel szedett entitások használata nem javasolt. K.m.n. – külön megnevezés nélkül

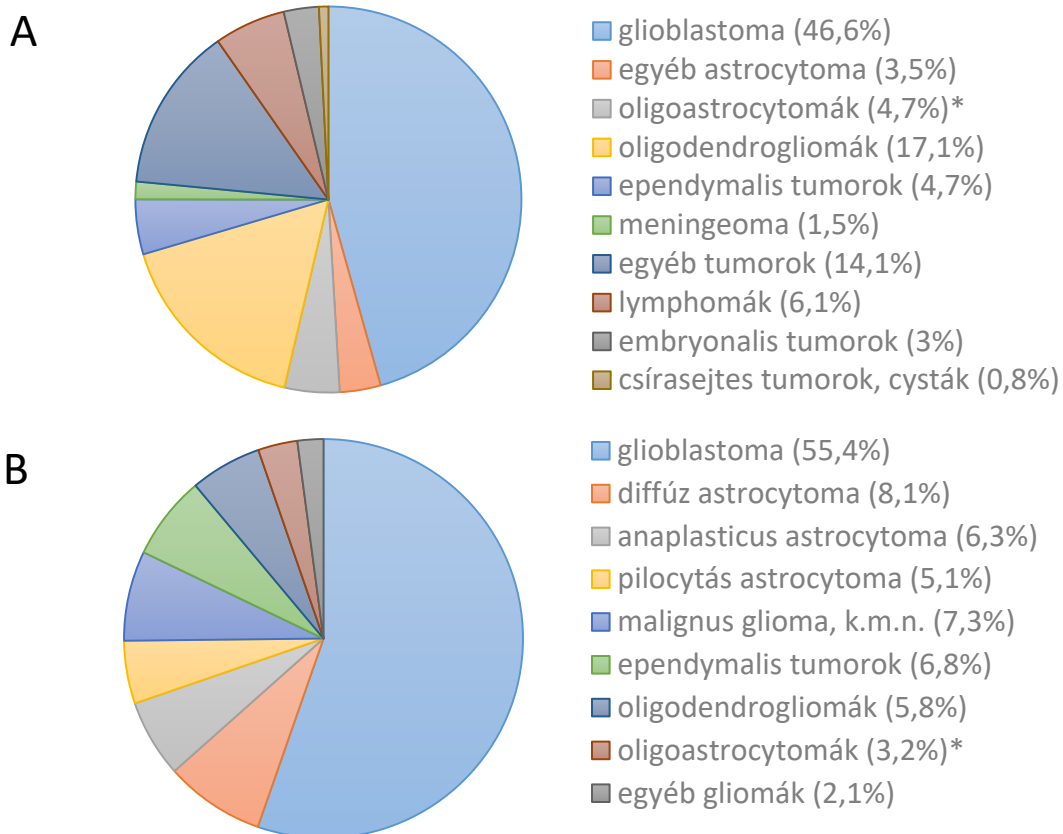
**I. DIFFÚZ ASTROCYTOMA ÉS OLIGODENDROGLIALIS TUMOROK**

Diffúz astrocytoma, IDH mutáns	9400/3
Gemistocytás astrocytoma	9411/3
Diffúz astrocytoma, IDH vad típusú	9400/3
Diffúz astrocytoma, k.m.n.	9400/3
Anaplasticus astrocytoma, IDH mutáns	9401/3
Anaplasticus astrocytoma, IDH vad típusú	9401/3
Anaplasticus astrocytoma, k.m.n.	9401/3
Glioblastoma, IDH vad típusú	9440/3
Óriássejtes glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Epitheloid gliosarcoma	9440/3
Glioblastoma, IDH mutáns	9445/3*
Glioblastoma, k.m.n.	9440/3
Diffúz középvonalsbeli glioma, H3 K27M mutáns	9385/3*
Oligodendroglioma, IDH mutációval és 1p/19q kodelációval	9450/3
Oligodendroglioma, k.m.n.	9450/3
Anaplasztikus oligodendroglioma, IDH mutációval és 1p/19q kodelációval	9451/3
Anaplasztikus oligodendroglioma, k.m.n.	9451/3
<i>Oligoastrocytoma, k.m.n.</i>	9382/3
<i>Anaplasticus oligoastrocytoma, k.m.n.</i>	9382/3

<b>II.</b>	<b>EGYÉB ASTROCYTAER TUMOROK</b>	
	Pilocytás astrocytoma	9421/1
	Pilomyxoid astrocytoma	9425/3
	Subependymalis óriássejtes astrocytoma	9384/1
	Peomorf xantastrocytoma	9424/3
	Anaplasztikus peomorf xantastrocytoma	9424/3
<b>III.</b>	<b>EPENDYMALIS TUMOROK</b>	
<b>IV.</b>	<b>EGYÉB GLIOMÁK</b>	
<b>V.</b>	<b>PLEXUS CHOROIDEUS TUMOROK</b>	
<b>VI.</b>	<b>NEURONALIS ÉS KEVERT NEURONALIS-GLIALIS TUMOROK</b>	
<b>VII.</b>	<b>PINEALIS RÉGIÓ TUMORAI</b>	
<b>VIII.</b>	<b>EMBRYONALIS TUMOROK</b>	
<b>IX.</b>	<b>AGYIDEGEK, PARASPINALIS IDEGEK TUMORAI</b>	
<b>X.</b>	<b>MENINGEOMÁK</b>	
<b>XI.</b>	<b>MESENCHYMALIS EREDETŰ NEM-MENINGEOMA TUMOROK</b>	
<b>XII.</b>	<b>MELANOCYTÁS TUMOROK</b>	
<b>XIII.</b>	<b>LYMPHOMÁK</b>	
<b>XIV.</b>	<b>HISTIOCYTAER TUMOROK</b>	
<b>XV.</b>	<b>CSÍRASEJTES TUMOROK</b>	
<b>XVI.</b>	<b>SELLARIS RÉGIÓ TUMORAI</b>	
<b>XVII.</b>	<b>METASZTÁZISOK</b>	

A 2. ÁBRA a gliómák egyes szövettani csoportjainak megoszlását mutatja.<sup>3</sup> Az egyes szövettani csoportok (astrocytomák, oligodendrogliomák, ependymomák és egyéb gliómák) tovább bonthatóak, a szöveti elfajulás mértékének megfelelően gradálhatóak. A diffúz astrocytomák grádusának megállapítása során a neuropathológus figyelembe veszi a mitotikus aktivitást, a mikrovaszkuláris proliferációt és a nekrosis létét/hiányát. Az alacsony grádusú diffúz astrocytomában egyik sem figyelhető meg, az anaplasticus astrocytomában fokozott mitotikus aktivitás igazolható, a glioblastomában pedig emellett nekrosis és/vagy érburjánzás is észlelhető.<sup>1,29</sup>

**2. ÁBRA Szöveti csoportok megoszlása.** (A) A malignus primer központi idegrendszeri daganatok megoszlását mutató kördiagramon jól látszik, hogy az összes astrocytoma felelős a rosszindulatú primer agydaganatok  $\frac{3}{4}$  része gliális eredetű, és több, mint fele astrocytoma. A leggyakoribb primer malignus agydaganat, a legrosszabb indulatú astrocytoma, a glioblastoma egymaga adja az összes rosszindulatú KIR daganat majd 50%-át. (B) Az ábra második felében a gliális tumorok megoszlása látható. Az összes gliális tumor szintén kb.  $\frac{3}{4}$  része astrocytaer tumor. (Ostrom et al, 2014 nyomán, \* a WHO 2016-os csoportosítása alapján használata nem javasolt.)



### 2.3.2. MOLEKULÁRIS CSOPORTOSÍTÁS

Az elmúlt évtizedekben rengeteg információ gyűlt össze az astrocytomákra jellemző molekuláris eltérésekről. Ez alapozta meg a több rétegből álló *integrált diagnózis* jelenlegi rendszerét, teszi lehetővé az egyes entitások igen alapos elkülönítését, a „kevert” diagnózis lehetőség szerinti mellőzését. Sőt, a molekuláris eltérések alapján a WHO grade II és III astrocytomák közötti olykor nehézkes különbségtétel is megoldódhat a közeljövőben (jelenleg az egyetlen különbség a mitotikus aktivitásban van és nincs meghatározott cut off érték).

*A WHO GRADE II ÉS III ASTROCYTOMÁK MOLEKULÁRIS ELTÉRÉSEI.* E daganatok legjellemzőbb molekuláris eltérése az *IDH1*, ritkábban az *IDH2* gén mutációja.<sup>30</sup> A mutáns enzim káros működése révén hozzájárul a DNS és a hiszton fehérjék metilációjához, végső soron a CpG (cytosine-phosphate-guanine) szigetek metilációjához, így a G-CIMP (genome-wide glioma cytosine-phosphate-guanine island methylator phenotype) fenotípus kialakulásához.<sup>31</sup> Emellett astrocytomákban gyakori a *TP53* és az *ATRX* gének mutációja, míg az *1p/19q kodeláció* nem fordul elő. Ezek a mutációk gyakorlatilag egymást kölcsönösen kizárják, és így az astrocytomák és az oligodendrogliomák elkülöníthetőek.<sup>1,2</sup>

*A WHO GRADE IV ASTROCYTOMA (GLIOBLASTOMA) JELLEMZŐ MOLEKULÁRIS ELTÉRÉSEI.* A GBM két csoportra bontható az *IDH* mutációs státusz alapján. Az esetek több, mintegy 90%-ában a vad típusú *IDH-1/2* expresszálódik, a maradék 10%-ban mutatható ki csupán az *IDH* mutáció. Ez a kisebb csoport gyakorlatilag megfeleltethető a szekunder, azaz alacsonyabb grádusból másodlagosan tovább malignizálódó GBM-nek. A különbségtétel azért fontos, mert a két csoportnak eltérő a klinikai képe (életkor, kórlefolyás, terápiás válaszkészség), az *IDH* mutáns GBM betegek túlélése megegyezik az *IDH* vad típusú anaplasticus astrocytoma betegekével, vagy akár jobb is lehet annál.<sup>32</sup> A vad típusú GBM-re számos mutáció jellemző, ilyenek pl. a *PTEN* tumorszupresszor mutációi, a *CDKN2A/p14<sup>ARF</sup>* vagy *CDKN2B* egyik alléljának elvesztése, a *TERT* mutációk. A *TERT* mutációi kölcsönösen kizárják az *ATRX* mutációt, és gyakran párosulnak az *EGFR* kópiaszámának amplifikálásával. A *TERT* mutációk GBM-ben rossz prognózissal járnak, érdekes módon oligodendrogliomában azonban kedvezőbbel.<sup>33-36</sup> Ezek mellett gyakran jelennek meg még a *TP53*, *PDGFRA*, *MDM2*, *BRAF*, *CDK4*, *CDK6* gének mutációi is.<sup>8,33,37</sup> A jellemző eltérések alapján négy GBM alcsoportot alkottak: klasszikus, neurális, proneurális és mesenchymalis (3. TÁBLÁZAT).<sup>38</sup> A csoportosítás azonban a tumoron belüli heterogenitás, az alcsoportok közötti váltás lehetősége és a meghatározás technikai feltételeinek szükségessége miatt a klinikai hasznosítást megnehezíti, már-már ellehetetleníti.

**3. TÁBLÁZAT Glioblastoma altípusok jellemző molekuláris eltérései.** A The Cancer Genom Atlas (TCGA) eredményei alapján 2010-ben Verhaak és munkatársai készítették el 91 glioblastomás mintában 601 gént vizsgálva a molekuláris al csoportbeosztást, így azonosítottak 4 olyan jól körülírható GBM csoportot, amelyek relatíve jól lefedik a különböző tulajdonságokkal rendelkező GBM típusokat. Az elemzés rámutatott arra is, hogy a TP53, RB1, ERBB2 útvonalak mutációja rendkívül gyakran mutálódott GBM-ben, és a háromféle útvonal gyakran mutat átfedést egymással, így feltehetőleg mind a három útvonal sérülése szükséges a GBM kialakulásához. A különböző alcsoportoknak van némi klinikai vonatkozása is. A proneuralis alcsoport gyakoribb fiatal betegek körében, és általában jobb a prognózis is. Az agresszívabb terápia általában jobb prognózist eredményez a klasszikus és mesenchymalis csoportban, míg nincs hatása a betegségkimenetelre a proneurais csoportban.

PRONEURALIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDGFRA fokozott expressziója/mutációja</li> <li>• 4q12 lokusz (PDGFRA gén) amplifikációja</li> <li>• IDH1 pontmutációk</li> <li>• TP53 mutációk</li> <li>• PIK3CA/PIK3R1 mutációk</li> <li>• proneuralis feldődés (pl. SOX gének)</li> <li>• oligodendrocyta vonal génjeinek expressziója (p. OLIG2, nKx2, PDGFRA)</li> </ul>
NEURALIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neuron markerek expressziója (pl. NEFL, GABRA1, SYT1)</li> </ul>
KLASSZIKUS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 7-es kromoszóma amplifikálódása</li> <li>• 10-es kromoszóma elvesztése</li> <li>• EGFR amplifikáció, VIII EGFR mutáció</li> <li>• TP53 mutációk hiánya</li> <li>• CDKN2A deléció</li> <li>• NES Notch és SHH jelátvitel erősödése</li> </ul>
MESENCHYMALIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NF1 mutáció vagy génvesztés</li> <li>• NF1 és PTEN komutáció</li> <li>• mesenchymalis markerek expressziója(CHI3L1, MET)</li> <li>• TNF és NFκ-B jelátviteli útvonal erősödése</li> </ul>

## 2.4. KEZELÉS

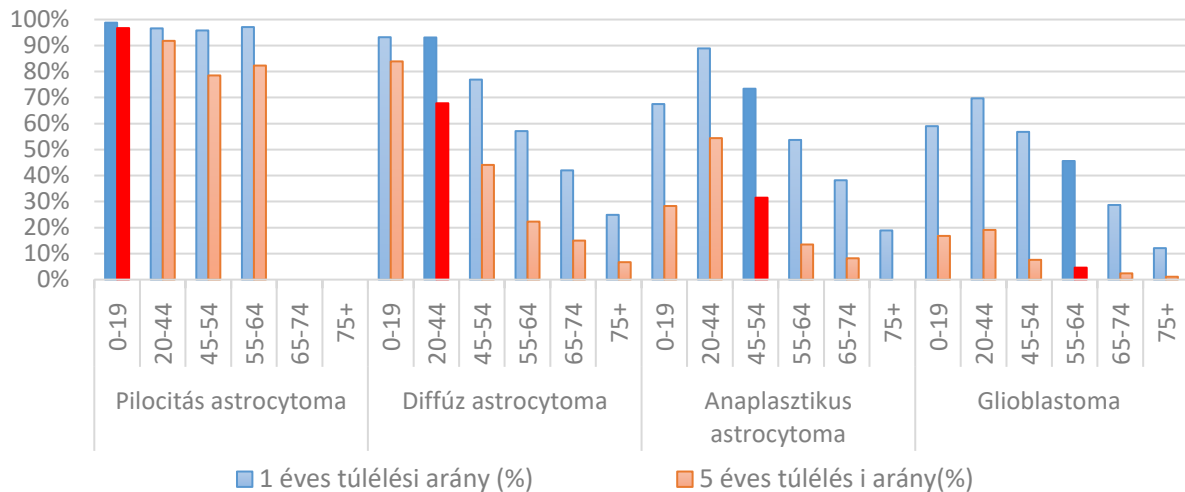
Az astrocytomák kezelése során sebészi, sugárterápiás és kemoterápiás ellátásra egyaránt szükség lehet. Az alkalmazott kezelési módszer elsődlegesen a szövettani diagnózistól függ. A pilocytás astrocytoma (WHO grade I) esetében a teljes sebészi eltávolítás jó eredményeket hozhat, és teljes eltávolításra a daganat kevésbé infiltratív növekedése miatt reális esély is van.

A diffúz növekedésű daganatok sebészi kezelése már nagyobb kihívást jelent.<sup>39</sup> A diffúz astrocytoma (WHO grade II) kezelése elsősorban szintén sebészi. A műtét időpontját illetően azonban nincs konszenzus, hiszen a daganat lassan növekszik és a gyógyszeresen kontrollálható rohamokon kívül gyakran nem okoz tüneteket. A daganat részleges eltávolítása esetén a tumor visszatérhet, ekkor sugárterápia segíthet.<sup>40</sup> A kemoterápia szerepe vitatott, magas rizikójú betegek esetén a sugárterápia esetleg kiegészíthető.<sup>41</sup> Az anaplasticus astrocytoma (WHO grade III) kezelése első lépésben szintén sebészi, melyet mindig besugárzás, majd adjuváns kemoterápia követ.<sup>42</sup> A glioblastoma (WHO grade IV) kezelése sebészi reszekcióval kezdődik, melyet konkuráló kemo-irradiáció követ. A konkuráló fázis lezárulása után a beteg a mellékhatások függvényében a daganat kiújulásáig monoterápiában kapja a temozolomide kemoterapeutikumot. A tumor kiújulása esetén újabb műtetre és célzott terápiás szer (bevacizumab) adására van lehetőség.<sup>28,43</sup>

## **2.5. PROGNÓZIS ÉS PROGNÓZIST BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK**

A gliómák prognózisa szövettani csoportonként és grádusonként eltérő. (1. TÁBLÁZAT) A szövettani csoportokon belül a fiatalabb életkor jobb prognózissal párosul.<sup>3</sup> (3. ÁBRA) E jelenség nem teljesen tisztázott, azonban legalább részben magyarázható a kedvező prognózist biztosító IDH mutációk magasabb arányával a fiatalabb betegcsoportban.<sup>32,44</sup> A prognózist kedvezően befolyásoló tényezők közé tartozik a szakirodalmi adatok alapján a fiatalabb életkoron kívül a magasabb posztoperatív Karnofsky pontszám (KPS), a teljes tumoreltávolítás és a kevesebb reziduális tumor, illetve a kisebb mértékű nekrozis.<sup>2,6,26</sup>

**3. ÁBRA Astrocytomás betegek túlélésének alakulása szövettani típus és korcsoport függvényében.** Az ábrán jól látható, hogy a fiatalabb életkor (a diagnózis idején) minden szövettani csoport esetén túlélési előnyt biztosít a betegek számára. Szembetűnő ezentúl a pilocytás astrocytoma és az infiltratív növekedési mintázatot mutató tumorok között a hosszútávú 5 éves túlélésben tapasztalható jelentős különbség. Az egyes szövettani csoportok esetén a medián életkornak megfelelő korcsoport sötétebb színű kiemeléssel jelölve. (Ostrom et al, 2014 nyomán)



A molekuláris vizsgálatok eredményei alapján az *IDH1* és *IDH2* gének mutációi erősen összefüggnek a prognózissal, a mutáns típus túlélési előnyt jelent.<sup>30,32</sup> Ezen felül az *IDH* mutációs státusz összefügg a G-CIMP fenotípussal alacsonyabb grádusú astrocytomákban, és ennek a csoportnak szintén kedvezőbb a prognózisa.<sup>31</sup> GBM esetén kedvező az *MGMT* promoter régió metiláltsága, mely összefüggést az alkiláló kemoterapeutikum (temozolomide) hatásmechanizmusa magyarázza.<sup>45</sup> Az *ATRX* mutáció szekunder GBM-ben és alacsonyabb grádusú astrocytomákban gyakori, szintén kedvezőbb betegségkimenetelre utal.<sup>46</sup> Gyermekkori GBM-ben jellemző (de nem kizárólagos) a hiszton H3.3 mutációja.<sup>47</sup>

A nevezett molekuláris markerek közül az IDH mutációs státusz a WHO 2016-os integrált diagnosztikai rendszerének szerves részét képezi.<sup>1</sup> Emellett elterjedt az *MGMT* státusz meghatározása, amelynek különösen a 65-70 év feletti betegek terápiája esetén van jelentősége.<sup>48</sup> Számos egyéb molekuláris prognosztikai markert vizsgáltak még, az eredmények azonban a legtöbb esetben kevésbé egyértelműek és a klinikumban nem vagy nagyon nehezen használhatóak.

## **2.6. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX ÉS A GLIÓMAINVÁZIÓBAN BETÖLTÖTT SZEREPE**

A KIR térfogatának jelentős részét a neuronok, glia sejtek és véredények teszik ki. Az extracelluláris tér az össztérfogat mindössze 15-25%-át teszi ki, és itt találhatóak az extracelluláris mátrix (ECM) molekulái, ionok, citokinek, növekedési faktorok, neurohormonok, metabolitok.<sup>49,50</sup> Az ECM alkotói is jelentősen különböznek az agyban a test többi részében megfigyelhető összetételtől. A KIR-ben a fő ECM alkotó a hialuronsav (HA). A HA a nagyméretű, a teret kitöltő glükóz-amino-glikánok (GAG) közé tartozik. A HA a sejtek felszínén lévő receptorokhoz (CD44 és CD168/RHAMM) kötődve alapvetően hozzájárul a szöveti struktúra kialakulásához, emellett számos sejtfolyamat (sejtosztódás, adhézió, motilitás) szabályozásában vesz részt a receptorhoz való kötődése.<sup>51</sup> A fehérje-kötött óriás szénhidrátmolekulák, azaz a proteoglikánok széles választéka megtalálható az agyban. Nagy mennyiségben találhatóak meg a heparán-szulfát proteoglikánok (HSPG), mint például a syndecan<sup>52</sup>. Egy másik jelentős csoportot képeznek a kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG), e népes család képviselői főleg a fejlődő agyban és regenerálódás során expresszálódnak. Ide tartozik például az agrecan, versican, neurocan és brevican. A HA és egyéb ECM alkotók összekapcsolásában játszanak szerepet.<sup>53,54</sup> A proteoglikánok közül megemlítendő még a tenascinok családja, ezek a sejtosztódás, migráció és morfogenezis során játszanak szerepet.<sup>55</sup> Rostos ECM állományból azonban sokkal kevesebb található az agyban, mint máshol. Az ECM rostos elemei közé a kollagének, a fibronectin és a laminin tartozik, ezekhez transzmembrán receptorok, az integrinek révén kötődnek a sejtek. A szervezet egyéb részeivel ellentétben az agyban az ECM és a szövet strukturális vázát nem a rostos elemek, hanem a HA adja.<sup>50,56-58</sup> Emellett az ECM-ben találhatóak az ECM dinamikus átalakulásáért felelős enzimek is, például mátrix metalloproteinázok, ADAMTS enzimek is.<sup>50,59</sup>

Ma már tudjuk, hogy az ECM nem csupán a szöveti morfológia egyik meghatározója, hanem a sejtek környezetének egy meglepően dinamikus változó és sokoldalú alkotója, ami

meghatározza a sejtek működésének számos aspektusát. Az ECM tehát nem csupán a sejtek közötti tér kitöltésére szolgál, hanem szerepe van számos sejt folyamatban, úgymint sejtosztódás, túlélés, adhézió, migráció. Emellett egyfajta tárolóként szolgál növekedési faktorok, citokinek számára, ezzel fokozottan befolyásolja a sejtek működését.<sup>60-62</sup> Éppen ezért a glióma invázióval foglalkozó szakirodalom az extracelluláris mátrix klasszikus, az alkotóelemek összességét magába foglaló leíró értelmezése helyett egy funkcionális egységként tekinti az extracelluláris teret kitöltő teljes mátrixot. Így ehhez a funkcionális extracelluláris mátrixhoz tartoznak az itt található GAG-ok, PG-k, rostos elemek mellett az ECM enzimeit, az ECM alkotóit kötő sejt felszíni receptorok is, de található több, az ECM és tumorinvázió kapcsolatát vizsgáló közlemény, ahol az itt tárolt citokinek, növekedési faktorok is említésre kerülnek.<sup>54,63-66</sup>

A megváltozott mennyiségű és minőségű ECM által teremtett *niche* megfelelő környezetet képes biztosítani a daganatos őssejtek (*cancer stem cell*, CSC) számára. Jelenlegi elképzeléseink szerint ezen sejtek felelősek a gliómák kialakulásáért és fennmaradásáért, például a CSC-k kihorgonyozása, a kihorgonyozás helyén egy speciális *pro-cancer niche* kialakítása, a sejtek polarizálása, és így az aszimmetrikus sejtosztódás biztosítása révén.<sup>64,65</sup> Az ECM bizonyos összetevői kapcsolatban állnak a daganatsejtek inváziós képességével is. Nem csupán változik (többnyire növekszik) mennyiségük, mely már önmagában hozzájárul az inváziós képesség kialakulásához, de ezen felül bizonyos fajtájuk a hagyományos funkció mellett modulációs szerepet is betölt ebben a megváltozott környezetben. Így elmondható, hogy a tumorsejtek, a tumoros ECM valamint a környező peritumorális agyállomány nem tumoros sejtjei és az ECM között egyfajta élénk párbeszéd alakul ki, és e párbeszéd segítségével a tumorsejtek módosítják a normál funkciót, alakítják ki az invázióhoz szükséges környezetet.<sup>11,50,63,67-73</sup>

### **3. CÉLKITŰZÉS**

Az extracelluláris mátrix elsősorban glioblastomában leírt, tumorinvázióban ismert szerepét figyelembe véve a kutatás célkitűzése volt az ECM alkotók mennyiségi változásait meghatározni különböző grádusú astrocytoma mintákban. Vizsgáltuk, hogy van-e kapcsolat az invázióban szerepet játszó molekulák (inváziós panel) expressziós mintázata (inváziós spektrum) és a különböző szövettani csoportok invazivitása között. Kutattuk, hogy az inváziós spektrum mutat-e összefüggést az astrocytomák grádusával. Ezért különböző grádusú astrocytomákból, valamint primer és szekunder agydaganatokból származó szövetmintákban vizsgáltuk az ECM molekulák mennyiségét és expressziós mintázatát. Emellett arra a kérdésre is kerestünk választ, hogy az ECM összetétel, ill. az inváziós spektrum kapcsolatban áll-e azonos grádus esetén a betegség kimenetelével, és így van-e prognosztikai jelentősége. E célból az expressziós eredmények és a klinikai adatok közötti összefüggést vizsgáltuk.

## **4. MÓDSZERTAN**

### **4.1. BETEGEK ÉS TUMORMINTÁK**

Kutatásunk során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Idegsebészeti Klinikán működő Agydaganat- és Tumorbankból származó intraoperatív gyorsfagyasztott astrocytoma és glioblastoma tumormintákat, valamint nem tumoros agyszöveti kontroll mintákat használtunk a molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzésére. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a DE Pathológia Intézetben a betegekhez tartozó formalin fixált, paraffinba ágyazott szövettani blokkokból készült metszeteken végeztük. A tumor- és agyszövetminták kutatási célú gyűjtéséhez, tárolásához és felhasználásához kutatócsoportunk TUKEB engedéllyel rendelkezik (51450-2/2015/EKU), a betegek minden esetben írásos beleegyezésüket adták az elvégzett műtétek során egyébként is eltávolításra kerülő tumor- és szövetminták kutatási célú felhasználásához. A mintákat minden esetben neuropathológus értékelte a pontos szövettani diagnózis megállapítása céljából.

#### *4.1.1. KÜLÖNBÖZŐ EREDETŰ MALIGNUS KIR DAGANATOK ECM ÖSSZETÉTELÉNEK VIZSGÁLATA*

A primer és szekunder malignus daganatok extracelluláris mátrixának vizsgálatát 41 GBM és 22 nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) agyi áttétjéből származó mintán végeztük el, a vizsgálatokhoz összesen 63 nem tumoros agyszöveti kontrollmintát használtunk. (4. TÁBLÁZAT) A mintákat minden esetben neuropathológus értékelte a diagnózis megerősítése érdekében. Összesen 40 ECM alkotó mRNS és fehérje szintjét mértük meg a szövetmintákban, melyekben a megfelelő mennyiségű tumorsejt jelenlétéről a Ki-67 expresszió mérésével bizonyosodtunk meg. (5. TÁBLÁZAT).

**4. TÁBLÁZAT. Primer és szekunder agydaganatok ECM összetételének vizsgálatához használt szövetminták típusa és száma**

SZÖVETANI DIAGNÓZIS	A FELHASZNÁLT MINTÁK SZÁMA	
	MRNS SZINT MÉRÉS	PROTEIN SZINT MÉRÉS
nem tumoros agyszövet kontroll	27	36
glioblastoma	17	24
NSCLC agyi metastasis	10	12

**5. TÁBLÁZAT. Primer és szekunder agydaganatok ECM összetételének összehasonlítása során vizsgált ECM alkotók.** A táblázatban szereplő összes molekula szintjét mértük transzkripció szintjén, a vastagon szedett 20 molekula expressziós szintjét transzlációs szinten is vizsgáltuk.

CD44	Integrin $\beta 3$
Agrin	Kollagén VIII, $\alpha 1$ lánc
<b>Brevican</b>	<b>Kollagén I, <math>\alpha 1</math> lánc</b>
Cadherin-N	Kollagén III, $\alpha 1$ lánc
<b>Cadherin-N2</b>	Kollagén IV, $\alpha 1$ lánc
Cadherin-P	<b>Laminin <math>\alpha 4</math></b>
<b>EGFR (ErbB1)</b>	<b>Laminin <math>\beta 1</math></b>
<b>ErbB2</b>	Laminin $\beta 2$
<b>ErbB4</b>	Matrilin-2
<b>Fibronectin</b>	<b>Matrix metalloproteináz 2 (MMP2)</b>
<b>HMMR (CD168)</b>	<b>Mátrix metalloproteináz 9 (MMP9)</b>
Hyaluronan szintáz-1	<b>Neurocan</b>
Hyaluronan szintáz-2	Neuroglycan C
<b>Integrin <math>\alpha 1</math></b>	Perlecan
Integrin $\alpha 11$	Syndecan-1
<b>Integrin <math>\alpha 3</math></b>	Syndecan-3
Integrin $\alpha 5$	Syndecan-4
<b>Integrin <math>\alpha 7</math></b>	<b>Tenascin-C</b>
Integrin $\alpha 9$	<b>Tenascin-R</b>
<b>Integrin <math>\beta 1</math></b>	<b>Versican</b>

#### 4.1.2. KÜLÖNBÖZŐ GRÁDUSÚ ASTROCYTOMÁK ECM ÖSSZETÉTELÉNEK VIZSGÁLATA

Az inváziós panel molekulák és a különböző invazivitással rendelkező, eltérő grádusú astrocytoma minták összehasonlításához összesen 94 astrocytoma és 54 nem tumoros agyszövet kontroll mintát használtunk, amelyekben 20 ECM alkotó mennyiségét mértük meg transzkripciós és transzlációs szinten. (6-7. TÁBLÁZAT) Az ECM alkotókat szakirodalmi adatok és a kutatócsoport korábbi eredményei alapján választottuk ki. A tumorminták gliális eredetének bizonyítása céljából GFAP génexpresszió mérés történt. A mintákban meghatároztuk a Ki67 expressziót annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a minták megfelelő mennyiségű malignus sejtet tartalmaztak.

#### 6. TÁBLÁZAT. A grádus és az invázióban szerepet játszó molekulák kapcsolatának vizsgálatához használt szövetminták száma és fajtája

SZÖVETTANI DIAGNÓZIS ÉS WHO GRÁDUS	A FELHASZNÁLT MINTÁK SZÁMA	
	MRNS SZINT MÉRÉS	PROTEIN SZINT MÉRÉS
nem tumoros agyszövet kontroll	18	36
pilocytás astrocytoma, WHO grade I	14	12
diffúz astrocytoma, WHO grade II	14	12
anaplasticus astrocytoma, WHO grade III	14	-
glioblastoma, WHO grade IV	16	12

#### 7. TÁBLÁZAT. A grádus és ECM összetétel vizsgálata során vizsgált ECM alkotók listája

Brevican	Laminin $\alpha$ 4 lánc
Cadherin-N2	Laminin $\beta$ 1 lánc
EGFR (ErbB1)	Matrix metalloproteináz 2 (MMP2)
ErbB2 (her2/neu)	Mátrix metalloproteináz 9 (MMP9)
Fibronectin	Neurocan
Integrin $\alpha$ 1 lánc	Rhamm (CD168, HMMR)
Integrin $\alpha$ 3 lánc	Syndecan-1
Integrin $\alpha$ 7 lánc	Tenascin-C
Integrin $\beta$ 1 lánc	Tenascin-R
Kollagén III, $\alpha$ 1 lánc	Versican

#### 4.1.3. KÜLÖNBÖZŐ PROGNÓZISÚ GLIOBLASTOMÁS MINTÁK ECM ÖSSZETÉTELÉNEK VIZSGÁLATA

Az ECM molekulák prognózisban betöltött szerepének vizsgálatához 26 GBM beteg mintáját választottuk ki. A mintákban 20 ECM alkotó mennyiségét mértük meg. (8. TÁBLÁZAT). A betegek ugyanabban a kezelési protokollban részesültek, azaz legalább subtotalis tumoreltávolítást követően Stupp protokoll szerinti konkurráló kemo-irradiációban részesültek, melyet temozolomide monoterápia követett. A kemoterápia mellett kialakuló progresszió esetén bevacizumab monoterápiában részesültek a betegek, mindaddig, amíg a beteg sátusa ezt lehetővé tette. A minták minden esetben az első műtét során eltávolított tumormasszából származtak. A betegek átlagéletkora  $58,69 \pm 8,01$  év volt (min: 43 év, max: 75 év). A betegek két csoportba soroltuk teljes túlélés (*overall survival*, OS) alapján, a 23 hónap vagy annál rövidebb teljes túléléssel rendelkező betegek alkották az egyik csoportot (A csoport, 12 fő), a 23 hónapnál hosszabb teljes túlélésű betegek a másik csoportot (B csoport, 14 fő). Az elválasztási paraméterként meghatározott 23 hónap alapja a szakirodalmi adatok mellett a saját beteganyagunkon tapasztalt átlagos teljes túlélési idő volt. A betegek klinikai adatait a 9. TÁBLÁZAT tartalmazza. A mintákat minden esetben neuropathológus értékelt a diagnózis megerősítése céljából, a gliális eredet igazolására GFAP, a megfelelő mennyiségű malignus sejt igazolására Ki-67 génexpresszió került meghatározásra.

#### 8. TÁBLÁZAT. Az ECM alkotók és a prognózis kapcsolatának vizsgálatában elemzett ECM alkotók listája

Brevican	Integrin, $\beta$ -1 lánc
Cadherin-N2	Laminin, $\alpha$ -4 lánc
EGFR (ErbB1)	Matrix metalloproteináz 2 (MMP2)
ErbB2	Mátrix metalloproteináz 9 (MMP9)
Fibronectin-1	Neurocan
Hmmr (CD168, RHAMM)	Syndecan-1
Integrin, $\alpha$ -1 lánc	Tenascin-C
Integrin, $\alpha$ -3 lánc	Tenascin-R
Integrin, $\alpha$ -7 lánc	Versican
Kollagen III, $\alpha$ -1 lánc	Laminin, $\beta$ -1 lánc

**9. TÁBLÁZAT. A különböző prognózisú betegek klinikai adatai.** Az átlagos életkort a diagnózis felállításának idején számítottunk, az átlagos tumorméret esetében a legnagyobb tumorátmérőt vettük figyelembe. A kiújulásig eltelt időt a tumoreltávolítástól az első MRI-vel igazolt tumorprogresszióig, a teljes túlélést pedig a beteg dokumentált haláláig számítottuk. A posztoperatív KPS-t minden esetben klinikai szakorvos állapította meg. (postop. – postoperatív, KPS – Karnofsky-index, PFS – progressziómentes túlélés, OS – teljes túlélés, front. – frontalis, temp. – temporalis, pariet. – parietalis, occipit. – occipitalis, cerebell.- cerebellaris, multilob. – többlebenyi elhelyezkedés.)

	ÁTLAGOS ÉLETKOR (ÉV)	ÁTLAGOS TUMOR-MÉRET (MM)	ÁTLAGOS. POSTOP. KPS	ÁTLAGOS PFS (HÓ)	ÁTLAGOS OS (HÓ)	OLDA-LISÁG (%)	LEBENYI ELHELYEZKEDÉS (%)	REOPERÁLT BETEGEK ARÁNYA (%)
<b>A CSOPORT (N=12)</b>	61,3 ±5,8	49,3 ±20,8	77,5 ±18,2	6,0 ±5,7	13,4 ±8,3	jobb: 33,3	Front: 25 Temp: 25 Pariet: 8,4 Occipit: 0 Cerebell: 0 Multilob: 41,6	58,33
<b>B CSOPORT (N=14)</b>	56,4 ±9,1	45,5 ±17,8	86,4 ±8,4	14,6 ±9,8	35,7 ±13,3	jobb: 35,7	Front: 42,9 Temp: 14,3 Pariet: 0 Occipit: 7,1 Cerebell: 7,1 Multilob: 28,6	85,71

#### 4.2. MRNS EXPRESSZIÓ MÉRÉSE

Az ECM alkotók transzkripciós szintjének leírása kvantitatív reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR) történt. A gyorsfagyasztott mintákat első lépésben szétzúztuk, majd TRI reagenst (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) használva homogenizáltuk. Ezt követően a TRI reagens lizátumból került izolálásra a teljes RNS a gyártó utasításainak megfelelően, majd NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies; Wilmington DE, USA) meghatározásra került az RNS mennyisége és tisztasága. A következő lépésben reverz transzkripcióval az RNS-ből egyszálú komplement DNS-t (cDNS) szintetizáltunk High-Capacity cDNA Archive Kit with RNasin (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA) használatával. A szintetizált cDNS-t ezután mikrofluid kártyára töltöttük oly módon, hogy adott komplement százból 100 ng RNS-ből származó cDNS legyen egy portban, hogy a TaqMan low-density array (TLDA) méréseket (Applied Biosystems 7900HT real-time PCR system with

Micro Fluidic Card upgrade; Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA) megfelelően lehessen elvégezni. A mikrofluid kártyákat SDS v.2.1 szoftverrel (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA) elemeztük relatív kvantifikáló mérésenként, meghatározva a ciklus küszöb értékeket ( $C_t$  érték).  $\beta$ -actin és glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) háztartási géneket használtunk belső standardként, a GAPDH gént továbbá referenciagénként használtuk a delta  $C_t$  értékek kiszámításához. A minták mRNS expressziójának összehasonlítását a  $dC_t$  értékek összehasonlításával végeztük el (comparative  $dC_t$  módszer).<sup>74</sup>

### **4.3. PROTEINEK SZINTJÉNEK MÉRÉSE**

Az ECM alkotók fehérje szintű expressziójának meghatározására tömegspektrométert használtunk. A mintákat első lépésben a mRNS expresszió meghatározásánál leírt módon homogenizáltuk, de ebben az esetben 50 mM Tris, 1mM EDTA, 17 mM  $\beta$ -merkaptotanol és 0,5% Triton-x100<sup>TM</sup> keverékből álló lízis puffert használtunk a minták lizálására. A fehérjék mennyiségét a Bradford módszerrel határoztuk meg, majd a fehérjékből azonos mennyiségűt használtunk tripszines emésztéshez.<sup>75</sup> A relatív fehérjemennyiség meghatározása az SRM módszerrel (*selected reaction monitoring*) történt.<sup>76-78</sup> A fehérjekoncentráció meghatározására az 500 cps jelintenzitású SRM spektrumok görbe alatti területeinek (AUC) kiszámítása alapján történt. Az adatok integrációja az Analyst v1.4.2 szoftver (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA) segítségével történt.

### **4.4. IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK**

Immunhisztokémiai vizsgálatot az IDH1 mutációs státusz és a Ki-67 protein expresszió vizsgálatára használtunk az ECM alkotók és a prognózis kapcsolatának vizsgálata során, a prognózis becslésével összefüggő markerek összehasonlítása érdekében. A mintákhoz tartozó formalinnal fixált, paraffinba ágyazott blokkokból készült 4 $\mu$ m vastagságú metszetek az R132H mutációra specifikus IDH1 egér monoklonális antitesttel (DIA H09) (Dianova; Hamburg, Németország), valamint Ki-67/MIB 1 egér monoklonális antitesttel (M7240) (Dako;

Glostrup, Dánia) kerültek megfestésre a gyártó utasításainak megfelelően, 1:50 (IDH1) és 1:200 (Ki-67) hígításban.

#### **4.5. STATISZTIKAI MÓDSZEREK**

A mérési eredmények, valamint a betegek klinikai adatai különböző statisztikai módszerekkel kerültek elemzésre. Az egyes ECM alkotók szintjének összehasonlítására esetén kétmintás t-próbát, illetve szignifikánsan különböző szórás esetén a Mann-Whitney próbát, 3 vagy több csoport esetén pedig egyirányú ANOVA-t használtuk. A teljes inváziós panel csoportok közötti összehasonlítása különböző statisztikai osztályozókkal (lineáris diszkriminancia analízis, legközelebbi szomszéd módszer, J48 pruned tree és locally weighted learning) történt. A betegek klinikai adatainak összehasonlítására kétmintás t-próbát vagy Mann-Whitney próbát, valamint  $\chi^2$ -próbát használtunk, a különböző prognózisú csoportok túlélésének vizsgálatára Kaplan-Meier túlélési analízis készült. A statisztikai osztályozók a Weka v3.6 program (University of Waikato, Hamilton, Új-Zéland) használatával, a többi statisztikai próba a GraphPad Prism v7.00 (GraphPad Software, La Jolla CA, USA) statisztikai programmal készült.

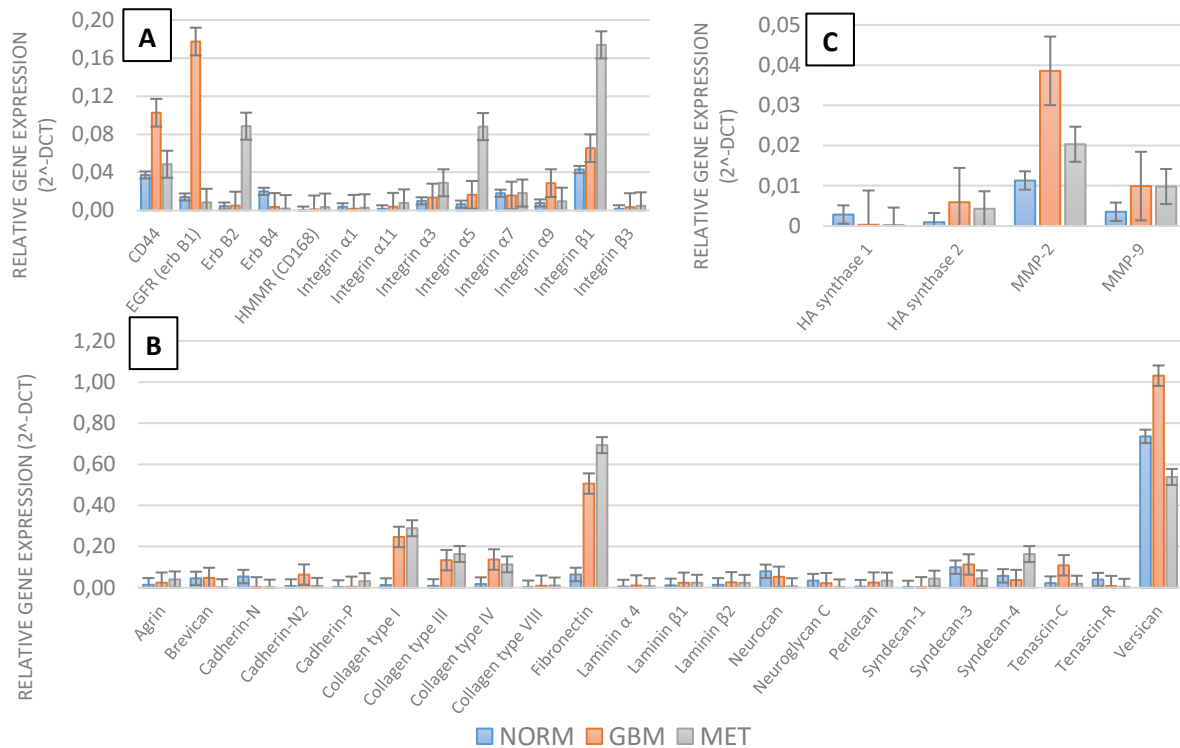
## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. PRIMER ÉS SZEKUNDER MALIGNUS AGYDAGANATOK ECM ÖSSZETÉTELÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

#### 6.1.1. MRNS EXPRESSZIÓ VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

Az ECM inváziós molekuláinak mennyisége jelentős mértékben eltér a nem tumoros és tumoros minták között (4. ÁBRA).

#### 4. ÁBRA. Az ECM alkotók átlagos expressziója glioblastoma, agyi metastasis és nem tumoros agymintákban. A: sejtfelszíni receptorok, B: receptorok liganjai, C: ECM enzimek

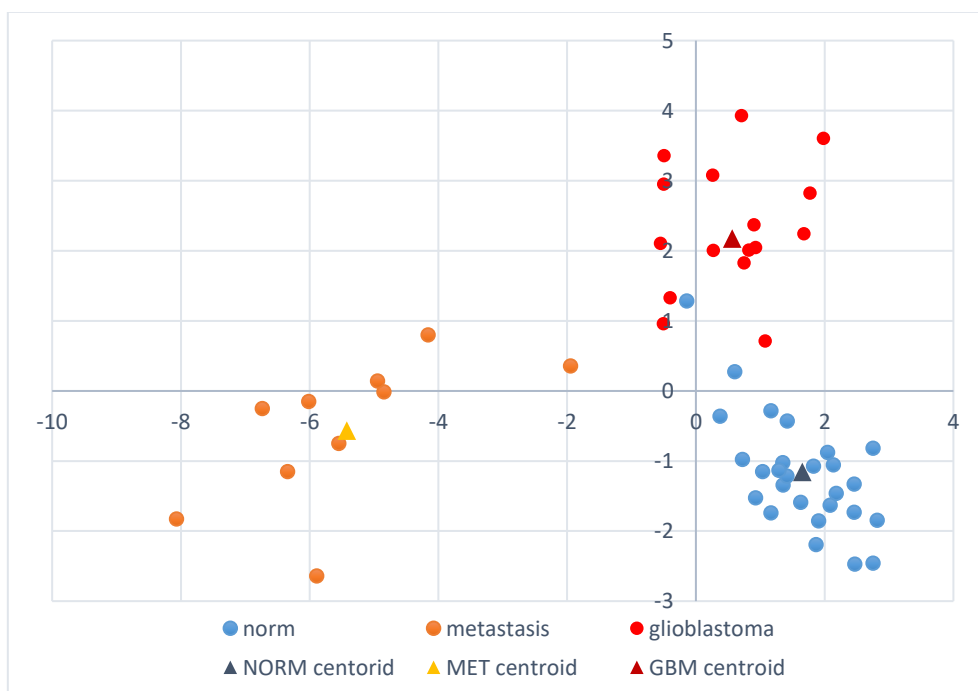


A nem tumoros agyszövet és GBM minták között szignifikánsan eltérő mennyiségben expresszáldott a CD44, cadherin-N, cadherin-N2, kollagén I  $\alpha$ 1, III  $\alpha$ 1, IV  $\alpha$ 1 és VI  $\alpha$ 1, EGFR, ErbB4, fibronectin, hyaluronan szintáz-1 és -2, HMMR (CD168), integrin- $\alpha$ 9, - $\beta$ 1 és - $\beta$ 3, laminin- $\alpha$ 4, - $\beta$ 1 és - $\beta$ 2, MMP-2 és -9, perlecan, tenascin-C és -R molekulák mRNS-e. A NSCLC agyi metastázisból származó mintákban az agrin, brevican, cadherin-N, cadherin-P, kollagén I  $\alpha$ 1, III  $\alpha$ 1, IV  $\alpha$ 1 és VI  $\alpha$ 1, ErbB4, fibronectin, hyaluronan szintáz-1, HMMR (CD168), integrin- $\alpha$ 5, - $\alpha$ 11, - $\beta$ 1 és - $\beta$ 3, laminin- $\beta$ 2, matrilin-2, neurocan, neuroglycan-C,

perlecan, syndecan-1 és -4, illetve tenascin-R molekulák mutattak szignifikánsan eltérő expressziót a nem tumoros agyi mintákhoz képest. A primer és szekunder agydaganatok nem csupán a normál agyszövetből térnek el jelentős mértékben, hanem egymástól is. Az agrin, brevican, CD44, cadherin-N2, cadherin-P, EGFR, integrin- $\alpha$ 5,  $\alpha$ -9 és  $\alpha$ -11, matrillin-1, MMP-9, neurocan, neuroglycan-C, syndecan-1, -3 és -4, illetve tenascin-C molekulák expressziós szintje tér el szignifikánsan a két eltérő eredetű tumortípusból származó mintákban. (4. ÁBRA)

A mRNS expressziós mintázat alapján a három csoport nagyon jól elkülöníthető egymástól statisztikai osztályozóval.(5. ÁBRA) A lineáris diszkriminancia analízis a cadherin-N, kollagén IV, ErbB2, hyaluronan szintáz-2, integrin  $\alpha$ 3, - $\alpha$ 5 és  $\alpha$ -9, MMP-9, illetve syndecan molekulák expressziós szintjét jelölte ki kulcsfontosságúnak az elkülönítés során. A módszer keresztvalidációt követően a minták 92,3%-át azonosította helyesen.

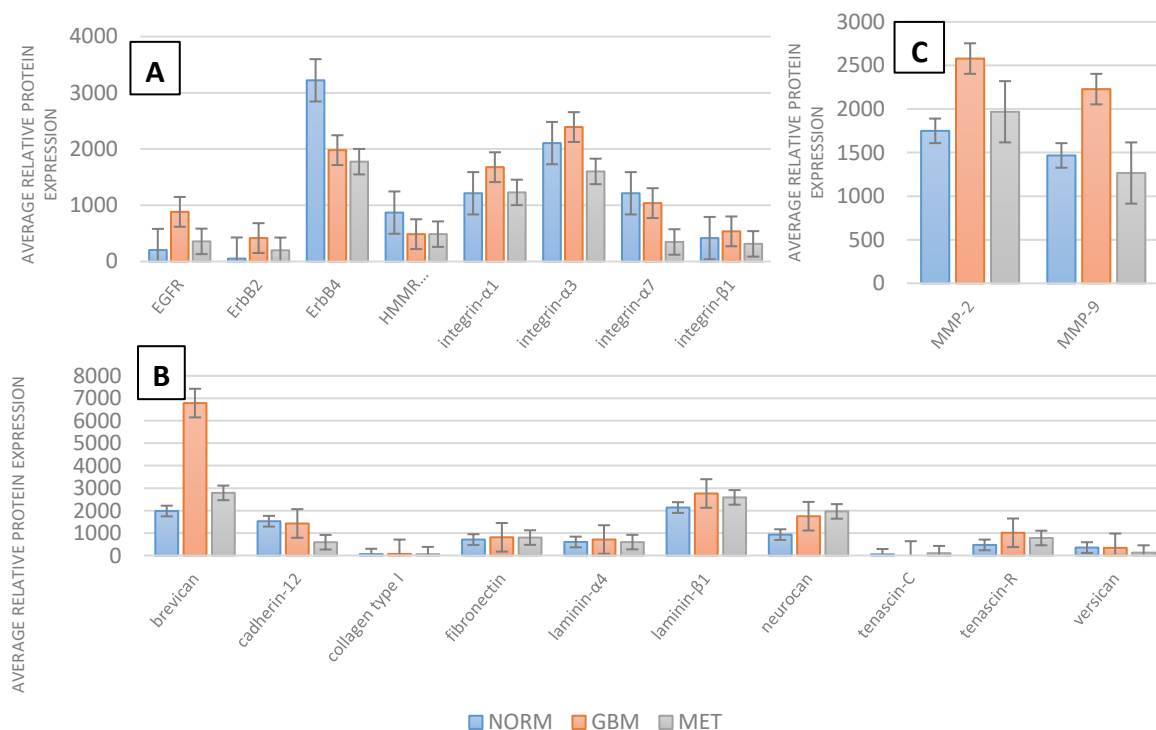
**5. ÁBRA Glioblastoma, nem kissejtes tüdőrák agyi metasztázis és nem tumoros minták inváziós sepktrum alapján történő elkülönítése statisztikai osztályozóval.** Az ábrán minden jelölő egy mintát reprezentál és helyzete az ECM alkotók mRNS mennyisége alapján a diszkrimináló függvény segítségével kiszámított standardizált kanonikus diszkriminancia együtthatóktól függ. A csoport centroidok az egyes szövettani csoportokba tartozó összes minta átlaga alapján kerültek kiszámításra.



### 6.1.2. FEHÉRJE EXPRESSZIÓS VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

A nem tumoros agyszövet és a GBM az EGFR, ErbB2, integrin-  $\beta$ 1, laminin- $\alpha$ 4 és - $\beta$ 1, MMP-2 és -9 molekulák szintjében tér el egymástól szignifikánsan. A metasztatikus minták csupán az integrin-  $\alpha$ 7 szintjében tértek el a nem tumoros agyszövettől. A primer és szekunder agytumorkok pedig az integrin-  $\alpha$ 7 és -  $\beta$ 1, MMP-9 és neurocan fehérjék szintjében tértek el egymástól szignifikánsan. (6. ÁBRA) A proteinexpressziós vizsgálatok részben megerősítik a mRNS expressziós mérések eredményeit (10. TÁBLÁZAT, 7. ÁBRA). A fehérjék expressziója alapján képezett inváziós spektrumokat is alávettük osztályozó algoritmusok által történő elemzésnek. A minták 84,7%-át azonosította helyesen az osztályozó. (11. TÁBLÁZAT) Kulcsmolekulaként az Erb-B1, Erb-B3, integrin- $\alpha$ 2, - $\alpha$ 3 és - $\beta$ 1, laminin- $\alpha$ 1 és - $\alpha$ 4, MMP-2 és MMP-9, valamint tenascin-R fehérjéket jelölte ki az osztályozó.

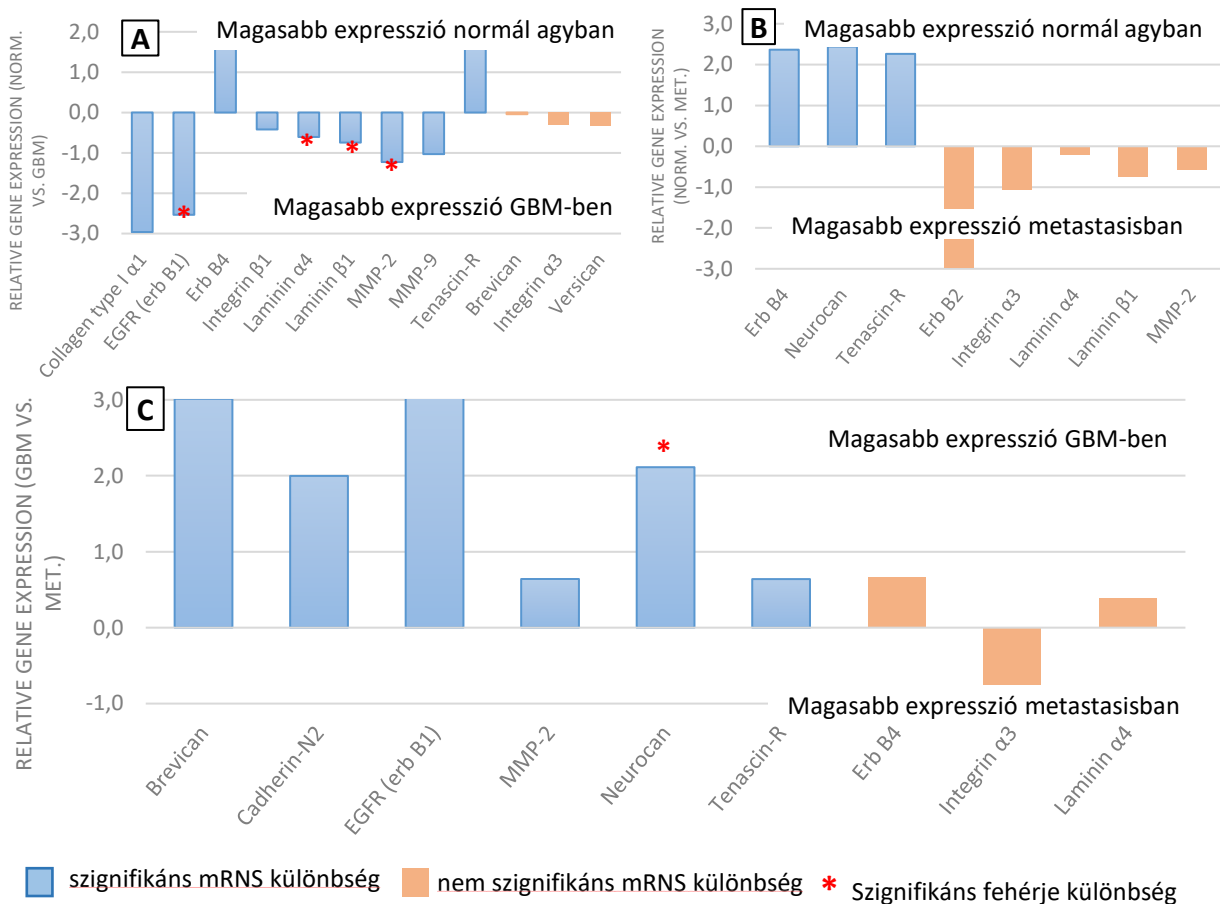
### 6. ÁBRA Az ECM molekulák fehérje mennyisége glioblastoma, agyi metastasis és normal agyszövet mintákban. A: sejtfelszíni receptorok, B: receptor ligandjai, C: ECM enzimek



**10. TÁBLÁZAT A vizsgálat során az mRNS és fehérje vizsgálat között konkordáns változásokat mutató ECM alkotók.** A nyilak az összehasonlítás második tagjában az átlagos expressziós szintet jelzik az első taghoz képest; \*  $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

ECM alkotó	Összehasonlított csoport	A változás iránya	A különbség szignifikanciaszintje
brevican	nem tumoros vs. GBM	↑	nem szignifikáns
	GBM vs. met	↓	mRNS: **
cadherin-N2	GBM vs. metastasis	↑	mRNS: ****
kollagén I, $\alpha 1$	nem tumoros vs. GBM	↑	mRNS: *
EGFR	nem tumoros vs. GBM	↑	mRNS: *, protein: ***
	GBM vs. metastasis	↓	mRNS: *
ErbB2	nem tumoros vs. GBM	↑	protein: ***
	nem tumoros vs. met	↑	nem szignifikáns
ErbB4	nem tumoros vs. GBM	↓	mRNS: ****
	nem tumoros vs. met	↓	mRNS: ****
	GBM vs. metastasis	↓	nem szignifikáns
integrin $\alpha$ -3	nem tumoros vs. GBM	↑	nem szignifikáns
integrin $\beta$ -1	nem tumoros vs. GBM	↑	mRNS: ***, protein: **
laminin $\alpha$ -4	nem tumoros vs. GBM	↑	mRNS: **, protein: *
	nem tumoros vs. metastasis	↑	nem szignifikáns
	GBM vs. metastasis	↓	nem szignifikáns
laminin $\beta$ -1	nem tumoros vs. GBM	↑	mRNS: *, protein: *
	nem tumoros vs. metastasis	↑	nem szignifikáns
MMP-2	nem tumoros vs. GBM	↑	mRNS: ***, protein: **
	nem tumoros vs. met	↑	nem szignifikáns
	GBM vs. met	↓	mRNS: *
MMP-9	nem tumoros vs. GBM	↑	mRNS: ***, protein: **
	GBM vs. metastasis	↓	protein: **
neurocan	nem tumoros vs. metastasis	↓	mRNS: **
	GBM vs. metastasis	↓	mRNS: *, protein: **
tenascin-R	nem tumoros vs. GBM	↓	mRNS: ***
	nem tumoros vs. met	↓	mRNS: ***
versican	nem tumoros vs. GBM	↑	nem szignifikáns

**7. ÁBRA. A konkordáns mRNS és fehérje expressziós változásokat mutató ECM alkotók átlagos mennyiségeinek különbségei az egyes csoportok között.**



**11. TÁBLÁZAT. Glioblastoma, agyi metastasis és normál agyszöveti minták elkülönítése a fehérje inváziós spektrum alapján. A minták nagyon jól elkülönülnek egymástól inváziós spektrum alapján, a módszer pozitív prediktív értéke és szenzitivitása, valamint egyéb klinikai megbízhatóságot mérő értékei bizonyítják az inváziós spektrum szövettani csoportra karakterisztikus jellegét.**

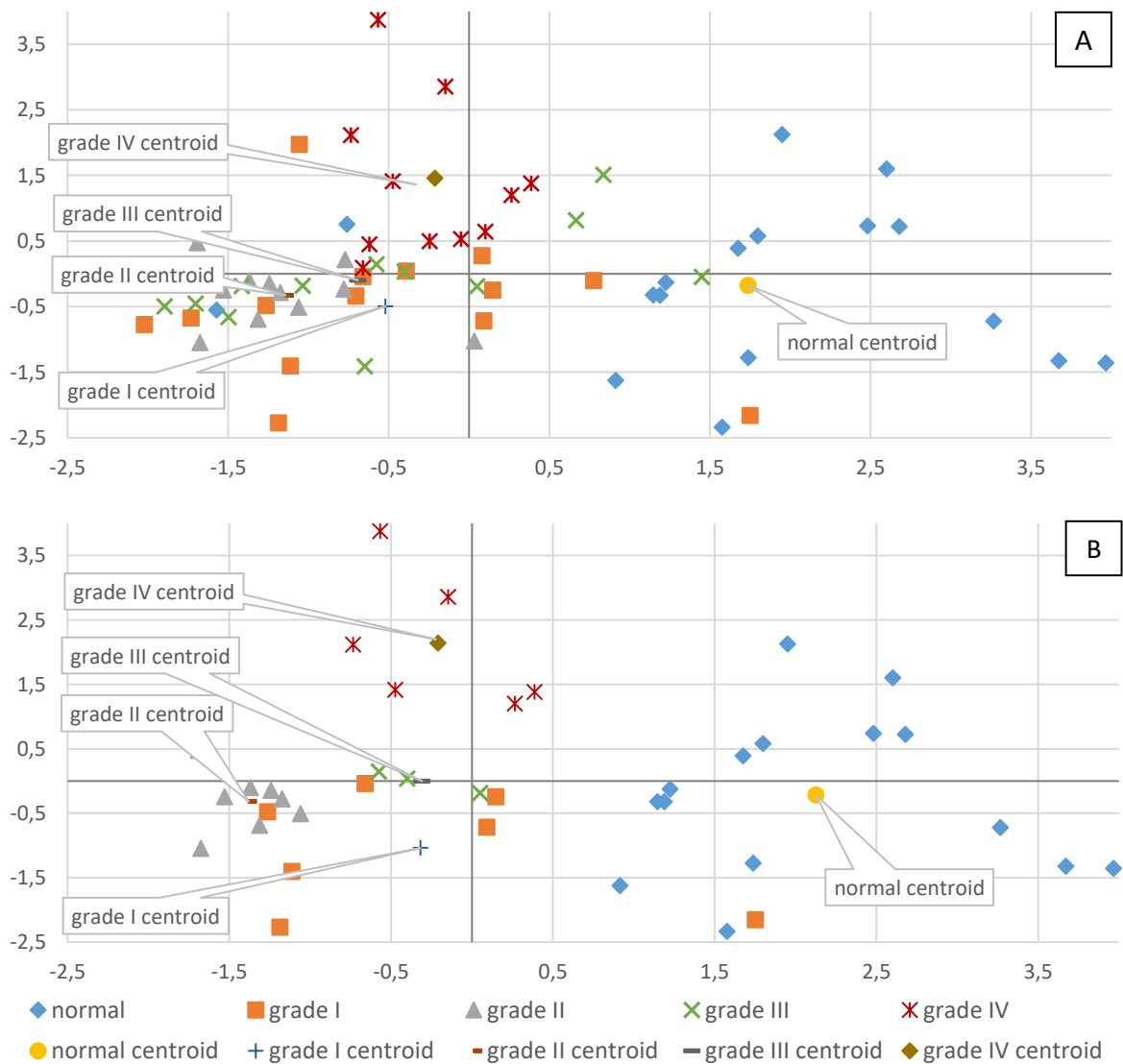
	Helyesen azonosított esetek		Szenzitivitás	ROC érték	F1 érték	Pozitív prediktív érték
	No.	%				
nem tumoros agyszövet	35/36	0.972	0,972	0,964	0,946	0,921
glioblastoma	18/24	75	0,75	0,856	0,766	0,783
metastasis	8/12	66,7	0,667	0,835	0,696	0,727
súlyozott átlag	61/72	84,71	0,847	0,906	0,844	0,843

## **6.2. KÜLÖNBÖZŐ GRÁDUSÚ ASTROCYTOMÁK ECM ÖSSZETÉTELÉNEK VIZSGÁLATA**

### *6.2.1. MRNS EXPRESSZIÓ VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI*

Az extracelluláris mátrix invázióban szerepet játszó alkotóinak mennyisége egy-egy molekula expressziós szintjét vizsgálva különböző grádusú astrocytomákban nem mutatott statisztikailag igazolható eltérést. Az inváziós panel molekuláinak expressziós mintázata – azaz az inváziós spektrum – azonban mutat jellegzetes különbségeket az egyes grádusok között. Az egyes grádusok expressziós mintázata kellően nagy eltéréseket mutat ahhoz, hogy az alapján a grádusok elkülöníthetők legyenek egymástól lineáris diszkriminancia analízissel (LDA). Különösen eltérő a nem tumoros agyszövet expressziós mintázata az astrocytoma mintákétól, valamint az astrocytomákon belül a glioblastoma inváziós spektruma mutat jelentős eltérést. (8. ÁBRA) Az LDA az elkülönítés során kulcsmolekulaként jelölte ki az alábbi molekulákat, melyek szintje leginkább befolyásolja az egyes csoportok elkülönítését: brevican, cadherin-N2, fibronectin és integrin  $\beta 1$ . Két szomszédos grádushoz tartozó mintákból alkotott csoport között elvégzett LDA az alcsoportok jobb elkülönítésére adott lehetőséget a módszer sajátosságaiból fakadóan. (9. ÁBRA) E kéts csoportos LDA-k további kulcsmolekulákat jelöltek ki, amelyek a „szomszédos” szövettani alcsoportok közötti fő különbségekre mutatnak rá. A mRNS expressziós mintázat alapján az LDA besorolta az egyes tumormintákat valamelyik vizsgálati csoportba is. Az összes vizsgált csoport (nem tumoros agy és WHO grade I-II-III-IV astrocytoma) esetén ez az azonosítási folyamat 50,8 %-os hatásfokú volt, a kéts csoportos analízisek azonban mind 80% fölötti hatékonysággal dolgoztak. Mindez a statisztikai osztályozók általános sajátosságából fakad, ahol besorolandó csoportok száma a hatásfokot minden esetben rontja. A kijelölt kulcsmolekulák, melyek expressziós értékei leginkább befolyásolják a diszkrimináló függvény együtthatóját, és az egyes LDA-k hatásfoka a 12. TÁBLÁZATBAN található.

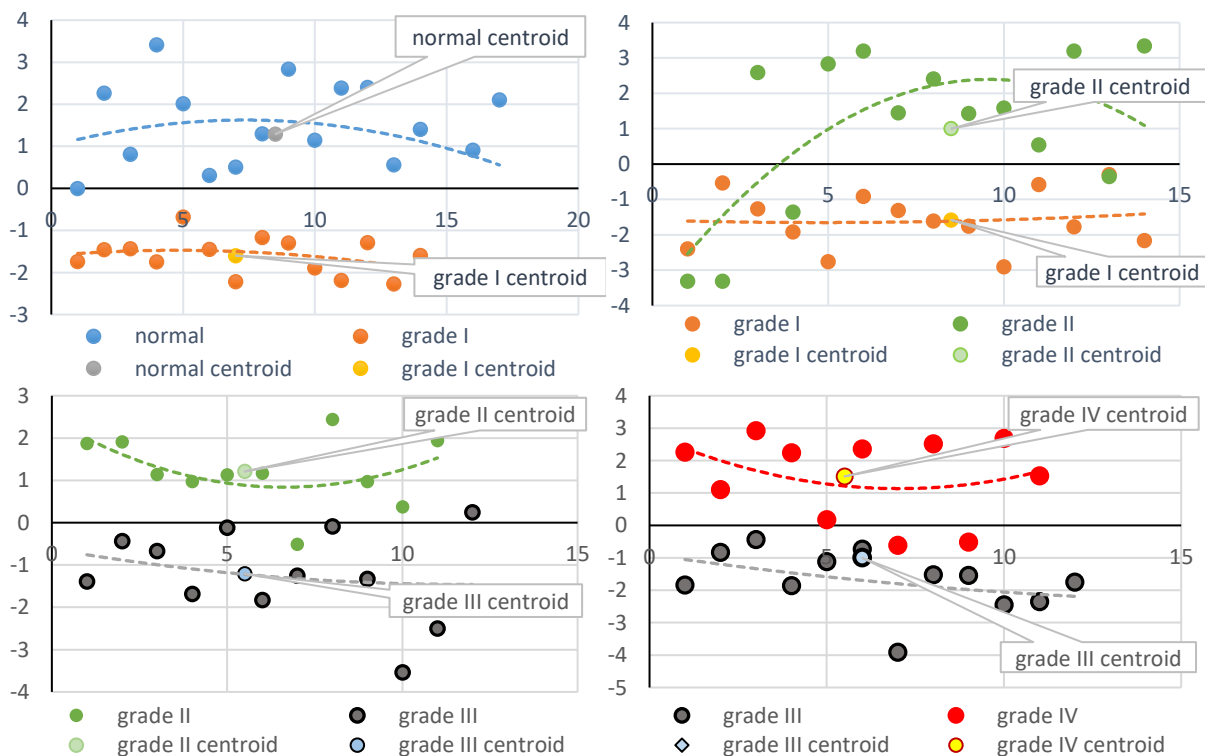
**8. ÁBRA A különböző grádusú astrocytoma minták elkülönítése lineáris diszkriminancia analízis segítségével az invázióban szerepet játszó ECM alkotók expressziós mintázata alapján.** Az x és y tengelyeken az egyes ECM alkotók mennyisége (mint vizsgált változó) alapján elkészített diszkrimináló függvényben szereplő standardizált kanonikus diszkriminancia együtthatók szerepelnek, melyek alapján a diszkriminálófüggvény elkülöníti az egyes mintákat. Az ábrán egy jelölő egy mintának felel meg és a teljes expressziós mintázat figyelembevételével készült diszkriminálófüggvény alapján került elhelyezésre a koordináta rendszerben. A centroid értékek az egyes együtthatók átlagos értékéből lettek számítva. A tumoros és nem tumoros minták centroidjai az y tengely különböző oldalán foglalnak helyet. A különböző grádusú astrocytoma mintákhoz tartozó centroidok az y tengely mentén a grádus szerint növekvő sorrendben találhatóak meg. Ezen megfigyelhető jellegzetességek is utalnak arra, hogy az ECM expressziós mintázata korrelál a grádussal. A ábra: az összes minta, B ábra: helyesen azonosított minták



**12. TÁBÁZAT A grádus és az ECM összetétele közötti kapcsolatot vizsgálata során végzett mRNS expressziós adatokkal végzett LDA által kijelölt kulcsmolekulák, valamint az LDA hatásfoka.** Az LDA kiválóan elkülöníti a nem tumoros és tumoros agyszövetet, valamint a nem infiltratív grade I astrocytomát és az infiltratív növekvő grade II astrocytomát. Megfelelő hatásfokkal tesz különbséget a szomszédos grádusú diffúz növekedést mutató astrocytomák között, de ez az előbbiektől kevéssel elmarad. Az alacsony és magas grádusú astrocytomák is jól elválaszthatóak az mRNS inváziós spektrum alapján LDA-val.

non-tumor vs. A I	A I vs. A II	A II vs. A III	A III vs. GBM	low grade vs. high grade
integrin $\beta$ 1 laminin $\alpha$ 4 tenascin C tenascin R	integrin $\alpha$ 3 integrin $\alpha$ 7 integrin $\beta$ 1 laminin $\alpha$ 4 MMP2 tenascin R versican	cadherin N2 ErbB2 neurocan syndecan 1 versican	brevican cadherin N2 fibronectin laminin $\beta$ 1 neurocan tenascin	brevican ErbB2 fibronectin ingerin $\beta$ 1 versican
Az elkülönítés hatásfoka				
96%	89,3%	82,6%	82,6%	78,9%

**9. ÁBRA. Az ECM expressziós mintázatán alapuló kétcsoportos lineáris diszkriminancia analízisek grafikus eredményei.** A grafikonon egy jelölő egy mintát reprezentál, az y tengelyen jelenik meg a diszkrimináló függvényhez használt standardizált kanonikus diszkriminancia együttható értéke, mely jelentős eltérést mutat a különböző grádusba tartozó minták között. Az együtthatók értéke alapján képezett trendvonalak jól mutatják ezt az eltérést.



### 6.2.2. FEHÉRJE EXPRESSZIÓ VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

A fehérje expressziós vizsgálatok egy-egy molekula expressziós szintjében szintén nem mutattak statisztikailag igazolható különbséget csoportok közötti eltéréseket vizsgálva. Az expressziós mintázat azonban itt is különbözött, a lineáris diszkriminancia analízis az inváziós panel molekuláinak expressziója alapján képezett inváziós spektrum alapján, az mRNS inváziós spektrumhoz hasonlóan, képes volt elkülöníteni az egyes csoportokat. Az összes csoport LDA elemzése 79,2%-os hatékonysággal sorolta a mintákat a megfelelő csoportba, a legfontosabb molekulák pedig a brevican, ErbB2, fibronectin, HMMR (CD168), integrin  $\alpha 1$ , laminin  $\alpha 4$ , laminin  $\beta 1$ , MMP-2, MMP-9 és syndecan voltak. A grade III minták proteomikai mérése nem elfogadható mérési eredményekkel zárult, így ez a grádus az LDA-ból kimaradt. Emiatt a teljes mintán végzett LDA eredményei némileg korlátozottak. A kétszoportos LDA-k azonban kiválóan működtek, minden esetben legalább az mRNS inváziós spektrum hatékonyságával működött az elkülönítés és csoportazonosítás A 13. táblázat az azonosított kulcsmolekulákat és az azonosítás hatékonyságát mutatja.

**13. TÁBLÁZAT A grádus és az inváziós spektrum kapcsolatát vizsgáló LDA által azonosított kulcsmolekulák és az azonosítás határfoka.** A dőlt betűvel szedett ECM alkotók az mRNS inváziós spektrumok analízise során is kulcsmolekulaként kerültek azonosításra ugyanabban a kategóriában. Ezen ECM alkotók kulcsszerepe a konkordáns eredmények tükrében igen valószínű.

<b>non-tumor vs. A I</b>	<b>A I vs. A II</b>	<b>low grade vs. GBM</b>
RHAMM (CD168) integrin $\alpha 1$ <i>laminin <math>\alpha 4</math></i> laminin $\beta 1$ MMP2	RHAMM (CD168) kollagen III, $\alpha 1$ <i>integrin <math>\beta 1</math></i> laminin $\beta 1$	RHAMM (CD168) integrin $\alpha 1$ MMP2
<b>Az azonosítás határfoka</b>		
95,8%	100%	86,1%

### **6.3. ELTÉRŐ PROGNÓZISÚ GRADE IV ASTROCYTOMA (GLIOBLASTOMA) MINTÁK ECM ÖSSZETÉTELÉNEK VIZSGÁLATA**

#### *6.3.1. A MINTÁKAT ADÓ BETEGEK KLINIKAI PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATI EREDMÉNYEI*

A betegek progressziómentes túlélése (PFS) a rosszabb betegségkimenetellel rendelkező A csoportban  $6,0 \pm 5,7$  hónap volt, míg a PFS a jobb prognózisú B csoportban  $14,6 \pm 9,8$  hónapnak adódott. A teljes átlagos túlélés (OS) az A csoportban  $13,4 \pm 8,3$  hónap, míg a B csoportban  $35,7 \pm 13,3$  hónap volt. Mind a PFS, mind az OS szignifikánsan különbözött a két csoport között (PFS  $p=0,04$ , OS  $p<0,001$ ). A betegek átlagéletkora nem különbözött szignifikánsan a két csoportban ( $61,3 \pm 5,88$  vs.  $56,43 \pm 9,06$  év,  $p=0,12$ ). A betegek homogenitásvizsgálata nem tárt fel szignifikáns különbséget a tumor lebenyi elhelyezkedése vagy oldalisága tekintetében ( $p=0,52$ , illetve  $p=0,92$ ). A tumorok átlagos mérete is hasonlóan bizonyult ( $49,3 \pm 20,8$  vs.  $43,53 \pm 17,7$  mm,  $p=0,42$ ). A kiújulás miatti reoperációk aránya sem tért el egymástól a két csoportban statisztikailag igazolható mértékben ( $7/12$  vs.  $12/14$ ,  $p=0,13$ ). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a két csoportban a betegek nem különböztek egymástól, az egyetlen különbség az elválasztási paraméterként meghatározott túlélési adatokban volt, melyeket a klinikai tényezők különbségei nem magyarázhatnak.

#### *6.3.2. IMMUNHISZTOKÉMIA*

Az IDH1 mutáció, mint kedvező prognózissal kapcsolt marker meghatározása során az A csoportban az IDH mutáns esetek aránya 25%, a B csoportban 28,5% volt. Az IDH mutáns tumorok aránya a két csoportban nem különbözik egymástól ( $p=0,84$ ). A Ki-67/MIB festődési index (LI) szintén meghatározásra került. Az A csoportban az LI  $12,5 \pm 6,09$  volt, a B csoportban pedig  $18,61 \pm 15,11$ . A Ki-67/MIB festődési index különbözőségei nem mutattak szignifikáns különbséget ( $p=0,20$ ).

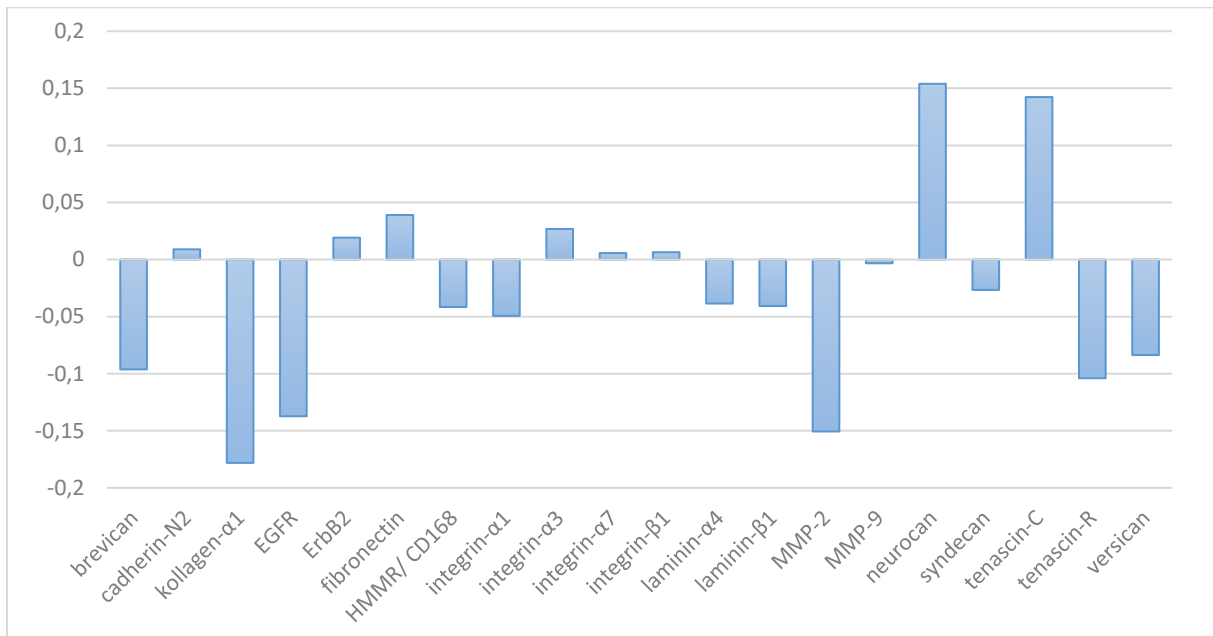
### 6.3.3. MRNS EXPRESSZIÓ VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

A mintákban a 20 vizsgált ECM alkotó mennyisége nem mutatott szignifikáns különbségeket, egy-egy molekulát egyedül vizsgálva. Bizonyos molekulák esetében jelentősebb különbségek voltak (pl. brevican, kollagén III, EGFR, MMP-2, neurocan, tenascin-C, 10. ÁBRA), de statisztikailag ez a különbség nem volt igazolható. Ugyanakkor ezek az egyéni szinten kis különbségek összeadódva egy statisztikailag is jelentős különbséget eredményeznek. Ennek bizonyítéka, hogy osztályozó algoritmussal (J48 pruned tree) vizsgálva az inváziós panel molekuláinak expressziós mintázatát, azaz az inváziós spektrumot, a két prognosztikai csoport mintái az inváziós spektrum eredményei alapján elkülöníthetőek. (14. TÁBLÁZAT) A módszer a minták 84,6%-át sorolta helyes prognózisú csoportba, eredményesebb volt a jobb túlélésű betegek esetében, ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a pozitív prediktív érték magasabb (0,9) a rosszabb prognózisú csoport esetében, ami klinikai szempontból fontos. Az osztályozó a brevican és az integrin- $\beta$ 1 molekulák mennyiségét határozta meg a prognózist leginkább befolyásoló inváziós molekulának, és az osztályozó által használt döntési fa első döntése az integrin- $\beta$ 1 lánc mennyiségétől függött, így ennek szerepe jelentősebb.

**14. TÁBLÁZAT A különböző prognózisú betegekből származó minták elkülönítése statisztikai osztályozóval.** A módszer szenzitivitása kiemelkedő a jobb túlélésű csoportra, ugyanakkor a pozitív prediktív értéke magasabb a rosszabb prognózisú csoportban. A ROC és F1 értékek kellően magasak ahhoz, hogy a teszt klinikai szempontból használható legyen.

	Helyesen azonosított esetek		Szenzitivitás	ROC érték	F1 érték	Pozitív prediktív érték
	No.	%				
<b>A csoport</b>	9/12	75,0%	0,75	0,775	0,818	0,90
<b>B csoport</b>	13/14	92,8%	0,92	0,775	0,875	0,82
<b>Súlyozott átlag</b>	22/26	84,6%	0,84	0,775	0,85	0,85

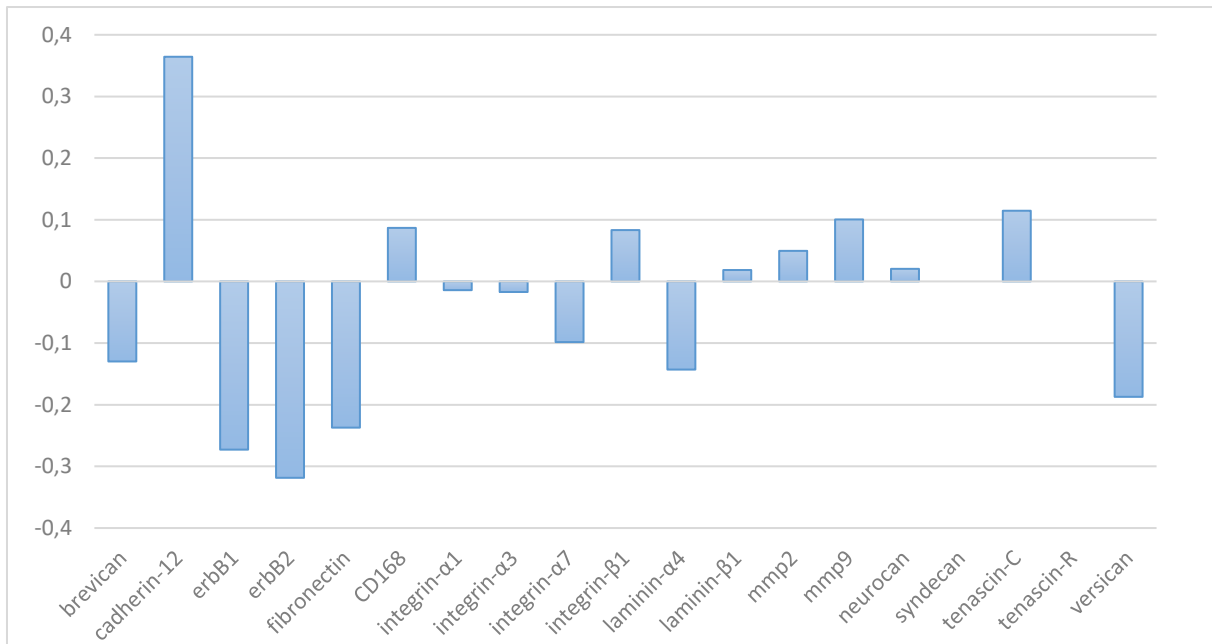
**10. ÁBRA A különböző prognózisú GBM csoportokban eltérő az ECM inváziós molekuláinak szintje.** Az ábrán az adott molekula expressziós szintjének hányadosai láthatóak, az értékek természetes alapú logaritmusát megjelenítve:  $\ln(\text{B csoport expresszió}/\text{A csoport expresszió})$ . A pozitív értékek így azokat a molekulákat jelölik, amelyek a jobb prognózisú B csoportban expresszálódnak magasabb szinten, míg a negatív értékek a rosszabb prognózisú A csoportban vannak jelen nagyobb mennyiségben.



#### 6.3.4. FEHÉRJE EXPRESSZIÓ VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

Az inváziós panelben található molekulák fehérje szintű expressziójának vizsgálata az mRNS eredményekhez hasonló eredményeket hozott. A fehérjék mennyisége egy-egy ECM alkotó esetében nem volt szignifikáns, azonban az expressziós mintázat itt is jellegzetes eltéréseket mutatott. (11. ÁBRA). A brevican, EGFR és tenascin-C itt is jelentősebb eltérést mutatott, és az mRNS eredményekkel konkordáns volt a változás iránya. A cadherin-N2, valamint a laminin- $\alpha$ 4 és - $\beta$ 1 különbség szintén jelentős volt, de mRNS szinten ezek a különbségek nem jelentek meg ilyen mértékben. A protein inváziós spektrum alapján az osztályozó képes volt a mintákat jó hatásfokkal elkülöníteni (15. TÁBLÁZAT). Az összes minta 85,7%-át sorolta helyes csoportba, a pozitív prediktív érték ez esetben is az A csoport esetében, a szenzitivitás pedig a B csoport esetében volt magasabb.

**11. ÁBRA A fehérje inváziós spektrum különbségei különböző prognózisú GBM betegek tumormintáiban.** Az oszlopok az egyes ECM alkotók csoportonkénti átlagos mennyiségének hányadosát reprezentálják, a hányados természetes alapú logaritmusaként. A pozitív értékek így magasabb expressziót jelentenek a jobb túlélésű B csoportban, a negatív értékek pedig a rosszabb túlélésű A csoportban.



**15. TÁBLÁZAT. A különböző prognózisú GBM tumorminták inváziós spektrumának statisztikai osztályozóval történő csoportosításának eredménye.** A protein inváziós spektrum ROC és F1 értékei jobbak a mRNS inváziós spektrum alapján végzett csoportosítás megfelelő értékeinél. A szenzitivitás és a pozitív prediktív érték az mRNS vizsgálati eredményekhez hasonló tendenciákat mutat.

	Helyesen azonosított esetek		Szenzitivitás	ROC érték	F1 érték	Pozitív prediktív érték
	No.	%				
<b>A csoport</b>	6/8	75%	0,75	0,854	0,857	1
<b>B csoport</b>	6/6	100%	1	0,854	0,857	0,75
<b>Súlyozott átlag</b>	12/14	85,7%	0,857	0,854	0,857	0,893

## 7. MEGBESZÉLÉS

Az astrocytomák a központi idegrendszer leggyakoribb malignus daganatai. A betegek ellátása kihívást jelent az ellátó orvosi team számára, melynek oka, a daganatok alacsony sugár- és kemoszenzitivitásán túl a tumorsejtek inváziós képessége.<sup>5,23,40,42</sup> Ez az inváziós képesség és diffúz növekedési hajlam olyannyira fontos, hogy a legújabb WHO klasszifikációban az astrocytomákat (és a hozzájuk sok tekintetben hasonló oligodendrogliomákat) elsődlegesen már nem a kiindulási sejttípus, hanem a növekedési jelleg alapján csoportosítjuk.<sup>1,29</sup> Az astrocytomák peritumorális infiltrációját övező kutatások egyik központi eleme az extracelluláris mátrix. Az ECM molekuláinak, valamint az ECM alkotókkal kapcsolatos teremtő sejtfelszíni receptorok mennyiségi-minőségi változásai jól ismertek egyéb daganatok esetében, és egyre több információval rendelkezünk a témában a gliómákat illetően is.<sup>11,63,67,69,79-81</sup> Jelen tudományos értekezés célja a glióma ECM inváziós molekuláinak vizsgálata volt, annak érdekében, hogy jobban megértsük, mi áll az astrocytomák, különösen a magas grádusú astrocytomák igen jelentős inváziós potenciáljának hátterében. Az ECM inváziós molekuláinak (azaz az inváziós panelnek) mRNS és fehérje szintű kifejeződését, expressziós mintázatát (azaz az egyes tumorok inváziós spektrumát) tanulmányozva arra a kérdésre kereste kutatásunk a választ, hogy az ECM hogyan változik astrocytomákban, léteznek-e olyan molekulák, amelyek „felelőssé tehető” a gliómák inváziós képességéért, mi magyarázza az alacsony és magas grádusú gliómák esetében az inváziós potenciál mértékének különbségét. Felmerült a kérdés, hogy vajon az inváziós spektrum, azon túl, hogy leírja az ECM összetételét, használható-e valamire a klinikai gyakorlatban, összefügg-e például a szövettani diagnózissal vagy a betegek prognózisával. Ezen kérdések vizsgálatához WHO grade I-II-III-IV astrocytoma mintákat, agyi áttétekből származó mintákat és nem tumoros agyszöveti kontrollmintákat elemeztünk a molekuláris biológia módszereivel.

## **7.1. A PRIMER ÉS SZEKUNDER MALIGNUS AGYDAGANATOK INVÁZIÓS SPEKTRUMA MARKÁNSAN ELTÉR EGYMÁSTÓL**

Eredményeink alapján jól látható, hogy az extracelluláris mátrix összetétele, különösen az inváziós molekulák mennyisége, nem elsősorban a malignitás mértékének függvénye, bár azzal természetesen összefüggést mutat. Az egyaránt malignus, de eltérő eredetű KIR daganatokban jelentősen eltérő összetételűnek bizonyult az ECM, és ez a tumoros ECM jelentős mértékben különbözik a nem tumoros agyszövetben találhatóétól. A glioblastomás és metastasis minták egyaránt 24-24, összesen 34 ECM alkotó mennyiségében különböztek szignifikáns mértékben mRNS szinten a normál agytól. A GBM mintákban kilenc olyan ECM molekula volt, amelyben a megváltozott és szignifikánsan eltérő mRNS szintet a fehérje expresszió kongruens változása követte, négy esetben (EGFR, laminin- $\alpha$ 4, - $\beta$ 1, MMP-2) ráadásul a fehérjeszint változás is szignifikáns volt. A metastasis minták esetében a szignifikáns mRNS különbséget három esetben követte azonos irányú fehérjeszint változás. A GBM és metastasis minták mRNS inváziós spektruma 17 molekula mennyiségében tért el szignifikánsan, ezt hat esetben követte azonos irányú fehérje expressziós változás, mely egy (neurocan) esetben volt szignifikáns is.

(10. TÁBLÁZAT, 7. ÁBRA) Önmagában az a tény, hogy a tumoros, és nem tumoros agyszövet extracelluláris mátrixa különbözik, nem meglepő, azonban jól látszik az, hogy a metastasis és a glioblastoma minták más-más ECM alkotók tekintetében térnek el a nem tumoros agyszövettől. Továbbá eredményeinkből látszik, hogy az egyaránt malignus primer és szekunder agydaganatok inváziós spektruma is jelentősen eltérő. Mind a mátrixhoz való kapcsolódás molekulái és ezek extracelluláris receptorai, mind a mátrix molekulákat egymáshoz kötő glikoproteinek mennyiségében van különbség. A különbségek annyira jellegzetesek, hogy csak az inváziós spektrum alapján, a szövettani kép ismerete nélkül sikerült azonosítani a minták szövettani csoportját. Ezek az ECM összetételbeli különbségek feltehetőleg összefüggésben állnak azzal a jól ismert tapasztalati ténnyel, hogy az agyi áttétek

jól elhatárolódnak a környező agyállománytól, míg a glioblastoma nem rendelkezik éles határvonallal, erősen beszűri a peritumorális agyszövetet.

## **7.2. AZ AZONOS SZÖVETTANI CSOPORTBA TARTOZÓ, DE ELTÉRŐ GRÁDUSÚ ASTROCYTÓMÁK ECM ALKOTÓINAK EXPRESSZIÓS MINTÁZATA JELLEGZETES KÜLÖNBSÉGEKET MUTAT**

Nem ennyire markáns az ECM összetételében megfigyelhető különbség azonos szövettani csoportba (astrocytoma) tartozó, de eltérő grádusú tumorok esetében. Az inváziós panel molekuláinak mennyisége eltérő ugyan, a különbségek azonban statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak az egyes grádusokból képezett csoportok között. Ez összhangban áll azzal a szemlélettel, mely szerint az astrocytomák, különösen az infiltratív növekedést mutató astrocytomák egy egyfajta spektrumon elhelyezkedő entitások, melynek egyik végpontja a glioblastoma, másik végpontja a diffúz astrocytoma, és valahol külön helyezkedik el, a nem infiltratív növekedésű pilocytás astrocytoma.<sup>82</sup> Az egyes astrocytomák (pusztán) szövettani kép alapján történő elválasztása ma már nem is elfogadott, mindenképpen szükséges az IDH státusz meghatározása is. A szövettani kép, a molekuláris vizsgálatok és a prognózis kapcsolatát jól jelzi, hogy az IDH mutáns és IDH vad típusú grade II és III astrocytomák esetében az IDH státusz, és nem a WHO grádus a meghatározó a túlélés szempontjából, tehát az IDH mutáns WHO grade II és III astrocytoma túlélése (és a betegek átlagos életkora is) közel azonos. Ugyanez igaz a vad típus esetén is, és hasonló tendencia figyelhető meg anaplasticus astrocytoma és glioblastoma esetében is.<sup>30,32,44</sup> A különböző grádusokba tartozó minták esetében, az összes csoportot egyszerre vizsgálva tehát az egyes ECM alkotók nem térnek el egymástól mennyiségileg jelentősen, az expressziós mintázat azonban már statisztikailag is igazolható különbségeket mutat. Úgy tűnik, az egyedi molekulák statisztikai küszöbértéket nem meghaladó különbségei összeadódnak, és az inváziós spektrumot, mint az egész mintára jellemző változót vizsgálva már nem elhanyagolhatók az ECM alkotók mennyiségi-minőségi

különbségei. A „szomszédos” csoportokba tartozó minták nagyon jó hatásfokkal különíthetők el az inváziós spektrum alapján, ráadásul a lineáris diszkriminancia analízis kijelöl bizonyos kulcsmolekulákat is. Nem feltétlenül e molekulák különbsége a legjelentősebb az egyes csoportok között, de a teljes mintázatot elemezve e molekulák különbségei a leginkább döntőek a minták elválasztása során. A kulcsmolekulák között integrinek és a hozzájuk kötődő lamininek, fibronectin mellett a mátrix alkotóit egymáshoz kötő proteoglycanok (brevican, neurocan, versican) és a tumorsejtek ECM-hez történő adhéziójában szerepet játszó tenascinok is megtalálhatóak. (12. TÁBLÁZAT) A fehérje inváziós spektrum elemzés részben megerősíti ezeket az eredményeket, részben pedig kiegészíti azokat. Utóbbira jó példa a laminin- $\alpha 4$  és - $\beta 1$  láncok kulcsmolekulaként történő megjelölése, ismert ugyanis, hogy ez a két laminin lánc a  $\gamma$  láncsal együtt alkotják a laminin-8 (laminin-411) ECM alkotót, melynek gliómainvázcióban betöltött szerepét korábban mások is leírták és vizsgálatunkban hol az egyik, hol a másik, hol pedig mind a két lánc mennyisége tűnt az elválasztás szempontjából fontosnak.<sup>83</sup> (12. és 13. TÁBLÁZAT) Az inváziós spektrum és a grádus kapcsolatát a statisztikai osztályozó tehát bizonyítja.

A kapcsolat jelentőségét, gyakorlati hasznosíthatóságát az adja, hogy jelenleg a grádustól függ a betegek kezelési protokollja és a módszer segítheti a neuropatológust a helyes grádus megállapításában, különösen akkor, amikor limitált mennyiségű minta áll rendelkezésre, pl. azért, mert csak biopsziás mintavételezés történt. Ilyenkor esetenként nehéz lehet a GBM és az anaplasticus astrocytoma elkülönítése, de a grade II és III daganatok helyes diagnosztizálása is lehet nehezített kis mennyiségű minta esetén. Továbbá, mint az az IDH mutáció példáján láthattuk, a betegség molekuláris tumorbiológiája a betegségkimenetel szempontjából fontosabb, mint a szövettani kép, és az inváziós spektrum a tumor molekuláris összetételére vonatkozóan ad információt. Mely ECM alkotók expresszálódnak fokozott mértékben és melyek mennyisége csökkent? Milyen az egyes ECM alkotók egymáshoz viszonyított aránya?

Ma a gliómák onkoterápiája antiproliferatív jellegű, de vannak II-es és III-as fázisban lévő tanulmányok, amelyekben antiinvazív ágenseket tesztelnek.<sup>28,84–87</sup> Az antiproliferatív és antiinvazív onkoterápia ötvözése révén csökkenthetővé válhat az alkilálószer dózisa, ezzel a betegek talán kisebb mértékben tapasztalják meg a kellemetlen, gyakran a kezelést ellehetetlenítő mellékhatásokat. Az új támadáspont pedig akár azt is lehetővé teszi majd, hogy a tumorok teljes mértékben reszekálhatóvá váljanak, vagy reszekciót követően kisebb mértékben újuljanak ki a daganatok.

### **7.3. AZ INVÁZIÓS SPEKTRUM ÖSSZEFÜGGÉST MUTAT A PROGNÓZISSAL GLIOBLASTOMÁS BETEGEKNÉL**

Glioblastomás betegekből származó minták vizsgálataink alapján elmondható, hogy az extracelluláris mátrix összetétele kapcsolatban áll azzal, hogy milyen a betegek túlélése. A szakirodalom alapján a fiatalabb életkor, a férfi nem, a kisebb tumorméret gyenge összefüggést mutat a kedvezőbb betegségkimenetellel.<sup>6,9</sup> Saját korábbi és jelenlegi kutatásaink során azonban e prognosztikai markereket nem sikerült igazolnunk a különböző prognózisú betegek esetében. Jól ismert továbbá az MGMT metilációs státusz és az IDH mutációk szerepe a prognózisban.<sup>45,88,89</sup> Az MGMT státusz meghatározás jelentősége elsősorban időskorban (65 < év) válik világossá, itt ugyanis nem metilált MGMT promoter esetén felmerül a temozolomide kemoterápia terápia előny és a mellékhatások által a betegre rótt teher eltolódott aránya miatt a temozolomide terápia csökkentése, elhagyása.<sup>48</sup> Az IDH mutáció glioblastomás betegek esetén nem túl gyakori (kb. 10%), és a mutáció összefüggése a túléléssel bár egyértelmű, egyéni betegek szintjén erős, nagyobb betegpopulációt vizsgálva azonban nem meggyőző. Az IDH mutáns betegek túlnyomó hányada ugyanazt a pontmutációt hordozza, így a mutáció tesztelése költséghatékony és egyszerű, ma már diagnosztikai vonatkozása miatt rutinszerűen végzik.<sup>30,88</sup> Vizsgálatunk során a 23 hónapos elválasztási határ az átlagos, Stupp protokoll szerinti túlélési idő fölött van. Ennek oka, hogy a betegek jelentős része kiegészítő célzott onkoterápiában

részesül (bevacizumab) kiújulást követően, és így az átlagos teljes túlélés a DE KK Idegsebészeti Klinikán 23 hónap. A vizsgálatba bevont betegek mind a két túlélési csoportban egyenlő arányban részesültek célzott onkoterápiában, a betegek egy része mégis rossz prognózissal rendelkezett, más betegek pedig akár bevacizumab nélkül is tovább éltek. Az IDH mutációs arány nem különbözött egymástól a két csoportban, ahogyan a betegek klinikai jellemzői sem. A „klasszikus” prognosztikai markerek alapján tehát nem lehetett eldönteni, hogy az egyes betegek melyik túlélési csoportba tartoznak.

Az ECM összetétele azonban eltérőnek bizonyult a két csoport között. Egyedi molekulák szintjén itt sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, az expressziós mintázat, az inváziós spektrum azonban jól láthatóan különbözött a rossz és a jobb túlélésű betegek között. (14. és 15. TÁBLÁZAT) A betegek ~85%-áról lehetett megállapítani, hogy melyik prognosztikai csoportba tartozik, a módszer megbízhatósági jelzői megfelelőek. Kiemelendő, hogy a pozitív prediktív érték mind mRNS, mind fehérje inváziós spektrum esetében a rosszabb túlélésű betegek esetében volt nagyobb, ennek klinikai szempontból az a jelentősége, hogy megbízhatóan jelöli ki azokat a betegeket, akik kiemelt figyelmet, gyakoribb követést igényelnek. Itt is fontos megemlíteni, hogy az inváziós spektrum nem csupán egy eszköz a prognózis becslésére. A közeljövőben remélhetőleg új, célzott onkoterápiás szerek jelennek meg, az osztályozó által kijelölt kulcsmolekulák lehetnek ezen új szerek célpontjai. A hozzáadott információ tartalom, a tumor molekuláris összetételébe történő betekintés adja a módszer további értékét. A célzott onkoterápia magas költségei, az esetleges ritka, de súlyos mellékhatásai miatt fontos azon betegpopuláció kiválasztása, ahol a beteg terápiás előnyt élvez a kezelés alkalmazása esetén. A megfelelő betegpopuláció kiválasztása révén tehát gazdasági jelentősége is lehet a módszernek, hiszen az inváziós spektrum elemzése feltárja, hogy az adott terápiás célpont fokozottan expresszálódik-e a beteg tumorában, van-e értelme használni az adott szert. A bevacizumab terápia hatástalansága az esetek egy részében jól példázza mindezt.

#### **7.4. A GLIÓMAINVÁZIÓBAN KULCSSZEREPET BETÖLTŐ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX MOLEKULÁK**

Az agy extracelluláris mátrixa egyedülálló a test többi részéhez képest. Felépítése jelentős különbségeket mutat, pl. a rostos fehérjék helyett a hialuronsav a domináns alkotóelem, valamint számos elsősorban a központi idegrendszerre jellemző alkotóelem jellemzi (pl. brevican, cadherin-N2 stb). A nem tumoros agyban az ECM összetétele és szerveződése olyan, hogy a sejtek motilitása, a szöveti szerveződés plaszticitása és az ECM átalakulása kevésbé jelentős. Ezzel szemben a gliomasejtek képesek ezt a gátló hatást áttörve szétszóródni a központi idegrendszerben, ráadásul csak ott; hiszen a gliális tumorok jellemzője, hogy az ép agyi erek inváziója nem történik meg, így a távoli áttétek sem alakulnak ki.<sup>11,63,67,81</sup> A tumorsejtek aktívan részt vesznek az ECM megváltozásában, egyrészt az ECM alkotók szintézise, másrészt a nem tumoros sejtek modulálása révén, hiszen a megváltozott mikrokörnyezet befolyásolja a nem tumoros sejtek működését is.<sup>63,68,69</sup>

A megváltozott glioma ECM egyik karakterisztikus vonása, hogy rendkívüli mértékben megnő a hialuronsav (HA) mennyisége és szerepe.<sup>51,70</sup> Ennek bizonyítékeként szolgál kutatásunkban a hialuronsavat szintetizáló hyaluronan szintáz-2 enzimek mennyiségének növekedése GBM-ben a normál agyhoz képest. Jelentős különbség volt a CD44 expressziójában is, ami a HA fő receptora, de a koreceptor, a CD168 (HMMR) expressziója is szignifikáns különbségeket mutatott. Utóbbi egyébként az alacsony és magas grádusú gliómák elkülönítésében is fontos szerepet játszik. Ezek az eredmények illeszkednek a hialuronsav gliomainvázcióban betöltött szerepéről kialakított eddigi ismereteinkhez.<sup>51,58,63,70,90,91</sup>

A hialuronsavval kapcsolatba lépő lecticanok, egy kondroitin-szulfát proteoglycan család tagjai szintén fokozott mértékben expresszálódnak. Az ide tartozó agyspecifikus brevican, illetve a versican vagy a neurocan mennyisége jelentősen nő astrocytomákban, mennyiségük összefügg a grádussal. A brevican több osztályozóban kulcsmolekulaként került azonosításra, és a grádus

növekedése fokozott neurocan és versican expresszióval jár. Ezen adhézióban, migrációban és sejtosztódásban szerepet játszó molekulák szerepét más kutatók is említették már a gliomasejtek inváziós képességével kapcsolatban, a grádusok közötti különbségek leírása azonban újdonság.<sup>71,92,93</sup> Ezek a molekulák kapcsolatot alakítanak ki azokkal a rostos ECM alkotókkal, amelyek egyébként kis mennyiségben vannak jelen a normál agyban. Gliómákban azonban a rostos állomány mennyisége növekszik. Eredményeink alapján is fokozott a fibronectin, a kollagének és bizonyos lamininek (pl az  $\alpha 4$  és  $\beta 1$  allancot tartalmazó laminin-8) mennyisége a normál agyhoz képest, és ez a növekedés grádusfüggő. A migráló tumorsejtek ezeket a sejteket használják egyfajta útvonalként a migráció során.<sup>61,94-97</sup>

A tumorsejtek az extracelluláris mátrix alkotóelemeivel a sejtfelszíni receptoraik segítségével kapcsolódnak. Az invázióban az integrinek szerepe jól ismert, astrocytomák esetében az  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  és  $\alpha V$ , valamint a  $\beta 1$  és  $\beta 3$  láncok szerepe merült fel kutatásaink során. Az integrin- $\beta 1$  szerepe megkerülhetetlennek látszik a gliomasejtek inváziójában, több elemzés során is kulcsmolekulaként került leírásra vizsgálatunkban, és ez összhangban áll a szakirodalomban található információkkal.<sup>57,98-100</sup> A lamininek és az őket kötő integrinek eredményeink alapján a betegségkimenetellel is összefüggnek, erre vonatkozóan eddig kevés adat volt elérhető. Továbbá, a sejtfelszíni molekulák közül a syndecanok, tenascinok és cadherineknak mennyisége van összhangban a tumorok grádusával és növekedő inváziós képességével, ezt eredményeink és a szakirodalom egybehangzóan megerősítik.<sup>55,101,102</sup>

A mátrix dinamikus átalakulásáért felelős molekulák közül a mátrix metalloproteinázok szerepe ma már egyértelmű. Az MMP-2 mennyisége összefüggést mutatott a grádussal, ami az eddigi ismereteinket megerősíti. Mennyisége ugyanis jelentősen nő gliómákban, sőt, a megnövekedett mennyiségű MMP2 moduláns szerepet is képes betölteni.<sup>67,103,104</sup>

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az astrocytomak gliális eredetű daganatok, a rosszindulatú KIR daganatok túlnyomó része astrocytoma. Kezelésük és az ezzel összefüggő betegségkimenetel az egyes szövettani alcsoportok között jelentős különbséget mutat. A legrosszab prognózisú astrocytoma egyben a leggyakoribb is, az összes malignus KIR daganat kb. 50%-a glioblastoma. A glioblastoma túlélése 16-24 hónap között mozog többnyire, azonban a betegek között nagyon magas a heterogenitás. A szakirodalom alapján a betegek életkora, neme, a tumorméret összefüggnek a betegségkimenetellel, saját kutatási eredményeink azonban ezt nem igazolják, feltehetően azért, mert e tényezők igazoltan gyenge markerei a prognózisnak. Jelenleg nincs olyan, a klinikumban jól használható marker, amely alapján a betegségkimenetel megbecsülhető lenne.

Jelen munka tárgyát éppen ezért a tumorok molekuláris összetétele és a daganatok klinikai csoportosítása közötti összefüggést vizsgáló mérések képezték. Vizsgáltuk a szövettani kép és a tumorok összetétele közötti kapcsolatot, valamint a különböző túlélési idővel rendelkező, de más szempontból nem különböző betegcsoportok esetében a túlélési idő összefüggéseit a molekuláris összetétellel. A kérdések megválaszolásához qRT-PCR-t, tömegspektrométert és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk.

Vizsgálatunk alapján elmondható, hogy különbözik a primer és szekunder agyi malignitások extracelluláris mátrixának összetétele. Az ECM inváziós molekulái eltérő expressziós mintázattal rendelkeznek különböző grádusokban, ez alapján a mintázat alapján a tumorminták besorolhatóak valamely szövettani alcsoportba. Ehhez hasonló módon, az expressziós mintázat különbözik a rossz és jobb prognózisú betegcsoportok között, mely alapján a betegségkimenetel közel 85%-os aránnyal helyesen becsülhető. Az inváziós spektrum vizsgálata segítséget nyújthat a neuropathológusoknak a minták elkülönítésében, a klinikusoknak a prognózis becslésében, valamint többletinformációt ad a kutatók számára.

## 8.1. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A primer és szekunder központi idegrendszeri malignus daganatok extracelluláris mátrixa jelentős különbségeket mutat a nem tumoros agyszövetéhez képest.
2. A primer és szekunder központi idegrendszeri malignus daganatok inváziós spektruma, azaz az invázióban szerepet játszó ECM molekulák expressziós mintázata jelentősen eltérő.
3. Az azonos szövettani csoportba tartozó központi idegrendszeri malignus daganatok (astrocytoma) ECM összetétele mind transzkripciós, mint transzlációs szinten a grádussal összefüggő eltéréseket mutat, így az inváziós spektrum a grádusra specifikus jellemzőnek bizonyult, melynek meghatározásával a különböző grádusú tumorok megbízhatóan elkülöníthetők egymástól.
4. Azonos szövettani csoportú és grádusú tumorok (glioblastoma) igen heterogén prognózissal rendelkeznek, mely nem magyarázható a betegek klinikai paramétereinek eltéréseivel.
5. Az inváziós spektrum elemzése alapján több molekula az invázió kulcsmolekulájának tekinthető (pl. brevican, integrin- $\beta$ 1, laminin- $\alpha$ 4).
6. Az inváziós spektrum prognosztikai markerként használható, mert jó hatásfokkal különíti el a rossz és jobb prognózisú glioblastomás betegeket.

## 9. SUMMARY

Astrocytomas are glial tumors, the vast majority of malignant primary CNS tumors are of astrocytic origin. Treatment and prognosis of the various types of astrocytomas show great differences among the histologic groups. The one with the worst prognosis is the most common type, glioblastoma comprises approximately 50% of all malignant CNS tumors. Survival varies between 16 to 24 months, patients show a great degree of heterogeneity in terms of survival. Previous research suggests that patient age, gender, tumor size correlate with patient outcome, however, our previous and present findings could not confirm this, possibly because these prognostic markers are considered weak. Currently, there is no prognostic marker in everyday clinical use.

This dissertation is therefore based upon analyses that have been performed to study the hypothesized correlation between the molecular composition and the clinical classification of tumors. The connection of histopathology and molecular composition has been analyzed, as well as the relationship of molecular composition and overall survival of patients with different prognosis but with no other differences. To answer the questions, qRT-PCR, mass-spectrometry and immunohistochemistry methods were used.

Based upon our findings, it can be stated that primary and secondary intracerebral malignancies have different extracellular matrix compositions. The invasion-related molecules of ECM have different expressional patterns in various grades of astrocytoma and this can be used to identify tumor grade. The expressional pattern is also different in tumor samples of patients with poor or better prognosis, which was correctly assessed with an 85% success rate. Analyzing the invasion spectrum would help neuropathologists in identifying tumor grade, clinicians in assessing patient outcome and scientists in gaining extra information of gliomas.

## 9.1. NOVEL SCIENTIFIC FINDINGS

1. Primary and secondary malignant central nervous system tumors and non-tumor brain have great differences in extracellular matrix composition
2. The invasion spectrum, i.e. the expression pattern of invasion-related extracellular matrix molecules of primary and secondary malignant central nervous system tumors are significantly different.
3. Central nervous system malignancies of the same histopathologic group (i.e. astrocytomas) show distinct ECM composition in various grades both on transcriptional and translational level. Thus, invasion spectrum is a grade-specific characteristic marker of the tumor that allows separation of different tumor grades.
4. Tumors of same histopathology and grade (i.e. glioblastoma) show great heterogeneity in patient outcome which cannot be explained by differences in clinical factors.
5. Analyzing the invasion spectrum reveals the key role of multiple molecules in tumor invasion (eg. brevican, integrin-  $\beta$ 1, laminin- $\alpha$ 4)
6. The invasion spectrum can be used as a prognostic marker because it identifies glioblastoma samples with poor and better prognosis with good accuracy.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;1-18. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
2. Pollo B. Pathological classification of brain tumors. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;56(2):103-111.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncology* . 2014;16(suppl 4):iv1-iv63. doi:10.1093/neuonc/nou223.
4. Pouratian N, Schiff D. Management of low-grade glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010;10(3):224-231. doi:10.1007/s11910-010-0105-7.
5. Johnson DR, Galanis E. Medical management of high-grade astrocytoma: current and emerging therapies. *Semin Oncol.* 2014;41(4):511-522. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.06.010.
6. Helseth R, Helseth E, Johannesen TB, et al. Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand.* 2010;122(3):159-167. doi:10.1111/j.1600-0404.2010.01350.x.
7. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(1):25-41. doi:10.1007/s00005-012-0203-0.
8. Donato V, Papaleo A, Castrichino A, et al. Prognostic implication of clinical and pathologic features in patients with glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide. *Tumori.* 93(3):248-256. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17679459>. Accessed April 3, 2016.
9. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol.* 2004;6(3):227-235. doi:10.1215/S1152851703000620.
10. Klekner A, Virga J, Toth J, et al. [The role of extracellular matrix components in the invasion of intracranial malignancies]. *Magy Onkol.* 2013;57(4):222-231. doi:MagyOnkol.2013.57.4.222.
11. Chintala SK, Rao JK. Invasion of human glioma: role of extracellular matrix proteins. *Front Biosci.* 1996;1:d324-d339.
12. Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* 2004;70(2):217-228. doi:10.1007/s11060-004-2751-6.
13. Inskip PD, Linet MS, Heineman EF. Etiology of brain tumors in adults. *Epidemiol Rev.* 1995;17(2):382-414. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654518>. Accessed August

- 18, 2017.
14. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R FJ, ed. *Cancer Incidence in Five Continents*. Vol 10.; 2014. doi:10.1097/00008469-199309000-00010.
  15. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005;109(1):93-108. doi:10.1007/s00401-005-0991-y.
  16. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2(9):494-503. doi:10.1038/ncpneuro0289.
  17. Hemminki K, Tretli S, Olsen JH, et al. Familial risks in nervous system tumours: joint Nordic study. *Br J Cancer*. 2010;102(12):1786-1790. doi:10.1038/sj.bjc.6605708.
  18. Walsh KM, Anderson E, Hansen HM, et al. Analysis of 60 Reported Glioma Risk SNPs Replicates Published GWAS Findings but Fails to Replicate Associations From Published Candidate-Gene Studies. *Genet Epidemiol*. 2013;37(2):222-228. doi:10.1002/gepi.21707.
  19. Preston-Martin S. EPIDEMIOLOGY OF PRIMARY CNS NEOPLASMS. *Neurol Clin*. 1996;14(2):273-290. doi:10.1016/S0733-8619(05)70256-5.
  20. Salminen E, Pukkala E, Teppo L, al. et, Nussey S, Uttley D. Second cancers in patients with brain tumours—impact of treatment. *Eur J Cancer*. 1999;35(1):102-105. doi:10.1016/S0959-8049(98)00341-4.
  21. Davis F, Il'yasova D, Rankin K, McCarthy B, Bigner DD. Medical Diagnostic Radiation Exposures and Risk of Gliomas. *Radiat Res*. 2011;175(6):790-796. doi:10.1667/RR2186.1.
  22. Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol*. 2011;12(7):624-626. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845765>. Accessed August 18, 2017.
  23. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol*. 2014;16(7):896-913. doi:10.1093/neuonc/nou087.
  24. DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med*. 2001;344(2):114-123. doi:10.1056/NEJM200101113440207.
  25. Recht LD, Bernstein M. Low-grade gliomas. *Neurol Clin*. 1995;13(4):847-859.
  26. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107:799-807. doi:10.3238/arztebl.2010.0799.
  27. Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*. 2008;62(4):753-764.

28. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330.
29. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
30. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013. doi:10.1007/s11910-013-0345-4.
31. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell.* 2010;17(5):510-522. doi:10.1016/j.ccr.2010.03.017.
32. Neuropathologica A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010;120(120):707-718. doi:10.1007/s00401-010-0781-z.
33. Bralten LBC, French PJ. Genetic alterations in Glioma. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1129-1140. doi:10.3390/cancers3011129.
34. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 2012;205(12):613-621. doi:10.1016/j.cancergen.2012.10.009.
35. Smith JS, Jenkins RB. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci.* 2000;5(figure 1):D213-31. doi:10.2741/Smith.
36. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2499-2508. doi:10.1056/NEJMoa1407279.
37. Rich JN, Hans C, Jones B, et al. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.* 2005;65(10):4051-4058. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3936.
38. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17(1):98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
39. Kayama T, Tominaga T, Yoshimoto T. Management of pilocytic astrocytoma. *Neurosurg Rev.* 1996;19(4):217-220. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007882>. Accessed August 18, 2017.
40. van den Bent MJ, Snijders TJ, Bromberg JEC. Current treatment of low grade gliomas. *Memo.* 2012;5(3):223-227. doi:10.1007/s12254-012-0014-3.

41. van den Bent MJ. Practice changing mature results of RTOG study 9802: another positive PCV trial makes adjuvant chemotherapy part of standard of care in low-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2014;16(12):1570-1574. doi:10.1093/neuonc/nou297.
42. Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Anaplastic glioma: current treatment and management. *Expert Rev Neurother.* 2015;15(6):601-620. doi:10.1586/14737175.2015.1042455.
43. Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, et al. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol.* 2011;70(1). doi:10.1002/ana.22425.
44. Reuss DE, Mamatjan Y, Schimpf D, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):867-873. doi:10.1007/s00401-015-1438-8.
45. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003. doi:10.1056/NEJMoa043331.
46. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 2012;3(7):709-722. doi:10.18632/oncotarget.588.
47. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, et al. Corrigendum: Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.* 2012;484(7392):130-130. doi:10.1038/nature11026.
48. Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, et al. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer.* 2012;131(6):1342-1350. doi:10.1002/ijc.27385.
49. Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 1998;21(5):207-215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01261-2.
50. Novak U, Kaye AH. Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas.* 2000;7(4):280-290. doi:10.1054/jocn.1999.0212.
51. Park JB, Kwak HJ, Lee SH. Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adh Migr.* 2008;2(3):202-207. doi:10.4161/cam.2.3.6320.
52. Watanabe A, Mabuchi T, Satoh E, et al. Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. *J Neurooncol.* 2006;77(1):25-32. doi:10.1007/s11060-005-9010-3.
53. Silver DJ, Silver J. Contributions of chondroitin sulfate proteoglycans to neurodevelopment, injury, and cancer. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;27:171-178. doi:10.1016/j.conb.2014.03.016.

54. Gladson CL. The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58(10):1029-1040. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515226>. Accessed April 3, 2016.
55. Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26641-26644. doi:10.1074/jbc.R500005200.
56. Friedlander DR, Zagzag D, Shiff B, et al. Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alphaV and beta1 integrins. *Cancer Res.* 1996;56(8):1939-1947. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620517>. Accessed April 3, 2016.
57. Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol.* 1993;143(1):154-163.
58. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):528-539. doi:10.1038/nrc1391.
59. Kohutek Z a, diPierro CG, Redpath GT, Hussaini IM. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci.* 2009;29(14):4605-4615.
60. Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
61. Bouterfa H, Darlapp AR, Klein E, Pietsch T, Roosen K, Tonn JC. Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. *J Neurooncol.* 1999;44(1):23-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10582665>. Accessed April 3, 2016.
62. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 3):255-264. doi:10.1242/jcs.006064.
63. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(6):1046-1069. doi:10.1016/j.biocel.2004.01.013.
64. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012;196(4). <http://jcb.rupress.org/content/196/4/395>. Accessed August 20, 2017.
65. Reinhard J, Brösicke N, Theocharidis U, Faissner A. The extracellular matrix niche microenvironment of neural and cancer stem cells in the brain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;81(Pt A):174-183. doi:10.1016/j.biocel.2016.05.002.
66. Xiong G-F, Xu R. Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. *J Cancer Metastasis Treat.* 2016;2(9):357. doi:10.20517/2394-4722.2016.08.
67. Rubenstein BM, Kaufman LJ. The role of extracellular matrix in glioma invasion: a

- cellular Potts model approach. *Biophys J.* 2008;95(12):5661-5680. doi:10.1529/biophysj.108.140624.
68. Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, Reisfeld RA, Strongin A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *J Cell Sci.* 1997;110(19):2473-2482.
  69. Gladson CL. The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58(10):1029-1040. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515226>. Accessed August 20, 2017.
  70. Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP. Elevated Hyaluronan Production Induces Mesenchymal and Transformed Properties in Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45801-45810. doi:10.1074/jbc.M308168200.
  71. Wegrowski Y, Maquart F-X. Chondroitin sulfate proteoglycans in tumor progression. *Adv Pharmacol.* 2006;53:297-321. doi:10.1016/S1054-3589(05)53014-X.
  72. Hayen W, Goebeler M, Kumar S, Riessen R, Nehls V. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 1:2241-2251.
  73. Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A. Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 1998;58(16):3743-3750. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032529241&partnerID=tZOtx3y1>.
  74. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601>. Accessed August 27, 2017.
  75. Bradford M. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
  76. James A, Jorgensen C. Basic design of MRM assays for peptide quantification. *Methods Mol Biol.* 2010;658:167-185.
  77. Qian W-J, Jacobs JM, Liu T, Camp DG, Smith RD. Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(10):1727-1744.
  78. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2008;4:222.
  79. Paulus W. Brain extracellular matrix, adhesion molecules, and glioma invasion. *Brain tumor invasion Biol Clin Ther considerations Wiley-Liss, New York.* 1998:301-322.
  80. Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochir (Wien).* 1999;141(3):295-305. doi:10.1007/s007010050301.

81. Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* 2004;70(2):217-228. doi:10.1007/s11060-004-2751-6.
82. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):809-827. doi:10.1007/s00401-015-1424-1.
83. Kawataki T, Yamane T, Naganuma H, et al. Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res.* 2007;313(18):3819-3831. doi:10.1016/j.yexcr.2007.07.038.
84. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
85. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2003;290(16):2149-2158. doi:10.1001/jama.290.16.2149.
86. Razis E, Selviaridis P, Labropoulos S, et al. Phase II study of neoadjuvant imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6258-6266. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1867.
87. Lee EQ, Kuhn J, Lamborn KR, et al. Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro Oncol.* 2012;14(12):1511-1518. doi:10.1093/neuonc/nos264.
88. Amelot A, De Cremoux P, Quillien V, et al. IDH-mutation is a weak predictor of long-term survival in glioblastoma patients. *PLoS One.* 2015. doi:10.1371/journal.pone.0130596.
89. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6002-6007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.
90. Akiyama Y, Jung S, Salhia B, et al. Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. *J Neurooncol.* 2001;53(2):115-127. doi:10.1023/A:1012297132047.
91. Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdinger G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res.* 1999;59(24):6246-6250.
92. Gary SC, Hockfield S. BEHAB/brevican: an extracellular matrix component associated with invasive glioma. *Clin Neurosurg.* 2000;47:72-82.

93. Varga I, Hutóczki G, Szemcsák CD, et al. Brevican, neurocan, tenascin-C and versican are mainly responsible for the invasiveness of low-grade astrocytoma. *Pathol Oncol Res.* 2012;18(2):413-420.
94. Mahesparan R, Read T-A, Lund-Johansen M, Skafnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol.* 2003;105(1):49-57. doi:10.1007/s00401-002-0610-0.
95. Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME. Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res.* 1994;54(14):3897-3904. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027989375&partnerID=tZOtx3y1>.
96. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(3):197-207. doi:10.1016/S1044-579X(02)00023-8.
97. Ljubimova JY, Lakhter AJ, Loksh A, et al. Overexpression of  $\alpha 4$  chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res.* 2001;61(14):5601-5610. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035878071&partnerID=tZOtx3y1>.
98. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest.* 2002;109(8):999-1006. doi:10.1172/JCI15468.
99. Paulus W, Baur I, Beutler AS, Reeves SA. Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab Invest.* 1996;75(6):819-826.
100. D'Abaco GM, Kaye AH. Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci.* 2007;14(11):1041-1048. doi:10.1016/j.jocn.2007.06.019.
101. Xian X, Gopal S, Couchman JR. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):31-46.
102. TAKEICHI M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5(5):806-811. doi:10.1016/0955-0674(93)90029-P.
103. Kesanakurti D, Chetty C, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with  $\alpha 5 \beta 1$  integrin in glioma. *Oncogene.* 2013;32(3):327-340. doi:10.1038/onc.2012.52.
104. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-174. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036512208&partnerID=tZOtx3y1>.

## 11. TÁRGYSZAVAK

Extracelluláris mátrix, invázió, tumor grádus, prognózis, túlélés, expressziós mintázat, inváziós spektrum, glioblastoma, astrocyoma

Extracellular matrix, invasion, tumor grade, prognosis, survival, expressional pattern, invasion spectrum, glioblastoma, astrocytoma

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

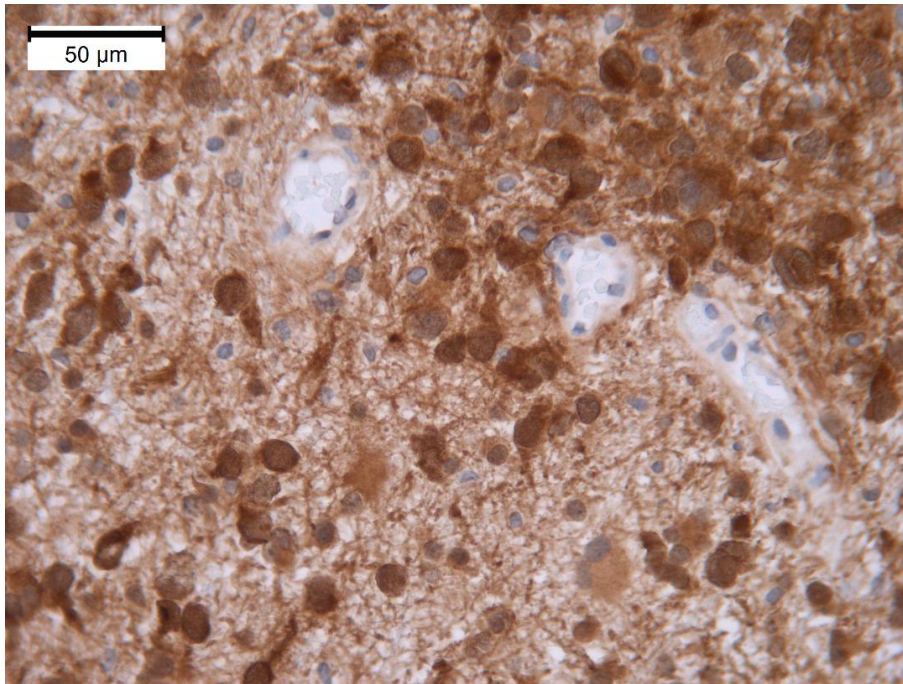
Szeretném megköszönni témavezetőm, Dr. Klekner Álmos lelkiismeretes munkáját. Egyike azoknak, akik miatt a tudományos pályára léptem, ezúton is köszönöm neki az iránymutatást, a számonkérést, a támogatást és a bizalmat. Munkássága példaértékű számomra.

Köszönöm Dr. Bognár László Professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a kutatásaim elvégzésére és hozzájárult közös kutatásaink sikeréhez. Hálás vagyok a Neuro-onkológiai Laboratóriumban dolgozó kollégáknak, Reményi-Puskár Juditnak és Dr. Hutóczki Gábornak, illetve a DE KK Idegsebészeti Klinika valamennyi dolgozójának, akik munkája nélkül jelen értekezés nem készülhetett volna el. Külön köszönöm munkacsoportunk TDK hallgatója, Szivos László megbízható munkáját és segítségét a mérések elvégzésében. Bízom abban, hogy sokáig dolgozhatok még ebben a munkacsoportban, ahol nagyon sokat tanultam eddig is. Szeretném megköszönni továbbá szerzőtársaimnak, kutatócsoportunk minden tagjának, különösen Dr. Hortobágyi Tibornak, Dr. Tóth Juditnak, Dr. Csősz Évának, Dr. Zahuczky Gábornak és Steiner Lászlónak, hogy megosztották velem tudásukat, tanácsokkal láttak el és hogy együtt készíthettük el a publikációkat.

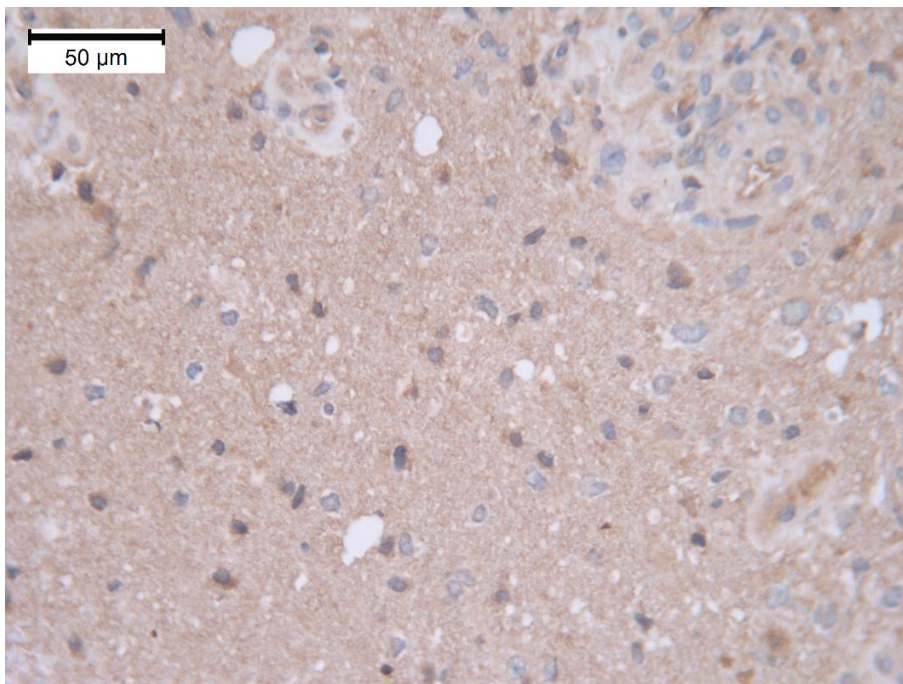
Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy biztosították számomra a megfelelő környezetet, nem rótták fel nekem a nem velük töltött időt, és hogy támogattak, bíztattak és mellettem álltak az évek alatt.

## 13. FÜGGELÉK

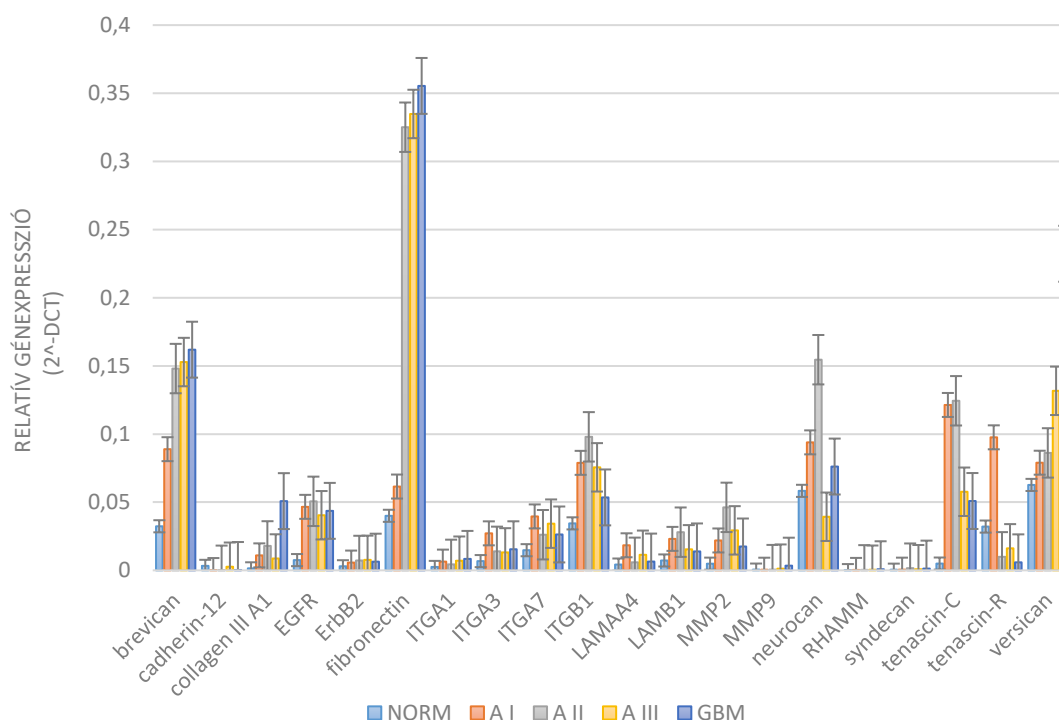
1. FÜGGELÉK: IDH1 R132H mutáció pozitív glioblastoma. (40x nagyítás, 1:50 hígítás)



2. FÜGGELÉK: IDH1 R132H mutáció negatív glioblastoma (40x nagyítás, 1:50 hígítás)



**3. FÜGGELÉK:** Az invázióban szerepet játszó vizsgált ECM alkotók relatív génexpressziója különböző grádusú astrocyoma és nem tumoros agyszöveti kontroll mintákban.



ECM ALKOTÓ	RELATÍV GÉNEXPRESSZIÓ (2 <sup>-dct</sup> érték)				
	NORM	A I	A II	A III	GBM
brevican	0,032325	0,088888	0,148034	0,152807	0,161897
cadherin-12	0,003286	0,000213	0,000032	0,002646	0,000268
collagen III A1	0,001474	0,010979	0,017924	0,008695	0,050787
EGFR	0,007503	0,046590	0,050625	0,040416	0,043636
ErbB2	0,002991	0,005698	0,007234	0,007697	0,006377
fibronectin	0,040010	0,061472	0,325110	0,334813	0,355400
ITGA1	0,002504	0,006404	0,004380	0,007064	0,008405
ITGA3	0,006768	0,027154	0,013927	0,013166	0,015467
ITGA7	0,014773	0,039552	0,026133	0,034246	0,026316
ITGB1	0,034459	0,078854	0,097937	0,075568	0,053496
LAMAA4	0,004248	0,018388	0,005888	0,011406	0,006448
LAMB1	0,007234	0,023082	0,027989	0,015423	0,013877
MMP2	0,004883	0,021931	0,046199	0,029321	0,017497
MMP9	0,000547	0,000466	0,000518	0,001231	0,003429
neurocan	0,058322	0,093893	0,154534	0,039313	0,076145
RHAMM	0,000161	0,000313	0,000363	0,000454	0,000806
syndecan	0,000479	0,000518	0,001590	0,000814	0,001284
tenascin-C	0,004963	0,121324	0,124395	0,057651	0,050871
tenascin-R	0,032110	0,097594	0,009916	0,016144	0,005872
versican	0,062663	0,078965	0,086150	0,131703	0,232254



Nyilvántartási szám: DEENK/16/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Virga József  
Neptun kód: VCSKZE  
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10050907

### **A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények**

1. **Virga, J.**, Bognár, L., Hortobágyi, T., Zahuczky, G., Csósz, É., Kalló, G., Tóth, J., Hutóczki, G., Reményi-Puskár, J., Steiner, L., Klekner, Á.: Tumor Grade versus Expression of Invasion-Related Molecules in Astrocytoma.  
*Pathol. Oncol. Res.* 24 (1), 35-43, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-017-0194-6>  
IF: 1.736 (2016)
2. **Virga, J.**, Szemcsák, C. D., Reményi-Puskár, J., Tóth, J., Hortobágyi, T., Csósz, É., Zahuczky, G., Szivos, L., Bognár, L., Klekner, Á.: Differences in Extracellular Matrix Composition and its Role in Invasion in Primary and Secondary Intracerebral Malignancies.  
*Anticancer Res.* 37 (8), 4119-4126, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancerres.11799>  
IF: 1.937 (2016)
3. **Virga, J.**, Bognár, L., Hortobágyi, T., Zahuczky, G., Csósz, É., Kalló, G., Tóth, J., Hutóczki, G., Reményi-Puskár, J., Steiner, L., Klekner, Á.: Prognostic role of the expression of invasionrelated molecules in glioblastoma.  
*J. Neurol. Surg. Part A.* 78 (1), 12-19, 2017.  
IF: 0.726 (2016)





### További közlemények

4. Klekner, Á., Tóth, J., **Virga, J.**, Hortobágyi, T., Dér, Á., Szemcsák, C. D., Reményi-Puskár, J., Bognár, L.: Influence of oncotherapy and clinical parameters on survival of glioblastoma patients: a single center experience.  
*Neurol. India. "Accepted by Publisher"*, 2017.  
IF: 1.758 (2016)
5. Klekner, Á., Hutóczki, G., **Virga, J.**, Reményi-Puskár, J., Tóth, J., Scholtz, B., Csősz, É., Kalló, G., Steiner, L., Hortobágyi, T., Bognár, L.: Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain.  
*Clin. Neurol. Neurosurg.* 139, 138-143, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2015.09.017>  
IF: 1.198
6. Klekner, Á., **Virga, J.**, Tóth, J., Hortobágyi, T., Dér, Á., Szemcsák, C. D., Bognár, L.: Az extracelluláris mátrix komponensek tumorinvázióban betöltött szerepe intrakraniális daganatokban.  
*Magyar Onkol.* 57, 222-231, 2013.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,355**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
4,399**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

