

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A gliomák prognosztikai faktorainak kutatása

Dr. Szivos László

Témavezető: Dr. Klekner Álmos



DEBRECENI EGYETEM
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2025.

A GLIOMÁK PROGNOSZTIKAI FAKTORAINAK KUTATÁSA

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

Írta: Dr. Szivos László, okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Klekner Álmos, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Soltész Beáta, PhD
Dr. Dósa Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Molnár Csilla, PhD
Dr. Szalárdy Levente, PhD
Dr. Soltész Beáta, PhD
Dr. Dósa Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet,
„A” épület, tanterem, 2025. december 10. 13 óra

1. Bevezetés

A központi idegrendszer két fő sejtípusa a neuron (idegsejt), valamint a neuro-gliális ún. támasztó sejtek csoportja, mely utóbbi csoporton belül szintén két fő csoport különböztethető meg. Az ektodermális eredetű makroglia [asztrocita, oligodendrocita, ependyma sejtek], valamint a mesodermális eredetű mikroglia. A központi idegrendszerben az asztrocita tekinthető a leggyakoribb sejtípusnak, a vér-agy gát fenntartásában, valamint a sejt-közötti homeosztázis fenntartásában tölt be szerepet. Az oligodendrociták myelinhüvely termelési képességük által a sejt-sejt közötti ingerületvitel révén történő kommunikációt gyorsítják meg. A mikroglia sejtek a központi idegrendszer immunsejtjeinek tekinthetőek, az ependyma sejtek pedig a kamrák belső felszínét alkotják, a liquor termelés-, és keringésszabályozásában vesznek részt. Neuro-onkológiai megközelítésben ezen neuro-gliális sejtek neoplasztikus átalakulásaként kialakult daganatformákat nevezünk gliomáknak. Kiindulási hely szerinti megközelítésben a gliomák elsődleges központi idegrendszert érintő daganatformának tekinthetőek, szemben a más szervrendszerben kialakult daganatformákkal, melyek metasztázis révén képesek elérni a központi idegrendszeri struktúrákat.

Jelen doktori disszertáció célja a gliomák csoportján belül a leggyakoribb alcsoportoknak tekinthető diffúz, infiltratív terjedési mintázattal bíró, alacsonyabb grádusú asztrocitómák, valamint a glioblastoma prognosztikus faktorainak vizsgálata. Jelentőségüket adja egyrésztől gyakoriságuk, hiszen az összes malignus központi idegrendszeri (KIR) daganat $\frac{3}{4}$ -ét ezen daganatok alkotják, másrésztől pedig a rendelkezésünkre álló terápiás lehetőségek korlátozottsága. Sebésztechnikai szempontból az infiltratív jelleg miatt a teljes eltávolítás nem kivitelezhető, onkoterápiás szempontból pedig a kifejezett intratumorális heterogenitás, valamint agresszív növekedési ráta miatt behatárolt a kezelés. Habár az összes malignus daganat csupán 1-2 %-át teszik ki a malignus KIR daganatok, a daganatok jellegéből fakadó kezelési nehézségek, a magas morbiditási tényezők, az érintett aktív keresőképes korosztály jellege miatt, gyakoriságához mérten aránytalanul nagy társadalmi – gazdasági teherként tekinthető. Az

elmúlt bő évtizedben jelentős változások történtek ezen daganatcsoportok besorolásában, valamint a prognosztikus tényezők klinikai gyakorlatba történő implementálása során is. Célunk volt egyúttal ezen napi gyakorlatban használt prognosztikus szempontból releváns tényezők, valamint a kapcsolódó klasszifikációs változások összefoglalása, valamint a karakterisztikus diffúz, infiltratív terjedési mintázat mögötti folyamat és az extracelluláris mátrix kapcsolatának többértű meghatározása.

1.1. A központi idegrendszeri daganatklasszifikáció változása

Az elmúlt században a gliális daganatok klasszifikációja leginkább a hisztogenezis irányvonalainak figyelembevételével történt, amely a daganatokat azok mikroszkópikus jellemzőik, feltételezett különböző kiindulási sejtjei és ezek differenciáltsági állapota szerint különböztette meg. A hisztológiai tulajdonságokon alapuló elkülönítés a sejtek fénymikroszkópos jellemzőit, a sejtek származásával összefüggő fehérjék immunhisztokémiai expresszióját és az ultrastruktúrális tulajdonságokat vette figyelembe. Az elmúlt közel három évtized tanulmányai igazolták azonban több molekuláris genetikai alteráció szerepét az agydaganatok tumorigenezisének folyamatában is, melyek végül fokozatosan diagnosztikus kritériumokká is váltak.

2014-ben következett be a jelentős fordulat, a Harleem-konszenzus keretében, ahol a daganatklasszifikáció vonatkozásában szakítottak az évszázados, teljes mértékben a mikroszkópos vizsgálaton alapuló diagnosztikus elvvel. Bevezetésre került az integratív diagnosztika fogalma, melynek keretében az adott daganattípusra jellegzetes fenotípusos és genotípusos jegyek is meghatározó tényezővé váltak, biológiailag homogénebb és pontosabban meghatározott diagnosztikus entitások létrehozásának céljával.

A 2016-os revízióban fontos különbségtételt jelentett a diffúz, infiltratív jellemvonásokkal bíró gliomák megjelölése, a körülhatárolt, ezen terjedési mintázattal nem jellemezhető gliomákkal szemben. A múltban az összes asztrocita eredetű tumor ugyanazon csoportba került, a revíziót

követően a diffúzan infiltráló gliomák közös csoportba kerültek: alapozva ezt nem csupán a növekedési mintázatokra és viselkedésükre, sokkal inkább a közös jellemzőként fennálló genetikai driver mutációkra az *IDH1* és *IDH2* gének esetében. A 2016-os WHO KIR klasszifikációban, a diffúz gliomák csoportja magában foglalja a WHO Gr. 2 és Gr. 3 típusú asztrocita eredetű tumorokat, a Gr. 2 és Gr. 3 oligodendrogliomákat, a Gr. 4 glioblasztomákat, valamint a kapcsolódó gyermekkori diffúz gliomákat.

A molekuláris diagnosztika fejlődése szükségszerűen újraértelmezést sürgetett az újonnan definiált entitások prognosztikus várakozásaival kapcsolatban is. A korábbi releváns prognosztikus különbség az IDH-mutáns WHO Gr. 2 (diffúz) asztrocitómák és az IDH-mutáns WHO Gr. 3 (anaplasztikus) asztrocitómák között a kutatások tükrében minimalizálódni látszott. A diffúz, infiltratív, de high-grade jellemvonásokat nem mutató gliomákat egy csoportként, az újabb szakirodalmi terminus szerint *alacsonyabb* grádusú gliomák (*lower grade glioma*) csoportjaként említik. Ennek alapja, hogy a mitotikus aktivitáson alapuló egzakt elkülönítés nehezen kivitelezhető, valamint bizonyos molekuláris alterációk által kijelölt alcsoportokban a túlélési paraméterek nem a grádussal mutattak összefüggést, hanem a tumor agresszivitását, kemo- és sugárszenzitivitását egyaránt befolyásoló molekuláris eltérésekkel korreláltak.

A klasszifikáció a 2016-os módosítást követően is több elemében jelentős változáson ment keresztül. A módosítások alapját a cIMPACT (Consortium to Inform Molecular and Practical Approches to CNS Tumor Taxonomy) munkacsoportok által végzett munka jelentette, mely alapján végül a WHO klasszifikáció 5. verziója megalkotásra került. Végérvényesen kivezetésre került a primer és szekunder glioblasztoma fogalma, glioblasztoma kizárólag diffúz, infiltratív terjedési mintázattal bíró IDH-vadtípusú esetekben diagnosztizálható, IDH-mutáns esetekben Gr. 4 asztrocitómáról beszélünk.

Összefoglalva, jelenleg a gliomák taxonómiai besorolását tekintve a WHO központi idegrendszeri daganatokat részletező 2021-ben megjelent, 5. kiadása a jelenlegi iránymutató. A központi

idegrendszert érintő daganatformák eszerint 13 fő csoportba kerültek beosztásra, mely fő csoportokon belül a gliomák, a glioneuronális és neuronális tumorokkal együttesen kerültek beosztásra. A gliomák csoportján belül több entitás megkülönböztethető, azonban dolgozatomban a leggyakoribb csoportnak tekinthető diffúz, infiltratív terjedési mintázattal jellemezhető asztrocitomákkal, oligodendrogliomákkal, valamint glioblasztomával foglalkozom.

1.2. Epidemiológia

Minden évben, világszerte körülbelül 100.000 ember kerül diffúz gliomával diagnosztizálásra. Ez az összes daganatos diagnózis mindösszesen két százaléka, azonban a morbiditási és mortalitási adatok miatt kifejezett társadalmi hatással bír. Érdekes epidemiológiai adat, hogy azon országokban, ahol az észak-európai származású népesség túlnyomórészt él a betegségek előfordulási aránya sokkal kifejezettebb (Észak- Amerika, Ausztrália, Új-Zéland; Incidencia: 7.8 – 9.6 / 100.000 fő), azok területekhez viszonyítva, ahol túlnyomórészt ázsiai és afrikai népesség található (Délkelet-Ázsia, India; Incidencia: 1.9 – 3.3 / 100.000 fő). Szembetűnő a Nyugat-Európában tapasztalt négyszer magasabb előfordulási arány a jólétben élő kelet-ázsiai országokhoz viszonyítottan is (Nyugat-Európa: 8.5 / 100.000 fő; Japán, Szingapúr: 1.9 / 100.000 fő), mely arra utal, hogy az etnikai, kulturális, valamint környezeti tényezők is jelentős befolyásoló szereppel bírhatnak a gyakorta említett jelentési torzításon felül.

Elmondható, hogy a központi idegrendszert érintő daganatok 27.9 %-a tekinthető malignusnak. A malignus léziók több, mint 50 %-áért a glioblasztoma tehető felelőssé, összességében a gliális folyamatok pedig több, mint 80 %-át adják a malignus KIR daganatoknak.

Az életkorra korrigált incidenciaci értékek vonatkozásában a diffúz asztrocitaer és oligodendrogliális tumorok 4.45 / 100.000 fő (95 % CI: 4.42 – 4.48), míg a glioblasztoma 3.27 / 100.000 fő (95 % CI: 3.24 – 3.29) értékkel jellemezhető, a férfi nem esetében másfél – kétszeres predominancia mellett, valamint a 40 év fölötti életkor tekintetében gyakoribb előfordulási rátával. Túlélési adatok vonatkozásában a 1-, valamint 5-éves túlélési mutatók az irányadóak az

onkológiai gyakorlatban, valamint jellemző adat a medián teljes túlélési idő, mely a glioblasztoma esetében 8 hónap (95 % CI: 8-9), a legjobb prognózisú Gr. 2 oligodendroglioma esetében pedig 205 hónap (95 % CI: 196-209).

1.3. Kezelés

Klinikai, egyúttal prognosztikus szempontból is kiemelendő a daganatsebészeti beavatkozás szerepe. A jelenleg érvényes ajánlások szerint, amennyiben a beteg általános állapota, társbetegségei ezt lehetővé teszik úgy a sebészi eltávolítás az elsődlegesen választandó eljárás. A sebészi eltávolítás radikalitásának mértéke minden gliális daganatforma vonatkozásában pozitív prognosztikai tényezőnek tekinthető.

A sebészi eltávolítás kapcsán az onko – funkcionális egyensúly megtartása a legfontosabb iránytű. Habár a radikalitás mértéke a teljes túlélési idővel korrelál, az eltávolítás mértékének meghatározását kellő részletességű kockázat-haszon értékelésnek szükséges megelőznie ahhoz, hogy a beteg számára a lehető legkisebb mértékű életminőség romlás mellett a lehető legnagyobb mértékű reszekció (extent of resection – EOR) elvégzését érhessük el (maximális funkciómegtartó sebészeti megközelítés).

Posztoperatív terápia vonatkozásában általánosságban elmondható, hogy a kedvező prognosztikus mutatókkal rendelkező, alacsonyabb grádusú folyamatok esetében elsősorban a PCV (procarbazin, lomustin [CCNU], vincristine) kombinált kemoterápiás regimen, míg kedvezőtlenebb esetben a szintén alkiláló kemoterápiás szernek minősíthető temozolomid (TMZ) kezelés részesítendő előnyben a radioterápia alkalmazása mellett. Magasabb grádusú folyamatok, így a glioblasztoma esetében is a terápiás protokoll részét képezi a konkurráló kemo-irradáció, az ún. Stupp-protokoll.

1.4. Az Extracelluláris Mátrix

Az extracelluláris mátrix a sejteket körülvevő, dinamikus remodelációban álló, komplex környezet, amely a szöveti struktúra kialakításában, valamint a szövet funkcionalitásában is

kiemelt szerepet tölt be. Az extracelluláris mátrix egyfajta funkcionális egységként tekintendő, amely a sejtek közötti területet tölti ki. Hozzájárul a sejtek mobilitásához, egyrésztől kihorgonyzó funkció és migrációs barrier biztosításával, adott esetben pedig a sejtek migrációjának elősegítésével. Aktív részt vállal a jelátviteli folyamatokban, többek között biomechanikai erő létrehozásával, valamint az ezáltal közvetített szignálok révén.

Más szöveti struktúrák felépítésében is részt vesz, azonban az agy esetében minőségi és mennyiségi összetétele eltérő. Mennyiségi összetétele is releváns, fiziológias körülmények között az extracelluláris mátrix állomány az agyszövet térfogatarányának 20 %-a, ezzel szemben primer agyi daganatok esetében ez a térfogatarány az 50%-ot is elérheti.

A diffúz, infiltratív gliomák esetében a sebészi eltávolítás korlátja a daganatsejtek peritumorális infiltrációja, mely esetben a daganatsejtek több centiméter távolságban képesek a primer tumormassza helyétől eltávolodni, a normál agyszövetállományt infiltrálni.

A jelenség megértésére a Scherer-féle másodlagos struktúrák szolgálnak példaként, mely 1938-ban került leírásra. Ezek a struktúrák illusztrálni képesek, ahogyan a glioma sejtek az központi idegrendszeri agyállományt infiltrálják és azok anatómiai struktúrái mentén terjedni képesek. Ezen hisztológiai struktúrák a perineuronális és perivaszkuláris szatellózis, valamint a szubpiális, valamint fehérállományi rostkötegek (corpus callosum) mentén mutatott terjedés

Az extracelluláris mátrix több ponton kapcsolódik a peritumorális invázió folyamatához. Egyrésztől részt vesz a tumorigenesis egyik kiindulási pontjának tekinthető glioma őssejt niche kialakításában, valamint a daganatsejt migrációjának minden lépését mediálja.

Az invázióban 4 jellegzetes lépést különböztethetünk meg.

1. A sejtek leválnak a primeren növekvő tumoros masszáról

A tumorsejtek kadherin-mediált junciók segítségével tartják fent a sejt-sejt közötti kommunikációjukat. Elsőként ezen junciók destabilizálódása jön létre, majd a fent részletezett

EMT révén a glioma sejtek adhéziós tulajdonságai megváltoznak, a sejtek motilisabb karaktert nyernek.

2. Daganatsejtek kötődése az ECM-hez

A glioma sejtek több különböző módon képesek az ECM-el kapcsolódni. Ezen receptor – ligand kötődési mintázatban a daganatsejtek felszínén lévő receptorok, valamint az ECM különböző ligandjai között valósul meg az interakció. Kiemelt szerep jut ezen folyamatban az integrin receptor molekulacsaldának, mely a lamininekkel, tenascin molekulákkal, valamint fibronektinnekkel is ezen kötődés létrejöttét szolgálja. Az agyi ECM állományban excesszív mennyiségben lévő hialuronán kötésére alkalmas CD44 receptor szintén ezen folyamatban játszik döntő szerepet.

3. ECM degradációja

Az ECM remodelációja elengedhetetlen része az tumorsejt invázió létrejöttének. Ezen enzim-mediált folyamatban szerepet játszanak a mátrix-metalloproteinázok, a hialuronidázok, valamint egyéb katepszin típusú proteázok is.

4. Citoszkeletális kontrakció révén megvalósuló mozgás

A sejtek, a tumorsejt – ECM relációban megvalósuló, fokális adhéziós kinázok által közvetített jelátvitel révén, a citoszkeletális kontraktilitásnak köszönhetően tudnak mozogni. A sejt polarizálttá válik és membrán protrúziók keletkeznek, amelyek aktin filamentumokat és különböző strukturális és jelátviteli molekulákat tartalmaznak. Az aktin filamentumok és a miozin II molekula izoformáinak bevonásával létrejött citoszkeletális kontrakció folyamata az, amely a sejtek mozgásáért felelős.

1.4.1. Az extracelluláris mátrix összetétele

A központi idegrendszerben az ECM-et legnagyobb mennyiségben képviselő molekula a hialuronsav (HA), amely egy fehérjéhez nem kötött, térkitöltő szénhidrát óriásmolekula, ún. glükózaminoglikán (GAG). A HA kötésében részt vevő molekulák a CD44, valamint

CD168/RHAMM (receptor for hyaluronate mediated motility). A glükózaminoglikánok tulajdonságát az összetételük, a kapcsolódó szulfát-csoportok és szacharidok határozzák meg. A csoport jellemző molekulái: kondroitin-szulfát, keratán-szulfát, dermatán-szulfát, illetve a heparán-szulfát. Legfontosabb szerepüket a proteoglikánok felépítésében játsszák.

A proteoglikánok egy központi fehérjeláncból állnak, ezen fehérjelánchoz pedig különböző számú és minőségű GAG oldallánc csatlakozik. Fontos csoport a hialuronsav kötésére képes hialadherineinek csoportja, melyen belül a kondroitin-szulfát GAG oldalláncokat is kötő lektikánok kiemelt szerepűek. Lektikánnak (kondroitin-szulfát proteoglikánok [CSPG]) tekinthető: brevikán (BEHAB – brain enriched hyaluronan binding), verzikán, neurokán, aggregán.

erek, subpiális, subependimális régió bazális membránjában találhatóak legnagyobb mennyiségben a fibrilláris glikoproteinek, az ún. rostos ECM állomány alkotói. Ebbe a csoportba tartoznak a kollagének, a fibronektin, valamint a laminin molekulák is. Kiemelendő, hogy a szervezet más részeiben a szövetek strukturális vázát ezen rostos ECM elemek adják. Az agy ebből a szempontból kivétel, a vázat, összességében az ismert lágy szöveti tulajdonságait, leginkább a hialuronsav határozza meg. Az asztrocitómák esetében a grádus növekedésével fokozódó kollagén, fibronektin és laminin termelés jár, glioma sejtek inváziójában – lokalizációjukból is jól láthatóan – a fibrilláris glikoproteinek jelentős szerepet játszanak. A lamininek 3 hosszú polipeptid láncból (α, β, γ) épülnek fel, amelyeket diszulfid hidak kötnek össze, az integrinokkal, mint sejt felszíni receptorokkal képeznek komplexet. A sejtadhézió túl, az invázió, proliferáció, differenciáció folyamataiban vesznek részt.

Az integrinek fehérje természetű transzmembrán-receptorok, dimer szerkezettel rendelkeznek: α - és egy β -alegységből állnak. 8 különböző α - és 18 β -lánc kombinálódhat összesen 24 különböző heterodimerré. A dimer szerkezet meghatározza az adott receptor kötési tulajdonságait. Hatással vannak a sejtmozgás irányára, hiszen ligandjukhoz történő kötődés következtében képesek fokális

adhéziós klaszterek létrehozására, jellemzően az inváziós irányt meghatározó protrúziók területén.

A mátrix metalloproteinázok (MMP), cink-dependens endopeptidázok, a legismertebb ECM bontó proteázok. Fokozott expressziójuk migrációs széleken figyelhető meg, ligandjaik: a lektikánok, valamint a fibrilláris glikoproteinek.

2. Célkitűzés

Kutatásink révén azon kérdéskörre kívántunk választ kapni, hogy a diffúz, infiltratív asztrocitaer daganatok, valamint a glioblasztoma esetén a peritumorális infiltrációban szerepet játszó releváns extracelluláris mátrix alkotók, illetve ezek sejtfelszíni receptorainak expressziója, valamint ezen molekulák csoportjának (inváziós panelének) expressziós mintázata, az ún. inváziós spektrum korrelációt mutat-e:

- 1) GRADE 2 DIFFÚZ, INFILTRATÍV ASZTROCITOMÁK ELTÉRŐ PROGNÓZISSAL BÍRÓ CSOPORTJAIVAL,
- 2) GRADE 2 ÉS 3 DIFFÚZ, INFILTRATÍV ASZTROCITOMÁK ELTÉRŐ PROGNÓZISSAL BÍRÓ CSOPORTJAIVAL
- 3) GRADE 3 DIFFÚZ, INFILTRATÍV ASZTROCITOMÁK ONKORADIOTERÁPIA ELŐTTI ÉS RECIDÍV, ONKORADIOTERÁPIÁBAN MÁR RÉSZESÜLT BETEGCSOPORTJAIVAL,
- 4) GLIOBLASZTOMÁVAL DIAGNOSZTIZÁLT BETEGEK ELTÉRŐ PROGNÓZISSAL BÍRÓ CSOPORTJAIVAL?

Az adott csoportösszehasonlításban vizsgálatra került ECM molekulák alkották az inváziós panelt. Ezen molekulákat egyedileg gén-, valamint fehérje expressziós szinten is összehasonlítottuk, azzal a céllal, hogy azok specifikus peritumorális infiltrációhoz köthető kontribúcióját értékelni tudjuk. Továbbá, a molekulák expressziójának együttes értékelése is megtörtént (inváziós spektrum), mellyel pedig az adott vizsgálati csoportra jellegzetes expressziós mintázatot kívántuk értékelni és ezáltal az invázós aktivitás és a prognózis közötti összefüggést feltárni.

3. Módszertan

3.1. Betegek és tumorminták

A vizsgálataink során felhasznált tumormintákat a betegek kezelési tervének részeként indikált idegsebészeti műtéti ellátás során gyűjtöttünk. A mintákat a műtéti eltávolítást követően -196 °C hőmérsékletű folyékony nitrogén felszínén konzerváltuk, majd -80 °C -on ultramélyhűtőben kerültek tárolásra a felhasználásukig. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Pathológia, valamint Anatómiai, Szövet-, és Fejlődéstani Intézetében végeztük, a betegekhez tartozó formalin fixált, paraffinba ágyazott szövettani blokkokból készült metszeteken. A betegellátástól teljesen függetlenül futó szövetmintákat tapasztalt neuropatológus elemezte. Az Agydaganatbank a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) engedélyével rendelkezik, és a kutatási célú vizsgálatok minden esetben az érintett betegek írásos beleegyezésével történtek. Engedély száma: 51450/2015/EKU (0411/15)

A követési időszakunk 2003. január és 2020. februárja közé esett, minden vizsgált beteg esetében a kezelés, illetve a követés a DE-KK Idegsebészeti és Onkológiai Klinikán történt. A feldolgozásra kerülő minták minden esetben a DE-KK Idegsebészeti Klinikán működő Agydaganat- és Szövetbankból származtak.

A vizsgált csoportok esetében hisztó-patológiai értelemben vett asztrocitaer és glioblasztoma típusú daganatok összehasonlítását végeztük, melynek meghatározását képzett neuropatológus végezte a diagnózisalkotás időpontjában érvényben lévő protokollok alapján.

3.1.1. Inváziós panel

Génexpressziós szinten az invázióban szerepet játszó ECM mátrix molekulákból álló inváziós panelünk vizsgálatát végeztük, mely 25 ECM molekulát tartalmazott. Ezen panelből a Gr. 2 asztrocitómák vizsgálatában 22 molekula esetében, a Gr. 3 csoportban 23 molekula esetében, a glioblasztoma csoportban pedig 18 molekula esetében történt értékelhető azonosítás. Az inváziós panel részét képezi, azonban szoros értelemben véve nem invázióhoz kapcsolható ECM molekula a GFAP, valamint MKI67. Előbbit a gliális eredet ellenőrzésének céljából, míg utóbbi a tumorszövet jelenlétének igazolására határoztuk meg. Fehérje expresszió vonatkozásában a Gr. 2 tumorok esetében 10 molekula esetében, míg a glioblasztoma esetében minden vizsgálat molekula esetében történt meghatározás. A Gr. 3 daganatcsoport esetében, valamint a glioblasztoma prognosztikus csoportjaiban a kiemelt szereppel bíró ECM molekulák illusztratív célú immunhisztokémiai festését végeztük.

3.1.2. Eltérő prognosztikai csoportú Gr. 2 asztrocitómák

Az alacsony grádusú Gr. 2 diffúz asztrocitómák esetén eltérő prógnózissal bíró betegcsoportokat hasonlítottunk össze. Az alacsony grádusú daganatok esetében a prognosztikai csoportokba történő besorolást a túlélési adatok alapján végeztük el: kedvező prognosztikai csoportba a legalább 40 hónap teljes túlélést mutató betegeket soroltuk (N = 11), míg az ennél hamarabb elhunyt betegek a kedvezőtlen prognosztikai csoportba kerültek (N = 8). A csoportok között összehasonlításra került a klinikai paraméterek tekintetében az életkor, a daganat lokalizációja és oldalisága, valamint a primer műtéti ellátás radikalitásának mértéke. A vizsgált paraméterek vonatkozásában nem igazolódott szignifikáns különbség a két csoport között. A túlélési idők vonatkozásában az átlagos teljes túlélési idő, valamint a progressziómentes túlélési idők összevetését végeztük. Minden beteg esetében meghatároztuk a kórlefolyás során észlelt különböző progressziómentes túlélési időket (PFS), amelyeket időrendi sorrendiség alapján

jelöltünk. Ezen túlélési időket minden esetben további terápiás intervenciót szükségessé tévő, radiológiailag és/vagy klinikailag igazolt progresszió alapján különítettük el. A PFS I. értékek összevetése nem mutatott szignifikáns különbséget.

Megjegyzendő, hogy a jobb prognosztikai csoportba tartozó három eset vonatkozásában a reoperációra elsősorban életminőséget befolyásoló okból (epilepsziás rosszullét) és nem érdemi tumor progresszió miatt került sor. Mindhárom esetben az operációt követő négy hónapon belül történt a reoperáció, amely a PFS vonatkozásában így torzító tényezőnek tekinthető. Ennek megfelelően ezen betegek esetében a PFS I + II. idők képezték az elsődleges progresszióig eltelt időt számításainkban. A torzító tényező kiküszöbölése révén a két csoport között progressziómentes túlélési idejében szignifikáns különbség igazolható ($p=0.02^*$). A PFS II. idők összehasonlítására hét esetben volt az egyes csoportok között lehetőség, a két csoport között ezen paraméter tekintetében is szignifikáns különbség igazolható ($p=0.04^*$).

Az inváziós panelt alkotó 25 molekulából 22 invázióban szerepet játszó ECM molekula mRNS expressziójának egyedi összehasonlítását végeztük el a két prognosztikai csoport között.

Az inváziós panelünk részét képező 10 ECM molekula esetében azok fehérje expressziós értékeinek megítélésére immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. A molekulák biológiai funkcióit alapul véve 4 molekula esetében csak az extracelluláris mátrix, míg további 6 molekula esetében mind az ECM állomány, mind a tumorsejtek immunhisztokémiai értékelését is elvégeztük.

3.1.3. Onkoterápia előtti és utáni Gr. 3 asztrocitómák

A Gr. 3 asztrocitómák esetében „A” csoportba tartoznak azon esetek, ahol a molekuláris biológiai feldolgozásra került tumorminta az első daganatsebészeti beavatkozás kapcsán került eltávolításra, és ezt megelőzően radio-onkoterápiás kezelésre még nem került sor („primer csoport” $n=12$), míg a „B” csoportba azon esetek tartoznak, ahol a minták eltávolítása tumorprogressziót követően indikált reoperatio kapcsán történt, így megelőző radio-onkoterápiás

kezelésben is részesültek („kezelésben részesült csoport”, n=9). A kezelésben részesült csoport esetében 5 esetben csak sugárterápia alkalmazására került sor, 1 esetben csak onkoterápia alkalmazása történt, míg 3 esetben kombinált radio-onkoterápia alkalmazása történt.

A kliniko-patológiai vonatkozásában összehasonlításra került a klinikai paraméterek az életkor, a daganat lokalizációja és oldalisága, a primer műtéti ellátás radikalitásának mértéke, valamint a teljes túlélés. Statisztikailag szignifikáns eltérés egyik vizsgálat paraméter vonatkozásában sem igazolható a két csoport között.

Az inváziós panelt alkotó 25 molekulából 23 invázióban szerepet játszó ECM molekula mRNS expressziójának egyedi és együttes összehasonlítását végeztük el a két csoport között.

A Gr. 3 asztrocitaer daganatok esetében statisztikailag értékelhető immunhisztokémiai festésre nem volt lehetőségünk, kizárólag illusztratív céllal történt IHC festés.

3.1.4. 2 és 3 grádusú gliomák prognosztikai csoportjai

A grádusok közötti összehasonlítás révén a Gr. 2 rosszabb prognosztikai csoportba tartozó betegek, valamint a Gr. 3 betegcsoport vizsgálatát végeztük el. Ezen összehasonlítás jelentősége az inváziós spektrum prognosztikus szempontú vizsgálata az alacsonyabb grádusú gliomák esetében, az inváziós spektrum rizikócsoport meghatározásban történő alkalmazhatóságának értékelésére.

Az összehasonlításra került a klinikai paraméterek az életkor, a daganat lokalizációja és oldalisága, a primer műtéti ellátás radikalitásának mértéke, valamint a teljes túlélés. Statisztikailag szignifikáns eltérés kizárólag a betegek életkorának különbségében mutatkozott ($p=0.003$).

Az inváziós panelt alkotó 25 molekulából 22 invázióban szerepet játszó ECM molekula mRNS expressziójának egyedi és együttes összehasonlítását végeztük el a két csoport között.

3.1.5. Eltérő prognózissal rendelkező glioblasztomás betegcsoportok

A legnagyobb esetszám bevonásával készült összehasonlításra a glioblasztoma esetében volt lehetőségünk, ezen alcsoport esetében összesen 132 beteg adatát sikerült bevonnunk. A glioblasztomával rendelkező betegeket két prognosztikai csoportra osztottuk a teljes túlélési idő alapján. A 24 hónapnál rövidebb túlélési idejű betegeket „rosszabb prognózisú betegeknél” tekintettük, ők jelentették az A csoportot (n=74), míg azokat a betegeket, akik 24 hónapig vagy tovább éltek, „jobb prognózisú betegeknél” tekintettük, ők képezték a B csoportot (n=58). Az átlagos teljes túlélési idő tekintetében a 24 hónapos küszöbérték választásának indoka, hogy azon betegek akik a Stupp-protokoll szerinti kezelést követően bevacizumabot kapnak, 24 hónapos átlagos teljes túlélési idővel jellemezhetőek. Ezen tény a szakirodalmi adatok, valamint az intézményünk által korábban publikált betegadat elemzés is alátámasztja.

A betegeket radioterápiával, valamint egyidejű és fenntartó temozolomid kemoterápiával (Stupp-protokoll alapján) kezelték a tumor reszekciója után. A daganat kiújulását követően a betegek bevacizumab monoterápiát kaptak az esetleges ismételt progresszió megjelenéséig.

Az A csoportban a betegek medián életkora 61,0 év (CI: 57,97 – 63,28 év), míg a B csoportban 58,5 év (CI: 55,53 – 61,47 év). A statisztikai elemzés szignifikáns különbséget mutatott ki a két csoport között ($p = 0,0293$). A B csoport betegeinek preoperatív és posztoperatív Karnofsky-pontszáma (KPS) ugyan magasabb volt, de a KPS értékek között nem volt szignifikáns eltérés. A daganatok klinikai jellemzői egyéb tekintetben nem különböztek a két csoport között.

A Kaplan-Meier elemzések megerősítették a feltételezett különbségeket mind a progressziómentes túlélés (PFS), mind az általános túlélés (OS) tekintetében az A és B csoport betegei között (6. ÁBRA). Az A csoportban a medián túlélés 9,0 hónap (CI: 8,14 – 9,86 hónap) volt, míg a jobb prognózisú betegek medián túlélése 27,0 hónap volt (CI: 22,17 – 31,83 hónap) ($p < 0,0001$). A medián PFS különbségek is statisztikailag szignifikánsak: az A csoportban 5,5 hónap (CI: 3,79 – 7,21 hónap), míg a B csoportban 8,5 hónap (CI: 4,36 – 12,64 hónap) volt ($p = 0,024$).

Az inváziós panelt alkotó 25 molekulából 16 invázióban szerepet játszó ECM molekula mRNS expressziójának egyedi és együttes összehasonlítását végeztük el a két csoport között. A GBM invázióval kapcsolatos 16 extracelluláris mátrix (ECM) molekulájának fehérjeexpresszióját immunhisztokémiai festés segítségével is határoztuk meg.

3.2. mRNS expresszió meghatározása

Az ECM alkotók transzkripció szintjének meghatározása kvantitatív reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR) történt. A gyorsfagyasztott mintákat első lépésben szétzúztuk, majd TRI reagenst (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) használva homogenizáltuk 25 °C-on. A teljes RNS-t a gyártó protokolljának megfelelően izoláltuk a TriReagent lizátumokból. Az RNS mennyiségét és tisztaságát egy NanoDrop® ND 1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) mértük. Ezt követően reverz transzkripciót végeztünk, hogy a teljes RNS-t egyszálú komplementer DNS-sé (cDNS) alakítsuk egy High Capacity cDNA Archive kittel, RNasin jelenlétében (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Ezután a cDNS-t egy mikrofluidikai kártyára töltöttük (100 ng teljes RNS-nek megfelelő cDNS/port). A TaqMan® alacsony denzitású array kísérletek elvégzéséhez egy Applied Biosystems 7900HT valós idejű PCR-rendszert használtunk Micro Fluidic Card frissítéssel (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). A mikrofluidikai kártyákat az SDS 2.1 szoftverrel (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) elemeztük relatív kvantifikációs vizsgálatok céljából, és a ciklus küszöb (Cq) értékeket további elemzésre exportáltuk. A β 2-mikroglobulin, β -actin és a glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) housekeeping gének mutatták a legkisebb variációt a minták között. A GAPDH-t használtuk referencia génként a Δ Cq érték kiszámításához minden gén esetében. Az expressziós értékeket a korábban leírt komparatív Cq módszerrel ($\Delta\Delta$ Cq) határoztuk meg.

3.3. A fehérje expresszió meghatározása

A fehérjeexpressziót szemi-kvantitatív immunhisztokémiai (IHC) meghatározással mértük. A friss fagyasztott fagyasztott mintákat egy éjszakán át 4°C-on 4%-os paraformaldehid-oldatba merítettük, majd paraffinba ágyasztuk. Az IHC méréseket a Debreceni Egyetem Patológiai, valamint Anatómiai, Hisztológiai és Embriológiai Tanszék laboratóriumaiban végeztük. A metszeteket először xilol-oldattal eltávolítottuk a paraffinból, majd csökkenő koncentrációjú etanol-oldatokkal rehidratáltuk. Ezt követően hőindukált antigénfeltárást végeztünk citrátpufferben (pH 6,0). Az elsődleges antitesteket a gyártó utasításai szerint hígítottuk, majd 48 órán át inkubáltuk. A glioblasztoma minták esetében a vizualizálást a MACH 4 Universal AP Polymer Kit® (Biocare Medical, CA, USA) és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) alkalmazásával végeztük, hematoxilinnal végzett ellenfestéssel. Minden metszetsorozathoz pozitív és negatív kontroll metszeteket is megfestettünk. Az illusztratív cézzalattal készült Gr. 3 minták vizualizációját másodlagos fluoreszcens ellenanyagok 1:500 hígításban történő alkalmazásával végeztük, és egy éjszakán át inkubáltuk. A metszetek festésére 1:2000 hígítású DAPI-t használtunk, majd Hydromount segítségével lezártuk őket. A festés kiértékeléséhez konfokális mikroszkópiát alkalmaztunk.

A glioblasztoma minták IHC festének szemi-kvantitatív értékelése az alábbi módszer szerint történt. A fehérje expressziót három független vizsgáló értékelt, minden metszeten véletlenszerűen kiválasztott 10 nagy nagyítású látótérben, szemi-kvantitatív módon. Az értékelés során figyelembe vettük a festődő sejtek és/vagy extracelluláris tér százalékos arányát, valamint a festődés intenzitását. A festődés százalékos arányát az alábbiak szerint osztályoztuk: negatív vagy <10% festődés (0), 10-25% festődés (1), 25-50% festődés (2), 50-75% festődés (3), >75% festődés (4), a Bondarenko et al. által leírt módszer szerint. Az intenzitást 0-tól 3-ig terjedő skálán értékeltük (negatív: -, gyenge pozitivitás: + (1), közepes pozitivitás: ++ (2), erős pozitivitás: +++(3)). Minden metszet kombinált pontszámát a százalékos és intenzitási pontszámok szorzataként számítottuk ki, majd minden minta esetében egy átlagos pontszámot határoztunk meg.

3.4. Statisztikai módszerek

Az adatok statisztikai elemzését egy biomatematikus segítségével végeztük. A betegek klinikai adatainak összehasonlítására kétmintás t-próbát, Mann-Whitney próbát, valamint χ^2 -próbát használtunk, a különböző prognózisú csoportok túlélésének vizsgálatára Kaplan-Meier túlélési analízis készült.

A teljes inváziós panel csoportok közötti összehasonlítása különböző statisztikai osztályozókkal (lineáris diszkriminancia analízis, legközelebbi szomszéd módszer) történt. A statisztikai osztályozók a Weka v3.6 program (University of Waikato, Hamilton, Új-Zéland) használatával, a többi statisztikai próba a GraphPad Prism v8.01 (GraphPad Software, La Jolla CA, USA) statisztikai programmal készült.

4. Eredmények

4.1. Eltérő prognosztikai csoportú Gr. 2 asztrocitómák

4.1.1. mRNS expresszió eredmények

Az extracelluláris mátrix molekulák egyedi összehasonlítása alapján 6 molekula esetében igazolható szignifikáns különbség a génexpresszió vonatkozásában. Ezen molekulák a HMMR /CD168 ($p=0.02^*$); IDH-1 ($p=0.009^{**}$); Laminin α -5 ($p=0.03^*$); MKI-67 ($p=0.03^*$); PDGFA ($p=0.04^*$), valamint verzikán ($p=0.03^*$).

A lineáris diszkriminancia analízis révén ECM molekulák adott prognosztikai csoportra jellemző expressziós mintázata került értékelésre, annak fényében, hogy az adott prognosztikai csoportra jellemző, minden egyes ECM molekulát magába foglaló expressziós mintázatot, az egyedileg értékelt ECM molekula melyik prognosztikus csoport irányába és a többi vizsgált molekula viszonylatában mekkora mértékben befolyásolta.

Sorrendben, a legnagyobb hozzájárulással bíró, ezáltal a differenciálási lehetőséget növelő molekulák: az integrin β -1, integrin α -V, integrin β -5, CSPG-5, HMMR/CD168, CD44, EGFR.

Az ECM molekulák mRNS expressziójának lineáris diszkriminancia analízis statisztikai osztályozóval történt értékelése alapján további származtatott paraméterek meghatározására nyílt lehetőség, így azt mondhatjuk, hogy ezen expressziós mintázaton alapuló prognosztikai csoportosításunk szenzitivitása 87.5 %, míg negatív prediktív értéke 88.9%.

4.1.2. Fehérje expressziós eredmények

Az eredményeink alapján szignifikáns különbség a két prognosztikai csoport között csak az integrin α V tumorsejtek festődési intenzitásában igazolható ($p=0.04^*$). A fehérje expressziós eredményeink konkordáns egyezése figyelhető meg a génexpressziós szinten detektált értékekkel az alábbiak szerint: integrin α V, brevikan, CSPG-5, vezikan, integrin β -5, CD-44, molekulák minden vizsgált paraméterben, míg az MDM2, MMP2, FLT-4 molekulák tumorsejt festődési intenzitásai mutatnak az mRNS expresszióval konkordáns eredményeket.

4.2. Onkoterápia előtti és utáni Gr. 3 asztrocitomák

4.2.1. mRNS expressziós eredmények

Az egyedi ECM molekula összehasonlítás következményeként kizárólag az integrin α -3 molekula esetében [p=0.04*] igazolható szignifikáns különbség a génexpresszió vonatkozásában a vizsgálat betegcsoportok között.

A lineáris diszkriminancia analízis révén végzett statisztikai osztályozás értelmében sorrendben a legnagyobb mértékű differenciálási lehetőséget jelentették a GFAP, HMMR, CD44, integrin α -3, IDH-1, integrin α – V molekulák. A lineáris diszkriminancia analízis alapján elvégzett csoportazonosítás szenzitivitása 85.7 %, míg negatív prediktív értéke 88.9 %.

4.2.2. Fehérje expressziós eredmények

A Gr. 3 asztrocitaer daganatok esetében statisztikailag értékelhető immunhisztokémiai festésre nem volt lehetőségünk, kizárólag illusztratív céllal történt IHC festés.

4.3. Alacsonyabb grádusú gliomák (Gr 2,3) prognosztikai csoportjai

4.3.1. mRNS expressziós eredmények

mRNS expressziók összehasonlításában a CSPG-5 ($p=0.02^*$), az IDH-1 ($p=0.01^*$) és az integrin α -3 ($p=0.0003^{***}$) esetében igazolható szignifikáns különbség. Mindhárom molekula vonatkozásában a Gr. 3 csoportban igazolható magasabb expresszió. A lineáris diszkriminancia analízis révén végzett statisztikai osztályozás értelmében sorrendben a legnagyobb mértékű differenciálási lehetőséget jelentették az MDM2, HMMR, integrin- β 5 és brevican molekulák. A különböző grádusú asztrocitómák elkülönítése az inváziós spektrum alkalmazásával nagy pontosságúnak tekinthető, szenzitivitás 93.7 %-nak, specificitás 100%-nak adódott.

4.4. Eltérő prognózissal rendelkező glioblasztomás betegcsoportok

4.4.1. mRNS expressziós eredmények

A glioblasztoma eltérő prognózissal bíró betegcsoportjainak összehasonlítása jelentős különbségeket mutatott az mRNS expresszió vonatkozásában. Eredményeinket a 8. ÁBRÁN tüntettük fel, ahol az egyes expressziós értékek 10-es alapú logaritmikus skálán kerültek feltüntetésre. A molekulák egyedi összehasonlításában három invázióval kapcsolatos molekula expressziója bizonyult szignifikánsan eltérőnek a két prognosztikai csoportban. Az FLT4/VEGF-3, az MDM2 expressziója, valamint az MMP2 is szignifikánsan magasabb expressziós értéket mutatott a rosszabb prognózisú mintákban ($p = 0,0285$; $p=0,02$ és $p=0,0023$).

Az egyes ECM komponensek elemzése után a legközelebbi szomszéd statisztikai osztályozási módszert alkalmaztuk (nearest neighbor search) az inváziós panel együttes, átfogó elemzésére.

A statisztikai osztályozó algoritmus a következő molekulákat azonosította legfontosabb befolyásoló tényezőkként: CD44, EGFR, FLT4/VEGF-3, IDH1, MMP2, PDGFA, TNC és VCAN.

Ezen ECM komponensek expressziója kulcsszerepet játszhat a különböző prognózisú tumorok elkülönítésében. Az osztályozó a 132 beteg esetéből 94 esetben helyesen azonosította azt, hogy a beteg legalább 24 hónapot fog-e élni, tehát az osztályozó algoritmus segítségével a beteg prognózisa nagy pontossággal azonosítható. A szenzitivitás és a pozitív prediktív érték magasabb volt a rosszabb prognózisú tumorok esetében. A módszer ROC-értéke 0,706, míg a bináris osztályozás minőségét mérő Matthew's korrelációs együttható (MCC), amely -1 és +1 közötti értékeket vehet fel, 0,414 volt.

4.4.2. Fehérje expressziós eredmények

Az elemzett invázióval kapcsolatos fehérjék közül a brevican, CD44, HMMR, integrin- α V és - β 1, valamint MDM2 expressziója mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között.

Az mRNS- és immunhisztokémiai eltérések iránya összhangban volt, kivéve az integrin- β 1 molekulát. A fehérjeexpresszió összhangja alátámasztja az mRNS-expressziós eredményeink relevanciáját.

5. Diskusszió

5.1. Általánosságban

A diffúz, infiltratív asztrocitómák a leggyakoribb malignus központi idegrendszeri daganatok. Az *IDH 1/2* gének mutációs státuszától függően felosztásukban megkülönböztetünk Gr. 2,3 csoportba sorolandó alacsonyabb grádusú asztrocitómákat, valamint a korábban szekunder glioblasztomának tekintett, ún. high-grade Gr. 4 asztrocitómát. Glioblasztomáról kizárólag *IDH 1/2* vad típusú esetekben beszélünk. A daganatokat jellemző peritumorális infiltráció egyrésztől diagnosztikus kritériumnak tekinthető, másrésztől pedig meghatározó a daganatok kezelése kapcsán is. A daganatsebészeti szempontból kívánatos teljes eltávolítás a daganatsejt eredeti tumormasszához vonatkoztatott több centiméterre történő migrációja miatt nem lehetséges, recidíva kialakulása minden esetben bekövetkezik. Az infiltráció egy több lépésből álló aktív, a sejtközötti állományt kitöltő extracelluláris mátrix komponensek aktív közreműködése mellett megvalósuló dinamikus folyamat. Az extracelluláris mátrix molekulák mennyiségi és minőségi meghatározása az eltérő prognózisú, valamint más-más kezelési algoritmusban részesült betegcsoportokban mutatott expressziós mintázata alapján prognosztikus, valamint terápiás előnyt is biztosíthat a neuro-onkológusok számára. Tekintve mind az alacsonyabb grádusú daganatok között ismeretes eltérő növekedési potenciált mutató alcsoportokat, mind a glioblasztoma esetében ismeretes hosszú túlélési idővel jellemezhető betegalcsoportot rizikócsoportokat definiáló prognosztikus markerek meghatározása jelentős klinikai segítség. A glioblasztoma a legagresszívabb humán malignus megbetegedés. A vér-agy gát által is privilégizált intrakraniális lokalizáció miatt mind a lokális, mind a szisztémás kezelési lehetőségek is korlátozott effektivitásúak. Továbbá, a kifejezett intratumorális heterogenitás, valamint a klonális evolúció révén a terápia-rezisztens sejtcsoportok kiszelektálódása is aggasztó mértékű. A jelenleg alkalmazott kemoterápiás ágensek leginkább anti-proliferatív hatásmechanizmust képviselnek, az ezidáig vizsgálat tárgyát képező inváziót gátló gyógyszerkészítmények számottevő

eredményt nem mutattak sem a progressziómentes-, sem a teljes túlélés vonatkozásában. Kutatócsoportunk a fent említett problémakörök mentén vizsgálta az alacsonyabb grádusú asztrocitómák, valamint a glioblasztoma vonatkozásában a peritumorális infiltrációban szerepet játszó ECM molekulák szerepét eltérő prognosztikus, valamint kezelési algoritmusban részesült betegcsoportok esetében, az ECM molekulák egyedi hozzájárulásának, valamint expressziós mintázatának prognosztikus célú felhasználásának céljából.

5.2. A Gr. 2 asztocitómák prognosztikus csoportjai az inváziós spektrum alapján elkülöníthetők

Újabban a Gr. 2, valamint Gr. 3 csoportba sorolható gliomákat, így az asztrocitaer folyamatokat is az alacsonyabb grádusú gliomák terminusa szerint említik. A klasszikus hiszto-patológiai jellemvonásokon, továbbá a sejtek mitotikus aktivitásán alapuló elkülönítés hátrányait jól példázza ezen betegcsoport, hiszen jelentősen különböző lehet a terápiás ellátási algoritmus, végsősoron eltérő prognosztikus várakozásokkal bírnak a korábban Gr. 2 diffúz asztrocitómáknak nevezett csoportba sorolható diffúz gliomák. A molekuláris markerek fontosságát hangsúlyozza, hogy azonos szövettani csoportba sorolható alacsonyabb grádusú gliomák a megegyező terápia ellenére is igen eltérő progresszió mentes (PFS) és teljes túlélési adatokat (OS) mutatnak. Ennek megfelelően ma már a korábban homogénnek tekintett alacsonyabb grádusú gliomák csoportján belül a különböző terápia meghatározásának elősegítésére alacsony és magas rizikójú alcsoportokról beszélhetünk. Az alacsony grádusú asztrocitaer daganatok esetében a rizikócsoportok meghatározása a posztoperatív onkológiai ellátást befolyásolja. Jelenleg sem egyértelmű a tudományos állásfoglalás, miszerint az alacsony grádusú gliális daganatok esetében pontosan milyen feltételek teljesülése mellett szükséges közvetlenül posztoperatíván radio-, és/vagy onkoterápia alkalmazása. Megfordítva a kérdést, egyértelműen nem határozható meg azon alacsony növekedési potenciállal bíró *low-risk* betegek köre, akiknél csak a szoros követés, az ún. watchful waiting stratégia alkalmazása elegendő. Jelen vizsgálatunkban a Gr. 2 asztrocitómák prognosztikai csoportjainak összehasonlításában az expressziós mintázaton

alapuló prognosztikai csoportosításunk szenzitivitása 87.5 %, míg negatív prediktív értéke 88.9% a lineáris diszkriminancia analízis alapján. Összeségében tehát elmondható, hogy az inváziós spektrum a rossz prognosztikai csoportba tartozó grade 2 astrocytomák kiválasztásához megfelelő eszköznek bizonyulhat, rutinszerű felhasználásával ezen rizikócsoportok elkülönítésében kiegészítő eszközként funkcionálhat.

A prognosztikus csoportok között egyébiránt több molekula is szignifikáns különbséget mutatott mind transzkripció (HMMR, vezikán, PDGF-A Laminin α -5), mind transzlációs szinten (integrin α V) igazolva. Eredményeink között jelentős konkordancia figyelhető meg, mely a molekula egyedi szignifikáns szerepére hívja fel a figyelmet a peritumorális infiltráció folyamatában. (ld. Infiltrációban kiemelt szerepet játszó ECM molekulák alfejezet).

5.3. A diffúz, infiltratív gliomák esetében alkalmazott kezelési stratégia korlátozott anti-invazív potenciállal bír

A diffúz gliomák esetében alkalmazott kezelési stratégia jellegét, a terápiás targetek jellemzőit, valamint a túlélési mutatókra és életminőségére gyakorolt hatását tekintve elmondható, hogy a gliális daganatok terápiájában érdemi áttörés a temozolomid, valamint a bevacizumab bevezetése óta nem történt. Ennek okaként a központi idegrendszer privilégizált helyzete jelölhető meg elsődleges okként. A radioterápia vonatkozásában nehéz a megfelelő céltér fogat meghatározása, hiszen az infiltráló sejtcsoportok a standard radiográfiás módszerekkel csak korlátozottan, vagy egyáltalán nem mutathatóak ki. A sugárterápia dózismennyiségének és eloszlásának meghatározásakor, főként a kedvezőbb túlélési mutatókkal rendelkező alacsonyabb gradusú gliomák vonatkozásában figyelembe kell venni a sugárterápia kognitív és egyéb magasabb rendű agyi funkcióra gyakorolt hosszútávú hatását is. Az onkoterápia esetében pedig a központi idegrendszeri penetráció, valamint a terápia rezisztens mutációk által kisselektálódó gliomasejtcsoportok jelentik a legnagyobb kihívást.

A Gr. 3 asztocitómák vonatkozásában végzett vizsgálatunk eredményei alapján jól látható, hogy az ECM molekulák expressziós mintázatán alapuló elkülönítés a két csoport között ugyan jó hatásfokú, azonban az eredmények teljes körű értékelése alapján szembeűnő, hogy az integrin α -3 az egyedüli molekula, mely szignifikáns eltérést mutatott a két betegcsoport között. Ezen felül, a nem szignifikáns expressziós értékek eltéréseit jelző fold change változások sem utalnak számottevő expressziós különbségekre, valamint a molekulák többsége esetében a kezelésben részesült betegcsoport esetében mutatható ki magasabb expressziós érték. Eredményeink azt a feltételezést erősítik, hogy a sugárterápia és az antiproliferatív kemoterápia a gliomák invazív potenciáljára számottevő hatással nem bír.

5.4. A Gr. 2 és Gr. 3 diffúz, infiltratív asztrocitómák csoportjai egymással átfedést mutatnak – a jelenlegi grádusmeghatározás önmagában nem biztosít teljeskörű prognosztikus információt

Az alacsonyabb grádusú gliomák relevanciája a korábbiakban részletezésre került. Ezen fogalom megalkotásával kívánták egy platformra hozni azon korábban külön besorolásba eső (Gr. 2 és Gr. 3) daganatokat, melyek habár hiszto-morfológiailag különbözőek, de biológiai és klinikai viselkedés szempontjából összetartozó entitásoknak tekinthetők, ezáltal a kezelési stratégiájuk együttesen határozandó meg. A különböző grádusú daganatok összehasonlítását célzó vizsgálati csoportjaink ezen elv mentén kerültek meghatározásra. Megjegyzendő, hogy a két vizsgálati csoport egyértelmű homogenitása az inváziós spektrum alapján nem igazolható, azonban kiemelendő, hogy az egyedi molekuláris összehasonlításban, az egyedi szignifikancia szintjét a mitotikus aktivitást jelző MKI67 molekulán túl leginkább a markáns invazív potenciált jelző, valamint grádusértékekkel összefüggésbe hozható expressziós szint emelkedést mutató CSPG-5, valamint integrin α -3 molekulák mutattak. Vizsgálatunkban ezen molekulák a magasabb grádusú minták esetében mutattak magasabb expressziós értékeket. Egyebiránt, számottevő egyedi különbség nem igazolható az általunk végzett összehasonlításokban.

5.5. Az inváziós spektrum hatékony prognosztikus marker glioblasztomás betegek esetében

Megállapításra került, hogy az extracelluláris mátrix (ECM) komponensei glioblasztoma esetében is, transzkripciós és transzlációs szinten is eltérő expressziót mutatnak. Az FLT4, MDM2 és MMP-2 gének mRNS-expressziója szignifikánsan különbözött a két csoport között, továbbá az MDM2 esetében fehérje expressziós szinten is szignifikáns különbség volt igazolható. Az FLT4 és az MMP-2 esetében pedig elmondható, hogy a statisztikai osztályozó által kulcsmolekulaként kerültek kiválasztásra a különböző prognosztikai csoportok elkülönítésében.

A legközelebbi szomszéd módszer elvén alapuló statisztikai osztályozó algoritmus képes volt az inváziós spektrum alapján azonosítani az egyes minták prognosztikai csoportjait. A módszer nagy pontossággal meghatározta, hogy a beteg a rosszabb vagy a jobb prognózisú csoportba tartozik-e. Klinikai szempontból ez kiemelt jelentőségű, hiszen ezáltal gyakorlatilag a szövettani meghatározással egyidejűleg van mód az egyéni beteg túlélésére vonatkozó információt nyerni. A rosszabb prognózisú betegek esetében mutatott magasabb pozitív prediktív érték segít azon betegek azonosításában, akik kezelését intenzívebbé szükséges tenni a rendelkezésünkre álló módszerek mellett. Eredményeink továbbá kiegészítő információt biztosítanak a glioblasztomák molekuláris összetételéről is, így a jövőben lehetővé válhat a megfelelő anti-invazív terápiás szer kiválasztása.

5.6. Az infiltrációban kiemelt jelentőségű, terápia target molekulaként szerepeltethető ECM molekulák és azok jellemzői

Az invazivitás kérdéskörének vizsgálata, valamint az egyes ECM molekulák vonatkozásában elérhető információk a legtöbb esetben a glioblasztomára vonatkoztathatóan elérhetőek. Eredményeink révén az egyes karakterisztikus molekulákról rendelkezésünkre álló információmennyiséget kívántuk bővíteni az alacsonyabb grádusú gliomák kérdéskörén belül, esetleges terápiás targetként való felhasználásuk megjelölésével együttesen.

Az alábbiakban a vizsgált csoportokban konzekvensen releváns molekulaként megjelölt ECM molekulák szerepét kívánjuk kifejteni:

Az integrin molekulacsalád szerepe a peritumorális invázióban régóta a tudományos érdeklődés középpontjában áll. Az integrinek heterodimer szerkezetű, a glikoproteinek családjába tartozó, sejtfelszíni transzmembrán receptorok, melyek alpha-, valamint béta-alegységekből épülnek fel, mely alegységek a receptor ligand iránti specificitását is meghatározzák. Ligandok alapján történő csoportosítás szerint megkülönböztethetőek kollagén-, laminin-, RGD [arginin-glicin-aszpartát) aminosav szekvencia segítségével demerizációra képes integrinek, valamint leukocita receptorok. Intrinzik aktivitással nem rendelkeznek, fokális adhézis kinázok (FAK) segítségével képesek a downstream jelátviteli útvonalak aktivitálására. Az invázió részjelensége a tumorsejt, valamint a tumor mikrokörnyezet, és az extracelluláris mátrix strómális állománya közötti interakció, melyet az integrin molekulák több vonatkozásban is segítenek. Jelátviteli útvonalak aktiválása révén angiogenetikus, valamint proliferatív jeleket is közvetítenek, valamint kihorgonyozást biztosító, fizikális tényezőként is szolgálnak.

A béta-1 alegység a nyolc béta alegység közül az egyik legfontosabbnak tekinthető, több alpha-alegységgel képes heterodimer formációt kialakítani a perivaszkuláris térben. Ezen alegység ellen használt neutralizáló antitest in vitro kísérletek alapján önmagában is képes az inváziós potenciál csökkenését előidézni, azonban, a klinikai gyakorlatban használt érújdonképződés gátló kezelés

(bevacizumab) hatását is potenciózni képes. Vizsgálatunk egyértelműen megerősítette ezen molekula prognosztikus szerepét, az eredményeink alapján a rosszabb prognosztikus csoport azonosítását segítette elsősorban.

Az integrin αV a RGD-szekvencia felismerésével dimerizációra képes integrin alegységnek tekinthető. Ligandjai közé tartozik többek között a fibronectin, fibrinogén, valamint tenascin. Az αV alegység szerepe elsősorban magas grádusú gliális folyamatokban került részletezésre. Szerepét mutatja, hogy cilengitid néven az $\alpha V\beta 3$ és $\alpha V\beta 5$ alegységek elleni specifikus neutralizáló antitest több vizsgálat tárgyát is képezte. Az eddigi eredmények alapján a mindennapi gyakorlatba nem került be, azonban továbbra is kifejezett tudományos érdeklődésre tart számot ezen alegység neutralizálása. Jelen vizsgálatunkban az αV alegység szerepe mindhárom vizsgálati csoportban jelentős hozzájáruló tényező volt a csoportok közötti elkülönítésben. Eredményeink az alacsonyabb grádusú gliomák esetében az integrin αV peritumorális infiltrációt befolyásoló jelentős szerepét erősítették meg, ígéretes prognosztikus, valamint anti-invazív molekuláris targetnek is tekinthető ezen, a molekula szempontjából kevésbé vizsgált betegcsoport vonatkozásában is.

Az integrin családból kiemelendő továbbá az integrin $\alpha 3$ (ITGA3) molekula, melynek invázióban betöltött szerepét igazolja, hogy fokozott expressziója glioma őssejt típusú sejtek esetében (glioma stem-like cell [GSC]) került azonosításra. Az glioblasztoma sejtvonalakon végzett tanulmány alapján ITGA3 pozitív sejtek a vérerek körüli őssejt nichének tekintett területen mutattak fokozott megjelenést, továbbá az infiltratív sejtek esetében is felülreprezentált volt jelenlétük, valamint Az ITGA3 expressziója korrelációt mutatott a sejtek inváziós potenciáljával is.

A gliális eredetű daganatok vonatkozásában a glükózaminoglikánok csoportjába tartozó hialuronsav szerepe az invázió folyamatában jelentős. Neoplasztikus esetekben mennyisége a normál agyi extracelluláris mátrix állományhoz képest fokozott, valamint expressziója a grádus értékkel is arányosságot mutat. A hialuronsav kötése a HMMR (CD 168), valamint a CD 44

molekulák képesek. Az elérhető vizsgálatok döntő többsége szintén a magasabb grádusú gliális folyamatok esetében történt, azonban grádustól független jelentős esetszámot magában foglaló adatbázisok (the Cancer Genome Atlas – TCGA) értékelésével véghez vitt vizsgálatok a CD 168 és CD44 prognosztikus szerepét erősítették meg. Saját eredményeink megerősítették ezen molekulák kiemelt szerepét az infiltratív folyamatokban az alacsonyabb grádusú gliális folyamatok esetében is.

Eredményeink alapján említésre okot adó, a peritumorális infiltráció szempontjából kiemelt jelentőségű molekula az FLT4, az MDM2, valamint az MMP2.

Az FLT4 a „C” és „D” típusú vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) receptora. Normálisan nem expresszálódik az emberi agy endotéliumában, viszont kimutatták, hogy a glioblasztomában található vérerek endotéliumában expresszálódik. Ez többek között hozzájárulhat a bevacizumabbal kezelt betegek escape jelenségéhez, amely egy másodlagos neovaszkularizációt jelent az antiangiogén bevacizumab-terápia ellenére. Az MDM2 a p53 fehérje gátlója. A megnövekedett MDM2-szint az egyik lehetséges mechanizmusnak tekinthető a p53 kapuórfunkciójának megkerülésére, *TP53* vad típusú glioblasztomákban. Ezen túlmenően, az MDM2 p53-független szerepekkel is rendelkezik. Az MDM2 genomikus instabilitást idéz elő, valószínűleg a DNS-károsodás javításának gátlásán és a sejtciklus leállításának elnyomásán keresztül. Emellett bizonyítottan elősegíti az EMT folyamatát, ezáltal fokozza a sejtek mozgékonyágát és a tumor invazivitását. Az MMP-2 jól ismert szerepet játszik a tumor extracelluláris mátrixának dinamikus átalakításában, valamint egyéb onkogén funkciókban, amelyek elősegítik a glioma sejtek agyi parenchymába való invázióját.

6. Összefoglalás

Az asztrocitaer daganatok a központi idegrendszer malignus daganatainak leggyakoribb képviselői. Kuratív kezelésük sem a komplett sebészi eltávolítást nehezítő peritumorális infiltráció miatt, sem a jelenleg több szempontól csak korlátozott effektivitású sugár-, és kemoterápiás kezelés miatt nem kivitelezhető. Az újabban elérhető molekuláris genetikai alapon történő diagnosztika prognosztikus, valamint prediktív előnyöket szolgáltat a neuro-onkológusok számára, azonban továbbra is nehezen meghatározhatóak az egyes, eltérő ellátási protokollba tartozó rizikócsoportok.

Munkacsoportunk a fenti problémaköröket összekapcsolva a peritumorális infiltráció jelenségében szerepet játszó ECM molekulák expressziós mintázatának értékelésével kívánta a rizikócsoportok azonosítását segíteni, oly módon, hogy az eltérő agresszivitású, prognózisú, valamint megelőző terápiás ellátási protokollban részesült asztrocitaer daganatcsoportok ezirányú molekuláris összetételét vizsgáltuk.

Eredményeink alapján elmondható, hogy adott ECM molekulák expressziós értékeinek figyelembevételével a glioblasztoma, valamint a Gr. 2 diffúz, infiltratív asztocitómák csoportján belül a prognosztikus alcsoportok elkülönítése jó hatásfokú. Megállapítható továbbá, hogy az alacsonyabb grádusú gliomák csoportján belül a jelenleg alkalmazott grádusmeghatározás nem kellően reprezentálja a Gr. 2 és Gr. 3 asztrocitaer daganatok közötti különbséget, továbbá, hogy a jelenleg alkalmazott kezelési protokoll számottevő anti – invazív potenciállal nem rendelkezik.

7. Új tudományos eredmények

1. A Gr. 2 asztrocitómák eltérő prognózissal rendelkező alcsoportjai az extracelluláris mátrix molekulák inváziós spektruma alapján elkülöníthetők. Az inváziós spektrum értékelése a gráduson belüli rizikócsoportok azonosítását segíti.
2. A diffúz, infiltratív gliomák esetében alkalmazott kezelési stratégia az extracelluláris mátrix molekulák expressziójára érdemi hatást nem gyakorol, a kezelés korlátozott anti – invazív potenciállal bír.
3. A Gr.2 és Gr. 3 diffúz infiltratív csoportjai egymással átfedést mutatnak. A jelenleg alkalmazott grádusmeghatározás önmagában nem biztosít teljeskörű prognosztikus információt, az alacsonyabb grádusú glioma fogalm napi gyakorlatba való vezetése javasolt.
4. Az inváziós spektrum hatékony prognosztikus marker glioblasztomás betegek esetében, alkalmazása a hosszabb túlélési mutatókkal rendelkező glioblasztoma alcsoport kisselektálását segítheti.
5. Az inváziós panelbe tartozó extracelluláris mátrix molekulák -a magasabb grádusú gliomákon túl-, az alacsonyabb grádusú gliomák esetében is kulcsfontosságú szerepet játszanak a peritumorális infiltráció folyamatában (pl. integrin $\alpha3, \alpha V, \beta 1$, MMP2).

8. Tárgyszavak

Alacsonyabb grádusú glioma, asztrocitoma, glioblasztoma, prognózis, rizikó csoportok, peritumorális infiltráció, extracelluláris mátrix, inváziós spektrum

Lower grade glioma, astrocytoma, glioblastoma, prognosis, risk groups, peritumoral infiltration, extracellular matrix, invasion spectrum

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőm Klekner Álmos Tanár Úr számára témavezetőként nyújtott segítségét. Koordinálása, szakmai és emberi támogatása mellett sajátíthattam el a tudományos módszertant, valamint lehetőségem nyílt a központi idegrendszer mélyrehatóbb megismerésére. Szakmaisága, precizitása, valamint emberi hozzáállása példaértékű számomra.

Hálás köszönettel tartozom Bognár László Professor Úrnak, hogy lehetőséget biztosított az Intézetben történő tudományos kutatómunka folytatásához. Köszönet illeti meg a Neuro-onkológiai Laboratórium korábbi dolgozóit, Reményi – Puskár Juditot, valamint Jenei Adrienn, akik a minta-, és adatgyűjtésben mindig megbízható segítséggel szolgáltak. Köszönöm a Neuropathológiai Laboratórium munkatársainak segítségét, akik türelemmel és nagy gondossággal segítettek az vizsgálómódszerek részleteinek elsajátítását, a vizsgálatok kivitelezését. Köszönöm a szerzőtársaimnak az együttműködés lehetőségét, valamint a számolatlan hasznos tanácsot a munkám során. Külön köszönet illeti meg Virga Józsefet, szerző-, és harcostársamat, akivel az elmúlt 10 évben közösen dolgozhattam, segítsége elengedhetetlen volt a disszertáció elkészítéséhez.

Hálásan köszönöm Barzó Pál Professor Úrnak, aki a mindennapi klinikai munka mellett ösztönzött és támogatott a tudományos munkavégzésben, továbbá a kutatásaimhoz tartozó klinikai és sebésztechnikai vonatkozásokat páratlan profizmussal számomra átadni igyekezett.

Szívem teljes szeretetével köszönöm feleségemnek, valamint kisfiamnak a sokszor embert próbáló időszakokban nyújtott támogatásukat, türelmüket. Számomra Ti jelentitek a mindent. Nagyon köszönöm édesanyámnak, édesapámnak, testvéremnek és nagymamámnak, akik hitet, célt és lehetőséget biztosítottak számomra.



Nyilvántartási szám: DEENK/66/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szivos László
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szivos, L.**, Virga, J., Mészár, Z. M., Rostás, M., Bakó, A., Zahuczky, G. J., Hortobágyi, T., Klekner, Á.: Prognostic Role of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in Diffusely Infiltrating Grade 2 and 3 Astrocytomas.
Brain Sci. 14 (11), 1-17, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci14111157>
IF: 2.7 (2023)
2. Virga, J., **Szivos, L.**, Hortobágyi, T., Kouhsari, M. C., Zahuczky, G., Steiner, L., Tóth, J., Reményi-Puskár, J., Bognár, L., Klekner, Á.: Extracellular matrix differences in glioblastoma patients with different prognoses.
Oncol. Lett. 17 (1), 797-806, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2018.9649>
IF: 2.311

További közlemények

3. Horváth, Z., Lukács, M., **Szivos, L.**, Barzó, P.: Localization of macroscopically undetectable intramedullary hematoma by intraoperative epidural motor evoked potential.
Clinical Neurophysiology Practice. 7, 129-134, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnp.2022.04.001>
IF: 1.7
4. Kis, D., **Szivos, L.**, Rekecki, M., Shukir, B. S., Máté, A., Hideghéty, K., Barzó, P.: Predicting the true extent of glioblastoma based on probabilistic tractography.
Front. Neurosci. 16, 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2022.886465>
IF: 4.3





5. **Szivos, L.**, Virga, J., Klekner, Á., Árkosy, P.: Az alacsony grádusú gliómák prognosztikai faktorainak szerepe a terápia megválasztásában - a nemzetközi irodalom és ajánlások összefoglalása konklúziókkal.
Magy Onkol. 65 (1), 59-70, 2021.
6. **Szivos, L.**, Virga, J., Hortobágyi, T., Zahuczky, G., Uray, I. P., Jenei, A., Bognár, L., Árkosy, P., Klekner, Á.: Az inváziós spektrum prognosztikai jelentősége glioblastomában.
Ideggyogy. Szle. 73 (9-10), 317-325, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18071/ISZ.73.0317>
IF: 0.427
7. Árkosy, P., Tóth, J., Béres, E., Tóth, D., **Szivos, L.**, Nagy, J., Klekner, Á., Virga, J.: Prognosis and Treatment Outcomes of Patients Undergoing Resection of Brain Metastases from Breast Cancer.
Anticancer Res. 40 (3), 1759-1770, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.14130>
IF: 2.48
8. Klekner, Á., **Szivos, L.**, Virga, J., Árkosy, P., Bognár, L., Hádáné Birkó, Z., Nagy, B.: Significance of liquid biopsy in glioblastoma: a review.
J. Biotechnol. 298, 82-87, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.011>
IF: 3.503
9. 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/anticancer.11799>
IF: 1.865

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,286

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,011

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

Debrecen, 2025.02.20.

