

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Különböző grádusú astrocytomák extracelluláris
mátrix összetételének vizsgálata**

Dr. Virga József

Témavezető: Dr. Klekner Álmos



DEBRECENI EGYETEM

Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2018.

KÜLÖNBÖZŐ GRÁDUSÚ ASTROCYTOMÁK EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX ÖSSZETÉTELÉNEK VIZSGÁLATA

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

Írta: Dr. Virga József okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Klekner Álmos, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora
tagok: Dr. Alpár Alán, az MTA doktora
Dr. Krasznai Zoárd, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Idegsebészeti Tanszék Könyvtára
2018. június 1. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Mészár Zoltán, PhD
Dr. Major Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora
tagok: Dr. Alpár Alán, az MTA doktora
Dr. Krasznai Zoárd, PhD
Dr. Mészár Zoltán, PhD
Dr. Major Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme
2018. június 1. 13:30

1. BEVEZETÉS

A központi idegrendszer (KIR) daganatos megbetegedései a betegség kiindulási helye alapján alapvetően két csoportra bonthatók. 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. A daganatok előfordulása, a betegek epidemiológiai jellemzői a szövettani típustól függően változnak. Az összes astrocytoma incidenciája 4,5/100.000 fő, az alacsony grádusú astrocytomák fiatalabb életkorban, a magasabb grádusúak idősebb korosztályban fordulnak elő (a medián életkor grade III esetében 53 év, grade IV esetében 64 év). A betegségcsoport jelentőségét elsősorban nem a gyakoriság 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 a 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.

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 évtizedekben jelentős változáson, fejlődésen esett át. A 2006-ban bevezetett Stupp protokoll (lehetőségekhez képest elvégzett sebészi

eltávolítást követő konkurráló temozolomide kemo- és sugárterápia) révén a betegek túlélési esélyei javultak. További előrelépést jelent a VEGF-gátló bevacizumab kezelés, mely Magyarországon temozolomide kezelés mellett bekövetkező kiújulás esetén adható (egyéni méltányossági kérelemben). Ezen terápiás lehetőségek a korábbi adatokhoz képest nagymértékben hosszabbították meg a progressziómentes és teljes túlélést, összességében azonban a GBM továbbra is egy, a beteg, a család és a kezelő egészségügyi személyzet számára komoly kihívást jelentő, a betegek életminőségét nagymértékben lerontó, sajnálatos módon elkerülhetetlenül a beteg halálához vezető betegség. Fontos kiemelni, hogy megfigyelhető 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. Ilyen kedvező prognosztikai markernek tekinthető irodalmi adatok alapján a fiatalabb életkor, a férfi nem, a magasabb posztoperatív Karnofsky pontszám vagy a kisebb tumorméret. A hétköznapi gyakorlatban azonban ezek jelentősége minimális. Az elmúlt időszakban rengeteg információ gyűlt össze a glioblastoma (és a többi astrocytoma) molekuláris onkológiáját illetően, melyek hatására a gliomák eddigi csoportosítása is megváltozott. Kiemelendő ezen molekuláris eltérések közül a tumorok IDH mutációs státusza, ismert ugyanis, hogy a mutáció kedvezően befolyásolja a prognózist. Szintén jelentős az MGMT gén promoter szakaszának gyakori hipermetiláltsága, mely a génátírás elnémulásához vezet és a temozolomide terápia hatékonyságát ily módon növeli. Az MGMT promoter metiláltsági státusza tehát inkább prediktív marker. A kutatások során leírt számos egyéb mutálódott jelátviteli útvonal azonban úgy tűnik, hogy klinikai szempontból sajnos egyelőre kevésbé releváns.

1.1. Az extracelluláris mátrix a központi idegrendszerben és kapcsolata a gliómainvázióval

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 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. 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. 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. 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. E molekulák leginkább a HA és egyéb ECM alkotók összekapcsolásában játszanak szerepet. A proteoglikánok közül megemlítendő még a tenascinok családja, ezek a sejtosztódás, migráció és morfogenezis során játszanak szerepet. 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. Emellett az ECM-ben találhatóak az ECM dinamikus átalakulásáért felelős enzimek is, például mátrix metalloproteinázok, ADAMTS enzimek is.

Ma már tudjuk, hogy az ECM nem csupán a szöveti morfológia egyik meghatározója, hanem a sejtek környezetének egy meglepően dinamikusán 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. 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 enzimek, 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.

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. 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.

A peritumorális infiltráció azonban nem csak a GBM-re, hanem alacsonyabb grádusú astrocytomákra is jellemző. 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 gliomainvázióban 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. 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.

3. MÓDSZERTAN

3.1. 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.

3.1.1. 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. A mintákat minden esetben neuropathológus értékelte a diagnózis megerősítése érdekében. Összesen 40 ECM alkotó mRNS és 20 ECM alkotó fehérje szintjét mértük meg a szövetmintákban, melyekben a megfelelő mennyiségű tumorsejt jelenlétéről a Ki-67 expresszió mérésével bizonyosodtunk meg.

3.1.2. Különböző grádusú astrocytomák ECM összetételének vizsgálata

Az inváziós panel molekulák és a különböző invazivitással rendelkező, eltérő grádusú astrocytoma minták összehasonlításához összesen 94 WHO grade I-II-III-IV astrocytoma és 54 nem tumoros agyszövet kontroll mintát használtunk, amelyekben 20-20 ECM alkotó mennyiségét mértük meg transzkripciós és transzlációs szinten. 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 a minták megfelelő mennyiségű malignus sejtet tartalmaztak.

3.1.3. 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. 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 mintákat minden esetben neuropathológus értékelte a diagnózis megerősítése céljából, a gliális eredet igazolására

GFAP, a megfelelő mennyiségű malignus sejt igazolására Ki-67 génexpresszió került meghatározásra.

3.2. 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). β -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).

3.3. 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 β -merkaptoetanol és 0,5% Triton-x100TM keverékből álló lízis puffert használtunk a minták lizálására. A fehérjék mennyiségét a Bradford módszerrel határoztuk meg, majd a fehérjékből azonos mennyiségűt használtunk tripszines emésztéshez. A relatív fehérjemennyiség meghatározása az SRM módszerrel (*selected reaction monitoring*) történt. 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.

3.4. 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 μ 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.

3.5. 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 χ^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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Primer és szekunder malignus agydaganatok ECM összetételének összehasonlítása

4.1.1. *mRNS expresszió vizsgálat eredményei*

Az ECM inváziós molekuláinak mennyisége jelentős mértékben eltér a nem tumoros és tumoros minták között. A nem tumoros agyszövet és GBM minták között szignifikánsan eltérő mennyiségben expresszálódott 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- $\beta 2$, matrillin-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 agyszövettől 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 tért el szignifikánsan a két eltérő eredetű tumortípusból származó mintákban.

A mRNS expressziós mintázat alapján a három csoport nagyon jól elkülöníthető egymástól statisztikai osztályozóval. 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.

4.1.2. Fehérje expressziós vizsgálat eredményei

A nem tumoros agyszövet és a GBM az EGFR, ErbB2, integrin- β 1, laminin- α 4 és - β 1, MMP-2 és -9 molekulák szintjében tér el egymástól szignifikánsan. A metasztatikus minták csupán az integrin- α 7 szintjében tértek el a nem tumoros agyszövettől. A primer és szekunder agytumorok pedig az integrin- α 7 és - β 1, MMP-9 és neurocan fehérjék szintjében tértek el egymástól szignifikánsan. A proteinexpressziós vizsgálatok részben megerősítik a mRNS expressziós mérések eredményeit. Az mRNS és fehérje expressziós eredmények konkordánsak voltak a post hoc analízisek során. Mind transzkripciós és translációs szinten összesen hét esetben (EGFR, integrin β -1, laminin α -4 és β -1, MMP-2 és -9, illetve neurocan) voltak szignifikancia szintet meghaladó eredmények különböző csoportokat tekintve.

A fehérjék expressziója alapján képezett inváziós spektrumokat is alávetettük osztályozó algoritmusok által történő elemzésnek. A minták 84,7%-át azonosította helyesen az osztályozó, a pozitív prediktív érték 0,843 volt. Kulcsmolekulaként az Erb-B1, Erb-B3, integrin- α 2, - α 3 és - β 1, laminin- α 1 és - α 4, MMP-2 és MMP-9, valamint tenascin-R fehérjéket jelölte ki az osztályozó.

4.2. Különböző grádusú astrocytomák ECM összetételének vizsgálata

4.2.1. mRNA 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 mintáktól, valamint az astrocytomákon belül a glioblastoma inváziós spektruma mutat jelentős eltérést. 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- β 1. Két szomszédos grádushoz tartozó mintákból alkotott csoport között elvégzett LDA az alcsoportok jobb elkülönítésére adott lehetőséget a módszer sajátosságaiból fakadóan. E kéts csoportos LDA-k további kulcsmolekulákat jelöltek ki, amelyek a „szomszédos” szövettani alcsoportok közötti fő különbségekre mutatnak rá. A mRNA 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.

4.2.2. 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 brevicin, ErbB2, fibronectin, HMMR (CD168), integrin- α 1, laminin- α 4 és - β 1, MMP-2, MMP-9 és sindecan 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 kétcsoportos LDA-k azonban kiválóan működtek, minden esetben legalább az mRNS inváziós spektrum hatékonyságával működött az elkülönítés és csoportazonosítás.

4.3. Eltérő prognózisú grade IV astrocytoma (glioblastoma) minták ECM összetételének vizsgálata

4.3.1. 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.

4.3.2. 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 ($p=0,20$).

4.3.3. *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), 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. 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- β 1 molekulák mennyiségét határozta meg a prognózist leginkább befolyásoló inváziós molekulának, és az osztályozó által használt döntési fa első döntése az integrin- β 1 lánc mennyiségétől függött, így ennek szerepe jelentősebb.

4.3.4. *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. A brevican, EGFR és tenascin-C itt is jelentősebb különbségeket mutatott, és az mRNS eredményekkel konkordáns volt a változás iránya. A cadherin-N2, valamint a laminin- α 4 és - β 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. 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.

5. 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. 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. Az astrocytomák peritumorális infiltrációját övező kutatások egyik központi eleme az extracelluláris mátrix. Az ECM molekuláinak, valamint az ECM alkotókkal kapcsolatot teremtő sejtfelszíni receptorok mennyiségi-minőségi változásai jól ismertek egyéb daganatok esetében, és egyre több információval rendelkezünk a témában a gliómákat illetően is. 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 áttétből származó mintákat és nem tumoros agyszöveti kontrollmintákat elemeztünk a molekuláris biológia módszereivel.

5.1. 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 találhatóától. 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- α 4, - β 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. 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

jellegetések, hogy csak az inváziós spektrum alapján, a szövettani kép ismerete nélkül sikerült azonosítani a minták szövettani csoportját.

5.2. 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 astrocytómák, különösen az infiltratív növekedést mutató astrocytómák 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. Az egyes astrocytómák (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 astrocytómák esetében az IDH státusz, és nem a WHO grádus a meghatározó a túlélés szempontjából. Hasonló tendencia figyelhető meg anaplasticus astrocytoma és glioblastoma esetében is. 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 tenascin-ok is megtalálhatóak. A fehérje inváziós spektrum elemzés részben megerősíti ezeket az eredményeket, részben pedig kiegészíti azokat. Utóbbira jó példa a laminin- α 4 és - β 1 láncok kulcsmolekulaként történő megjelölése, ismert ugyanis, hogy ez a két laminin lánc a γ láncsal együtt alkotják a laminin-8 (laminin-411) ECM alkotót, melynek gliómainvazióban 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. 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 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. 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.

5.3. 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. 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. 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. Az IDH mutáció glioblastomás betegek esetén nem túl gyakori, 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. 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. 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 információtartalom, 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.

5.4. 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, elősorban a központi idegrendszerben expresszálandó 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 épi agyi erek inváziója nem történik meg, így a távoli áttétek sem alakulnak ki. A tumorsejtek aktívan részt vesznek az ECM megváltozásában, egyrészt az ECM alkotók szintézise, másrészt a nem tumoros sejtek modulálása révén, hiszen a megváltozott mikrokönyezet befolyásolja a nem tumoros sejtek működését is.

A megváltozott glioma ECM egyik karakterisztikus vonása, hogy rendkívüli mértékben megnő a hialuronsav (HA) mennyisége és szerepe. 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 gliómainvázióban betöltött szerepéről kialakított eddigi ismereteinkhez.

A hialuronsavval kapcsolatba lépő lecticanok, egy kondroitin-szulfát proteoglycan család tagjai szintén fokozott mértékben expresszálandók. 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 sejtsztódásban szerepet játszó molekulák szerepét más kutatók is említették már a gliomasejtek inváziós képességével kapcsolatban, a grádusok közötti különbségek leírása azonban újdonság. 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 $\beta 1$ alláncot 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.

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 αV , valamint a $\beta 1$ és $\beta 3$ láncok szerepe merült fel kutatásaink során. Az integrin- $\beta 1$ szerepe megkerülhetetlennek látszik a gliomasejtek inváziójában, expressziója fokozódik a grádus növekedésével, több elemzés során is kulcsmolekulaként került leírásra vizsgálatunkban, és ez összhangban áll a szakirodalomban található információkkal. 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 cadherineik mennyisége van összhangban a tumorok grádusával és növekedő inváziós képességével, ezt eredményeink és a szakirodalom egybehangzóan megerősítik.

A mátrix dinamikus átalakulásáért felelős molekulák közül a mátrix metalloporoteinázok 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.

6. 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 összefüggenek 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 besorolhatók 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.

7. 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 translációs 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- β 1, laminin- α 4).
6. Az inváziós spektrum prognosztikai markerként használható, mert jó hatásfokkal különíti el a rossz és jobb prognózisú glioblastomás betegeket.

8. 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.

A kutatást a Nemzeti Agykutatási Program (KTIA_13_NAP-A-V/3 és II/7) támogatta.

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-16-3-I és ÚNKP 17-3-I kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.



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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

