

Egyetemi doktori (Ph.D) értekezés tézisei

A POLIAMIN ANYAGCSERE JELENTŐSÉGE
AGYDAGANATOKBAN

Dr. Klekner Álmos

Témavezető: Prof. Dr. Csécsi György

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Idegsebészeti Klinika

2001

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az intrakraniális daganatok terápiájának megválasztásában a szövettani besorolásnak döntő szerepe van. A rutin szövettani osztályozás különböző festési eljárásokból és immunhisztokémiai reakciókat követő fénymikroszkópos vizsgálatokból áll. Mivel e hagyományosnak tekinthető patológiai vizsgálati módszerek a morfológiai jellemvonásokra szorítkozva állapítják meg a daganatok szövettani besorolását, a funkcionális tulajdonságok, mint például az onkogének expressziója vagy a sejtproliferációhoz szükséges enzimek aktivitása figyelmen kívül maradnak, így a rutin szövettani besorolás alapján választott terápia elégtelennek bizonyulhat. Fennáll tehát az igény további, olyan tumormarkerek felkutatására, melyek részben az aktuális malignitási fokról nyújtanak pontosabb információt, részben pedig a genetikailag meghatározott progresszióra való hajlamot is felderítenék.

A poliaminok biológiai szerepe

A poliaminok alifás szénhidrogén láncon 2-3-4 amino-, ill. iminocsoporttal rendelkező alifás szénhidrogén molekulák, melyek fiziológias pH-n pozitív töltésű kationként funkcionálva vonzzák a negatív töltésű sejtkomponenseket. Minden eukarióta sejtben jelen vannak, beleértve a központi idegrendszer sejtjeit is.

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

Az ODC gén expressziója és az ODC effektivitása igen sokrétű szabályozó mechanizmus befolyása alatt áll. Számos faktor serkentőleg hat az ODC-szintézisre (pl. onkogének, növekedési faktorok, hormonok), míg a poliaminok és az ún. antizim protein gátló hatásának bizonyultak. A szabályozási mechanizmusok sokrétűségét jellemzi, hogy ez utóbbi fehérje pedig az antizim-inhibitor molekula gátló hatása alatt áll.

Molekuláris biológiai kutatások feltárták, hogy az ODC aktív génje a hetedik kromoszóma rövid karján található és szomszédos génjei a ribonukleotid-reduktáz (DNS szintézisben szereplő enzim) és az N-myc-oncogén - e három gén pedig együtt sokszorozódik. Bizonyítást nyert az is, hogy az ODC kóros expressziója szükséges faktor az onkogenezishez, így maga az ODC proto-oncogén szerepe is felmerült.

A poliaminok biológiai szerepének alapja az, hogy relatíve kis méretűeknek és többszörös pozitív töltésűeknek köszönhetően igen sok sejtkomponenssel léphetnek kapcsolatba. Elsősorban proteinekhez és nukleinsavakhoz való kötődésük révén megvalósuló szerteágazó szerepük még ma sem teljesen tisztázott. Bizonyítást nyert azonban, hogy poliaminok nélkül a sejtek osztódása az S-fázisban leáll, DNS-szintézisük csökken és a mitózisba lépés blokkolódik, mivel bizonyos minimális mennyiségű poliamin-molekula a G1-fázisból az S fázisba lépéshez feltétlenül szükséges.

A poliaminok DNS-szerkezetre ill. kondenzációra, valamint a B-DNS Z-DNS-sé alakulására gyakorolt hatása nemcsak töltésük révén, hanem a több metil-csoport adta speciális szerkezeti adottságuk révén is megvalósulhat. A poliaminoknak tehát alapvető szerepük van a sejt differenciálódás, növekedés és regeneráció szabályozásában. Korábbi kutatások adatai szerint a poliamin bioszintézis regulációja többek között a kulcsenzim

(ODC) expressziójának transzkripció, transláció vagy poszt-transzláció szintű szabályozása révén valósul meg.

A poliamin anyagcsere kutatásainak eredményei daganatokban

Korábbi kutatások eredményei szerint a poliaminok bioszintézise szorosan összefügg a sejtszintű növekedési folyamatokkal, beleértve mind a fiziológiás, mind pedig a neoplasztikus sejtproliferációt, és a daganatos, gyorsan proliferáló szövetekben az ODC aktivitás a normál szövetekhez képest magasabb. Bizonyítást nyert, hogy a poliaminok hasznos biokémiai markerek lehetnek rosszindulatú daganatos betegségek diagnózisának felállításában és követésében. Megállapították azt is, hogy a poliaminok koncentrációja, és bioszintézisük kulcsenzimének, az ODC-nek aktivitása a központi idegrendszeri primer tumorok nagy részének proliferációs aktivitásával összefügg.

Intrakraniális daganatok vizsgálatának lehetőségei:

1. A gliómák poliamin szintjeiről és az ODC aktivitásáról már vannak ismereteink, de az *ependimómák* poliamin anyagcseréjének vizsgálatáról irodalmi adat még nincsen. Bár az intrakraniális gliómák 5-6 %-át adó ependimómák az esetek többségében jóindulatúnak bizonyulnak, anaplasztikus formájuk igen rossz klinikai kimenetelt eredményez: az átlagos túlélési idő 12-20 hónap közé tehető és a 3 éven belüli mortalitási arány egyes statisztikákban eléri a 100 %-ot. Mivel sugárérzékeny daganatról van szó, a sugárkezelés indikációjának pontosítása a kórlefolyás kimenetele szempontjából döntő jelentőséggel bírhat. A poliamin anyagcsere aktivitásának meghatározása az aktuális malignitási fok megállapításához lényeges információkkal szolgálhat.

2. A leggyakoribb intraaxiális primer agydaganatot az *asztrocitómák* képezik. Tumoreltávolítást követő posztoperatív sugárkezelés és kemoterápia mellett az 1 éves túlélés anaplasztikus asztrocitóma (AA) esetén 60-73 %, glioblasztóma multiforme (GBM) esetében 35-36 %, míg a két éves túlélés 38-50 %-ra ill. 8-12 %-ra csökken. Az AA és a GBM a középkorú korosztályt érinti, a betegek életkorának átlaga diagnóziskor 46 ill. 56 év. Ma már ismert tényként kezelhető az asztrocitómákban előforduló progresszióra való hajlam, így a II. vagy III. grádusú tumorok igen gyakran nagyobb grádusú recidívával jelentkeznek ismét. Egyik legnagyobb kihívást az alacsony grádusú tumorok biztos diagnosztizálása és a progresszióra való hajlam megállapítása jelenti, hiszen a mai gyakorlatban irradiáció nélkül kezelt II. grádusú asztrocitómák egy részének anaplasztikus tumorrá történő progrediálása az időben megállapított proliferációs potenciál alapján indikált radikális műtéttel és posztoperatív sugárkezeléssel esetleg megelőzhető lenne.

3. A nem-glia eredetű intrakraniális tumorok közül leggyakoribb daganat a *meningeóma*: az összes intrakraniális primer tumor 15-20 %-át teszik ki. A meningeómák osztályozása szintén hisztopatológiai jellemzőkön alapszik, azonban ezek a jellemzők nem mindig bizonyulnak elégségesnek az atípusos és a malignus meningeómák közötti különbségtételhez. Többnyire benignus megjelenési formájuk és sokszor sikeres teljes eltávolításuk ellenére a típusos meningeómák recidíváinak aránya 2-9 %, míg az atípusos formáé 29-50 % közé tehető. Az infiltratív, malignus növekedési jegyeket nélkülöző szövettani kép mellett észlelhető relatíve nagy kiújulási hajlam további vizsgálatokat indikál. A poliamin anyagcsere aktivitásának meghatározása a kiújulási potenciállal kapcsolatban prognosztikai szempontból is hasznosítható információkat eredményezhet.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során a tumoros sejtszaporodáshoz nélkülözhetetlen poliaminoknak és bioszintézisük kulcsenzimének, az ornitin-dekarboxiláznak (ODC) az intrakraniális daganatok diagnózisának pontosítását szolgáló, és a tumorprogresszióra ill. a recidívaképzési hajlamra utaló szerepét kutattuk.

1. Első lépésként *ependimómákban* igyekeztünk a poliamin anyagcsere aktivitásának meghatározásával az aktuális malignitási fok megállapításához további adatokat szolgáltatni. A malignitási szempontból II. grádusba sorolt gliómákat vizsgálva az *ependimómák* és az egyéb gliómák közötti proliferációs készségbeli különbségeket kívántuk a poliaminok intratumorális koncentrációjának és az ODC aktivitásának a meghatározásával megállapítani.

2. A leggyakoribb intrakraniális tumorok, az *asztrocitómák* esetében az ODC gén expressziójának meghatározásával a proliferációs potenciált, ezen keresztül pedig a progresszióra való hajlamot tűztük ki célul felderíteni.

3. A leggyakoribb intrakraniális extracerebrális daganatok, a *meningeómák* esetében szintén az ODC gén expresszióját vizsgáltuk. E daganatokban a poliamin anyagcsere kulcsenzime és a daganatkiújulás közötti összefüggést igyekeztünk prognosztikai szempontból megközelíteni.

4. Az utóbbi két tumorcsoport esetében az ODC mRNS és az enzimaktivitás vizsgálatának eredményeiből az ODC szabályozási mechanizmusaival kapcsolatban reméltünk hasznosítható információkhoz jutni.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A szövettani mintákat a kölni és a debreceni Idegsebészeti Klinikán 1991, ill. 1995 és 1998 között műtét közben eltávolított és folyékony nitrogénben lefagyasztott, majd az alább részletezett feldolgozásig -80°C -on tárolt tumorszövet alkotta.

Ependimómák: Az *ependimómákból* intraoperatív vett tumormintákat (n = 11) egyéb gliómákkal (n = 69) és nem-tumoros, kontrollként szolgáló agyszövetmintákkal (n = 52) hasonlítottuk össze. Az *ependimómák* közé a hagyományos szövettani vizsgálat során csak II. grádusúnak bizonyult tumorokat válogattunk. A glióma csoportba *asztrocitómákat*, oligodendrogliómákat és kevert, oligo-*asztrocitómákat* kerestünk, melyek mindegyike a szövettani feldolgozás során egyértelműen glia eredetűnek és szintén II. grádusúnak bizonyult.

Asztrocitómák esetében 24 tumormintát vizsgáltunk meg, melyeket a hisztopatológiai vizsgálat során megállapított grádus szerinti beosztás alapján csoportosítottunk. Ennek során *asztrocitóma* II grádus (A II, n = 8), *asztrocitóma* III grádus (A III, n = 8) és glioblasztóma multiforme (GBM, n = 8) eredményeit vetettük össze kontrollként szolgáló tumormentes agyszövet (n = 5) eredményeivel.

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

1. Meningeómák, melyek 8.4 év átlagos követési idő alatt nem újultak ki (M - R, n = 8).
2. Meningeómák, melyek később kiújultak (M + R). Átlagos követési idő 3.0 év, (n = 14).
3. A 2. csoport recidív tumorjai (R, n = 14).

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

Az asztrocitómák és meningeómák esetében az ODC aktivitást és az ODC mRNS relatív mennyiségét mértük meg, ill. az utóbbi tumorok esetében a fenti paraméterek mellett még a Ki-67 indexet és a mitózisindexet is meghatároztuk.

Szövetteni feldolgozás

A szövetteni klasszifikáció a több, reprezentatív tumorrészletből származó formalinfixált és paraffinba ágyazott tumormintából a World Health Organization (WHO) 2000 évi szövetteni besorolása és graduálási ajánlása szerint történt.

A hisztolopatológiai vizsgálatokhoz a tumorszöveteket hematoxin-eozinnal festettük, immunhisztokémiai vizsgálatként pedig a *Ki-67 antigén* reakciót alkalmaztuk. Mindkét eljáráshoz 10 µm vastag kriosztát metszeteket használtunk, melyeket a biokémiai vizsgálatokhoz kivett szövetminta helyéről készítettünk.

A Ki-67 jelöléshez a metszeteket először 2 órán át szobahőmérsékletű levegőn szárítottuk, majd 10 percig hideg acetoneban fixáltuk, végül Tris pufferbe helyeztük. A háttérfestődés kiküszöbölésére 3 %-os normál sertésszérumban történő preinkubáció következett. Ezután a metszeteket poliklonális, 1:10 arányban hígított Ki-67 ellenanyaggal (A 0047) 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az ellenanyag-kötődést alkalikus foszfátáz antialkalikus foszfátáz (APAAP) vagy sztreptavidin-peroxidáz (ABC) módszerrel és aminoetilkarbazol kromogénnel ill. hematoxin alapfestéssel határoztuk meg. A jelölési indexet a reakció szempontjából leginkább pozitív területet figyelembe véve legalább 1000 tumorsejt megszámlálásával állapítottuk meg.

A meningeómák szövetteni feldolgozásánál az egységnyi területre eső *mitózisok számát* is meghatároztuk.

Biokémiai vizsgálatok

A poliaminszintek meghatározása: A poliaminszintek meghatározásához a tumormintákat 0.1 N HCl-el -20°C-on etanolban homogenizáltuk. A homogenizátumokat 0.6 N HClO₄-el kétszer extraháltuk. Centrifugálás után a felülúszót 3 N KOH-al neutralizáltuk. O-ftalaldehiddel történő derivatizálás után a poliaminokat reverz fázisú Partisil 10 ODS 3 HPLC oszlopon szeparáltuk, majd a pontos mennyiségeket fluoreszcens detektorral határoztuk meg.

Az ODC aktivitás meghatározása: A szövetmintákat 4°C-on 25 vols (w/v) 50 mM, 7.2-es pH-jú Tris/HCL pufferben (melyet 5 mM dithiothreitol (DTT)-vel és 0.1 mmol/l EGTA-val egészítettünk ki) homogenizáltuk. A kontroll méréshez 4 mg tumorszövet-homogenizátumot Tris/DTT pufferbe tettünk, melyet 54 µM piridoxál foszfáttal és 74 µmol/l L[1-¹⁴C]ornitinnel (specifikus aktivitás 55 mCi/mmol) egészítettünk ki. A teljes térfogatot 130 µl-re állítottuk be. A lezárt kémcsöveket 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd az ODC aktivitást a felszabadult ¹⁴CO₂ mennyiségének folyadék szcintillációs számlálóban történő meghatározásával állapítottuk meg.

Az ODC mRNS tartalom meghatározása: A vizsgált szövetmintákban az ODC mRNS mennyiséget kvantitatív kompetitív RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) módszerrel határoztuk meg. Ehhez β-aktin gént, mint *'house keeping gene'*-t használtunk belső standardnak. A kompetitorok létrehozásához SOE-PCR (splicing by overlap extension PCR) és egy egyszeri bázismutáció segítségével egy rövid, specifikus

szekvenciát inzertáltunk mind az ODC, mind a β -aktin exonba: az ODC esetében ez a Bam HI restrikciós endonukleáz felismerési helye lett (GGATCC), míg β -aktinnál a Bgl II restrikciós endonukleáznak jelentett hasításhoz azonosítási szekvenciát (AGATCT). A tumorminták teljes RNS-ét izoláltuk, és az RNS-mennyiséget spektrofotométerrel 260 nm-en határoztuk meg. 1 μ g RNS-hez mintánként 20 egység AMV (avian myeloblastosis virus) reverz transzkriptázt adtunk. Az így nyert cDNS-t a kompetitor cDNS-ből készített hígítási sorral kombináltuk. A PCR-hoz 50 μ l-es volumeneket készítettünk 10 μ l hígított tumorból származó ill. kompetitor cDNS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, egyenként 0.2 mM a szükséges dezoxinukleotidokból, 0.2 μ M 'sense', ugyanennyi 'antisense primer' és 0.6 egység DNS polimeráz összeadásával. A mikrotubulusokat 3 percre 95 °C-ra hevítettük, majd 31 ciklus következett, melyek 30 sec 95 °C, 40 sec 60 °C, 40 sec 72 °C váltakozásából álltak. Leállító lépésként a tubulusokat 7 percig 72 °C-on tartottuk.

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

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

EREDMÉNYEK

Ependimómák vizsgálatának eredményei

ODC aktivitás: Az igen alacsony nem-tumoros agyszövet értékei mellett (0.9 ± 0.6 nmol/g/h) hasonlóan alacsony, bár számszerűleg magasabbak a II grádusú gliómák értékei (3.3 ± 4.4 nmol/g/h). Szembetűnő viszont az ODC aktivitásának fokozódása a II grádusú ependimómákban (11.3 ± 13.8 nmol/g/h) mely érték szignifikánsan különbözik mind a nem-tumoros agyszövetétől ($p \leq 0.0001$), mind pedig a II grádusú gliómákétól is ($p \leq 0.001$).

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

A *spermidinszintek* mérésekor statisztikai szempontból értékelhető különbséget egyik vizsgált csoport esetében sem tudtunk megállapítani.

A *sperminsztentek* meghatározásakor azt találtuk, hogy a II grádusú ependimómák sperminsztentje ($188,8 \pm 151,7$ nmol/g) mind az egyéb, II grádusú gliómák értékeit (77.6 ± 81.2 nmol/g, $p \leq 0.05$) mind pedig a kontroll szövetekét ($91,7 \pm 46,1$ nmol/g, $p \leq 0,01$)

szignifikánsan meghaladta, míg az egyéb gliómák és a kontroll minták sperminszintjei között szignifikáns eltérés nem igazolódott.

Asztrocitómák vizsgálatának eredményei

ODC aktivitás: Megállapítottuk, hogy a magas grádusú tumorokban mért enzimaktivitás szignifikánsan magasabb a kontroll csoport értékeihez képest (kontroll: 0.9 ± 0.3 nmol/g/h, A III: 7.9 ± 4.4 nmol/g/h, $p \leq 0.01$, GBM: 26.5 ± 15.7 nmol/g/h, $p \leq 0.01$). Az egyes tumorcsoportokat összehasonlítva azt találtuk, hogy míg a II grádusú asztrocitómákban mért enzimaktivitás (2.0 ± 1.5 nmol/g/h) a nem-tumoros agyszövetétől nem tért el jelentős mértékben, addig a III grádusú tumorokhoz ($p \leq 0.05$) és a glioblasztómákhoz ($p \leq 0.001$) képest e tekintetben szignifikánsan alacsonyabb értékeket képviselt. Emellett pedig statisztikailag szignifikánsan nagyobb enzimaktivitást találtunk a glioblasztóma multifórmában a III grádusú asztrocitómákhoz képest ($p \leq 0.01$).

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

Meningeómák vizsgálatának eredményei:

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

Az *ODC mRNA szint* szignifikánsan magasabb volt azokban a meningeómákban, melyek később recidiváltak, (M + R: 7.1 ± 5.2 mU/U β -aktin, $p \leq 0.001$) mint azokban a tumorokban, melyek a követési időszak alatt nem újultak ki (M – R: 2.1 ± 1.0 mU/U β -aktin). A recidív tumorok *ODC mRNA* tartalma viszont szignifikánsan kisebb volt, mint a hozzájuk tartozó primer tumoroké (R: 5.5 ± 4.2 mU/U β -aktin, $p \leq 0.01$).

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

A *mitózisszám* a *Ki-67 index* emelkedésével szinkron változott: recidíva nélküli tumorokban (M – R) 0.7 ± 0.5 /mm², a kiújuló meningeómákban (M + R) 3.6 ± 6.4 /mm² és a recidív daganatokban (R) 5.1 ± 9.5 /mm² volt, de szignifikáns különbségeket a statisztikai feldolgozás nem igazolt.

MEGBESZÉLÉS

Különböző extraneurális malignus agydaganat esetében már korábban bizonyították, hogy a poliamin bioszintézis a humán daganatokban aktivált állapotba kerül. Experimentális és humán gliómákon az ODC aktivitás és a malignitás között pozitív korreláció igazolódott, és feltételezték, hogy az ODC aktivációja a malignitás korai kifejeződése lehet. Elitsur és mtsai rákos kolonocitákban a normál kolonocitákhoz képest magasabb ODC mRNS szintet találtak, ami az ODC aktivitás poszt-transzkripció szinten megvalósuló szabályozására utal. Jóllehet mások mellett igazolni tudták, hogy az ODC transzkripció, transláció és poszt-transzláció szinten is szabályozódik, a pontos mechanizmust teljes részletességgel a mai napig sem sikerült feltárni.

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

Számításaink megerősítették azt az elképzelést, miszerint a poliamin anyagcsere aktivitásának mértéke a proliferációval összefüggve tumorokban magasabb értékeket eredményez, mint a nem-tumoros agyszövetben.

Megvizsgálva a gliómák csoportján belül azependimómákra és az egyéb gliómákra jellemző poliamin metabolizmus aktivitását, azt találtuk, hogy az azonos grádusbeli beosztás ellenére az *ependimómákban* az ODC aktivitás és a spermin szint szignifikánsan magasabb volt az egyéb gliómák értékeihez képest. Mindez azependimómák proliferációs készségének emelkedett voltára és ezen keresztül e daganattípus gliómákon belüli különleges szerepére hívja fel a figyelmet, melyet talán azependimális és subependimális sejtréteg nagyobb proliferációs potenciáljával lehet összefüggésbe hozni. Mivel azependimómák sugárérzékeny daganatok, és posztoperatív kezelésük a terápiás irányelvek felállításának ma is képlékeny részét képezi, jelen kutatási eredmények a tumoreltávolítás követő irradiációs kezelés indikációjának megállapításához is segítséget nyújthatnak.

Az *asztrocitómák* vizsgálata során II, III és IV grádusú (GBM) daganatokból származó minták ODC mRNS tartalmát és enzimaktivitását hasonlítottuk össze nem tumoros, kontroll agyszövetminták értékeivel. Az átlagos ODC aktivitás szignifikánsan magasabb volt a magas grádusú gliómában a peritumorális nem-tumoros agyszövethez képest sőt, az enzimaktivitás szignifikánsan magasabb volt a GBM-ban, mint az anaplasztikus, III grádusú gliómákban. Az ODC mRNS vizsgálata során szignifikánsan magasabb értékeket detektáltunk a II grádusú gliómákban és GBM-ban a kontroll szövetekhez képest, míg az egyes tumorscsoportok közötti ODC mRNS tartalom esetében szignifikáns eltérés nem igazolódott. Az ODC mRNS tekintetében a II grádusú tumorok és a kontroll szövetek közötti szignifikáns eltérés és ugyanezen csoportokban mért hasonló mértékű ODC aktivitás az egyébként benignus daganatként kezelt II grádusú asztrocitómák progressziós készségére figyelmeztet. Míg az ODC aktivitás a már korábban is leírt, malignitással együtt emelkedő összefüggése nem jelentett meglepő eredményt, addig az egyes csoportokban észlelt ODC aktivitás változásaihoz képest lényegesen nem változó ODC mRNS tartalom további összefüggésekre engedett következtetni: az eltérő grádusú daganatokban detektált közel azonos mennyiségű mRNS melletti szignifikánsan eltérő enzimaktivitás az ODC regulációjának poszt-transzkripció szinten történő megvalósulására hívja fel a figyelmet.

Vizsgálataink során az ODC gén expressziójának a *meningeómák* recidíva képzésében betöltött lehetséges szerepének tisztázását célozva az ODC mRNS szintet, az enzimaktivitást, a Ki-67 indexet és a mitózisszámot határoztuk meg. Az ODC aktivitás és a Ki-67 index ill. a mitózisszám között szoros összefüggés nem igazolódott, ami arra utal, hogy ezek a paraméterek a tumoros sejtproliferációt más és más szempontból jellemzik. Jelen vizsgálati anyagban az ODC aktivitás, a Ki-67 index és a mitózisszám recidív tumorokban magas értékeket képviselt, de az mRNS szint az asztrocitómákban tapasztaltakhoz hasonlóan nem mutatott az enzimaktivitással szinkron emelkedést. Ez az eltérés az ODC szabályozó mechanizmusainak a meningeómákban is poszt-transzkripciós szinten történő megvalósulását támasztják alá. A kiújult meningeómák primer tumoraiban szignifikánsan magasabb ODC mRNS szintet találtunk a recidívát nem eredményező tumorokhoz képest. Ezek az eredmények az ODC gén expressziójának a meningeómák kiújulásában betöltött szerepét bizonyíthatják.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Eredményeinkkel demonstrálni tudtuk, hogy a poliamin anyagcsere ependimómákban fokozódik, és ennek mértéke az azonos grádusbeli és hasonlóan gliá eredetű daganatokhoz képest nagyobb proliferációs készségről tanúskodik.
2. Az ependimómák kvantitatív biokémiai vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a poliaminszintek változásai a tumoros sejtszaporodással egyértelműen szoros összefüggésbe nem hozhatók.
3. Az asztrocitómák vizsgálata során a benignus daganatként kezelt II grádusú tumorokban a kontroll szövethez képest szignifikánsan magasabb ODC mRNS értékeket találtunk, ami e tumorok progresszióra való hajlamát jellemzi.
4. Az ODC aktivitás asztrocitómákban a grádussal együtt emelkedett, melyet az ODC mRNS tartalom nem követett. Az ODC aktivitás növekedésétől elmaradó mRNS tartalmat meningeómák esetében is tapasztaltuk, melyet az ODC regulációjának döntően poszt-transzkripció szinten történő megvalósulásaként értékeltünk.
5. Az ODC mRNS szint a kiújuló meningeómákban szignifikánsan magasabb volt mint a nem recidíváló tumorokban, tehát meningeómákban az ODC mRNS szint meghatározása a lokális kiújulás lehetőségének megállapításához prognosztikai faktorként szolgálhat.
6. Végezetül összefoglalásként megállapítható, hogy míg az ODC aktivitás a malignitás aktuális fokának markereként használható, addig az ODC mRNS tartalom a sejtproliferációs potenciálról számot adva a daganatokat prognosztikai szempontból jellemzi.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezést megalapozó *in extenso* közlemények

1. Klekner A, Röhn G, Schillinger G, Schröder R, Klug N, Ernestus RI: ODC mRNA as a prognostic factor for recurrence in meningiomas. J Neuro-oncol. 53: 67-75, 2001 *IF: 1,581*
2. Ernestus RI, Röhn G, Schröder R, Els T, Klekner A, Paschen W, Klug N: Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry. J Neurol Neurosurg Psychiatry 71: 88-92, 2001 *IF: 2,846*
3. Csécsei Gy.I, Székely Gy.Jr, Szabó S, Mikó L, Berényi E, Gyarmati J, Klekner A: Radical removal of meningiomas invading superior sagittal sinus. In: Book of proceedings (p: 491-494). Openbook Publishers, Adelaide, South Australia, 2001

Az értekezést megalapozó egyéb közlemények

1. Klekner A, Ernestus RI, Röhn G, Molnár P, Csécsei Gy, Klug N: Polyamine metabolism in ependymomas. Pathol Int, 46, S1: 625, 1996, *IF: 0,83*
2. Röhn G, Klekner A, Schillinger G, Schröder R, Ernestus RI: Gene expression of ornithine decarboxylase in meningiomas. Zentralblatt für Neuro-chirurgie Suppl, 1: 78, 2000, *IF: 0,939*
3. Schillinger G, Röhn G, Klekner A, Schröder R, Klug N, Ernestus RI: ODC-elevation in astrocytomas is regulated posttranscriptionally. Zentralblatt für Neuro-chirurgie Suppl, 1: 79, 2000, *IF: 0,939*

Az értekezést megalapozó közlemények összesített impakt faktora: 7,135

Az értekezés témájával megegyező konferenciái szereplések:

1. Klekner A, Szentirmay Z, Németh T, Szilágyi L, Aradi J, Ádám B, Szatmári I, Virág J, Molnár P: A complex approach for the precise determination of brain tumors' grade. Congress of the Hungarian Society of Pathologists and of the Hungarian Division of the International Academy of Pathology, August 26-29, 1998 Gyula, Hungary
2. Klekner A.: A poliamin metabolizmus szerepe az intracraniális daganatok diagnosztikájában. Debreceni Akadémiai Bizottság Tudományos Ülése, Debrecen, 2001.10.29.

Az értekezés témáján kívüli közlemények:

1. Csécsei Gy, Klekner A, Sikula J: Posterior lumbar interbody fusion (PLIF) using the bony elements of the dorsal spinal segment. Acta Chir Hun, 36 (1-4): 54-56, 1997
2. Csécsei Gy, Klekner A, Dobai J, Lajgut A, Sikula J: Posterior interbody fusion using laminectomy bone and transpedicular screw fixation in the treatment of lumbar spondylolisthesis. Surg Neurol, 53 (2-7): 2000, *IF: 1,018*

3. Sikula J, Kollár J, Csécei Gy, Klekner A: Quantitative CT densitometry of the autologous bone implants in patients with lumbar spinal fusion. Magyar Radiológia I.S.: 53, 1996
4. Sikula J, Kollár J, Klekner Á, Csécei Gy: A CT denzitometria és a 3D rekonstrukciós CT vizsgálatok szerepe a csontimplantátumok szervülésének megítélésében a lumbalis spinalis fúzió esetén. Magyar Radiol. Suppl, 1, 199: 2000
5. Gáspár A, Kardos S, András M, Klekner Á: Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis. Chromatographia, közlésre elfogadva, 2002, *IF: 1.619*

A tudományos közlemények összesített impakt faktora: 9,772

Az értekezés témáján kívüli konferenciai szereplések:

1. Csécei Gy, Klekner A, Sikula J: Posterior lumbar interbody fusion (PLIF) using the bony elements of the dorsal spinal segment. XVIth Hungarian Experimental Surgical Congress, September 25-27, 1997 Debrecen, Hungary
2. Klekner A, Molnár L: Spondylodiscitis as first diagnosis. Neurosurgical Conference, October 3-5, 1997 Kosice, Slovakia
3. Csécei Gy, Klekner A: Posterior lumbar interbody fusion with autologous bone. Neurosurgical Conference, October 3-5, 1997 Kosice, Slovakia
4. Németh T, Schlageter KE, Lapin GD, Klekner A, Groothuis DR, Molnár P: Structural and functional properties of capillaries in experimental brain tumors. National Conference of Neurological Sciences, 1998 Debrecen, Hungary
5. Klekner A, Csécei Gy, Molnár P, Székely Gy, Mikó L, Dobai JG, Módis L: Possible role of proteoglycans in the pathomechanism of cerebral aneurysms (preliminary study). Neuro 2000, XVth Congress of the Hungarian Neuro-surgical Society, 11-13 May, 2000 Miskolc, Hungary
6. Dobai JG, Hargitai Z, Szakáll Sz, Mikó L, Székely Gy, Klekner A, Csécei Gy: Intracerebellar haemorrhage due to an AVM after lumbar discectomy. A case report. Neuro 2000, XVth Congress of the Hungarian Neuro-surgical Society, 11-13 May, 2000 Miskolc, Hungary
7. Mikó L, Lengyel S, Székely Gy, Dobai JG, Ruzshti P, Klekner A, Csécei Gy: Monitoring of somatosensory evoked potentials during surgery for cerebral aneurysms. Part I. Correlation of postoperative outcome, Hunt-Hess's grading and type of SEP during aneurysm surgery. Neuro 2000, XVth Congress of the Hungarian Neuro-surgical Society, 11-13 May, 2000 Miskolc, Hungary
8. Mikó L, Lengyel S, Székely Gy, Dobai JG, Ruzshti P, Klekner A, György Csécei: Monitoring of somatosensory evoked potentials during surgery for cerebral aneurysms.

Part II. Relationship of postoperative outcome, intra- and postoperative complications. Neuro 2000, XVth Congress of the Hungarian Neuro-surgical Society, 11-13 May, 2000 Miskolc, Hungary

9. Sikula J., Kollár J., Klekner A., Csécei Gy.: A CT denzitometria és a 3D rekonstrukciós CT vizsgálatok szerepe a csontimplantátumok szervülésének megítélésében lumbalis spinalis fúzió esetén. Országos Radiológus Konferencia, Debrecen, 2000.10.15-16.
10. Kardos S, Gáspár A, András M, Klekner Á.: Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis. Balaton Symposium, 2-4 September, 2001, Siófok