

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Mezey Géza

Új utak keresése a neuro-onkológiai kórképek kezelésében

DEBRECENI EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Új utak keresése a neuro-onkológiai kórképek kezelésében

Dr. Mezey Géza

Témavezető: Prof. Dr. Bognár László



DEBRECENI EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	4
Irodalmi áttekintés.....	7
Célkitűzések.....	10
Anyagok és módszerek.....	11
<i>Bipoláris koagulációs csipesz és tömegspektrométer összekapcsolása (BF-MS).....</i>	<i>11</i>
<i>A bipoláris csipesszel kombinált tömegspektrométerrel végzett intraoperatív, in situ mérések menete, etikai engedélyek.....</i>	<i>12</i>
<i>Ultrahangos szívó (CUSA) és tömegspektrométer összekapcsolása (CUSA/SSI-MS).....</i>	<i>12</i>
<i>A CUSA-val kombinált tömegspektrométerrel végzett mérések menete, a minták kezelése, etikai engedélyek.....</i>	<i>13</i>
<i>A bipoláris csipesszel illetve a CUSA-val kombinált tömegspektrométerrel gyűjtött spektrumok tárolása, elemzése illetve statisztikai analízise.....</i>	<i>14</i>
<i>Alkalmazott biztonsági szabályok az aeroszolak belélegzésével kapcsolatban.....</i>	<i>14</i>
<i>A genetikai vizsgálatoknál felhasznált glioblasztóma minták gyűjtése, kezelése, etikai engedélyek...15</i>	<i>15</i>
<i>RNS extrakció menete és a RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) a GHRH, a pGHRHR és a SV1 és SV2 receptorok esetében.....</i>	<i>16</i>
<i>Az EGFR és PTEN expresszió vizsgálata kvantitatív real-time RT-PCR technikával.....</i>	<i>17</i>
<i>Statisztikai analízis a génexpressziós vizsgálatoknál.....</i>	<i>18</i>
<i>A spinális epidurális limfómák retrospektív analíziséhez használt módszerek.....</i>	<i>18</i>
Eredmények.....	19
<i>A tömegspektrometria idegsebészeti alkalmazása.....</i>	<i>19</i>
<i>A bipoláris csipesz és tömegspektrométer direkt összekapcsolásával szerzett eredményeink.....</i>	<i>19</i>
<i>A CUSA és a tömegspektrométer összekapcsolásával elért eredményeink.....</i>	<i>24</i>
<i>A glioblasztómás esetek génexpressziós vizsgálatával szerzett eredményeink.....</i>	<i>31</i>
<i>A glioblasztómával operált páciensek klinikai adatainak elemzése.....</i>	<i>32</i>
<i>A pGHRHR, SV1, SV2 receptorok és GHRH expressziója humán GB mintákban.....</i>	<i>33</i>
<i>Az EGFR és PTEN expresszió a vizsgált mintákban.....</i>	<i>34</i>
<i>Az ugyanazon betegekből származó első felismeréskori minták és a kiújult tumorokból származó minták expressziós profiljának vizsgálata.....</i>	<i>35</i>
<i>A génexpressziós eredmények és a kliniko-patológiai adatok analízise.....</i>	<i>36</i>
<i>Az epidurális limfómás betegek retrospektív vizsgálatával szerzett eredményeink.....</i>	<i>38</i>
<i>A tömegspektrometrián alapuló real time, in situ szövettani meghatározás lehetséges szerepe az epidurális limfómák kezelésében.....</i>	<i>38</i>
Megbeszélés.....	39

Összefoglalás	40
Támogatások.....	42
Hivatkozások listája	42
Keywords	50
Függelék.....	51
<i>Közlemények jegyzéke.....</i>	<i>51</i>
<i>A disszertációhoz kapcsolódó előadások és poszterek listája</i>	<i>53</i>

Bevezetés

A neuro-onkológia definíciója szerint a központi és a perifériás idegrendszert érintő tumoros folyamatok kezelésével foglalkozik. A központi idegrendszer daganatos megbetegedései lényegesen nagyobb számban fordulnak elő a neuro-onkológiai gyakorlatban, mint a perifériás idegrendszer daganatai, amelyeknek kezelése inkább az általános onkológiai elveket követi.

A központi idegrendszert érintő folyamatok lehetnek elsődlegesek és másodlagosak. Elsődleges, primer idegrendszeri tumoroknak az idegrendszert felépítő sejtcsoportokból kialakuló tumorokat nevezzük. Másodlagos, szekunder tumoroknak a más szervekből kiinduló daganatok idegrendszeri áttéteit, metasztázisait nevezzük (1).

Megtévesztő lehet, hogy a primer agytumrok közé tartozó glioblasztómáknál a szakirodalomban előfordul, hogy primer illetve szekunder glioblasztómákról esik szó. Ezekben az esetekben a primer glioblasztóma megjelölés bármilyen megelőző, alacsonyabb grádusú tumoros állapot nélkül megjelenő glioblasztómát jelenti. A szekunder glioblasztóma pedig az alacsonyabb grádusú asztrocitóma „másodlagos” malignizálódása során kialakuló glioblasztómát jelenti (1).

A központi idegrendszeri daganatok kezelésekor számos az idegrendszerre jellemző tulajdonságot kell szem előtt tartani. Emiatt a központi idegrendszert érintő tumorok kezelési elvei eltérnek a többi szerv daganatos betegségének kezelésétől. Másrészt a központi idegrendszert érintő áttétes tumoroknak is eltérő tulajdonságai vannak a többi szerv primer vagy szekunder tumorainak sajátosságaitól. Alapvetően a központi idegrendszer daganatos betegségeinek más szervektől eltérő tulajdonságai és kezelési elvei tették szükségessé egy multidiszciplináris, speciális megközelítés létrehozását, a neuro-onkológia kialakulását.

A neuro-onkológiai kezelést befolyásoló, a központi idegrendszerre jellemző legfontosabb általános tulajdonságok az alábbiak lehetnek:

- Az idegszövet regenerációja nagyon korlátozott és a funkcionális plaszticitása 4-6 éves kor után csekély.
- Állományi, az állományon kívüli és a durán belüli, illetve a durán kívüli lokalizációk eltérő kezelési elveket igényelhetnek.
- A tumor direkt és indirekt módon károsíthatja a környező területeket
- Perifokális és/vagy generalizált oedema alakulhat ki a tumor hatására az állományban
- Zárt térben a kompenzációs lehetőségek csekélyek.
- A tumor hatására létrejövő funkcióvesztés lehet reverzibilis és irreverzibilis.
- A funkcionáló (elokvens) területek közelében elhelyezkedő tumorok éppen kiterjesztett biztonságos eltávolítása funkcióvesztés nélkül nem lehetséges.
- Az elokvens terület érintettsége és/vagy tumoros infiltrációja erősen korlátozza a biztonságos reszekció mértékét.
- Az inoperabilitás vagy a parciális eltávolítás második vonalbeli kezelést tesz szükségessé.
- A vér-agy gát speciális kompartmentet képez.

Számos más tényező mellett csak a fentiek alapos figyelembevételével lehet kialakítani az optimális terápiát. Magyarországi és nemzetközi gyakorlatban is a terápiás terv kialakításáról multidiszciplináris team dönt; optimális esetben idegsebész, onkológus, sugárterapeuta, neuro-radiológus, neuro-patológus, neurológus, rehabilitációs szakember részvételével.

A központi idegrendszeri tumorok kezelése ma is a következő három pilléren alapul:

- Idegsebészeti beavatkozás
- Kemoterápia
- Radioterápia

Az elmúlt évtizedekben a kezelés mindhárom pillére jelentős fejlődésen ment keresztül. A lehető legjobb idegsebészeti kezelés elérését azonban elsősorban a preoperatív diagnosztika fejlődése segítette. A preoperatív diagnosztika legjelentősebb előrelépése a képalkotási eljárások: nagyfelbontású komputer tomográfia (CT), mágneses rezonancia képalkotás (MR), MR spektrometria, funkcionális MR, MR traktográfia, képalkotással kombinált elektrofiziológiai „brain mapping”, PET CT megjelenése és klinikai hozzáférhetősége volt (2-5). A lokalizáció és kiterjedés mellett ezek az eljárások a tumor szövettani típusának előzetes feltételezésére is alkalmasak. A képalkotók által feltételezett szövettani diagnózis megerősíthető a műtét előtt pár nappal történő sztereotaxiás mintavétellel, biopsziával. A sürgős beavatkozást igénylő esetekben, azonban biopsziára leggyakrabban nincs idő (2-5).

Elokvens területek intraoperatív azonosításában az elektrofiziológia fejlődése és az éber műtétek jelentettek előrelépést. Intraoperatív térbeli lokalizációt segíti a rutinszerűen alkalmazható neuro-navigáció (3). Az intraoperatív képalkotásban pedig jelentős szerepe lett az olcsó, ismételhető ultrahangnak (6,7), továbbá intraoperatív CT, MR is rendelkezésre állhatnak (2-8).

Azonban a műtét közbeni szövettani azonosítás továbbra is egyetlen elterjedt módja az intraoperatív szövettani analízis maradt. Ez a tradicionális szövettani vizsgálat egyszerűsített, így gyorsabb változata. Ideális esetben, megfelelő infrastruktúra mellett is megközelítőleg 30-40 percen belül hoz eredményt. Ez az időablak egy idegsebészeti műtét során meglehetősen hosszú lehet és a módszer megbízhatósága is alatta marad a hagyományos szövettani analízisnek, továbbá nem nyújt segítséget a tumorhatárok megítélésében és az infiltráló tumorok esetében az infiltráció mértékét sem mutatja megbízhatóan (8-10).

Az idegsebészeti műtétek során a tumoros területeknek az ép állománytól való elkülönítésében továbbra is az idegsebész tapasztalatának van kulcsszerepe, habár az elmúlt években néhány alternatív módszert is kifejlesztettek a szövetek *in situ*, intraoperatív azonosítására és megkülönböztetésére. Legutoljára különféle fluoreszcens vagy radioaktív jelölési technikák - beleértve a nano-partikulumok alkalmazását is - kerültek leírásra az agytumorok *in situ*, intraoperatív láthatóvá tételére, azonban ezek szövettani diagnózist önmagukban továbbra sem adnak (10-12). A jelöléses módszerek mindegyike, olyan fluoreszcens vagy radioaktív molekulák beadását igénylik, amelyek a tumor-sejtekben akkumulálódnak. Hátrányuk közé tartozik, hogy a jelölés specificitása gyakran csekély, a beadást követő optimális műtéti időablak pedig pontosan meghatározott és mindig speciális műtéti körülményeket igényel a detektálás (13-14).

Az elmúlt időszakban bemutatták, hogy néhány tömegspektrometriai ionizációs módszer potenciálisan alkalmas a tömeg spektrometrián alapuló intraoperatív hisztológiai meghatározás kifejlesztésére (15-18). Továbbá kifejlesztettek dedikált tömegspektrometrián alapuló intraoperatív módszereket tumor infiltráció azonosításra hasi sebészeti műtétekhez (18-20).

Az idegsebészet területén azonban továbbra sincs olyan eszköz, amely gyors, *in situ*, intraoperatív analízist tenne lehetővé. Ezt az idegsebészeti speciális követelmények az ép, funkcionáló állomány védelme és a speciális műtéti eszközök tovább nehezítik.

Az idegsebészetben már egy gyors, szövettani diagnózist nyújtó intraoperatív eszköz is nagyban támogatná a helyes sebészeti taktika kialakítását. Azonban a műtéti reszekció kivitelezését

leginkább a tumor határokat mutató, az ép állományt elkülönítő módszer segítésé. Egy ilyen tömegspektrometrián alapuló módszer, elsősorban a glioma típusú daganatok sebészetében jelenthet igazi előnyt, ahol egyrészt a határok és a tumor azonosítása még tapasztalt sebészek számára is sokszor bizonytalan (15). Másrészt gliomáknál, azon belül a glioblasztómáknál továbbra is az életkor, az általános állapot (performance scores) és a sebészi reszekció mértéke maradtak a releváns prognosztikai faktorok (21) illetve a glioblasztóma a leggyakoribb malignus, primer agytumor (1).

Glioblasztóma esetében ismert, hogy a teljes eltávolítás a távoli infiltráció miatt gyakorlatilag nem lehetséges, így a szövettani diagnózis ismeretében, amennyiben a beteg állapota megengedi kötelező az utókezelés. A jelenlegi glioblasztóma protokoll konkuráló kemo-irradiácót javasol posztoperatív kezelésként, azonban ennek eredményei is csak néhány hónapos túlélés növekedést mutatnak a korábbi kezelési rezsimhez képest (22).

Szelektívebb és specifikusabb kemoterápiás lehetőség irányában intenzív kutatás folyik. Primer glioblasztómák genetikai markereinek populáció szinten történő azonosítása, a gliomagenezisben betöltött szerepük vizsgálata széleskörű, de ez idáig a számos kísérlet ellenére genetikai prognosztikai faktort még nem sikerült azonosítani (23). Egyedi molekuláris terápiás célpontot is csak keveset sikerült felderíteni és a klinikai vizsgálatok eredményei szerint a túlélés drámai javulása továbbra is elmaradt, az ilyen támadáspontú kemoterápiás szerek használatakor (24-25).

Összefoglalva: a neuro-onkológiai kórképek kezelésében elsősorban a gliomák azon belül is a glioblasztóma kezelésében égető szükség van a kezelést és a kimenetelt javító új eljárásokra. Habár az elmúlt években történt mérsékelt előrelépés a sebészeti eltávolítás és a gyógyszeres utókezelés tekintetében is, azonban összességében mind a sebészeti reszekció mértékének, mind a posztoperatív kezelés hatásfokának javítására szükség van. Másrészt a neuro-onkológiai idegsebészeti ellátásban fontos szerepe lenne egy intraoperatív, *in situ*, gyors szövettani jellegű diagnózist adó módszernek is. Ez különösen olyan kórképek esetén hozna gyakorlati hasznot, ahol a szövettani diagnózis meghatározza a választandó sebészi taktikát.

Irodalmi áttekintés

A tumoros területek intraoperatív azonosításban az elmúlt évtizedben felvetették a képalkotó technikák (leginkább az ultrahang és a MR) és az infravörös spektroszkópia kombinált alkalmazását, de az ép és a tumoros szövetek komplett elkülönítését sebészeti körülmények között eddig nem tudták bizonyítani (6, 7, 14).

Az idegsebészetben a jelölési eljárások közül a fluoreszcens 5-aminolevulénsav alkalmazását dolgozták ki. Az 5-aminolevulénsav indukálja a fluoreszcens protoporfirin IX akkumulációját a glioblasztóma sejtekben, így lehetővé téve a tumorszövet *in vivo, in situ* láthatóvá tételét agyműtétek során (13). Azonban ez a módszer is a jelölő szer beadását és speciális műszereket igényel a fluoreszcencia detektálása. A módszer értékét a gyakorlati használatban csökkenti, hogy a fluoreszcenciát mutató területek átfedhetnek ép területeket is, valamint a jelölő ágens a műtét során is kijuthat a sejtekből. Továbbá szövettani diagnózist sem nyújt az eljárás, erről a műtét előtt kell megbizonyosodni (13). A technika széles körben nem terjedt el.

A tömegspektrometria a szerves anyagok legérzékenyebb és leghatékonyabb vizsgálóeszközének tartjuk mind analitikai, mind strukturális tekintetben. Alkalmas a kvalitatív és kvantitatív analízisre, jól reprodukálható és rendkívül kis mintamennyiséget igényel. A tömegspektrometria intraoperatív bevezetését sokáig a spektrométerek jelentős mérete és a speciális elhelyezési igény akadályozta. Így a tömegspektrometria az intraoperatív szövettanhoz hasonlóan nem nyújthatott előnyt, mivel a mintát a spektrométerhez kellett vinni. A mobil, kisméretű tömegspektrométerek megjelenésével ez az akadály elhárult, de a tömegspektrometriás méréshez a vizsgálni kívánt minta molekuláit alkalmassá kell tenni az analízishez, azaz - leegyszerűsítve - gázalmazállapotba kell hozni és ionizálni kell őket (16-17).

A rapid evaporációs ionizálás utáni tömeg spektrometria (Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry (REIMS)) a szövetek elektrokautes evaparációján alapul, ahol az ionok az elektromos disszekció során alakulnak ki és azután történik az evaparátum analízise. A REIMS analízis szövet specifikus, azonos idejű („real-time”) adatokat nyújt, de az alkalmazása a termikus evaparációt lehetővé tevő sebési beavatkozásokra korlátozódik, úgymint az elektro-sebészet és lézer sebészet (18-20). Ennek a technikának az alkalmazhatósága számos esetben korlátozott, különösen az idegsebészet területén, mivel amíg az eredeti REIMS metódus monopoláris elektromos sebészen alapul, addig az agysebészeti beavatkozások során elsősorban bipoláris, finom, dedikált eszközöket használunk. Az idegsebészetben elterjedt bipoláris technika tömegspektrometriával történő direkt kombinálása eddig még nem került leírásra.

Az idegsebészetben szintén gyakran használt normál vákuumos szívó mellett az ultrahangos szívó (Cavitron Ultra Sound Aspiration (CUSA)) a szövetek finom elválasztására és elszívására szolgál. Mindkét esetben az eszközöket a kiterjedt szöveti sérülés elkerülése miatt használjuk. Az ultrahangos elszívásnál a nehezebben szívható celluláris komponenst az ultrahangos rezgés megbontja és alkalmassá teszi az elszívásra (25). Megfelelő beállításnál és kezűgyességnél az ultrahangos szívó az ereket sértetlenül hagyja, amelyeket azután szelektíven lehet koagulálni. További előnye az ultrahangos szívónak, hogy elektromos feszültség és jelentős hő terhelés nélkül képes eltávolítani a tumorszövetet. Ez különösen fontos az agysebészetben, ahol a kiterjedt hegyszövet képződés később epilepsziához vezethet illetve az áthaladó elektromos feszültség és hőhatás funkcionális károsodást okozhatnak (20, 26-28). A CUSA és a tömegspektrométer párosításának fontosságát már korábban felismerték, azonban az elszívott szövettörmelék itt nem alkalmas közvetlenül tömegspektrometriás mérésre azt gázalmazállapotba kell hozni és ionizálni kell előbb. Eddig csak a CUSA által elszívott szövettörmelék részletek

előkészítését és a spektrométerhez való transzportálást követő tömegspektrometriai felhasználását ismertették. A CUSA és tömegspektrométer direkt összekapcsolását eddig nem sikerült megoldani (16, 17). A technika on-line, direkt alkalmazása feltételezésünk szerint gyorsabb analízist tenne lehetővé és az egyik legfinomabb idegsebészeti eszköz lenne alkalmas a mintavételre. Másrészt elokvens területek közelében sem kell hőhatástól, elektromos feszültségtől tartani. A műtőben akár a bipoláris csipeszt, akár a CUSA-t spektrométerrel kombinálva elviekben egy gyors in situ hisztológiai analízisre nyílna lehetőség, amely nagyban segítené a sebészi taktika kialakítását.

Ritka kórképek kezelésekor - például az általunk korábban vizsgált primer központi idegrendszeri érintő limfómák esetében - ez jelentős előnnyel járna (29-34). Ezekben az esetekben a kemoterápia és, vagy sugárterápia alkalmazása jó eredménnyel jár és a kezelés alapját ma már ezek a modalitások alkotják a térfoglalás nélküli esetekben (35-38). A térfoglaló esetekben egy intraoperatív gyors szövettani eredmény jelentősen befolyásolja a sebészi technikát, mivel ezekben az esetekben a szövettan ismeretében elegendő a térfoglalás megszüntetése. Térfoglaló spinális epidurális limfómák esetében azonban a sürgősség nem teszi lehetővé a gondos preoperatív kivizsgálást, hiszen mind a biopszia, mind a kiegészítő MR spektroszkópia időigényes (39-46).

A primer agydaganatok közül a glioma csoport gyakoriságánál fogva is különös figyelmet igényel. Különösen az infiltratív gliomák sebészete jelent kihívást, ahol a sebészi tapasztalat kiemelt fontosságú. A tumorhatárok sokszor nehezen ismerhetők fel és a tumor korábbi elnevezésének (multiforme) megfelelően a tumor igen heterogén, állagában is szélsőséges határok között mozog (1). Még tapasztalt sebészekkel is előfordul, hogy még biztonságosan eltávolítható tumorállomány, infiltrált agyállomány marad vissza. Emiatt a glioblasztómák sebészetében különösen hiányzik az eltávolítást segítő technika. A tömegspektrometria elviekben az ép és daganatos szövetek elkülönítésére az idegsebészethen is alkalmas lehet, ahogy a REIMS technika a hasi sebészet egyes területein, ha a módszert az idegsebészeti körülményekhez sikerül adaptálni (18-19).

Korábbi kutatások és sajnos a gyakorlati tapasztalatok is igazolták, hogy a glioblasztómák infiltrációs potenciálja nagyon jelentős (1, 22). A szolid, összefüggő tumor részekről több centiméteres távolságban is lehetnek migrált, tumoros sejtek. Ezeknek sebészi eltávolítása értelemszerűen nem lehetséges. Ettől eltekintve a sebészi reszekció mértéke a glioblasztómás esetekben továbbra is prognosztikai faktor maradt (25). Egyértelmű, individuális molekuláris genetikai prognosztikai faktort azonban eddig még az intenzív kutatások ellenére sem sikerült kimutatni (25). Másrészt a migrált tumor sejtekből a betegség ritka kivételétől eltekintve mindig kiújul, így a szövettan ismeretében utókezelés szükséges. A jelenlegi konkuráló kemo-irradiáció során használt temozolamid vér-agy gáton történő penetrációja kiváló, de se nem szelektív, se nem specifikus kemoterápiás szer (22).

Fentiek miatt a műtéti eltávolítás minél kiterjesztettebb és biztosabb kivitelezése mellett egy molekuláris genetikai prognosztikai faktor és terápiás célpont identifikálása is égetően szükséges lenne. A glioblasztómák esetében a leggyakoribb genetikai eltérés a receptor tirozin kinázok (receptor tyrosine kinases (RTK)) aktivációja, különösen az epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor (EGFR)) aberráns expressziója (47,48). Az EGFR gén amplifikációja és/vagy over-expressziója a primer glioblasztómák karakterisztikus eltérése (48). Az EGFR gén amplifikációja 40%-ukban illetve over-expressziója 60%-ukban fordul elő. A teljes EGFR gén amplifikációjával párhuzamosan növekszik a mutáció, intragenikus delécio eshetősége az EGFR gén 2-7 exonjainak tekintetében (47). Emiatt EGFR lokusz amplifikációja a vad típusú és a v3 variáns ko- és over-expressziójához vezet (23,47). Ez a mutált EGFR, az EGFRv3-ként

ismert variánsa, amely egy folyamatosan aktivált, ligandfüggetlen receptor (47). Azonban kimutatták, hogy a vad típusú és EGFRv3 variáns gén over-expressziója önmagában nem transzformáló esemény felnőtt agyszövetben (47). Humán glioblasztóma minták kiterjedt vizsgálata kimutatott olyan genetikai konstellációt, ahol az RTK-ok aktivációja tumorsuppresszor gén funkcióvesztésével társult, mint például a PTEN (phosphatase and tensin homologue) gén funkcióvesztése (49, 50). A PTEN gén a 10-es kromoszóma hosszú karján lokalizálódó gén, amely a sejtproliferációt a PIP3 útvonalon keresztül hatva gátolja (49). A 10q delécióna a leggyakoribb kópiaszám eltérés glioblasztómáknál, az esetek 85%-ban megtörténik (47, 50-52). A gén funkcióvesztéssel társult mutációja a primer gliomák 15-40%-ára jellemző genetikai eltérés (50-52).

Az EGFR/PTEN/Akt/mTOR útvonal az egyik felderített kulcs genetikai útvonal a primer glioblasztómák kialakulásában (23). Habár az EGFR és PTEN úgy tűnik, központi szerepet tölt be a gliomagenézisben, a molekuláris státuszuk a célzott terápiákra (mint például az everolimus vagy a gefinitib) adott választ nem jelzi előre és a túléléssel sem korrelálnak (24, 25). Ennek ellenére glioblasztóma sejtvonalakon kimutatták, hogy az EGFRv3 és a PTEN koexpressziója az EGFR kinázokra való érzékenységgel társult és, hogy a PTEN gén elvesztése glioblasztómáknál az EGFR kináz inhibitorokkal történő kezelés rezisztenciájához vezet (53).

A gliomagenézis kutatásában különféle peptid hormonok szerepét is intenzíven vizsgálják. A peptid hormonok közül a hipotalamusz által termelt GHRH (growth hormone-releasing hormone) tumorok növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálata került előtérbe. A hipofízis típusú növekedési hormon-felszabadító hormon receptor gén (pituitary-type growth hormone releasing hormone receptor (pGHRH)) a 7p kromoszómán helyezkedik el az EGFR génje mellett (54-55). A növekedési hormon-felszabadító hormon (growth hormone-releasing hormone (GHRH)) bizonyítottan növekedési faktorként viselkedik különféle daganatok esetében. (54, 55). Számos humán tumoros megbetegedésnél a túlélés növelése érdekében GHRH antagonistákat fejlesztettek ki (54, 56, 57), amelyeket sikeresen alkalmaztak malignus glioma sejtenyészetekben is (46-59). Experimentális tumor modellekben a GHRH antagonisták hatása a hipofízis növekedési hormon – hepatikus IGF (inzulin-like growth factor) tengelyen keresztül (60) illetve az autokrin/parakrin GHRH-nak a tumor pGHRH és/vagy SV1 (splicing variáns 1) receptoraihoz való kötődésének direkt gátlásán keresztül érvényesül (61,62). Bizonyított, hogy a GHRH antagonisták specifikusan, nagy affinitással kötődnek a malignus tumorokon lévő GHRH receptorok splicing variánsaihoz is és blokkolva az autokrin GHRH kötődését fejtik ki antiproliferatív hatásukat (61,62). Szintén kimutatták, hogy a perifériába jutott GHRH analóg (JV-1-42) képes penetrálni a központi idegrendszerbe, azaz átmenni a vér-agyagáton (63). Korábban kiderült az is, hogy a GHRH antagonisták analógok csökkentik az U-87GM humán glioblasztóma sejtenyészetek tumorigenicitását (64, 65).

Az elmúlt időszakban az úgynevezett splicing mechanizmus megismerésével kiderült, hogy a tumorokban a splicing során szignifikánsan több hiba történik. A kódolt receptoroknak gyakran funkcionáló és nem funkcionáló splicing variánsai jelennek meg (66, 67). Ezeknek a receptoroknak specifikus agonistáit és antagonistáit lehet kifejleszteni, továbbá a splicing variánsok célzott terápia lehetőségét teremtik meg (58-67). Ismert, hogy a GHRH fő splicing variánsa az SV1 receptor többféle tumortípusban is megtalálható (60, 62, 66, 68). Ezeken kívül bizonyították, hogy emlőtumor sejtvonalak esetében a GHRH antagonisták az EGFR-Akt útvonalon fejtik ki az antiproliferatív hatásukat (69). Eddig azonban a GHRH receptor és a funkcionáló splicing variánsa, az SV1 receptor, és a nem funkcionáló SV2 expresszióját human glioblasztóma mintákon eddig nem vizsgálták.

Célkitűzések

Kísérleteink első részében a tömegspektrometria speciális idegsebészeti adaptálását tűztük ki célul. A bipoláris csipesszel illetve CUSA-val történő mintavétel in situ, intraoperatív, direkt tömegspektrometriai analízisét kívántuk megvalósítani. Ezen belül egyrészt a tömegspektrometrián alapuló in situ, in vivo szövettani azonosítás, másrészt a tumoros és ép területek elkülönítése volt a végleges célunk. Fenti célokkal az intraoperatív döntéshozatal és a sebészi beavatkozás támogatását szerettük volna elérni.

Ezért kiemelten kezeltük a sebészi szempontból kihívást jelentő glioma csoportba tartozó daganatok vizsgálatát és a gliomákon belül különös tekintettel vizsgáltuk az asztrocitómák és glioblasztómák azonosításának lehetőségét, a tumoros szövet ép agyállománytól való elkülönítését és a módszereink ilyen irányú felhasználási lehetőségeit.

Ezen túlmenően, a központi idegrendszeri tumoros folyamat szövettani jellegű azonosításán kívül, a CUSA/SSI-MS módszer egyéb lehetőségeit is vizsgáltuk, úgymint a lipidfrakciók és peptidek kimutatásának lehetőségeit.

Feltételezésünk szerint az egyes peptidek, fehérje fragmentumok azonosítása a tumoros szövet spektrumán belül később lehetővé teszi majd a tömegspektrometriával történő egyre specifikusabb molekuláris faktorok gyors kimutatását is.

A molekuláris prognosztikai faktor és terápiás target hiánya leginkább szintén a gliomák, glioblasztóma posztoperatív terápiája esetében érezhető. A glioblasztómák műtéti eltávolításának javítása mellett a posztoperatív kezelésük szerény lehetőségeit is bővíteni szükséges, emiatt elsőként egy esetleg prognosztikai faktorként is használható terápiás target vizsgálatát tűztük ki célul, egyelőre konvencionális molekuláris genetikai eszközökkel. A glioblasztómák terápiájában lehetséges molekuláris célpontként a GHRH, a GHRH receptor és GHRH receptor splicing variánsok megjelenését vizsgáltuk humán glioblasztóma mintákon a klasszikus, a gliomagenezisben bizonyítottan szerepet játszó EGFR és PTEN expressziós mintázatok mellett.

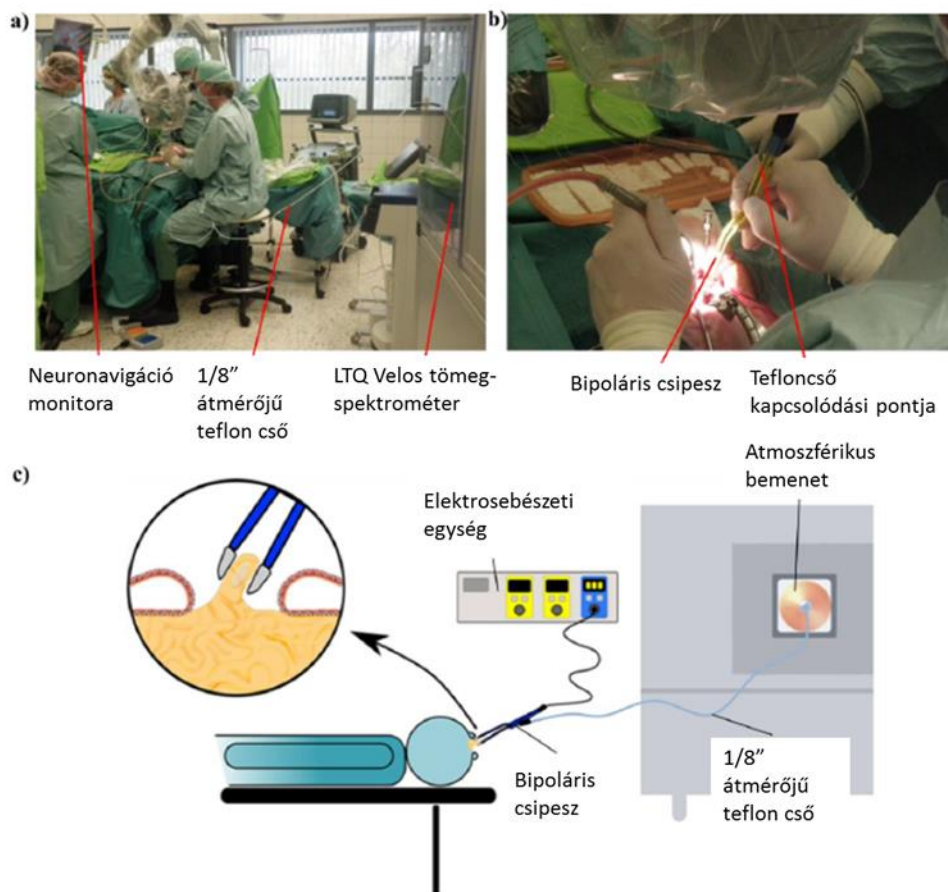
Továbbá kísérleteink során kiderült, hogy a tömegspektrometrián alapuló módszerünk a ritka tumorok gyors azonosításában is szerepet kaphat. Így disszertációnkban példaképpen bemutatunk egy ritka kórkép a spinális epidurális limfómák eseteinek retrospektív vizsgálatát, amelyeknél eredményeink szerint, ha gyors intraoperatív szövettani diagnózis állna rendelkezésre az adott helyzetben az a műtéti kezelés stratégiáját is megváltoztathatná.

Anyagok és módszerek

Bipoláris koagulációs csipesz és tömegspektrométer összekapcsolása (BF-MS)

Kereskedelmi forgalomban lévő a műtétek során egyébként is alkalmazott, eredetileg vízcsepegtetési, általunk módosított bipoláris csipeszt használtunk (ERBE Elektromedizin GmbH, Tübingen, Németország), amely a REIMS technikához hasonlóan az ionizációt is megvalósította az in vivo sebészeti beavatkozások alatt.

A sebészi ionforrás és az ion transzfer felépítését az 1. ábra mutatja be. A minta ionizációja a sebészeti beavatkozás helyén megtörténik a csipesz közé került szövetdarab elektromos disszekciója során. A keletkezett sebészi „füstöt”, valójában evaporátumot, még helyesebben aeroszolt a csipesz hegyétől kissé magasabban lévő eredetileg a csepegtetésre tervezett réseken szívtuk el. A csipesz másik végét egy 4 méter hosszú, 1/8 col külsőátmérőjű és 2mm belsőátmérőjű teflon csővel kötöttük össze az LTQ Velos (ThermoScientific, Bremen, Németország) vagy LCQ Deca XP Plus (ThermoFinnigan, San Jose, Kalifornia, USA) tömegspektrométerek általunk készített kapillaris bemeneteivel. A szívásért felelős mikro pumpát sűrített levegővel hajtottuk meg 2,5 bar névleges bemeneti nyomással (a klinika központi sűrített levegő hálózatból). A pumpa tömeg spektrométer gyári, ion forrásával lett összeépítve az atmoszférikus bemenetre merőlegesen azért, hogy redukálja a tömegspektrométer belsőbb részeit érő szennyeződést.



1. ábra: Fényképek és szerkezeti vázlat az idegsebészeti eszközről.

(a) Az idegsebészeti műtőben készült kép a tömegspektrométerhez párosított eszközzel (Debreceni Egyetem, Magyarország). (b) Sebészi használatban a mintavevő csipesz és látható a kapcsolódó elvezető teflon cső. (c) A módszer vázlata és a spektrométer atmoszférikus kapilláris bemenetével történő összekapcsolásról.

A bipoláris csipesszel kombinált tömegspektrométerrel végzett intraoperatív, in situ mérések menete, etikai engedélyek

A kísérletekben mindig a fent bemutatott bipoláris csipesz és a mobil tömeg spektrométer direkt összekapcsolásával kialakított kompakt rendszert használtuk, amelynek kapcsolt része a spektrumokat rögzítő komputer és a számításokhoz, kiértékeléshez használatos szoftver. A rendszert teljes mértékben adaptáltuk a műtéti körülményekhez.

Fontos kiemelni, hogy a műtétek során a tumorok rutinszerű eltávolítását végeztük el és a tumor felszínének koagulációja a vérzéscsillapítás miatt minden műtétnél megtörténik és minden körülmények között keletkezik a hőhatásra evaporátum. A kortikotómia végzésekor történő koaguláció az ép, vagy annak tűnő agyfelszínen, majd az agyállományban a tumor legközelebbi úton történő elérést szolgálja. Szöveti verifikációra eltávolított rendkívül kismennyiségű peritumorális kortex vagy fehérállomány a tumor eltávolításakor minden esetben egyébként is eltávolításra, elszívásra került volna. Utóbbi méréseket itt peritumorális, vélhetőleg ép agyszövet spektrumként vettük fel. Minden esetben csak a koaguláció során egyébként is keletkező aeroszolt használtuk fel a mérésekhez. Az intraoperatív vizsgálatok elvégzését a Debreceni Egyetem etikai bizottsága engedélyezte.

A bipoláris csipesszel 44 műtét során szívtuk el a tumorok koagulálásakor keletkező evaporátumot, amelynek spektrometriai adatait rögzítettük. Továbbá 4 műtét során a peritumorális állomány koagulációjakor is sikerült mintát venni. Az így létrehozott spektrometriai adatbázist 11 későbbi műtét során gyűjtött mérésekkel teszteltük.

A műtétek után az eltávolított szövetek, tumorok szabályos patológiai vizsgálatra kerültek, mint minden más esetben. Az eltávolított tumorokból nem hiányzott szövetrész. A szövettani azonosítás a korábbi rutinnak megfelelően a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében történt, illetve a CUSA mérésekhez is felhasznált esetekben a Giesseni Egyetemen is.

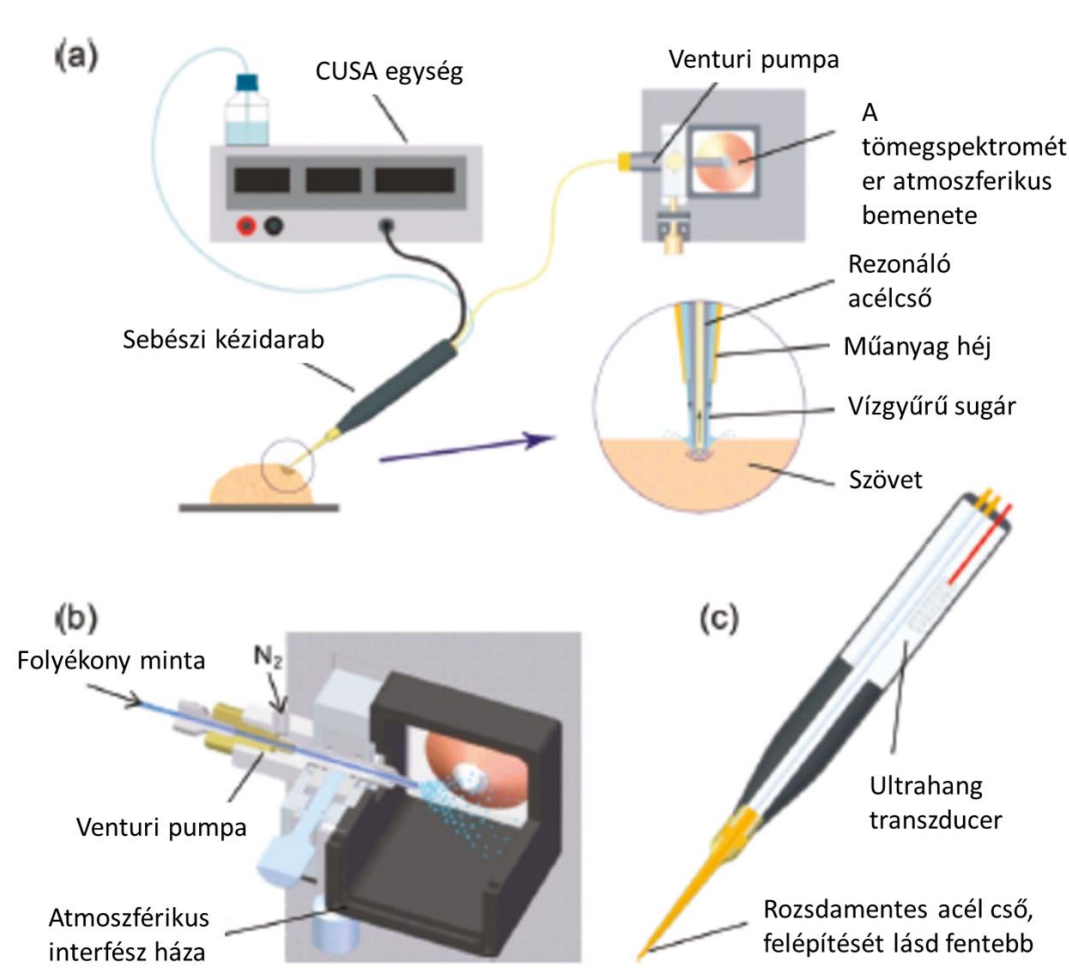
A spektrumok adatbázisban tárolása és analízise az ultrahangos szívó és tömegspektrométer összekapcsolásával készült mérésekkel egyformán történt.

Ultrahangos szívó (CUSA) és tömegspektrométer összekapcsolása (CUSA/SSI-MS)

A szövetek dezintegrációjára és eltávolítására a kereskedelmi forgalomban levő ultrahangos szívót (CUSA, Cavitron Ultrasound Aspiration) használtuk (Selector, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Németország). Az ultrahangos dezintegrációt 24 kHz frekvenciával és 60%-os energiafokozat mellett végeztük. Teflon csővel (1/16 col külsőátmérő, 1,2 mm belsőátmérő) helyettesítettük a kézidarab szívóoldalát, hogy a memória effektust csökkentjük. Ezt a Teflon csövet kötöttük egy módosított Venturi pumpához egy 2 méter hosszú (1/8 col külső, 2 mm belsőátmérőjű) teflon csővel. Ebben az összeállításban a Venturi pumpát nitrogén gázzal hajtottuk meg 10 bar névleges nyomással. A Venturi pumpa a tömegspektrométer atmoszférikus bemenetére lett felszerelve itt is, a fentieknek megfelelően, merőlegesen a kapillárisra (2. (b) ábra). Az ezzel megegyező atmoszférikus interfészt korábban Santos és mtsai írták le (70) és Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization-nak nevezték el (V-EASI). A nagy felbontású tömegspektrometriai mérések Thermo LTQ Orbitrap Discovery (ThermoScientific, Bremen,

Németország) eszközzel történtek. Az kis felbontású méréseket pedig egy LCQ Deca XP Max (ThermoFinnigan, San Jose, Kalifornia, USA) quadrupole ioncsapdájú tömegspektrométerrel végeztük el.

Az ultrahangos reszekció során a vibráló kézi darabot a szövet felszínére helyezzük és a vibrációt (~20-40 kHz) egy körkörös a kézi darab végére kívülről rávezetett vízgyűrű adja át a szövetnek. Ennek részleteit a 4. (a) ábrán mutatjuk meg. A folyadékot a szövettörmelékkel együtt vákuumos szívással távolítja el az eszköz a hegy belsejében lévő nyíláson. A szívás által létrehozott áramlási sebesség 2-10 ml/perc között változtatható (2. (c) ábra).



2. ábra (a) A tömegspektrométer és az ultrahangos kézi darab kísérleti összeállítása.

A kinagyított az ultrahangos szívó végének felépítését mutatja, amelyen a lefelé nyíl a víz áramlási irányát a felfelé nyíl a szövettörmelék elszívásának irányát jelöli. (b) A tömegspektrométer bemeneti nyílására szerelt Venturi-EASI típusú pumpa. (c) A sebési eszköz kézi darabjának vázlata.

A CUSA-val kombinált tömegspektrométerrel végzett mérések menete, a minták kezelése, etikai engedélyek

A kísérletekben mindig a fent részletezett CUSA és a mobil tömegspektrométer direkt összekapcsolásával kialakított kompakt rendszert használtuk, amelynek kapcsolt része a spektrumokat rögzítő komputer és a számításokhoz, kiértékeléshez használatos szoftver. A rendszert teljes mértékben adaptáltuk a műtéti körülményekhez.

Az eszköz analitikai képességének vizsgálatához és az optimális kísérleti paraméterek beállításához először élelmiszer minőségű sertés szerveket használtunk.

Az *ex vivo* vizsgálatokhoz a human agymintákat és agytumor szövetmintákat a Debreceni Egyetem és az Universitätsklinikum Giessen und Marburg (Németország) Idegsebészeti Klinikájáról szereztük be, amelyeknek szövettani validálása megtörtént.

Az emberi agy szeleteket illetve az agy metasztatikus tumorait tartalmazó szövettanilag validált szeleteket a Debreceni Egyetem, Patológiai Intézetéből szereztük be. A kutatás elvégzését a szövettani minták gyűjtését mind a Debreceni Egyetem, mind a Giesseni Egyetem etikai bizottsága engedélyezte.

A bipoláris csipesszel illetve a CUSA-val kombinált tömegspektrométerrel gyűjtött spektrumok tárolása, elemzése illetve statisztikai analízise

Az egyes tömegspektrumok felvétele egy szövet egyszeri mintavételezését követő tömegspektrometriás mérésből, negatív és vagy pozitív ionmóddal, 150-1000 m/z értékek között történtek. A más ionmóddal vagy m/z értékkel történt kivételeket jeleztük.

A spektrumok adatait digitalizáltuk 0,01 m/z felbontást használtunk a nagyfelbontású méréseknél és 1,0 m/z értéket az alacsony-felbontású méréseknél és az adatokat SQL (Structured Query Language) adatbázisban tároltuk (Oracle, Redwood City, Kalifornia, USA). Az adatbázis tartalmazza a spektrumhoz tartozó minta teljes klasszikus szövettani eredményeit, klasszifikációját, WHO grádusát.

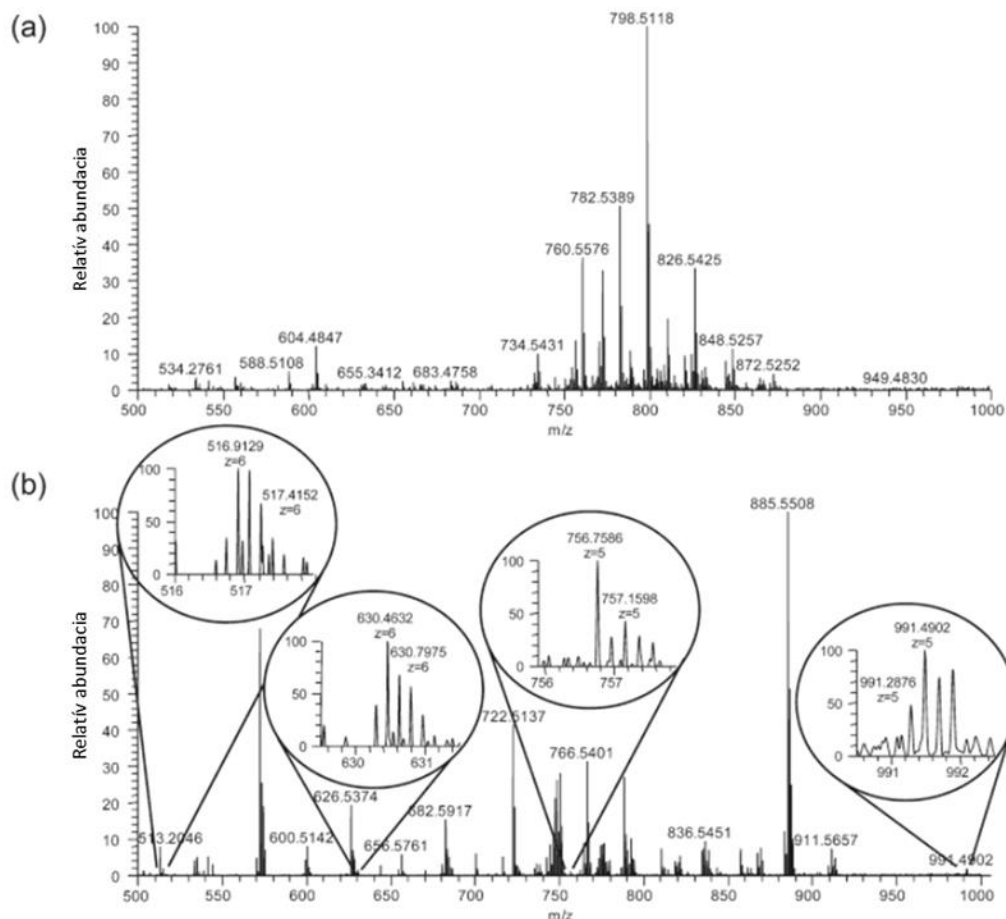
A teljes spektrumokat tároltuk és a későbbi spektrumok gyors megfeleltetéséhez a teljes spektrumot analizáltuk. A kiválasztott, normalizált teljes spektrumon, PCA (principal component analysis) analízist végeztünk, hogy a dimenziók számát 60-ra csökkentjük. A PCA-t követően LDA (linear discriminant analysis) analízist végeztünk a dimenziók számának csökkentése nélkül. A dimenziók számának megválasztása kereszt-validációs vizsgálatok által korábban meghatározottak szerint történt (20), ahol a mérési hibát a komponensek számának függvényében teszteltük.

A létrejövő PCA/LDA modellt szintén az adatbázisba mentettük és majd a szövettípus meghatározáshoz használtuk vagy demonstráció céljából az első három PCA vagy LDA komponensek átlagának függvényében (relative abundance) koordináta rendszerben ábrázoltuk (3. ábra).

Egy új spektrumnak a valós idejű klasszifikációja az elementett PCA/LDA modellen alapul. Az új spektrumot először a 60 dimenziós PCA térbe majd a szintén 60 dimenziós LDA térbe kell transzformálni. Ezt követően a négyzetes Mahalanobis távolságot kalkuláljuk minden az adatbázisban meglévő szövettani csoport PCA/LDA dimenzióknak az átlagához. Az új spektrum a legközelebbi csoportátlaghoz kerül besorolásra akkor, ha a spektrum minden dimenzióban a csoportátlag +/- 5-szörös standard deviációján belül van. Ha a spektrum kívül van a fent megállapított intervallumon, a spektrumot nem tudjuk besorolni, az nem tartozik az eddig ismert szövettani csoportokba (19, 20).

Alkalmazott biztonsági szabályok az aeroszolak belélegzésével kapcsolatban

Műteti körülmények között a sebészek és a személyzet is a rendszeresített, szabvány szűrőképességű sebészeti maszkokat használta. Az experimentális és *ex vivo* méréseknél a fentieknek megfelelő paraméterekkel rendelkező maszkot viseltünk (M7500 series maszk 6055 A2 filterrel (3M Deutschland GmbH, Neuss, Németország)).



3. ábra (a) Sertés agy kortex CUSA/SSI (sonic spray ionisation = szónikus spray-ionizáció) spektruma pozitív ion módban. (b) Humán agy tumor CUSA/SSI spektruma negatív ion módban. A kinagyítások többszörösen töltött ionok jelenlétét mutatják, amelyek peptideknek felelnek meg.

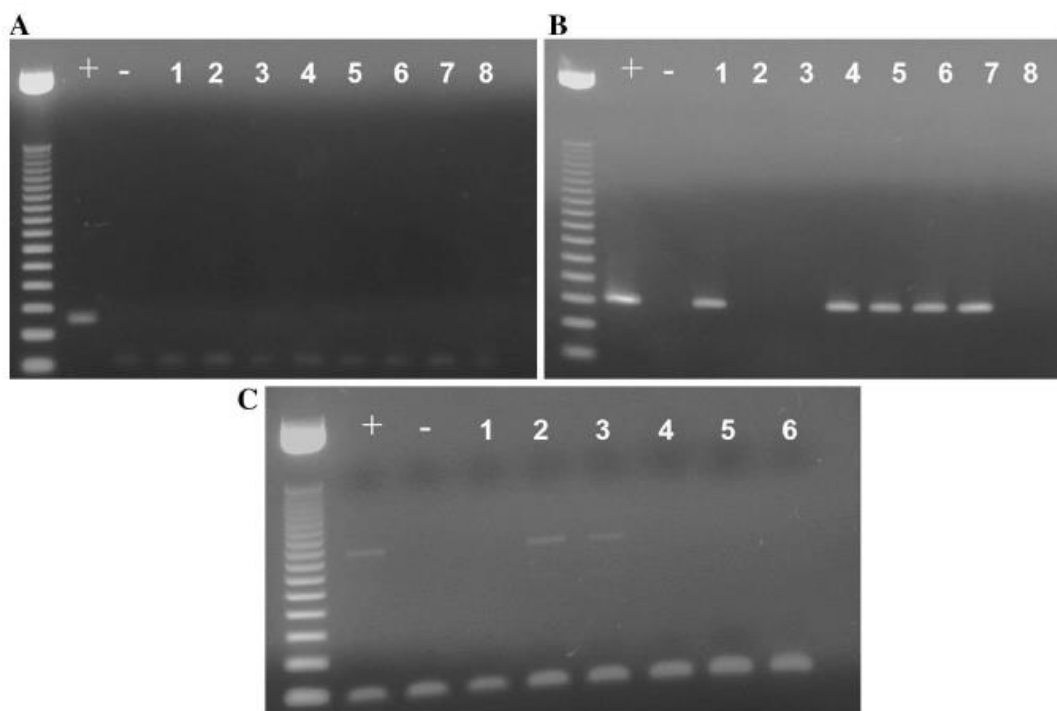
A genetikai vizsgálatoknál felhasznált glioblasztóma minták gyűjtése, kezelése, etikai engedélyek

Huszonhat szövetmintát (23 glioblasztóma és 3 peritumorális szövetminta) gyűjtöttünk össze idegsebészeti beavatkozások során a Debreceni Egyetem, Idegsebészeti Klinikáján. A mintákat az eltávolítást követően folyékony nitrogénben rögtön lefagyasztottuk és -80 °C tároltuk a felhasználásig. A szövettani analízishez és genetikai vizsgálatokhoz a kivett minta ugyanazon darabjait használtuk. A tumorok szövettani diagnózisát formalinnal fixált, parafinba ágyazott metszetek hematoxin-eozin festése és további immunhisztokémai vizsgálata alapján állapítottuk meg. A tumorok szövettani klasszifikációja a WHO 2007-ben kiadott “Classification of Tumors” szabályai alapján történt (1). A Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte a

minták gyűjtését és felhasználását. A betegek beleegyező nyilatkozat aláírásával hozzájárultak a kivett szövetek tudományos felhasználásához.

RNS extrakció menete és a RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) a GHRH, a pGHRHR és a SV1 és SV2 receptorok esetében

A fagyasztott mintákat egy éjszakán keresztül -20 °C-on RNAlater Ice (Qiagen, GmbH, Germany) oldatban inkubáltuk. A szövetmintákból való RNS izoláláshoz RNeasy Mini kit-et (Qiagen, GmbH, Germany) használtunk. Az RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) és 1% TAE agaróz gél használatával határoztuk meg. Minden egyes mintából 250 nanogram RNS-t írtunk át cDNS-é QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) felhasználásával 20 mikroliternyi végső térfogatban. A kontrollként beta-aktin (ACTB) gént használtunk. A gén specifikus primereket a pGHRHR-hoz (sense: 5'-CACGTCTTCTGCGTGTGAG-3', antisense: 5'-GCATCTCCTCTGCTGCTTGT-3') és SV1-hez (sense: 5' GGAGTTGTGGCTAGAGAG-3', antisense: 5'-GCATAGAACAGTGGAGAAG-3') a the primer3_www.cgi v0.2 programmal terveztük (71) a GHRH, SV2 és ACTB primereinek tervezését és szintézisét korábbi közleményeknek megfelelően végeztük (67). Minden PCR reakcióban a cDNS 1 mikroliterjét amplifikáltuk egy összesen 25 mikroliteres oldatban, amely 1,5 millimol MgCl₂-ot, egy egységnyi PCR puffert (Fermentas, Germany), 0,3 millimol mindegyik deoxinukleotidból (Promega, Germany), egy egység TrueStart HotStart DNS polimerázt (Fermentas) és mindegyik primerből 0,25 mikromol tartalmazott. A mintákat 3 percig 95 °C-on denaturáltuk, majd az ACTB-nél harminc egyébként negyven cikluson keresztül 45 másodpercig 95 °C-on, azután 30 másodpercig 54 °C-on az SV1, 59 °C-on az SV2, 64 °C-on a GHRH illetve 67 °C-on a pGHRHR esetében, majd 1,5 percig 72 °C-on végeztük az amplifikációkat, amelynek végén 10 percig 72 °C-on álltak a minták. Minden egyes amplifikátum 10 mikroliterét 1,5%-os agaróz gélen elektroforézissel megfutattuk, ethidium bromiddal festettük és UV fény alatt láthatóvá téve elemeztük (4. ábra)



4. ábra: A ligand GHRH és GHRH receptor expressziók GB mintákon. Gél fotók (a) a pGHRHR, (b) GHRH, (c) splicing variáns SV1 receptorok mRNA expressziójáról; + pozitív kontroll (human hipofízis), - negatív kontroll, 1-8 GB minták.

Az EGFR és PTEN expresszió vizsgálata kvantitatív real-time RT-PCR technikával

Minden mintából 600 nanogram RNS írtunk át cDNS-re High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, CA, USA) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. Ezután SYBR Green Premix Ex Taq-alapú assay-t használtunk az EGFR és PTEN mRNA expressziójának meghatározására (Takara Bio Inc., Japan).

A vizsgálathoz a következő primereket használtuk 0,25 mikromol végső koncentrációban. EGFR (sense: 5'-CTC AGC CAC CCA TAT GTA CC-3'; antisense: 5'-CGT CCA TGT CTT CTT CAT CC-3'), PTEN (sense: 5'-AGC ATC ACC ATT CTT TGC TG-3'; antisense: 5'-ACC ACA GCC ATC GTT ATG AA 3') and GAPDH (sense: 5'-CAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'; antisense: 5' TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3'). Minden reakció 15 nanogram cDNS-t tartalmazott triplikátum formátumban és M×3005P™ real-time PCR System segítségével amplifikáltuk (Agilent Technologies, USA) a következő hőmérséklet profil mellett: aktiváció 1 percig 95 C-on, 40 ciklus amplifikáció 1 percig 95 C-on, majd 30 másodperc 55 C-on (GAPDH), 58 C-on (EGFR), 60 C-on (PTEN) esetben, majd 1 perc inkubálás 72 C-on. Minden esetben az olvadási görbét meghatároztuk (72). A gén expressziók változását (fold change) a $\Delta\Delta C_t$ (73) módszer alapján határoztuk meg GAPDH belső kontroll mellett és kalibrátorként a peritumorális mintákat használtuk.

Statisztikai analízis a génexpressziós vizsgálatoknál

A statisztikai analízishez az IBM SPSS Statistics 19 (IBM Corporation, USA) szoftvert használtuk. Az EGFR és PTEN expressziók esetében a több mint kétszeres gén expresszió változást tekintettük a gén up- vagy down regulációjának. A Kolmogorov-Smirnov teszt alapján az EGFR expresszió értékeinek eloszlása a normál eloszlástól szignifikánsan különbözött, ezért nem parametrikus tesztekkel használtunk az EGFR (Mann-Whitney U teszt), a PTEN (independent samples median teszt) gének és a GHRH, SV1 profilok illetve a kliniko-patológiai adatok összehasonlítására. A túlélések analíziséhez Kaplan-Meier módszert log rank tesztel (Mantel-Cox) használtunk. A $p < 0,05$ értékeknél tekintettük az eltérést szignifikánsnak.

A spinális epidurális limfómák retrospektív analíziséhez használt módszerek

A Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézete és az Idegsebészeti Klinika által mintegy két és fél évtized alatt kezelt 1166 limfómás beteg adatait tekintettük át. Kliniko-patológiai, diagnosztikus és terápiás adataik retrospektív ellenőrzésével az 512 Hodgkin limfómával és a 654 Non-Hodgkin limfómával kezelt beteg spinális epidurális érintettségét vizsgáltuk. 13 esetben a betegség epidurális térfoglalással járt vagy epidurális térfoglalásként jelentkezett először.

Eredmények

A tömegspektrometria idegsebészeti alkalmazása

Az eszközök idegsebészeti és a műtéti körülményekhez való adaptációját a szerző végezte. A módosított bipoláris csipesz és a CUSA optimális felhasználásának intraoperatív alkalmazásához szükséges változtatások az összekapcsolás módjának kidolgozása és a paraméterek beállításának idegsebészeti aspektusai szintén a szerző munkája. Az idegsebészeti eszköz és a kapcsolódó műszerek operatív körülményeknek megfelelő, helyes működését a műtétek vagy az *ex vivo* kísérletek közben, a disszertáció szerzője felügyelte. A humán műtétek jelentős részében a szerző operatorként vagy asszisztens operatorként is részt vett. A tömegspektrometriai mérések ellenőrzését, a mérések feldolgozását a spektrometriában jártas szakemberek, a szerzőtársak végezték. A szövettani és a klinikai adatok begyűjtését és az analízisek eredményeinek végső idegsebészeti értékelését szintén a szerző végezte.

A bipoláris csipesz és tömegspektrométer direkt összekapcsolásával szerzett eredményeink

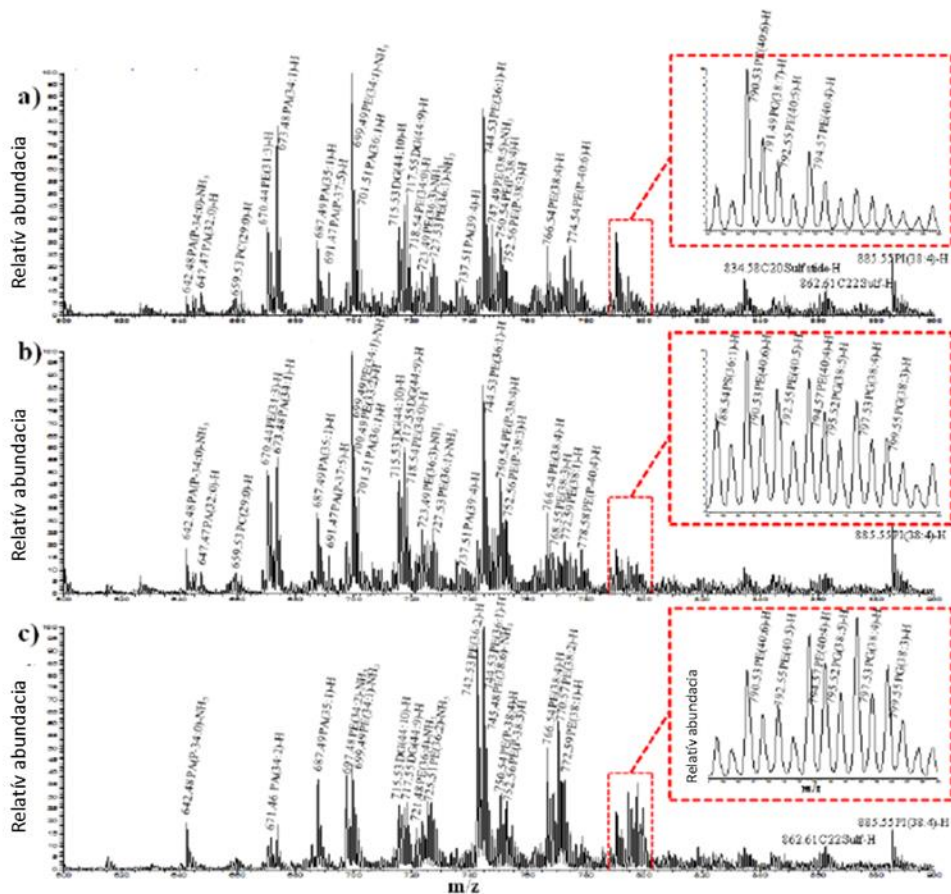
Összesen 55 műtét során végeztünk tömegspektrometriai méréseket. Az első 44 páciens műtétje során összesen 264 spektrumot vettünk fel és szövettan specifikus adatbázist hoztunk létre. A negyvennégy műtét során *glioblasztóma*, további gliómák, metasztázisok, meningeoma, *limfóma*, neurilemmoma, ganglioglioma szövettani diagnózisok fordultak elő. A 44-ből 4 műtét során a peritumorális állomány koagulációjakor is sikerült mintát venni. Az operált tumorok szövettani besorolása és a műtétjük során felvett spektrumok részletes megoszlását az 1. táblázatban mutatjuk be.

További 11 páciens műtétje során felvett spektrumokkal (1. táblázat) teszteltük az adatbázist (5 glioblasztóma, ugyanitt 1 peritumorális agyszövet, 3 metasztázis, 3 meningeoma). Emellett az adatbázis felépítésekor létrehozott szövettanspecifikus PCA/LDA modellek egymás közötti keresztvalidációját is elvégeztük.

Diagnózis	Adatbázis beteg száma	Spektrumok száma	A validáláshoz használt betegek száma
Peritumorális agyszövet	4	23	1
Asztrocitómák (kivéve GB)	5	23	-
Ganglioglióma	1	14	-
Glioblasztóma	10	49	4
Limfóma	1	3	-
Meningeóma	8	38	3
Metasztázis – emlő, tüdő, vastagbél, endometrium, hólyag	15	99	3
Neurilemmóma	2	9	-
Egyéb (nekrozis)	2	6	-
Összesen	44	264	10

1. táblázat: A betegek száma, a tumorok szövettani típusának megoszlása, és a felvett spektrumok száma látható. A későbbi validációra használt betegek spektrumai nem lettek feltöltve az adatbázisba.

A műtétek során felvett peritumorális agyszövet, glioblasztóma és metastázis spektrumokat az 5. ábrán mutatjuk be. Az ábrán jól látható, hogy a spektrumok az ábrán megjelenített szövetek esetében részben átfedést mutatnak, azonban látható az is, hogy az egyes spektrum csúcsok egymáshoz viszonyított aránya szignifikánsan különbözik és szövetspecifikus eloszlást mutat.



5. Ábra (a) Humán ép agyszövet, cortex spektruma, (b) Humán glioblasztóma spektruma és (c) tüdőmetasztázis spektruma 600-900 m/z tartományban LTQ Velos tömegspektrométerrel vizsgálva. A spektrumokat *in vivo*, *in situ* vettük fel idegsebészeti műtétek során a módosított, kereskedelmi forgalomban levő bipoláris csipeszt használva. A spektrumok egymásnak megfelelő csúcsainak aránya minden egyes szövettípus esetén különbözik, amelyet a 788-803 m/z tartomány kinagyított részein mutatunk be.

Továbbá, ahogy várható volt a metasztatikus tumorszöveteknél különbözött a csúcsok eloszlása leginkább a normál agyszövetétől és az elsődleges agytumorknál pedig kevésbé.

Ahogy korábbiakban leírtuk az 54 beteget két csoportba osztottuk. Az első csoportba került 44 páciens műtétéje során felvett spektrumokat az adatbázisba mentettük. A második csoport 10 betegének spektrumait pedig független validációra használtuk (2. táblázat).

	Validálásra használt spektrumok száma	Validáció
Peritumorális agy	12	83.33% (16.66% fals pozitív)
Asztrocitóma	-	-
Glioblasztóma	8	100%
Metasztázis	14	100% (Colon és tüdő metastázis)
Neurilemmoma	-	-
Meningeóma	13	100%

2. táblázat. A független validációs teszt eredményei

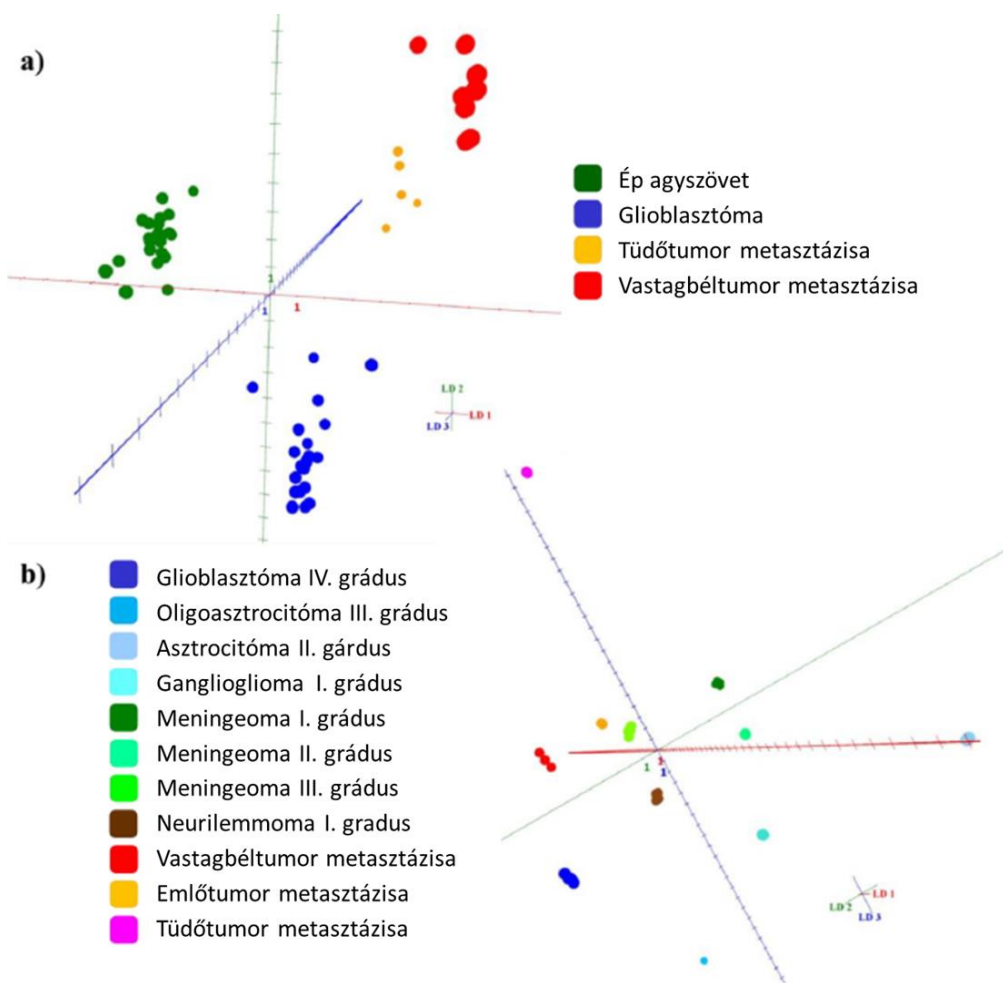
A validáció során különösen a *glioblasztóma*, *meningeoma* és a *metasztázisok* validálása mutatott a várakozáson felüli értéket. Vagyis egy glioblasztóma műtétéje során a tumorfelszín koagulációjakor felvett spektrum az adatbázisba eddig feltöltött LDA és PCA modellekhez 100%-ban validálható volt, hasonlóan a vastagbél és tüdőmetasztázisok új műtétekkel való validálásához. Egyértelmű, hogy a kapott eredmény részben a kis elemszám miatt ilyen kiemelkedő, hiszen egy-két százas nagyságrendű spektrumból felépített adatbázishoz viszonyítottunk pár új műtét során szerzett spektrumot.

Mivel ganglioglioma és *limfóma* műtéteiből csak egy-egy állt rendelkezésre, ezekben az esetekben kereszt validáció vagy független validáció nem volt lehetséges. Ezen tumorok spektrumait az analíziseket követően (LDA) az első három LD (linear discriminant) értékkel egy pontra vonatkoztatva ábrázoltuk a többi tumorrall együtt ko-ordináta rendszerben illusztrációként (6. ábra).

A 6.ábra jól szemlélteti, hogy a glioblasztóma minták és a különböző grádusú asztrocitómák is jól elkülönülnek egymástól és a többi szövetmintától.

Próbaképpen az ép agyállomány spektrumok és az agytumor spektrumok "leave-one-out" keresztvalidációját is elvégeztük. Habár ahhoz, hogy az egyes kategóriákban statisztikailag értelmezhető elemszámunk (beteg illetve spektrum) legyen összefoglaló szövettani kategóriákat kellett létrehoznunk, mint ép agyszövet, primer glioma és metastázisok. A fenti tesztet használva a módszernek szignifikáns érzékenységet az adott elemszámnál csak az ép agyszövet kimutatásában mutatott.

Látható azonban, hogy 54 beteg esetén az operált agytumorok diverzitása megnehezítette, hogy elég adatot gyűjtsünk egyszerű statisztikai multivariancia analízisek végzéséhez, azonban az általunk kialakított PCA+LDA algoritmusunkat használva az adatok statisztikai analíziséhez a módszer még a gyűjtött minták száma mellett is alkalmas az egészséges és tumoros agyszövet, a primer és a metastatikus agydaganat elkülönítésére. Emellett potenciális lehetőséget nyújt a különböző grádusú primer daganatok megkülönböztetéshez is. Ennek illusztrálására a felvett spektrumok első három LD értékét ábrázoltuk 3 dimenziós koordináta rendszerben, ahol az egyes LD értékek adták meg az x, y, z koordinátákat.



6. ábra: A különböző agytumorkok LTQ Velos tömegspektrométer használatával felvett spektrumainak első három LD (linear discriminant) értékének ábrázolása ko-ordináta rendszerben. (a) Az ép agyállomány és a feltüntetett különböző tumortípusok elkülönülése az első három LD értékek ábrázolása során. (b) Különböző gradusú meningeómák, asztrocitómák és eltérő eredetű metasztázisok összevetése LCQ Deca tömegspektrométerrel felvett spektrumok első 3 LD értékének ábrázolásával. Az ábra emellett láthatóvá teszi, hogy az LDA algoritmus még a három első LD érték esetén is jól használható a szövettani típusok elkülönítésre.

A műtétek során a bipoláris csipesz sikeresen regisztrálható volt neuronavigációs rendszerhez is, így a mintavétel térbeli helyzetét és a tumorhoz való viszonyát így is ellenőrizni tudtuk.

A módszer előnyét a kísérleteink során elsősorban az adta, hogy a REIMS technikához hasonlóan a szövet koagulációja során keletkező gáz halmazállapotú aeroszol direkt vizsgálható a tömegspektrométerrel. Másrészt a REIMS technika során felgyűlt tömegspektrometriai analízisben szerzett tapasztalatokat fel tudtuk használni. Azonban a rendszer legnagyobb hátrányát pont az elektromos hőhatáson alapuló mintavétel jelentette, mivel ez az idegsebészeti környezetben korlátozottan alkalmazható, ha nem csak a tumoron magán szeretnénk méréseket végezni és információt gyűjteni. Elokvens területek közelében sokkal inkább megfelelőnek tűnt a CUSA alkalmazása.

A CUSA és a tömegspektrométer összekapcsolásával elért eredményeink

A CUSA használatakor dezintegrált szövet és vér a folyamatos öblítésre használt fiziológiás sóoldattal együtt kerül elszívásra. Feltételeztük, hogy ennek az elszívott szövettörmeléknek a tömegspektrometriai analízise elegendő adatot szolgáltat az adott szövet azonosításához.

Komponens	Negatív ion mód
zsírsavak	16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:3, 20:4, 22:6
foszfatidil-etanolaminok	16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3 22:6
foszfatidil-serinek	16:0, 18:1, 18:0, 20:5, 22:6
foszfatidil-inozitolok	16:0, 18:0, 20:4
plazmalogének	16:0, 18:1
foszfatidsavak	16:0, 18:1, 18:0
szulfatidok	18:1, 22:1, 22:2, 24:0, 24:1, 24:2, 24:3, 26:2

Komponens	Pozitív ion mód
foszfatidil-kolinok	16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:3, 20:4, 22:6
foszfatidil-etanolaminok	16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:4, 22:4, 22:6
trigliceridek	18:2, 20:0, 20:4, 18:1

3. Táblázat a CUSA/SSI módszerrel negatív és pozitív ionmódban azonosított lipidek

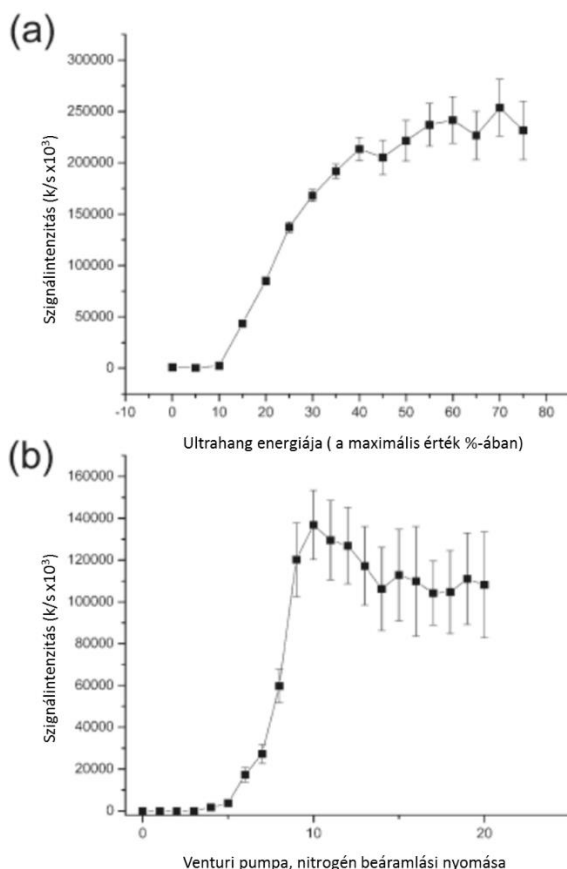
Habár az elszívott szövettörmelék spray ionizációja tűnt a legegyszerűbb megközelítésnek, a makroszkópos szövetdarabok jelenléte hatékonyan meggátolta bármilyen hagyományos spray ionizációs összeállítás használatát, amely kapillárisokat használ a folyékony minta továbbítására. A nemrégiben leírt Venturi “easy ambient sonic spray” ionizációs technika (70), azonban lehetővé teszi az 1mm-t meghaladó átmérőjű csövek használatát a minta tömeg spektrométerbe történő juttatására. Másrészt a Venturi eszköz elég szívóerőt tud produkálni a folyékony minták továbbításához nagyobb átmérőjű csövek használatakor is.

A kísérleti összeállításunkat (2. ábra) először sertés agy vizsgálatával teszteltük. És ezt az *in situ*, *in vivo* eszköz modelljének tekintettük.

A nem szokványos mintavételi módszer és a folyékony, darabos minta gázhalmazállapotba való transzformálása majd ionizálása azonban számos problémához vezetett. Ezért a sertés agyvelőn végzett kísérleteink során vizsgálnunk kellett az eszköz többféle paraméterének hatását a spektrum jelintenzitására, minőségére. Ebben az összefüggésben vizsgáltuk a CUSA eszköznél az ultrahang energiáját, a Venturi pumpa nitrogén beáramlási nyomását, az atmoszférikus interfész relatív geometriáját, az analízátor feszültség beállításait és a spektrométer kapilláris bemenetének hőmérsékletét.

A szignálintenzitás erősen függött a dezintegrációra használt ultrahang energiájától (7. (a) ábra). Az eredmények világosan mutatták, hogy a sejtek ultrahangos felbontása, dezintegrálása előfeltétele annak, hogy a sejtkomponensek magas koncentrációt érjenek el az öblítő folyadékban és így megfelelő spektrum minőséget kapjunk. Az eredmények azt is megmutatták, hogy a bemutatott eszköz és a működési stratégia nem használható ultrahangos dezintegráció nélkül, vagyis nem működik az idegsebészetben is széles körben használt egyszerű sebési szívóval. A jelerősség és a Venturi pumpa bemeneti nitrogén nyomásának vizsgálata dinamikus kapcsolatot

mutatott tiszta telíthetőségi maximummal a 0-30 bar tartományban (7. (b) ábra). Az egyértelmű optimális határérték miatt a további kísérletekben 10 bar nyomású nitrogént használtunk a Venturi pumpa meghajtására.



7. ábra: (a) A jelerősség az ultrahang energiájának függvényében, (b) A jelerősség a pumpát meghajtó nitrogéngáz bementi nyomásának függvényében

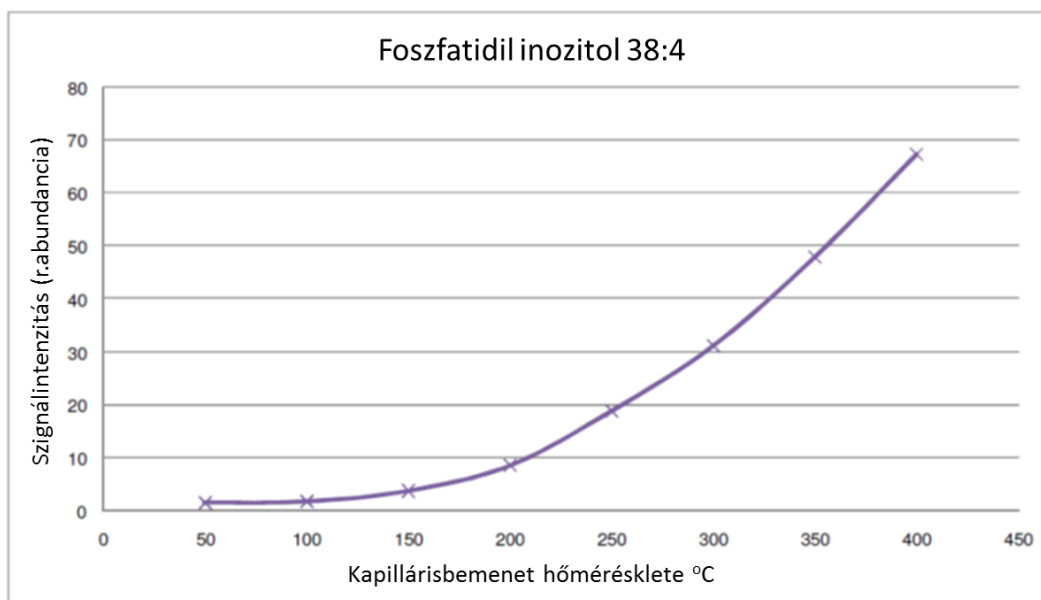
Mind a jelerősség függése a porlasztó gáz nyomásától, így áramlási sebességétől, mind az ultrahangos dezintegráció szükségessége arra mutatott, hogy egy szónikus sprayszerű ionizációs mechanizmus történik, mivel a folyékony minta egyedül pneumatikus sprayhatáson megy keresztül és nincs elektromos potenciál gradiens vagy hőhatás.

Ezt a feltételezést az a megfigyelés is alátámasztotta, hogy csak azoknak az alkotó molekuláknak a csúcsai voltak detektálhatók, amelyek a folyadékban disszociálódtak. Azért, hogy ezt a szónikus spray ionizációs mechanizmus hipotézist bizonyítsuk, leszűrt szövet homogenizátumot vizsgáltunk tradicionális sonic spray ionforrással (74). Az így kapott spektrumok nagyon hasonlóak voltak a CUSA/SSI felvett eredményekhez, amelyeket a 3. (b) ábrán mutattunk be.

További kísérleti bizonyítékot nyújtott a glutamin aminosav különböző pH értékeken történő porlasztása. A keletkező anion és kation pH függő intenzitása majdnem identikus volt a Venturi eszköz és a tradicionális szónikus spray ionforrás esetén, hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz.

A Venturi pumpa relatív pozíciója a tömegspektrométer atmoszférikus interfészéhez szintén drámai hatással volt a szignál intenzitására. Az Venturi pumpa kimenetének optimális távolsága a tömeg spektrométer bemenetétől kb. 20-25mm-nek adódott. Habár a Venturi pumpa és a tömeg spektrométer kapilláris által bezárt szög kisebb hatással volt az intenzitásra és a hosszanti elrendezés bizonyult jobbnak az derékszögben való elhelyezést választottuk, hogy minimalizáljuk az eszköz szennyeződését.

A tömeg spektrométer bementeti kapillárisának hőmérsékletét is vizsgáltuk az intenzitás függvényében. Száz °C alatt a foszfatidil-inozitol 38:4 intenzitása elhanyagolható volt, azonban 100-400 °C között növekvő tendenciát találtunk (8. ábra). Így mivel az ionizáció hatékonysága a hőmérséklettel nőtt, ez az eredmény is azt a feltételezést támasztotta alá, hogy az összeállításunkban sonic spray-szerű ionizáció történik. Azonban a hőmérséklet emelésével annak esélye is növekedett, hogy a bementeti kapilláris eltömődjön a kitapadó nagyobb szövetdaraboktól így kompromisszumként 250 °C-ot használtunk a későbbiekben.



8. ábra: A kapilláris hőmérséklet és a lipid szignál intenzitásának kapcsolata.

Az eszköz paramétereinek optimalizációja lehetővé tette a CUSA/SSI rendszerünk 4 órás folyamatos működtetését, amely egy átlagos időtartamú műtétnél és azon belül a CUSA használat időtartamához képest bőven elegendő.

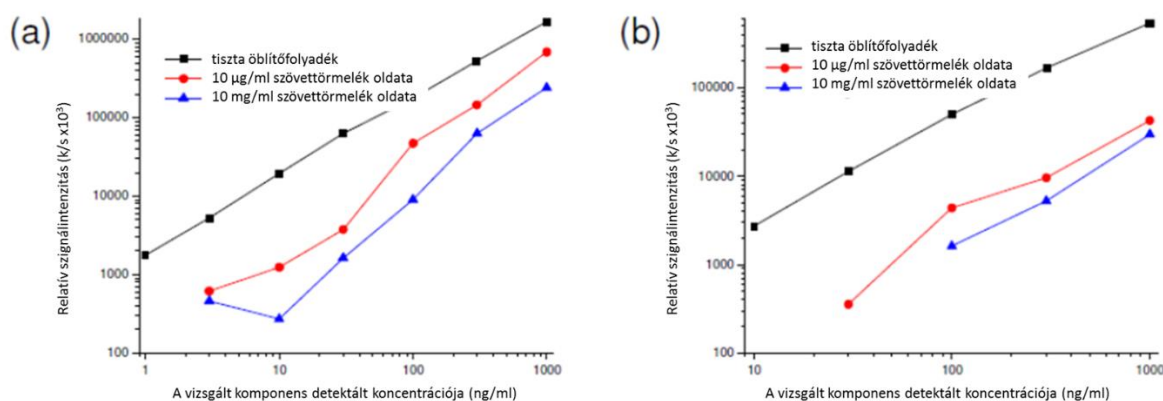
A CUSA csőrendszerének eltömődése esetén a műtétnél segédkező asszisztensnek kell átöblíteni a rendszert és ilyenkor a tömegspektrométer felé a bemenet zárt. A vezeték tefloncsőre cserélését követően memória effektust nem jelentkezett és a Venturi ionforrás sem mutatott erre utaló jelet a tesztek során.

Az ionoptika optimális beállítása is különbözött a Venturi technika esetén a klasszikus elektropray ionizációnál vagy a légköri nyomású kémiai ionizációnál szokványos beállításoktól. A semleges elektród (az eredeti beállításban ez földelt) -90 Voltra töltésénél körülbelül ötszörös jelerősödés jött létre.

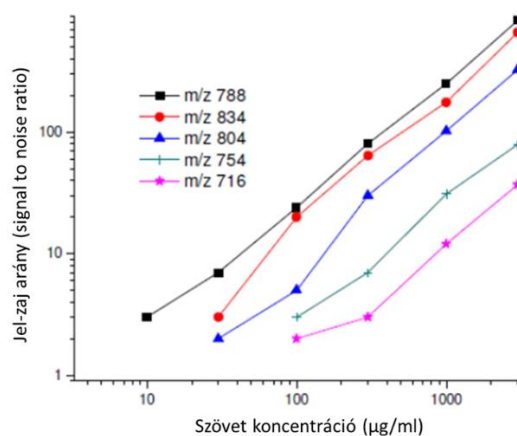
A módszer általános érzékenységét mind a teljes spektrum információk, mind az egyedi összetevők detektálásával határoztuk meg. Az előbbi esetben változó mennyiségű sertés agy

fehérállományát oldottuk fel 1 ml fiziológias sóban az ultrahangos kézidarab segítségével és szívtuk fel a Venturi pumpa segítségével a tömegspektrométerbe.

A kapott spektrumokat integráltuk és a különböző csúcsok jel-zaj arányát ábrázoltuk a szuszpendált szövet tömegének függvényében. Az eredményekből következően teljes spektrális információ már 500 mikrogrammos vagy nagyobb szövet felhasználása esetén is rendelkezésre áll és a spektrum mintázata változatlan. A fő csúcsok azonban már 50 mikrogram/ml-es koncentrációban is rendelkezésre állnak. Az egyedi összetevőkre való érzékenységet substance P és foszfatidil etanolamin kimutatásával teszteltük. A kimutathatósági határt három különböző agyszövet koncentrációban vizsgáltuk. Az adatokat a 9. ábrán mutattuk be. A megfigyelt LOD (limit of detection, kimutathatósági határ) értékek (3:1 jel-zaj arány mellett) nanogram/milliliter tartományban voltak a peptidek és 100 nanogram/milliliter tartományban a foszfolipid komponensek tekintetében (10. ábra).



9. ábra: Kalibrációs görbék a Substance P (a) és foszfatidil-etanolamid (b) LOD (limit of detection) vizsgálatánál

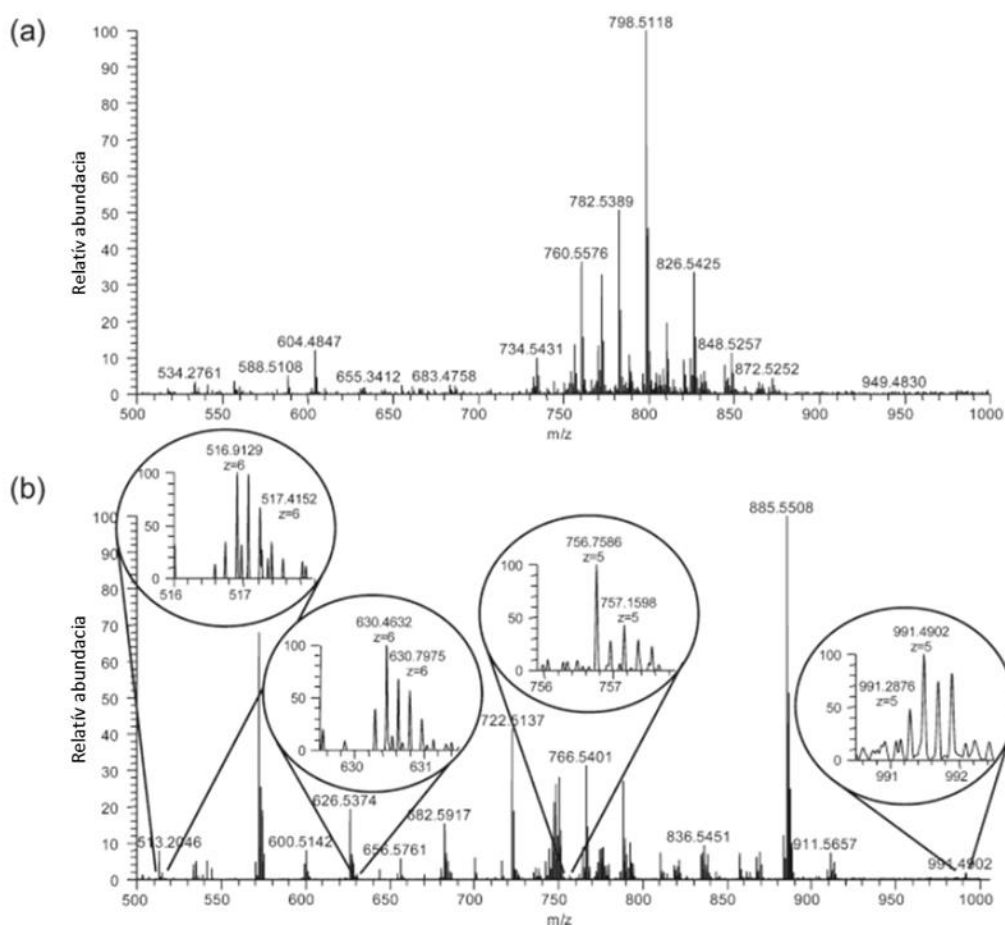


10. ábra: Az intakt foszfolipidekre vonatkozó LOD (limit of detection) kísérletek kalibrációs görbéi

Az érzékenység értékek megfelelnek konvencionális sonic spray ionizációs technikák érzékenységének (75, 76) és a szöveti komponensek kimutatását a fenti bizonyítékok alapján nyomnyi koncentrációban is lehetővé teszik.

Az így kialakított modell rendszerünkkel felvett spektrumokat az 11. ábrán mutatjuk be. Mint ahogy elméletileg is várható volt a spray ionizáció során létrejövő ionok főleg változatos lipidcsúcsoknak felelnek meg a spektrumban, amelyek az egyszerű zsírsavaktól a glicerofoszfolipidek vagy szulfatid-glikoszfingolipidek jelenlétét mutatják. A sertés agyminták vizsgálata során azonosított lipideket az 3. táblázatban foglaltuk össze. A sertés agyszövet negatív ion módban, alacsony m/z értéknél mért tömegspektrumát a 12. ábrán mutatjuk be.

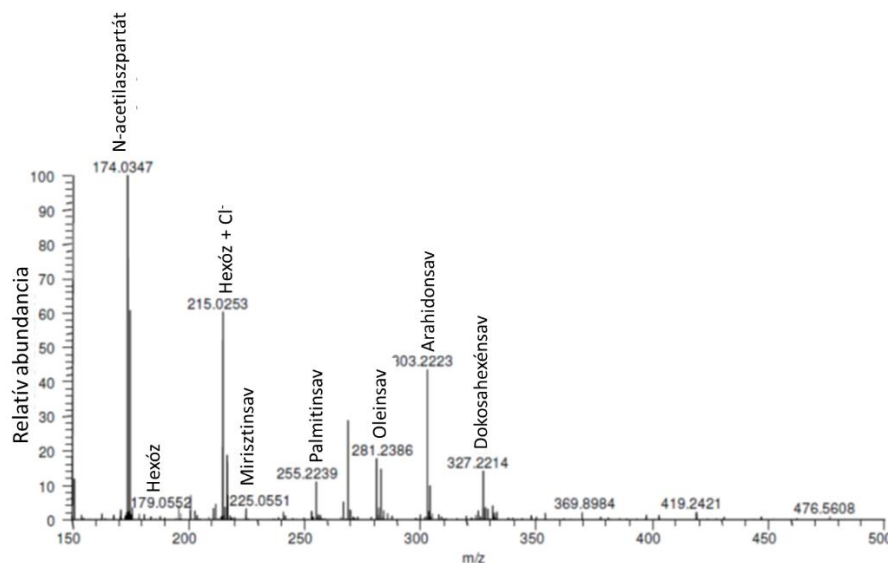
Ellentétben más “ambiens” tömegspektrometriai módszerekkel, mint például a REIMS, a CUSA/SSI (cavitron ultrasonic surgical aspiration/sonic spray ionization) módszer az igen intenzív lipid ion populáció mellett egyes anyagcseretermékek, szénhidrátok és peptidek ionjait is létrehozza és azok jelenlétét is kimutatja.



11. ábra (a) Sertés agy cortex pozitív ionmódban CUSA/SSI tömegspektrometriával felvett spektruma (b) Humán agytumor minta, negatív ionmódban CUSA/SSI tömegspektrometriával felvett spektruma. A kinagyított részek többszörösen töltött ionszignáloknak felelnek meg, amelyek peptideknek felelnek meg

Az 11. (b) ábrán a kinagyított részekben is látható, hogy a human agyminták negatív módban felvett spektrumában többszörösen töltött peptid anionok jelenlétére utaló csúcsok vannak.

Agytumor mintákat vizsgálva az általunk A-nak és B-nek elnevezett ionszignálok egy 3788,3 Da és egy 4960,5 Da molekulatömegű peptid jelenlétét jelzik (77, 78). Az A szignál a molekulatömege és töltöttsége alapján a CGRP (calcitonine gene related peptide)-nek felel meg, amely a központi idegrendszerben bőségesen előfordul és a tüdőtumорок esetében is diagnosztikus markerként írják le. A B szignált a korábbi kísérletek a béta-timozin peptidhez rendelik, amelyet szintén a kissejtes tüdőtumорок prognosztikai markereként írtak le (78,79).



12. ábra: CUSA/SSI eszközzel negatív ionmódban sertésagy fehérállomány vizsgálatakor készült tömegspektrum az alacsony m/z tartományban

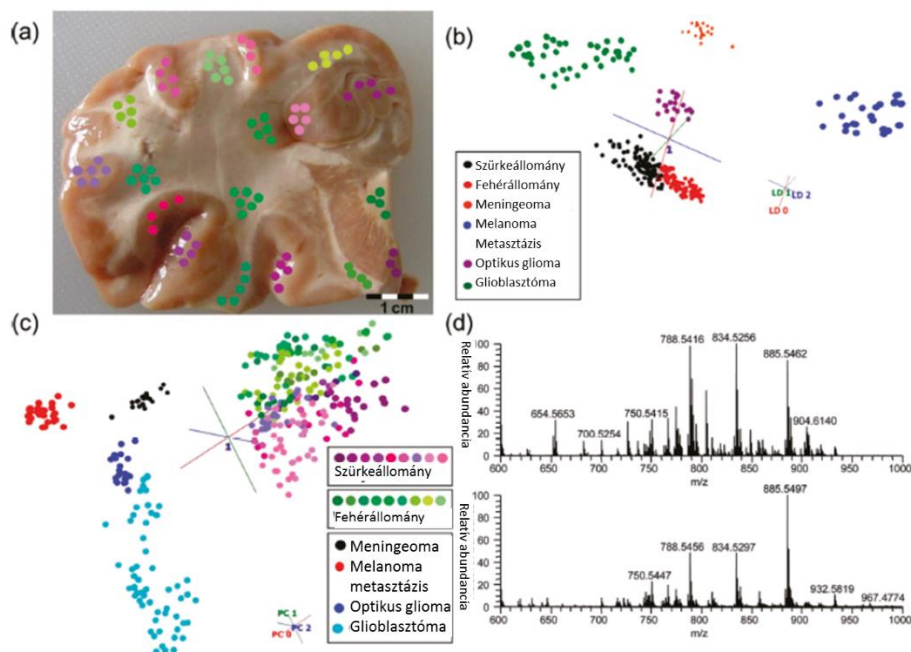
A mi kísérleti azonosításunk egyszerű ellenőrzése azon a tényen alapult, hogy a vizsgált minta kissejtes tüdőtumor agyi áttétje volt (80, 81). Azonban az ilyen azonosítás validálásához további kísérletek szükségesek.

Kísérletünk másik fő célja egy olyan tömegspektrometrián alapuló módszer kifejlesztése volt, amely alkalmas a szövetek intraoperatív azonosítására, és amely segíti a sebészt a tumorszövet minél teljesebb eltávolításában az ép szövetek megőrzése mellett. Egyértelmű, hogy a szövetspecifikus adatok begyűjtése az ilyen analízis előfeltétele.

A CUSA/SSI spektrum tekintélyes szövetspecifitást mutat még ép, poszt mortem, humán agyszövetminták esetén is. A szürke és a fehérállomány területéről vett minták a módszerrel karakterisztikus különbséget mutatnak (13. (d) ábra). Hasonlóan a MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) imaging, (82) DESI imaging vagy a (83) REIMS technikákkal gyűjthető komplex lipid komponens spektrumokhoz az általunk gyűjtött spektrumok szövetspecifitása sem a szövetspecifikus biomarkerekhez kapcsolódott, hanem inkább az azonos lipid komponensek spektrális mintázatának eltérő eloszlásán alapult. Mivel az egyedi ionintenzitások kevésbé informatívak a szöveti azonosításra teljes spektrális információkat használtunk.

Nyilvánvaló, hogy a tömegspektrometriás ujjlenyomatot használó azonosításhoz a korábbiakban is leírt adatbázis szükséges, amely tartalmazza a szövettanilag már verifikált autentikus spektrumok összességét.

A spektrális adatbázist részben humán friss fagyasztott *ex vivo* minták (humán agytumorminták) és friss post mortem minták (humán post mortem, ép agyszeletek) használatával alakítottuk ki. Az *ex vivo*, friss post mortem (24 órán belüli) és friss fagyasztott minták közötti spektrális különbség elhanyagolhatónak bizonyultak korábbi állatkísérleteink során. Az adatbázis 284 szövettanilag ellenőrzött agytumorminta spektrumait tartalmazta és ezt az adatbázist használtuk az azonosítási algoritmus kifejlesztéséhez. A 600-1000 m/z érték között felvett spektrumokat digitalizáltuk és normalizáltuk. A módszereknél kifejtett PCA-t végeztünk, hogy a spektrumot jellemző dimenziók számát 60-ra csökkentsük (20). A 13. (c) ábra prezentálja a szövettanilag azonos csoportok spektrumainak térbeli megoszlását az első három PC (principal component) alapján, magukat a spektrumokat pedig az 14. ábrán ábrázoltuk.



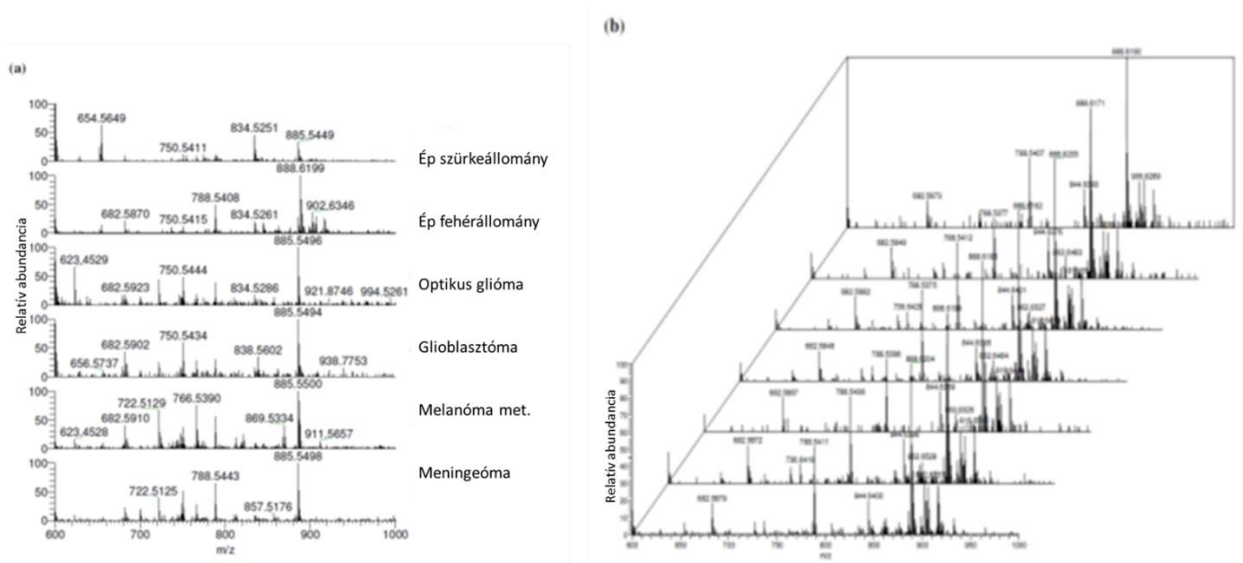
13. ábra: (a) Ép humán agyszelet képe a mintavételi helyekkel (a színek megegyeznek a (c) ábrán látottakkal) (b) Humán ép agyszövet és agytumorszövetek térbeli ábrázolása az első három LDA paraméter függvényében (c) Humán ép agyszövet és agytumorszövetek térbeli ábrázolása az első három PCA dimenzió függvényében (d) Tipikus negatív ion módban felvett human szürkeállomány (fent) és human fehérállomány spektrum (lent).

Habár az adatok így is teljes elkülönülést mutattak, irányított LD analízist végeztünk, hogy tovább növeljük az egyes csoportok közötti szegregációt. Az LDA eredményét az első három LDA paraméter térbeli ábrázolásával a 13. (b) ábrán mutatjuk be. Így várhatóan az egyidejű analízis meghatározza az aktuálisan felvett minta helyét az adatbázis 60 dimenziós LDA terében és klasszifikálja a spektrumot a legközelebbi szövettani-specifikus adatcsoporthoz. Mivel az LDA tér nem ortogonális az új spektrum dimenzióink távolságát a már ismert szövettani csoportok

dimenzióitól négyzetes Mahalobonis teszttel határoztuk meg a módszerekben leírtaknak megfelelően.

A jelenlegi hardveres háttérrel egy ismeretlen szövet spektrumának az azonosítása az előre létrehozott PCA/LDA adatbázissal kevesebb, mint 0,1 másodperc, amely elhanyagolható részt képez a teljes analízishez szükséges 2-3 másodperces intervallumban. Természetesen feltéve, hogy a szövettanhoz tartozó spektrum már benne van az adatbázisban.

Glioblasztóma és ép agyszövet azonosítási teljesítménye mindkét esetben 100%-osnak bizonyult, azonban ez a váratlanul jó eredmény részben a minták limitált száma miatt jöhetett létre. Ez további finomításra szorul, olyan későbbi vizsgálatokkal, ahol az elemszámot néhány száz helyett néhány ezerre kellene növelni.



14. ábra: (a) Humán szürke és fehérállomány illetve különféle humán agytumorkok egy mérésből származó tömegspektrumai. (b) Különböző területekről származó humán, ép fehérállomány minták egyszeri méréssel begyűjtött spektrumai.

A korábbi műtétek során a CUSA kézidarabját sikeresen regisztráltuk a neuronavigációs berendezésünkhöz, így a mintavételezés térbeli helyének ismételhetősége kivitelezhető. Ez azt jelenti, hogy az intraoperatív körülmények között - hasonlóan a bipoláris csipeszhez - a CUSA/SSI tömegspektrometriai adatai elhelyezhetők a koponyán belüli térben és a spektrumok az adott pont radiológiai jellemzőivel összehasonlíthatók.

A glioblasztómás esetek génexpressziós vizsgálatával szerzett eredményeink

Homogén klinikai csoportok kialakítását és a mintákhoz tartozó klinikopatológiai adatgyűjtést a szerző végezte. A GHRH-val kapcsolatos RT-PCR és primer szintézis a Debreceni Egyetem Biofarmácia Intézetében történt, az ehhez szükséges mRNS izolálást a szerző végezte. Az EGFR, PTEN expressziós vizsgálatokat a Népegészségtani Intézet Biomarker Tanszékén végeztük. A primereket a szerző szerezte be. Az mRNS izolálást és a real time PCR-t, ez eredmények értékelését egy molekuláris biológus kollégával együtt a szerző végezte. Az

eredmények összefoglalása a statisztikai elemzések értékelése és a publikáció végleges formája szerző munkája.

A glioblasztómával operált páciensek klinikai adatainak elemzése

Huszonhárom primer glioblasztómában szenvedő beteget operáltunk meg 2005 novembere és 2008 novembere között. A rezekált szolid tumorok mintáit vizsgáltuk. Csak egyértelműen primer glioblasztómás esetek válogattunk be, ahol a legnagyobb tumorátmérő 3 centiméter felett volt, de a páciens állapota mind pre-, mind posztoperatív az utókezelést lehetővé tette és makroszkóposan jó rezekció történt. 15 esetben a műtét a tumor első felismerését követően történt. A beavatkozás után a szövettan ismeretében standard postoperatív kezelést kezdeményeztük. A posztoperatív kezelést négy esetben leállítottuk a tumor rapid progressziója és a beteg állapotának gyors romlása miatt. Egy esetben pedig a beteg non-compliance-e miatt. A 23-ból 8 esetben korábbi műtét történt és a páciensek megkapták a szokásos utókezelést a bebizonyosodott glioblasztóma szövettan miatt. Ezekben az esetekben a tumorrecidíva reoperációjakor gyűjtöttünk mintákat. Ebből a 8 esetből 4-ben az első műtétből is rendelkezünk mintával. Három esetben peritumorális mintát is be tudtunk szerezni, amelynek eltávolítása a tumor eléréséhez szükséges volt. Ezeket a szöveteket a később mért EGFR és PTEN expressziós értékek kalibrálásához használtuk.

A betegek átlagéletkora $59.8 \text{ év} \pm 2.2 \text{ SE}$ (standard error) volt (37–78 év tartományban). A nő férfi arány pedig 14:9. Az utánkövetés az utolsó beteg haláláig tartott (2011 július). Az átlagos teljes túlélés $536.3 \text{ nap} \pm 107.0 \text{ SE}$ ($n = 19$) volt a diagnózistól és $411.3 \text{ nap} \pm 90.3 \text{ SE}$ ($n = 23$) a mintavételtől. A négy reoperált beteg természetesen egy betegként szerepel a releváns statisztikákban. Minden beteg a tumorprogresszió miatt hunyt el. A klinikopatológiai adatokat az 4. táblázatban összegeztük.

Beteg száma	Nem	Kor	Kor felismeréskor	Túlélés a mintavételtől (nap)	Teljes túlélés (nap)	Elsődleges lokalizáció	Kezelés a mintavétel előtt	Kezelés a mintavétel után	Szövettan
1. csoport									
1A	N	64	Ugyanaz	702	Megegyezik	Bal temporális	Nincs	CI, C	GBM
2	N	67	Ugyanaz	156	Megegyezik	Jobb frontális	Nincs	Nincs	GBM
3	F	73	Ugyanaz	280	Megegyezik	Bal temporo-parietális	Nincs	I	GBM
4	N	66	Ugyanaz	1738	Megegyezik	Bal frontális	Nincs	CI, C	GBM
5	N	66	Ugyanaz	112	Megegyezik	Bal occipitális	Nincs	CI	GBM
6	N	63	Ugyanaz	662	Megegyezik	Jobb temporális	Nincs	CI, C	GBM
7A	F	51	Ugyanaz	721	Megegyezik	Bal temporo-occipitális	Nincs	CI, C	GBM
8A	F	61	Ugyanaz	709	Megegyezik	Bal fronto-temporális	Nincs	CI	GBM
9	F	78	Ugyanaz	38	Megegyezik	Bal temporális	Nincs	Nincs	GBM
10A	F	52	Ugyanaz	715	Megegyezik	Bal frontális	Nincs	CI, C	GBM
11	F	59	Ugyanaz	90	Megegyezik	Bal temporális	Nincs	Nincs	GBM
12	N	60	Ugyanaz	1231	Megegyezik	Bal temporális	Nincs	CI	GBM
13	N	44	Ugyanaz	65	Megegyezik	Bal temporo-parietális	Nincs	Nincs	GBM
14	N	75	Ugyanaz	17	Megegyezik	Bal fronto-temporális	Nincs	CI	GBM
15	N	44	Ugyanaz	578	Megegyezik	Bal frontális	Nincs	Nincs	GBM
2. csoport									
1B	N	65	64	264	702	Bal temporális	CI, C	C, I	GBM sl
7B	F	53	51	21	721	Jobb cerebelláris	CI, C	C	GBM sl
8B	N	63	61	50	709	Bal parieto-occipitális	CI	Nincs	GBM sl
10B	F	52	52	566	715	Bal frontális	CI, C	Op	GBM sl
16	N	37	37	196	364	Bal occipitális	Op, CI	Op	GBM sl
17	N	74	72	276	1209	Bal cerebelláris	Op, Op, I	Nincs	GBM sl
18	F	58	57	85	400	Jobb frontális	Op, Op, CI	Nincs	GBM sl
19	N	51	50	187	402	Jobb frontotemporális	CI	Nincs	GBM sl

4. táblázat: A primer glioblasztómával operált betegek főbb klinikai jellemzői.

A pácienseket két csoportra osztottuk: az 1. csoportba a felismeréskor operált betegeket, a 2. csoportba a korábbi kezelést követően operált betegeket soroltuk. Az A) és B) kiegészítés ugyan azt a beteget jelenti.

CI kemo-irradiáció, I irradiáció, C temodal monoterápia, Op operáció, sl postirradiációs szövettani eltérések

A pGHRH, SV1, SV2 receptorok és GHRH expressziója humán GB mintákban

A pGHRH receptor nem expresszáldott az általunk vizsgált mintákban, azonban az SV1 receptor expressziója a minták 17,4% kimutatható volt (23/4). A másik – feltételezhetően nem funkcionáló – splicing variánst, az SV2 receptort két minta esetében tudtuk kimutatni. A természetes ligand lehetséges autokrin vagy parakrin hatásának vizsgálata miatt, a GHRH expressziót is meghatároztuk és ez 23-ból 14 mintában (61,9%) kimutatható volt. Csak egy mintában expresszáldott mind a ligand GHRH, mind az SV1 receptor. A 9 GHRH negatív minta közül 3 pozitív volt az SV1 receptorra. A pGHRH, SV1, SV2 és GHRH kifejeződés konstellációit a 5. táblázatban részleteztük.

Beteg száma	pGHRH	GHRH	SV1	SV2
1. csoport				
1A	–	+	–	–
2	–	–	–	–
3	–	+	–	+
4	–	+	–	–
5	–	+	–	–
6	–	+	–	–
7A	–	+	–	–
8A	–	+	+	–
9	–	–	–	+
10A	–	+	–	–
11	–	–	+	–
12	–	+	–	–
13	–	+	–	–
14	–	–	+	–
15	–	–	–	–
2. csoport				
1B	–	+	–	–
7B	–	–	–	–
8B	–	–	–	–
10B	–	–	–	–
16	–	+	–	–
17	–	+	–	–
18	–	+	–	–
19	–	–	+	–

5. táblázat: A ligand GHRH és receptorainak (pGHRH, SV1 és SV2) mRNS expressziója human GB mintákban.

Az 1. csoportban az első operációnál vett mintákat a 2. csoportba a kezelést követően vett mintákat soroltuk. A) és B) megjelölések ugyanazt a beteget jelentik az első illetve a recidíva műtétjénél, + van expresszió, - nincs expresszió

Az EGFR és PTEN expresszió a vizsgált mintákban

A PTEN és EGFR gének expresszióinak mértékét normalizált értékeként mutatjuk be, ahogy az anyagok és módszerek fejezetben jeleztük. A 23 tumormintából 15 esetben (65,2%) szignifikáns mértékben megnövekedett az EGFR expressziója és 18 minta szignifikáns PTEN expresszió csökkenést mutatott (78,3 %). Tizenegy esetben (47,8 %) az EGFR up-reguláció PTEN down-regulációval társult. A gén expresszió analízis eredményeit a 6. táblázatban tüntettük fel.

Beteg száma	Relatív expresszió			
	EGFR	±SE	PTEN	±SE
1. csoport				
1A	1.282	0.059	0.682	0.023
2	36.314 ↑	0.464	0.424 ↓	0.084
3	0.837	0.057	0.139 ↓	0.004
4	0.112 ↓	0.005	0.076 ↓	0.001
5	3.279 ↑	0.086	0.108 ↓	0.006
6	0.356 ↓	0.028	0.371 ↓	0.011
7A	7.864 ↑	0.365	0.246 ↓	0.021
8A	143.479 ↑	7.816	0.442 ↓	0.014
9	11.743 ↑	0.772	0.150 ↓	0.021
10A	1.248	0.032	0.165 ↓	0.007
11	1.238	0.077	0.410 ↓	0.230
12	0.764	0.048	0.062 ↓	0.002
13	2.468 ↑	0.281	0.019 ↓	0.001
14	4.039 ↑	0.355	0.568	0.063
15	5.312 ↑	0.096	0.211 ↓	0.020
2. csoport				
1B	2.084 ↑	0.048	0.395 ↓	0.005
7B	3.177 ↑	0.122	0.417 ↓	0.041
8B	16.380 ↑	0.057	0.171 ↓	0.021
10B	66.439 ↑	0.691	1.772	0.043
16	2.620 ↑	0.054	1.466	0.048
17	4.876 ↑	0.068	0.914	0.019
18	5.493 ↑	0.213	0.189 ↓	0.011
19	0.342 ↓	0.012	0.248 ↓	0.039

6. táblázat: Az EGFR és PTEN gének relatív expresszió szintjei

A GAPDH normalizált értékeket korreláltattuk a peritumorális szövetek expressziójának átlagaihoz (fold change level). A génexpresszió több mint kétszeres változását tekintettük felül és alul regulátnak, amely változásokat fel és le nyilakkal jelöltünk. A) és B) megjelölések ugyanazt a beteget jelentik az első illetve a recidíva műtétjénél, + van expresszió, - nincs expresszió. Az 1. csoportba az első operációnál vett mintákat, a 2. csoportba a kezelést követően vet mintákat soroltuk.

Az ugyanazon betegekből származó első felismeréskori minták és a kiújult tumorokból származó minták expressziós profiljának vizsgálata

Négy esetben volt meg a lehetőségünk arra, hogy tumormintákat vegyünk az első műtét során eltávolított tumorból és a recidív tumorból is. Három esetben a GHRH expresszáldott az elsőként operált tumorban, de a nem lehetett detektálni a recidívában. Az SV1 egyetlen tumorban volt jelen, az első operációból származó mintában. Az EGFR és PTEN csak egy esetben mutatott normál expressziót, de ugyanebben az esetben, a recidívában az EGFR over-expresszáldott és a PTEN pedig alul regulált volt. Egyebekben az EGFR mRNA magasan reprezentált volt minden mintában és a PTEN pedig alul-regulált volt mindenütt kivéve egy recidív tumorszövetet. Ezeket az eredményeket a 7. táblázatban mutatjuk be.

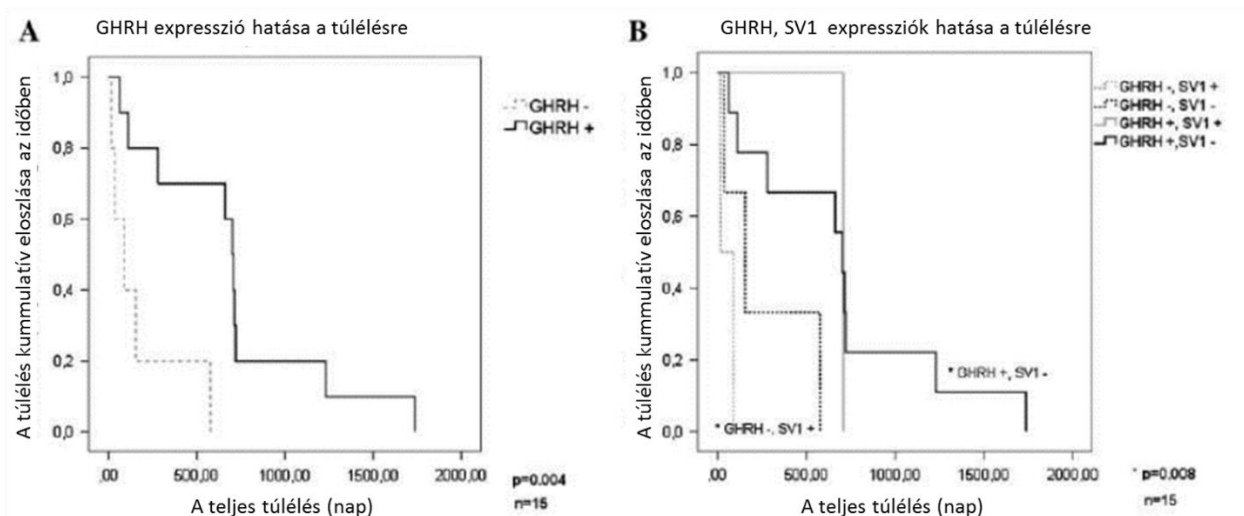
Beteg száma	pGHRHR	GHRH	SV1	EGFR	PTEN
1A	–	+	+	↑	↓
1B	–	–	–	↑	↓
7A	–	+	–	Nincs változás	Nincs változás
7B	–	+	–	↑	↓
8A	–	+	–	↑	↓
8B	–	–	–	↑	↓
10A	–	+	–	↑	↓
10B	–	–	–	↑	Nincs változás

7. táblázat: Az első műtétből származó minták és a recidív tumorok expressziós profilja.

A) minták az első műtétből, B) minták a recidív tumorokból, + over-expresszió, - down-reguláció real-time RT PCR-val meghatározva

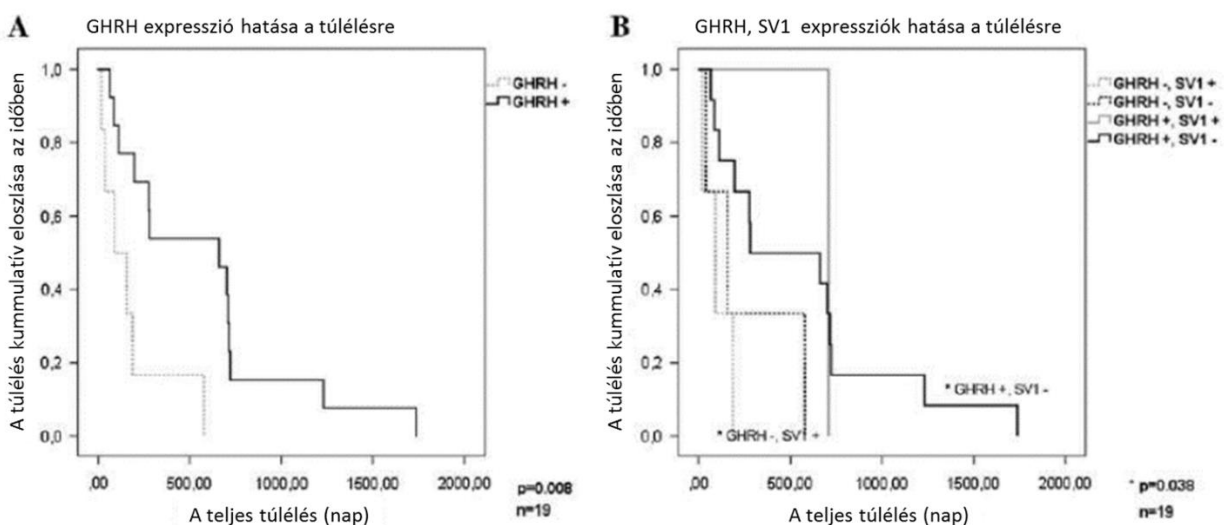
A génexpressziós eredmények és a kliniko-patológiai adatok analízise

Az elvégzett statisztikai analízisek során azt találtuk, hogy az SV1 pozitív mintákban a PTEN expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint az SV1 negatív esetekben. További analízishez a betegeket két csoportba osztottuk. Az 1. csoportba azt a 12 beteget soroltuk, akiket a klinikai diagnózist követően operáltunk meg és még nem kaptak semmilyen kezelést. A 2. csoportba sorolt nyolc betegnél a kemo-irradiációt követően recidivált majd megoperált tumorból vettünk mintát. Négy beteg mindkét csoportban szerepelt, mint operált és később reoperált eset. Az első csoportban azok a betegek, akiknek tumora GHRH negatív volt szignifikánsan kevesebb volt a teljes túlélési ideje (OS). Ez a csökkenés szignifikáns maradt akkor is amennyiben a GHRH negativitáshoz SV1 pozitivitás társult (15. ábra), amely magasabb PTEN átlagértékekkel járt együtt. A második csoportban ezek a korrelációk nem álltak fenn. A teljes túlélés mindkét csoportban való analízise ebben a kontextusban kérdéses, mivel az átfedő 4 esetben kimutattuk, hogy a tumorprogresszió vezethetett a megváltozott genetikai profilhoz. Habár a két csoport együttes OS analízise (a négy átfedő beteg kihagyása mellett) szintén igazolta, hogy a GHRH negatív esetek rövidebb teljes túlélést mutatnak és a túléléscsökkenés a GHRH negatív SV1 pozitív eseteknél is fennáll (16. ábra). Megfordítva ez azt jelenti, hogy a GHRH pozitív és SV1 negatív esetek szignifikánsan jobb prognózist mutatnak. A mintáinkban a klasszikus EGFR és PTEN markerek expresszió szintjei nem korreláltak szignifikánsan a túléléssel. Habár a posztoperatív kezelés hiánya látszólag rövidebb túlélési időt okozott, ezekben az esetekben a gyors tumorprogresszió vezetett a KPS (Karnofsky Performance Score) csökkenéséhez és vezetett a posztoperatív elkezdett terápia felfüggesztéséhez.



15. ábra: A ligand GHRH és az SV1 receptor expressziójának korrelációja a teljes túléléssel újonnan diagnosztizált glioblasztómás esetekben.

(A) A GHRH expresszió és a teljes túlélés közötti korreláció az újonnan diagnosztizált glioblasztómás esetekben. A szürke szaggatott görbe a GHRH negatív betegek túlélési analízisét mutatja; a fekete folyamatos görbe a GHRH pozitív eseteket mutatja ($p=0.004$). (B) GHRH és SV1 expressziós mintázatok és a teljes túlélés közötti korreláció újonnan diagnosztizált glioblasztómás eseteinknél. A szürke szaggatott görbe a GHRH negatív, SV1 pozitív esetek túlélési statisztikáját mutatja, a fekete pontozott görbe a GHRH negatív SV1 pozitív eseteket, a szürke folyamatos a görbe a GHRH pozitív, SV1 pozitív eseteket, a folyamatos fekete görbe pedig a GHRH pozitív, SV1 negatív eseteket ($p=0.008$). Kaplan-Meier és log rank (Mantel-Cox) regressziós tesztet használtunk az expresszió, túlélés analíziséhez.



16. ábra: A ligand GHRH és az SV1 receptor expressziójának korrelációja a teljes túléléssel újonnan diagnosztizált glioblasztómás és recidív glioblasztómás esetekben együtt

A) A GHRH expresszió és a teljes túlélés közötti korreláció újonnan diagnosztizált glioblasztómás esetekben és a recidív glioblasztómás esetekben együtt (1. csoport és 2. csoport együtt). A szürke szaggatott görbe a GHRH negatív betegek túlélési analizisét mutatja; a fekete folyamatos görbe a GRHR pozitív esteket mutatja ($p=0.004$). B) GHRH és SVI expressziós mintázatok és a teljes túlélés közötti korreláció újonnan diagnosztizált és recidív GB eseteinknél (1. csoport és 2. csoport együtt). A szürke szaggatott görbe a GHRH negatív, SVI pozitív esetek túlélési statisztikáját mutatja, a fekete pontozott görbe a GHRH negatív SVI pozitív eseteket, a szürke folyamatos a görbe a GHRH pozitív, SVI pozitív eseteket, a folyamatos fekete görbe pedig a GHRH pozitív, SVI negatív eseteket ($p=0,008$). Kaplan-Meier és log rank (Mantel-Cox) regressziós tesztet használtunk az expresszió-túlélés analiziséhez

Az epidurális limfómás betegek retrospektív vizsgálatával szerzett eredményeink

A szerző a spinális epidurális folyamatok elemzését végezte el illetve a kézirat publikációra előkészítését és a publikálást levelezőszerzőként végezte.

Kor (év)	Nem	Klinikai tünet	Radiológiai diagnózis	Lokalizáció	Operáció	Klinikai változás	Szövetten	Típus	Követés	A lymphoma diagnózis és az epidurális megjelenés között eltelt idő	Túlélés az epidurális érintettség után	RT	
1	16	♂	Lokális fájdalom	MR	L1-5	–	Javult	HL	sec.	Életben, KR	50	91	Igen
2	26	♀	Paraparézis	MR	L1-5	–	Változatlan	NHL	sec.	Elhunyt	12	3	Igen
3	34	♂	Paraplegia	MR	C5-7	–	Javult	HL	sec.	Elhunyt	113	12	Igen
4	31	♂	Tünetmentes	CT	Th12-L1	–	Változatlan	HL	sec.	Elhunyt	23	27	Igen
5	24	♂	Paraparézis	MG	Th10-11	+	Változatlan	HL	sec.	Elhunyt	41	27	Igen
6	37	♂	Paraplegia	MR	Th8	+	Változatlan	NHL	pr.	Életben, KR	0	3	Igen
7	64	♀	Lokális fájdalom	MR	L5-S2	+	Javult	NHL	pr.	Életben, KR	0	48	Nem
8	63	♂	Paraparézis	MR	Th2-3	+	Javult	NHL	pr.	Életben, KR	0	3	Igen
9	62	♂	Paraparézis	MR	Th8-9	+	Javult	NHL	pr.	Életben, KR	0	3	Igen
10	37	♂	Lokális fájdalom	MG	L2-4	+	Javult	HL	sec.	Elhunyt	29	120	Igen
11	66	♂	Paraplegia	MG	Th3-4	+	Javult	HL	sec.	Elhunyt	37	116	Igen
12	32	♂	Paraparézis	CT	Th11-12	+	Javult	HL	pr.	Elhunyt	0	63	Igen
13	16	♂	Ataxia	CT	Th11-12	+	Javult	NHL	pr.	Életben, KR	0	185	Igen

8. táblázat: Az epidurális régióban megjelenő malignus limfómás eseteink kliniko-patológiai jellemzői

Rövidítések: CR, komplett remisszió; HL, Hodgkin limfóma; MG, mielográfia; ML, malignus limfóma; NHL, non-Hodgkin limfóma; pr., primer, extranodális forma; RT, radioterápia; sec., disszeminált típus, szekunder megjelenés; túlélések az utolsó kontroll szerint

A tömegspektrometrián alapuló real time, in situ szövettani meghatározás lehetséges szerepe az epidurális limfómák kezelésében

Összesen 13 epidurális (7 Hodgkin és 6 Non-Hodgkin limfóma) érintettséget találtunk a vizsgálat időszakban. Ez az előfordulási gyakoriság az irodalmi adatokkal megegyezik. A 13 esetből 6 (46,15%) betegnél az első megjelenés az epidurális érintettség volt és minden betegnél a műtéti szövetszövetminta vezetett a primer diagnózishoz. Mind a hat beteg posztoperatív kezelésben részesült (8. táblázat).

Habár a műtéteket analizálva, minden esetben csak dekompressziót végeztünk és a posztoperatív követés során nem jelentkezett spinális instabilitásra utaló jel, az eredményekből jól

következtethető, hogy a szövettani diagnózis *in situ* megismerése a műtéti technikában a spinális dekompresszió minimál invazív megoldása felé mozdítaná a sebészt, mivel a posztoperatív radio- és kemoterápia kimagaslóan hatásos és egyébként is szükséges. A kórkép onkológia kezelés melletti átlagos, teljes túlélési ideje pedig azt mutatja, hogy ha maga a folyamat vagy a dekompresszió instabilitáshoz vezet, akkor az instrumentális stabilizáció mindig mérlegelendő a beteg minél jobb mobilitásának megtartása miatt.

Megbeszélés

A disszertáció egyik célja az volt, hogy létrehozzunk, egy olyan eszközt, amely alkalmas *in situ*, *in vivo* alkalmazásra. A bipoláris elektrotermikus koaguláció során keletkező aeroszol előnye az volt, hogy közvetlenül alkalmas tömegspektrometriai mérésre és a REIMS módszerrel szerzett tapasztalatainkat könnyedén tudtuk használni. Az bebizonyosodott, hogy gyors intraoperatív szövettani jellegű analízisre alkalmas azonban, pont az elektrotermikus hatás korlátozza a felhasználását.

Emiatt az idegsebészetben használt delikát szívek felé fordult az érdeklődésünk. A környező szövetek roncsolása nélkül az ultrahangos szívóval lehet az idegsebészetben jelenleg a legfinomabban szöveteket eltávolítani. Azonban ebben az esetben, a minta nem alkalmas egyből tömegspektrometriai analízisre, gázhalmazállapotba kell hozni és ionizálni kell. Erre alkalmasnak ígérkezett a Venturi pumpa közbeiktatásával létrehozott szónikus spray ionizáció. Az új eszközkombináció számos paraméterében igényelt tesztvizsgálatokat. Az optimális beállítások biztosítása után kezdtük el a rendszer analitikai képességeit vizsgálni. És végül a szövettani verifikációra való alkalmasságot.

Ex vivo, de műtéti körülmények között kimutattuk, hogy a rendszer alkalmas a szövetek összetevőinek igen szelektív vizsgálatára is és sikerült peptideket is kimutatni.

Azonban a szövettani diagnózishoz, hasonlóan a bipoláris csipessel végzett kísérletek esetén itt is egy szövettanspecifikus adatbázis kellett létrehozni. A bebizonyítottuk, hogy a létrehozott PCA/LDA modellünk alkalmas a gyors analízisre. Továbbá bemutattuk, hogy a rendszer (2-3 másodperc) jelentősen gyorsabb szövettani diagnózishoz juttathatja az operatórt, mint a friss fagyasztott metszeten alapuló intraoperatív szövettan (30-40 perc) vagy az off-line tömegspektrometriai analízis (~10 perc) (8, 9, 33). Az eredményeink különösen gliómák, glioblasztómák és metasztatikus tumorok esetén voltak kiemelkedőek. Azonban megfelelő adatbázis mellett más tumortípusok is kimutathatók.

Különösen ritka, sürgős ellátást igénylő entitások esetén lehet hasznos a módszer, ahol az intraoperatív szövettani diagnózis a sebészi taktikát is megváltoztatja. Ennek illusztrálásra mutattuk be spinális epidurális eseteink retrospektív analízise során szerzett eredményeinket. Jól látható, hogy a spinális epidurális limfómák kezelésében a kemoterápia és a lokális sugárkezelés hatékony. Továbbá 2 esetben akkor is javultak a spinális kompresszió tünetei, amikor műtétet nem tudtunk végezni. Fontos, hogy az esetek megközelítőleg felében az első diagnózist a műtét utáni szövettan jelentette. Kimutattuk, hogy ezekben az esetekben az intraoperatív diagnózis kifejezetten támogatja a műtéti technika kiválasztását.

Az on line analízis további előnye, hogy az elszívott szövetrészek akár gyorsan egymás után, így virtuálisan folyamatosan azonosíthatók vele, amely szignifikánsan javíthatja a beavatkozás precizitását. Emellett kimutattuk, hogy az ép és a tumoros szövetek között is képes különbséget tenni a rendszer. Ennek alkalmazása pedig az infiltratív gliómák műtéteinél lehet kiemelten hasznos. Habár a módszert a bipoláris csipessel ellentétben nem teszteltük egyelőre *in vivo*, *in situ* körülmények között, a módszer feltehetőleg hasonlóan jól teljesítene. Szélesebb nem

csak idegsebészeti kontextusban a CUSA/SSI technika használható lenne egy általános felszíni analitikai technikaként is, hasonlóan a Van Berkel és mtsai által leírt experimentális SSP-ES-MS (surface sampling probe – electrospray - mass spectrometry) technikához (84).

Fontos kiemelni, hogy mind a bipoláris csipesz, mind a CUSA kézidarabja használható neuronavigációval együtt. Az eszköz helyzete, így a térben ellenőrizhető, a korábban a neuronavigációba feltöltött képanyag alapján és a mintavétel pontos radiológiai helye is megadható. Ezzel a tömegspektrometriás adatok radiológiai jellemzőkkel történő összevetése is lehetséges.

Bemutattuk, hogy a módszerünk segítheti a gliómák, glioblasztómák műtéti eltávolítását, azonban glioblasztómáknál még makroszkóposan teljes rezekció mellett is a betegség gyakorlatilag mindig kiújul. A glioblasztómák esetében jelenlegi postoperatív kezelési rezsimek eredményei továbbra sem mutatnak áttörést.

A vizsgálatunkkal először bizonyítottuk, hogy a GHRH és splicing variáns, SV1 receptora expresszálódik humán glioblasztómákban. Ezen kívül kimutattuk, hogy a GHRH és SV1 expressziós mintázata korrelál a teljes túléléssel.

A GHRH expressziójának erős pozitivitása (61,9%) azt sugallja, hogy a GHRH útvonal szerepet játszhat a glioblasztómák patogenezisében. Ezt támasztják alá korábbi vizsgálatok, amelyekben a GHRH kezelése növelte a szívizom és a tumoros sejtek túlélését (85).

Összefoglalva vizsgálatunkban a GHRH negatív, SV1 pozitív esetek rosszabb teljes túlélést mutattak. Megfordítva a GHRH pozitív, SV1 negatív esetek hosszabb túlélést mutattak. Ezt részben alátámasztják Farkas és mtsai (86), akik korábban kimutatták, hogy a GHRH receptor expressziója rektum tumorokban korrelált a kemoterápiára adott gyenge válasszal. Ez és a mi eredményünk is felveti, hogy nem csak a parakrin és autokrin GHRH játszhat szerepet a tumor progresszióban az SV1 receptor aktiválásán keresztül és nem csak lokális intratumorális reguláló faktorok csökkenthetik a tumoros GHRH expressziót. A tumoros GHRH expresszió, vagyis a GHRH autokrin felszabadulása negatív visszacsatolás alatt állhat. Ez a hatás a GHRH expresszió down-regulációján alapulhat szisztémás GHRH vagy más ligand által mediálva SV1 vagy akár más receptorokon keresztül. Ezen kívül a GHRH más receptoron keresztül is hathat, mint az SV1 és ez a hatás lehet protektív. Az egyik feltételezett receptor, amely mediálhatja a GHRH-ra adott választ a VIP (vasoactive intestinal peptide) receptor lehet, és ez a receptor hatás lehet hasonlóan protektív, mint a tüdőtumorkok növekedése esetében a ligand VIP (87). Vesesejtes karcinómák növekedését szintén gátolja a VIP és PACAP (pituitary adanylate cyclase-activating peptide) (88). Összegezve a GHRH útvonal további vizsgálata glioblasztómákban terápiás szempontból is jelentős eredményeket hozhat.

Összefoglalás

Az elvégzett kísérleteink alapján sikeresen kombináltuk a módosított sebészi bipoláris csipeszt és az ultrahangos szívót a mobil tömegspektrométerrel. Ezzel egy olyan idegsebészeti eszközt hoztunk létre, amely nemcsak valósidejű, hanem *in situ* szövetanalízisre is képes. Továbbmenve a módszer képes a szövetek molekuláris összetételét analizálni, amely a tömegspektrometria alapvető tulajdonsága. A szövetek ilyen jellegű molekuláris leírása további kapukat nyithat meg a klasszikus genetikai és immunhisztokémiai markerek és a tömegspektrometria között.

A bipoláris csipesszel és az ultrahangos szívóval végzett tömegspektrometriai méréseink kimutatták, hogy az ép és tumoros területek elkülönítése lehetséges, ezzel az eszköz segítheti a

sebész munkáját. Továbbá mindkét eszköz sikeresen párosítható neuronavigációs rendszerhez. Az ultrahangos módszer legfőképp a gliomák, glioblasztómák műtéteinél lehet hasznos és javíthatja a biztonságos eltávolítás mértékét.

Mindkét eszköznél, megfelelő adatbázis mellett, gyors intraoperatív szövettani diagnózishoz juthatunk és akár grádus szintű meghatározás is lehetséges. Ez különösen ritka vagy intraoperative nehezen felismerhető, de leginkább sebészileg más taktikát igénylő elváltozások esetén lehet hasznos, mint például a központi idegrendszeri limfómák.

A gliomák sebészi reszekciójának javítása mellett, a túlélés érdemben csak az utókezelés javításával lehetséges. Ezért a klasszikus EGFR, PTEN markerek mellett a GHRH és receptorainak expressziós profilját vizsgáltuk. Ezzel további lépést tettünk a glioblasztómák szelektívebb és specifikusabb kezelésében használható molekuláris target és prognosztikai faktor azonosítása felé.

Summary

According to our results we successfully combined the modified surgical bipolar forceps and ultrasonic aspirator with a mobile mass spectrometer. In this manner we created a tool not only for real time but also for in situ tissue analysis. Moreover this method has the fundamental advantage of mass spectrometry by analysing the molecular constitution of tissues. This kind of molecular description may open further gates to compare the mass spectrum with the presence of classic genetic and immunohistochemic markers.

In our experiments with the bipolar forceps and the ultrasound aspirator we have revealed that the discrimination between tumorous and healthy neural tissues is possible. Both instruments were successfully coupled to neuronavigation. These possibilities, especially the ultrasound based method significantly could help the neurosurgeon who operates gliomas or glioblastoma by improving the extent of safe resection.

Our experiments proved if an appropriate database is available fast, intraoperative histology can be obtained by both of our instruments and even grade level histologic discrimination can be performed. The real time tissue analysis can be useful in the analysis of rare, macroscopically unidentifiable tumors, especially when the operated tumour needs different treatment strategy in the aware of the histology. Therefore in this thesis we showed that retrospective analysis of a rare entity could reveal the importance of real-time intra-operative histology.

Moreover in this thesis I presented our expression results of GHRH, pGHRHR, its splicing variants, PTEN and EGFR genes in human glioblastoma samples. Our study provides the first evidence that GHRH and SV1 are present in a substantial part of human GB tissues. We pointed out that expression pattern of GHRH and its SV1 receptors could predict prognosis. Namely GHRH positive, SV1 negative cases showed better overall survival. These results showed that we have moved towards finding the GHRH pathway suitable as a molecular target and a useful prognostic factor in human glioblastomas.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm mindazoknak, aki részt vettek a fenti munkákban, segítettek és támogattak.

Támogatások

Ezt a munkát a TAMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 és TAMOP 4.2.2.A-11/1/ KONV-2012-0031 projektek támogatták. A projekteket részben az Európai Unió és az Európai Szociális Alap finanszírozta.

Hivatkozások listája

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvett A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6. Review. Erratum in: *Acta Neuropathol.* 2007 Nov;114(5):547. PubMed PMID: 17618441; PubMed Central PMCID: PMC1929165.
2. Archip N, Clatz O, Whalen S, Kacher D, Fedorov A, Kot A, Chrisochoides N, Jolesz F, Golby A, Black PM, Warfield SK. Non-rigid alignment of pre-operative MRI, fMRI, and DT-MRI with intra-operative MRI for enhanced visualization and navigation in image-guided neurosurgery. *Neuroimage.* 2007 Apr 1;35(2):609-24. Epub 2006 Dec 23. PubMed PMID: 17289403; PubMed Central PMCID: PMC3358788.
3. Upadhyay UM, Golby AJ. Role of pre- and intraoperative imaging and neuronavigation in neurosurgery. *Expert Rev Med Devices.* 2008 Jan;5(1):65-73. Review. PubMed PMID: 18095898.
4. Picht T, Vajkoczy P, Kombos T. Prä- und intraoperative Funktionslokalisierung bei komplexen Hirntumoren *Der Onkologe* 2011 Apr;17: 324-331
5. Lignelli A, Khandji AG. Review of imaging techniques in the diagnosis and management of brain metastases. *Neurosurg Clin N Am.* 2011 Jan;22(1):15-25, v. doi: 10.1016/j.nec.2010.09.002. Review. PubMed PMID: 21109145.
6. Unsgaard G, Rygh OM, Selbekk T, Müller TB, Kolstad F, Lindseth F, Hernes TA. Intraoperative 3D ultrasound in neurosurgery. *Acta Neurochir (Wien).* 2006 Mar;148(3):235-53; discussion 253. Epub 2005 Dec 19. Review. PubMed PMID: 16362178.
7. Ukimura O, Okihara K, Kamoi K, Naya Y, Ochiai A, Miki T. Intraoperative ultrasonography in an era of minimally invasive urology. *Int J Urol.* 2008 Aug;15(8):673-80. doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02090.x. Epub 2008 Jun 16. Review. PubMed PMID: 18564203.
8. Cserni G. Axillary staging of breast cancer and the sentinel node. *J Clin Pathol.* 2000 Oct;53(10):733-41. Review. PubMed PMID: 11064665; PubMed Central PMCID: PMC1731094.
9. Miedema JR, Hunt HV. Practical issues for frozen section diagnosis in gastrointestinal and liver diseases. *J Gastrointest Liver Dis.* 2010 Jun;19(2):181-5. Review. PubMed PMID: 20593052.

10. Layfield DM, Agrawal A, Roche H, Cutress RI. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg.* 2011 Jan;98(1):4-17. doi: 10.1002/bjs.7229. Epub 2010 Sep 1. Review. PubMed PMID: 20812233.
11. Bogalhas F, Charon Y, Duval MA, Lefebvre F, Palfi S, Pinot L, Siebert R, Ménard L. Development of a positron probe for localization and excision of brain tumours during surgery. *Phys Med Biol.* 2009 Jul 21;54(14):4439-53. doi: 10.1088/0031-9155/54/14/006. Epub 2009 Jun 26. PubMed PMID: 19556688.
12. Heller S, Zanzonico P. Nuclear probes and intraoperative gamma cameras. *Semin Nucl Med.* 2011 May;41(3):166-81. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2010.12.004. Review. PubMed PMID: 21440694.
13. Hefti M, Mehdorn HM, Albert I, Dorner L (2010) Fluorescence-Guided Surgery for Malignant Glioma: A Review on Aminolevulinic Acid Induced Protoporphyrin IX Photodynamic Diagnostic in Brain Tumors. *Current Medical Imaging Reviews* 6: 254–258. doi: 10.2174/157340510793205503
14. Mieog JS, Vahrmeijer AL, Hutteman M, van der Vorst JR, Drijfhout van Hooff M, Dijkstra J, Kuppen PJ, Keijzer R, Kaijzel EL, Que I, van de Velde CJ, Löwik CW. Novel intraoperative near-infrared fluorescence camera system for optical image-guided cancer surgery. *Mol Imaging.* 2010 Aug;9(4):223-31. PubMed PMID: 20643025.
15. Eberlin LS, Dill AL, Golby AJ, Ligon KL, Wiseman JM, Cooks RG, Agar NY. Discrimination of human astrocytoma subtypes by lipid analysis using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010 Aug 9;49(34):5953-6. doi: 10.1002/anie.201001452. PubMed PMID: 20602384; PubMed Central PMCID: PMC3021787.
16. Agar NY, Golby AJ, Ligon KL, Norton I, Mohan V, Wiseman JM, Tannenbaum A, Jolesz FA. Development of stereotactic mass spectrometry for brain tumor surgery. *Neurosurgery.* 2011 Feb;68(2):280-89; discussion 290. doi: 10.1227/NEU.0b013e3181ff9cbb. PubMed PMID: 21135749; PubMed Central PMCID: PMC3678259.
17. Jolesz, F.; Golby, A.; Agar, N. Y. R. Integrated Surgical Sampling Probe. U.S. Patent Application 20110144476, June 16, 2011.
18. Schäfer KC, Dénes J, Albrecht K, Szaniszló T, Balog J, Skoumal R, Katona M, Tóth M, Balogh L, Takáts Z. In vivo, in situ tissue analysis using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(44):8240-2. doi: 10.1002/anie.200902546. PubMed PMID: 19746375.
19. Balog J, Szaniszló T, Schaefer KC, Denes J, Lopata A, Godorhazy L, Szalay D, Balogh L, Sasi-Szabo L, Toth M, Takats Z. Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2010 Sep 1;82(17):7343-50. doi: 10.1021/ac101283x. PubMed PMID: 20681559.

20. Sächfer KC, Szaniszló T, Günther S, Balog J, Dénes J, Keseru M, Dezso B, Tóth M, Spengler B, Takáts Z. In situ, real-time identification of biological tissues by ultraviolet and infrared laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011 Mar 1;83(5):1632-40. doi: 10.1021/ac102613m. Epub 2011 Feb 8. PubMed PMID: 21302917.
21. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 1;27(34):5743-50. doi: 10.1200/JCO.2009.23.0805. Epub 2009 Oct 5. PubMed PMID: 19805672.
22. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirmanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. PubMed PMID: 15758009.
23. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8. doi: 10.1038/nature07385. Epub 2008 Sep 4. Erratum in: *Nature.* 2013 Feb 28;494(7438):506. PubMed PMID: 18772890; PubMed Central PMCID: PMC2671642.
24. Kreisl TN, Lassman AB, Mischel PS, Rosen N, Scher HI, Teruya-Feldstein J, Shaffer D, Lis E, Abrey LE. A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *J Neurooncol.* 2009 Mar;92(1):99-105. doi: 10.1007/s11060-008-9741-z. Epub 2008 Nov 19. PubMed PMID: 19018475.
25. Ang C, Guiot MC, Ramanakumar AV, Roberge D, Kavan P. Clinical significance of molecular biomarkers in glioblastoma. *Can J Neurol Sci.* 2010 Sep;37(5):625-30. PubMed PMID: 21059509.
26. Brock M, Ingwersen I, Roggendorf W. Ultrasonic aspiration in neurosurgery. *Neurosurg Rev.* 1984;7(2-3):173-7. PubMed PMID: 6493516.
27. Inoue T, Ikezaki K, Sato Y. Ultrasonic surgical system (SONOPET) for microsurgical removal of brain tumors. *Neurol Res.* 2000 Jul;22(5):490-4. PubMed PMID: 10935222.
28. Oertel J, Krauss JK, Gaab MR. Ultrasonic aspiration in neuroendoscopy: first results with a new tool. *J Neurosurg.* 2008 Nov;109(5):908-11. doi: 10.3171/JNS/2008/109/11/0908. PubMed PMID: 18976083.
29. Perry JR, Deodhare SS, Bilbao JM, Murray D, Muller P. The significance of spinal cord compression as the initial manifestation of lymphoma. *Neurosurgery.* 1993 Feb;32(2):157-62. PubMed PMID: 8437651.

30. Toprak A, Kodalli N, Alpdogan TB, Giral A, Celikel CA, Gurmen N, Bayik M. Stage IV Hodgkin's disease presenting with spinal epidural involvement and cauda equina compression as the initial manifestation: case report. *Spinal Cord*. 1997 Oct;35(10):704-7. PubMed PMID: 9347602.
31. Nokes SR, Henry GM, Bucolo A, Harshfield DL. Radiological case of the month. Hodgkin's lymphoma. *J Ark Med Soc*. 1990 Dec;87(7):293-4. PubMed PMID: 2149379.
32. Higgins SA, Peschel RE. Hodgkin's disease with spinal cord compression. A case report and a review of the literature. *Cancer*. 1995 Jan 1;75(1):94-8. Review. PubMed PMID: 7804983.
33. Moridaira K, Handa H, Murakami H, Uchiyama T, Takeuchi T, Sato S, Tamura J, Naruse T, Tsuchiya J. Primary Hodgkin's disease of the bone presenting with an extradural tumor. *Acta Haematol*. 1994;92(3):148-9. Review. PubMed PMID: 7871955.
34. Bender BL, Mayernik DG. Hodgkin's disease presenting with isolated craniospinal involvement. *Cancer*. 1986 Oct 15;58(8):1745-8. PubMed PMID: 3756795.
35. Burch PA, Grossman SA. Treatment of epidural cord compressions from Hodgkin's disease with chemotherapy. A report of two cases and a review of the literature. *Am J Med*. 1988 Mar;84(3 Pt 1):555-8. Review. PubMed PMID: 3279772.
36. Carde P, Burgers JM, Henry-Amar M, Hayat M, Sizoo W, Van der Schueren E, Monconduit M, Noordijk EM, Lustman-Marechal J, Tanguy A, et al. Clinical stages I and II Hodgkin's disease: a specifically tailored therapy according to prognostic factors. *J Clin Oncol*. 1988 Feb;6(2):239-52. PubMed PMID: 2578012.
37. Plotkin SR. Update on primary central nervous system lymphoma. *Curr Opin Neurol*. 2005 Dec;18(6):645-53. PubMed PMID: 16280675.
38. Ferreri AJ, Reni M. Prognostic factors in primary central nervous system lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005 Aug;19(4):629-49. vi. Review. PubMed PMID: 16083827.
39. Recht LD. Neurologic complications of systemic lymphoma. *Neurol Clin*. 1991 Nov;9(4):1001-15. Review. PubMed PMID: 1758425.
40. Zimmerman RA. Central nervous system lymphoma. *Radiol Clin North Am*. 1990 Jul;28(4):697-721. Review. PubMed PMID: 2190266.
41. Grubbs SS, Tilton DC, Trayner E. Oncologic emergencies. *Del Med J*. 1990 Nov;62(11):1339-47. PubMed PMID: 2276403.
42. Miyakoshi N, Shimada Y, Suzuki T, Hongo M, Itoi E. Magnetic resonance imaging of spinal involvement by hematopoietic malignancies requiring surgical decompression. *J Orthop Sci*. 2003;8(2):207-12. PubMed PMID: 12665958.

43. Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, Payne R, Saris S, Kryscio RJ, Mohiuddin M, Young B. Direct decompressive surgical resection in the treatment of spinal cord compression caused by metastatic cancer: a randomised trial. *Lancet*. 2005 Aug 20-26;366(9486):643-8. PubMed PMID: 16112300.
44. Gavrilovic IT, Abrey LE. Diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma. *Curr Oncol Rep*. 2005 Jan;7(1):47-54. Review. PubMed PMID: 15610686.
45. Epelbaum R, Haim N, Ben-Shahar M, Ben-Arie Y, Feinsod M, Cohen Y. Non-Hodgkin's lymphoma presenting with spinal epidural involvement. *Cancer*. 1986 Nov 1;58(9):2120-4. PubMed PMID: 3756827.
46. Mascalchi M, Torselli P, Falaschi F, Dal Pozzo G. MRI of spinal epidural lymphoma. *Neuroradiology*. 1995 May;37(4):303-7. PubMed PMID: 7666966.
47. Zhu H, Acquaviva J, Ramachandran P, Boskovitz A, Woolfenden S, Pfannl R, Bronson RT, Chen JW, Weissleder R, Housman DE, Charest A. Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2712-6. doi: 10.1073/pnas.0813314106. Epub 2009 Feb 5. PubMed PMID: 19196966; PubMed Central PMCID: PMC2650331.
48. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):6892-9. PubMed PMID: 15466178.
49. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2007 Mar;113(3):295-302. Epub 2007 Jan 18. PubMed PMID: 17235514.
50. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*. 1997 Apr;15(4):356-62. PubMed PMID: 9090379.
51. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar 28;275(5308):1943-7. PubMed PMID: 9072974.
52. Knobbe CB, Merlo A, Reifemberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol*. 2002 Jul;4(3):196-211. Review. PubMed PMID: 12084351; PubMed Central PMCID: PMC1920635.
53. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liao LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL,

Mischel PS. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*. 2005 Nov 10;353(19):2012-24. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006 Feb 23;354(8):884. PubMed PMID: 16282176.

54. Schally AV, Halmos G Targeting to Peptide Receptors. In: Kratz F, Senter P, Steinhagen H (eds) *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*. 2012 Wiley-VCH, Weinheim, pp 1219–1262

55. Schally AV, Varga JL, Engel JB. Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Jan;4(1):33-43. Review. PubMed PMID: 18084344.

56. Schally AV, Varga JL. Antagonistic Analogs of Growth Hormone-releasing Hormone: New Potential Antitumor Agents. *Trends Endocrinol Metab*. 1999 Dec;10(10):383-391. PubMed PMID: 10542394.

57. Schally AV. New approaches to the therapy of various tumors based on peptide analogues. *Horm Metab Res*. 2008 May;40(5):315-22. doi: 10.1055/s-2008 1073142. Review. PubMed PMID: 18491250.

58. Schally AV, Varga JL. Antagonists of growth hormone-releasing hormone in oncology. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2006 Mar;9(3):163-70. Review. PubMed PMID: 16533148.

59. Pozsgai E, Schally AV, Zarandi M, Varga JL, Vidaurre I, Bellyei S. The effect of GHRH antagonists on human glioblastomas and their mechanism of action. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15;127(10):2313-22. doi: 10.1002/ijc.25259. PubMed PMID: 20162575.

60. Szepeshazi K, Schally AV, Groot K, Armatis P, Hebert F, Halmos G. Antagonist of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) inhibit in vivo proliferation of experimental pancreatic cancers and decrease IGF-II levels in tumours. *Eur J Cancer*. 2000 Jan;36(1):128-36. PubMed PMID: 10741306.

61. Halmos G, Schally AV, Varga JL, Plonowski A, Rekasi Z, Czompoly T. Human renal cell carcinoma expresses distinct binding sites for growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10555-60. PubMed PMID: 10962030; PubMed Central PMCID: PMC27063.

62. Halmos G, Schally AV, Czompoly T, Krupa M, Varga JL, Rekasi Z. Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor splice variants in human prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Oct;87(10):4707-14. PubMed PMID: 12364462.

63. Jaeger LB, Banks WA, Varga JL, Schally AV. Antagonists of growth hormone-releasing hormone cross the blood-brain barrier: a potential applicability to treatment of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 30;102(35):12495-500. Epub 2005 Aug 23. PubMed PMID: 16118272; PubMed Central PMCID: PMC1194927.

64. Kiaris H, Schally AV, Varga JL. Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit the growth of U-87MG human glioblastoma in nude mice. *Neoplasia*. 2000 May-Jun;2(3):242-50. PubMed PMID: 10935510; PubMed Central PMCID: PMC1507563.
65. Jaszberenyi M, Schally AV, Block NL, Zarandi M, Cai RZ, Vidaurre I, Szalontay L, Jayakumar AR, Rick FG. Suppression of the proliferation of human U-87 MG glioblastoma cells by new antagonists of growth hormone-releasing hormone in vivo and in vitro. *Target Oncol*. 2013 Dec;8(4):281-90. doi: 10.1007/s11523-013-0264-y. Epub 2013 Feb 1. PubMed PMID: 23371031.
66. Busto R, Schally AV, Braczkowski R, Plonowski A, Krupa M, Groot K, Armatis P, Varga JL. Expression of mRNA for growth hormone-releasing hormone and splice variants of GHRH receptors in human malignant bone tumors. *Regul Pept*. 2002 Oct 15;108(2-3):47-53. PubMed PMID: 12220726.
67. Havt A, Schally AV, Halmos G, Varga JL, Toller GL, Horvath JE, Szepeshazi K, Köster F, Kovitz K, Groot K, Zarandi M, Kanashiro CA. The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 29; 102(48):17424-9. Epub 2005 Nov 18. PubMed PMID: 16299104; PubMed Central PMCID: PMC1297670.
68. Busto R, Schally AV, Varga JL, Garcia-Fernandez MO, Groot K, Armatis P, Szepeshazi K. The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of its receptor in human gastroenteropancreatic carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 3;99(18):11866-71. Epub 2002 Aug 19. PubMed PMID: 12186980; PubMed Central PMCID: PMC129360.
69. Seitz S, Hohla F, Schally AV, Moder A, Engel JB, Horn F, Varga J, Zarandi M, Ortmann O, Köster F, Buchholz S. Inhibition of estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines with a growth hormone-releasing hormone antagonist. *Oncol Rep*. 2008 Nov;20(5):1289-94. PubMed PMID: 18949435.
70. Santos VG, Regiani T, Dias FF, Romão W, Jara JL, Klitzke CF, Coelho F, Eberlin MN. Venturi easy ambient sonic-spray ionization. *Anal Chem*. 2011 Feb 15;83(4):1375-80. doi: 10.1021/ac102765z. Epub 2011 Jan 14. PubMed PMID: 21235233.
71. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-86. PubMed PMID: 10547847.
72. Øvstebø R, Haug KB, Lande K, Kierulf P. PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation. *Clin Chem*. 2003 Mar;49(3):425-32. PubMed PMID: 12600954.
73. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.

74. Takats Z, Nanita SC, Cooks RG, Schlosser G, Vekey K. Amino acid clusters formed by sonic spray ionization. *Anal Chem.* 2003 Mar 15;75(6):1514-23. PubMed PMID: 12659217.
75. Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H. Sonic spray mass spectrometry. *Anal Chem.* 1995 Sep 1;67(17):2878-82. PubMed PMID: 8779414.
76. Benijts T, Günther W, Lambert W, De Leenheer A. Sonic spray ionization applied to liquid chromatography/mass spectrometry analysis of endocrine-disrupting chemicals in environmental water samples. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(16):1866-72. PubMed PMID: 12876687.
77. Craig RK, Edbrooke MR, Riley JH, McVey JH, Parker D. Differential expression of the human calcitonin/CGRP gene in medullary thyroid carcinoma and lung carcinoma cell lines. *Recent Results Cancer Res.* 1985;99:71-8. PubMed PMID: 3877961.
78. Edbrooke MR, Parker D, McVey JH, Riley JH, Sorenson GD, Pettengill OS, Craig RK. Expression of the human calcitonin/CGRP gene in lung and thyroid carcinoma. *EMBO J.* 1985 Mar;4(3):715-24. PubMed PMID: 2408883; PubMed Central PMCID: PMC554247.
79. Hall AK. Differential expression of thymosin genes in human tumors and in the developing human kidney. *Int J Cancer.* 1991 Jul 9;48(5):672-7. PubMed PMID: 2071228.
80. Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2003 Sep 11;22(39):8031-41. PubMed PMID: 12970751.
81. Cha HJ, Jeong MJ, Kleinman HK. Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Nov 19;95(22):1674-80. PubMed PMID: 14625258.
82. Veloso A, Astigarraga E, Barreda-Gómez G, Manuel I, Ferrer I, Giralt MT, Ochoa B, Fresnedo O, Rodríguez-Puertas R, Fernández JA. Anatomical distribution of lipids in human brain cortex by imaging mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2011 Feb;22(2):329-38. doi: 10.1007/s13361-010-0024-5. Epub 2011 Jan 28. PubMed PMID: 21472592.
83. Dill AL, Eberlin LS, Costa AB, Zheng C, Ifa DR, Cheng L, Masterson TA, Koch MO, Vitek O, Cooks RG. Multivariate statistical identification of human bladder carcinomas using ambient ionization imaging mass spectrometry. *Chemistry.* 2011 Mar 1;17(10):2897-902. doi: 10.1002/chem.201001692. Epub 2011 Jan 31. PubMed PMID: 21284043; PubMed Central PMCID: PMC3050580.
84. Van Berkel GJ, Kertesz V. Application of a liquid extraction based sealing surface sampling probe for mass spectrometric analysis of dried blood spots and mouse whole-body thin tissue sections. *Anal Chem.* 2009 Nov 1;81(21):9146-52. doi: 10.1021/ac901712b. PubMed PMID: 19817477.
85. Granata R, Trovato L, Gallo MP, Destefanis S, Settanni F, Scarlatti F, Brero A, Ramella R, Volante M, Isgaard J, Levi R, Papotti M, Alloatti G, Ghigo E. Growth hormone-releasing hormone

promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischaemia-reperfusion injury in rat heart. *Cardiovasc Res.* 2009 Jul 15;83(2):303-12. doi: 10.1093/cvr/cvp090. Epub 2009 Mar 17. PubMed PMID: 19293247.

86. Farkas R, Pozsgai E, Schally AV, Szigeti A, Szigeti E, Laszlo Z, Papp A, Gomori E, Mangel L, Horvath PO, Bellyei S. Possible predictors of histopathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 Mar;138(3):387-95. doi: 10.1007/s00432-011-1110-1. Epub 2011 Dec 8. PubMed PMID: 22160161.

87. Maruno K, Absood A, Said SI. Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 24;95(24):14373-8. PubMed PMID: 9826707; PubMed Central PMCID: PMC24380.

88. Vacas E, Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Schally AV, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits human renal cell carcinoma proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Oct;1823(10):1676-85. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.018. Epub 2012 Jun 21. PubMed PMID: 22728770.

Kulcsszavak

neuro-onkológia, mikro-idegsebészet, tömegspektrometria, valós idejű, in situ szövethatározás, splicing variáns peptid receptrok, kemoterápia, radiotherápia

Keywords

neuro-oncology, micro-neurosurgery, mass spectrometry, realtime in situ tissue analysis, splicing variant peptide receptors, chemotherapy, radiotherapy

Függelék

Közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Jelölt: Mezey Géza
Neptun kód: H8K54A
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

Iktatószám: DEENKÉTK//2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mezey, G.**, Treszl, A., Schally, A.V., Block, N.L., Vízkeleti, L., Juhász, A., Klekner, Á., Nagy, J., Balázs, M., Halmos, G., Bognár, L.: Prognosis in human glioblastoma based on expression of ligand growth hormone-releasing hormone, pituitary-type growth hormone-releasing hormone receptor, its splicing variant receptors, EGF receptor and PTEN genes.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 140 (10), 1641-1649, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-014-1716-1>
IF:3.009 (2013)
2. Schäfer, K., Balog, J., Szaniszló, T., Szalay, D., **Mezey, G.**, Dénes, J., Bognár, L., Oertel, M., Takáts, Z.: Real Time Analysis of Brain Tissue by Direct Combination of Ultrasonic Surgical Aspiration and Sonic Spray Mass Spectrometry.
Anal. Chem. 83 (20), 7729-7735, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ac201251s>
IF:5.856
3. Székely, G., Miltényi, Z., **Mezey, G.**, Simon, Z., Gyarmati, J., Gergely, L., Bognár, L., Illés, Á.: Epidural malignant lymphomas of the spine: Collected experiences with epidural malignant lymphomas of the spinal canal and their treatment.
Spinal Cord. 46 (4), 278-281, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.sc.3102124>
IF:2.071



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



További Közlemények

4. Nagy G., Kemény A.A., Major O., Eröss L., Várady P., Mezey G., Fedorcsák I., Bognár L.: Az intracerebrális cavernomák sugársebészete: Hol tart ma a világ?
Idégyogy. Szle. "közlésre elfogadva", 2014.
IF:0.343 (2013)
5. Fedorcsák I., Nagy G., Dobai J., Mezey G., Bognár L.: Az intracerebrális cavernomák sugársebészete: Hol tart Magyarország?
Idégyogy. Szle. "közlésre elfogadva", 2014.
IF:0.343 (2013)
6. Mezey G., Fedorcsák I., Bognár L.: Sugársebészeti beavatkozások, technikák.
In: Stereotaxiás és funkcionális idegsebészet. Szerk.: Valálik István, Akadémiai Kiadó, Budapest, 308-341, 2012.
7. Gergely, P., Budán, F., Szabó, I., Mezey, G., Németh, Á., Huszár, A., Iványi, J., Gombos, K., Knapp, Á., Örfi, L., Kéri, G., Ember, I.: Kinase inhibitors reduce 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced onco-suppressor gene expression in short-term experiments.
Eur. J. Oncol. 17 (1), 11-21, 2012.
IF:0.75
8. Peitl, B., Döbrönte, R., Németh, J., Mezey, G., Kovács, P., Paragh, G., Szilvássy, Z.: The prandial insulin sensitivity-modifying effect of vagal simulation in rats.
Metabolism. 54 (5), 579-583, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2004.11.014>
IF:2.294

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,666

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,936

Debrecen, 2014.11.17.

A disszertációhoz kapcsolódó előadások és poszterek listája

Real-time identification of brain cancers in the neurosurgical theater. J Balog, T Szaniszló, **G Mezey**, L Bognár, Z Takáts, The Association of Mass Spectrometry Applications to the Clinical Lab, Conference in San Diego **2013**. előadás

G Mezey First year outcome of patients with vestibular schwannoma after rotating gamma system treatment., International Stereotactic Radiosurgery Society Congress, Paris, **2011**. poszter

G Mezey Intrakraniális metasztázisok komplex idegsebészeti és neuro-onkológiai kezelése, az „oncoteam” szerepe (Complex neurosurgical and neuro-oncological treatment of intracranial metastases, role of oncoteam)., Congress of Hungarian Society of Neurosurgery, Szeged, **2011**. előadás

B Rózsa, A Juhász, B Dezső, G Tóth, T Flaskó, Á Klekner, **G Mezey**, L Bognár, A Molnár, C Kiss, A Gyetvai Gonadotropin hormone-releasing hormone-I (GnRH-I), Gonadotropin hormone-releasing hormone receptor-I (GnRHR-I) és splice variánsainak expressziója human benignus és malignus szövetekben. Magyar Onkológusok Társaság Kongresszusa, Budapest, **2009**. előadás

G Mezey, J Dobai, I Fedorcsák, L Bognár Gamma-radiosurgical treatment of large-size cystic metastases after stereotactic volume reduction. Magyar Idegsebészeti Társaság Kongresszusa, Debrecen **2009**. poszter

G Mezey, J Tóth, L Novák, L Bognár Primer diffúzan disszeminált pilocitás asztrocitóma: irodalmi áttekintés és esetbemutatás (Primary diffusely disseminated pilocytic astrocytoma: case report and review of the literature) Magyar Neuro-onkológiai Társaság Kongresszusa Debrecen **2009**. előadás

G Mezey Alacsony gradusú gliomák, Debreceni tapasztalatok I-II. (Low-grade gliomas, Experiences in Debrecen, case reports I-II.). Magyar Neuro-onkológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen **2009**. előadás

G Csiky, J Dobai, **G Mezey**, I Fedorcsák, L Bognár Veszibuláris schwannomák kezelése forgó rendszerű gamma-sugársebészeti eszközzel: retrospektív analízis (Treatment of vestibular schwannomas by rotating gamma-radiosurgical system: retrospective study). Magyar Neuro-onkológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen **2009**. poszter

G Mezey, L Vízkeleti, S Ecsedi, V Koroknai, T Kiss, I Fedorcsák, A Klekner, M Balázs, L Bognár Az EGFR és a PTEN gének eltérései különböző grádusú asztrocitómákban. Magyar Idegsebészeti Társaság Kongresszusa, Debrecen **2009**. előadás

P Gergely, **G Mezey**, L Örfi, I Ember In vivo effect of assorted chemopreventive molecules on DMBA-induced onco-suppressor gene expression in CBA/CA mice. International Conference of Anticancer Research, Kos, Greece, **2008**. poszter