

EGYETEMI DOKTORI (PHD ÉRTEKEZÉS)

**Tüdőrák agyi metasztázisa és intrakraniális agydaganatok
peritumorális invazivitásának összehasonlítása az extracelluláris
mátrix komponensek expressziójának vizsgálatával**

Dr. Varga Imre

Témavezető: Dr. Klekner Álmos PhD



**DEBRECENI EGYETEM
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 Az ECM-ről általában	7
2.2 Az ECM fontosabb összetevői	8
2.3 Az invazivitásban leginkább szerepet játszó ECM-molekulák részletes jellemzése	14
2.4. Az invazivitásban szerepet játszó enzimek jellemzése	20
2.5. Célkitűzések	21
3. Szövetminták és módszerek	22
3.1. Szövetminták	22
3.2. mRNS analízis	26
3.3. Immunhisztokémia és mikroszkópos analízis	28
3.4. Statisztikai módszerek	29
4. Eredmények	30
4.1. mRNS expressziós eredmények	30
4.2 Immunhisztokémiai eredmények	43
5. Megbeszélés	46
5.1. Az ECM szerepe daganatokban, különös tekintettel a tüdőrákra	46
5.2. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában és glioblasztómában	48
5.3. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában, alacsony grádusú asztrocitómában és schwannomában	51
5.4. Új eredmények	58
6. Összefoglalás	60
7. Irodalomjegyzék	62
8. Tárgyszavak	77
9. Köszönetnyilvánítás	78
10. Függelék	79

RÖVIDÍTÉSEK

BEHAB/Brevikán	Brain Enriched Hialuronan Binding/Brevikán
ECAM	Endothelial Cell Adhesion Molecule
ECM	Extracellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GAG	Glucose Amino Glucane
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GBM	Glioblasztóma Multiform
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HAS	Hialuronan Synthase
HS	Heparan Sulfate
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglykane
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix Metalloproteinase
NCAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
NSCLC	Non-Small-Cell-Lung-Cancer
PCAM	Platelet Cell Adhesion Molecule
PCR	Polymerase Change Reaction
PG	Proteoglycane
QRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TNC	Tenascín-C
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

1. BEVEZETÉS

„Korunk pestise”, ezzel a kifejezéssel számos betegséget illethet már, de talán legjobban a rosszindulatú daganatokra illik. Közöttük is kiemelkedő helyet foglal el a tüdőrák, gyakori (és egyre gyakoribb) előfordulása, nehéz szűrhetősége, más daganatokétól elmaradó terápiás esélyei és kiemelkedő mortalitása miatt.

A terápiás kudarcok fő oka általában az elkésett felismerés, a gyógyulás reményével egyedül kecsegtető sebészi megoldás gyakori kivitelezhetetlensége. Az inoperabilitás hátterében nemritkán távoli áttét áll.

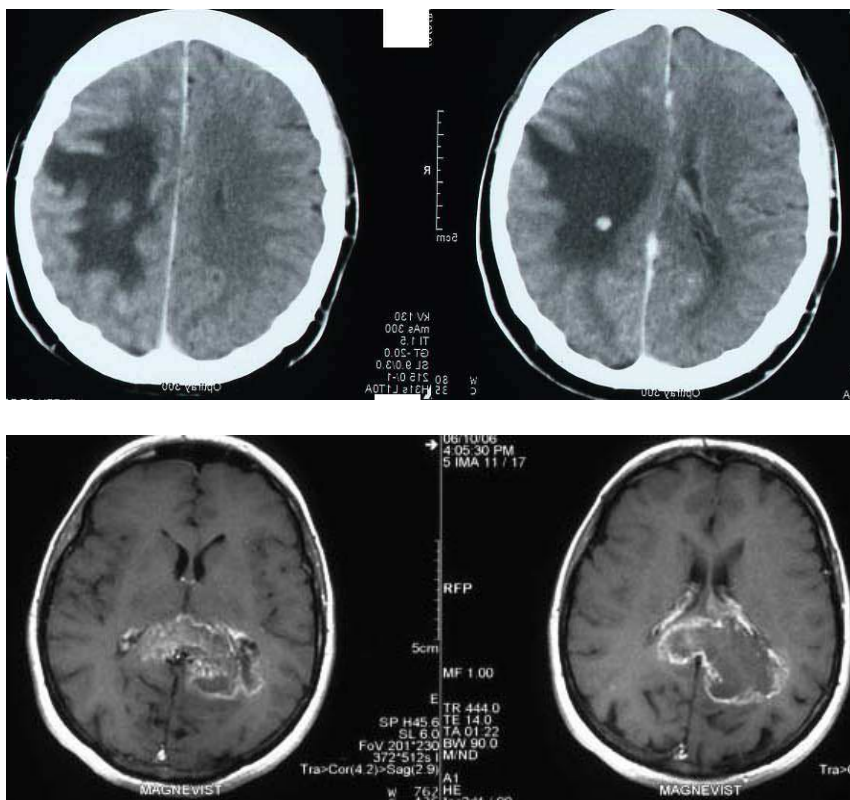
A tüdőrák hematogén áttétképzésének leggyakoribb helye a központi idegrendszer (1). A betegség lefolyása során az esetek 40-65% -ában létrejön az agyi metasztázis (2), sőt, az esetek 9%-ában ez az egyetlen távoli szervi áttét. Ennek pontos oka nem ismert, de már korábban is a kissejtes hörgőrák neuroendokrin eredetével magyarázták olyan, mindkét sejtben meglévő kapcsoló molekulák, kötőhelyek által, melyek a vérben keringő tumorsejteket a hasonló struktúrájú szervekhez, szövetekhez horgonyozzák (3). Tetszetős az ötlet azért is, mert a mikocelluláris karcinoma egyéb, idegi eredetű, vagy idegrendszerrel rokon struktúrákba (pl. mellékvese) is ad áttétet. Idővel megtalálni vélték ezt a sejtfelszíni molekulát is, melyet NCAM (neural cell adhesive molecule) -nak, idegsejt adhéziós molekulának, illetve újabban CD56-nak neveztek el. E molekuláról később kiderült, hogy inkább az idegrostok növekedésében játszik szerepet, ráadásul a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) központi idegrendszeri – és mellékvese - áttétei alig ritkábbak a kissejtesénél, jóllehet a gyanított sejtfelszíni markert ill. receptort nem hordozzák. A különbség a kissejtes és a nem-kissejtes rák agyi áttétképzésében, hogy a metasztázisok a kissejtes hörgőrák esetében gyorsabban létrejönnek és gyakrabban multiplex jellegűek. A rendelkezésre álló

adatok szerint a nem-kissejtes tüdőrákon belül leggyakrabban az adenokarcinoma agyi áttétjével találkozhatunk (4).

A másik oldalról nézve megállapíthatjuk, hogy a metasztázis a leggyakoribb rosszindulatú agydaganat (5). Az USA-ban évi 120-140.000 agyi metasztázis fordul elő, ez felel az összes tumoros haláleset 20%-áért. Valamennyi egyéb szervi daganat együttesen az esetek 8-10%-ában jár agyi áttéttel (6). Az agyban talált metasztatikus daganatok leggyakoribb forrása a primer tüdőrák, ezt követik csökkenő gyakorisággal az emlőrák, a melanoma, a veserák és a colon karcinoma (7).

Az agyi áttét a betegség kórlefolyását, kezelhetőségét és prognózisát is alapjaiban érinti, ezért nagyon fontos ezen áttétek időben történő kimutatása. Sajnos, nem egyszer látjuk, hogy a tünetmentes primer hörgőrák mellett az áttét okozta központi idegrendszeri tünetek jelentkeznek legelőször (8).

Ezek a tünetek kezdetben nagyon hasonlóak lehetnek a primer agytumороk okozta tünetekhez, az esetek többségében azonban már az első koponya CT (vagy MRI) is alkalmas lehet az elsődleges agytumороk és a metasztázisok nagy valószínűséggel történő elkülönítésére. Az elkülönítés alapja az, hogy amíg a primer agydaganat maga körül az agy állományát mélyen infiltrálja, attól kevésbé élesen választható el, szabálytalan alakú és kiterjedésű ödémás gyűrű övezi, addig az áttét az agyállománytól általában élesen elválasztható, közel szabályos gömb alakú és körülötte gyakran típusos perifokális ödémás gyűrű is látható (1. ábra).



1. ábra. Pulmonalis adenokarcinoma metasztázis CT (fent) és *glioblastoma multiforme* (lent) MRI képe.

A primer agydaganatok az intrakraniális daganatok második leggyakoribb csoportját jelentik. Közismert idegsebészeti tapasztalat és dilemma, hogy míg a gliomák radikális sebészi megoldása az infiltratív növekedés miatt az esetek döntő többségében kivitelezhetetlen, addig a tüdőrák áttétjeinek teljes eltávolítása általában rutin idegsebészeti beavatkozásnak számít. Természetesen ez a megállapítás csak a szoliter és könnyen hozzáférhető tumorgócokra igaz, a multiplex megjelenésű áttétek sebészileg ez esetben sem kezelhetők.

A tüdőrák agyi áttétjeinek ismerete tünetmentes gócok esetén is döntő kérdés, hiszen a primer folyamat műtéti megoldása és az egész prognózis is alapvetően ettől függ. Önmagában operálható primer folyamat és szoliter agyi áttét megfelelő kezeléssel még gyógyítható lehet, s ez nem utolsósorban annak a ténynek köszönhető, hogy az agyi áttétek növekedése nem, vagy csak minimális invazivitást mutat. Az igen széles körű nemzetközi kutatásokról beszámoló

irodalmi adatok a peritumorális inváziót egyértelműen az extracelluláris mátrix (ECM) komponenseivel hozzák szoros kapcsolatba (9, 10, 11, 12, 13). A glioma és a tüdőrák áttét között tapasztalható jelentősen különböző reszekabilitást eredményező intracerebrális invázió oka tehát döntően a két tumortípus extracelluláris mátrixának eltérő szerkezetében, az ott található makromolekulák tulajdonságaiban keresendő.

Jelen munkánkban gliomák és tüdő adenokarcinoma agyi áttétek ECM komponenseinek RNS- és proteinszintű analízisével a két különböző daganattípus eltérő inváziós hajlamának molekuláris hátterét vizsgáltuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Mivel a daganatok peritumorális infiltrációjában az extracelluláris mátrixnak (a továbbiakban: ECM) döntő szerepe van, ezért a vizsgálataink szempontjából fontos molekulák kiválasztásához azok funkciójának ismerete kiemelkedő jelentőségű. Az alábbiakban az ECM szerkezetének, funkcióinak rövid leírását, fontosabb molekuláinak jellemzését kívánjuk adni a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján, kiemelve néhány, a tüdőgyógyász-onkológus szemszögéből fontos tudnivalót.

2.1. Az ECM-ről általában

A többsejtű élőlényeknek olyan sejtközötti állományra van szükségük, amely biztosítja a sejtek kapcsolódását, kommunikációját, együttműködését, vándorlását, védelmét és a szükségnek megfelelő fejlődését is. Ezt az állományt extracelluláris mátrixnak nevezzük. Az ECM szerkezete nagyon is kötött, jellemző a fajra, a szövettípusra, az egyed korára, egészségi állapotára, a szervezetben zajló folyamatokra egyaránt. Számos patológiás jelenség, így a

fibrózis, a daganatok keletkezése és növekedése, a metasztázisképzés, de egyes kardiovaszkuláris betegségek és a nefrózis patogenezise, valamint a sebgyógyulás folyamata is szoros összefüggést mutat az ECM váltoásaival.

Más megfogalmazásban az ECM a kötőszövet nem-sejtes alkotórésze. A nem- emlős állatok, alacsonyabbrendű többsejtű élőlények, sőt a növények is rendelkeznek extracellularis matrix-szal, de azok a megfigyelések, jelenségek és evidenciák, melyekről az alábbi összefoglaló szól, az emlősök, közelebbről az ember sejtközötti állományára érvényesek.

Az ECM alkotói a sejten belül keletkeznek, és exocitózis útján jutnak a környezetbe (14), illetve egy részük a membránba épül be. Ha tehát ECM-alkotó molekulák után kutatunk, azokat megtalálhatjuk sejten belül és kívül, vagy akár a sejt membránjában is.

Az egyes molekulák egymással meghatározott sorrendben kapcsolódnak össze, jellegzetes struktúrát alakítva ki. Ez a struktúra módosulhat környezeti hatások vagy a sejt belső működése révén, hormonszerű anyagok vagy enzimek által. Az ECM lebontását sérülés, „remodelling” vagy patológiás folyamatok alkalmával az arra alkalmas enzimek rendszere, mindenekelőtt a mátrix-metalloproteinázok, cisztein-aszpartil proteinázok, szerin-proteinázok végzik (15).

2.2 Az ECM fontosabb összetevői

Az ECM alkotórészeit többféle felosztás alapján tárgyalhatjuk:

1.) Lokalizáció szerint az extracelluláris mátrix *interstitiális matrix*ből és *membrana basalis*ből áll (16). Az interstitiális teret poliszacharidokból és fibrózus proteinekből álló gél tölti ki, mely feszüléssel szembeni ellenállóképességet kölcsönöz az ECM-nak. A *membrana basalis* az ECM lemezszerű tömörülése, melyhez különböző epiteliális sejtek rögzülnek.

a.).Proteoglikánok	b.). Nem-proteoglikán poliszacharidok	c.). Rostok	d.). Egyéb speciális vázfehérjék	e.) Enzimek	f.) Ásványi anyagok és víz
1 Heparánszulfát (+fehérje)	Hialuronsav (proteinkomponens nincs)	1. Kollagén	1. Fibronektin	1. Mátrix-metalloproteinázok	
2 Kondroitinszulfát (+fehérje)		2. Elasztin, fibrillin, retikulin	2. Laminin	2. Cisztein-aszpartil-proteinázok	
3 Keratánszulfát (+fehérje)			3. Matrilin	3. Szerin proteinázok	
4 Dermatánszulfát (+fehérje)			4. Kadherine		

1. táblázat. Az ECM alkotóinak molekuláris alapú felosztása.

Ad a és b.)

Proteoglikánok. A proteoglikánok protein magból és savas cukorláncokból (glükózaminoglikánok, GAG) állnak. A GAG-ok szénhidrát polimerek (N-acetilglükózaminból vagy N-acetilgalaktózaminból és uronsavból épülnek fel, utóbbiak glükuronsav vagy iduronsav lehetnek (ld. 2. táblázat). A GAG komponens szerint a következő proteoglikánok ismertek:

kondroitinszulfát (glükuronsav + N-ac. galaktózamin polimer és fehérje)

dermatánszulfát (korábban kondroitinszulfát B) (iduronsav + N-ac. galaktózamin polimer + fehérje)

heparánszulfát (glükuronsav + N-szulfoglükózamin polimer és fehérje)

keratánszulfát (galaktóz + N-ac.glükózamin polimer és fehérje)

hialuronsav (csak poliszacharid) (glükuronsav+ N-ac.glükózamin polimer). Szabad formában migráló sejtekben található. Proteinhez nem kötődik kovalens kötéssel, ezért nem tartják proteoglikánnak, de praktikus okokból azokkal együtt szokás tárgyalni.

Ad c.)

Két fő rostféle (és azok számos módosulata) található az ECM-ban. Az egyik a **kollagén**, mely a szervezet legnagyobb tömegben található fehérjéje, az össz-fehérjetömeg 25-35%-át teheti ki (17), főképp a kötőszövetben és az izomzatban található. Alkotói közül a glicin és a prolin aminosavak találhatók meg nagy mennyiségben. Elnyújtott rostokból áll, melyek inakban, szalagokban, a bőrben, de a corneában, porcokban, csontokban, véredényekben, bélben és a gerinc porckorongjaiban is megtalálhatók. Az izmok tömegének 1-6%-át adja, főleg az *endomyosium* alkotórésze. A kollagén kölcsönzi a kötőszövet rigiditását. Szerkezetét monomer formában vizsgálva, „microfibrillum”-ként írták le. Az élő szervezetben inkább három lánc alkotta, ún. tripla hélix formájában létezik. A három láncból kettő azonos (két $\alpha 1$ -lánc), egy pedig kisméretben különbözik tőlük ($\alpha 2$ -lánc). A láncokat kovalens kötések rögzítik egymáshoz, hasonló az egyes triplexek között is kialakulnak, kiterjedt és stabil térbeli szerkezetet (rostot) hozva létre. Szintézise több előalakon keresztül (prokollagén, tropokollagén) zajlik. A prokollagén az endoplazmás retikulumban szintetizálódik, innen transzfer vezikulumok szállítják a Golgi apparátusba, ahol oligoszacharidok kötődnek hozzá, majd exocitózisra kész vezikulumokban jut el a sejtmembránig. A sejten kívülre jutva, a membrán kollagén-peptidázai tropokollagénné alakítják. Ha a folyamat a III típusú kollagén szintézisékor elmarad, a defektus kollagenopathiához (Ehlers-Dahnlos-szindróma) vezet. A kollagén harmad-negyedleges szerkezetét hidrogénhidak, ill. hidroxilgyökök stabilizálják, a szintézis folyamatában a C-vitaminnak kulcsszerepe van. A kollagénnak 28 különböző módosulata létezik az emberi

szervezetben belül, ezeket romai számokkal jelöljük (kollagén I-XXVIII) de a szervezetben fellelhető kollagén 90%-a egyetlen típushoz (kollagén I) tartozik. Ezt a típust leginkább a bőrben, inakban, erek környezetében, egyes szervekben találjuk. A csont szerves anyagának nagy részét adja. A II típusú kollagén a porcokra jellemző, a III-as a reticularis rostokra, ahol az I típussal együtt fordulnak elő, a IV típus a membrana basalis jellegzetes kollagénje, az V-ös megtalálható a sejtek felszínén, a hajban és a placentában. Mivel a daganatok ECM-ában is jelentős mennyiségű kollagén található, azok molekuláris felépítése és a normál szövetektől való eltérése kórjelző lehet és a peritumorális infiltrációt is befolyásolhatják.

A másik fő rosttípus az **elasztin**. A fibrillinnel együtt az elasztikus rostok fő alkotófehérjéje, a nyúlást és az összehúzódást teszi lehetővé. Bővelkedik hidrofób aminosavakban (glicin, prolin). A szolubilis tropoelasztint lizinhidak, illetve lizintartalmú molekulák (dezmozin, izodezmozin) kapcsolják elasztinná lizil hidroxiláz enzim jelenlétében. Az elasztin felel a kötőszövetek rugalmasságáért. A pubertás után elasztin már nem keletkezik, a fokozatos lebomlás magyarázza a korábban rugalmas szövetek merevebbé válását. Az elasztint kódoló gén defektusával magyarázzák a *supravalvular aortic stenosis* (SVAS) kialakulását, ill. a gén hiányában jelenik meg az öröklődő *cutis laxa* (löttyögő, laza, de rugalmatlan bőr).

A Marfan-szindróma kialakulását is összefüggésbe hozzák az elasztinnal, de az inkább az elasztikus rostokat alkotó másik fehérje ill. glikoprotein, a fibrillin defektusával magyarázható. Az elasztin fokozott bontása figyelhető meg az alfa-1-antitripszin hiánnyal magyarázható súlyos, rapid tüdőemfizéma eseteiben (18).

Ad d.)

A speciális vázfehérjék főbb képviselői az alábbiakban kerülnek ismertetésre.

A **fibronektin** az ECM-ban bőségesen jelenlevő adhezív glikoprotein. A sejtek kitapadásában, vándorlásában, differenciálódásában és proliferációjában van szerepe. Előfordul a nyálban is, ahol a patogén mikroorganizmusok általi kolonizációtól véd. Habár protein részét egyetlen gén kódolja, az alternatív *splicing* révén több izoform módosulata ismert. A membránt átérő receptorfehérjékhez (integrinek) csatlakozik, ezen kívül kollagéneket, fibrint és heparánszulfátot is köt. Szerkezetileg két, nem teljesen azonos alegységből áll, melyet diszulfidhidak kötnek össze (19). Két formában létezik: egyik a szolubilis forma, mely a plazmában található, hepatociták termelik, a fibrinnel együtt a sérülés helyén deponálódik, szerepe van az alvadékképződésben. Az inszolubilis formát főképp fibroblasztok termelik, ez található az extracelluláris mátrixban. A szolubilis formát a sérülés helyén ugyancsak a fibroblasztok által termelt proteázok (főleg mátrix-metalloproteinázok) bontják le, helyette inszolubilis fibronektin képződik. A fibronektint kódoló gén defektusa embrionálisan halálhoz is vezethet, vagy mezodermális, velőcső- és vaszkularis fejlődési zavarok támadnak. Tumoros megbetegedésekben a fibronektin termelődése általában csökken, degradációja ellenben fokozódik. Ugyanekkor csökken a fő kötőhely, az $\alpha 5 \beta 1$ integrin receptorok expressziója is. Nem-kissejtes tüdőrákban (NSCLC) ezzel ellentétes megfigyelés is született: kifejezetten magas fibronektin termelődést mértek. Feltételezik, hogy a fibronektin kötődése a tüdőráksejtekhez protektív hatású, rezisztenssé teheti a tumort az apoptózist indukáló kemoterápiás szerekkel szemben (20).

A **laminin** több változatban létező glikoprotein, a lamina basalis egyik fő alkotója. Szerepet tulajdonítanak neki a sejtdifferenciálódásban, az adhézióban, a migrációban, az egyén fenotípusos megjelenésében és a sejtek túlélésében egyaránt. Minden laminin molekula három különböző (α , β és γ) láncból áll, az egyes láncoknak 5, 4 illetve 3 genetikai variánsa van. Az új nomenklatura szerint így pl. a laminin511: tartalmazza az $\alpha 5$ -ös, a $\beta 1$ -es és a $\gamma 1$ -es láncokat. In vivo jelenleg 15 különböző kombinációt figyeltek meg. Közleményeink írásakor

jórészt még a korábbi nómenklatúra használata volt általános, így a jelen értekezésben is a laminin korábbi elnevezéseit (pl. LAMA-1) használjuk (21). A laminin révén olyan szerkezet alakul ki a *lamina basalis*ban, amely más sejtekhez horgonyozza a sejtet. A laminin önálló hálózatot alkot, ámde kapcsolatba kerül a IV. típusú kollagen alkotta hálózattal entaktin, fibronectin és perlekán útján. E molekulák is a sejtmembránhoz kötődnek részint integrin receptorok révén, részint pedig a *disztroglikán* glikoprotein komplex, valamint a Lutheran vércsoport-glikoproteinek által. A laminin szerepe nagy jelentőségű az axonnövekedésben (lam-111). A laminin hiányában főképpen izombetegségek, muszkuláris disztrófia alakulnak ki, valamint *epidermolysis bullosa*-t, *junctionalis nephrosis*-szindrómát is észleltek. Pulmonológiai szempontból fontos megfigyelés, hogy tüdőrák sejtvonalak vizsgálata során csökkent laminin-5 expressziót észleltek, nagyjából a kissejtes (65-86%), ritkábban a nem-kissejtes (20-60%) tumorok esetében (22).

Matrilin(ek). Négytagú fehérjecsalád, mely a von Willebrand faktor-A (vWFA) doménjét tartalmazó fehérjék szupercsaládjába tartozik. Az ECM –ben található, a kollagén-tartalmú rostokat kötik más mátrix-alkotókhoz. A vWFA-n kívül EGF-szerű domain is tartalmazzuk. Leginkább porcokban, de más szövetekben is előfordulnak (23). Glükózaminoglikánt nem tartalmazzuk, de glükózaminoglikánhoz kapcsolódhatnak. Matrilin-1: A vWFA domének közötti diszulfidhidak révén három azonos alegység kapcsolódik egymáshoz. A matrilin-1 porcokban található, de pl. a szemben is leírták. A matrilin-3-mal gyakran együtt fordul elő. Matrilin-2: a legnagyobb tagja a családnak, a matrilin-3 pedig a legkisebb. A matrilin-2 kötőszöveti struktúrákban, a bőrben, a belekben található, extracelluláris hálózatot képez. A matrilin-3 is az ízületi porc alkotója, fokozott expressziója az ízületi gyulladásos betegségekben inkább következménye a betegségnek, nem oka.

Kadherin(ek). Calcium-dependens adhézis fehérjék összefoglaló neve. Transzmembrán proteinek, melyek a sejtek egymáshoz rögzítésében játszanak szerepet a

zonula adherens területén. Alcsoportjai a klasszikus, a dezmoszomális, a protokadherin és az egyéb kadherineik. A klasszikus kadherineik között az E-kadherineik (CDH-1) az epiteliális szövetekre, az N-kadherineik az idegszövetekre (CDH-2) jellemzőek, a P-kadherin (CDH-3) a placentában található. A kadherineik katenin segítségével kötődnek aktinhoz illetve a citoszkeletonhoz.

Ad e.) Az ECM-ben megtalálható enzimeket a következő fejezetben részletezzük

Cukorlánc		Intracellularis PG	Sejtfelszíni PG	ECM PG
Egyszerű PG	Keratánszulfát			Fibromodulin keratocan lumican osteoaderin osteoglycin
	Kondroitinszulfát és dermatánszulfát	Chromogranin A	CD-44, melanoma PG, neurokán phosphocan thrombomodulin	aggrekán biglycan dekorin verzikán kollagén IX, XII, XIV, epiphygan, brevikan
	Heparánszulfát		Glypican 1-6, szindekán 2,3,4 transferrin receptor	Perlekán agrin kollagen XVIII
Összetett PG		Serglycin	Betaglycan, szindekán 1 amphiglycan	

2. táblázat. Az ismertebb proteoglikánok felosztása összetevők és lokalizáció szerint, Tímár és mtsai nyomán (24).

2.3. Az invazivitásban leginkább szerepet játszó ECM-molekulák részletes jellemzése

A legfontosabb, a tumoros invázióban is szerepet játszó ECM-alkotók a következők:

a.) **Aggrekán.** A lektikán fehérjecsald tagja, a verzikánnal és a neurokánnal együtt. A porcok tömegének max. 10%-a proteoglikán, ennek nagyrésze aggrekán, főleg az ízületi porcban van nagy mennyiségben. Szerkezete üvegmosó kefére hasonlít, a kondroitin-és keratánszulfát láncok az elnyújtott fehérje *core*-ra akaszknak. A fehérjerész három globuláris domaint (G1, G2, G3) tartalmaz, melyek a különböző kötőhelyekként

szolgálnak. Nagyfokú szerkezeti polimorfizmus jellemzi. A kompresszióval szembeni ellenállóképességet kölcsönzi a porcnak (25). Szerepe van a sejtadhézióban, hialuronsav-kötésben, az aggregációban és a kondrociták apoptózisában. Degradációja esetén artritisz fejlődik ki. Bontását az ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) családba tartozó *aggrecanase*-ok végzik. Tüdőrákos betegeken, ahol több típusú kollagén ellen is találtak tüdőrák invazivitásával összefüggésbe hozható antitesteket, az aggregán elleni ellenanyag jelenlétét is vizsgálták, de nem találtak hasonló eltérést (26).

- b.) **Agrin.** A görög „agrein”. azaz ’összegyűjteni’ szóból származik, ami arra utal, hogy az agrin acetilkolin receptorokat képes összegyűjteni (27). Fő szerepe az embriogenezis alatt, a neuromuszkuláris junctionok fejlődésében van (28). A motoneuron-axon végén szecernálódik. Ezen kívül az agrin a glomeruláris *membrana basalis* fő proteoglikánja, a vesefiltrációban és a sejt-matrix interakciókban játszik szerepet. Hepatocelluláris karcinómában és kolangiokarcinómában erős agrin expressziót észleltek az erek falának *membrana basalis*-ban. A neurokállal, a tenascin-C-vel és a verzikállal együtt teszik felelőssé az alacsony grádusú asztrocitómák invazivitásáért.
- c.) **Brevikán.** Kondroitinszulfát tartalmú proteoglikán az agyban, a lektikán/hialektin családba tartozik. A neuronok végső differenciálódásáért lehet felelős. Neve arra utal, hogy a fehérjelánc viszonylag rövid. Primer agytumzorokban nagy mennyiségben fordul elő, felelős lehet az alacsony grádusú asztrocitoma invazivitásáért (29). Melanoma sejtekben is megtalálható. Főképp a primer cerebelláris asztrocitákban fordul elő. Degradációjáért az *aggrecanase*-1 és a MMP-1,2,3,7,8,10,13 felelősek. Gliomákban sok bontóenzim aktiválódása eredményezi a brevikán fokozott degradációját.
- d.) **Dekorin.** A sejtben és az ECM-ban is megtalálható, leucinban gazdag proteoglikán. A kötőszövet része, az I. típusú kollagénhez kapcsolódik, azt „dekorálja” (innen a név). Az

ECM strukturális felépítésében, valamint az EGF receptor működésében játszik szerepet (30).

- e.) **Disztroglikán.** Transzmembrán glikoprotein, mely leginkább vázizomsejtekben található, de másutt, így az az agyban is előfordul. Az ECM valamint a sejt belső váza között teremti összeköttetést. Intracellulárisan a disztrofin nevű, X kromoszomán kódolt fehérjéhez kötődik, az pedig az intracelluláris aktinhoz. Disztrofin hiányában alakul ki a *dystrophia musculorum progressiva Duchenne* néven ismert hereditár izombetegség. A disztroglikán két alegységből áll, az α -alegység lamininhez, agrinhez és perlekánhoz (a lamina basalis alkotóihoz) kapcsolódik (31), a β -alegység a tulajdonképpeni transzmembrán rész, ami a disztrofinnal kerül kapcsolatba.
- f.) **Entaktin.** Más néven nidogen-1, a *membrana basalis*-t alkotó glikoproteinek egyike. A perlekánnal együtt szerepe van a *membrana basalis* kollagén és laminin hálózatainak egymáshoz kapcsolásában (32). EGF-szerű szekvenciákat és *thyreoglobulin*-ra emlékeztető szekvenciákat is tartalmaz, ciszteinben gazdag (33). Kalciumionokat köt és a sejtadhéziót segíti általában.
- g.) **Integrin(ek).** Transzmembrán receptorok, melyek a sejt és környezete (más sejtek, ill. az ECM) között teremtenek kapcsolatot. Számos típusuk ismeretes, és a legtöbb sejt többfélét is hordoz a felszínén. Az integrineknek szerepük van a szignál transzdukcióban, ezáltal szabályozzák a sejt alakját, motilitását és a sejtciklust. Oda-vissza kapcsolatot jelentenek az ECM és a sejt között. A sejt felszínhez, valamint a fibronectinhez, vitronectinhez, lamininhez és kollagénhez kötődnek az ECM alkotói közül. Szerkezetüket illetően heterodimerek, azaz két különböző szerkezetű lánc (α és β) alkotja őket, emlősökben az előbbinek 18, utóbbinak 8 változata ismert (34). Intracellulárisan a β -lánc egy talin nevű fehérjéhez kötődik, amely az integrin térbeli szerkezetét módosítja, képes az integrint dimerizálni. Az integrinek fő funkciói: 1) a sejtet az ECM-hoz kötik, 2) szignál

transzdukciót biztosítanak az ECM-től a sejt irányába, ezáltal befolyásolják a sejtosztódást, a differenciálódást, a sejtek növekedését és az apoptózist is, 3) szerepük van a sejtek migrációjában. Különleges integrin a GPIIb/IIIa, mely trombociták felszínén található, és az alvadás folyamata során a trombociták fibrinhez kapcsolódását teszi lehetővé. Ezt a kapcsolódásra való hajlamát az érpálya-sérülés helyén található kollagénnel való érintkezés sokszorosára erősíti, elősegítve az alvadékháló gyors kialakulását. Epiteiális tumorokban, így a nem-kissejtes tüdőrákban is az integrin-expresszió csökkenését figyelték meg. Az $\alpha 2,3,6$ és a $\beta 4$ alegységeket vizsgálták, melyek a kollagénnel és a lamininhez kötődnek, valamint az αv , 5, $\beta 3$, 6-ot, melyek fibronectinhez és fibrinogenhez kapcsolódnak. Azt tapasztalták, hogy a kollagen – és lamininkötő integrinek csökkent expressziója a NSCLC sejtekben gyakran megfigyelhető a normál hörgő epitéliumhoz képest, míg a másik csoportban a $\beta 6$ -os alegység fokozott regulációja észlelhető az esetek 50%-ában, s ezen esetek mind kiérett, jól differenciált tumorok, metasztázis nélkül.

- h.) **Neurokán.** Kondroitinszulfát proteoglikán, mely leginkább az agyban található. A sejtdhéziót és a migrációt befolyásolja. Agysérülés vagy egyes citokinek hatására emelkedett regulációt figyeltek meg (35). A neurokán gátolja az axonok regenerációját.
- i.) **Perlekán.** A *membrana basalis*-an jelenlévő, öt domainnal rendelkező heparánszulfát, mely az ECM komponenseihez kötődik, ill. képez keresztkötéseket az egyes alkotók között (36). A perlekán egyaránt termelődik a simaizomsejtekben és a vaszkuláris endotéliumban. Szerkezete a különböző fajokban csak csekély eltérést mutat. A perlekánnak szerepe van az ECM összeállításában, a lipoprotein kötésben, a sejtosztódásban és a sejtdhézióban. A vaszkuláris ECM kulcsfontosságú molekulája. Szükséges a porc és a csont fejlődéséhez is. Stimulálja az EGF-aktivitást és a regeneráció folyamatát. Lebontásában a katepszin-S-nek van kiemelkedő fontossága. A perlekán és a

heparánszulfát fokozott bontása a porcszövet fokozott mineralizációját (ezzel csontszövet irányú fejlődését) segíti elő (37). Az agyban főképp a *hippocampus* tartalmaz perlekánt.

j.) **Szindekán.** Transzmembrán protein(család), négy tagja ismert. A szindekán 3-5 heparánszulfát v. kondroitinszulfát láncot tartalmaz, melynek révén ligandok egész sorával lép kapcsolatba, pl. fibroblaszt növekedési faktorok, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, fibronectin, antitrombin -1, *transforming growth factor beta-1*. A szindekán és a fibronectin közötti kapcsolatot a tenascin C modulálja. A szindekán-1 és szindekán-3, valamint a szindekán-2 és a szindekán-4 képeznek két szerkezeti alcsoportot. A szindekán-1 a fibroblasztokban és az epiteliális sejtekben fordul elő nagy mennyiségben (főképp a keratinocitákban) de kevés van belőle az endothel sejtekben és az idegsejtekben. A szindekán-2 az endoteliális, neurális és fibroblaszt sejtekben gyakori, de kevésbé található epiteliális sejtekben. A szindekán-3 döntően idegsejtekben fordul elő, de alig kimutatható epiteliális sejtekben, míg a szindekán-4 az epitélben és a fibroblasztokban (helyileg főképp a májban és a tüdőben) van nagyobb mennyiségben, de kevés az endotélben és az idegsejtekben. A szindekánok funkciói: 1) növekedési faktor-receptor aktiváció, pl. a szindekán-1 az FGF-2 aktivátoraként működik a sebgyógyulásban (38), 2) mátrix adhézió: kollagén I, III, V, fibronectin, trombospondin, tenascin, 3) sejt-sejt adhézió: pl. a szindekán-4 integrinokkal együtt vesz részt a sejt-sejt interakciókban, 4) tumor szuppresszió és progresszió. Bár általában a szindekánokat tumorszuppresszív hatásúaknak tekintik, a szindekán-1 expresszió *myeloma multiplex*-ben és más tumorokban progresszióhoz vezet (39). A szindekán-4 regulációja oszteoarthritisben fokozott, s ez korrelál a porcdestrukcióval és a következményes panaszokkal. Hasonlóképpen a szindekán-1 emelkedett regulációja *myeloma multiplex*-ben rossz prognózissal jár együtt. A szindekán-1 a legtöbb tumorban tanulmányozott tagja a

csoportnak. Nagy valószínűséggel a növekedési faktorok hatását közvetíti, így emlőrákban és endometrium-karcinómában segíti az angiogenezist.

k.) **Tenaszcin.** Glikoprotein-család, mely négy tagból áll: tenaszcin C, R, X és W. Legfontosabb a tenaszcin-C, mely inakban, csontokban és porcokban található. A tenaszcin-R az idegrendszerben, a tenaszcin-X a laza kötőszövetben fordul elő, a kódoló gén mutációja vagy defektusa alkalmával alakul ki az Ehlers-Dahnlos-szindróma (40). A tenaszcin-W-t a fejlődő csontokban és a vesében találjuk. A tenaszcinban EGF-szerű szekvenciák és fibronectin III-domainok ismétlődnek. A tenaszcin-C képes a fibronectint megkötni és megakadályozni, hogy az szindekánhoz kapcsolódjon. Egyes tumorok stromájában tenaszcin-C halmozódik fel, s ez rendszerint rossz prognoszt jelent.

l.) **Verzikán.** Kondroitinszulfát tartalmú proteoglikán. A lektikán család tagja, az aggregánnal, brevikánnal és neurokánnal együtt. A verzikánnak 4 izoformja létezik: a V0, V1, V2, V3. Tartalmaz EGF-szerű szekvenciákat, *complement regulatory protein* (CRP) domainokat és lektin domainokat. A C-terminális régió különböző ligandokat köt, ami a lektikán családra általában jellemző. Szerepe van a sejtadhézióban, proliferációban, migrációban. Általában „anti-adhezív” molekulának tartják, ami talán az adhezívnek tartott integrinek gátlásával magyarázható. Az N-terminus hialuronant köt, a C-terminus a tenaszcinval és a fibulin-2-vel kapcsolódik. A verzikán leginkább a véredények simaizomsejtjeiben, a bőr epiteliális sejtjeiben és az idegrendszerben található. Felnőttek központi idegrendszerében a perineuronális hálózatban fordul elő, a szinaptikus kapcsolódást stabilizálja. Fontos szerepet játszik az embrionális sejt vándorlásban és az idegsejtek vándorlásában. Kulcsfontosságú egyes gyulladásos folyamatokban, a sejtadhézióra gyakorolt hatásán keresztül. Fokozott verzikán expresszióval találkozhatunk többféle tumorban, mint agy, emlő, petefészek, prosztata, gasztrointesztinum, melanoma, szarkoma, peritoneális

mezotelioma. Egérben a Lewis tüdőkarcinomában találtak összefüggést a verzikán expresszió és a tüdőbe, májba, mellékvesébe történő áttétképzés között.

2.4. Az invazivitásban szerepet játszó enzimek jellemzése

A peritumorális invázióban szerepet játszó ECM-komponensek aktuális lokális koncentrációja a releváns szintetizáló ill. lizáló enzimek mikrolokuláris mennyiségének és aktivitásának függvénye. Ezért a szóban forgó enzimek tumorinvázió szempontjából igen nagy jelentőséggel bírnak. Az ECM ebből a szempontból legfontosabb enzimeit a mátrix metalloproteinázok (MMP-k). A cink-dependens endopeptidázok közé tartoznak, az *adamalysin*-ekkel, *serralysin*-ekkel és *astacin*-okkal együtt (41). Jelenleg 28 féle MMP-ről tudunk, melyeket egyszerű arab számokkal jelölünk (pl. MMP-1, ld. 3. táblázat). A mátrix metalloproteinázok az ECM gyakorlatilag valamennyi komponensét képesek lebontani. Ugyancsak képesek az ECM alkotókat aktiválni, ill. aktív metabolitokat lehasítani. Főszerepet játszanak a szöveti sérülést követő *remodelling* során, de hasonlóképpen fontosak a sejtek migrációjában, differenciálódásában, az angiogenezis folyamatában. A kórfolyamatok közül a májcirózisban, az artritiszben (MMP-1), a daganatok infiltratív növekedésében és a metasztázisképzésben (MMP-2 és MMP-9) fontosak. A többi enzim a jelen munkánk szempontjából kisebb jelentőségű, nem vizsgáltuk.

Név (gén neve)	Enzim neve, funkciója
MMP-1	szöveti kollagenáz
MMP-2	gelatináz A
MMP-3	Stromelysin-1
MMP-7	matrilysin, a sejtmembrán koleszterol-szulfátjához kötődik
MMP-8	neutrofil kollagenáz
MMP-9	gelatináz B

3. táblázat. Néhány fontosabb mátrix-metalloproteináz. Van Lint és mtsai nyomán (41)

2.5 Célkitűzések

1. Az irodalmi előzmények alapján az igen nagyszámú, peritumorális invázióban definitív szereppel bíró ECM komponensek összeválogatása, egy ún. „inváziós panel” létrehozása.
2. Az inváziós panel RNS- és egyes molekulák proteinszintű vizsgálatával a glioblasztóma és a tüdőrák agyi áttétei közötti különbségek meghatározásával az igen eltérő inváziós aktivitásért leginkább felelős molekulák meghatározása.
3. Az anaplasztikus tumorokat képviselő glioblasztóma elemzését követően a benignus tulajdonságokkal bíró, de mégis infiltratív primer agydaganat, az asztrocitoma WHO grade II esetében az invázióban leginkább szerepet játszó molekulák identifikálása.

3. SZÖVETMINTÁK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Szövetminták

Szövetmintáink a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikán működő Idegsebészeti Szövet- és Agydaganatbankból származtak: műtét során a daganat széli részéből eltávolított és folyékony nitrogén felszínén azonnal lefagyasztott majd -80°C -on tárolt mintákon végeztünk méréseket. A Debreceni Idegsebészeti Szövet-és Agydaganatbank a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) engedélyével rendelkezik (3145-1/2014), és a kutatási célú mintagyűjtés a betegek írásos beleegyezésével történtek. A vizsgálatokhoz csak a terápia célú beavatkozások során eltávolított szövetmintákat használtuk, így a beteg számára semmilyen, a rutin kezeléstől eltérő kockázat nem keletkezett. Tekintettel az anaplasztikus daganatok heterogén jellegére a vizsgálatok során minden fagyasztott tumordarabból szövettani metszetet is készítettünk a pathológiai mikrolokuláris diagnózis megerősítéséhez.

A fenti cékitűzések megvalósításához négy fázisban végeztük el méréseinket. Az egyes fázisban vizsgált szövetminták és molekulák listáit a 4. táblázatban foglaltuk össze. Az első fázisban az irodalom áttekintése alapján összeállítottuk azoknak a molekuláknak a listáját, melyek a peritumorális invázióban szerepet játszhatnak (5. táblázat). Ezeknek a géneknek az mRNS expresszióját meghatároztuk 5 glioblasztóma, 5 peritumorális normál agyszövet és 5 tüdő adenokarcinoma intracerebrális áttétből származó szövetmintában. Ezután az mRNS expressziós értékeket a különböző szövettani csoportok között összehasonlítva meghatároztuk azoknak a molekuláknak a körét, melyek szignifikáns eltérést mutatva a nagyobb esetszámú vizsgálatokhoz további mérések céljára érdemesnek találtunk.

Az előzetes mérések alapján az egyes tumorcsoportok nagyobb számú analíziséhez összeállított molekulák listáját inváziós panelnek neveztük el. Konkrét, publikálásra érdemes

eredményeink már ennek a célzottan összeválogatott inváziós panelnek a mérési eredményeiből születtek.

fázis	célmolekulák száma	szöveti típusok és mintaszámuk	immunhisztokémiával vizsgált molekulák	publikált forrás
1.	96	5 GBM 5 MET 5 NORM	-	nem publikált
2.	23	4 GBM 4 MET	neurokán, verzikán, szindekán, MMP-2, 9	Ideggy. szemle
3.	30	11 GBM 10 MET 9 NORM	agrin, neurokán, szindekán, verzikán, hialuronsav, MMP-2, 9	Central European Neurosurg.
4.	26	9 A-II 10 MET 8 SCH 9 NORM	brevikán, neurokán, tenascin-C, verzikán	Path. Oncol. Res.

4. táblázat. A különböző eredetű intrakraniális daganatok invázióban szerepet játszó ECM-molekulák meghatározásának fázisai. GBM = glioblasztóma, MET = tüdő adenokarcinoma agyi áttéte, NORM = nem tumoros (peritumorális) agyállomány, A-II = asztrocitoma WHO grade II, SCH = schwannoma, MMP = mátrix metalloproteináz.

	FEHÉRJÉK	GÉNEK	TLDA azonosító
1	Beta-actin	ACTB	Hs99999903 m1
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs99999905 m1
3	Beta-2-microglobulin	B2M	Hs00187842 m1
4	CD44	CD44	Hs00153304 m1
5	CD168 (RHAMM)	HMMR	Hs00234864 m1
6	Aggerekán	AGC1	Hs00153936 m1
7	Verzikán	CSPG2	Hs00171642 m1
8	Brevikán	BCAN	Hs00222607 m1
9	Neurokán	CSPG3	Hs00189270 m1
10	Neuroglükán C	CSPG5	Hs00198108 m1
11	HAS1	HAS1	Hs00758053 m1
12	HAS2	HAS2	Hs00193435 m1
13	HAS3	HAS3	Hs00193436 m1
14	Kondroitinases (AC és ABC)	GALNS	Hs00166833 m1
15	Szindekán1	SDC1	Hs00174579 m1
16	Szindekán2 (HSPG1)	SDC2	Hs00299807 m1
17	Szindekán3 (N-Szindekán)	SDC3	Hs00206320 m1
18	Szindekán4 (Amphiglycan,Ryudocan)	SDC4	Hs00161617 m1
19	Laminin alpha1	LAMA1	Hs00300550 m1
20	Laminin alpha2	LAMA2	Hs00166308 m1
21	Laminin alpha4	LAMA4	Hs00158588 m1
22	Laminin beta1	LAMB1	Hs00158620 m1
23	Laminin beta2	LAMB2	Hs00158642 m1
24	Laminin gamma1	LAMC1	Hs00267056 m1
25	Tenaszcín-C (Hexabrachion)	TNC	Hs00233648 m1
26	Tenaszcín-R (Restrictin, Janusin)	TNR	Hs00162855 m1
27	Fibronectin	FN1	Hs00277509 m1
28	(Matrilin1)	MATN1	Hs00159075 m1
29	Matrilin2	MATN2	Hs00242753 m1
30	Fibrillin1	FBN1	Hs00171191 m1
31	Fibrillin2	FBN2	Hs00417208 m
32	Fibrillin3	FBN3_HUMAN	Hs00261049 m1
33	Elasztin	ELN	Hs00355783 m1
34	Agrin	AGRN	Hs00394748 m1
35	Perlekán (HSPG2)	HSPG2	Hs00194179 m1
36	Type I alpha1	COL1A1	Hs00164004 m1
37	Type III alpha1	COL3A1	Hs00164103 m1
38	Type IV alpha1	COL4A1	Hs00266237 m1
39	(Type VIII alpha1 (érfejlődésben fontos))	COL8A1	Hs00156669 m1
40	(Type VIII alpha2 (érfejlődésben fontos))	COL8A2	Hs00697025 m1
41	Aquaporin1	AQP1	Hs00166067 m1
42	Aquaporin2	AQP2	Hs00166640 m1
43	Aquaporin3	AQP3	Hs00185020 m1
44	Aquaporin4	AQP4	Hs00242342 m1
45	FGF8	FGF8	Hs00171832 m1
46	WNT1	WNT1	Hs00180529 m1
47	WNT2	WNT2	Hs00608224 m1
48	WNT2B	WNT2B	Hs00244632 m1
49	Lactadherin (MFG-E8,HMFG)	MFGE8	Hs00170712 m1
50	Kadherin E	CDH1	Hs00393592 m1

51	Kadherin N	CDH2	Hs00169953 m1
52	Kadherin N2 - Brain Kadherin	CDH12	Hs00415843 m1
53	Kadherin P	CDH3	Hs00354998 m1
54	TGF Beta1 (Camurati-Engelmann disease)	TGFB1	Hs99999918 m1
55	TGF Beta2	TGFB2	Hs00234244 m1
56	TGF Beta3	TGFB3	Hs00234245 m1
57	TGF Beta-induced, 68kDa	TGFB1	Hs00165908 m1
58	TGF Beta-induced factor (TALE family homeobox)	TGIF	Hs00820148 q1
59	TGF Beta-induced factor2 (TALE family homeobox)	TGIF2	Hs00222358 m1
60	TGF Beta-induced factor2-like, X-linked	TGIF2LX	Hs00536782 s1
61	TGF Beta-induced factor2-like, Y-linked	TGIF2LY	Hs00536782 s1
62	Transglutaminase1 (K polypeptide epidermal type I)	TGM1	Hs00165929 m1
63	Transglutaminase2 (C polypeptide)	TGM2	Hs00190278 m1
64	Transglutaminase3 (E polypeptide)	TGM3	Hs00162752 m1
65	Transglutaminase5	TGM5	Hs00188562 m1
66	Transglutaminase7	TGM7	Hs00369497 m1
67	Factor XIII A1	F13A1	Hs00173388 m1
68	Factor XIII B	F13B	Hs00157471 m1
69	Integrin - Alpha1	ITGA1 - PELO	Hs00235030 m1
70	Alpha2 (CD49B)	ITGA2	Hs00158148 m1
71	Alpha2B (CD41B)	ITGA2B	Hs00385235 m1
72	Alpha3 (CD49C)	ITGA3	Hs00233722 m1
73	Alpha5 (Fibronectin receptor)	ITGA5	Hs00233732 m1
74	Alpha6	ITGA6	Hs00173952 m1
75	Alpha7	ITGA7	Hs00174397 m1
76	Alpha8	ITGA8	Hs00233321 m1
77	Alpha9	ITGA9	Hs00174408 m1
78	Alpha10	ITGA10	Hs00174623 m1
79	Alpha11	ITGA11	Hs00201927 m1
80	Beta1 (Fibronectin receptor, CD29)	ITGB1	Hs00559595 m1
81	Beta2 (CD18)	ITGB2	Hs00164957 m1
82	Beta3 (CD61)	ITGB3	Hs00173978 m1
83	Beta4	ITGB4	Hs00236216 m1
84	Beta5	ITGB5	Hs00609896 m1
85	MMP-1 (Interstitial Kollagenase)	MMP1	Hs00233958 m1
86	MMP-2 (Gelatinase A)	MMP2	Hs00234422 m1
87	MMP-8 (Neutrophil Kollagenase)	MMP8	Hs00233972 m1
88	MMP-9 (Gelatinase B)	MMP9	Hs00234579 m1
89	MMP-13 (Kollagenase 3)	MMP13	Hs00233992 m1
90	EGFR (erb B1)	EGFR	Hs00193306 m1
91	erb B2	ERBB2	Hs00170433 m1
92	erb B3	ERBB3	Hs00176538 m1
93	erb B4	ERBB4	Hs00171783 m1
94	Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Hs00157674 m1
95	CEA = CEACAM5	PSG2/CEACAM5	Hs00237075 m1
96	Citokeratin-18	KRT18	Hs01920599 qH
97	Citokeratin-19	KRT19	Hs00761767 s1
98	Ki-67	MKI67	Hs00606991 m1

5. táblázat. Az előzetes mRNS expressziós szintek meghatározásához az irodalmi eredmények alapján összeállított molekula- és génlista.

A második fázisban az előzetes mérések alapján megállapított inváziós panelt vizsgáltuk 8 szövetmintán: 4 glioblasztóma és 4 tüdő adenokarcinoma agyi áttéti daganatában. 23 invázióban szerepet játszó ECM molekula mRNS expressziós szintjét határoztuk meg és közülük 5 molekula esetében immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatot is végeztünk. A harmadik fázisban elvégzett mérésekhez 30 szövetmintát elemeztünk: 11 glioblasztómát, 10 tüdő eredetű adenokarcinoma szoliter agyi áttétét és 9 peritumorális agyszövetmintát válogattunk össze, melyeknél 30 inváziós molekula mRNS expresszióját mértük meg és 7 molekula (IHC) analízisét végeztük el. A negyedik méréshez összesen 36 szövetmintát vizsgáltunk: 9 asztrocitoma grade II, 10 tüdő adenokarcinoma agyi metasztázis, 8 schwannoma és 9 tumormentes peritumorális agyszövetmintát dolgoztunk fel. Ebben a fázisban az inváziós panel 26 molekulából állt és 4 molekulán végeztünk IHC vizsgálatot.

Az RNS analízisre szánt mintákból előbb metszeteket készítettünk szövettani diagnózishoz és immunhisztokémiai vizsgálatokra, majd a maradék szövetdarabot RNS izolálásra továbbítottuk. A szövettani diagnózist a klinikumtól független sorsú kódolt mintákon gyakorlott neuropatológus állapította meg.

3.2. mRNS analízis

A kiválasztott molekulacsoport mRNS expresszióját egyedi rendelés alapján előállított ún. „DNS-kártya” segítségével végeztük el („Micro Fluidic Card” - Applied Biosystems, USA). Az inváziós panelt alkotó sejtfelszíni receptorokat és ligandjaikat vizsgáltuk. A tumor eredetét igazoló markereket (*glial fibrillary acidic protein* [GFAP] és citokeratin 18,19), a Ki-67 proliferációs markert és belső standardként a beta-aktin és gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz [GAPDH] expresszióját szintén vizsgáltuk.

RNS analízis

A frissen (folyadék nitrogénben) fagyasztott mintákat manuális CryoPress eszközzel (Microtec Co., Ltd, Japan) porlasztottuk. A frissen porlasztott mintákat ezután a megfelelő mennyiségű TriReagent (Invitrogen, USA) oldatba helyeztük, és azonnal rotor-stator homogenizátorral homogenizáltuk. Total RNS-t a TriReagent lizátumból a gyártó előírásai alapján vontuk ki. Az RNS tisztaságát és mennyiségét NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) segítségével határoztuk meg majd – 80°C-on tároltuk. RNS minőségét 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk ethidium bromide festék segítségével. Total RNS-t egyláncú cDNS-be konvertáltuk High Capacity cDNA Archive Kit with RNasin (Applied Biosystems, USA) segítségével (600 ng total RNS mintánként egy reverz transzkriptáz reakcióban). Az átírt cDNS-t egy microfluidic card portjaiba helyeztük.

TaqMan Low Density Array (TLDA) kísérleteket végeztünk Applied Biosystems 7900HT real-time PCR rendszer segítségével Micro Fluidic Card upgrade-ben (Applied Biosystems, USA). A Micro Fluidic Card format a mintánkénti 40 gén analízisét teszi lehetővé. Minden mintáról másolat is készült, amit szintén analizáltunk. A Micro Fluidic Card-dal nyert eredményeket SDS 2.1 software segítségével elemeztük ki. Ezen software-rel automatikus küszöbérték mellett és a már meghatározott C_T értéket használva határoztuk meg a mintákban jelenlévő cDNS mennyiségét. Minden esetben meghatároztuk a housekeeping GAPDH gén expressziós mértékét is. GAPDH mutatott a legkisebb variációt az egyes minták között és referencia génként szolgált a dC_t értékek kiszámításánál.

Expressziós értékeket a comparative C_T method segítségével határoztuk meg, ahogy azt az irodalomban már leírták korábban (Livak és Schmittgen, 2001). Röviden, feltételezve, hogy a PCR hatékonysága bármely gén esetében TLD-Assay felhasználva az 1-hez közelít, egy tumoros vagy normál (kalibrátor) mintában a gén mRNS expresszióját (Han és mtsai.

2005) össze lehet hasonlítani a következő egyenlet segítségével (Hirose és mtsai. 2001):

$$X_{\text{tumor}} = 2^{-dCT_{\text{tumor}}} \text{ és } X_{\text{normal}} = 2^{-dCT_{\text{normal}}}$$

2^{-dCT} értékét GeneSpring 7.3 software (Silicon Genetics, Redwood City CA, USA) segítségével határoztuk meg; így megkaptuk az egyedi, individuális mRNS expressziós (X) különbségeket a mintákon belüli kategóriákban.

3.3. Immunhisztokémia (IHC) és mikroszkópos analízis

Az első fázisban IHC vizsgálatokat nem végeztünk.

A második fázisban (minek alapján) 5 molekula IHC festődési intenzitását vizsgáltuk: neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 és MMP-9.

A harmadik fázisban történt méréseknél a mRNS meghatározás eredményeinek értékelése után hét molekulát választottunk ki és vizsgáltunk fehérjeszinten immunhisztokémiailag: az agrint, a neurokánt, a szindekánt, a vezikánt, a MMP-2-t és 9-et, valamint a hialuronant.

A negyedik fázisban a mRNS eredmények értékelése után a brevikán, neurokán, tenaszcin-C és a verzikán került kiválasztásra proteinszintű immunhisztokémiai vizsgálatra.

Az immunhisztokémiai reakciók intenzitásának kiértékelését három különböző, szövettani vizsgálatokban jártas szakember egymástól függetlenül végezte el. Minden metszeten három különböző területen 0-4-ig osztályoztuk a festődési intenzitást, majd eredményeinket átlagolva jutottunk a végleges értékekhez. Fagyasztott mintákat fixáltunk *Saint Marie's fixative* (Sainte-Marie, 1962; Tuckett és Morriss-Kay, 1988) oldatban 24 órán keresztül 4°C-on. A fixáció és dehidráció után a mintákat viaszba ágyaztuk és 5-µm vastag szeleteket készítettünk. A mintákat haematoxylin-eosin festékekkel festettük meg, de emellett immunhisztokémiai eljárást is alkalmaztunk a következő protokoll szerint: a mintákat előinkubáltuk ready-to-use 2.5% normal horse szérumban (Vector, Burlingame, CA, USA) 30

percen keresztül 37°C-on, így a nem specifikus primer antitest kötődését gátoltuk meg. Brevikán meghatározásához MAB40091 (Monoclonalis Antibody Brevican40091) (R&D Systems, Minneapolis, USA), neurokánhoz AB26003 (ABCAM, Cambridge, USA), tenaszcinhoz AB19011 és a verzikánhoz AB1032 (Chemicon, Millipore, USA) antitesteket használtunk.

A szeleteket ezután 4 °C-on inkubáltuk 12 órán keresztül a megfelelően hígított antitesteket tartalmazó oldatban. A morfológiai vizsgálatokhoz immunohisztokémiai és hemalaun festést végeztünk a fennmaradó szeleteken.

Az immunhisztokémiai metszeteket három különböző, tapasztalt kutató elemezte ki és értékelte a 2. fázisban 1-től 4-ig, a 3. fázisban a különbségek észlelésének finomítása érdekében 1-től 5-ig terjedő skálán. A pontértékek az intercelluláris stroma festődési intenzitását jellemezték, ahol az 1-es érték a negatív, a maximális érték a legintenzívebben festődő mintát jelentette.

3.4. Statisztikai módszerek

A mérések pontosítása és a statisztikai analízis érdekében minden QRT-PCR mérést kétszer végeztünk el. Mintáink statisztikai elemzése során az egyes gének expressziós szintjei közötti különbség meghatározásához a Mann-Whitney féle U-próbát alkalmaztuk. A $p \leq 0.05$ esetén az eredményeket szignifikánsnak tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. mRNS expressziós eredmények

1. fázis

Az első fázisban az irodalmi áttekintés alapján összeválogatott, tumoros invázióban szerepet játszó 96 molekula mRNS expressziós szintjét határoztuk meg glioblasztóma, tüdő adenokarcinoma agyi áttéti és peritumorális agyszövet mintákon. A mérések alapján határoztuk meg azoknak a molekuláknak a körét, melyek a tapasztalt eltérések alapján nagyobb számú szövetmintán való további vizsgálatra is érdemesnek találtunk. Az így kialakult célmolekulák csoportját inváziós panelnek neveztük el (6. táblázat).

GBM v Norm 1.5x UP	p<0.01	MET v GBM 2x UP	p<0.005	MET v Norm 1.5x UP	p<0.01
Gene Name		Gene Name		Gene Name	
laminin beta1	0.00994	TGF beta-induced-factor	0.0375	laminin beta1	0.00994
szindekán1	0.00815	CEA	0.0342	szindekán-1	0.00815
MMP-9 (gelatinase-B)	0.00664	Erb B3	0.0192	MMP-9	0.00664
Kollagen type I alpha1	0.00615	integrin alpha3	0.0167	Kollagen type I apha 1	0.00615
		integrin beta1	0.0121		
		kadherin-P	0.00717		
		TGF beta-induced-factor 2	0.00604		
		szindekán1	0.00177		
		szindekán4	0.00173		
		aquaporin3	0.00113		
		Erb B2	0.000628		
		citokeratin-19	0.000215		
		citokeratin-18	4.22e-5		
MET v GBM 2x Down	p<0.05	GBM v Norm 1.5x Down	p<0.05	MET v Norm 1.5x Down	p<0.01
Gene Name		Gene Name		Gene Name	
neurokán	0.0436	aquaporin-3	0.0463	TGF-beta3	0.00623
laminin alpha4	0.0313	integrin alpha-9	0.0445	szindekán-2	0.00597
MMP-2 (gelatinase-A)	0.0275	WNT2B	0.0303	aquaporin-4	0.00444
tenaszcin-R	0.0266				0.00411
lactadherin	0.0237	tenaszcin-R	0.0222		
fibrillin2	0.0236	szindekán-4	0.0162		
GFAP	0.0144	Erb B4	0.0115		
TGF beta2	0.0123	HA-synthase-1	0.00591		
aquaporin4	0.0111				
aquaporin1	0.00778	kadherin N2	0.00126		
CD44	0.00774	WNT2	0.000533		
tenaszcin-C	0.00498				
neuroglikán-C	0.0029				
brevikán	0.00182				
elasztin	0.000508				
matrilin2	0.000182				
verzikán	0.000113				
kadherin-N	4.17e-5				
integrin alpha7	2.34e-5				

6). táblázat. Az invázióval összefüggésbe hozható molekulák mRNS expressziójában az előzetes mérések során észlelt szignifikáns eltérések. GBM = glioblasztóma; MET = tüdő adenokarcinoma agyi áttéte; NORM = peritumorális normális agyállomány.

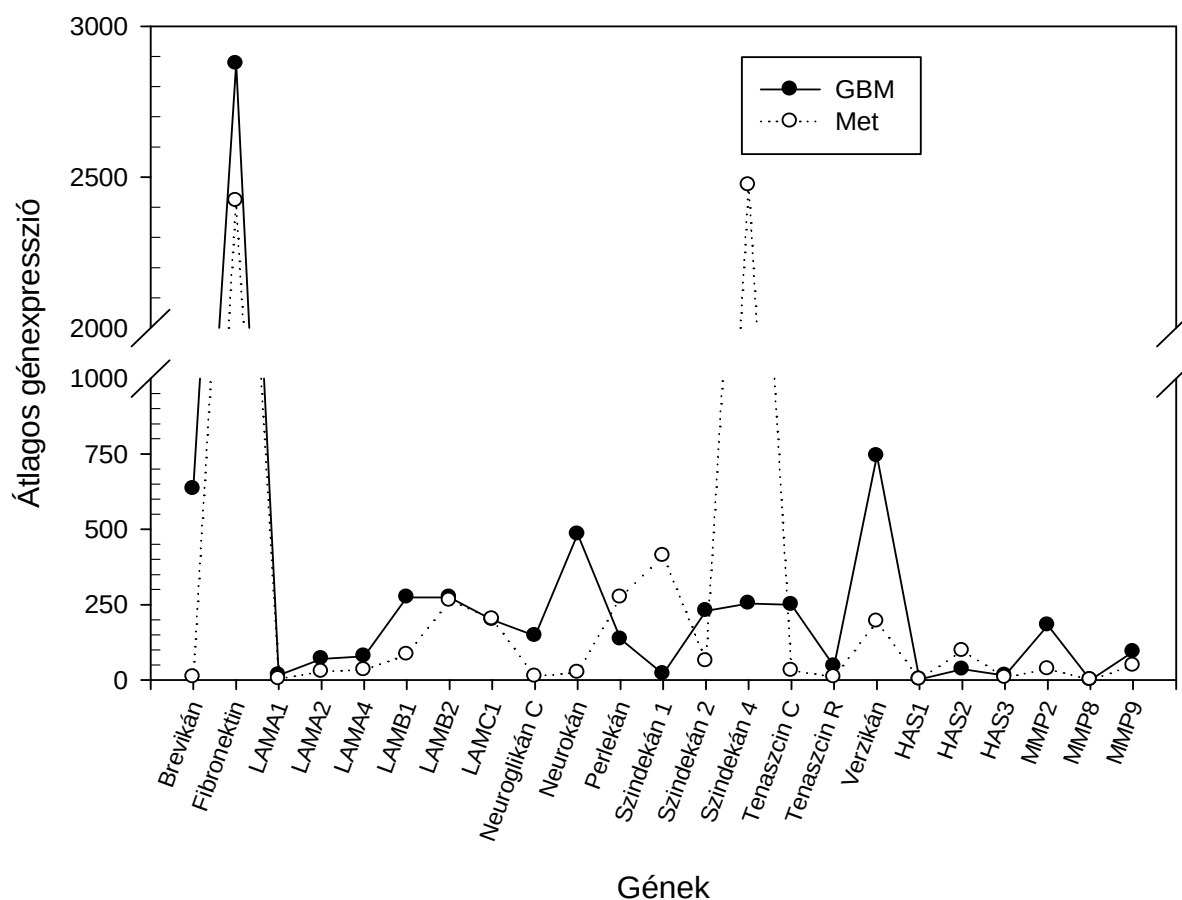
2. fázis

Az ezt követő fázisban glioblasztóma és a tüdő adenokarcinoma esetében az inváziós panel meghatározásakor a következő eredményekre jutottunk.

A második fázisban 23, peritumorális infiltrációban szerepet játszó ECM-komponens mRNS expressziós szintjét határoztuk meg. A 23 molekulából 17 tartozott a proteoglikánok közé, a további 6 vizsgált molekula pedig az enzimeket képviselte. A fentiekén kívül szintén meghatároztuk tumorspecifikus markerként a GFAP és a citokeratin-18,19 valamint proliferációs markerként a Ki67 mRNS expresszióját (7. táblázat, 2. ábra).

Gén	GBM – Met	
	fold change	p value
Brevikán	128,33	0,0290
Fibronectin	1,90	0,6860
Laminin alfa 1	4,11	0,1140
Laminin alfa 2	2,80	0,0570
Laminin alfa 4	2,77	0,1140
Laminin beta 1	2,90	0,0570
Laminin beta 2	1,10	0,8860
Laminin gamma 1	0,96	1,0000
Neuroglükán C	15,19	0,0250
Neurokán	21,36	0,0290
Perlekán	0,56	0,3430
Szindekán 1	0,07	0,0290
Szindekán 2	3,71	0,0290
Szindekán 4	0,14	0,0290
Tenaszcin C	5,77	0,0290
Tenaszcin R	10,43	0,1140
Verzikán	3,87	0,0290
Hilauronsav szintáz 1	1,09	0,8860
Hilauronsav szintáz 2	3,36	0,3430
Hilauronsav szintáz 3	2,28	0,2000
Mátrix metalloproteináz 2	4,67	0,0290
Mátrix metalloproteináz 8	0,57	0,6860
Mátrix metalloproteináz 9	1,85	0,6860
Citokeratin 18	0,0037	0,0290
Citokeratin 19	0,0006	0,0290
GFAP	19,52	0,0290
Ki-67	0,79	0,6860

7. táblázat. Huszonhárom, tumoros környezeti infiltrációban szerepet játszó ECM-komponens mRNS expressziós szintjének összehasonlítása glioblasztómában és tüdő adenokarcinoma agyi áttétében, tumor- és proliferációs markerekkel kiegészítve. (A szignifikáns különbségek vastag betűvel kiemelve.)



2. ábra. Huszonhárom, tumoros környezeti infiltrációban szerepet játszó ECM-komponens mRNA expressziós szintje glioblasztómában és tüdő adenokarcinoma agyi áttétében.

Eredmények a 2 fázisban

A tumormarkerek a megfelelő daganattípusra jellegzetesen minden minta esetében jelentős eltérést illetve specifikus mRNA-emelkedettséget mutattak, ami a minták eltérő szövettani típusát egyértelműen megerősítették. A Ki67 minden esetben egymáshoz hasonló magas értéket eredményezett, bizonyítva ezzel a minták magas proliferációs aktivitását és a szövetminta megfelelően sejtdús – és nem nekrotikus jellegét.

A két különböző eredetű daganatban mért mRNA expressziós értékek összehasonlítása során a glioblasztóma mintákban az adenokarcinoma áttétéhez képest szignifikánsan

magasabb szintet mértünk a brevikán, a neurokán, a neuroglikán-C, a szindekán-2, a tenaszcin-C, a verzikán, és az MMP-2 esetében.

A szindekán-1 és 4 mRNS expressziós szintje az áttéti daganatban bizonyult statisztikailag igazolhatóan magasabbnak.

A fibronectin, a perlekán, a szindekán-2, a laminin- α 1,2,4, β 1,2, γ 1, a hialuronan-szintáz 1,2,3, az MMP-8 és 9 mRNS szintjeinek esetében nem volt szignifikáns különbség a glioblasztóma és az áttéti daganat között.

3. fázis

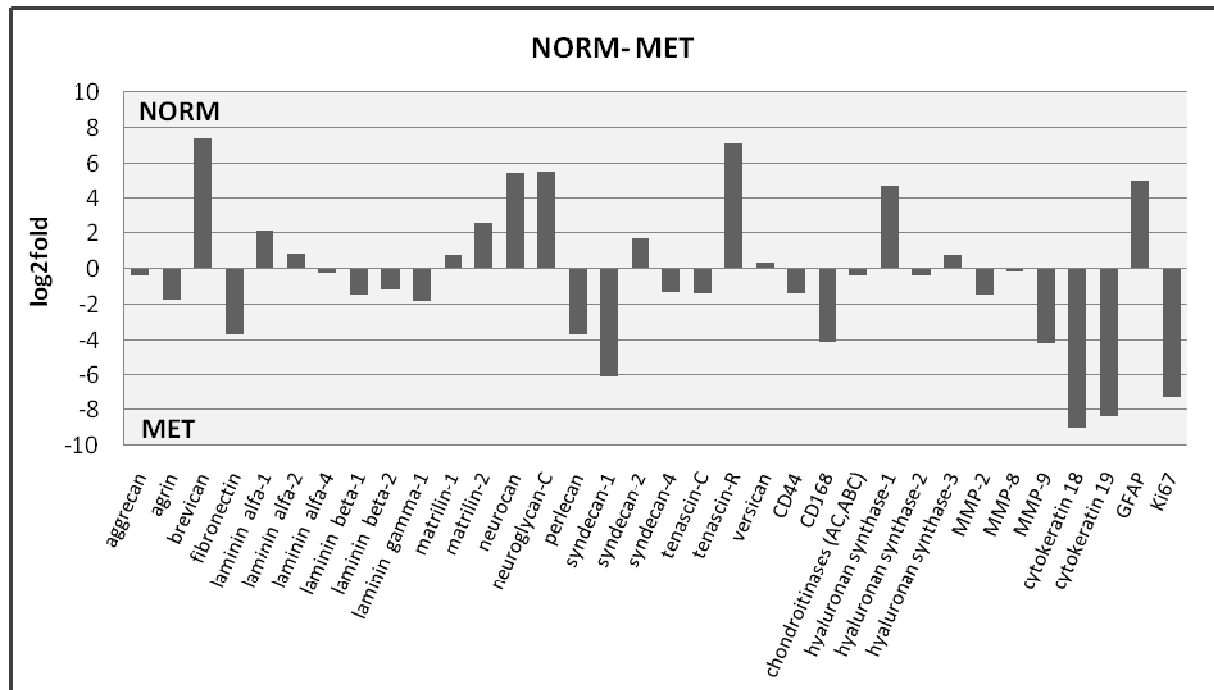
A harmadik fázisban harminc szövetmintát vizsgáltunk három különböző homogén szövetcsoportban: tizenegy GBM mintát, melyek a tumor által infiltrált marginális zónából származtak, további tíz mintát intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisból, kilencet pedig normál agyszövetből. A statisztikai analízis eredményeit a 34 molekula mRNS expresszió különbségei tekintetében a vizsgált mintacsoportok között a 8. táblázatban foglaltuk össze.

A tumormarkerek és a Ki67 proliferációs marker mRNS expressziója megerősítette a szövettani diagnózist. A vizsgált molekulák mRNS expresszióját a 3. ábrán jelenítettük meg.

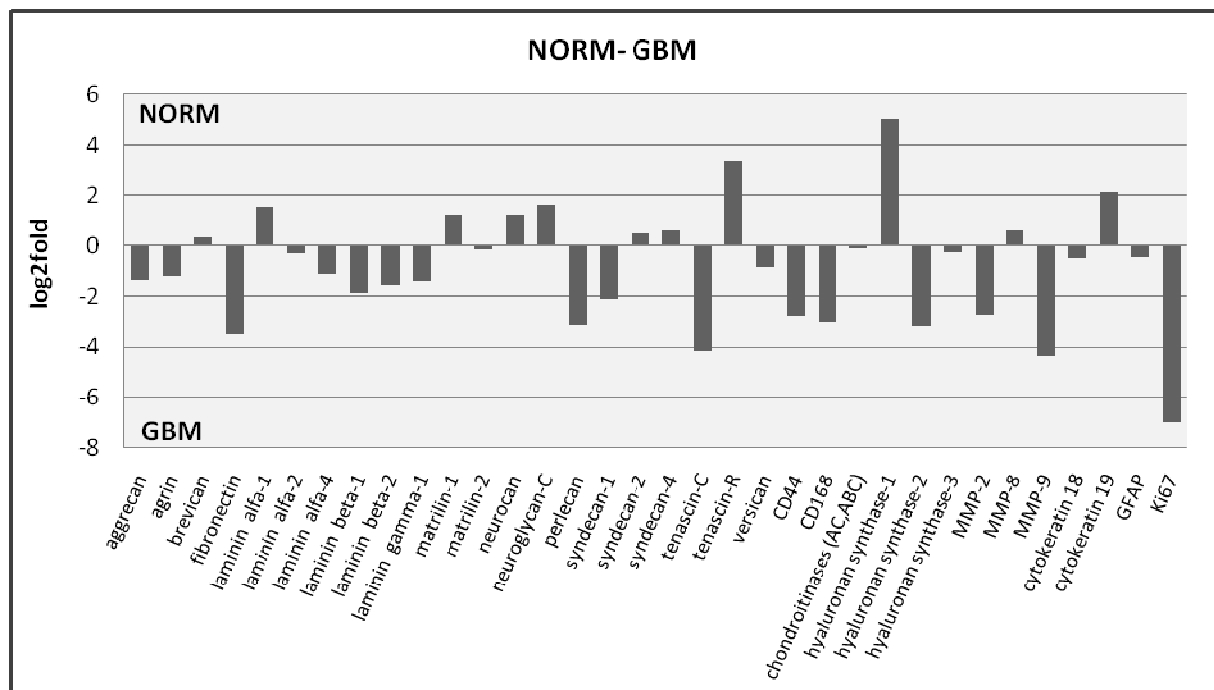
	Norm - Met		Norm - GBM		GBM – Met	
	<i>p value</i>	<i>fold change</i>	<i>p value</i>	<i>fold change</i>	<i>p value</i>	<i>fold change</i>
aggrekán	0,421	0,79	0,421	0,39	1,000	2,01
agrin	0,002	0,30	0,012	0,44	0,218	0,67
brevikán	<0,001	172,46	0,820	1,27	<0,001	135,66
fibronectin	<0,001	0,08	<0,001	0,09	0,916	0,87
laminin alfa-1	0,032	4,55	0,548	2,98	0,421	1,53
laminin alfa-2	0,310	1,84	0,841	0,82	0,222	2,24
laminin alfa-4	0,713	0,85	0,023	0,47	0,098	1,79
laminin beta-1	0,020	0,36	0,001	0,27	0,379	1,33
laminin beta-2	0,020	0,44	0,005	0,34	0,130	1,29
laminin gamma-1	0,016	0,29	0,222	0,38	1,000	0,76
matrilin-1	0,548	1,69	0,310	2,34	1,000	0,72
matrilin-2	0,002	6,07	0,761	0,90	<0,001	6,72
neurokán	<0,001	44,76	0,095	2,29	0,001	19,50
neuroglükán-C	<0,001	46,94	0,058	3,15	<0,001	14,89
perlekán	<0,001	0,08	<0,001	0,12	0,342	0,70
szindekán-1	<0,001	0,01	0,008	0,23	<0,001	0,06
szindekán-2	0,008	3,27	1,000	1,44	0,151	2,27
szindekán-4	0,020	0,41	0,048	1,53	0,008	0,27
tenascin-C	0,348	0,40	0,006	0,06	0,007	6,91
tenascin-R	<0,001	136,10	<0,001	10,53	0,018	12,92
verzikán	0,596	1,27	0,289	0,56	0,307	2,29
CD44	0,094	0,39	0,003	0,15	0,012	2,70
CD168	<0,001	0,06	<0,001	0,12	0,053	0,46
kondroitinases (AC,ABC)	0,222	0,77	0,841	0,95	0,690	0,81
hialuronan synthase-1	<0,001	26,98	<0,001	33,55	0,504	0,80
hialuronan synthase-2	0,838	0,77	0,002	0,11	0,003	6,84
hialuronan synthase-3	0,421	1,75	0,690	0,83	0,222	2,10
MMP-2	0,131	0,37	0,004	0,15	0,032	3,08
MMP-8	1,000	0,89	0,857	1,50	0,310	0,60
MMP-9	0,001	0,06	<0,001	0,05	0,805	1,11
citokeratin 18	0,008	0,002	0,310	0,72	0,008	0,003
citokeratin 19	0,008	0,003	0,151	4,49	0,008	0,001
GFAP	0,016	33,31	0,548	0,73	0,008	45,61
Ki67	0,008	0,01	0,008	0,01	0,548	0,82

8. táblázat. Jelentős különbségek (vastagon szedve) a 30, ivázióval összefüggésbe hozható molekula és a 4 tumormarker mRNS expressziója között glioblasztómában (GBM), tüdő adenokarcinoma agyi metastaisában (Met) és a normál agyszövetben (norm).

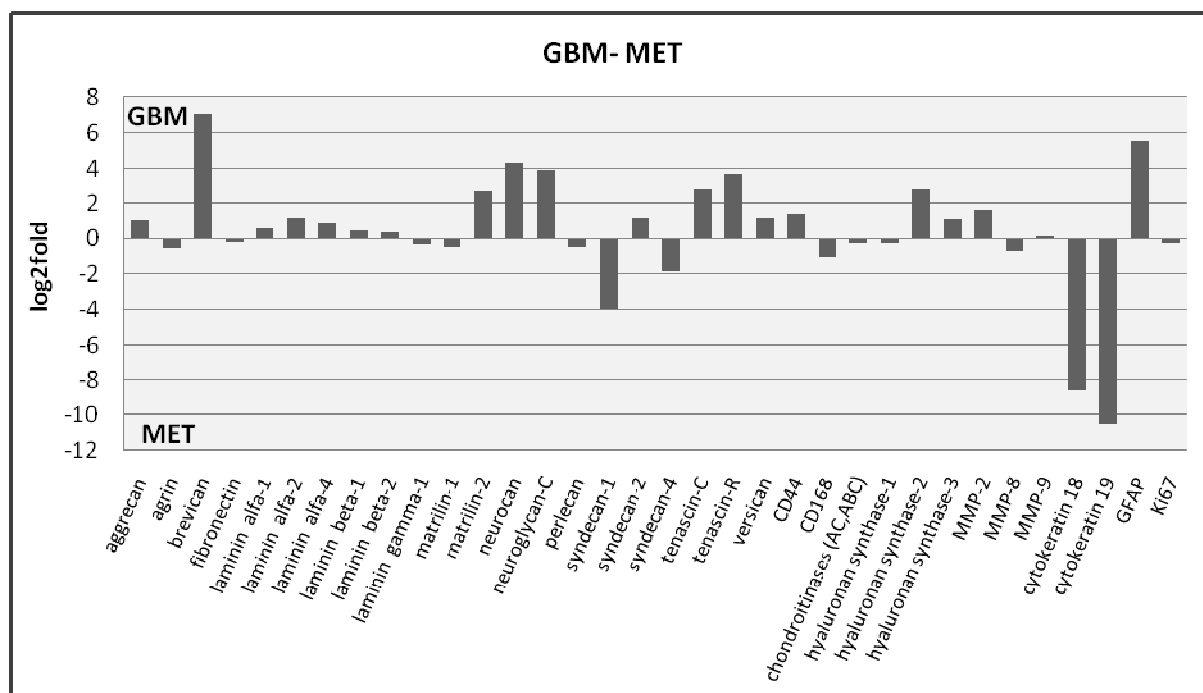
A.



B.



C.



3. ábra. 30, az invázióval összefüggébe hozható molekula, tumormarker és a Ki67 proliferációs marker glioblasztómában (GBM), tüdő adenokarcinoma agyi metasztázisában (Met) és normál agyszövetben (Norm). Összefüggés az egyes molekulák mRNS expressziója (fold change) normál agyszövet és metasztázis esetében (A); normál agyszövet és GBM esetében (B); GBM és áttét esetében (C).

Eredmények a 3. fázisban

A) GBM versus normál agyszövet

Az agrin, fibronectin, laminin α 4, β -1 and β -2, perlekán, szindekán-1, tenaszcin-C, CD44, CD168, HAS-2, MMP-2 and -9 mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett volt GBM-ban összehasonlítva a normál agyszövettel, miközben a szindekán-4, tenaszcin-R and HAS-1 mRNS expressziója statisztikailag alacsonyabb volt GBM-ban. Az aggrekán, brevikan, laminin α -1, -2, laminin β -1, laminin γ -1, matrilin-1 and -2, neurokán, neuroglíkan, szindekán-2, verzikan, kondroitinases, HAS-3, and MMP-8 mRNS szintjei nem különböztek lényegesen a normál agyszövetben és GBM-ban.

B) Intracerebrális tüdőeredetű adenokarcinoma metasztázisok és normál agyszövet

Jelentősen csökkent mRNS expressziót mértünk brevikán, laminin α -1, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C, szindekán-2, tenascin-R, and HAS-1 esetében a tüdő adenokarcinoma metasztázisban a normál agyszövettel összevetve. Ezzel szemben az agrin, fibronectin, laminin β -1, β -2 and γ -1, perlekán, szindekán-1 and -4, CD168 and MMP-9 mRNS szintje statisztikailag magasabb volt a metasztatikus tumorban, a normál agyszövethez viszonyítva. Nem volt látható különbség az aggregán, laminin α -2, -4, matrilin-1, tenascin-C, verzikán, CD44, kondroitinases, HAS-2, -3, MMP-2 and -8 mRNS szintjét tekintve a ké szövettípus között.

C) GBM és tüdő adenokarcinoma metasztázis

A különböző eredetű anaplasztikus tumorokat összehasonlítva, az mRNS expresszió brevikán, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C, tenascin-C és R, CD44, HAS-2 és MMP-2 esetében jelentősen magasabb volt GBM-ben mint tüdő adenokarcinoma metasztázisban. A szindekán-1 és szindekán-4 transzkriptumai lényegesen emelkedtek az adenokarcinoma agyi áttétje esetében. Nem észleltünk statisztikailag jelentős különbségeket agrin, aggregán, fibronectin, laminin α -1,-2 or -4, laminin β -1, -2, laminin γ -1, matrilin-1, perlekán, szindekán-2, verzikán, CD168, kondroitinase, HAS-1 és -3, vagy MMP-8, és -9 esetében.

4. fázis

A negyedik lépésben elvégzett mérések során 3 különböző eredetű és dignitású tumor eredményeit hasonlítottuk össze egymással és a peritumorális agyszövet eredményeivel (9. táblázat).

Eredmények a 4. fázisban

Összehasonlítva a génexpressziót NSCLC agyi áttétjében és a grade II asztrocitomában a kadherin-3, kollagen type I, III és IV, fibronectin, perlekán, szindekán-1 and -4 és a MMP-9 expressziója volt jelentősen magasabb a metasztázisban. Ezzel szemben, a brevikán, kadherin-2, laminin alpha-4 and beta-2, matrillin-2, neurokán, szindekán-3, tenascín-C and -R, verzikán, HAS-2, and MMP-2 szintjeit az asztrocitomában találtuk magasabbnak.

Az NSCLC agyi áttétjeiben magasabb mRNS szinteket találtunk kadherin-3, neurokán, szindekán-1 és MMP-9 tekintetében, összevetve a schwannomával, míg a schwannomában magasabb volt a kadherin-2, kollagen IV és VIII, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2, matrillin-2, neuroglükán-C, perlekán, szindekán-3, HAS-2 és MMP-2 szintje.

Összehasonlítva a schwannoma és az asztrocitoma mintákat, a kollagen alpha -1, kollagen III, IV és VIII, fibronectin, perlekán, matrillin-2, szindekán-4, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2 magasabbnak találtatott schwannomában, míg a brevikán, neuroglükán-C, tenascín-C és -R, neurokán és verzikán inkább az asztrocitomában expresszáldott.

Az asztrocitoma minták és a normál agyszövetből valók összehasonlítása feltárta, hogy az agrin, brevikán, kadherin-2, kollagen type I, III and IV, fibronectin-1, laminin alpha-4 és beta-2, matrillin-2, neurokán, perlekán, szindekán-3, tenascín-C, verzikán, HAS-2, és MMP-2 és -9 mRNS szintjei jelentősen magasabbak voltak az asztrocitoma mintákban. Ezzel ellentétben a szindekán-4 és a HAS-1 mRNA szintjei a normál agyszövetben bizonyultak magasabbnak.

A schwannoma mintákban az agrin, a kollagen I, III IV és VIII típusok, a fibronectin, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2, matrillin-2, perlekán, szindekán-3 és -4, HAS-2 és MMP-2 mRNS értékeit mérték magasabbnak a normál agyszövethez viszonyítva, míg a normál agyból

vett mintákban a brevikán, neurokán, neuroglikán-C and tenascín-R mRNS-ének magasabb értékeit mérték.

Az agrin, kadherin-3, a kollagen I, III, IV és VIII típusok, a fibronectin, a laminin beta-1 és beta-2, perlekán, szindekán-1 és -4, valamint a MMP-9 mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztázisokban, mint a normál agyszövetben. Ezzel ellentétben a brevikán, kadherin-2, neurokán, neuroglikán-C, matrillin-2, szindekán-3, tenascín-R és a HAS-1 sokkal alacsonyabb volt a metasztázisokban, mint a normál agyszövetben.

	FC NRM/ MET	P	FC MET/ AII	P	FC MET/ SCH	P	FC NRM/ AII	P	FC SCH/ AII	P	FC NRM/S CH	P
agrin	0.31	0.002	0.88	0.462	0.99	0.790	0.27	0,001	0.89	0.564	0.30	0.009
brevikán	20.32	<.001	0.01	<.001	13.48	0.534	0.13	0,019	0.001	0.001	273.94	0.001
kadherin-2	6.29	0.001	0.10	<.001	0.10	0.001	0.60	0,038	0.99	0.773	0.61	0.386
kadherin-3	0.12	0.041	7.50	0.027	5.05	0.021	0.91	0,757	1.48	0.290	0.61	0.564
kollagen type I alpha-1	0.02	<.001	4.24	0.011	0.76	0.374	0.08	0,019	5.60	0.004	0.01	0.001
kollagen type III alpha-1	0.01	<.001	3.18	0.014	0.45	0.110	0.04	0,004	7.02	0.004	0.01	0.001
kollagen type IV alpha-1	0.15	0.001	2.41	0.027	0.24	0.001	0.36	0,019	10.14	0.001	0.04	0.001
kollagen type VIII alpha-1	0.18	0.007	1.54	0.142	0.14	0.013	0.28	0,402	11.35	0.007	0.02	0.001
neuroglikán-C	32.84	<.001	0.02	<.001	0.28	0.006	0.75	0.402	0.08	0.001	9.31	0.001
fibronektin	0.07	<.001	5.10	0.011	1.21	0.859	0.34	0.019	4.21	0.001	0.08	0.001
hialuronan-synthase-1	22.12	<.001	1.23	0.462	0.18	0.165	27.18	<.001	6.97	0.439	3.90	0.440
hialuronan-synthase-2	0.33	0.806	0.45	0.003	0.67	0.016	0.15	0.002	0.68	0.149	0.22	0.005
perlekán	0.10	<.001	2.63	0.004	0.06	<.001	0.26	0.002	45.58	0.001	0.01	0.001
laminin alpha-4	0.76	0.683	0.36	0.009	0.07	<.001	0.27	0.004	5.34	0.001	0.05	0.001
laminin beta-1	0.32	0.018	1.09	0.744	0.06	<.001	0.35	0.102	19.21	0.001	0.02	0.001
laminin beta-2	0.50	0.018	0.59	0.022	0.16	<.001	0.29	0.001	3.68	0.001	0.08	0.001
matrillin-2	4.31	0.001	0.08	<.001	0.01	<.001	0.36	0.003	7.05	0.001	0.05	0.001
matrix-metalloproteinase-2	0.58	0.121	0.47	0.041	0.12	0.003	0.27	0.004	4.04	0.054	0.07	0.003
matrix-metalloproteinase-9	0.09	0.001	6.68	0.002	12.30	0.004	0.58	0.965	0.54	0.501	1.08	0.630
neurokán	17.89	<.001	0.03	<.001	24.99	0.010	0.59	0.038	0.00	0.001	447.06	0.001
szindekán-1	0.02	<.001	80.73	<.001	40.51	<.001	1.35	0.627	1.99	0.923	0.68	0.773
szindekán-3	2.16	0.018	0.19	0.001	0.12	0.001	0.41	0.009	1.62	0.630	0.25	0.004
szindekán-4	0.33	0.018	5.32	0.001	1.36	0.859	1.78	0.047	3.91	0.001	0.45	0.004
tenaszcin-C	2.11	0.327	0.27	0.006	3.00	0.155	0.57	0.005	0.09	0.001	6.35	0.847
tenaszcin-R	12.16	<.001	0.04	<.001	59.44	0.159	0.48	0.233	0.00	0.001	723.00	0.001
verzikán	1.67	0.568	0.11	0.027	0.51	0.534	0.18	0.024	0.22	0.027	0.84	0.564

9. táblázat. 26, az invázióval összefüggő ECM molekula mRNS szintjének összehasonlítása normál agyszövetben (NRM), NSCLC központi idegrendszeri metasztázisában (MET), grade II asztrocitomában és schwannomában (SCH). (FC = fold change, P = p value).

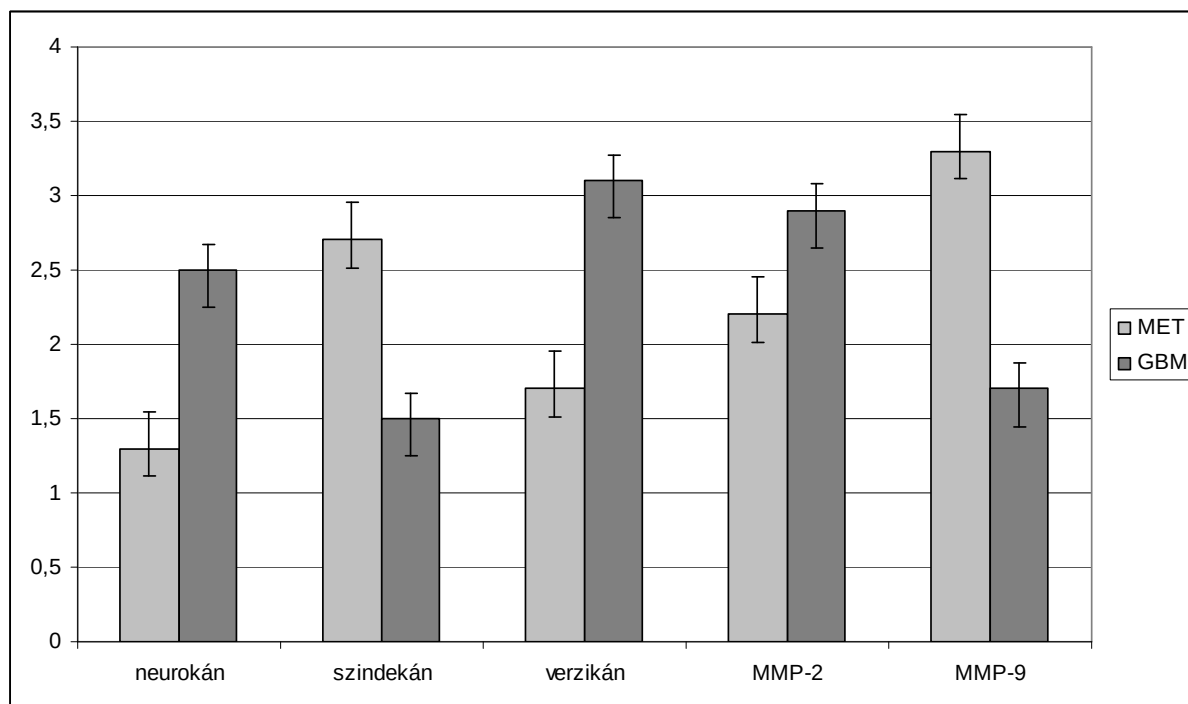
4.2. Immunhisztokémiai eredmények

1. fázis

Az első fázisban nem végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat.

2. fázis

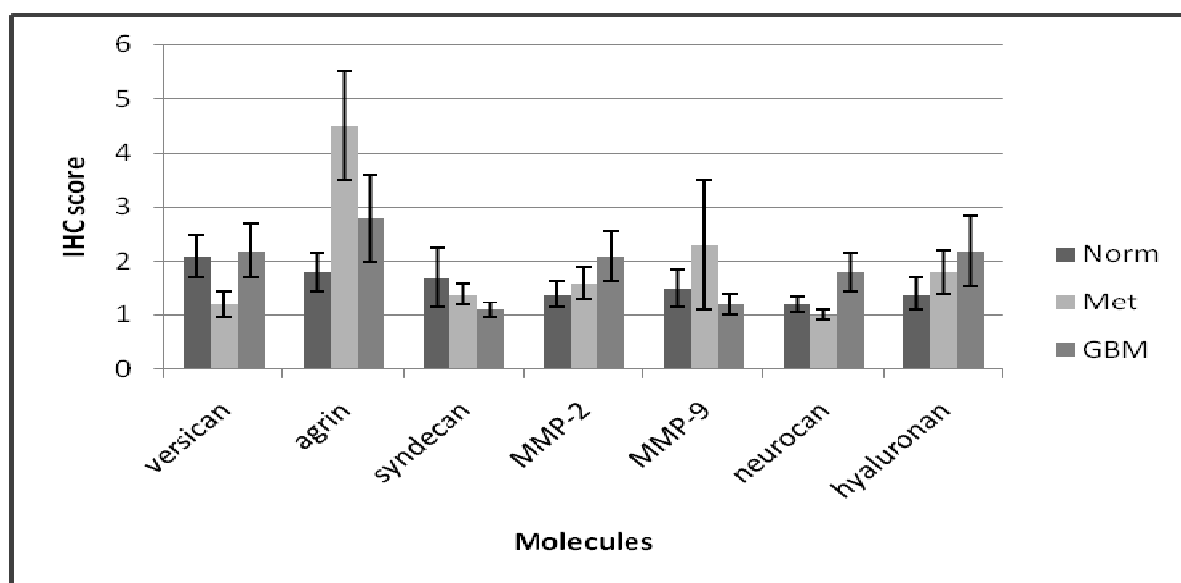
Öt molekula esetében (neurokán, verzikán, szindekán mátrix-metalloproteináz-2 és 9) vizsgáltuk az immunhisztokémiai reakció intenzitását. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a neurokán, a verzikán és a MMP-2 esetében a glioblasztómában az áttéti daganathoz képest egyértelműen magasabb értékeket állapítottunk meg. A szindekán és az MMP-9 az adenokarcinomában mutatott intenzívebb festődési reakciót (4. ábra).



4. ábra. Immunhisztokémiai reakciók szemi-kvantitatív eredménye glioblasztómában és tüdő adenokarcinoma agyi áttétében. Minden metszeten három különböző területen 0-4-ig osztályoztuk a festődési intenzitást, majd eredményeinket átlagolva jutottunk a végleges értékekhez.

3. fázis

A harmadik fázisban glioblasztóma, adenokarcinoma áttét és peritumorális agyszövetmintákon végeztünk immunhisztokémiai festést és összehasonlító elemzést 7 molekulára vonatkozóan: agrin, hialuronan, neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 és 9. Az immunhisztokémiai és HA hisztokémiai reakciókat a 5. ábrán foglaltuk össze. A morfológiai értékelésnek megfelelően az immunreaktivitás a legkifejezettebb az agrin, neurokán, szindekán, és verzikán esetében a sejtmembránon és az extracellularis térben volt, míg a MMP-k erős immunoreaktivitást mutattak a sejtmembránon és intracellularisan. A legerősebb immunfestődés az agrin, szindekán és MMP-9 esetében a tüdő adenokarcinoma metasztázisban volt megfigyelhető, míg a MMP-2, neurokán és hialuronan a legmagasabb értékeket GBM mintákban mutatta. A tumor markerek és a Ki-67 festődési intenzitása megfelelt a kórszövettani diagnózisnak.



5. ábra. A négy PG két MMP hialuronsav glioblasztómában (GBM) intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisban (Met) és normál agyszövetben (Norm). A reakciókat 1-5-ig felállított score szerint három különböző régióban határoztuk meg. Az egyes régiókból nyert score-okat aztán összegeztük általános összehasonlítás céljából.

4. fázis

A vizsgálatunk utolsó fázisában 4 különböző szövettani csoportban (asztrocitoma grade II, adenokarcinoma agyi áttéte, schwannoma és peritumorális agyszövet) végeztünk IHC festést 4 molekula esetében: brevikán, neurokán, tenaszcin-C és verzikán.

A brevikán, neurokán, tenaszcin-C és a verzikán immunreaktivitása a legintenzívebb volt a sejtmembránon és az extracelluláris térben. A legintenzívebb festődést minden molekula esetében az asztrocitoma szövetekben észlelték. A normál agyszövetben kevésbé kifejezett immunfestődést találtak neurokán, tenaszcin-C és verzikán esetében, a schwannoma minták pedig gyengébb immunfestődést mutattak brevikán és neurokán tekintetében. A metasztatikus szövetek mutatták a leghalványabb immunfestődést verzikánra. A tenaszcin-C festődés nagyon gyenge volt mind a schwannomában, mind NSCLC-ben. A tumormarkerek és a Ki-67 festődési intenzitása összhangban állt a hisztológiai diagózissal.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az ECM szerepe daganatokban, különös tekintettel a tüdőrákra.

Több próbálkozás történt már azzal a céllal, hogy a daganatok egyes tulajdonságait az ECM összetételével, annak váltoásaival összefüggésbe hozzák. Néhány ECM összetevőnek az invazivitással kapcsolatos szerepéről már születtek megfigyelések (10. táblázat).

AGRIN	BREVIKÁN	KADHERIN-2	KADHERIN-3	FIBRONEKTIN	MATRILIN-2
NEUROKÁN	NEUROGLIKÁN-C	PERLEKÁN	SZINDEKÁN-1	SZINDEKÁN-3	SZINDEKÁN-4
TENASZCIN-C	TENASZCIN-R	VERZIKÁN	KOLLAGEN-I.	KOLLAGEN-III.	KOLLAGEN-IV.
KOLLAGEN-VIII.	MATRIX METALLO- PROTEINASE-2 (MMP-2)	MMP-9	HIALURONAN SYNTHETASE-1 (HAS-1)	HAS-2	LAMININ- ALPHA4
LAMININ-BETA2	LAMININ-BETA1				

10. táblázat. ECM molekulák, melyekről már leírták, hogy szerepet játszhatnak az invazivitás folyamatában (42).

Nincs biztos végleges következtetés abban a tekintetben, hogy mely ECM összetevők pontosan milyen módon felelősek a tumorok invazivitásáért (az általunk vizsgált tumorok közül ez döntően az asztrocitoma esetében fontos), illetve mely molekulák hozhatók összefüggésbe a keringő daganatsejt megtapadásával egy adott területen (ami a tüdőrák áttétek kialakulása szempontjából fontos). Nyilvánvaló, hogy a keringő tumorsejt helyszínen termelt, esetleg magával vitt ECM komponensei kapcsolatba lépnek a befogadó szövet extracellularis matrixával, s ott dől el, hogy a „vándor” tumorsejt képes lesz-e a megtapadásra, s ha igen, képes lesz-e ugyanott a migrálásra, majd később a kolonizációra? Az

általunk vizsgált két malignus tumortípus ebből a szempontból két végpontot képvisel: az asztrocitoma metasztatizál nem ad, de rendkívüli invazivitásával hívja fel magára a figyelmet, a pulmonális adenokarcinoma pedig könnyen, gyorsan metasztatizál – nemcsak az agyba, de oda különösen gyakran – ellenben a metasztatizálás helyén az agyállományban csak csekély inváziós készséget mutat, eltérve ebben nem csupán az asztrocitomától, de a primer adenokarcinomától is. Mindezen jelenségek okait jelentős részben az ECM szerkezete és működése rejtheti.

A tumor-eltávolítás kiterjedése határozza meg az onkoterápia hatékonyságát. Ez különösen igaz a primer agytumorokra, ahol a peritumorális invázió rendszerint lehetetlenné teszi a radikális reszekciót. A peritumorális infiltrációt nemcsak a malignus gliomákban, hanem az alacsony grádusú tumorokban, így a II. grádusú asztrocitomákban is megfigyelték (43, 44). Ezzel szemben a NSCLC agyi metasztatizálai csak mérsékelten invazívak, így a radikális kiirtásuk általában rutin idegsebészeti beavatkozás (45, 46, 47).

A különböző tumorok minden egyes ECM alkotója megtalálható az irodalomban, de a molekulák széles spektrumának egyidejű elemzése egyetlen jellemző jelenség alapján, mint az agytumorok invazivitása, eddig még nem látott napvilágot. A tanulmány célja elsősorban a különböző eredetű agytumorok invázióval összefüggésbe hozható molekulái expressziós mintázatának meghatározása és összehasonlítása volt. Másodsorban pedig azonosítani kívántuk azokat a molekulákat, amelyek elsődlegesen felelősek a grade II asztrocitoma peritumorális invazivitásáért. Mivel a tumorinvázió nagyban függ a meglehetősen nagyszámú ECM komponens és a tumorsejtek közötti interakcióktól, megvizsgáltuk egy kiválasztott 96 tagú ECM-alkotó csoport molekuláit, melyekről korábban már igazolódott, hogy aktívan részt vesznek a peritumorális infiltrációban. Az előzetes mérések során ezekből a molekulákból

célzott vizsgálatokkal az intrakraniális daganatokra jellemző molekulák körét, az un. **inváziós panelt** határoztuk meg (1. fázis), és további mRNS expressziós méréseinkhez a különböző daganatok összehasonlításakor már ennek a panelnek a tagjait vizsgáltuk.

5.2. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában és glioblasztómában

A tüdőkarcinoma agyi áttétei és a glioblasztóma összehasonlításakor (2-3. fázis) összesen 30 ECM-komponens génexpresszióját határoztuk meg, hogy az eltérő invazivitás molekuláris hátteréhez közelebb kerüljünk. 21 ECM komponens, hét proteáz, a hialuronsav membrán-receptor (CD44) és a CD168 esetében végeztünk kvantitatív RT-PCR-t. Az mRNS analízis eredményei alapján a fentiek közül hét molekula (agrin, neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 MMP-9 és a hialuronsav) immunhisztokémiai festődését is vizsgáltuk.

Korábbi tanulmányok pozitív korrelációt írtak le a glioma inváziós készsége és a brevikan (48, 49), a fibronectin (50, 51) a laminin (52, 53) a szindekán (54), a tenascin-C (55, 56), a verzikán (57), az MMP-9 (58, 59), a hialuronsav (60) és a CD44 (61, 62, 63) expressziója között. A mi méréseink az irodalomban közölt eredményeket részben megerősítették, részben kiegészítették, amennyiben jelentős különbséget észleltünk a normál agy és a GBM között a fibronectin, laminin β -1, perlekán, szindekán-1, -4, tenascin-C, -R, CD44, CD168, HAS-1, -2, és MMP-2 és -9 mRNS profilja tekintetében.

Nincs kielégítő adat az irodalomban asztrocitómák esetében az aggregánról, matrilinről, perlekánról, neuroglükán-C-ről, neurokánról, CD168-ról vagy a kondroitinázról. Megfigyelésünk szerint azonban a CD-168 és a perlekán mRNS expressziója szignifikánsan magasabb a glioblasztómában a normál agyszövethez képest, míg a többi tekintetében nem volt nyilvánvaló különbség a kettő között.

ECM komponenseket és invázióval összefüggő molekulákat vizsgálták már nem-kissejtes hörgőrák néhány esetében is. A bronchialis adenokarcinómában a hialuronsav (64), fibronectin (65, 66), laminin (67, 68), verzikán (69), MMP-9 (70) és a CD44 (71) szignifikánsan magasabb expresszióját észlelték, míg a perlekán, tenascin-C és a szindekán nem korrelált a tumornövekedéssel (72, 73, 74). Nincs olyan adat sem, mely egyértelmű összefüggést mutatna az agrin, brevikan, matrilin, neuroglikan-C, neurokan, CD168, kondroitináz, HAS és a tüdő eredetű adenokarcinoma viselkedése között. Saját méréseink során összehasonlítva az intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisokat a normál agyszövettel, a vizsgált 30 molekula közül 18 esetében jelentős különbségeket észleltünk. Néhány molekula az eredeti szövetre jellemző (pl. a brevikan, neurokan, a neuroglikan C az agyszövetmintákban), míg mások valószínűleg a peritumorális invázióban játszanak fontos szerepet (fibronectin, szindekán-1, 4, CD-168 és MMP-9). Az agrin, laminin β -1, β -2, γ -1 és a perlekán intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisban megnövekedett expressziójának magyarázatához még további kutatásokra van szükség.

Eredményeink szerint 11 molekula mRNS expressziója szignifikánsan különbözött a GBM és az adenokarcinoma metasztázisok között. Mivel a brevikan, matrilin-2, neurokan, neuroglikan-C és a tenascin-R magasabb mRNS expressziót mutatott mind a normál agyszövetben, mind pedig a GBM-ban a metasztatikus tumorokhoz viszonyítva, ezeket a molekulákat a gliaszövetre specifikus molekuláknak tekinthetjük. Másrészt a tenascin-C, CD44, HAS-1 és a MMP-2 mRNS expressziója a metasztázishoz hasonlítva csak a GBM-ban volt emelkedett. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy az előbbi, GBM-ben és normál agyszövetben egyaránt magasabb szintet mutató molekulák a primer agydaganat és a peritumorális agyállomány nagyfokú hasonlóságát eredményezi, így a GBM tumorsejtjei "otthonosan érezve" magukat a környező agyállományban, azt mélyen infiltrálni képesek. A többi szövetmintához képest a GBM-ben észlelt magasabb expressziót mutató molekulák

pedig valószínűleg a tumor inváziójához szükséges és azt előmozdító komponensként szerepelnek.

Végül méréseink szerint a tüdő adenokarcinoma agyi metasztázisában magas volt a szindekán-1 és -4 expressziója, de ez úgy látszik, az “idegen” környezetben elégtelennek bizonyul a peritumorális agyszövetbe történő invázióhoz. Ebből az a következtetés szűrhető le, hogy a szindekán-1 és -4 intracerebrális peritumorális invázióban jelentős szerepet valószínűleg nem játszik.

Az mRNS expresszió és az immunhisztokémiai eredmények összehasonlítása

Az mRNS-expressziós eredmények poszt-transzlációs szintű manifestálódásának meghatározásához valamint morfológiai információnyerés céljából immunhisztokémiai analízist végeztünk hét molekula esetében (agrin, neurokán, szindekán, verzikán, matrix metalloproteináz 2 [MMP-2], MMP-9, és hialuronsav).

A három szövetminta-csoport immunfestődési intenzitásában meglévő különbségek jól korreláltak a verzikán, agrin, szindekán és a MMP-2 mRNS-expressziójában észlelt eltérésekkel. Az immunhisztokémiai analízis során az agrin, a szindekán és a MMP-9 predominánsnak bizonyult a hörgő eredetű adenokarcinomában, míg a MMP-2, a neurokán és a hialuronsav a legerősebb immunfestődést a GBM-ban mutatta.

Érdekességképpen, a legerősebb agrin festődési intenzitást és mRNS expressziót a metasztázis csoportban mértük. Az agrin fontos komponense a vér-agy-gátnak (75, 76) de jelentőségét és szerepét a az intracerebrális tüdő adenokarcinoma metasztázisokban még nem tisztázták.

Az MMP-9 a legerősebb immunfestődési intenzitást a tüdő adenokarcinoma metasztázisaiban mutatta, de a legerősebb mRNS expressziót a GBM csoportban mértük. Bár a legmagasabb neurokán mRNS-expressziót normál agyszövetben találtuk, de az

immunhisztokémia a tumorokban mutatott kissé emelkedett festődési intenzitást. Ezek az eltérések valószínűleg poszt-transzkripciós eseményekhez köthetők és pontos tisztázásukhoz további vizsgálatok szükségesek.

A hialuronsav leginkább GBM-ban volt jelen. Mivel receptorának, a CD44-nek ugyancsak magasabb mRNS expresszióját mértük, általános szerepük az invázió folyamatában megerősíthető.

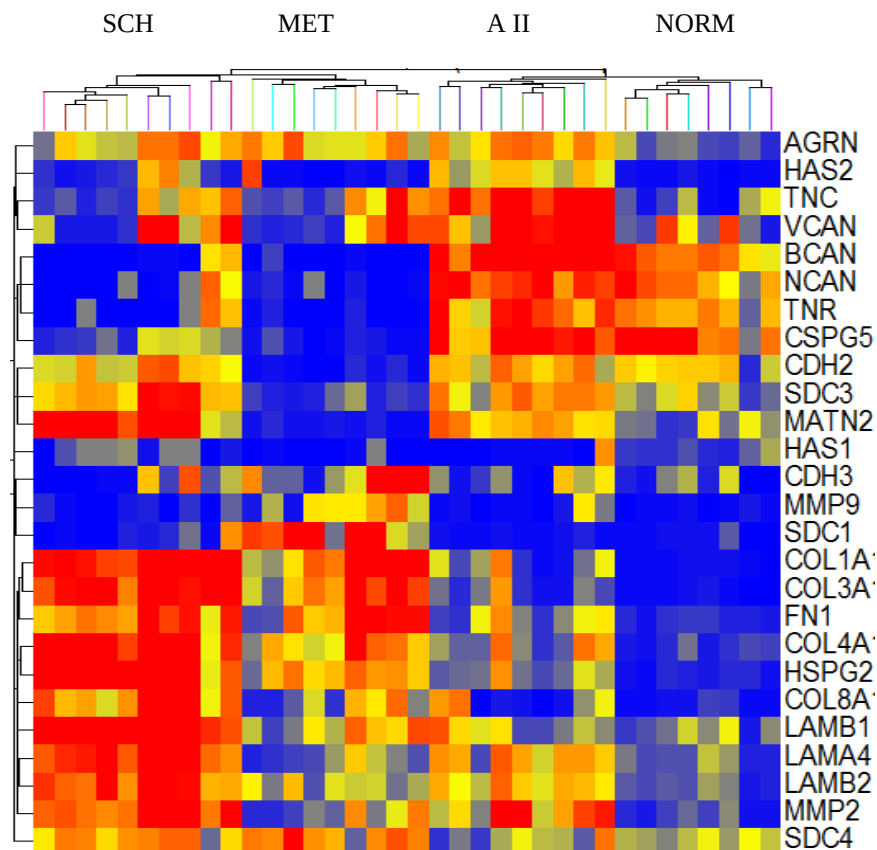
Konklúziók a 2. és 3. fázisban elvégzett mérések alapján (metasztázis versus glioblasztóma)

A 30 invázióval összefüggő molekula mRNS expressziójának GBM-ben, normál agyszövetben és intracerebrális adenokarcinoma metastázisban történő összehasonlításával sikerült néhány olyan molekulát azonosítani, melyek valószínűleg részt vesznek a GBM extrém magas inváziós aktivitásában. Vizsgálataink szerint a tenascin-C, CD44, és MMP-2 látszanak a leginkább érintettek a GBM peritumorális infiltrációjában, de a fibronectin és a szindekánok korábbi közleményekben felvetett pozitív szerepét a különböző infiltrációs aktivitás tekintetében nem tudtuk megerősíteni. Az eddig közölt adatokhoz további új eredményként hozzájárulva a brevikán, neurokán, neuroglükán-C és a matrilin-2 glioblasztómák invazívitásában betöltött lehetséges szerepét tudtuk igazolni.

5.3. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metastázisában, alacsony grádusú asztrocitómában és schwannomában

A 4. fázisban az inváziós panel génexpresszióját infiltratív szemibenignus grade II asztrocitoma, non-infiltratív és benignus schwannoma és a non-infiltratív, de malignus nem kissejtes tüdőkarinoma (NSCLC) agyi metastázisából származó szövetmintákon vizsgáltuk. A 26 invázióval összefüggő molekula mRNS expressziójának meghatározásával az egyes

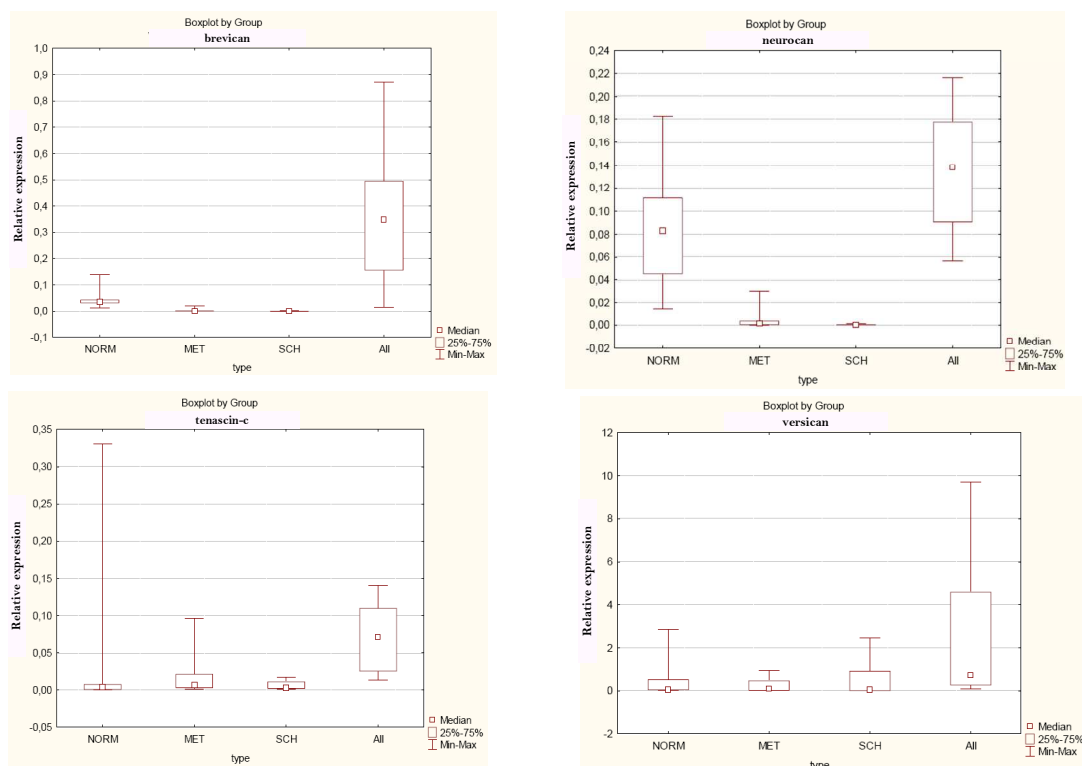
csoportokra jellemző expressziós mintázatot sikerült alkotni. Cluster analízis útján vizsgáltuk ezekenél a molekuláknál az expressziós mintázatban bekövetkezett változások jellemző voltát (6. ábra). E statisztikai teszt által világosan kimutatható, hogy minden egyes szövetszoportnak megvan a maga jellegzetes inváziós molekula mintázata (**inváziós spektrum**), ami arra utal, hogy ennek a 26 molekulának az mRNS expressziós mintázata az illető tumorszövetre erősen jellemző. A brevikán, neurokán, neuroglukán, tenaszcin, verzikán és a MMP-2 a normal agyszövetre és a grade II asztrocitomára voltak jellemzőek, míg a schwannoma és az adenokarcinoma extracelluláris mátrixa döntően kollagéneket, fibronektint, szindekánokat, laminineket és kadherineket tartalmazott. Ezek a jellegzetes inváziós spektrumok jelentős mennyiségű kötőszövetes állományra utalnak a schwannomában és a metasztázisban, míg a gliomás szövetekben a saját jellemző GAG-ok és proteoglikánok jelennek meg. A meglepően nagyfokú hasonlóság a grade II asztrocitoma és a normál agy között magyarázatul szolgál a glioma sejtek környező agyszövetbe történő kiterjedt migrációjára. Ugyanakkor a jelentős különbség az adenokarcinoma és a normál agy inváziós spektruma között segít megérteni a csökkent peritumorális infiltrációt a metasztázis esetében.



6.ábra. Hierarchikus klaszterezés komplett kapcsoltsági elemzéssel Pearson korrelációt alkalmazva az mRNS expressziós mintázat specificitásának tesztelésére 26 invázióval összefüggő ECM molekula esetén normál agyszövetből (NORM), II-es grádusú asztrocitómából (A II), intracerebrális adenokarcinoma metasztázisból (MET) és schwannomából (SCH) származó mintáknál. A kék-sárga-piros színek a génexpresszió fokozódását jelzik.

Azon célból, hogy azonosítsuk a molekulákat, amelyek a grade II asztrocitoma invazivitásáért leginkább felelősek lehetnek, a génexpressziós eredményeket összehasonlítottuk a többi, nem-invazív tumoréval és a normál agyszövettel. Az asztrocitoma mintákat először a metasztázis mintákkal vetettük össze, melynek során azonosítottunk 13 molekulát, amelyek expressziója jelentősen magasabb volt az asztrocitómában (9. táblázat). Ennek a 13 molekulának az mRNS expressziós szintjét a nem-invazív schwannoma mintákkal egybevetve 8 olyan molekulát találtunk, melyek expressziója schwannomában is emelkedett volt a metasztázishoz képest (kadherin-2, neuroglükán-C, laminin alfa-4, laminin béta -2,

matrillin -2, szindekán -3, HAS-2 és MMP-2). Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy mivel a schwannoma egyáltalán nem mutat invazív tulajdonságokat, ezért ezeknek a molekuláknak a magas expressziója nem jár feltétlenül fokozott invazivitással. Az is igazolódott, hogy ennek a 8 molekulának az expressziója a metasztázisban és a schwannomában is jelentősen különbözött, de egyik tumor sem infiltratíván növe, ezért ennek a 8 molekulának az expressziója esetében tapasztalt különbség oka valószínűleg a különböző fejlődéstani eredet, és feltételezhetően nem függenek össze az invazív fenotípussal. Eltekintve tehát ettől a 8 molekulától, a maradék 18 molekula mRNS expresszióját schwannoma és asztrocitoma mintákban egybevetve arra az eredményre jutottunk, hogy öt molekula (brevikán, neurokán, tenascin-C, tenascin R és verzikán) expressziója asztrocitomában szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Végezetül ezt az öt molekulát teszteltük újból asztrocitomában és normal agyszövetben: a tenascin-R tekintetében statisztikailag igazolható, számottevő eltérést nem találtunk, azonban a többi négy molekula (brevikán, neurokán, tenascin-C, verzikán) szintje jelentősen magasabbnak bizonyult az asztrocitomában (7. ábra). Az asztrocitoma minták különböző expressziót mutattak a normal agyszövettel összehasonlítva további tizenhat molekulánál, de ezek a molekulák a nem-invazív daganatokban is eltérést mutattak, így az analízis nem bizonyított pozitív korrelációt ezekben az esetekben az emelkedett génexpresszió és a vizsgált tumor inváziós potenciálja között. Emellett az mRNS expresszió az említett négy molekula esetében nem volt szignifikánsan magasabb schwannomában vagy metasztázisban, összehasonlítva a normál agyszövettel, ami az asztrocitoma peritumorális inváziójában játszott egyedi szerepüket támasztja ismételtelen alá.



7. ábra. Brevikán, neurokán, tenaszcin-C és verzikán mRNS expressziójának statisztikai analízise ép agyszövetben (NORM), tüdő adenokarcinoma intracerebrális metasztázisában (MET), schwannomában (SCH) és grade II asztrocitómában (All).

E négy molekulát már korábban is összefüggésbe hozták a peritumorális invázióval. Az agyspecifikus BEHAB/brevikán proteoglikán upregulációja és hasítása bizonyítottan segíti a glioma invázióját (77, 78, 79, 80). A brevikán expressziója upregulált a gliasejtek proliferációja és vándorlása során, ideértve a központi idegrendszer korai fejlődését és a malignus gliomát is (81, 82, 83, 84). Molekuláris szinten a brevikán segíti az EGFR aktivációját, fokozza a sejtadhéziós molekulák expresszióját, és potenciózza a fibronectin termelődését és a fibronectin mikrofibrillumoknak a sejtfelszínen való akkumulációját. Továbbá a brevikán N-terminális hasítási terméke – tehát nem az egész protein – kapcsolódik fibronectinhez sejt kultúrákban és a glioma mintákban.

A neurokán a főbb agyi kondroitinszulfát proteoglikánok egyike mely interakcióba lép a heparánszulfát proteoglikánokkal (HSPG-k), úgymint a szindekán 3-mal és a glipikán 1-lyel, és vélhetőleg a sejtadhéziót és a migrációt modulálja. (85, 86, 87). A neurokán C-terminális fragmentje – de az N-terminális fragment nem – jelentősen növeli a neuritnövekedési arányt a sejt kultúrákban. A HSPG-k, mint a szindekán -3 és a glipikán -1 sejt felszíni receptorul szolgálnak a neurokán számára, és az ezen HSPG-k és a neurokán C-terminális domainje közötti interakciók segítik a neuritok növekedését.

A hexamer ECM glikoprotein tenascin átmenetileg expresszálódik több fejlődő szervben, és gyakran re-expresszálódik tumorokban. Jelen van a központi és a perifériás idegrendszerben éppúgy, mint a simaizmokban és az inakban (88, 89, 90). A tenascin EGF-szerű domáineket tartalmaz és fibronectin-szerű ismétlődő szekvenciákat, mely összefügg növekedést serkentő tulajdonságával. Sok sejttípusban van ezen kívül antiadhezív hatása is (91). A tenascin-C-t *in vitro* és *in vivo* eredmények alapján is összefüggésbe hozták az asztrocitoma agresszivitásával és inváziókészségével (92, 93). A tenascin-C tehát egy független prognosztikus indikátor: expressziója fokozott grade II asztrocitomában és a pozitív tenascin-C expresszió a recidíva nagyobb veszélyével jár együtt. A schwannomában a tumorsejtek tenascin-C negatívak, míg a tumorok több mint felében az erek és a regrediált tumor területei tenascin-C pozitívak. Metasztatikus tumorokban a tumorsejtek tenascin-C negatívak: néhány érfal tenascin-C pozitív, ami azt sugallja, hogy a tenascin-C az angiogenesis folyamatában is részt vesz (94). Az ECM fibrotikus elváltozásokban gazdag fokális területei a tenascin-C-re immunhisztokémiai pozitivitást mutatnak. A legállandóbb tenascin-C immunpozitivitást a nagy malignitású agytumorsejtek fibrotikus stromájában, valamint a tumor széli részein, különösen a high-grade asztrocitomában detektáltak (95, 96, 97).

A verzikán egy olyan hialurontartalmú proteoglikán, mely mind a tumor stromájában, mind pedig a tumorsejtekben felhalmozódik (98, 106). A verzikán részt vesz a sejtadhézióban, migrációban és az angiogenezisben, mely folyamatok az invázióban és a metasztázisképződésben egyaránt megfigyelhetők (99, 100). A verzikán egyike a főbb ECM proteineknek az agyban. Az ECM molekulák és hasítási termékeik döntően szabályozzák a neuritok növekedését és elágazódásaik kialakulását, ezáltal modulálva az ideghálózatok kialakulását (101, 102). A peptid fragmentek, melyek a verzikán C-terminusát hordozzák (G3 domain) jelen vannak a humán asztrocitómában. A verzikán G3 domain regulálja az idegsejtek kapcsolódását, a neuritok növekedését és a szinaptikus funkciót a hippocampus neuronjaiban EGFR–dependens és –independens szignál útvonalakon keresztül. A G3 domain ezen kívül serkenti a dendritikus nyúlványokat is. A verzikán G3 expressziója asztrocitoma sejtekben segíti a kolónia növekedését, a tumornövekedést és az érést. A G3 tartalmú közeg serkenti az endoteliális sejtadhéziót, proliferációt és migrációt (103, 104, 105). Az erős stromális verzikán festődés rossz túlélési mutatókkal (*disease-free survival*), gyakoribb recidívával és előrehaladottabb betegséggel függ össze. Az adenokarcinómában az erősebb stromális verzikán festődés ugyancsak gyakoribb recidívával, előrehaladottabb tumorstádiummal és nyirokcsomó-metasztázisokkal korrelál (106).

Az immunhisztokémiai eredmények megerősítették, hogy a brevikan, a neurokan, a tenascin-C és a verzikán nagy mennyiségben van jelen asztrocitómában. Ezek a proteinek normál agyszövetben is előfordulnak, de csekély mennyiségben találhatók schwannómában és a metasztatikus szövetekben, ami nem tette lehetővé, hogy e szövetek tekintetében is statisztikai összehasonlítást végezzünk.

Az inoperábilisnak tekintett, áttétet adó szolid tumorok esetében alkalmazott, hagyományos nem-sebészi eljárások – a kemoterápia és a sugárterápia – korlátai ma már világosan láthatók. Ezen eljárások – bár tumor-szelektivitásuk még némileg növelhető – az ép

testi sejtekre, szövetekre is hatnak, ami alkalmazható dózisukat limitálja, a kuratív hatás elérését pedig – legalábbis tüdőrák esetében – gyakorlatilag lehetetlenné teszi. Vannak, lesznek is még a jövőben a mainál hatásosabb sejtmérgek, a céltérfogat jobb bemérését lehetővé tevő sugárterápiás eszközök, de nem kétséges, hogy a jobb gyógyeredmények érdekében új utakon kell a daganatterápiában is elindulnunk.

Napjainkban egyre nagyobb szerepet kapnak a rosszindulatú tumorok kezelésében az úgynevezett biológiai válaszmódosító anyagok. Olyan molekulák ezek, melyeket nem mint a sejtet megölő mérgeket fejlesztettek ki, hanem a daganat életébe, növekedésébe, terjedésébe avatkoznak bele olyan módon, hogy a gazdaszervezet túlélését segítik, a daganatbetegség előretörését pedig gátolják. Több daganat esetében hormonokat, szintetikus hormonszerű anyagokat vagy éppen hormonok, hormonreceptorok elleni ellenanyagokat alkalmaznak immár sikerrel. A tüdőrák szempontjából ez kevésbé látszik perspektivikus lehetőségnek, bár egyes receptorok (pl. EGFR) jelenléte a ráksejtek felszínén több új gyógyszer kifejlesztésére inspirálta eddig is a gyógyszeripart. Hasonlóképpen eredményesnek tűnő próbálkozás az angiogenezis-gátló gyógyszerek bevetése. Mindezen új lehetőségekkel együtt a tüdőrák úgy látszik „feladja a leckét”, ha potenciálisan nőttek is a túlélési esélyek, ezek számottevő javulást a nemzetközi statisztikák szerint eddig nem hoztak. Ennek egyik oka mindenképpen a tüdőrák rendkívül erős áttétképzési hajlama. A korai áttétképzés miatt romlanak a radikális műtét esélyei, más kuratív célú standard eljárás pedig jelenleg nincs. Ilyen körülmények között felértékelődik minden olyan új eredmény, eljárás és gyógyszer, amely a metasztázisok képződését, fejlődését gátolni képes.

5.4. Új eredmények

1. Az ECM molekulái közül az irodalom áttekintése után összeválogatott 96 molekula expresszióját meghatároztuk különböző inváziós potenciált mutató intracerebrális

daganatokban, és eredményeink alapján létrehoztunk egy inváziós panelt. Az inváziós panel tartalmazza azokat az invazivitásban szerepet játszó ECM komponenseket, melyek eltérő expressziója összefüggésbe hozható a tüdőrák agyi áttéte és a gliomák eltérő invazivitásával.

2. Az inváziós panel négy különböző eredetű intrakraniális daganatban és nem-tumoros agyszövetben történő meghatározásával az egyes szövettani diagnózisokra jellegzetes inváziós spektrumokat azonosítani tudtuk. Az inváziós spektrum az egyes daganatokra igen nagyfokú specificitást mutat, igazolva ezzel az invázióért felelős ECM komponensek expressziójának daganatspecifikus jellegét.
3. Vizsgálataink során négy olyan molekulát tudtunk azonosítani (brevikán, neurokán, tenascin-C és verzikán), melyek a tüdőrák intracerebrális áttéte és a gliomák közötti jelentősen különböző peritumorális inváziójáért leginkább felelősek és az antiinvazív onkoterápiához a jövőben targetként szolgálhatnak.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munkánkban egy olyan új lehetőségre kívántunk rávilágítani, mellyel az áttétek kialakulása és növekedése a jövőben gátolható lenne. Mivel sok molekuláról ismert, hogy részt vesz az áttétképzésben és a tumorinvázióban, nem könnyű targetet választani az anti-inváziós terápia számára. A mi összehasonlításunk, melyet a különböző ECM molekulák expressziós mintáival végeztünk, segíthet leszűkíteni a lehetséges célmolekulák számát. Az általunk vizsgált ECM molekulák különböző mintázatot mutattak a gliomák és az adenokarcinoma áttétek esetében. Feltehetően az egyes primer tumorokra jellemző, de egymástól különböző molekuláris összetétel lehetőséget teremt a tumorok szelektív „célbavételére”. Az első lépés az ECM invázióért felelős molekulái expressziójának meghatározása a különböző intracerebrális daganatokban. Az igen nagyszámú molekula közül ezáltal kiszűrhető az a néhány potenciális molekula, melyek további vizsgálatával az onkoterápiához konkrétan hasznosítható targetmolekulák identifikálhatók. Vizsgálataink során először 96 ECM komponens mRNS expressziós szintjét mértük meg, majd eredményeink alapján meghatároztuk a további analízisre érdemes molekulák csoportját, és belőlük un. **inváziós panelt** képeztünk. Ezzel a fenti célon túl azt is elértük, hogy az inváziós panelt alkotó molekulák mRNS-szintjeiből daganatspecifikus **inváziós spektrumot** lehetett képezni, mely a cluster analízis szerint az általunk vizsgált 4 különböző daganattípusra is igen nagymértékű specificitást mutat. Ezáltal igazolni tudtuk, hogy a különböző daganatok eltérő invázivitásáért valóban az ECM-komponensek jól meghatározható molekulacsoportja felelős.

További méréseink során a különböző eredetű intracerebrális tumorok inváziós spektrumának elemzésével 4 olyan molekulát szűrtünk ki, mely a gliomák és a tüdőrák agyi metasztázisának eltérő infiltrációs aktivitásáért konkrétan felelősnek mondható. A statisztikai analízis alapján megállapítható, hogy a brevikan, neurokan, tenascin-C és verzikan tehát a jövőben az antiinvazív terápiához targetként felhasználható.

SUMMARY

Effectiveness of therapy in case of malignant intracerebral tumors depends mainly on the invasive behavior of the tumor. In recent work we tried to find new perspectives in inhibition of tumor metastases development and invasion.

We compared the molecular composition of extracellular matrix of different tissues like normal brain, glioblastoma, astrocytoma grade II and intracerebral pulmonary adenocarcinoma metastasis. For these purposes fresh frozen tissue samples were used collected by routine clinical neurosurgical procedures at the Department of Neurosurgery, University of Debrecen.

For determination of the mRNA expression of the invasion-related extracellular matrix proteins quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (QRT-PCR) was used. Then immunohistochemical staining was performed for ECM molecules found to be in connection with invasion processes in the peritumoral brain.

The trial was made in four phases. At the first phase 96 molecules reported in the literature as possibly active agents in tumor growth and metastatization were investigated in glioblastoma and lung adenocarcinoma brain metastases. The mostly differ 30 molecules were selected and named „invasion panel”. In the second phase we checked the invasion panel in further glioblastoma and intracerebral metastases samples of pulmonary adenocarcinoma. In the third phase our examinations were extended to normal brain tissue and in the fourth phase we analyzed four different histological tissue types, as well as normal brain, schwannoma, astrocytoma grade II, and intracerebral adenocarcinoma metastasis.

The mRNA-levels of invasion panel molecules were analyzed by cluster analysis that proved tumor specific expression pattern of the selected molecules. We named this „invasion spectrum”.

Our observations partially concerned, partially completed the results reported preliminarily in the literature. New results:

1.) An „invasion panel” was identified, consisting ECM components probably responsible for peritumoral invasion.

2.) Definite differences could be established regarding the expression pattern of the invasion panel in cases of distinct tumor types. This specific expression panel is named as „invasion spectrum” characterizing tissues of different histological types.

3.) Four molecules (brevican, neurocan, tenascin C and versican) were identified which are probably responsible for the extremely high invasion feature of gliomas.

In summary, identification of exact molecules playing indispensable role in peritumoral invasion can serve as new targets for anticancer therapy in the future.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- 1.) Nolte SM, Venugopal C, McFarlane N, Morozova O, Hallett RM, O'Farrell E, Manoranjan B, Murty NK, Klurfan P, Kachur E, Provias JP, Farrokhyar F, Hassell JA, Marra M, Singh SK: A cancer stem cell model for studying brain metastases from primary lung cancer. J Natl Cancer Inst. 2013; 105(8): 551-62.
- 2.) Johnson JD, Young B: Demographics of Brain Metastasis. Neurosurg Clin N Am 1996 (7): 337-344.
- 3.) Jensen M, Bertold F: Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer. Cancer Lett 258 (1): 9-21.
- 4.) Cox JD, Yesner R: Adenocarcinoma of the lung – recent results from VA Lung Group. Am Rev Resp Dis 1979, (120): 1025-1029.
- 5.) Komaki R, Cox JD, Stark R: Frequency of brain metastasis in adenocarcinoma and large cell carcinoma of the lung: Correlation with survival. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1983; (9): 1467-1470.
- 6.) Chi A, Komaki R: Treatment of Brain metastases from Lung Cancer 2010; (2): 2100-2137
- 7.) Posner JB: Management of Brain Metastases. Rev Neurol (Paris) 1992; 148 (6-7): 477-487
- 8.) Pásztor E.: Az idegrendszer daganatai. In.: Besznyák I. (szerk): Sebészi Onkológia. Medicina 1997, 518.
- 9.) Stetler-Stevenson W G, Liotta L A, Kleiner Jr D E: Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. The FASEB Journal December 1993; (7): 1434-1441.
- 10.) Stetler-Stevenson W G, Aznavoorian S, and Liotta L A: Tumor Cell Interactions with the Extracellular Matrix During Invasion and Metastasis. Annual Review of Cell Biology 1993; (9): 541-573.

- 11.) Tanjore, H., Kalluri, R.. The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol.* 2006; 168(3): 715-717.
- 12.) Lu P, Weaver VM, Werb Z: The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression *JCB* 2012; (196): 395-406.
- 13.) Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, . Shalinsky D R Lisa, Z W. Coussens M, and DeClerck Y A: Stromal Matrix Metalloproteinase-9 Regulates the Vascular Architecture in Neuroblastoma by Promoting Pericite Recruitment *Cancer Res* 2004; (64): 1675.
- 14.) Plopper G: The extracellular matrix and cell adhesion, in *Cells* (eds Lewin B, Cassimeris L, Lingappa V, Plopper G). Sudbury, MA: Jones and Bartlett, 2007. ISBN 0-7637-3905-3907.
- 15.) Shapiro SD: Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; (5): 602-608.
- 16.) Kumar; Abbas; Fausto. Robbins and Cotran: *Pathologic Basis of Disease* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier. ISBN 0-7216-0187-1 .
- 17.) Grace M. Fischer M.D. Josep G. Llauro M.D. (October 1966). "Collagen and Elastin Content in Canine Arteries Selected from Functionally Different Vascular Beds". *Circulation Research* 19 (2): 394–399.
- 18.) Toyonobu Usuki , Haruka Yamada , Takahiro Hayashi , Hiroto Yanuma , Yohei Koseki , Noriyuki Suzuki , Yoshiro Masuyama and Yong Y. Lin: Total synthesis of COPD biomarker desmosine that crosslinks elastin. *Chem. Commun.* 2012; (48): 3233-3235.
- 19.) Pankov R, Yamada KM (October 2002). "Fibronectin at a glance". *Journal of cell science* 115 (20): 3861–3863.
- 20.) Han S, Khuri FR, Roman J (Jan 2006): Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP activated protein kinase pathways. *Cancer Research* 66 (1): 315-323.

21.) Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 24 (5): 326–332.

22.) Sathyanarayana UG, Toyooka S, Padar A, Takahashi T, Brambilla E, Minna JD, Gazdar AF: Epigenetic inactivation of laminin-5-encoding genes in lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2003; (7): 2665-72.

23.) Szabó Erzsébet: A matrilin-2 expressziójának vizsgálata májregenerációban kísérletesen és hepatocelluláris karcinómában. Doktori értekezés, Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, 2007.

24.) Timar J, A Jeney, I Kovalszky, I, L Kopper: Role of Proteoglycans in Tumor Progression: *Pathol.Oncol.Res.*, 1995; (1): 85-93.

25.) Nagy RJ, Szleifer I: Structure and interactions of aggrecans: Statistical thermodynamic approach. *Biophys J*: 95 (10): 4570-4583.

26.) Felix Fernandez-Madrid F, Robert L. Karvonen RL, Kraut MJ, Czelusniak B, and Ager JW: Autoimmunity to collagen in human lung cancer. *Cancer Research* 1996; (56): 121-126.

27.) Batmunkh Enkhjargal: Agrin expresszió primer májtumorban. Doktori értekezés. Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, 2007.

28.) Sanes JR, Lichtmann JW: Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2 (11): 791-805

29.) Varga I, Hutóczki G, Szemcsák CD, Zahuczky G, Tóth J, Adamecz Z, Kenyeres A, Bognár L, Hanzély Z, Klekner A.: Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are

Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma. *Pathol Oncol Res.* 2012; (2): 413-420.

.

30.) Iozzo, R V; Moscatello D K, McQuillan D J, Eichstetter I :Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem. (UNITED STATES)* 1999; 274 (8): 4489–4492.

31.) Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S: Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* 1994; 77 (5): 675–86.

32.) Yurchenco, P.D., Patton, B.L.: Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly". *Current Pharmaceutical Design*, 2009; (15): 1277–1294.

33.) Chung AE, Durkin ME: Entactin: structure and function. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; (4): 275-282.

34.) Humphries M.J.: Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* 2000; 28 (4): 311–339.

35.) Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci.* 2000; 20 (7): 2427-2438.

36.). Iozzo RV: Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol.* 1994; 14 (3): 203–208.

37.) Brown AJ, Alicknavitch M, D'Souza SS, Daikoku T, Kirn-Safran CB, Marchetti D, Carson DD, Farach-Carson MC : Heparanase expression and activity influences kondrogenic and osteogenic processes during endochondral bone formation. *Bone* 2008; 43 (4): 689–99.

38.) C W Kim et al., Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Molecular Biology of the Cell* 1994; 5, (7): 797–805.

39.) Anttonen A et al. Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma. *British Journal of Cancer* 79 (3-4): 558–564.

- 40.) Bristow J, Carey W, Egging D, Schalkwijk J. Tenascin-X, collagen, elastin, and the Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 139 (1): 24–30.
- 41.) Van Lint P, Libert C :Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation: *J. Leukoc. Biol.*2007; 82 (6): 1375–1381.
- 42.) Szemcsák Csaba Dávid: Az extracellularis matrix szerepe az alacsony grádusú gliomák invazivitásában. Diplomamunka, DEOEC ÁOK 2010
- 43.) Giese A, Rief MD, Loo MA, et al. Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res* 1994; (54): 3897-3904,
- 44.) Giese A, Laube B, Zapf S, et al. Glioma cell adhesion and migration on human brain section. *Anticancer Res* 1998; (18): 2435-2447.
- 45.) Lo CK, Yu CH, Ma CC et al.: Surgical management of primary non-small-cell carcinoma of lung with synchronous solitary brain metastasis: local experience. *Hong Kong Med J* 2010; 16(3): 186-191.
- 46) Pfannschmidt J, Dienemann H: Surgical treatment of oligometastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010; 69(3): 251-258 .
- 47.) Abacioglu U, Caglar H, Atasoy BM et al :Gamma knife radiosurgery in non small cell lung cancer patients with brain metastases: treatment results and prognostic factors. *J BUON* 2010; 15(2): 274-80.
- 48.) Gary SC, Hockfield S. BEHAB/brevican: an extracellular matrix component associated with invasive glioma. *Clin Neurosurg* 2000; (47): 72-82.
- 49.) Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT. BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *J Neurooncol* 2008; (88): 261-272.

- 50.) Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol* 2003; (105): 49-57.
- 51.) Tews DS. Adhesive and invasive features in gliomas. *Pathol Res Pract* 2000; (196): 701-711.
- 52.) Guo P, Imanishi Y, Cackowski FC, Jarzynka MJ, Tao HQ, Nishikawa R, Hirose T, Hu B, Cheng SY. Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 metalloproteinase, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. *Am J Pathol* 2005; (166): 877-890.
- 53.) Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol* 2003; (105): 49-57.
- 54.) Watanabe A. Expression of syndecans, a heparan sulfate PG, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. *J Neurooncol* 2006; (77): 25-33.
- 55.) Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Hayakawa T. Expression of tenascin in human gliomas: Its relation to histological malignancy. *Acta Neuopath (Berlin)* 1993; (85): 481-487.
- 56.) Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, Chikramane S, Chan W, Greco MA, Allen JC, Dorovini-Zis K, Grumet M. Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res* 1996; (56): 182-189.
- 57.) Paulus W. Differential expression of versican isoforms in brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; (55): 528-533.
- 58.) Arnold SM. Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in paired primary tumors and brain metastasis. *Clin Cancer Res* 1999; (5): 4028-4033.

- 59.) Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, Tsuruo T, Shibata Y, Muto T, Nagawa H. MMP-1 is a Prognostic Marker for Hematogenous Metastasis of Colorectal Cancer. *The Oncologist* 2000; (5): 108-114.
- 60.) Delpech B, Maingonnat C, Girard N, Chauzy C, Maunoury R, Olivier A, Tayot J, Creissard P. Hialuronsav and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumor stroma. *Eur J Cancer* 1993; (29): 1012-1017.
- 61.) Oz B, Karayel FA, Gazio NL, Ozlen F, Balci K. The distribution of extracellular matrix proteins and CD44S expression in human astrocytomas. *Path Oncol Res* 2000; (6): 118-124.
- 62.) Ranuncolo SM, Ladede V, Specterman S, Varela M, Lastiri J, Morandi A, Matos E, Bal de Kier Joffé E, Puricelli L, Pallotta MG. CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol* 2002; (79): 30-35.
- 63.) Wiranowska M, Ladd S, Smith SR, Gottschall PE. CD44 adhesion molecule and neuroglial PG NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biol* 2006; (35): 159-172.
- 64.) Pirinen R, Leinonen T, Bohm J, Johansson R, Ropponen K, Kumpulainen E, Kosma VM. Versican in nonsmall cell lung cancer: relation to hialuronic acid, clinicopathologic factors, and prognosis. *Hum Pathol* 2005; (36): 44-50.
- 65.) Han S, Sidell N, Roman J. Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell proliferation by suppressing p21 gene expression via signals involving Erk and Rho kinase. *Cancer Lett* 2003; (219) :71-81.
- 66.) Khan ZA, Caurtero J, Barbin YP Chan BM, Uniyal S, Chakrabarti S. ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma. *Exp Lung Res* 2005; (31): 701-711.
- 67.) Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M, Maeshima A, Yamada T, Matsuno Y, Fukayama M, Yokota J, Hirohashi S. Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenonarcinomas. *Am J Pathol* 2002; (160): 1129-1141.

- 68.) Szelachowska J, Jelen M, Kornafel J. Prognostic significance of intracellular laminin and Her2/neu overexpression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2006; (26): 3871-3876.
- 69.) Pirinen R, Tammi R, Tammi M, Hirvikoski P, Parkkinen JJ, Johansson R, Böhm J, Hollmén S, Kosma VM. Prognostic value of hyaluronic acid expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; (95):12-17.
- 70.) Arnold SM. Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in paired primary tumors and brain metastasis. *Clin Cancer Res* 1999; (5): 4028-4033.
- 71.) Lee LN, Kuo SH, Lee YC, Chang YL, Chang HC, Jan IS, Yang PC. CD44 splicing pattern is associated with disease progression in pulmonary adenocarcinoma. *J Formos Med Assoc* 2005; (104): 541-548.
- 72.) Han JY, Kim HS, Lee SH, Park WS, Lee JY, Yoo NJ. Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Lung Cancer* 2003; (41): 65-70.
- 73.) Nackaerts K, Verbeken E, Deneffe G, Vanderschueren B, Demedts M, David G. Heparan sulfate PG expression in human lung-cancer cells. *Int J Cancer* 1997; (74): 335-345.
- 74.) Shah L, Walter KL, Borczuk AC, Kawut SM, Sonett JR, Gorenstein LA, Ginsburg ME, Steinglass KM, Powell CA. Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004; (101): 1632-1638.
- 75.) Rascher G, Fischmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H. Extracellular matrix and the blood-brain barrier in multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002; (104): 85-91.

- 76.) Warth A. Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; (109): 418-426.
- 77.) Hu B, Kong LL, Matthews RT et al: The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. 2006; *J Biol Chem* 283(36): 24848-24859.
- 78.) Viapiano MS, Bi WL, Piepmeier J et al: Novel tumor-specific isoforms of BEHAB/brevican identified in human malignant gliomas. *Cancer Res* 2005; 65 (15): 6726-6733
- 79.) Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT: BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *J Neurooncol* 2008; 88 (3):261-272.
- 80.) Viapiano MS, Matthews RT, Hockfield S.: A novel membrane-associated glycovariant of BEHAB/brevican is up-regulated during rat brain development and in a rat model of invasive glioma. *J Biol Chem* 2008; 278(35): 33239-33247.
- 81.) Nutt CL, Matthews RT, Hockfield S : Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican. *Neuroscientist*, 2001; 7(2): 113-122.
- 82) Gary SC, Hockfield S : BEHAB/brevican: an extracellular matrix component associated with invasive glioma. *Clin Neurosurg* 2000; (47): 72-82.
- 83) Gary SC, Kelly GM, Hockfield S : BEHAB/brevican: a brain-specific lectican implicated in gliomas and glial cell motility. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8(5): 576-581.
- 84.) Gary SC, Zerillo CA, Chiang VL et al : cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma. *Gene* 2000; 256(1-2): 139-147.

- 85.) Talts U, Kuhn U, Roos G et al. : Modulation of extracellular matrix adhesiveness by neurocan and identification of its molecular basis. *Exp Cell Res* 2000; 259(2): 378-388.
- 86.) Akita K, Toda M, Hosoki Y et al.: Heparan sulphate proteoglycans interact with neurocan and promote neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *Biochem J* 2004; 383(Pt 1): 129-138.
- 87.) Rauch U, Feng K, Zhou XH: Neurocan: a brain chondroitin sulphate proteoglycan. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(12-13): 1842-1856.
- 88.) Zinovieva E, Lebrun N, Letourneur F et al.: Lack of association between Tenascin-C gene and spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(11): 1655-1658.
- 89.) Meloty-Kapella CV, Degen M, Chiquet-Ehrismann R et al.: Avian tenascin-W: expression in smooth muscle and bone, and effects on calvarial cell spreading and adhesion in vitro. *Dev Dyn* 2006; 235(6): 1532-1542.
- 90.) Pajala A, Melkko J, Leppilahti J et al.: Tenascin-C and type I and III collagen expression in total Achilles tendon rupture. *Histol Histopathol* 2009; 24(10): 1207-1211.
- 91.) Fischer D, Brown-Lüdi M, Schulthess T et al (1997) Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 13): 1513-1522.
- 92.) Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M et al.: Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci* 2009 100(8): 1451-1459
- 93.) Maris C, Rorive S, Sandras F et al.: Tenascin-C expression relates to clinicopathological features in pilocytic and diffuse astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008; 34(3): 316-329.
- 94.) Bicer A, Guclu B, Ozkan A et al.: Expressions of angiogenesis associated matrix metalloproteinases and extracellular matrix proteins in cerebral vascular malformations. *J Clin Neurosci* 2010; 17(2): 232-236

- 95.) Kim CH, Bak KH, Kim YS et al.: Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg Neurol* 2000; 54(3): 235-240.
- 96.) Leins A, Riva P, Lindstedt R et al.: Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer* 2003; 98(11): 2430-9 .
- 97.) Zagzag D, Capo V.: Angiogenesis in the central nervous system: a role for vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor and tenascin-C. Common molecular effectors in cerebral neoplastic and non-neoplastic "angiogenic diseases". *Histol Histopathol* 2002; 17(1): 301-321.
- 98.) Mukaratirwa S, Chimonyo M, Obwolo M et al.: Stromal cells and extracellular matrix components in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Histol Histopathol* 2004; 19(4): 1117-11123.
- 99.) Klekner A, Varga I, Bognár L et al.: Extracellular matrix of cerebral tumors with different invasiveness. *Ideggyogy Sz* 2010; 63(1-2): 38-43.
- 100.) Varga I, Hutóczki G, Petrás M et al (2010) Expression of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in Human Glioblastoma Versus Intracerebral Lung Adenocarcinoma Metastasis. *Cen Eur Neurosurg*. 2010; 71(4):173-180
- 101) Xiang YY, Dong H, Wan Y et al (2006) Versican G3 domain regulates neurite growth and synaptic transmission of hippocampal neurons by activation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2006; 281(28): 19358-19368.
- 102) Wu Y, Sheng W, Chen L et al (2004) Versican V1 isoform induces neuronal differentiation and promotes neurite outgrowth. *Mol Biol Cell* 2004; 15(5): 2093-2104.
- 103.) Ricciardelli C, Sakko AJ, Ween MP et al.: The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1-2): 233-245.

- 104.) Wu Y, Zhang Y, Cao L et al .Identification of the motif in versican G3 domain that plays a dominant-negative effect on astrocytoma cell proliferation through inhibiting versican secretion and binding. J Biol Chem 2001; 276(17): 14178-14186.
- 105.) Zheng PS, Wen J, Ang LC et al.: Versikán/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. FASEB J 2004; 18(6): 754-756.
- 106.) Soltermann A, Tischler V, Arbogast S.: Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2008; 14(22): 7430-7437.



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/58/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Varga Imre

Neptun kód: ZJA2WN

Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, I.**, Hutóczki, G., Szemcsák, C.D., Zahuczky, G., Tóth, J., Adamecz, Z., Kenyeres, A., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma. *Pathol. Oncol. Res.* 18 (2), 413-420, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9461-0>
IF:1.366
2. **Varga, I.**, Hutóczki, G., Petrás, M., Scholtz, B., Mikó, E., Kenyeres, A., Tóth, J., Zahuczky, G., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Expression of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in Human Glioblastoma Versus Intracerebral Lung Adenocarcinoma Metastasis. *Cent. Eur. Neurosurg.* 71 (4), 173-180, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249698>
IF:0.472

További Közlemények

3. Klekner Á., **Varga I.**, Bognár L., Hutóczki G., Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B.: Különböző invazivitású agydaganatok extracelluláris mátrixának expressziója. *Ideggyógy. Szle.* 63 (1-2), 38-43, 2010.
IF:0.236
4. Bágyi, K., Haczku, A., Márton, I., Szabó, J., Gáspár, A., András, M., **Varga, I.**, Tóth, J., Klekner, Á.: Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery. *BMC Infect. Dis.* 9, 104-113, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-9-104>
IF:2.55

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



5. Petrás M., Hutóczki G., **Varga I.**, Jr. Vereb G., Szöllősi J., Bognár L., Ruszthi P., Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B., Klekner Á.: Különböző eredetű malignus agydaganatok invazivitásának panelszerű vizsgálata.
Magyar Onkol. 53 (3), 253-258, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/MOnkol.53.2009.3.3>
6. Bágyi, K., Márton, I., Szabó, J., András, M., Gáspár, A., **Varga, I.**, Bognár, L., Klekner, Á.: Efficacy of pre-operative cephalosporin prophylaxis in controlling pathogenic oral bacterial growth in comatose patients.
J. Med. Microbiol. 57 (Pt1), 128-129, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47381-0>
IF:2.19
7. Jenei M., Veres I., Schmidt E., **Varga I.**, Remenyik É.: Az erythrodermáról és rühkafertőzésről scabies norvegica két esete kapcsán.
Orv. Hetil. 149 (47), 2229-2235, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28479>
8. **Varga I.**, Dezső B., Horváth Á., Kiss S.S.: A tüdő, a mellhártya és a mediastinum daganatai.
In: Klinikai onkológia a gyakorlatban. Szerk.: Szántó János, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 129-157, 2005.
9. **Varga I.**, Szűcs M.Z., Moldvay J., Jáger M., Szűcs G., Bordás M., Molnár L., Szilasi M., Strausz J.: A bronchoszkópia szerepe a nyelőcsődaganatok kivizsgálásában és kezelésében.
Orv. Hetil. 145 (45), 2285-2288, 2004.
10. **Varga I.**, Brugós L., Farkas M., Szilasi M.: Bronchoszkópia az intenzív osztályokon.
Orv. Hetil. 145 (18), 957-961, 2004.
11. Cziráj, L., Koncz, A., **Varga, I.**, Dévényi, K., Kumánovics, G., Szűcs, G.: Investigation of the alveolar macrophages and T lymphocytes in 15 patients with systemic sclerosis.
Clin. Rheumatol. 18 (5), 357-363, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s100670050119>
IF:0.615
12. **Varga I.**, Koncz A., Brugós L., Szilasi M., Szakács É.: Első tapasztalataink a légúti stent-tel.
Med. Thorac. 51 (4), 154-157, 1998.





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



13. Koncz A., **Varga I.**, Kollár J., Winkler I.: Többszörös kerekárnyék radiológiai képével jelentkező pulmonális tuberkulózis esete.
Med. Thorac. 46 (7), 241-246, 1993.
14. Koncz A., Herman K., **Varga I.**, Szabó Z., Szilasi M.: Sürgős bronchológiai vizsgálatok indikációja és kivitelezése szív-műtétek perioperatív időszakában.
Med. Thorac. 46 (12), 467-474, 1993.
15. Dobrán I., Mórocz I., Vezendi S., **Varga I.**: Endobronchialis szemcsés-sejtes tumor: Abrikosoff myoblastoma.
Med. Thorac. 44 (11), 487-491, 1991.
16. Faragó E., Szilasi M., Csontos Z., **Varga I.**, Mihóczy L.: Antibiotikum szint mérések hörgőkarcinomás betegek köpetében.
Med. Thorac. 43 (6), 249-258, 1990.
17. Szilágyi J., Bene J., **Varga I.**: Új módszer az orrlégzés vizsgálatára.
Pneumonol. Hung. 41, 57-63, 1988.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7.429

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
1.838**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.24



8. TÁRGYSZAVAK

glioma, brain metastasis, astrocytoma, glioblastoma, extracellular matrix, invasion

glióma, agyi áttéti daganat, asztrocitóma, glioblasztóma, extracelluláris mátrix, invázió

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Klekner Álmosnak a hosszú évekig tartó közös kutatómunkában nyújtott segítségét, valamint Dr. Bognár László Professzor Úrnak és Dr. Szilasi Mária Intézetvezető Tanár Nőnek a két Klinika közös tudományos munkájának támogatását. Köszönettel tartozom továbbá a kutatómunkában együttműködő kollégáknak: Dr. Hutóczki Gábornak, Dr. Scholtz Beátának, Dr. Tóth Juditnak, Dr. Zahuczky Gábornak, Dr. Hanzély Zoltánnak és Kenyeres Annamáriának.

A PhD dolgozat a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 kutatási projekt támogatásával készült el. A témavezetőt a kutatómunkájában a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.

10. FÜGGELÉK (az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények)

- 1.) **I. Varga**, G. Hutóczki, M. Petras, A. Kenyeres, B. Scholtz, E. Mikó, Z. Hanzely, L. Bognar, G. Zahuczky, A. Klekner: Expression pattern of invasion-related extracellular matrix molecules in human glioblastoma versus intracerebral lung adenocarcinoma metastasis. *Central Eur Neurosurg*, . 2010 Nov;71(4):173-80.
- 2.) **I. Varga**, G. Hutóczki, M. Petrás, B. Scholtz, E. Mikó, A. Kenyeres, J. Tóth, G. Zahuczky, L. Bognár, Z. Hanzély, A. Klekner: Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma has now been published in the following paginated issue of *Pathology & Oncology Research*: Volume 18, Issue 2 (2012), Page 413-420.