

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Új utak keresése a neuro-onkológiai kórképek kezelésében

Dr. Mezey Géza

Témavezető: Prof. Dr. Bognár László



DEBRECENI EGYETEM
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2015

Új utak keresése a neuro-onkológiai kórképek kezelésében

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

Írta: Dr. Mezey Géza okleveles általános orvos, idegsebész szakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bognár László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Járdánházy Tamás, kandidátus

Prof. Dr. Berényi Ervin, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület
tanterme, 2015. szeptember 23. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Büki András, az MTA doktora

Dr. Bagó Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Büki András, az MTA doktora

Prof. Dr. Járdánházy Tamás, kandidátus

Prof. Dr. Berényi Ervin, PhD

Dr. Bagó Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület
tanterme, 2015. szeptember 23. 13 óra

A doktori értekezés előzményei

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

A központi idegrendszeri daganatok kezelésekor azonban számos az idegrendszerre jellemző tulajdonságot kell szem előtt tartani, amelyek miatt a központi idegrendszert érintő primer tumorok kezelési elvei eltérnek a többi szerv daganatos betegségének kezelésétől. Másrészt a központi idegrendszert érintő áttétes tumoroknak is eltérő tulajdonságai vannak a többi szerv primer vagy szekunder tumorainak sajátosságaitól.

Alapvetően a központi idegrendszer daganatos betegségeinek más szervektől eltérő tulajdonságai és kezelési elvei tették szükségessé egy multidiszciplináris, speciális megközelítés létrehozását, a neuro-onkológia kialakulását.

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

- Idegsebészeti beavatkozás
- Kemoterápia
- Radioterápia

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

Elokvens területek intraoperatív azonosításában az elektrofiziológia fejlődése és az éber műtétek jelentettek előrelépést. Intraoperatív térbeli lokalizációt segíti a rutinszerűen alkalmazható neuro-navigáció. Az intraoperatív képalkotásban pedig jelentős szerepe lett az olcsó, ismételhető ultrahangnak, továbbá intraoperatív CT, MR is rendelkezésre állhatnak. Azonban a műtét közbeni szövettani azonosítás továbbra is egyetlen elterjedt módja az intraoperatív szövettani analízis maradt. Ez a tradicionális szövettani vizsgálat egyszerűsített, így gyorsabb változata. Ideális esetben, megfelelő infrastruktúra mellett is megközelítőleg 30-40 percen belül hoz eredményt. Ez az időablak egy idegsebészeti műtét során meglehetősen hosszú lehet és a módszer megbízhatósága is alatta marad a hagyományos szövettani analízisnek. Továbbá nem nyújt segítséget a tumorhatárok megítélésében és az infiltráló tumorok esetében az infiltráció mértékét sem mutatja megbízhatóan.

Az idegsebészeti műtétek során a tumoros területeknek az ép állománytól való elkülönítésében továbbra is az idegsebész tapasztalatosságának van kulcsszerepe, habár az elmúlt években néhány alternatív módszert is kifejlesztettek a szövetek *in situ*, intraoperatív azonosítására és megkülönböztetésére. Legutoljára különféle fluoreszcens és radioaktív jelölési technikák - beleértve a nano-partikulumok alkalmazását is - kerültek leírásra az agytumorkok *in*

situ, intraoperatív láthatóvá tételére, azonban ezek szövettani diagnózist önmagukban továbbra sem adnak. A jelöléses módszerek mindegyike, olyan fluoreszcens vagy radioaktív molekulák beadását igénylik, amelyek a tumor-sejtekben akkumulálódnak. Hátrányuk közé tartozik, hogy a jelölés specificitása gyakran csekély, a beadást követő optimális műtéti időablak pedig pontosan meghatározott és mindig speciális műtéti körülményeket igényel a detektálás. Fentiek miatt a gyakorlatban ezek a módszerek nem is terjedtek el széles körben.

Az elmúlt időszakban bemutatták, hogy néhány tömegspektrometriai ionizációs módszer potenciálisan alkalmas lehet a tömeg spektrometrián alapuló intraoperatív hisztológiai meghatározás kifejlesztésére. Továbbá kifejlesztettek dedikált tömegspektrometrián alapuló intraoperatív módszereket tumor infiltráció azonosításra hasi sebészeti műtétekhez. A REIMS módszer (Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry) a szövetek elektrokauteres evaporációján alapul, ahol az ionok az elektromos disszekció során alakulnak ki és azután történik az evaporátum analízise.

Az idegsebészet területén azonban továbbra sincs olyan eszköz, amely gyors, *in situ*, intraoperatív analízist tenne lehetővé. Ezt az idegsebészeti speciális követelmények az ép, funkcionáló állomány védelme és a speciális műtéti eszközök tovább nehezítik. Az idegsebészetben már egy gyors, szövettani diagnózist nyújtó intraoperatív eszköz is nagyban támogatná a helyes sebészeti taktika kialakítását. Azonban a műtéti reszekció kivitelezését leginkább a tumor határokat mutató, az ép állományt elkülönítő módszer segítené.

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

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

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

A neuro-onkológiai kórképek kezelésében elsősorban a gliomák azon belül is a glioblasztóma kezelésében égető szükség van a kezelést és a kimenetelt javító új eljárásokra. Habár az elmúlt években történt mérsékelt előrelépés a sebészeti eltávolítás és a gyógyszeres utókezelés tekintetében is, azonban összességében mind a sebészeti reszekció mértékének, mind a posztoperatív kezelés hatásfokának javítására szükség van.

Másrészt a neuro-onkológiai idegsebészeti ellátásban fontos szerepe lenne egy intraoperatív, *in situ*, gyors szövettani jellegű diagnózist adó módszernek is. Ez különösen olyan kórképek esetén hozna gyakorlati hasznot, ahol a szövettani diagnózis meghatározza a választandó sebészi taktikát.

Célkitűzések

Kísérleteink első részében a tömegspektrometria speciális idegsebészeti adaptálását tűztük ki célul. A bipoláris csipesszel illetve ultrahangos szívóval (CUSA – cavitron ultrasound aspiration) történő mintavétel valós idejű, in situ, intraoperatív és direkt tömegspektrometriai analízisét kívántuk megvalósítani. Ezen belül egyrészt a tömeg spektrometrián alapuló in situ, in vivo szövettani azonosítás, másrészt a tumoros és ép területek elkülönítése volt a végleges célunk. Fenti célokkal az intraoperatív döntéshozatal és a sebészi beavatkozás támogatását szerettük volna elérni.

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

Ezen túlmenően, a központi idegrendszeri tumoros folyamat szövettani jellegű azonosításán kívül, az általunk kifejlesztett módszerek egyéb lehetőségeit is vizsgáltuk, úgymint a lipidfrakciók és peptidek kimutatásának lehetőségeit. Feltételezésünk szerint az egyes peptidek, fehérje fragmentumok azonosítása a tumoros szövet spektrumán belül később lehetővé teszi majd, hogy tömegspektrometriával egyre specifikusabb molekuláris faktorok gyors kimutatása is megoldható legyen.

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

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

Anyagok és módszerek

Bipoláris koagulációs csipesz és tömegspektrométer összekapcsolása (BF-MS)

Kereskedelmi forgalomban lévő a műtétek során egyébként is alkalmazott, eredetileg vízcsepegtetési, általunk módosított bipoláris csipeszt használtunk (ERBE Elektromedizin GmbH, Tübingen, Németország), amely a REIMS technikához hasonlóan az ionizációt is megvalósította az in vivo sebészeti beavatkozások alatt. A minta ionizációja a sebészeti beavatkozás helyén megtörténik a szövetdarab elektromos disszekciója során. A keletkezett sebészi „füstöt”, valójában evaporátumot, még helyesebben aeroszolt a csipesz hegyétől kissé magasabban lévő eredetileg a csepegtetésre tervezett réseken szívtuk el. A csipesz másik végét egy 4 méter hosszú, 1/8 col külsőátmérőjű és 2mm belsőátmérőjű teflon csővel kötöttük össze az

LTQ Velos (ThermoScientific, Bremen, Németország) vagy LCQ Deca XP Plus (ThermoFinnigan, San Jose, Kalifornia, USA) tömeg spektrométerek általunk készített kapilláris bemeneteivel. A szívásért felelős mikro pumpát sűrített levegővel hajtottuk meg 2,5 bar névleges bemeneti nyomással (a klinika központi sűrített levegő hálózatból). A pumpa tömeg spektrométer gyári „electrospray” ion forrásával lett összeépítve az atmoszférikus bemenetre merőlegesen azért, hogy redukálja a tömeg spektrométer belső részeit érő szennyeződést.

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

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

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

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

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

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

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

A szövetek dezintegrációjára és eltávolítására a kereskedelmi forgalomban levő ultrahangos szívót (CUSA, Cavitron Ultrasound Aspiration) használtuk (Selector, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Németország). Az ultrahangos dezintegrációt 24 kHz frekvenciával és 60%-os energiafokozat mellett végeztük. Teflon csővel (1/16 col külsőátmérő, 1,2 mm belsőátmérő) helyettesítettük a kézidarab szívóoldalát, hogy a memória effektust csökkentsük. Ezt a Teflon csövet kötöttük egy módosított Venturi pumpához egy 2 méter hosszú (1/8 col külső, 2 mm belsőátmérőjű) Teflon csővel. Ebben az összeállításban a Venturi pumpát nitrogén gázzal hajtottuk meg 10 bar névleges nyomással. A Venturi pumpa a tömegspektrométer atmoszférikus bementére lett felszerelve itt is, a fentieknek megfelelően, merőlegesen a

kapillárisra. Az ezzel megegyező atmoszférikus interfészt korábban Santos és mtsai írták le és Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization-nak nevezték el (V-EASI). A nagy felbontású tömegspektrometriai mérések Thermo LTQ Orbitrap Discovery (ThermoScientific, Bremen, Németország) eszközzel történtek. Az kis felbontású méréseket pedig egy LCQ Deca XP Max (ThermoFinnigan, San Jose, Kalifornia, USA) quadropole ioncsapdájú tömegspektrométerrel végeztük el.

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

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

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

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

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

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

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

Az egyes tömegspektrumok felvétele egy szövet egyszeri mintavételezését követő tömegspektrometriás mérésből, negatív és vagy pozitív ionmóddal, 150-1000 m/z értékek között történtek. A más ionmóddal vagy m/z értékkel történt kivételeket jeleztük. A spektrumok adatait digitalizáltuk 0,01 m/z felbontást használtunk a nagyfelbontású méréseknél és 1,0 m/z értéket az alacsony-felbontású méréseknél és az adatokat SQL (Structured Query Language) adatbázisban tároltuk (Oracle, Redwood City, Kalifornia, USA). Az adatbázis tartalmazza a spektrumhoz tartozó minta teljes klasszikus szövettani eredményeit, klasszifikációját, WHO grádusát.

A teljes spektrumokat tároltuk és a későbbi spektrumok gyors megfeleltetéséhez a teljes spektrumot analizáltuk. A kiválasztott, normalizált teljes spektrumon PCA (principal component analysis) analízist végeztünk, hogy a dimenziók számát 60-ra csökkentjük. A PCA-t követően LDA (linear discriminant analysis) analízist végeztünk a dimenziók számának csökkentése nélkül. A dimenziók számának megválasztása kereszt-validációs vizsgálatok által korábban meghatározottak szerint történt, ahol a mérési hibát a komponensek számának függvényében tesztelték. A létrejövő PCA/LDA modellt szintén az adatbázisba mentettük és majd a szövettípus meghatározáshoz használtuk vagy demonstráció céljából az első három PCA vagy LDA

komponensek átlagának függvényében (relative abundance) ábrázoltuk. Emellett a szövetek első három LDA vagy PCA értékének 3 dimenziós koordináta rendszerben való ábrázolását szemléltetesképpen használtuk.

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

Alkalmazott biztonsági szabályok az aeroszolak belélegzésével kapcsolatban

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

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

Huszonhat szövetmintát (23 glioblasztóma és 3 peritumorális szövetminta) gyűjtöttünk össze idegsebészeti beavatkozások során a Debreceni Egyetem, Idegsebészeti Klinikáján. A mintákat az eltávolítást követően folyékony nitrogénben rögtön lefagyasztottuk és -80 °C tároltuk a felhasználásig. A szövettani analízishez és genetikai vizsgálatokhoz a kivett minta ugyanazon darabjait használtuk. A tumorok szövettani diagnózisát formalinnal fixált, parafinba ágyazott metszetek hematoxin-eozin festése és további immunhisztokémiai vizsgálata alapján állapítottuk meg. A tumorok szövettani klasszifikációja a WHO 2007-ben kiadott "Classification of Tumors" szabályai alapján történt. A Debreceni Egyetem etikai bizottsága engedélyezte a minták gyűjtését és felhasználását. A betegek beleegyező nyilatkozat aláírásával hozzájárultak a kivett szövetek tudományos felhasználásához.

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

A fagyasztott mintákat egy éjszakán keresztül -20 °C-on RNAlater Ice (Qiagen, GmbH, Germany) oldatban inkubáltuk. A szövetmintákból való RNS izoláláshoz RNeasy Mini kit-et (Qiagen, GmbH, Germany) használtunk. Az RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) és 1% TAE agaróz gél használatával határoztuk meg. Minden egyes mintából 250 nanogram RNS-t írtunk át cDNS-é QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) felhasználásával 20 mikroliternyi végső térfogatban. A kontrollként beta-aktin (ACTB) gént használtunk. A gén specifikus primereket a pGHRHR-hoz (sense: 5'-CACGTCTTCTGCGTTGAG-3', antisense: 5'-GCATCTCCTCTGCTGCTTGT-3') és SV1-hez (sense: 5' GGAGTTGTGGCTAGAGAG-3', antisense: 5'-GCATAGAACAGTGGAGAAG-3') a primer3_www.cgi v0.2 programmal terveztük (71) a GHRH, SV2 és ACTB primereinek tervezését és szintézisét korábbi közleményeknek megfelelően végeztük. Minden PCR reakcióban a cDNS 1 mikroliterjét

amplifikáltuk egy összesen 25 mikroliteres oldatban, amely 1,5 millimol $MgCl_2$ -ot, egy egységnyi PCR puffert (Fermentas, Germany), 0,3 millimol mindegyik deoxinukleotidból (Promega, Germany), egy egység TrueStart HotStart DNS polimerázt (Fermentas) és mindegyik primerből 0,25 mikromol tartalmazott. A mintákat 3 percig 95 °C-on denaturáltuk, majd az ACTB-nél harminc egyébként negyven cikluson keresztül 45 másodpercig 95 °C-on, azután 30 másodpercig 54 °C-on az SV1, 59 °C-on az SV2, 64 °C-on a GHRH illetve 67 °C-on a pGHRHR esetében, majd 1,5 percig 72 °C-on végeztük az amplifikációkat, amelynek végén 10 percig 72 °C-on álltak a minták. Minden egyes amplifikátum 10 mikroliterét 1,5%-os agaróz gélen elektroforézissel megfuttattuk, etidium bromiddal festettük és UV fény alatt láthatóvá téve elemeztük.

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

Minden mintából 600 nanogram RNS-ét ártunk át cDNS-re High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, CA, USA) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. Ezután SYBR Green Premix Ex Taq-alapú assay-t használtunk az EGFR és PTEN mRNS expressziójának meghatározására (Takara Bio Inc., Japan). A vizsgálathoz a következő primereket használtuk 0,25 mikromol végső koncentrációban. EGFR (sense: 5'-CTC AGC CAC CCA TAT GTA CC-3'; antisense: 5'-CGT CCA TGT CTT CTT CAT CC-3'), PTEN (sense: 5'-AGC ATC ACC ATT CTT TGC TG-3'; antisense: 5'-ACC ACA GCC ATC GTT ATG AA 3') and GAPDH (sense: 5'-CAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'; antisense: 5' TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3'). Minden reakció 15 nanogram cDNS-t tartalmazott triplikátum formátumban és Mx3005P™ real-time PCR System segítségével amplifikáltuk (Agilent Technologies, USA) a következő hőmérséklet profil mellett: aktiváció 1 percig 95 °C-on, 40 ciklus amplifikáció 1 percig 95 °C-on, majd 30 másodperc 55 °C-on (GAPDH), 58 °C-on (EGFR), 60 °C-on (PTEN) esetében, majd 1 perc inkubálás 72 °C-on. Minden esetben az olvadási görbét meghatároztuk. A gén expressziók változását (fold change) a $\Delta\Delta C_t$ módszer alapján határoztuk meg GAPDH belső kontroll mellett. Kalibrátorként a peritumorális mintákat használtuk.

Statisztikai analízis a génexpressziós vizsgálatoknál

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

A spinális epidurális limfómák retrospektív analíziséhez használt módszerek

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

Eredmények

A tömegspektrometria idegsebészeti alkalmazása

Az eszközök idegsebészeti és a műtéti körülményekhez való adaptációját a szerző végezte. A módosított bipoláris csipesz és a CUSA optimális intraoperatív alkalmazásához szükséges változtatások az összekapcsolás módjának kidolgozása és a paraméterek beállításának idegsebészeti aspektusai szintén a szerző munkája. Az idegsebészeti eszköz és a kapcsolódó műszerek helyes működését, amennyiben nem ő operált, a disszertáció szerzője felügyelte, továbbá a műtétek mintegy negyedét hajtotta végre. A tömeg spektrometriai mérések ellenőrzését, a mérések feldolgozását a spektrometriában jártas szakemberek, a szerzőtársak végezték. A szövettani és a klinikai adatok begyűjtését és az analízisek eredményeinek végső idegsebészeti értékelését szintén a szerző végezte.

A bipoláris csipesz és tömegspektrométer direkt összekapcsolásával szerzett eredményeink

Összesen 55 műtét során végeztünk tömegspektrometriai méréseket. Az első 44 páciens műtétje során összesen 264 spektrumot vettünk fel és szövettan specifikus adatbázist hoztunk létre. A negyvennégy műtét során *glioblasztóma*, további gliomák, metasztázisok, meningeoma, *limfóma*, neurilemmoma, ganglioglioma szövettani diagnózisok fordultak elő. A 44-ből 4 műtét során a peritumorális állomány koagulációjakor is sikerült mintát venni. További 11 páciens műtétje során felvett spektrumokkal teszteltük az adatbázist (szövettanilag: 5 glioblasztóma, ugyanitt 1 peritumorális agyszövet, 3 metasztázis, 3 meningeoma). Emellett az adatbázis felépítésekor létrehozott szövettanspecifikus PCA/LDA modellek egymás közötti keresztvalidációját is elvégeztük.

A műtétek során felvett ép agyszövet, glioblasztóma és metasztázis spektrumok részben átfedést mutatnak, azonban látható az is, hogy az egyes spektrum csúcsok egymáshoz viszonyított aránya szignifikánsan különbözik és szövetspecifikus eloszlást mutat. Továbbá, ahogy várható volt a metasztatikus tumorszöveteknél különbözött a csúcsok eloszlása leginkább a normál agyszövetétől és az elsődleges agytumороknál pedig kevésbé. Ahogy korábbiakban leírtuk az 55 beteget két csoportba osztottuk. Az első csoportba került 44 páciens műtétje során felvett spektrumokat az adatbázisba mentettük. A második csoport 11 betegének spektrumait pedig független validációra használtuk.

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

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

glioblasztóma minták és a különböző grádusú asztrocitómák is jól elkülönülnek egymástól és a többi szövetmintától.

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

Látható azonban, hogy 55 beteg esetén az operált agytumorsek diverzitása megnehezítette, hogy elég adatot gyűjtsünk egyszerű statisztikai multivariancia analízisek végzéséhez. Azonban az általunk kialakított PCA+LDA algoritmusunkat használva az adatok statisztikai analíziséhez a módszer még a gyűjtött minták száma mellett is alkalmas az egészséges és tumoros agyszövet, a primer és a metasztázis agydaganat elkülönítésére és potenciális lehetőséget nyújt a különböző grádusú primer daganatok elkülönítésére is. Ennek illusztrálására a felvett spektrumok első három LD értékét ábrázoltuk 3 dimenziós koordináta rendszerben, ahol az egyes LD értékek adták meg az x, y, z koordinátákat.

A módszer előnyét a kísérleteink során elsősorban az adta, hogy a REIMS technikához hasonlóan a szövet koagulációja során keletkező gáz halmazállapotú aeroszol direkt vizsgálható a tömegspektrométerrel. Másrészt a REIMS technika során felgyűlt tömegspektrometriai analízisben szerzett tapasztalatokat fel tudtuk használni.

Azonban a rendszer legnagyobb hátrányát pont az elektromos hőhatáson alapuló mintavétel jelentette, mivel ez az idegsebészeti környezetben korlátozottan alkalmazható főleg, ha nem csak a tumoron magán szeretnénk méréseket végezni és információt gyűjteni. Elokvens területek közelében sokkal inkább megfelelőnek tűnt a CUSA alkalmazása.

A CUSA és a tömegspektrométer összekapcsolásával elért eredményeink

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

Habár az elszívott szövettörmelék spray ionizációja tűnt a legegyszerűbb megközelítésnek, a makroszkópos szövetdarabok jelenléte hatékonyan meggátolta bármilyen hagyományos spray ionizációs összeállítás használatát, amely kapillárisokat használ a folyékony minta továbbítására.

A nemrégiben leírt Venturi “easy ambient sonic spray” ionizációs technika, azonban lehetővé teszi az 1mm-t meghaladó átmérőjű csövek használatát a mintának a tömegspektrométerbe történő juttatására. Másrészt a Venturi eszköz elég szívóerőt tud produkálni a folyékony minták továbbításához.

A kísérleti összeállításunkat először sertés agy vizsgálatával teszteltük. És ezt az *in situ, in vivo* eszköz modelljének tekintettük. A nem szokványos mintavételi módszer és a folyékony, darabos minta gázhalmazállapotba való transzformálása majd ionizálása azonban számos problémához vezetett. Ezért a sertés agyvelőn végzett kísérleteink során vizsgálnunk kellett az eszköz többféle paraméterének hatását a spektrum jelintenzitására, minőségére. Ebben az összefüggésben vizsgáltuk a CUSA eszköznél az ultrahang energiáját, a Venturi pumpa nitrogén

beáramlási nyomását, az atmoszférikus interfész relatív geometriáját, az analizátor feszültség beállításait és a spektrométer kapilláris bemenetének hőmérsékletét.

A szignálintenzitás erősen függött a dezintegrációra használt ultrahang energiájától. Az eredmények világosan mutatták, hogy a sejtek ultrahangos felbontása, dezintegrálása előfeltétele annak, hogy a sejtkomponensek magas koncentrációt érjenek el az öblítő folyadékban és így megfelelő spektrum minőséget kapjunk. Az eredmények azt is megmutatták, hogy a bemutatott eszköz és a működési stratégia nem használható ultrahangos dezintegráció nélkül, vagyis nem működik az idegsebészetben is széles körben használt egyszerű sebészi szíróval.

A jelerősség és a Venturi pumpa bemeneti nitrogén nyomásának vizsgálata dinamikus kapcsolatot mutatott tiszta telíthetőségi maximummal a 0-30 bar tartományban. Az egyértelmű optimális határérték miatt a további kísérletekben 10 bar nyomású nitrogént használtunk a Venturi pumpa meghajtására.

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

Ezt a feltételezést az a megfigyelés is alátámasztotta, hogy csak azoknak az alkotó molekuláknak a csúcsai voltak detektálhatók, amelyek a folyadékban disszociálódtak. Azért, hogy ezt a szónikus spray ionizációs mechanizmus hipotézist bizonyítsuk, leszűrt szövet homogenizátumot vizsgáltunk tradicionális sonic spray ionforrással. Az így kapott spektrumok nagyon hasonlóak voltak a CUSA/SSI felvett eredményekhez. További kísérleti bizonyítékot nyújtott a glutamin aminosav oldatának különböző pH értékeken történő porlasztása. A keletkező anion és kation pH függő intenzitása majdnem identikus volt a Venturi eszköz és a tradicionális szónikus spray ionforrás esetén, hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz.

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

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

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

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

Az ionoptika optimális beállítása is különbözött a Venturi technika esetén a klasszikus elektro spray ionizációnál vagy a légköri nyomású kémiai ionizációnál szokványos beállításoktól.

A semleges elektród (az eredeti beállításban ez földelt) -90 Voltra töltésénél körülbelül ötszörös jelerősödés jött létre.

A módszer általános érzékenységét mind a teljes spektrum információk, mind az egyedi összetevők detektálásával határoztuk meg. Az előbbi esetben változó mennyiségű sertés agy fehérállományát oldottuk fel 1 ml fiziológias sóban az ultrahangos kézidarab segítségével és szívtuk fel a Venturi pumpa segítségével a tömegspektrométerbe. A kapott spektrumokat integráltuk és a különböző csúcsok jel-zaj arányát ábrázoltuk a szuszpendált szövet tömegének függvényében. Az eredményekből következően teljes spektrális információ már 500 mikrogrammos vagy nagyobb szövet felhasználása esetén is rendelkezésre áll és a spektrum mintázata változatlan. A fő csúcsok azonban már 50 mikrogram/ml-es koncentrációban is rendelkezésre állnak. Az egyedi összetevőkre való érzékenységet substance P és foszfátidil etanolamin kimutatásával teszteltük. A kimutathatósági határt három különböző agyszövet koncentrációban vizsgáltuk. A megfigyelt LOD (limit of detection, kimutathatósági határ) értékek (3:1 jel-zaj arány mellett) nanogram/milliliter tartományban voltak a peptidok és 100 nanogram/milliliter tartományban a foszfolipid komponensek tekintetében. Az érzékenység értékek megfelelnek konvencionális sonic spray ionizációs technikák érzékenységének és a szöveti komponensek kimutatását a fenti bizonyítékok alapján nyomnyi koncentrációban is lehetővé teszik.

Az így kialakított modell rendszerünkkel felvett spektrumok alapján, mint ahogy elméletileg is várható volt a spray ionizáció során létrejövő ionok főleg változatos lipidcsúcsoknak felelnek meg a spektrumban, amelyek az egyszerű zsírsavaktól a glicerofoszfolipidek vagy szulfatid-glikoszfinolipidek jelenlétét mutatják. A sertés agyminták vizsgálata során többféle lipidfrakciót tudtunk azonosítani.

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

A human agyminták negatív módban felvett spektrumában többszörösen töltött peptid anionok jelenlétére utaló csúcsok vannak. Agytumor mintákat vizsgálva az általunk A-nak és B-nek elnevezett ionszignálok egy 3788,3 Da és egy 4960,5 Da molekulatömegű peptid jelenlétét jelzik. Az A szignál a molekulatömege és töltöttsége alapján a CGRP (calcitonine gene related peptide)-nek felel meg, amely a központi idegrendszerben bőségesen előfordul és a tüdőtumork esetében is diagnosztikus markerként írják le. A B szignált a korábbi kísérletek a béta-timozin peptidhez rendelik, amelyet szintén a kissejtes tüdőtumork prognosztikai markereként írtak le. Ebben az esetben a kísérleti azonosításunk egyszerű ellenőrzése azon a tényen alapult, hogy a vizsgált minta kissejtes tüdőtumor agyi áttétje volt. Azonban egy ilyen típusú azonosítás validálásához számos tovább kísérlet, vizsgálat szükséges.

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

A CUSA/SSI spektrum tekintélyes szövetspecifitást mutat még ép, poszt mortem, human agyszövetminták esetén is. A szürke és a fehérállomány területéről vett minták a módszerrel karakterisztikus különbséget mutatnak. Hasonlóan a MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) imaging, DESI (desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging) vagy a REIMS technikákkal gyűjthető komplex lipid komponens spektrumokhoz az

általunk gyűjtött spektrumok szövetspecifitása sem a szövetspecifikus biomarkerekhez kapcsolódott, hanem inkább az azonos lipid komponensek spektrális mintázatának eltérő eloszlásán alapult. Mivel az egyedi ionintenzitások kevésbé informatívak a szöveti azonosításra teljes spektrális információkat használtunk. Nyilvánvaló, hogy a tömegspektrometriás ujjlenyomatot használó azonosításhoz a korábbiakban is leírt adatbázis szükséges, amely tartalmazza a szövettanilag már verifikált autentikus spektrumok összességét.

A spektrális adatbázist részben humán friss fagyasztott *ex vivo* minták (humán agytumorminták) és friss post mortem minták (humán post mortem, ép agyszeletek) használatával alakítottuk ki. Az *ex vivo*, friss post mortem (24 órán belüli) és friss fagyasztott minták közötti spektrális különbség elhanyagolhatónak bizonyultak korábbi állatkísérleteink során.

Az adatbázis 284 szövettanilag ellenőrzött agytumorminta spektrumait tartalmazta és ezt az adatbázist használtuk az azonosítási algoritmus kifejlesztéséhez. A 600-1000 m/z érték között felvett spektrumokat digitalizáltuk és normalizáltuk. A módszereknél kifejtett PCA-t végeztünk, hogy a spektrumot jellemző dimenziók számát 60-ra csökkentjük.

Habár az adatok így is teljes elkülönülést mutattak, irányított LD analízist végeztünk, hogy tovább növeljük az egyes csoportok közötti szegregációt. Így várhatóan az egyidejű analízis meghatározza az aktuálisan felvett minta helyét az adatbázis 60 dimenziós LDA terében és klasszifikálja a spektrumot a legközelebbi szövettan-specifikus adatcsoporthoz. Mivel az LDA tér nem ortogonális az új spektrum dimenzióink távolságát a már ismert szövettani csoportok dimenzióitól négyzetes Mahalobonis teszttel határoztuk meg a módszerekben leírtaknak megfelelően.

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

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

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

A glioblasztómával operált páciensek klinikai adatainak elemzése

Huszonhárom primer glioblasztómában szenvedő beteget operáltunk meg 2005 novembere és 2008 novembere között. A rezekált szolid tumorok mintáit vizsgáltuk. Csak egyértelműen primer glioblasztómás esetek válogattunk be, ahol a legnagyobb tumorátmérő 3 centiméter felett volt, de a páciens állapota mind pre-, mind posztoperatív az utókezelést lehetővé tette és makroszkóposan jó rezekció történt. 15 esetben a műtét a tumor első felismerését követően történt. A beavatkozás után a szövettan ismeretében standard posztoperatív kezelést kezdeményeztünk. A posztoperatív kezelést négy esetben leállítottuk a tumor rapid progressziója és a beteg állapotának gyors romlása miatt. Egy esetben pedig a beteg non-compliance-e miatt. A 23-ból 8 esetben korábbi műtét történt és a páciensek megkapták a szokásos utókezelést a

bebizonyosodott glioblasztóma szövettan miatt. Ezekben az esetekben a tumorrecidíva reoperációjakor gyűjtöttünk mintákat. Ebből a 8 esetből 4-ben az első műtétből is rendelkezünk mintával. Három esetben peritumorális mintát is be tudtunk szerezni, amelynek eltávolítása a tumor eléréséhez szükséges volt. Ezeket a szöveteket a később mért EGFR és PTEN expressziós értékek kalibrálásához használtuk.

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

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

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

Az EGFR és PTEN expresszió a vizsgált mintákban

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

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

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

A génexpressziós eredmények és a kliniko-patológiai adatok analízise

Az elvégzett statisztikai analízisek azt mutatták, hogy az SV1 pozitív mintákban a PTEN expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint az SV1 negatív esetekben. További analízishez a

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

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

Összesen 13 epidurális (7 Hodgkin és 6 Non-Hodgkin limfóma) érintettséget találtunk a vizsgálat időszakban. Ez az előfordulási gyakoriság az irodalmi adatokkal megegyezik. A 13 esetből 6 (46,15%) betegnél az első megjelenés az epidurális érintettség volt és minden betegnél a műtéti szövetszövetminta vezetett a primer diagnózishoz. Mind a hat beteg posztoperatív kezelésben részesült. Habár a műtéteket analizálva, minden esetben csak dekompresziót végeztünk és a posztoperatív követés során nem jelentkezett spinális instabilitásra utaló jel, az eredményekből jól következtethető, hogy a szövettani diagnózis *in situ* megismerése a műtéti technikában a spinális dekompreszió minimál invazív megoldása felé mozdítaná a sebészt, mivel a posztoperatív radio- és kemoterápia kimagaslóan hatásos. A kórkép onkológia kezelés melletti átlagos, teljes túlélési ideje pedig azt mutatja, hogy ha maga a folyamat vagy a dekompreszió instabilitáshoz vezet, akkor az instrumentális stabilizáció mindig mérlegelendő a beteg minél jobb mobilitásának megtartása érdekében.

Diszkusszió

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

Emiatt az idegsebészetben használt delikat szívek felé fordult az érdeklődésünk. A környező szövetek roncsolása nélkül az ultrahangos szívválválal lehet az idegsebészetben jelenleg a legfinomabban szöveteket eltávolítani. Azonban ebben az esetben, a minta nem alkalmas egyből tömegspektrometriai analízisre, gázalmazállapotba kell hozni és ionizálni kell. Erre alkalmasnak

ígérkezett a Venturi pumpa közbeiktatásával létrehozott szónikus spray ionizáció. Az új eszközkombináció számos paraméterében igényelt tesztvizsgálatokat. Az optimális beállítások biztosítása után kezdtük el a rendszer analitikai képességeit vizsgálni. És végül a szövettani verifikációra való alkalmasságot.

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

Azonban a szövettani diagnózishoz, hasonlóan a bipoláris csipessel végzett kísérletek esetén itt is egy szövettan-specifikus adatbázis kellett létrehozni. A bebizonyítottuk, hogy a létrehozott PCA/LDA modellünk alkalmas a gyors analízisre. Továbbá bemutattuk, hogy a rendszer (2-3 másodperc) jelentősen gyorsabb szövettani diagnózishoz juttathatja az operatórt, mint a friss fagyasztott metszeten alapuló intraoperatív szövettan (30-40 perc) vagy az off-line tömegspektrometriai analízis (~10 perc).

Az analitikai eredményeink különösen gliomák, glioblasztómák és metasztatikus tumorok esetén voltak kiemelkedőek. Azonban megfelelő adatbázis mellett más tumortípusok is kimutathatók.

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

Az on line analízis további előnye, hogy az elszívott szövetrészletek akár gyorsan egymás után, így virtuálisan folyamatosan azonosíthatók vele, amely szignifikánsan javíthatja a beavatkozás precizitását. Emellett kimutattuk, hogy az ép és a tumoros szövetek között is képes különbséget tenni a rendszer. Ennek alkalmazása pedig az infiltratív gliomák műtéteinél lehet kiemelten hasznos. Habár a módszert a bipoláris csipessel ellentétben nem teszteltük egyelőre *in vivo*, *in situ* körülmények között, a módszer feltehetőleg hasonlóan jól teljesítene. Szélesebb nem csak idegsebészeti kontextusban a CUSA/SSI technika használható lenne egy általános felszíni analitikai technikaként is, hasonlóan a Van Berkel és mtsai által leírt experimentális SSP-ES-MS (surface sampling probe – electrospray - mass spectrometry) technikához.

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

A vizsgálatunkkal először bizonyítottuk, hogy a GHRH és splicing variáns, SV1 receptora expresszálódik humán glioblasztómákban. Ezen kívül kimutattuk, hogy a GHRH és SV1 expressziós mintázata korrelál a teljes túléléssel. A GHRH expressziójának erős pozitivitása (61,9%) azt sugallja, hogy a GHRH útvonal szerepet játszhat a glioblasztómák patogenezisében. Ezt támasztják alá korábbi vizsgálatok, amelyekben a GHRH kezelés növelte a szívizom és a tumoros sejtek túlélését.

Összefoglalva vizsgálatunkban a GHRH negatív, SV1 pozitív esetek rövidebb teljes túlélést mutattak. Megfordítva a GHRH pozitív, SV1 negatív esetek hosszabb túlélést mutattak. Ezt részben alátámasztják azok a korábbi eredmények, hogy a GHRH receptor expressziója rektum tumorokban korrelált a kemoterápiára adott gyenge válasszal. Ez és a mi eredményünk is felveti, hogy nem csak a parakrin és autokrin GHRH játszhat szerepet a tumor progresszióban az SV1 receptor aktiválásán keresztül és nem csak lokális intratumorális reguláló faktorok

csökkenthetik a tumoros GHRH expressziót. A tumoros GHRH expresszió, vagyis a GHRH autokrin felszabadulása negatív visszacsatolás alatt állhat. Ez a hatás a GHRH expresszió down-regulációján alapulhat szisztémás GHRH vagy más ligand által mediálva SV1 vagy akár más receptorokon keresztül. Ezen kívül a GHRH más receptoron keresztül is hathat, mint az SV1 és ez a hatás lehet protektív. Az egyik feltételezett receptor, amely mediálhatja a GHRH-ra adott választ a VIP (vasoactive intestinal peptide) receptor lehet, és ez a receptor hatás lehet hasonlóan protektív, mint a tüdőtumorkok növekedése esetében a ligand VIP hatása. Vesesejtes karcinómák növekedését szintén gátolja a VIP és PACAP (pituitary adanilate cyclase-activating peptide). Összegezve a GHRH útvonal további vizsgálata glioblasztómákban terápiás szempontból is jelentős eredményeket hozhat.

Az értekezés új tudományos eredményei

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

A bipoláris csipesszel és az ultrahangos szívóval végzett tömegspektrometriai méréseink kimutatták, hogy az ép és tumoros területek elkülönítése lehetséges, ezzel az eszköz segítheti a sebész munkáját. Továbbá mindkét eszköz sikeresen párosítható neuronavigációs rendszerhez. Az ultrahangos rendszer legfőképp a gliomák, glioblasztómák műtéteinél lehet hasznos és javíthatja a biztonságos eltávolítás mértékét.

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

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

Kulcsszavak

neuro-onkológia, mikro-idegsebészet, tömegspektrometria, valós idejű, *in situ* szövetanalízis, splicing variáns peptid receptrok, kemoterápia, radioterápia

A jelöltnek az értekezés témájában született publikációinak a Kenézy Könyvtár által hitelesített listája:



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Jelölt: Mezey Géza
Neptun kód: H8K54A
Doktori Iskola: Ideg tudományi Doktori Iskola

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



További Közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,666

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

Debrecen, 2014.11.17.

A disszertációhoz kapcsolódó előadások és poszterek listája

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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