

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A GLIOBLASZTÓMA JELENLEGI TERÁPIÁS KORLÁTAinak
ÖSSZEFÜGGÉSEI AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX ÖSSZETÉTELÉVEL**

Dr. Hutóczki Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Bognár László



DEBRECENI EGYETEM

Ideg tudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2016

A GLIOBLASZTÓMA JELENLEGI TERÁPIÁS KORLÁTAINAK ÖSSZEFÜGGÉSEI AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX ÖSSZETÉTELÉVEL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Hutóczki Gábor okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bognár László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora
tagok: Dr. Balkay László, PhD
Dr. Valikovics Attila, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

2016. szeptember 9. 11:00
Debreceni Egyetem ÁOK, Idegsebészeti
Tanszék könyvtára

Az értekezés bírálói:

Dr. Bagó Attila, PhD
Dr. Kopniczky Zsolt, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora
tagok: Dr. Bagó Attila, PhD
Dr. Balkay László, PhD
Dr. Kopniczky Zsolt, PhD
Dr. Valikovics Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2016. szeptember 9. 13:00
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület előadója

1. BEVEZETÉS

A központi idegrendszeri (CNS) daganat a 20 és 39 év közötti férfiaknál a leukémia után a második leggyakoribb tumorról kapcsolatos halálok, a 0-19 éves gyermekek esetén pedig a leggyakoribb tumor típus. Alapvetően elődleges (primer, a CNS-ben kialakult) és másodlagos (szekunder, áttétes) csoportokat különböztetünk meg. Az elsődleges agydaganatok közül morbiditás és mortalitás alapján kitüntetett szerepük van a gliómáknak, melyek a neuroepitheliális szövet daganatai közé tartoznak. Ez a szövettípus a neuronokat és az azokat támogató hálózatot alkotó gliasejteket (astrocyta, oligodendrogliá, ependyma, radiális glia, mikroglia) foglalja magába. A gliasejtek daganatos átalakulásukból jönnek létre a különböző típusú gliómák. Megjelenésük, agresszivitásuk, kiújulási hajlamuk, illetve kezelhetőségük alapján a WHO I-IV. grádusba sorolja őket. Az I.-II. grádust az úgynevezett alacsony grádusú gliómák (LGG) foglalják magukba, míg a III.-IV. grádusú daganatok a magas grádusú gliómákat (HGG) jelentik. Ez utóbbiak közül a legnagyobb jelentőségű a külön névvel illetett IV. grádusú glióma, azaz a glioblasztóma multiforme (GBM), ami a gliómák 54 %-át és az összes primer központi idegrendszeri daganat 17 %-át teszi ki. Ez a daganattípus rendkívül rossz prognózisú, gyorsan növekvő, agresszív.

A múltban a sebészi eltávolítás önmagában 3-5 hónapos átlagos túlélést hozott, melyet később a kiegészítő posztoperatív radioterápia 8-11 hónapra nyújtott meg. Emellett

számos kemoterápiás szert is kipróbáltak, azonban ezek alkalmazása önmagában, vagy a sugárkezeléssel kombinálva sem hozott szignifikáns javulást.

2005-ben Roger Stupp és munkatársai 576 beteg vizsgálata alapján a konformális besugárzással kombinált temozolomid kezelés kedvező eredményeit közzölték, ami a medián túlélést 14,6 hónapra növelte. Ez mérföldkőnek bizonyult a glioblasztóma posztoperatív kezelésében és a széles körű bevezetése óta a munkacsoport vezetőjének nevével illetett konkuráló kemoirradiáció standardként használt.

A temozolomid az imidazotetrazine családba tartozó, kedvező farmakokinetikai tulajdonsággal bíró alkiláló ágens, ami a központi idegrendszerbe jól penetrál, közel 100%-os a biológiai hozzáférhetősége és alkalmazása relative enyhe mellékhatásokkal jár. A daganatsejtek DNS-ének alkilálása révén fejti ki hatását, mely során a javító enzimek egyes és kettős lánctöréseket hoznak létre a DNS kettős spirálban így aktiválva az apoptózis útvonalakat. A temozolomid az első választandó szer újonnan diagnosztizált glioblasztóma esetében, emellett más gliómákban is bizonyított hatékonysága. Sugárkezeléssel kombinálva a konkuráló fázisban általában 75mg/m² dózisban, később monoterápia formájában kezdetben 150mg/m² majd 200mg/m² dózisban alkalmazzák. A konkuráló kezelésben a temozolomid radioszenzitizációja jelenti az adjuváns hatást, melyet többek között az alábbi mechanizmusok útján ér el: a károsodott DNS kijavításának elégtelensége, autofágia és apoptózis indukció, epiteliális-mezenhímális tranzíció megfordítása.

A komplex kezelés ellenére is sajnos törvényszerű a kiújulás mely rövid időn belül a beteg halálát okozza. A glioblasztómát napjainkban gyógyítani nem lehet, a cél a progresszió lassítása és beteg életminőségének minél további megőrzése. A folyamatos kiújulás oka az, hogy a daganat kifejezett infiltratív tulajdonsággal bír és ezáltal teljes sebészeti reszekciója lehetetlen. A kezelés gerincét a minél nagyobb tumor tömeg eltávolítása és az ezt követő onkoterápia képezi.

A metasztázisok ezzel ellentétben megjelenésükben, viselkedésükben és kezelhetőségükben is alapvetően eltérnek a gliómáktól. Átlagos incidenciájuk 9% - 17% között van, de ezt évről évre emelik a folyamatosan újuló képalkotó eljárások és az egyre hatékonyabb szisztémás daganatkezelések, mely utóbbiak nyújtják a túlélést, nagyobb lehetőséget teremtve ezzel központi idegrendszeri áttétek megjelenésére. A primer forrás tekintetében három daganat típusnak van kiemelkedő jelentősége: a tüdő karcinómának, az emlő karcinómának és a melanómának, ezek teszik ki az esetek közel 80%-át, azonban ezek közül is legnagyobb szereppel a tüdő tumor bír, mely önmaga 30-60%-ot képvisel. A szoliter és oligo agyi metasztázisok mellett a beteg életkilátásai jobbak, mint glioblasztóma esetében és a prognózist általában az elsődleges daganat határozza meg. Kezelésük sebészi eltávolításból és/vagy különböző típusú sugárkezelésből áll. Ez utóbbi esetében széles paletta áll rendelkezésre, mely magában foglalja a teljes- ill. fokális agyi besugárzást, a konformális besugárzást és a sztereotaxiás módszereket is. A sebészi kezelés nagyban függ a metasztázis(ok) méretétől, elhelyezkedésétől, környezetéhez való viszonyától, általánosságban azonban elmondható, hogy az áttét általában jól körülírt, állományi

környezetével nem kapaszkodik össze, azt nem infiltrálja így radikális eltávolítása rutin idegsebészeti feladat.

Az elsődleges és a másodlagos központi idegrendszeri daganatok igen eltérő módon lépnek kapcsolatba az őket körülvevő agyszövettel, ami megszabja terjedésüket és ezáltal onkoterápiájuk sikerességét is. A kifejezetten invazív malignus gliómák nagyban különböznek a csaknem szferoid agyi áttétektől és infiltratív zónájukat nehéz intraoperatív megkülönböztetni a peritumorális ép agyszövettől, legtöbb esetben ez teszi lehetetlenné radikális eltávolításukat. Ebben a gyökeresen különböző inváziós potenciálban meghatározó szerepe az extracelluláris mátrixnak (ECM) van.

Az ECM egy fehérjében és rostban gazdag állomány, ami a szervezet többi sejtjeihez hasonlóan a központi idegrendszer sejtjeit veszi körül. Összetételét illetően a mátrix rendkívül heterogén, tartalmaz kollagéneket, elasztint, laminineket, fibronektint, proteoglikánokat, glükózaminoglikánokat, illetve enzimeket. A különböző molekulák, enzimek és szolubilis faktorok kötőszöveti rostok hálózatába vannak ágyazva.

Az ECM egy dinamikus és aktív környezetet biztosít a sejteknek, melyben szoros kapcsolat alakul ki a sejt és az azt körülvevő mátrix között, ami másodlagos jelátviteli útvonalakon keresztül a tumor sejtek inváziójában bír meghatározó szereppel. A peritumorális infiltráció során szoros kapcsolat alakul ki az ECM-el. Ez a sejt-ECM konnexió a sejt-sejt interakcióval és a szolubilis faktorok rendszerével együtt egy komplex kommunikációs hálózatot hoz létre. A környezetet beszűrő tumorsejtek változást hoznak létre a mátrix komponensek expressziójában, valamint a proteázok és szintázok aktivitásában. Ezen peritumorális ECM-ben bekövetkezett változások

felelősek a gliómák és az agyi metasztázisok nagyban eltérő invazivitásáért. Ahhoz, hogy megértsük a különböző típusú anaplasztikus agydaganatok igen különböző invazív potenciálját, a daganatok peritumorális ECM-re gyakorolt hatását és a peritumorális agyszövetben lévő és az invázióhoz köthető ECM komponensek szintjének változását kell vizsgálni. Ennek megismerése és változásainak feltérképezése kulcsfontosságú információval szolgálhat az intrakraniális agyi daganatok eltérő viselkedésének megértéséhez és egy hatékony onkoterápia koncepciójának kidolgozásához.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalomban számos esetben vizsgálták már különböző ECM molekulák szintjét intrakraniális daganatokban, azonban korábban csak néhány kutatócsoport végzett panelszerű, expressziós mintázat létrehozását célzó vizsgálatot. Emellett az agyi daganatokat övező peritumorális állomány is nagyrészt ismeretlen területnek számít a neuro-onkológiában, mint ahogy a glioblasztómák kemoirradiációs kezelésének az ECM szemszögéből történő analizisével is csak nagyon kevesen próbálkoztak. Ezeket figyelembe véve végeztük kutatásunkat ezen a területen.

Napjainkban gözerővel folynak a kutatások olyan típusú szerek kifejlesztésére, amelyek érdemi megoldást jelenthetnek a recidíva problémájára, azonban az átütő siker még várat magára. Ezen terápiák egy részének a célpontja a daganatsejtek

közvetlen környezete, azaz az infiltráció színhelye, az extracelluláris mátrix. A tumorsejtek invázióját alapvetően a mátrixot alkotó molekulák (kollagén, integrinek, lamininek, proteoglikánok, szintetizáló és bontó enzimek, stb.) szabják meg létrehozva egy aktív, dinamikus, „intelligens” közeget, melynek változása kulcsfontosságú a sejtmozgásban. Ezt a változást többek között a releváns mátrix molekulák expressziójának változásával lehet követni. Amennyiben az onkoterápia megváltoztatja a mátrix molekulák expresszióját, az hatással van a tumor infiltratív képességére. E nélkül azonban a konkuráló kezeléstől a tumor inváziós aktivitásának mérséklődése nem várható, és így a kiújult daganat radikális eltávolítására az onkoterápia után sem lesz remény.

Felmerül tehát a kérdés, hogy az invázió milyen változást hoz létre a peritumorális állományban (az milyen mértékben különbözik primer és szekunder agydaganatokban) és hogy a glioblasztóma jelenleg elfogadott standard kezelése okoz-e valamilyen változást a tumor extracelluláris mátrixában, azaz bír-e a konkuráló kemoirradiáció az infiltrációt befolyásoló hatással? Ezen kérdések megválaszolására tűztük ki célul egyrészt az intracerebrális daganatok és a nem-tumoros agyállomány invázióban szerepet játszó ECM komponenseinek és a hozzájuk kapcsolódó molekulák expressziós szintjeinek vizsgálatát, másrészt az onkoterápia előtti és utáni GBM tumormintában meghatározni a releváns ECM komponensek expresszióját és összehasonlító elemzéseket végezni.

3. MÓDSZERTAN

Ahhoz, hogy a központi idegrendszerben vizsgálni lehessen a mátrix molekulák szintjének különbségét és változásukat bizonyos ágensekre első lépésben humán agymintákat kellett gyűjteni. E célból 2005. decemberben létrehoztuk a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat és Szövetbankot, ahol a betegek előzetes beleegyezésével a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Idegsebészeti Klinikájának műtőiben intraoperative eltávolított daganat- és agyszövet mintákat lefagyasztjuk és tároljuk. A szövetbankban jelenleg 55 eltérő szövettani típusba sorolható központi idegrendszeri lézió található és közel 1300 betegből származó minta, amiket eltávolítás után folyékony nitrogén felszínén azonnal lefagyasztunk és -80 Celsius fokon tárolunk. A mintáról számos adatot (beteg azonosító, életkor, mintavétel ideje, verifikált szövettani diagnózis, mintaszám) rögzítünk, melyek a könnyű keresést és statisztikai analízist teszik lehetővé.

Először 27 db humán agyszövet minta került feldolgozásra, melyek során az alábbi három szöveti típust különböztettük meg: glioblasztóma makroszkóposan közvetlenül daganat melletti területe, peritumorális zónája (peri-GBM), tüdő adenokarcinóma intracerebrális metasztázisának peritumorális zónája (peri-Met) és nem tumoros agyszövet (Norm). Mindegyik típus kilenc különböző szövettani mintát tartalmazott. Ezen peritumorális mintavételek csak akkor történtek meg, amikor az a tumor eltávolítása során elkerülhetetlen volt. A peritumorális minták minden esetben a daganat közvetlen közeléből származtak, melyet műtét közben az operatőr

makroszkóposan ép agyszövetnek ítélt meg. Ezeket a mintákat később egy tapasztalt neuropatológus vizsgált és hagyott jóvá, a kritérium az volt, hogy a szövetdarab ne a daganat állományából származzon. A nem tumoros agyszövet mintákat epilepszia sebészet során eltávolított agyrészletekből gyűjtöttük és teljes mértékben tumormentesek voltak. Ezt követően 31 darab humán glioblasztóma szövetmintát vizsgáltunk. A mintákat szintén a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat és Szövetbankból válogattuk ki úgy, hogy 15 darab minta kezelésen még át nem esett betegről származott, 16 esetben pedig sugár- és kemoterápiát követően kiújult daganat reszekciója során nyert tumorszövetet dolgoztunk fel. A minták átlagos mérete körülbelül 5mm³ volt.

Műtétet követően az úgynevezett 'Stupp'-protokoll 60 Gy dózisú konformális sugárkezelést jelent a műtéti területre és a biztonsági zónára, ezzel párhuzamosan napi 75 mg/ m² temozolomid szájon át történő szedését, majd a konkuráló fázis után monoterápiás fázisként az első ciklusban 150 mg/ m², később pedig 200 mg/ temozolomidot magában (öt napon keresztül, 28 napos ciklusokban). Közvetlenül feldolgozás előtt mind az 58 mintából egy szeletet szövettani analízisre küldtünk, melyet szintén neuropatológus jóváhagyása után vizsgáltunk tovább. A munkafolyamat egészét a Magyar Etikai Bizottság (TUKÉB) jóváhagyta és engedélyezte. Minden beteg részletes felvilágosítást követően műtét előtt egy hozzájárulási nyilatkozatot írt alá.

Az agymintákban az ECM molekulák végső szöveti mennyiségét számos folyamat befolyásolja mind a transzkripció, mind a transzláció során (pl.: alternatív splicing,

poszttranszlációs modifikációk), ezért az expressziós profil létrehozásához a mátrix alkotóelemeket RNS (mRNS) és fehérje szinten is analizáltuk. Az irodalmi adatok alapján közel 100 darab molekulát helyeztünk kutatásaink fókuszába, amit az eredményektől függően fokozatosan tovább szűkítettünk. Végül 20 darab ECM alkotóelem szerepe bizonyult kulcsfontosságúnak, ezek a következők: Brevikán, N-kadherin-2, III. típusú kollagén alfa1 lánc, EGFR (erbB1), ErbB2, Fibronektin, CD168, Integrin alfa1, alfa3, alfa7, béta1 láncai, Laminin alfa4, béta1 láncai, Mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2), Mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), Neurokán, Szindekán-1, Tenascín-C, Tenascín-R, Verzikán. A peritumorális és tumormentes mintákban a Szindekán-1 szintjét nem vizsgáltuk.

mRNS analízis

A szövetek RNS tartalmának izolálása során az első feladat a szövetminta mechanikus porítása volt, majd ehhez hozzáadtuk a megfelelő mennyiségű Trizolt. A porított minta TriReagens-ben való homogenizálását késes homogenizátor alkalmazásával segítettük elő. A homogenizátumot centrifugáltuk majd a felülúszóhoz hozzáadtunk a megfelelő mennyiségű kloroformot. Ezután újra centrifugáltuk, így szétváltak a különböző fázisok: a felső vizes fázis (az RNS-t tartalmazza), az interfázis (proteinek) és az alsó, fenolos fázis (a DNS-t tartalmazza). Az RNS fázissal dolgoztunk tovább, melyet nukleázmentes vízben oldottunk fel. A teljes feloldódás után a mintákon mennyiségi, tisztasági, valamint minőségi analízist végeztünk. Az RNS oldatot RNEasy-vel tisztítottuk, majd a tisztított RNS mintákat reverz transzkripciót

alkalmazva polimeráz láncreakció segítségével visszaírtuk egyszálú cDNS-é. A következő lépés a kapott cDNS-ek kvantitatív PCR feldolgozása volt. Mintáink analiziséhez TaqMan Low Density Array-t használtunk. A mikrofluidikai kártyákat SDS 2.1 szoftver segítségével elemeztük, és a kapott relatív kvantifikációs CT értékeket használtuk fel további analízisre. A beta-aktin és a glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) úgynevezett háztartási gének mutatták a legkisebb eltérést a minták között, így ezeket használtuk referencia génként a deltaCT értékek meghatározására. Az expressziós értékeket az összehasonlító CT módszerrel számoltuk ki.

Fehérje analízis

Az RNS analízis során leírt szöveti homogenizálás után a szöveti lízishez a következő lízis puffert használtuk: 50mM Tris, 1mM EDTA, 17mM béta-merkaptóetanol és 0,5% Triton-X100. A fehérje tartalmat Bradford módszerrel határoztuk meg és a tripszines emésztéshez azonos fehérje mennyiségeket mértünk ki. A relatív fehérje szint meghatározáshoz selected reaction monitoring (SRM) alapú célzott proteomikai módszer lett kifejlesztve. A fehérje koncentráció becsléséhez a kapott spektrumok görbe alatti területeit (AUC) számoltuk ki. Azokat az SRM spektrumokat használtuk fel az AUC kiszámolásához, ahol a jel intenzitása meghaladta az 500cps-t. Az adatokat Analyst1.4.2 szoftverrel dolgoztuk fel.

Statisztikai analízis

A szövettani csoportok között fennálló feltételezett különbség igazolására ANOVA tesztet használtunk ahol ennek a feltételei teljesültek, más esetben pedig Kruskal-Wallis tesztet. Két csoport összehasonlítása során Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, így tudtunk gén és fehérje szinten szignifikánsan különböző expressziós szintet azonosítani. Szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg és a szignifikáns eltéréseknél 95%-os konfidencia intervallumot (CI) is számoltunk.

4. EREDMÉNYEK

mRNS expresszió

Először 9db peri-GBM, 9db peri-Met és 9db Norm, összesen 27db minta vizsgálatát végeztük el, melyek nem tumoros agyszövetből valamint glioblasztóma, illetve agyi metasztázis peritumorális területéből származtak. A két daganattípus peritumorális mintáiban vizsgált expressziós szinteket egymáshoz, valamint a nem tumoros mintákhoz hasonlítottuk. A peri-GBM és peri-Met összehasonlításban tíz molekula mutatott relatív expressziónövekedést a peri-metasztatikus szövetben: Brevikán, ErbB1, ErbB2, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin alfa-7, Laminin alfa-4, Laminin béta-1, Tenascín-R, Verzikán. Kilenc gén esetében volt megfigyelhető fokozott expresszió glioblasztóma peritumorális mintáiban: N-kadherin-2, Kollagén alfa-1, Fibronektin, CD168, Integrin béta-1, MMP-2, MMP-9, Neurokán, Tenascín-C. Két esetben találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést: a Tenascín-C (95% CI: 7,95-12,92) és a CD168 (95% CI: 2,75-4,64) expressziója szignifikánsan magasabb volt peri-GBM-ben peri-Met-hez viszonyítva.

Amikor a Peri-GBM mintákat a Norm szövethez viszonyítottuk 14 esetben volt peritumorálisan expresszió emelkedés: N-kadherin-2, Kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, Fibronectin, CD168, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin béta-1, Laminin béta-1, MMP-2, MMP-9, Neurokán, Tenascin-C, de csak a CD168 (95% CI: 0,30-0,44) esetében volt szignifikáns az emelkedés. 5 gén expressziója csökkent Peri-GBM-ben nem tumoros agyszövethez viszonyítva: Brevikán, Integrin alfa-7, Laminin alfa-4, Tenascin-R, Verzikán, mely közül csak a Tenascin-R (95 % CI: 1,40-5,11) csökkenése bizonyult szignifikánsnak. Összehasonlítva a Peri-Met és a Norm mintákat 13 molekula mRNS szintjénél találtunk Peri-Met emelkedést: Brevikán, Kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, CD168, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin alfa-7, Integrin béta-1, Laminin alfa-4, Laminin béta-1, MMP9, Verzikán. Emellett mindössze hat gén szintje csökkent a peritumorális szövetben Norm-hoz viszonyítva: N-kadherin-2, Fibronectin, MMP-2, Neurokán, Tenascin-C, Tenascin-R. Ebben az összehasonlításban egyik esetben sem találtunk szignifikáns eltérést.

Az onkoterápia előtti és utáni glioblasztómák összehasonlítása során a kezelt mintákban a 19 vizsgált molekulából 12 molekula RNS szintje csökkent: Brevikán, Kollagén alfa-1, Fibronectin, Integrin alfa-1, Integrin alfa-7, Laminin alfa-4, Laminin béta-1, MMP-9, Neurokán, Szindekán-1, Tenascin-R, Verzikán, míg 7 molekula transzkriptumában láttunk emelkedést: N-kadherin-2, CD168, ErbB2, Integrin alfa-3, Integrin béta-1, MMP-2, Tenascin-C. Az MMP-9 expressziócsökkenése bizonyult szignifikánsnak (95% CI: 0.13 – 0.26).

Fehérje szintek

Miután megadtuk az mRNS expressziós szinteket ún. jelölés nélküli SRM alapú kvantitatív fehérje analízist végeztünk el, hogy az információval szolgáljon nekünk a transzlációs fázisról és ezáltal lássuk az mRNS szintek változásának fehérje szintű manifesztációit. Az ErbB2, a Szindekán-1 és a Tenascin-C kivételével mindegyik gén fehérjét meg tudtuk határozni.

Peri-GBM ill. peri-Met korrelációban 11db ECM fehérje mennyisége volt emelkedett glioblasztóma esetében, amiből 5db mutatott az mRNS értékekkel megegyező irányú változást: N-kadherin-2, CD168, Integrin béta-1, MMP9, Neurokán. A CD168 emelkedés szignifikánsnak bizonyult (95% CI: 325,9-1109,1) csakúgy, mint gén szinten. A metasztázis körül 6db fehérje szintjének emelkedését detektáltuk, amiből 3db volt az mRNS változással megegyező: Integrin alfa-1, Tenascin-R, Verzikán. A Fibronectin szint növekedés peri-Met-ben szignifikáns volt (95% CI: [-642,5],[-10,5]), azonban ennek a molekulának az mRNS szintje a mérések során csökkenést mutatott. Nem tumoros agyszövethez viszonyítva peri-GBM mintákban 13db fehérje szintje volt nagyobb, amiből 10db a génexpressziókkal megegyező változást mutatott: N-kadherin-2, Kollagén alfa-1, ErbB1, Fibronectin, CD168, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin béta-1, Laminin béta-1, MMP9. Mindössze 4db fehérje koncentrációja volt magasabb Norm szövetben, ebből 2db mutatott konkordanciát: Tenascin-R, Verzikán. Szignifikáns eltérést nem lehetett detektálni. Peri-Met és Norm összehasonlításban 8db fehérje szintje emelkedett meg a peritumorális szövetben, 7 esetben konkordanciával: Kollagén alfa-1, ErbB1, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3,

Integrin alfa-7, Integrin béta-1, Verzikán. A peri-GBM – peri-Met korrelációhoz hasonlóan a Fibronektin szint emelkedés itt is szignifikáns volt annak ellenére, hogy gén szinten ugyanúgy csökkenést detektáltunk. Peri-Met-ben nem tumoros mintákhoz képest csökkent koncentrációt mértünk 9db fehérje esetében, ebből 4db csökkenés volt az mRNS változással megegyező irányú: N-kadherin-2, MMP-2, Neurokán, Tenascinn-R. Ez utóbbi esetben sem találtunk szignifikáns eltérést.

A glioblasztóma onkoterápiájának hatását tanulmányozva 12 vizsgált fehérje szintje csökkent: Brevikán, N-kadherin-2, CD168, Kollagén alfa-1, ErbB2, Integrin alfa-3, Integrin alfa-7, Integrin béta-1, Laminin béta-1, MMP-2, MMP-9, Neurokán, Tenascinn-R, 5 génnél pedig a fehérje koncentráció növekedését tapasztaltuk: ErbB2, Fibronektin, Integrin alfa-1, Laminin alfa-4, Verzikán. A Szindekán-1 és a Tenascinn-C a kezelés utáni mintákban nem volt detektálható. A Brevikán szintje onkoterápia után szignifikáns csökkenést mutatott. (95% CI: [-8857.43] - [-7.46])

Az expressziós változásokat RNS és fehérje szinten együtt elemezve 8 esetben látható konkordáns változás (4. táblázat). A Brevikán, Kollagén alfa-1, Integrin alfa-7, Laminin béta-1, MMP-9, Neurokán, Tenascinn-R a kezelt mintákban mindkét vizsgálatban konzekvens expressziócsökkenést mutatott, ezzel ellentétben az ErbB2-nél a transzkripció és a transláció során is emelkedés volt megfigyelhető. A statisztikai elemzések során az eltérések mindössze 2 esetben bizonyultak szignifikánsnak: RNS szinten a MMP-9 (fold change: 0.21 p érték: 0.006 95%-os CI: [0.13] - [0.26]), protein szinten pedig a Brevikán (prot. level:-4432,44 p érték: 0.006

95%-os CI: [-8857,43] - [-7,46]) csökkent szignifikáns mértékben az onkoterápiát követően.

5. MEGBESZÉLÉS

Az ECM az elmúlt időben számos kutatás középpontjában állt, így rendkívül sok új információ áll rendelkezésre, ami szerkezeti részleteire, tulajdonságára illetve a különböző fiziológiás és pathológiás folyamatokban betöltött szerepére vonatkozik. Sokáig úgy vélték, hogy az ECM főleg strukturális szereppel bír, azonban az utóbbi időben egyre világosabbá vált, hogy nélkülözhetetlen a sejtek környezetükkel való funkcionális kapcsolatához. Bebizonyosodott, hogy az ECM-alkotóknak létfontosságú szerepe van például az egyedfejlődés irányításában, a sejt migrációban, a sejtek érésében és differenciálódásában, a sejt-túlélésben, a szöveti homeosztázis fenntartásában, a tumoros sejtek inváziójában, és még sok egyéb folyamatban. A mátrixban bekövetkezett bármely öröklött vagy szerzett strukturális defektus olyan sejt- és szövetszintű változásokat okoz, ami meglévő betegségek súlyosbodásához, illetve új betegségek kialakulásához vezet. Például a nem megfelelő laminin termelése hibás izomstruktúrához vezet, ami izomdisztófiát hoz létre. Annak ellenére, hogy központi idegrendszerben található ECM nagymértékű hasonlóságot mutat más szövet ECM-éhez, a molekuláris összetételben mégis határozott különbséget lehet felfedezni, sőt néhány komponens csak az agyban található meg. Például az agyi ECM reaktíve

kis mennyiségű rostképző fehérjét és nagy mennyiségű GAG-t tartalmaz. Az idegsejtek membránjához közel az ECM sűrűbbé válik, és bazálmembránt formál, ami főleg kollagénekből, glikoproteinekből, különösen tenaszcinokból valamint kondroitin szulfát és heparán szulfát proteoglikánokból (verzikan, neurokan, aggregan, neuroglikan-C, perlekan, agrin), hialuronsavból és sejtdhéziós molekulákból áll. Fontos szerepük van emellett többek között a kadherineknak, elasztinnak, CD44 sejtfelszíni receptornak, matrinnak, szindekannak, aquaporinoknak, agrinnak, TGF β -nak és a mátrix metalloproteinázoknak is. Amellett, hogy az ECM-nek fontos funkciója van az embriogenezisben, a daganatok progressziójához is elengedhetetlen. A sejt-sejt és sejt-ECM interakciók révén valósul meg daganatok invazív tulajdonsága, a tumoros környezeti infiltráció.

Kutatásunk során az invázióval összefüggő ECM komponenseket és transzmembrán receptorokat vizsgáltunk primer (glioblasztóma) és szekunder (adenokarcinóma metasztázis) agyi daganatoknál, egyrészt azok peritumorális területében másrészt az infiltratív daganat állományában standard onkoterápia előtt és után. Az mRNS expressziós mintázat létrehozása és a fehérje szintek kvantifikálásának eredményeképpen több ECM alkotó elem és receptor is összefüggésbe volt hozható a peritumorális invázió mértékével. Egyes molekulák mRNS és fehérje szinten is azonos irányú változást mutattak, emellett néhány szignifikánsan eltért a különböző vizsgált szövettani csoportokban. Egyértelmű különbségeket találtunk a peritumorális szövetekben, azokat akár egymáshoz, akár tumormentes agyszövethez hasonlítottuk.

5.1. Glioblasztóma peritumorális zónája:

Tenaszcinok és CD168

A tenaszcinok ötféle tagból (tenaszcin-C, -R, -X, -Y, -W) álló nagyméretű extracelluláris mátrix glikoprotein családot alkotnak. Közülük a különböző ún. alternative splicing során létrejött többféle izoformával rendelkező tenaszcin-C (TNC) kulcsszereppel rendelkezik az embriogenezisben, sebgyógyulásban, valamint a tumorprogresszióban. A tenaszcin-C-t számtalan embrió- és felnőtt szövetből izolálták már, például hámszövetből, simaizom sejtekből és bizonyos daganatokból. Ez a molekula az integrinokkal, kollagénnel, proteoglikánokkal valamint a fibronectinnel lép kapcsolatba. A sejt-környezettől függően funkcionálhat adhezív vagy antiadhezív fehérjeként is, és oldott formában gátolja a fibroblasztok fibronectinnel borított felületen történő adhézóját és vándorlását. Az embriogenezis során először a tenaszcin-C detektálható, majd később az érett szervezetben a tenaszcin-R megjelenésével párhuzamosan eltűnik. A tenaszcin-C érett, normál agyban általában nincs, de megtalálható sérülést követően, illetve tumorsejtek bazál laminájában, ahol gátolják a fibronectin és a szindekán-4 közötti kapcsolatot elősegítve ezzel a daganat növekedését és metasztázis létrejöttét. Malignus gliómákban a TNC autokrin módon növeli a glióma sejtek invazivitását, létrehozva egy reaktív változást a tumor körüli agyszövetben. Hirata és munkatársai azt találták, hogy a TNC expresszió arányos az MRI képeken lévő peritumorális reaktív elváltozások nagyságával és a glioblasztóma betegek prognózisával. Herold – Mende és munkatársai egyenes arányosságot találtak

a TNC szint emelkedése és a daganat malignitása között. A tenaszcin család egy másik tagjáról, a tenaszcin-R-ről (TNR) bizonyosodott be, hogy fontos szereppel bír a központi idegrendszer kialakulásában, regeneráció során, valamint többféle sejt-mátrix interakcióban pl. a tumorsejtek adhéziójában és migrációjában. Mind mRNS mind fehérje szinten a TNR szint növekedése figyelhető meg pilocitás (WHO Gr. I.) asztrocitómákban glioblasztómákkal szemben. Ezzel megegyezően a TNR expresszió csökkenését írták le az asztrociter tumorok grádusának emelkedésekor.

A CD168 (úgy is ismert, mint HMMR vagy RHAMM) egy hyaluronsav receptor, ami hatással van a sejtek közötti kommunikációra, a migrációra, ezzel segítve az angiogenezist és a metasztázisok kialakulását. A CD168 kapcsolatba lépve az aktinnal a kalmodulinnal, mikrotubulusokkal és más mitózishoz kapcsolódó struktúrával expresszió emelkedést mutatott agresszív daganatokban.

Ami a peri-GBM mintákat illeti a vizsgált molekulák nagy része nem mutatott szignifikáns eltérést kivéve a Tenaszcin-C és a CD168 emelkedését valamint a Tenaszcin-R csökkenését. Ez alapján feltételezhető, hogy a glioblasztómát körülvevő agyszövet ECM-je nem reagál határozottan a daganat terjeszkedésére. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy az ECM nem tudja megfelelően megakadályozni a tumorsejtek peritumorális szövetbe történő invázióját. Az eredmények mellett kiemelik ezen három molekula glióma sejt invázióban betöltött szerepét. A tenaszcin-R gén szignifikáns leszabályozása peri-GBM-ben feltehetően az inváziós potenciál növekedésének és a malignus viselkedésnek a jele. Tehát a TNR akadályozza a peritumorális inváziót, míg a TNC segítheti azt.

MMP-9

Bizonyos enzimek szintén nagy hatással bírnak a peritumorális invázióra. A mátrix metalloproteináz család úgy járul hozzá a daganat progresszióhoz, hogy különböző ECM komponenseket és sejtfelszíni receptorokat tud lebontani és átalakítani, ezáltal újrendezi a mátrixot, így segítve elő a sejtek közötti kommunikációt. Ami az MMP család zselatináz csoportját illeti Veeravalli szerint az MMP9-nek nagy hatása van a glióma sejtek migrációjára és inváziójára. Mi az MMP9 nagymértékű emelkedését tapasztaltuk periGBM-ben mind RNS mind fehérje szinten, ami feltehetően a peritumorális szövetbe történő tumor inváziót segíti, bár szignifikanciát nem találtunk.

5.2. Metasztázis peritumorális zónája

Fibronektin

A fibronektin egy olyan ECM glikoprotein dimer ami integrin sejtreceptorokhoz és más mátrix komponenshez (fibrin, kollagén, stb.) kötődik. A sejtadhéziót, migrációt és differenciálódást segítve kulcsszerepet játszik az embriógenézisben, sebgyógyulásban, daganatnövekedésben és áttétek kialakulásában. A gliómákban a fibronektin expressziója emelkedik, elősegítve ezzel a sejt migrációt és az inváziót egyenes arányban a tumor grádussal. Másfelől Sabari és munkatársai vizsgálatai alapján a fibronektinben gazdag mátrix jelentősen gátolhatja a glioblasztóma sejtek szétszóródását. Mi szignifikánsan alacsonyabb fibronektin fehérje szintet detektáltunk periGBM-ben mint peri-Met-ben, mely alapján valószínűsíthető, hogy a fibronektin gátolja a tumorsejtek szomszédos agyszövetbe történő migrálását.

Azok a molekuláris változások, amelyek a perimetasztatikus régióban jönnek létre gyaníthatóan csökkentik a tumorinfiltrációt feltehetően létrehozva egy olyan peritumorális „hálót” a metasztázis körül, ami gátolja a tumorsejtek terjedését. A fibronectin metasztázis körüli egyértelműen emelkedett szintje egy korai lépésként hozzájárulhat az áttét kialakulásához segítve a metasztatikus sejteket a megtapadásban, a letapadásban és a tumorfészkek kialakításában. Ez a hipotézis összhangban van Paget „mag és föld” elméletével. Az mRNS expresszió emelkedés hiánya a magas fehérjeszintek mellett a fibronectin egy másodlagos koncentrációját feltételezi, ami származhat a tumorból, de ez további vizsgálatokat igényel.

Az intracerebrális daganatok peritumorális ECM-jének vizsgálata olyan molekulákat tudott azonosítani, amelyek feltehetően (pozitív vagy negatív) hatással vannak az inváziós folyamatra.

5.3. Onkoterápia okozta változások

A GBM kezelését sokáig a műtéti reszekció és az azt követő sugárkezelés jelentette. A technikai fejlődésnek köszönhetően a standard teljes agyi besugárzási protokollt később felváltotta a konformális agyi besugárzás. Emellett számos kísérlet folyt a dóziseszkaláció, a sugársebészet és a brachyterápia terén, azonban egyik sem váltotta be igazán a hozzá fűzött reményeket, így a ma elfogadott protokoll a $2 \times 30 = 60 \text{ Gy}$ konformális besugárzást tartalmazza. A terápiás stratégia később a különböző kemoterápiás szerek megjelenésével bővült, melyek önmagukban, vagy a besugárzással kombinálva kerültek alkalmazásra. Az úgynevezett “temozolomid

előtti” időszakban számos kemoterápiás szert (platinoidok, taxánok, topoizomeráz inhibitorok, egyéb alkiláló szerek) alkalmaztak a glioblasztóma kezelésében, 2005 óta azonban a temozolomiddal történt kemoirradiáció képi a standard kezelés alapját.

A jelenlegi, nem kellően effektív terápia mellett felmerült az igény a glioblasztómák génexpressziós és fehérje változásainak feltérképezésére: többek között a sejtmotilitás, a membránösszetétel, valamint az extracelluláris mátrix felépítésének olyan jellegű változásaira, melyek hatással vannak a glioblasztóma sejtek infiltrációjára és ezáltal meghatározzák a kezelés hatékonyságát. Ezen változások mélyebb ismerete megismertetheti a jelenlegi protokoll korlátait és utat nyithat új kutatási célpontok kitzítéséhez. Jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk a konkuráló kezelés okozta részletes molekuláris mechanizmust illetően, a kezelés infiltrációra gyakorolt hatása sem tisztázott, és az eddigi vizsgálatok sejtenyészeten, nem pedig emberi agyszöveten történtek.

Vizsgálatunkban ennek a kezelésnek az invázióra gyakorolt hatását elemeztük: az onkoterápiát követően mindössze az MMP-9 RNS szintje és a Brevikán fehérje szintje mutatott szignifikáns csökkenést. A többi vizsgálat molekula esetében nem volt szignifikáns változás.

Mint ECM degradáló enzim, az MMP-9 szintje glioblasztómákban emelkedést mutat a normál agyszövethez képest. Trog D. és mtsai temozolomid és besugárzás hatását vizsgálták glioblasztóma sejtvonalon és a kezelést túlélő sejtekben szignifikáns metalloproteináz emelkedést tapasztaltak, ami korrelált az agresszív, infiltratív tulajdonsággal. A mi eredményünkben a MMP-9 onkoterápia után RNS szinten sokkal

nagyobb csökkenést mutatott, mint fehérje szinten. Ez feltehetően annak a következménye, hogy a tumorelles szerek javarészt a DNS replikációt érintik és kevésbé hatnak a fehérje szintre. A Brevikán fehérjeszintű csökkenése összefügg Nakada M. és mtsai valamint Held-Feindt J. és mtsai eredményeivel, akik a glioblasztómában pozitív összefüggést találtak a brevikan szint csökkenése és a sejtinvázió között. Tanulmányunkban az onkoterápia következtében szignifikánsan lecsökkent Brevikan szintet feltételezi, hogy a konkuráló kemoterápiának nincs hatása a tumoros invázióra. Eredményeink alapján tehát feltételezhető, hogy a konkuráló kemoirradiáció nem hat lényegesen a glioblasztóma sejtek inváziójára és a kezelés hatására valószínűleg egy agresszívabb, nagyobb inváziós potenciállal bíró szubpopuláció szelektálódik ki. Mindezeket figyelembe véve kutatásunk hozzájárul a GBM kezelése alapvető sikertelenségének megértéséhez, emellett pedig új, célzott anti-inváziós kezelések kifejlesztésének szükségességét támasztja alá.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A glioblasztóma multiforme (GBM) a leggyakoribb felnőttkori elsődleges agydaganat, és egyike a legrosszabb prognózisú betegségeknek. Törvényszerű kiújulásának egyik feltételezett oka a tumor kifejezett infiltratív jellege. A környezetet beszűrő tumorsejtek változást hoznak létre a peritumorális mátrix komponensek expressziójában. A GBM kezelésében a standard konkuráló kemoirradiáció hónapokat

növelt ugyan az átlagos és a progressziómentes túlélésen, de átütő sikert nem ér el. A temozolomidra épülő kemoterápia ineffektivitásának egyik feltételezett oka, hogy az antiproliferatív kezelés nem hat lényegesen a daganatsejtek infiltrációjára. Az invazivitás okozta peritumorális szöveti változásra és az invazivitás onkoterápiára bekövetkező esetleges megváltozására molekuláris szinten a peritumorális agyszövetben és a daganatban lévő extracelluláris mátrix alkotóelemeinek expressziós szintjében bekövetkezett változások utalhatnak. Erre fókuszálva 20 db invázióhoz köthető molekula mRNS és fehérje szintjét határoztuk meg, az RNS szinteket Q-PCR, a fehérje szinteket pedig kvantitatív proteomikai analízis segítségével. A molekulákat tumormentes agyszövetben (Norm/9db), glioblasztóma (Peri-GBM/9db) és intracerebrális adenokarcinóma metasztázis (Peri-Met/9db) peritumorális agyszövetében valamint konkuráló kemoirradiáció előtti (kezeletlen/15db) és utáni (kezelt/16db) glioblasztóma mintákban vizsgáltuk.

Létrehozva a vizsgált szövetek inváziós mintázatát eredményeink több ECM molekulát is kiemelnek, amelyek feltehetően szerepet játszanak a metasztázisok inváziójának megakadályozásában és a glioblasztóma sejtek migrációjának gátlási képtelenségében: CD168, Fibronectin, MMP-9, Tenascin-C, Tenascin-R. Emellett feltételezhető, hogy a kemoirradiationak nincs lényeges hatása a glioblasztómák extracelluláris mátrixának összetételére és ezáltal nem hat érdemlegesen a daganat infiltratív jellegére. Véleményünk szerint az antiproliferatív ágensek antiinvazív készítményekkel való kiegészítése a GBM kezelésében megfontolást érdemel.



Nyilvántartási szám: DEENK/90/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hutóczki Gábor
Neptun kód: G5FXRG
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Klekner, Á., **Hutóczki, G.**, Virga, J., Reményi-Puskár, J., Tóth, J., Scholtz, B., Csósz, É., Kalló, G., Steiner, L., Hortobágyi, T., Bognár, L.: Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain.
Clin. Neurol. Neurosurg. 139, 138-143, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2015.09.017>
IF:1.127 (2014)
2. **Hutóczki, G.**, Bognár, L., Tóth, J., Scholtz, B., Zahuczky, G., Hanzély, Z., Csósz, É., Reményi-Puskár, J., Kalló, G., Hortobágyi, T., Klekner, Á.: Effect of Concomitant Radiochemotherapy on Invasion Potential of Glioblastoma.
Pathol. Oncol. Res. 22 (1), 155-160, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-015-9989-5>
IF:1.855 (2014)





További közlemények

3. Simándi, Z., Czipa, E., Horváth, A., Kószeghy, Á., Bordás, C., Pólska, S., Juhász, I., Imre, L., Szabó, G., Dezső, B., Barta, E., Sauer, S., Károlyi, K., Kovács, I., **Hutóczky, G.**, Bognár, L., Klekner, Á., Szűcs, P., Bálint, B.L., Nagy, L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology.
Stem Cells. 33 (3), 726-741, 2015.
IF:6.523 (2014)
4. Csonka T., Szepesi R., Bidiga L., ifj. Péter M., Klekner Á., **Hutóczky G.**, Csiba L., Méhes G., Hortobágyi T.: A herpesencephalitis diagnosztikájáról egy esetismertetés kapcsán.
Ideggyógy. Szle. 66 (9-10), 337-342, 2013.
IF:0.343
5. 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, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9461-0>
IF:1.555
6. 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
7. 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
8. Petrás M., **Hutóczki G.**, Varga I., 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>



9. Bágyi K., Klekner Á., **Hutóczki G.**, Márton I.: A szájüregi baktériumok szerepe az aspirációs pneumónia patogenezisében: Irodalmi összefoglalás.
Fogorv. Szle. 99 (5), 205-212, 2006.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,111

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
2,982**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.04.12.

