

**A NEURO-ONKOLÓGIA
AKTUÁLIS PERSPEKTÍVÁI**

DR. KLEKNER ÁLMOS

OKTATÁSI SEGÉDANYAG

DE ÁOK Idegsebészeti Klinika

TARTALOMJEGYZÉK

1. ELŐSZÓ	6
2. A GLIOMÁK INVÁZIVITÁSA	8
2.1. A gliomák és az extracelluláris mátrix	8
2.1.1. Az extracelluláris mátrix szerepe az invázióban.....	9
2.1.2. A gliomák peritumorális inváziójának molekuláris megközelítése	10
2.1.3. A tumorsejtek inváziójának folyamata	11
2.1.4. A gliomák inváziójában szerepet játszó extracelluláris mátrix komponensek vizsgálatának klinikai jelentősége	13
2.2. Az anti-invazív terápia létjogosultsága	13
2.3. A gliomák invazivitásával kapcsolatos kutatások ismertetése	14
2.3.1. Agyi áttéti daganat és gliomák invazivitásának összehasonlítása	14
2.3.2. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára	20
2.3.3. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban.....	22
2.3.4. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztomában	24
2.4. Agyi áttéti daganat és gliomák invazivitásának összehasonlítása.....	25
2.4.1. mRNS expressziós eredmények	25
2.4.2. Immunhisztokémiai eredmények.....	31
2.5. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára	34
2.5.1. RNS expressziós eredmények.....	34
2.5.2. Proteomikai eredmények	34
2.6. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban	37
2.6.1. RNS expressziós eredmények.....	37
2.6.2. Proteomikai eredmények	38
2.7. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztomában	40
2.7.1. A betegek klinikai adatainak eredményei.....	40
2.7.2. Az inváziós molekulák RNS expressziós mintázata.....	40
2.7.3. Protein expressziós eredmények.....	42
2.8. Agyi áttéti daganat és gliomák invazivitásának összehasonlítása.....	44
2.8.1. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában és glioblasztomában	44
2.8.2. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában, alacsony grádusú asztrocitomában és schwannomában	46
2.9. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára	48
2.10. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban	50

2.11. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztomában	52
3. AZ ALACSONYABB GRÁDUSÚ GLIOMÁK MOLEKULÁRIS ONKOLÓGIAI MEGKÖZELÍTÉSE ÉS KEZELÉSI IRÁNYVONALAI	54
3.1. Jelenlegi terápiás ajánlások	56
3.2. Molekuláris patológiai faktorok	59
3.2.1. IDH1/2 (izocitrát-dehidrogenáz) mutáció.....	59
3.2.2. G-CIMP fenotípus	63
3.2.3. MGMT promoter hipermetiláció	63
3.2.5. TERT mutáció	66
3.2.6. ATRX mutáció	67
3.2.7. H3K27M – mutáció.....	68
3.2.8. BRAF V600E mutáció.....	70
3.2.9. BRAF fúzió.....	72
3.2.11. TP53 mutáció.....	74
3.2.13. PTEN	77
3.2.14. Kisebb jelentőséggel bíró markerek	77
3.3. Konklúziók.....	81
4. A TEMOZOLOMID SZEREPE A GLIOBLASZTOMA KEZELÉSÉBEN	89
4.1. A glioblasztoma általános neuro-onkológiai megközelítése	89
4.2. A temozolomid klinikai jelentősége.....	90
4.3. A temozolomid vizsgálata glioblasztomában.....	92
4.3.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztomás betegekben - mintavétel és mérési módszerek	92
4.3.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztomában	93
4.3.3. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztomás betegekben - eredmények.....	94
4.3.4. A temozolomid intratumorális koncentrációjának közvetlen meghatározása humán glioblasztomában - eredmények	96
4.3.5. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztomás betegben - konklúzió	97
4.3.6. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztomában - konklúzió.....	98
5. A GLIOBLASZTOMA HETEROGENITÁSÁNAK KLINIKAI JELENTŐSÉGE .	100
5.1. A tumorheterogenitás szerepe a kezelés ineffektivitásában	101
5.2. Jelenlegi terápiás lehetőségek	102

5.3. Új diagnosztikai módszerek a személyre szabott terápia megvalósításához	103
5.3.1. Keringő nukleinsavak	103
5.3.2. Egyéb keringő anyagok	104
5.4. Új terápiás lehetőségek.....	105
6. A GLIOBLASZTOMA IDEGSEBÉSZETI MEGKÖZELÍTÉSE	108
6.1. A jelenlegi onkoterápia hatékonyságának meghatározása glioblastoma esetében saját beteganyagban.....	108
6.1.1. Progressziómentes és teljes túlélés	110
6.1.2. Tumorméret	112
6.1.3. Műtéti típus.....	113
6.2. Azonos bázisterápiában részesülő betegek túlélési adatainak elemzése	116
6.3. Összefoglalás.....	117
7. AZ 1p19q KODELÉCIÓ	119
7.1. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagban: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliomákban és oligoasztrocitomákban.....	119
7.2. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagban: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliomákban	120
7.3. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagban: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliomákban és oligoasztrocitomákban.....	124
8. A FOLYADÉK BIOPSZIA KUTATÁSI PERSPEKTÍVÁI	126
8.1. Glioblastoma – háttér	127
8.2. Molekuláris markerek glioblastomában	127
8.3. Keringő tumor nukleinsavak	129
8.4. Keringő DNS.....	130
8.5. Keringő RNS	132
8.6. Extracelluláris vezikulumok.....	135
8.7. Keringő tumorsejtek.....	138
8.8. Összegzés	139
9. A DEBRECENI IDEGSEBÉSZETI AGYDAGANATBANK	141
9.1. A Debreceni Neuro-onkológiai Labor kialakítása.....	141
9.1.1. Szervezeti háttér	141
9.1.2. Az Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank jelentősége.....	141
9.1.3. Az Agydaganatbank gyakorlati működése során kifejlesztett debreceni technikák	143
9.2. A Neuro-onkológiai Labor kutatási hatékonysága 2005-2017 között.....	144

9.2.1. Az Agydaganat- és Szövetbankban rejlő kutatási potenciál	144
10. ZÁRSZÓ	146
11. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	148
12. IRODALOMJEGYZÉK	150

1. ELŐSZÓ

A neuro-onkológia olyan, határterületeket ötvöző multidiszciplináris, újonnan lendületet nyert klinikai szakirány, mely a 2006-ban rutinszerűen bevezetett kemoterápiás készítmények és új onkoterápiás protokollok széleskörű elterjedésével alapozta meg létjogosultságát. Az idegsebészet, sugárterápia, klinikai onkológia és patológia központi idegrendszeri proliferatív folyamatokkal foglalkozó szakembereinek együttműködésével megalakult onkoteamek (neuro-onkoteamek) felállításával a neuro-onkológia visszavonhatatlanul bevonult a klinikai szakok közé és fejlődése meglepően meredeken ívelő pályára állt. Mind a primer agydaganatos, mind pedig az áttéti daganatos betegek 2006 után tapasztalt egyértelműen javuló életminőségi és túlélési paraméterei az új szakterület jelentőségét és eredményességét bizonyítják, melyekhez több tényező hozzájárulása vezetett. Az egyik ilyen fejlődést hozó változás a különböző szakterületek ötvözésével kialakult kombinált kezelési metódusok előretörésében valósult meg, míg a molekuláris patológiai markerek megjelenése és a klinikumba való bevonulása egyrészt a diagnosztika, másrészt a terápia megválasztásában hozott jelentős eredményeket, melyek további javulása ma már leginkább a személyre szóló neuro-onkoterápia megvalósulásától várható. Ennek a fejlődési folyamatnak az elemei az elméleti kutatások eredményeinek a klinikumba való átültetéséből alakultak ki, és így a transzlációs kutatás kézzel fogható hatékonyságának egyik fő bizonyítékául szolgálnak. Jelen egyetemi jegyzetben a teljes neuro-onkológia áttekintése helyett a betegellátásba beépülő kutatási folyamatok fontosabb állomásainak bemutatása a cél, különös tekintettel a Debreceni Egyetemen megvalósult eredményekre. Mivel 2006 előtt a primer malignus agydaganatok – a magas grádusú asztrocitómák – lesújtóan szerény túlélési adatai jelentették a legnagyobb kihívást a neuro-onkológusok számára, ezért a fő kutatási célkitűzések is ezzel a szövettani entitással kapcsolatban fogalmazódtak meg leginkább, majd később fokozatosan kiterjedtek a gliómák csoportjára, de az áttéti daganatok és benignus intrakraniális daganatok sem maradtak ki a vizsgálatokból. Az összes releváns agydaganatkutatás adatcentrikus közlése helyett a jegyzet célja a komplex megközelítés előnyeinek feltárása, egyrészt a társszakmák horizontális összefüggéseinek áttekintésével, másrészt pedig a molekuláris alapoktól a betegség kialakulásáig történő kórfolyamat vertikális megjelenésének a megvilágításával. Ezáltal nyerhet betekintést az olvasó az agydaganatok diagnosztikai folyamatainak fejlődésébe a szövettani mintavételtől a folyadékbiopsziáig, a hisztomorfológiai vizsgálattól a génszekvenálásig, és megértheti, hogyan kezd egyre jobban

harmonizálni az idegsebészeti szemlélet az onkoterápia eszköztárával, mely utóbbi folyamatos fejlődésének és súlypontát helyeződésének okaihoz juthatunk közelebb.

Jelen jegyzet célkitűzéseinek megvalósításához az alábbiakban ismertetjük a gliomák ineffektív kezeléséért nagyrészt felelős tumorinvazivitás problémakörét, az alacsonyabb grádusú gliomák molekuláris onkológiai megközelítését és kezelési irányelveit, a standard kemoterápia alapját képező temozolomiddal kapcsolatos ismereteket, a tumor-heterogeneitásból származó nehézségeket, néhány idegsebészeti megfontolást, egyes genetikai alterációk klinikai jelentőségét, a folyadékbiopsziában rejlő lehetőségeket, és végül bemutatásra kerül a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank és az általa képviselt kutatási potenciál.

2. A GLIOMÁK INVÁZIVITÁSA

2.1. A gliomák és az extracelluláris mátrix

Mivel a sejtosztódást gátló antiproliferatív hatásmechanizmusú kemoterapeutikumok hatékonysága kitaró próbálkozások ellenére sem érte el a kívánt szintet, határozott igény jelentkezett egyéb támadáspontú készítmények kifejlesztésére. Tekintve, hogy mind a sugárterápia, mind pedig a műtéti kezelés hatékonyságának leginkább az agydaganatok invazivitása szab korlátokat, az intracerebrális tumorok környezeti infiltrációs képességének megismerése és befolyásolása az utóbbi időkben egyre gyakrabban vált a neuro-onkológiai kutatások célpontjává. A tumoros invázió folyamatának megértéséhez a tumorsejtek és környezetük kapcsolatának közelebbi feltárása vált szükségessé.

A központi idegrendszer (KIR) sejtjeit a szervezet többi sejtjeihez hasonlóan a fehérjében és rostban gazdag extracelluláris mátrix (ECM) veszi körül. Összetételét illetően a mátrix rendkívül heterogén, döntően kollagéneket, elasztint, laminineket, fibronektint, proteoglikánokat (PG), glükózaminoglikánokat (GAG), illetve enzimeket tartalmaz. Felépítésére jellemző, hogy a különböző molekulák, enzimek és szolubilis faktorok kötőszöveti rostok hálózatába ágyazódnak. Az ECM szövet-specifikus és dinamikus, aktív környezetet biztosít a sejteknek. Ez a szoros sejt-ECM kapcsolat különböző jelátviteli útvonalon keresztül meghatározó szereppel bír számos fiziológias és pathológias folyamatban, mint például a sejtmozgás, differenciálódás, génexpresszió, hisztogenezis valamint a rosszindulatú daganatok terjedése.

A tumorsejtek inváziója során szoros kapcsolat alakul ki a sejtek és az ECM között. Ez a sejt-ECM konnexió a sejt-sejt interakcióval és a szolubilis faktorok rendszerével együtt egy komplex kommunikációs hálózatot hoz létre. Az intrakraniális daganatokat igen jól lehet jellemezni eltérő invazív potenciáljaikkal, ami nagyban ECM függő. A kifejezetten invazív malignus gliomák nagyban különböznek a csaknem gömb alakú agyi áttétektől és sokszor nehéz intraoperatív megkülönböztetni őket a peritumorális agyszövetétől, melyet a gliomasejtek több centiméter mélyen infiltrálni képesek, ami radikális reszekciójukat eleve lehetetlenné teszi. Másfelől pedig egy átlagos szoliter agyi áttét sebészi eltávolítása rutin

idegsebészeti feladatnak számít. Úgy tűnik, az ECM-nek kiemelkedő szerepe van ebben az igen eltérő intenzitású invazív viselkedésben.

2.1.1. Az extracelluláris mátrix szerepe az invázióban

Ahhoz, hogy a gliomák invazív természetét megérthessük, át kell tekintenünk a peritumorális infiltráció celluláris és molekuláris történéseit. A tumoros invázió legfontosabb szereplője az ECM, mely a normál agyi térfogat meglehetősen nagy részét jelenti, hiszen az egészséges agyszövet térfogatának nagyjából 20%-a az extracelluláris tér. Az extracelluláris térfogat aránya azonban a primer agytumороk jelentős részében szignifikánsan megemelkedik, a teljes tumorszövet térfogatának mintegy 48%-át képviseli. Az agyszöveti ECM szerkezete és komponensei sokban eltérnek az egyéb szervekben megtalálható ECM felépítésétől. Az agyi ECM főként makromolekulákat tartalmaz, (GAG-okat és PG-eket) és csak kisebb részben vannak jelen a fibrilláris glikoproteinek (pl. kollagének, fibronektin, elasztin vagy retikulín). Az ECM-ben található glikoproteinek összetevői kulcsfontosságúak a peritumorális infiltrációban, hiszen a celluláris kitapadás és a migráció szerkezeti elemeit adják. Az invázió molekuláris mechanizmusainak feltárása végett kiterjedt kutatások irányultak a hialuronsav (hialuronán, HA), a PG-ok és különböző típusú GAG-ok jelenlétének és funkciójának vizsgálatára, és több esetben állapítottak meg pozitív összefüggést egyes ECM alkotók és a malignus gliomák invazivitása között. A sejtek adhéziójához és migrációjához a sejtek felszínén lévő specifikus receptoroknak az ECM komponenseivel kell kapcsolatba lépniük. A sejt felszíni receptorok közül kiemelendők az integrinek, a CD44 és a CD168. Bizonyos proteázok, valamint szintetázok szintén erősen befolyásolják az invazivitást, ugyanis az ECM alkotóinak mikrolokuláris koncentrációját módosítani és/vagy a pericelluláris hálózatot emészteni képesek.

A gliomasejtek aktív mozgásukhoz az ECM makromolekuláinak segítségével beszűrrik környezetüket és azt a tumoros szövethez hasonlóvá alakítják. A peritumorális invázió folyamata a tumoros sejtek és a nem-neoplastikus sejtek, illetve az ECM konfrontációs zónájától függ. Míg a gliomasejtek főként adhéziós receptorokat és proteázokat expresszálnak, addig a szöveti sejtek olyan makromolekulák szintézisét segítik elő, amelyek az eredeti szerkezet fenntartásáért felelősek, illetve gátolják az inváziós sejtmozgást. Mivel az agyparenchymában az ECM-ben nincs fibrilláris jellegű, erős kötőszövetes szerkezetű, kollagénen gazdag hálózat, az agyállomány lágy szöveti tulajdonságokkal bír, és ezért nem

képes a tumorsejtek migrációjával szemben valódi ellenállást kifejteni. Ráadásul a gliasejtes tumorok esetében további két tényező segíti még elő a peritumorális beszűrődést. Az egyik ilyen tényező az, hogy az agy parenchymájának normál szerkezete nagyrészt a fehérállomány pályáiból és a bazális membránból áll, melyek alkalmasak arra, hogy a sejtek migrációját vezetni tudják. A másik infiltrációt segítő tényező a gliális sejtek specifikusan fokozott migrációra való képessége. Mindkét tényező az agyszövetre jellemző, és a fejlődéstani, szerkezet és a funkció közötti kapcsolat ismeretével könnyen megérthető.

Neuro-onkológiai szempontból a gliomasejtek fokozott motilitása, valamint a kifejezett peritumorális infiltráció az alábbi problémákhoz vezet:

- A. Mivel a gliomasejtek inváziója az alacsony grádusú tumorokban is megfigyelhető, még ezekben, az egyébként benignus jellegű tumorok esetében sem tekinthető a teljes eltávolítás egyszerűen kivitelezhető és kézenfekvő megoldásnak. Ez az oka annak, hogy az alacsony grádusú (II-es grádusú) tumorokat „semi-benignus” tumoroknak tartjuk. A tumor makroszkóposan teljesnek tűnő sebészi eltávolítása ellenére a recidívák aránya nagyon magas, a betegek teljes gyógyulása messze nem törvényszerű.
- B. Magas grádusú tumorok esetében sem nyitott műtéttel, sem pedig konformális radioterápiával, vagy sztereotaktikus pontbesugárzással („gammakés”) sem lehet teljes tumoreltávolítást elérni. Érthető tehát, hogy miért találkozunk majdnem minden esetben a tumor lokális kiújulásával.
- C. A lokális kemoterápiás kezelésnek (intraparenchymális vagy műtét után alkalmazott intracavitális gyógyszerek) határfoka alacsony, hiszen a reszekciós üreg szélétől akár több cm-es távolságban is megtalálható infiltráló tumorsejtekre a helyi kezelés már érdemben hatást nem gyakorol.

2.1.2. A gliomák peritumorális inváziójának molekuláris megközelítése

Mivel laborvizsgálataink tárgyát az ECM tumorinvázióval összefüggésbe hozható molekulái képezik, részletes megismerésük kutatásunk alapját jelenti. A tumoros infiltráció sejtszintű eseményei igen összetett molekuláris folyamatok eredményeképpen valósulnak meg.

A tumorsejtek migrációjában szerepet játszó molekulákat három fő csoportra lehet osztani:

1. Sejtmembrán-asszociált molekulák (receptorok és adhéziós molekulák).

- Főbb képviselők:
- integrinek
 - CD44
 - RHAMM (receptor for hyaluronate-mediated motility)
 - szindekánok
 - kadherine

2. ECM komponensek (a receptorok célmolekulái).

- Főbb képviselők:
- glükózaminoglikánok (GAG-ok)
 - proteoglikánok (PG-k)
 - hialuronsav (HA)
 - fibronectin
 - lamininek
 - agrin
 - tenascin
 - lektikánok (brevikán, neurokán, verzikán, stb.)

3. Az ECM komponenseit szintetizáló vagy lizáló enzimek.

- Főbb képviselők:
- mátrix-metalloproteinázok (MMP-k)
 - katepszinek
 - hialuronsav szintetázok (HAS)

2.1.3. A tumorsejtek inváziójának folyamata

A primer agydaganatok inváziós hajlama régóta ismert tény, így a peritumorális beszűrődés molekuláris mechanizmusai már sok éve a neuro-onkológiai kutatások tárgyát képezik és néhány inváziós folyamatot már részletesen ismerünk. Általában a tumoros inváziót egy négylépéses modellel lehet leírni, mely az agytumrok esetében is alkalmazható. Ez a modell az alábbi lépésekből áll:

- 1) az invazivitás helyén a tumorsejtek leválnak az egyre növekvő primer tumoros sejthalmazról,

2) a levált sejtek specifikus receptoraik révén kapcsolódnak az ECM meghatározott komponenseihez,

3) a gliomasejtek által szekretált proteázok lokálisan bontják az ECM-et, a környező szövetben migrációs útvonalat alakítanak ki,

4) a tumorsejtek citoskeletális folyamatok segítségével aktív mozgásba kezdenek.

A peritumorális invázió minden egyes fenti lépése számos molekula összehangolt működését kívánja meg, melynek eredményeképpen a tumorsejt az alább részletezett aktív sejtszintű mozgás révén a normális agyparenchymába vándorol.

1) A szöveti invázióban szereplő tumorsejtek primer tumorsejthalmazról történő leválása meglehetősen bonyolult folyamat és további lépésekre osztható:

a) a primer tumor-sejthalmazt összetartó kadherin mediált sejtkapcsolatok destabilizálódása és szerkezeti felbomlása,

b) a primer tumormasszához kapcsolódást biztosító további sejtdhéziós molekulák csökkent kifejeződése, mely a *gap junction* típusú sejt-sejt közötti kapcsolatok erős redukciójához vezet,

c) végül a sejtet az ECM-hez kihorgonyzó CD44 enzimikus bontása történik meg egy ADAM nevű metalloproteináz által.

2) A tumoros sejtek ECM-hez történő kapcsolódása specifikus sejtfelszíni és transzmembrán receptorok révén történik meg, melynek egyik jellemző formája az integrinek kapcsolódása a lamininekhez, fibronektinhez és kollagénhez vagy a CD44 kötődése a HA-hoz.

3) Az ECM komponensek degradációja a proteázok, pl. MMP, hialuronidáz, katepszin és kondroitin-szulfatáz megemelkedett szintje és fokozott aktivitása révén jön létre.

4) A migráció során a glioma sejtek a környező ECM-mel állandó kapcsolatban állnak, ahol az ECM a sejtek számára egyrészt mechanikai barriert jelent, de a mozgó sejtek számára húzó kötődési struktúrát is képvisel. A sejtek morfológiája megváltozik a sejtmozgás alatt: a sejt polarizálttá válik, membrán kitüremkedések jelennek meg, a mozgás irányában állábak (*pseudopodium*-ok), továbbá *lamellipodium*-ok, *filopodium*-ok és *invadopodium*-ok alakulnak ki. A membrán-kitüremkedésekért felelős aktin filamentumok mellett egyéb szerkezeti és jelátviteli molekulák is aktiválódnak és citoskeletális kontrakciók révén a membrán kihorgonyozódik, összességében a sejt előrehalad. Az ECM alkotók citoskeletonhoz történő csatlakozását disztroglikánok biztosítják. A gliális sejtek mozgásában és összehúzódásában a miozin-II két izoformája (A és B) vesz részt. A miozin-II révén a glioma sejtek a magjuknál

szűkebb pórusokon is képesek átjutni, ami azért fontos, mert az agyállományra kifejezetten szűk extracelluláris terek jellemzők.

2.1.4. A gliomák inváziójában szerepet játszó extracelluláris mátrix komponensek vizsgálatának klinikai jelentősége

Közismert idegsebészeti tapasztalat és dilemma, hogy míg a gliomák radikális sebészi megoldása az infiltratív növekedés miatt az esetek döntő többségében kivitelezhetetlen, addig a szoliter áttéti daganatok teljes eltávolítása általában rutin idegsebészeti beavatkozásnak minősül. Ez a megfigyelés a leggyakoribb, primer tüdőkarcinóma eredetű metasztázisok esetében is rendszeresen tapasztalható. A tüdőrák hematogén áttétképzésének leggyakoribb helye a KIR. A betegség lefolyása során az esetek 40-65%-ában létrejön az agyi metasztázis, sőt, az esetek 9%-ában ez az egyetlen távoli szervi áttét. Valamennyi egyéb szervi daganat együttesen az esetek 8-10%-ában jár agyi áttéttel. Az intracerebrális áttéti tumor radikális reszekábilítása nem utolsósorban annak a ténynek köszönhető, hogy az agyi áttétek növekedése nem, vagy csak minimális invazivitást mutat. A glióblasztóma és a tüdőrák áttét között tapasztalható jelentősen különböző reszekabilitást eredményező intracerebrális invázió oka döntően a két tumortípus extracelluláris mátrixának eltérő szerkezetében, az ott található makromolekulák mikrolokuláris expressziójában és tulajdonságaiban keresendő. Ha megismerjük az egyébként hasonlóan anaplasztikus, de jelentősen eltérő intracerebrális inváziót mutató daganatok peritumorális infiltrációjában látható különbségek okait, akkor a gliomák invazitásának gátlására szolgáló eszközökhöz juthatunk. Ennek segítségével a műtéti reszekabilitás és a sugárterápia hatékonysága is jelentősen növelhető lenne.

2.2. Az anti-invazív terápia létjogosultsága

Jelenleg a primer agytumorkok kuratív onkoterápiája még nem ismert. Az intenzív sejtosztódás, a szignifikáns peritumorális beszűrődés és a fokozott angiogenezis együttesen felelős a gliomák kiemelkedően magas recidíva-arányáért. A nemrégiben bevezetett kemoterápiás szerek hatékonyságának átmeneti jellege miatt valószínűleg kombinációs terápia hozhatna javuló eredményeket. Ezért amellet, hogy nagy specificitású tumormarkereket keresünk, a gliomák invázójának molekuláris spektrumát is érdemes felderíteni. Emellet szól, hogy az invázióval összefüggésbe hozható molekulák mRNS expressziós szintje jellemző a különböző szövettani típusú tumorcsoportokra. Ezért az individuális kemoterápiához

szükséges egyedi anti-tumor célpontok kiválasztásához a gliomák inváziós spektrumának meghatározása komoly segítséget nyújthat. A tumorprogresszió összetettségéből fakadóan a gyógyszerkombináció már kiterjedhet az anti-proliferatív, anti-invazív valamint anti-angiogén készítményekre is, melyek együttes hatásától az agytumoreroterápiájában új eredmények várhatók. A jelen disszertációban részletezett kutatások tárgyát képező peritumorális invázió gyógyszeres redukálása révén a reziduális vagy recidív daganat radikális műtéti eltávolításának esélyei egyértelműen javulnának, illetve a sugárkezelés (akár az FBRT, akár a stereotaxiás sugársebészet) kuratív jellege is felmerülhetne. Kutatásainkat ezek alapján egyrészt a jelenlegi onkoterápia ineffektivitása okainak feltárása, másrészt a peritumorális invázió molekuláris hátterének megismerése vezette.

2.3. A gliomák invazivitásával kapcsolatos kutatások ismertetése

2.3.1. Agyi áttéti daganat és gliomák invazivitásának összehasonlítása

Betegek

Szövetmintáink a Debreceni Idegsebészeti Szövet- és Agydaganatbankból származtak: műtét során a daganat széli részéből eltávolított és folyékony nitrogén felszínén azonnal lefagyasztott, majd -80°C -on tárolt mintákon végeztünk méréseket. A vizsgálatokhoz csak a terápiás célú beavatkozások során eltávolított szövetmintákat használtuk, így a beteg számára semmilyen, a rutin kezeléstől eltérő kockázat nem keletkezett. Tekintettel az anaplasztikus daganatok heterogén jellegére, a vizsgálatok során minden fagyasztott tumordarabból szövettani metszetet is készítettünk a szövettani mikrolokuláris diagnózis megerősítéséhez.

A célkitűzésekben megfogalmazott kérdések megválaszolásához négy fázisban végeztük el méréseinket. Az egyes fázisban vizsgált szövetminták és molekulák listáit az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az első fázisban az irodalom áttekintése alapján összeállítottuk azoknak a molekuláknak a listáját, melyek a peritumorális invázióban szerepet játszhatnak (2. táblázat). Ezeknek a géneknek az mRNS expresszióját meghatároztuk 5 GBM, 5 peritumorális normál agyszövet és 5 tüdő adenokarcinóma intracerebrális áttétekből származó szövetmintában. Ezután az mRNS expressziós értékeket a különböző szövettani csoportok között összehasonlítva meghatároztuk azoknak a molekuláknak a körét, melyek szignifikáns eltérést mutatva a nagyobb esetszámú vizsgálatokhoz további mérések céljára érdemesnek találtunk.

Az előzetes mérések alapján az egyes tumorcsoportok nagyobb számú analiziséhez összeállított molekulák listáját inváziós panelnek neveztük el. Konkrét, publikálásra érdemes eredményeink már ennek a célzottan összeválogatott inváziós panelnek a mérési eredményeiből születtek.

Fázis	Célmolekulák száma	Szöveti típusok és mintaszám		Immunhisztokémiával vizsgált molekulák
1.	96	5	GBM	-
		5	MET	
		5	NORM	
2.	23	4	GBM	neurokán, verzikán, szindekán, MMP-2, -9
		4	MET	
3.	30	11	GBM	agrin, neurokán, szindekán, verzikán, hialuronsav, MMP-2, -9
		10	MET	
		9	NORM	
4.	26	9	A-II	brevikán, neurokán, tenascin-C, verzikán
		10	MET	
		8	SCH	
		9	NORM	

1. táblázat. A különböző eredetű intrakraniális daganatok invázióban szerepet játszó extracelluláris mátrix-molekulák meghatározásának fázisai. GBM = glioblasztoma, MET = tüdő adenokarcinóma agyi áttéte, NORM = nem tumoros (peritumorális) agyállomány, A-II = II-es grádusú asztrocitoma, SCH = schwannoma, MMP = mátrix metalloproteináz.

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

Az RNS analízisre szánt mintákból előbb metszeteket készítettünk szövettani diagnózishoz és immunhisztokémiai vizsgálatokra, majd a maradék szövetdarabot RNS

izolálásra továbbítottuk. A szövettani diagnózist a klinikumtól független sorsú kódolt mintákon gyakorlott neuropatológus állapította meg.

	Fehérjék	Gének	TLDA azonosító
1	Beta-actin	ACTB	Hs99999903_m1
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs99999905_m1
3	Beta-2-microglobulin	B2M	Hs00187842_m1
4	CD44	CD44	Hs00153304_m1
5	CD168 (RHAMM)	HMMR	Hs00234864_m1
6	Aggrecán	AGC1	Hs00153936_m1
7	Verzikán	CSPG2	Hs00171642_m1
8	Brevikán	BCAN	Hs00222607_m1
9	Neurokán	CSPG3	Hs00189270_m1
10	Neuroglükán C	CSPG5	Hs00198108_m1
11	HAS1	HAS1	Hs00758053_m1
12	HAS2	HAS2	Hs00193435_m1
13	HAS3	HAS3	Hs00193436_m1
14	Kondroitinases (AC és ABC)	GALNS	Hs00166833_m1
15	Szindekán1	SDC1	Hs00174579_m1
16	Szindekán2 (HSPG1)	SDC2	Hs00299807_m1
17	Szindekán3 (N-Szindekán)	SDC3	Hs00206320_m1
18	Szindekán4 (Amphiglycan, Ryudocan)	SDC4	Hs00161617_m1
19	Laminin alpha1	LAMA1	Hs00300550_m1
20	Laminin alpha2	LAMA2	Hs00166308_m1
21	Laminin alpha4	LAMA4	Hs00158588_m1
22	Laminin beta1	LAMB1	Hs00158620_m1
23	Laminin beta2	LAMB2	Hs00158642_m1
24	Laminin gamma1	LAMC1	Hs00267056_m1
25	Tenascin-C (Hexabrachion)	TNC	Hs00233648_m1
26	Tenascin-R (Restrictin, Janusin)	TNR	Hs00162855_m1
27	Fibronektin	FN1	Hs00277509_m1
28	(Matrilin1)	MATN1	Hs00159075_m1
29	Matrilin2	MATN2	Hs00242753_m1
30	Fibrillin1	FBN1	Hs00171191_m1
31	Fibrillin2	FBN2	Hs00417208_m
32	Fibrillin3	FBN3_HUMAN	Hs00261049_m1
33	Elasztin	ELN	Hs00355783_m1
34	Agrin	AGRN	Hs00394748_m1
35	Perlekán (HSPG2)	HSPG2	Hs00194179_m1
36	Kollagén - Type I alpha1	COL1A1	Hs00164004_m1
37	Kollagén - Type III alpha1	COL3A1	Hs00164103_m1
38	Kollagén - Type IV alpha1	COL4A1	Hs00266237_m1
39	Kollagén - Type VIII alpha1	COL8A1	Hs00156669_m1
40	Kollagén - Type VIII alpha2	COL8A2	Hs00697025_m1
41	Aquaporin1	AQP1	Hs00166067_m1
42	Aquaporin2	AQP2	Hs00166640_m1
43	Aquaporin3	AQP3	Hs00185020_m1
44	Aquaporin4	AQP4	Hs00242342_m1
45	FGF8	FGF8	Hs00171832_m1
46	WNT1	WNT1	Hs00180529_m1
47	WNT2	WNT2	Hs00608224_m1
48	WNT2B	WNT2B	Hs00244632_m1

49	Lactadherin (MFG-E8, HMFG)	MFGE8	Hs00170712_m1
50	Kadherin E	CDH1	Hs00393592_m1
51	Kadherin N	CDH2	Hs00169953_m1
52	Kadherin N2 - Brain Kadherin	CDH12	Hs00415843_m1
53	Kadherin P	CDH3	Hs00354998_m1
54	TGF Beta1 (Camurati-Engelmann disease)	TGFB1	Hs99999918_m1
55	TGF Beta2	TGFB2	Hs00234244_m1
56	TGF Beta3	TGFB3	Hs00234245_m1
57	TGF Beta-induced, 68kDa	TGFBI	Hs00165908_m1
58	TGF Beta-induced factor (TALE family homeobox)	TGIF	Hs00820148_g1
59	TGF Beta-induced factor2 (TALE family homeobox)	TGIF2	Hs00222358_m1
60	TGF Beta-induced factor2-like, X-linked	TGIF2LX	Hs00536782_s1
61	TGF Beta-induced factor2-like, Y-linked	TGIF2LY	Hs00536782_s1
62	Transglutaminase1 (K polypeptide epidermal type I)	TGM1	Hs00165929_m1
63	Transglutaminase2 (C polypeptide)	TGM2	Hs00190278_m1
64	Transglutaminase3 (E polypeptide)	TGM3	Hs00162752_m1
65	Transglutaminase5	TGM5	Hs00188562_m1
66	Transglutaminase7	TGM7	Hs00369497_m1
67	Factor XIII A1	F13A1	Hs00173388_m1
68	Factor XIII B	F13B	Hs00157471_m1
69	Integrin - Alpha1	ITGA1 - PELO	Hs00235030_m1
70	Alpha2 (CD49B)	ITGA2	Hs00158148_m1
71	Alpha2B (CD41B)	ITGA2B	Hs00385235_m1
72	Alpha3 (CD49C)	ITGA3	Hs00233722_m1
73	Alpha5 (Fibronectin receptor)	ITGA5	Hs00233732_m1
74	Alpha6	ITGA6	Hs00173952_m1
75	Alpha7	ITGA7	Hs00174397_m1
76	Alpha8	ITGA8	Hs00233321_m1
77	Alpha9	ITGA9	Hs00174408_m1
78	Alpha10	ITGA10	Hs00174623_m1
79	Alpha11	ITGA11	Hs00201927_m1
80	Beta1 (Fibronectin receptor, CD29)	ITGB1	Hs00559595_m1
81	Beta2 (CD18)	ITGB2	Hs00164957_m1
82	Beta3 (CD61)	ITGB3	Hs00173978_m1
83	Beta4	ITGB4	Hs00236216_m1
84	Beta5	ITGB5	Hs00609896_m1
85	MMP-1 (Interstitial Kollagenase)	MMP1	Hs00233958_m1
86	MMP-2 (Gelatinase A)	MMP2	Hs00234422_m1
87	MMP-8 (Neutrophil Kollagenase)	MMP8	Hs00233972_m1
88	MMP-9 (Gelatinase B)	MMP9	Hs00234579_m1
89	MMP-13 (Kollagenase 3)	MMP13	Hs00233992_m1
90	EGFR (erb B1)	EGFR	Hs00193306_m1
91	erb B2	ERBB2	Hs00170433_m1
92	erb B3	ERBB3	Hs00176538_m1
93	erb B4	ERBB4	Hs00171783_m1
94	Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Hs00157674_m1
95	CEA = CEACAM5	PSG2/CEACAM5	Hs00237075_m1
96	Citokeratin-18	KRT18	Hs01920599_gH
97	Citokeratin-19	KRT19	Hs00761767_s1
98	Ki-67	MKI67	Hs00606991_m1

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

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

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

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

Expressziós értékeket a comparative C_T method segítségével határoztuk meg, ahogy azt az irodalomban már korábban leírták (Livak és Schmittgen, 2001). Röviden, feltételezve, hogy a PCR hatékonysága bármely gén esetében TLD-Assay-t használva az 1-hez közelít, egy tumoros vagy normál (kalibrátor) mintában a gén mRNS expresszióját (Han és mtsai. 2005) össze lehet hasonlítani a következő egyenlet segítségével (Hirose és mtsai. 2001):

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

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

Immunhisztokémia (IHC) és mikroszkópos analízis

Az első fázisban IHC vizsgálatokat nem végeztünk.

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

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

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

A fagyasztott mintákat Saint Marie oldatban (Sainte-Marie, 1962; Tuckett és Morriss-Kay, 1988) fixáltuk 24 órán keresztül 4°C -on. A fixáció és dehidráció után a mintákat viaszba ágyaztuk és $5\text{-}\mu\text{m}$ vastag szeleteket készítettünk. A mintákat haematoxylin-eosin festékkel festettük meg, de emellett immunhisztokémiai eljárást is alkalmaztunk a következő protokoll szerint: a mintákat előinkubáltuk ready-to-use 2.5% normal horse szérumban (Vector, Burlingame, CA, USA) 30 percen keresztül 37°C -on, így a nem specifikus primer antitest kötődését gátoltuk meg. Brevikán meghatározásához MAB40091 (Monoclonalis Antibody Brevikán40091) (R&D Systems, Minneapolis, USA), neurokánhoz AB26003 (ABCAM, Cambridge, USA), tenaszcinhoz AB19011 és a verzikánhoz AB1032 (Chemicon, Millipore, USA) antitesteket használtunk.

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

Az immunhisztokémiai metszeteket három különböző, tapasztalt kutató elemezte ki és értékelte a 2. fázisban 1-től 4-ig, a 3. fázisban a különbségek észlelésének finomítása érdekében 1-től 5-ig terjedő skálán. A pontértékek az intercelluláris stroma festődési

intenzitását jellemezték, ahol az 1-es érték a negatív, a maximális érték a legintenzívebben festődő mintát jelentette.

Statisztikai módszerek

A mérések pontosítása és a statisztikai analízis érdekében minden quantitative real time polymerase chain reaction (QRT-PCR) mérést kétszer végeztünk el. Mintáink statisztikai elemzése során az egyes gének expressziós szintjei közötti különbség meghatározásához a Mann-Whitney féle U-próbát alkalmaztuk. A $p \leq 0,05$ esetén az eredményeket szignifikánsnak tekintettük.

2.3.2. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára

Betegek

Ehhez a tanulmányhoz 31, idegsebészeti műtét során eltávolított és intraoperatív gyorsfagyasztott humán GBM szövetmintát vizsgáltunk. A mintákat a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat és Szövetbankból válogattuk ki úgy, hogy 15 minta onkoterápiában még nem részesült betegről származott, 16 esetben pedig sugár- és kemoterápiát követően kiújult daganat reszekciója során nyert tumorszövetet dolgoztunk fel. A betegek onkoterápiájának összefoglalását a 3. táblázat tartalmazza. A műtét során eltávolított mintát azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és feldolgozásig -80°C -on tároltuk. A szövettani diagnózist tapasztalt neuropatológus verifikálta. A szövetmintákban az inváziós panel részeként 19 darab ECM alkotóelem RNS és fehérje szintű génexpresszióját határoztuk meg. A mátrix molekulákat, melyek között transzmembrán fehérje, bontó enzim és PG is van, a korábbi kutatási eredményeink alapján választottuk ki (4. táblázat).

Betegszám	Kezelés
Beteg 1	RT + 2 TEM
Beteg 2	CRT + 6 TEM
Beteg 3	CRT
Beteg 4	RT + 4 TEM
Beteg 5	CRT + 6 TEM
Beteg 6	CRT + 6 TEM
Beteg 7	CRT + 6 TEM
Beteg 8	CRT

Betegszám	Kezelés
Beteg 9	CRT + 2 TEM
Beteg 10	CRT + 6 TEM
Beteg 11	CRT
Beteg 12	CRT + 2 TEM
Beteg 13	RT + 15 TEM
Beteg 14	CRT
Beteg 15	RT + 15 TEM
Beteg 16	CRT + 1 TEM

3. táblázat. A kezelés utáni betegcsoport onkoterápiájának részletei. RT: 30x1,8Gy fokális agyi sugárkezelés, CRT: konkuráló kemorradiáció (RT+75 mg/m² temozolomid napi adása), TEM: temozolomid monoterápia (első ciklus: 150 mg/m², utána 200 mg/m²)

Gén	TLDA azonosító
Brevikán	BCAN-Hs00222607_m1
Kadherin-N2	CDH12-Hs00415843_m1
CD168	HMMR-Hs00234864_m1
Kollagén type III alpha1	COL3A1-Hs00164103_m1
Erb B2	ERBB2-Hs00170433_m1
Fibronectin	FN1-Hs00277509_m1
Integrin alpha1	ITGA1-Hs00235030_m1
Integrin alpha3	ITGA3-Hs00233722_m1
Integrin alpha7	ITGA7-Hs00174397_m1
Integrin beta1	ITGB1-Hs00559595_m1
Laminin alpha4	LAMA4-Hs00158588_m1
Laminin beta1	LAMB1-Hs00158620_m1
Matrix metalloproteinase-2	MMP2-Hs00234422_m1
Matrix metalloproteinase-9	MMP9-Hs00234579_m1
Neurokán	NCAN-Hs00189270_m1
Szindekán-1	SDC1-Hs00174579_m1
Tenaszcin-C	TNC-Hs00233648_m1
Tenaszcin-R	TNR-Hs00162855_m1
Verzikán	VCAN-Hs00171642_m1

4. táblázat. A vizsgált gének (inváziós panel) és az RNS analízis során használt assay próbák listája.

A vizsgált molekulák mintákban való mRNS szintjét valós idejű kvantitatív reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció (RT-QPCR) segítségével mértük meg, a kapott értékeket pedig komparatív C_T módszerrel számoltuk ki a korábban bevált módszer szerint.

Az mRNS szint meghatározását követően kvantitatív fehérje analízist végeztünk. Először szövet homogenizátumot készítettünk, ugyanúgy, mint a QRT-PCR-hoz, azonban a szöveti lízishez 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 17 mM beta-mercaptoethanol és 0.5% Triton-X100 lízis puffert használtuk. A homogenizátum fehérje koncentrációját Bradford-módszerrel mértük meg. A fehérjék relatív mennyiségének meghatározásáért az SRM (*selected reaction monitoring*) célzott tömegspektrometriás módszerrel végeztük. A kapott SRM spektrum görbe alatti területének kiszámításával, és további szoftveres analízissel (Analyst 1.4.2) megkaptuk az egyes minták fehérje szintjeit.

Statisztikai módszerek

Fehérje és mRNS szinten is a szignifikáns expressziókülönbséget Mann-Whitney U-teszttel határoztuk meg. A szignifikancia szint $p < 0,05$ volt, emellett 95%-os konfidencia intervallumot is számoltunk.

2.3.3. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban

Betegek

Összesen 27, idegsebészeti műtét során eltávolított humán agyszövetminta került feldolgozásra. Az alábbi három szöveti típust különböztettük meg: GBM makroszkóposan közvetlenül daganat melletti területe (peri-GBM, 9 db), tüdő adenokarcinóma intracerebrális metasztázis peritumorális zónája (peri-Met, 9 db) és nem tumoros agyszövet (Norm, 9 db). A peritumorális mintavételek csak akkor történtek meg, amikor az a tumor eltávolítása során elkerülhetetlen volt. A nem tumoros agyszövetmintákat epilepszia sebészet során eltávolított agyrészletekből gyűjtöttük. Mindegyik mintát a további vizsgálatok megkezdése előtt tapasztalt neuropatológus értékelte és osztályozta.

Gén	TLDA azonosító
Brevikán	BCAN-Hs00222607_m1
Kadherin-N2	CDH12-Hs00415843_m1
Kollagén type III alpha1	COL3A1-Hs00164103_m1
EGFR (erb B1)	EGFR-Hs00193306_m1
Erb B2	ERBB2-Hs00170433_m1
Fibronectin	FN1-Hs00277509_m1
CD168	HMMR-Hs00234864_m1
Integrin alpha1	ITGA1-Hs00235030_m1
Integrin alpha3	ITGA3-Hs00233722_m1
Integrin alpha7	ITGA7-Hs00174397_m1
Integrin beta1	ITGB1-Hs00559595_m1
Laminin alpha4	LAMA4-Hs00158588_m1
Laminin beta1	LAMB1-Hs00158620_m1
Matrix metalloproteinase-2	MMP2-Hs00234422_m1
Matrix metalloproteinase-9	MMP9-Hs00234579_m1
Neurokán	NCAN-Hs00189270_m1
Tenaszcin-C	TNC-Hs00233648_m1
Tenaszcin-R	TNR-Hs00162855_m1
Verzikán	VCAN-Hs00171642_m1

5. táblázat. A vizsgált gének (inváziós panel) és RNS analízis során használt assay próbáik listája.

Az inváziós panel molekulái mRNS és fehérje expressziójának meghatározása

A molekulákat korábbi kutatási eredményeink alapján választottuk ki (5. táblázat), és a korábban részletezett módon végeztük el az RNS és fehérje expressziós értékek meghatározását.

Statisztikai módszerek

A három szövettani csoport 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.

2.3.4. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblastomában

Kutatásunk során az Agydaganat- és Szövetbankból származó, intraoperatív gyorsfagyasztott GBM minták esetében végeztünk méréseket. Az mRNA és protein expressziót 20 ECM alkotó esetében vizsgáltuk (inváziós panel), melyeket a korábbi eredményeink alapján választottunk ki. Az inváziós panelbe ezúttal beválogatott molekulákat a 6. táblázat tartalmazza.

1	brevikán
2	kadherin-12
3	kollagén, type III, alpha-1 chain
4	EGFR
5	ERBB2
6	fibronektin-1
7	HMMR (CD168, RHAMM)
8	integrin, alpha-1 chain
9	integrin, alpha-3 chain
10	integrin, alpha-7 chain
11	integrin, beta-1 chain
12	laminin, alpha-4 chain
13	laminin, beta-1 chain
14	MMP-2
15	MMP-9
16	neurokán
17	szindekán-1
18	tenascin-C
19	tenascin-R
20	verzikán

6. táblázat. A kutatás során vizsgált inváziós panelt képviselő ECM alkotók. A molekulák mRNA és protein szintű expresszióját QRT-PCR és tömegspektroszkóp segítségével vizsgáltuk.

Betegek és szövetminták

Vizsgálatainkhoz 26 betegből származó GBM mintát választottunk ki. A betegek átlagos életkora: $58,69 \pm 8,01$ min. 43 év, max: 75 év volt. A mintabeválasztásnál alapvető szempont volt, hogy minden beteg azonos kezelési protokoll szerint került ellátásra: a betegek subtotális daganatreszekció után konkuráló kemo-irradiációban és TMZ monoterápiában részesültek. TMZ mellett bekövetkező progresszió esetén bevacizumab monoterápiát alkalmaztunk ameddig a klinikai állapot lehetővé tette. A mintákat két csoportba osztottuk a teljes túlélés alapján; saját intézeti tapasztalataink alapján a Stupp protokollban részesülő betegek esetében meghatározott átlagos, 23 hónapos túlélést tekintettük szelekciós tényezőnek. A 23 hónap vagy annál rövidebb teljes túléléssel rendelkező betegekből származó mintákból képeztük az „A” csoportot, míg a „B” csoportba a 23 hónapnál nagyobb teljes túlélést mutató betegek kerültek (A csoport 12 fő, B csoport 14 fő).

Módszer

A mintákban a kiválasztott molekulák mRNS szintű expresszióját kvantitatív real-time PCR-ral, a fehérjeszintű expressziót tömegspektrométerrel határoztuk meg a korábbi vizsgálatainkkal megegyezően.

Statisztikai elemzés

A túlélési, valamint a molekulák expressziójának méréséből származó adatok összehasonlítását kétmintás t-próbával, illetve statisztikai aránybecsléssel végeztük. Az egyes molekulák túlélésre gyakorolt hatásának elemzése során az LWL (*locally weighted learning*) és „J48 pruned tree” döntési fa elnevezésű statisztikai osztályozókat használtuk. A statisztikai elemzést biomatematikus segítségével a Weka 3.6 statisztikai elemzőszoftverrel végeztük.

2.4. Agyi áttéti daganat és gliomák invazivitásának összehasonlítása

2.4.1. mRNS expressziós eredmények

1. fázis

Az első fázisban az irodalmi áttekintés alapján összeválogatott, tumoros invázióban szerepet játszó 96 molekula mRNS expressziós szintjét határoztuk meg GBM, tüdő adenokarcinóma agyi áttéti és peritumorális agyszövet mintákon. A mérések alapján határoztuk meg azoknak a molekuláknak a körét, melyek a tapasztalt eltérések alapján nagyobb számú szövetmintán való további vizsgálatra is érdemesnek találtunk (inváziós panel).

2. fázis

Az ezt követő fázisban GBM és a tüdő adenokarcinóma esetében az inváziós panel 23, peritumorális infiltrációban szerepet játszó ECM-komponensből állt. A 23 molekulából 17 tartozott a PG-k közé, a további 6 vizsgált molekula pedig az enzimeket képviselte. A fentiekén kívül szintén meghatároztuk tumorspecifikus markerként a GFAP és a citokeratin-18,19 valamint proliferációs markerként a Ki67 mRNS expresszióját (7. táblázat).

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

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

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

A két különböző eredetű daganatban mért mRNA expressziós értékek összehasonlítása során a GBM mintákban az adenokarcinóma áttétéhez képest szignifikánsan magasabb szintet mértünk a brevikán, a neurokán, a neuroglükán-C, a szindekán-2, a tenaszcin-C, a verzikán, és az MMP-2 esetében.

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

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

3. fázis

A harmadik fázisban harminc szövetmintát vizsgáltunk három különböző homogén szövetcsoportban: 11 GBM mintát, melyek a tumor marginális zónájából származtak, további 10 mintát intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisból, 9-et pedig normál agyszövetből. A statisztikai analízis eredményeit a 34 molekulából álló inváziós panel mRNA expresszió különbségei tekintetében a vizsgált mintacsoportok között a 8. táblázatban foglaltuk össze.

A tumormarkerek és a Ki67 proliferációs marker mRNA expressziója megerősítette a szövettani diagnózist.

A) GBM versus normál agyszövet

Az agrin, fibronectin, laminin α 4, β -1, β -2, perlekán, szindekán-1, tenaszcin-C, CD44, CD168, HAS-2, MMP-2 és -9 mRNA expressziója szignifikánsan emelkedett volt GBM-ben összehasonlítva a normál agyszövettel, miközben a szindekán-4, tenaszcin-R és HAS-1 mRNA expressziója statisztikailag alacsonyabb volt GBM-ben. Az aggregán, brevikán, laminin α -1, -2, laminin β -1, laminin γ -1, matrilin-1, -2, neurokán, neuroglükán, szindekán-2, verzikán, kondroitinases, HAS-3 és MMP-8 mRNA szintjei nem különböztek lényegesen a normál agyszövetben és GBM-ben.

B) Intracerebrális tüdőeredetű adenokarcinóma metasztázis és normál agyszövet

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

	Norm - Met		Norm - GBM		GBM - Met	
	<i>p</i> érték	fold change	<i>p</i> érték	fold change	<i>p</i> érték	fold change
aggregán	0,421	0,79	0,421	0,39	1,000	2,01
agrin	0,002	0,30	0,012	0,44	0,218	0,67
brevikán	<0,001	172,46	0,820	1,27	<0,001	135,66
fibronectin	<0,001	0,08	<0,001	0,09	0,916	0,87
laminin alfa-1	0,032	4,55	0,548	2,98	0,421	1,53
laminin alfa-2	0,310	1,84	0,841	0,82	0,222	2,24
laminin alfa-4	0,713	0,85	0,023	0,47	0,098	1,79
laminin beta-1	0,020	0,36	0,001	0,27	0,379	1,33
laminin beta-2	0,020	0,44	0,005	0,34	0,130	1,29
laminin gamma-1	0,016	0,29	0,222	0,38	1,000	0,76
matrilin-1	0,548	1,69	0,310	2,34	1,000	0,72
matrilin-2	0,002	6,07	0,761	0,90	<0,001	6,72
neurokán	<0,001	44,76	0,095	2,29	0,001	19,50
neuroglükán-C	<0,001	46,94	0,058	3,15	<0,001	14,89
perlekán	<0,001	0,08	<0,001	0,12	0,342	0,70
szindekán-1	<0,001	0,01	0,008	0,23	<0,001	0,06
szindekán-2	0,008	3,27	1,000	1,44	0,151	2,27
szindekán-4	0,020	0,41	0,048	1,53	0,008	0,27
tenaszcin-C	0,348	0,40	0,006	0,06	0,007	6,91
tenaszcin-R	<0,001	136,10	<0,001	10,53	0,018	12,92
verzikán	0,596	1,27	0,289	0,56	0,307	2,29
CD44	0,094	0,39	0,003	0,15	0,012	2,70

CD168	<0,001	0,06	<0,001	0,12	0,053	0,46
kondroitinases (AC,ABC)	0,222	0,77	0,841	0,95	0,690	0,81
hialuronan synthase-1	<0,001	26,98	<0,001	33,55	0,504	0,80
hialuronan synthase-2	0,838	0,77	0,002	0,11	0,003	6,84
hialuronan synthase-3	0,421	1,75	0,690	0,83	0,222	2,10
MMP-2	0,131	0,37	0,004	0,15	0,032	3,08
MMP-8	1,000	0,89	0,857	1,50	0,310	0,60
MMP-9	0,001	0,06	<0,001	0,05	0,805	1,11
citokeratin 18	0,008	0,002	0,310	0,72	0,008	0,003
citokeratin 19	0,008	0,003	0,151	4,49	0,008	0,001
GFAP	0,016	33,31	0,548	0,73	0,008	45,61
Ki67	0,008	0,01	0,008	0,01	0,548	0,82

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

C) GBM és tüdő adenokarcinóma metasztázis

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

4. fázis

A negyedik lépésben elvégzett mérések során három különböző eredetű és dignitású tumor eredményeit hasonlítottuk össze egymással és a peritumorális agyszövet eredményeivel.

Összehasonlítva a génextpressziót a NSCLC agyi áttétjében és a II-es grádusú asztrocitómában a kadherin-3, kollagén type I, III és IV, fibronektin, perlekán, szindekán-1 és -4 és a MMP-9 expressziója volt jelentősen magasabb a metasztázisban. Ezzel szemben, a

brevikán, kadherin-2, laminin alpha-4, beta-2, matrillin-2, neurokán, szindekán-3, tenaszcin-C és -R, verzikán, HAS-2 és MMP-2 szintjeit az asztrocitómában találtuk magasabbnak.

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

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

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

A schwannoma mintákban az agrin, a kollagén I, III, IV és VIII típusok, a fibronectin, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2, matrillin-2, perlekán, szindekán-3 és -4, HAS-2 és MMP-2 mRNS értékeit mértük magasabbnak a normál agyszövethez viszonyítva, míg a normál agyból vett mintákban a brevikán, neurokán, neuroglükán-C és tenaszcin-R mRNS-ek magasabb értékeit rögzítettük.

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

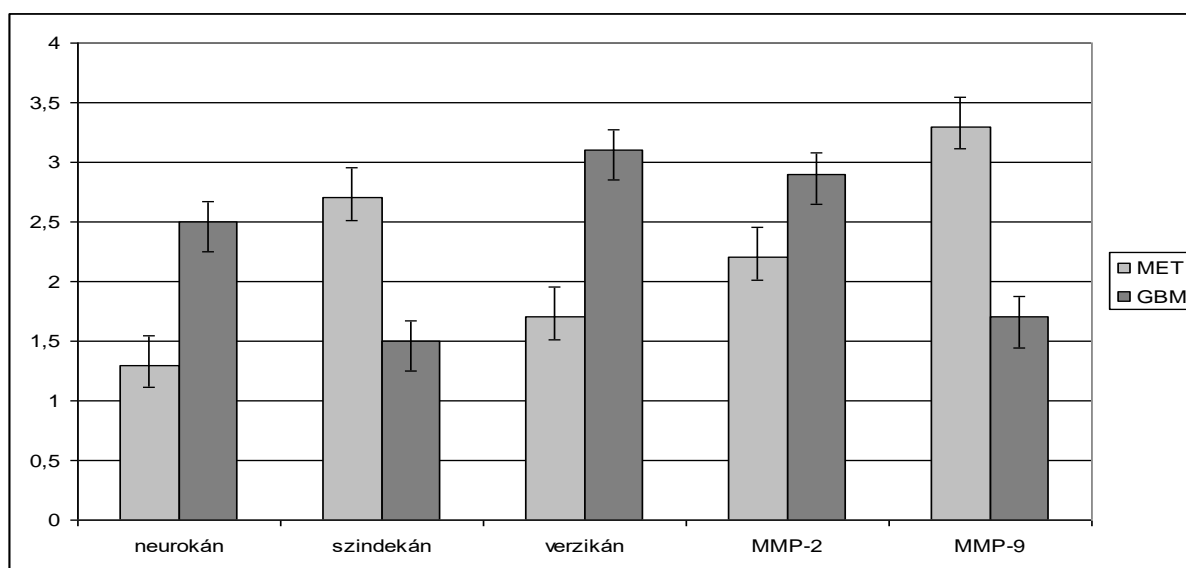
2.4.2. Immunhisztokémiai eredmények

1. fázis

Az első fázisban nem végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat.

2. fázis

Öt molekula esetében (neurokán, verzikán, szindekán, MMP-2 és -9) vizsgáltuk az immunhisztokémiai reakció intenzitását. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a neurokán, a verzikán és a MMP-2 esetében a glioblasztómában az áttéti daganathoz képest egyértelműen magasabb értékeket állapítottunk meg. A szindekán és az MMP-9 az adenokarcinómában mutatott intenzívebb festődési reakciót (1. ábra).

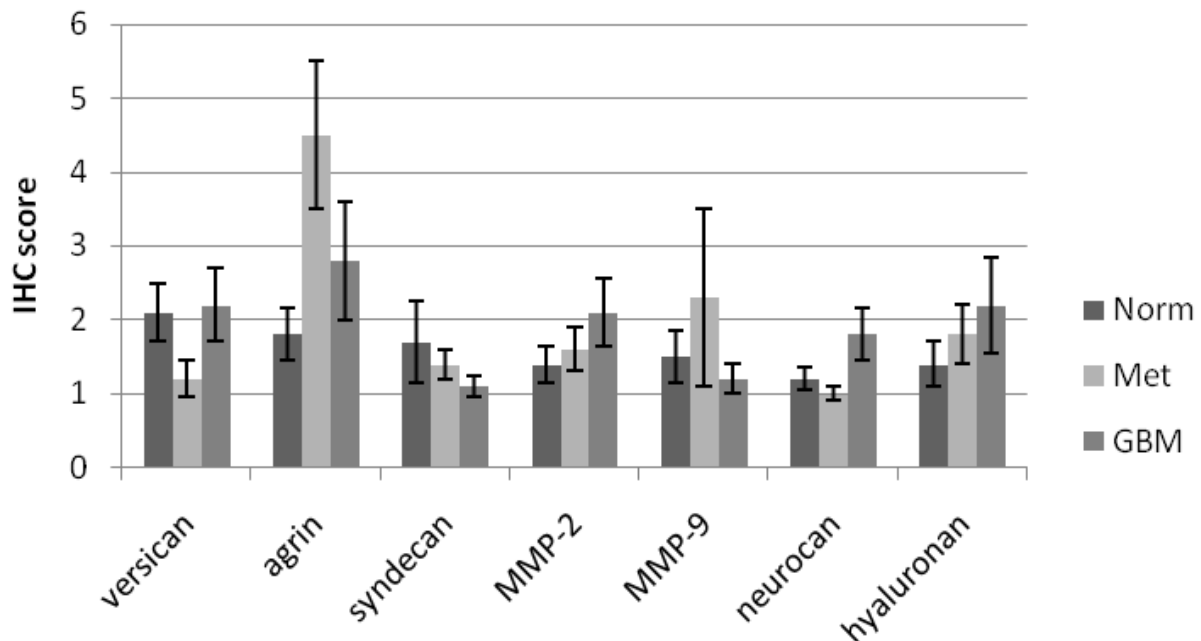


1. ábra. Immunhisztokémiai reakciók szemi-kvantitatív eredménye glioblasztómában (GBM) és tüdő adenokarcinóma agyi áttétében (MET). Minden metszeten három különböző területen 0-4-ig osztályoztuk a festődési intenzitást, majd eredményeinket átlagolva jutottunk a végleges értékekhez.

3. fázis

A harmadik fázisban GBM, adenokarcinóma áttét és peritumorális agyszövetmintákon végeztünk immunhisztokémiai festést és összehasonlító elemzést 7 molekulára vonatkozóan: agrin, hialuronan, neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 és -9. Az immunhisztokémiai és HA hisztokémiai reakciókat a 2. ábrán foglaltuk össze. A morfológiai értékelésnek megfelelően az immunreaktivitás a legkifejezettebb az agrin, neurokán, szindekán és verzikán esetében a sejtmembránon és az extracelluláris térben volt, míg a MMP-k erős immunreaktivitást mutattak a sejtmembránon és intracellulárisan. A legerősebb immunfestődés az agrin, szindekán és MMP-9 esetében a tüdő adenokarcinóma metasztázisban volt megfigyelhető, míg a MMP-2, neurokán és hialuronan a legmagasabb

értékeket GBM mintákban mutatta. A tumormarkerek és a Ki-67 festődési intenzitása megfelelt a kórszöveti diagnózisnak.



2. ábra. Négy proteoglikán, két MMP és a hialuronsav immunhisztokémiai festődési intenzitása glioblasztómában (GBM) intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisban (Met) és normál agyszövetben (Norm). A reakciókat 1-5-ig felállított *score* szerint három különböző régióban határoztuk meg. Az egyes régiókból nyert *score*-okat összehasonlítás céljából átlagoltuk.

4. fázis

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

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

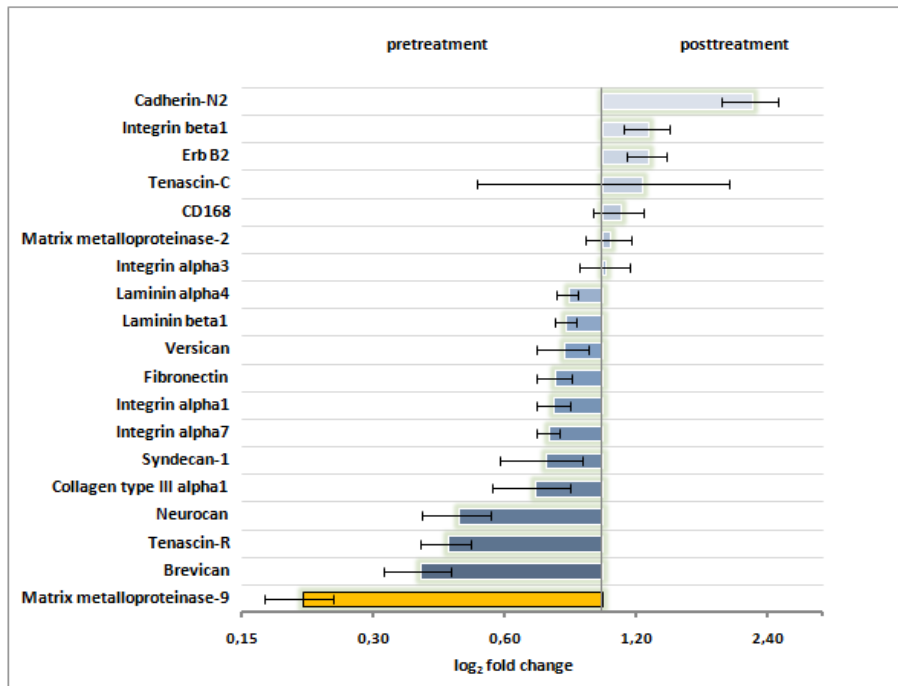
2.5. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára

2.5.1. RNS expressziós eredmények

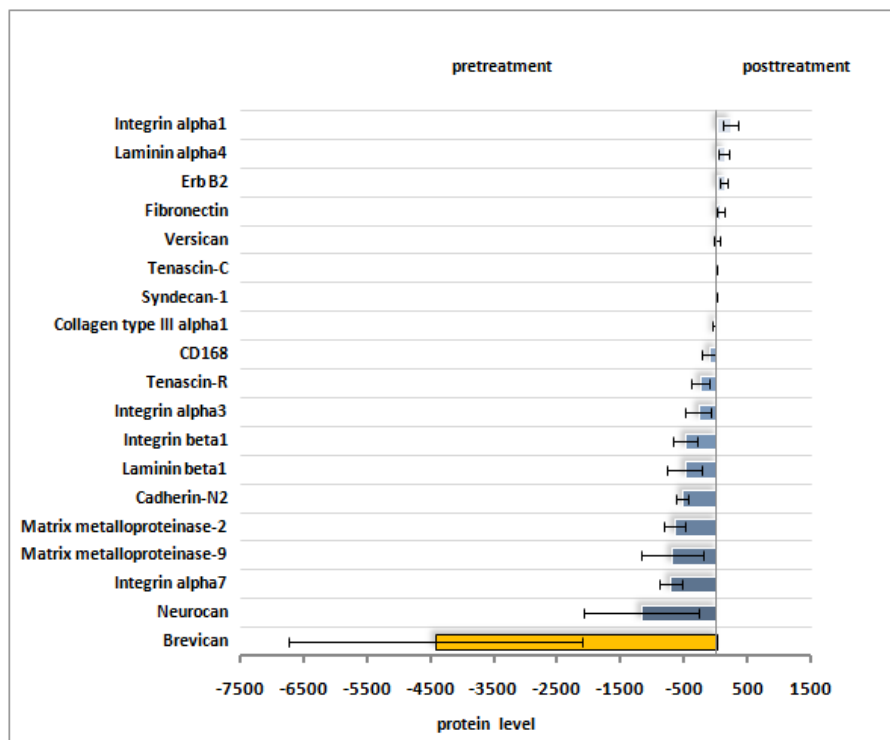
A konkuráló kemo-irradiációs kezelés előtti és utáni GBM szövetminták esetében a génextpresszió összehasonlítása során a kezelt mintákban a 19 vizsgált molekulából 12 molekula RNS szintje csökkent (brevikán, kollagen type III alpha1, fibronectin, integrin alpha1, integrin alpha7, laminin alpha4, laminin beta1, MMP-9, neurokán, szindekán1, tenaszcin-R, verzikán), míg 7 molekula transzkriptumában láttunk emelkedést (kadherin N2, CD168, erbB2, integrin alpha3, integrin beta1, matrix metalloproteinase-2, tenaszcin-C), (3. ábra).

2.5.2. Proteomikai eredmények

Kvantitatív fehérje vizsgálattal 2 molekula esetében (szindekán-1, tenaszcin-C) nem kaptunk értékelhető eredményt, 12 vizsgált fehérje szintje csökkent (brevikán, kadherin N2, CD168, kollagén type III alpha1, erbB2, integrin alpha3, integrin alpha7, integrin beta1, laminin beta1, MMP-2, MMP-9, neurokán, tenaszcin-R) 5 génnél pedig a fehérje koncentráció növekedését tapasztaltuk (erbB2, fibronectin, integrin alpha1, laminin alpha-4, verzikán) (4. ábra).



3. ábra. A vizsgált extracelluláris-mátrix molekulák (inváziós panel) RNS expressziójának *fold change* változása onkoterápia előtti, valamint utáni glioblasztoma mintákban log₂ skálán feltüntetve. A balra mutató sávok magasabb kezelés előtti szintet jelentenek, míg a jobbra mutatók onkoterápia utáni magasabb expressziót. A szignifikáns változást világosszürke színnel jelöltük.



4. ábra. A vizsgált extracelluláris mátrix molekulák (inváziós panel) fehérje szintű mennyiségi változásai (*fold change*, log₂ skálán feltüntetve) kezeletlen és konkuráló kemo-irradiációban részesült glioblasztoma mintákban. A molekulák a változás mértékének sorrendjében szerepelnek. A balra irányuló vonalak a kezelés előtti magasabb szintet, a jobbra irányuló vonalak a kezeléseket utáni magasabb szintet jelentik. A szignifikáns változást világosszürke színnel jelöltük.

Az expressziós változásokat RNS és fehérje szinten együtt elemezve 8 esetben látható konkordáns változás (9. táblázat). A brevikán, kollagén type III alpha1, integrin alpha7, laminin beta1, MMP-9, neurokán, tenascin-R a kezelt mintákban mindkét vizsgálatban konzekvens expressziócsökkenést mutat, ezzel ellentétben az erbB2-nél a transzkripció és a transláció során is expresszióemelkedés 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 (protein szint: -4432,44, p érték: 0,006 95%-os CI: [-8857,43] - [-7,46]) csökkent szignifikáns mértékben az onkoterápiát követően.

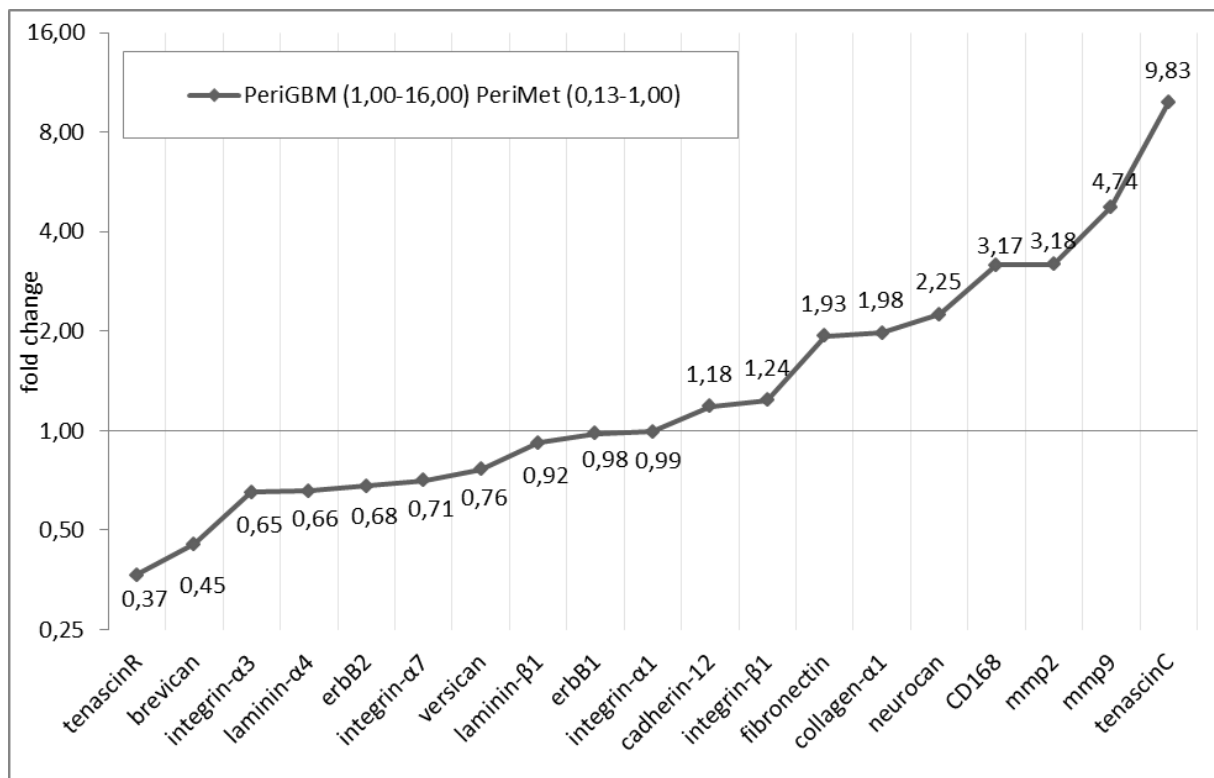
Molekula	RNS		FEHÉRJE		RNS	FEHÉRJE
	fold change	p érték	fehérje szint	p érték		
Matrix metalloproteinase-9	0,21	0,006	-696,52	0,767	↓	↓
Brevican	0,38	0,149	-4432,44	0,006	↓	↓
Tenascin-R	0,44	0,260	-248,43	0,597	↓	↓
Neurocan	0,47	0,244	-1174,38	0,716	↓	↓
Collagen type III alpha1	0,70	0,540	-35,47	0,806	↓	↓
Syndecan-1	0,74	0,678	0,00	0	↓	-
Integrin alpha7	0,75	0,161	-720,12	0,113	↓	↓
Integrin alpha1	0,78	0,228	218,80	0,575	↓	↑
Fibronectin	0,78	0,395	68,87	0,753	↓	↑
Versican	0,82	0,859	1,70	0,909	↓	↑
Laminin beta1	0,83	0,185	-499,08	0,223	↓	↓
Laminin alpha4	0,84	0,374	124,27	0,766	↓	↑
Integrin alpha3	1,02	0,621	-279,55	0,307	↑	↓
Matrix metalloproteinase-2	1,04	0,859	-660,13	0,093	↑	↓
CD168	1,10	0,737	-116,92	0,482	↑	↓
Tenascin-C	1,24	0,984	0,00	0	↑	-
Erb B2	1,27	0,429	121,35	0,503	↑	↑
Integrin beta1	1,28	0,199	-496,82	0,112	↑	↓
Cadherin-N2	2,20	0,334	-538,95	0,166	↑	↓

9. táblázat. A vizsgált extracelluláris mátrix molekulák (inváziós panel) RNS és fehérje szintű expresszióváltozásai kezeletlen, valamint sugár- és kemoterápia utáni glioblasztoma mintákban. A világosszürke sorok az RNS és fehérje szinten is egyirányú változást mutató molekulákat jelölik, a fekete háttérrel kiemelés pedig a szignifikáns változást jelenti.

2.6. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban

2.6.1. RNS expressziós eredmények

A peri-GBM és peri-Met összehasonlításban tíz molekula mutatott relatív expressziónövekedést a peri-metasztatikus szövetben: brevikan, ErbB1, ErbB2, integrin alfa-1, alfa-3, alfa-7, laminin alfa-4, beta-1, tenascin-R, verzikán. Kilenc gén esetében volt megfigyelhető fokozott expresszió GBM peritumorális mintáiban: N-kadherin-2, kollagén alfa-1, fibronectin, CD168, integrin beta-1, mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2), MMP-9, neurokán, tenascin-C. Két esetben találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést: a tenascin-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 (5. ábra).



5. ábra. Az invázióval összefüggésben vizsgált molekulák (inváziós panel) mRNA expressziós *fold change* változása log₂ alapú skálán glioblasztoma melletti agyállomány (peri-GBM) és áttéti daganat melletti agyállomány (peri-Met) szövetekben. A molekulák a kapott értékek növekvő sorrendjében szerepelnek. Az 1,00 alatti érték peri-Met-ben lévő fokozott expressziót, míg az 1,00 feletti érték peri-GBM-ben lévő fokozott expressziót jelent.

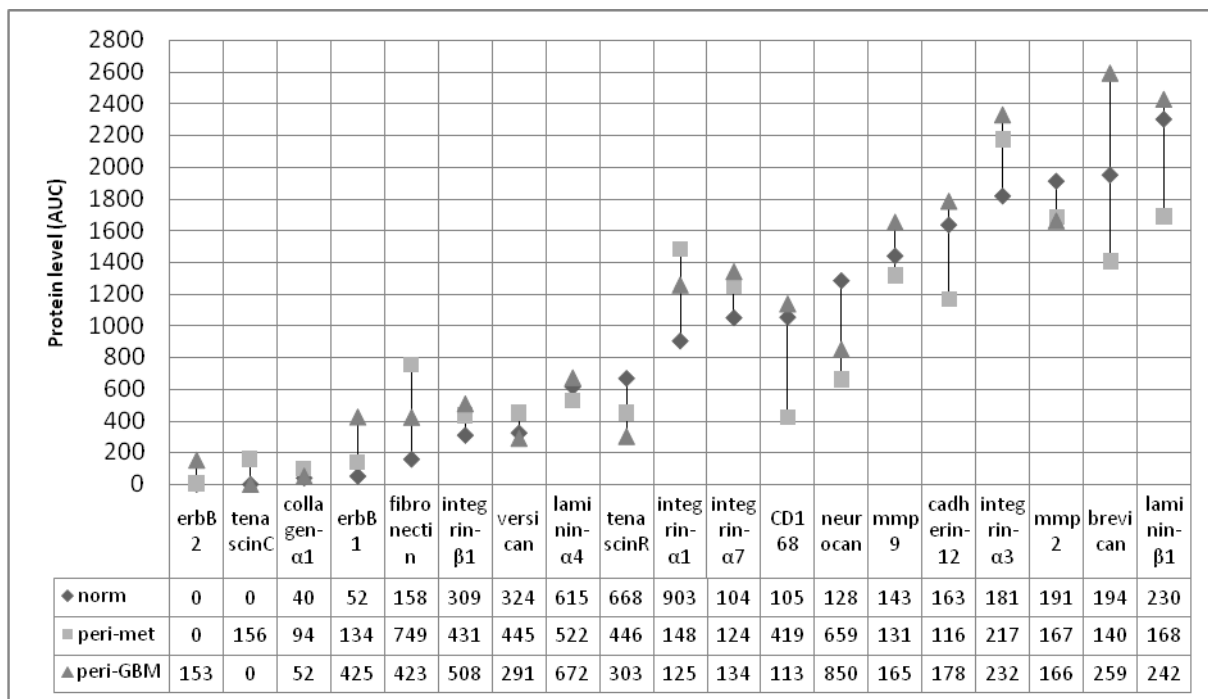
A peri-GBM mintákat a Norm szövethez viszonyítva 14 esetben volt peritumorálisan expresszió emelkedés: N-kadherin-2, kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, fibronectin, CD168, integrin alfa-1, alfa-3, beta-1, laminin beta-1, MMP-2, MMP-9, neurokán, tenaszcin-C, de csak a CD168 (95% CI: 0,30-0,44) esetében volt statisztikailag szignifikáns az eltérés. 5 gén expressziója csökkent peri-GBM-ben nem tumoros agyszövethez viszonyítva: brevikan, integrin alfa-7, laminin alfa-4, tenaszcin-R, verzikan, mely közül csak a tenaszcin-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: brevikan, kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, CD168, integrin alfa-1, integrin alfa-3, integrin alfa-7, integrin beta-1, laminin alfa-4, laminin beta-1, MMP-9, verzikan. Emellett mindössze hat gén szintje csökkent a peritumorális szövetben Norm-hoz viszonyítva: N-kadherin-2, fibronectin, MMP-2, neurokán, tenaszcin-C, tenaszcin-R. Ebben az összehasonlításban egyik esetben sem találtunk szignifikáns eltérést.

2.6.2. Proteomikai eredmények

Az mRNS-szinten vizsgált molekulák protein-szintű mennyiségi meghatározásához un. jelölés nélküli SRM alapú kvantitatív fehérje analízist végeztünk. Az ErbB2 és tenaszcin-C kivételével mindegyik gén fehérjéjét meg tudtuk határozni. Az összesített eredményeket a 10. táblázat mutatja.

Peri-GBM ill. peri-Met korrelációban 11 ECM fehérje mennyisége volt emelkedett GBM esetében, amiből 5 mutatott az mRNS értékekkel megegyező irányú változást: N-kadherin-2, CD168, integrin beta-1, MMP-9, neurokán. A CD168 emelkedés szignifikánsnak bizonyult (95% CI: 325,9-1109,1) csakúgy, mint gén szinten. A metasztázis körül 6 fehérje szintjének emelkedését detektáltuk, amiből 3 volt az mRNS változással megegyező: integrin alfa-1, tenaszcin-R és verzikan. A fibronectin-szint növekedés peri-Met-ben szintén szignifikánsnak bizonyult (95% CI: [-642,5]-[-10,5]).



10. táblázat. Az inváziós panel molekuláinak fehérje expressziós szintjei glioblasztoma melletti agyállomány (peri-GBM) és áttéti daganat melletti agyállomány (peri-Met) és nem tumoros betegből származó (norm) agyszövetmintákban.

Nem tumoros agyszövethez viszonyítva peri-GBM mintákban 13 fehérje szintje volt nagyobb, amiből 10 a génexpressziókkal megegyező változást mutatott: N-kadherin-2, kollagén alfa-1, ErbB1, fibronectin, CD 168, integrin alfa-1, alfa-3, beta-1, laminin beta-1, MMP-9. Mindössze 4 fehérje koncentrációja volt magasabb Norm szövetben, ebből 2 mutatott konkordanciát: tenascin-R, verzikán. Szignifikáns eltérést nem detektáltunk.

Peri-Met és Norm összehasonlításban 8 fehérje szintje emelkedett meg a peritumorális szövetben, 7 esetben konkordanciával: kollagén alfa-1, ErbB1, integrin alfa-1, alfa-3, alfa-7, beta-1, verzikán. A peri-GBM - peri-Met korrelációhoz hasonlóan a fibronectin-szint emelkedés itt is szignifikáns volt annak ellenére, hogy gén szinten ugyanúgy csökkenést detektáltunk. Peri-Met-ben nem tumoros mintákhoz képest csökkent koncentrációt mértünk 9 fehérje esetében, ebből 4 esetben volt a csökkenés az mRNS változással megegyező irányú: N kadherin-2, MMP-2, neurokán, tenascin-R. Ez utóbbi esetben sem találtunk szignifikáns eltérést.

2.7. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában

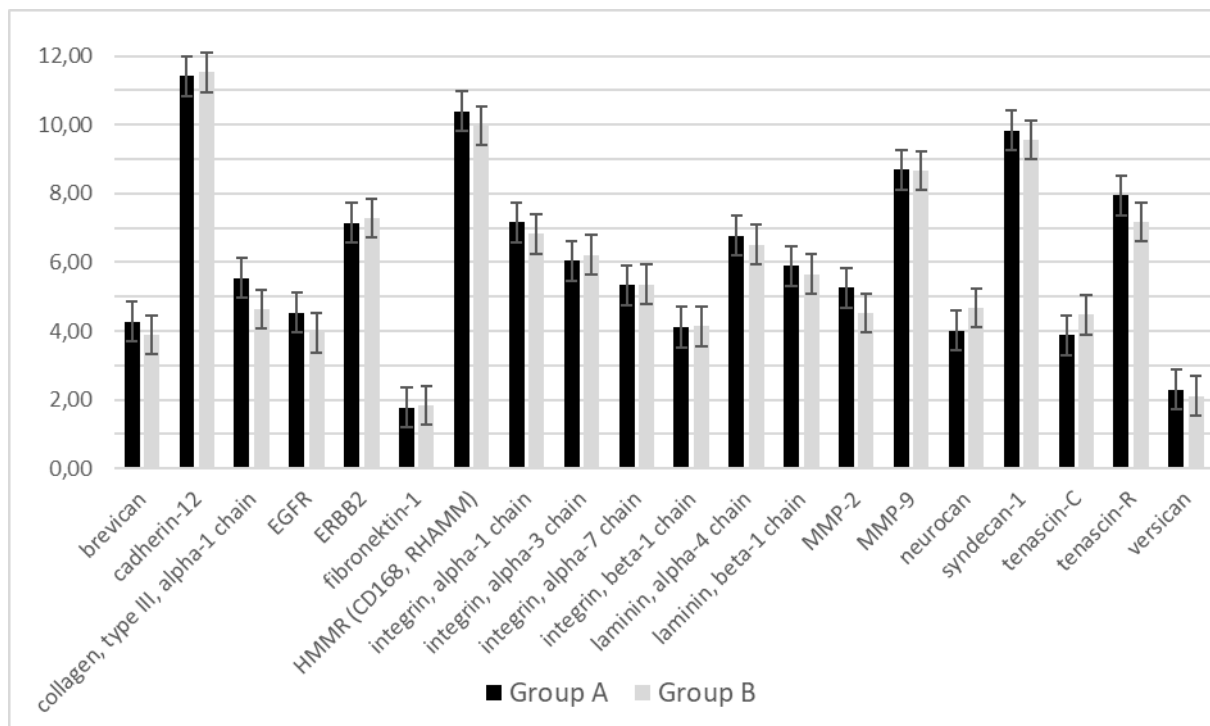
2.7.1. A betegek klinikai adatainak eredményei

A GBM mintákat két csoportba osztottuk a teljes túlélés alapján; 23 hónapos túlélést tekintettük szelekciós tényezőnek. A 23 hónap vagy annál rövidebb teljes túléléssel rendelkező betegekből származó mintákból képeztük az „A” csoportot, míg a „B” csoportba a 23 hónapnál nagyobb teljes túlélést mutató betegek kerültek (A csoport 12 fő, B csoport 14 fő).

Az invázióban szerepet játszó molekulák meghatározására kiválasztott mintákat adó betegek átlagos progressziómentes túlélése (PFS) az A csoportban $8,0 \pm 7,0$ hónap, a B csoportban $14,4 \pm 8,3$ hónap volt. Az átlagos teljes túlélés (OS) az A csoportban $13,4 \pm 8,3$ hónapnak, míg a B csoportban $35,2 \pm 13,6$ hónapnak adódott. A két csoport átlagos progressziómentes és teljes túlélése szignifikánsan különbözik egymástól (PFS: $p = 0,04$; OS: $p < 0,001$). A tumorok lebenyi lokalizációja és a daganat oldaliságában nem mutatkozott szignifikáns különbség a két eltérő túlélési csoportban ($p = 0,52$, ill. $p = 0,75$). A daganatok legnagyobb átmérője átlagosan $49,3 \pm 20,8$ mm volt az A csoportban, $43,5 \pm 17,7$ mm a B csoportban, a két csoportban a daganatok átlagos mérete nem különbözött egymástól szignifikánsan ($p = 0,42$). A két csoportban a kiújulás miatti reoperációk aránya (7/12 vs. 12/14) sem különbözik szignifikánsan egymástól ($p = 0,27$). Elmondható tehát, hogy a túléléseket leszámítva a betegek klinikai paraméterei hozzávetőlegesen azonosak, a két csoport homogenitása nem különbözik egymástól szignifikánsan.

2.7.2. Az inváziós molekulák RNS expressziós mintázata

Az egyes gének expresszióját egyedileg vizsgálva a két csoport adatai között szignifikáns különbséget nem találtunk (6. ábra). A 20 ECM alkotó expresszióját együttesen vizsgálva azonban az egyes csoportokra jellemző inváziós mintázat, azaz inváziós spektrum hozható létre, melynek statisztikai osztályozó algoritmusok elemzésével specifikus és szignifikáns eltérés igazolható a különböző túlélést mutató betegcsoportok között.



6. ábra. Az inváziós panel molekuláinak mRNS expressziós értékei különböző túlélést mutató GBM mintákban. Group A: átlagos teljes túlélés < 23 hónap; Group B: átlagos teljes túlélés > 23 hónap

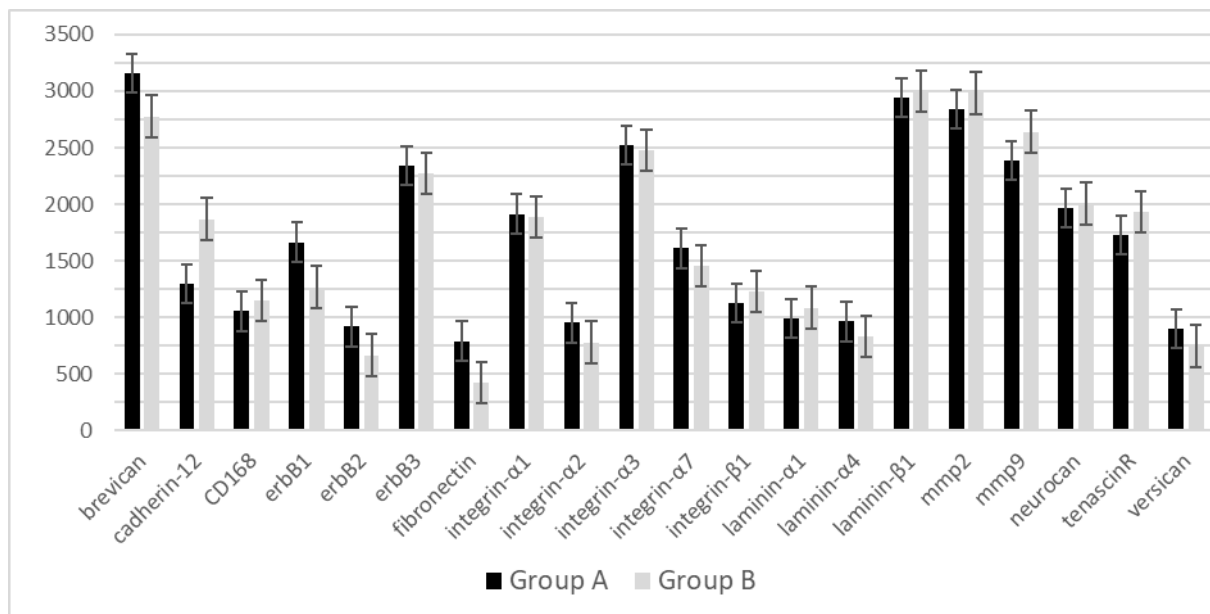
A csoport-összehasonlítást végző tesztek mellett bizonyos molekulák kulcsszerepét is meghatározták, melyek együttes expresszióváltozása a szignifikáns különbséghez nélkülözhetetlenek. A két különböző betegcsoportban a brevikan és az integrin- β 1 expressziós szintje tűnik jelentősnek a tumorok invazivitása és a várható túlélés alakulása szempontjából. Az elemző program a minták 85,2%-át azonosította helyesen, a módszer szenzitivitása 0,852; pozitív prediktív értéke 0,858 volt (11. táblázat). Az elemzések során tehát egyértelműen megállapítható, hogy a molekulák inváziós spektruma és a várható túlélés jól igazolható összefüggést mutat.

	Helyesen azonosított minták		Szenzitivitás	ROC analízis érték	Pozitív prediktív érték
	No.	%			
A csoport	9/14	64,2%	0,750	0,775	0,900
B csoport	14/15	93,3%	0,933	0,775	0,824
Összesítve	23/25	85,0%	0,852	0,775	0,858

11. táblázat. Az inváziós panel mRNS expressziós eredményeinek statisztikai osztályozóval történő elemzése után a jobb és rosszabb prognózisú csoportok elkülönülése glioblasztómában.

2.7.3. Protein expressziós eredmények

A proteinszintű elemzések során az A és B csoportok között a molekulákat egyenként vizsgálva szignifikáns különbség nem igazolható (7. ábra). A fehérje szintű expressziós értékekből összeálló inváziós spektrum az egyedi adatokkal szemben azonban jól használható, hiszen az expressziós mintázat alapján az esetek 85,7%-ában a mintát helyesen becsülte meg túlélés szempontjából (szenzitivitás: 0,857, pozitív prediktív érték: 0,893). Kiemelendő, hogy a magasabb túlélési csoportba tartozó minták mindegyikét helyesen becsülte az algoritmus (12. táblázat). A brevikan, kadherin-12, integrin- α 3, valamint laminin- α 4 és - β 1 fehérjék bizonyultak kulcsmolekulának az osztályozás szempontjából.



7. ábra. Az inváziós panel molekuláinak protein expressziós értékei különböző túlélést mutató GBM mintákban. Group A: átlagos teljes túlélés < 23 hónap; Group B: átlagos teljes túlélés > 23 hónap.

	Helyesen azonosított minták		Szenzitivitás	ROC analízis érték	Pozitív prediktív érték
	No.	%			
A csoport	6/8	0,75%	0,75	0,875	1
B csoport	6/6	100%	1	0,875	0,75
Összesítve	12/14	85,7%	0,857	0,875	0,89

12. táblázat. Az inváziós panel protein expressziós eredményeinek statisztikai osztályozóval történő elemzése után a jobb és rosszabb prognózisú csoportok elkülönülése glioblasztomában.

2.8. Agyi áttéti daganat és gliomák invazivitásának összehasonlítása

Általános megállapítás az onkológiában, hogy a tumor-eltávolítás radikalitása meghatározza az onkoterápia hatékonyságát. Ezt azonban a daganatok környezeti inváziója megghiúsíthatja, ahogyan az asztrocitomák esetében is előfordul. A peritumorális infiltrációt nemcsak a malignus gliomákban, hanem az alacsony grádusú tumorokban, így a II. grádusú asztrocitomákban is megfigyelték. Ezzel szemben a NSCLC agyi metasztázisai csak mérsékelten invazívak, így a radikális eltávolításuk általában rutin idegsebészeti beavatkozásnak számít. Tanulmányunk célja elsősorban a különböző eredetű agytumorerő invázióval összefüggésbe hozható molekulái expressziós mintázatának meghatározása és összehasonlítása volt. Másodsorban pedig azonosítani kívántuk azokat a molekulákat, amelyek elsődlegesen felelősek a II-es grádusú asztrocitomák peritumorális invazivitásáért. Mivel a tumorinvázió nagyban függ a meglehetősen nagyszámú ECM komponens és a tumorsejtek közötti interakcióktól, megvizsgáltuk egy gondosan összeválogatott 96 tagú ECM-alkotó csoport molekuláit, melyekről korábban már igazolódott, hogy aktívan részt vesznek a peritumorális infiltrációban. Az előzetes mérések során ezekből a molekulákból célzott vizsgálatokkal az intrakraniális daganatokra jellemző molekulák körét, az ún. **inváziós panelt** határoztuk meg, és további mRNS expressziós méréseinkhez a különböző daganatok összehasonlításakor már ennek a panelnek a tagjait vizsgáltuk.

2.8.1. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában és glioblasztomában

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

Korábbi tanulmányok pozitív korrelációt írtak le a glioma inváziós készsége és a brevikán, a fibronectin, a laminin, a szindekán, a tenascin-C, a verzikán, az MMP-9, a HA és a CD44 expressziója között. Saját méréseink az irodalomban közölt eredményeket részben megerősítették, részben kiegészítették, amennyiben jelentős különbséget észleltünk a normál

agy és a GBM között a fibronectin, laminin β -1, perlekán, szindekán-1, -4, tenaszcin-C, -R, CD44, CD168, HAS-1, -2, és MMP-2 és -9 mRNS profilja tekintetében.

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

ECM komponenseket és invázióval összefüggő molekulákat vizsgálták már NSCLC esetében is. A bronchialis adenokarcinómában a HA, fibronectin, laminin, verzikán, MMP-9 és a CD44 szignifikánsan magasabb expresszióját észlelték, míg a perlekán, tenaszcin-C és a szindekán nem korrelált a tumornövekedéssel. Nincs olyan adat sem, mely egyértelmű összefüggést mutatna az agrin, brevikán, matrilin, neuroglükán-C, neurokán, CD168, kondroitináz, HAS és a tüdő eredetű adenokarcinóma viselkedése között. Saját méréseink során összehasonlítva az intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisokat a normál agyszövettel, a vizsgált 30 molekula közül 18 esetében jelentős különbségeket észleltünk. Néhány molekula az eredeti szövetre jellemző (pl. a brevikán, neurokán, a neuroglükán-C az agyszövetmintákban), míg mások valószínűleg a peritumorális invázióban játszanak fontos szerepet (fibronectin, szindekán-1, -4, CD-168 és MMP-9). Az agrin, laminin β -1, β -2, γ -1 és a perlekán intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisban megnövekedett expressziójának magyarázatához még további kutatásokra van szükség.

Eredményeink szerint 11 molekula mRNS expressziója szignifikánsan különbözött a GBM és az adenokarcinóma metasztázis között. Mivel a brevikán, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C és a tenaszcin-R magasabb mRNS expressziót mutatott mind a normál agyszövetben, mind pedig a GBM-ben a metasztatikus tumorokhoz viszonyítva, ezeket a molekulákat a gliaszövetre specifikus molekuláknak tekinthetjük. Másrészt a tenaszcin-C, CD44, HAS-1 és a MMP-2 mRNS expressziója a metasztázishoz hasonlítva csak a GBM-ben volt emelkedett. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy az előbbi, GBM-ben és normál agyszövetben egyaránt magasabb szintet mutató molekulák a primer agydaganat és a peritumorális agyállomány nagyfokú hasonlóságát eredményezik, így a GBM tumorsejtjei "otthonosan érezve" magukat a környező agyállományban, azt mélyen infiltrálni képesek. A többi szövetmintához képest a GBM-ben észlelt magasabb expressziót mutató molekulák pedig valószínűleg a tumor inváziójához szükséges és azt előmozdító komponensként szerepelnek.

Az mRNS expresszió és az immunhisztokémiai eredmények összehasonlítása

A vizsgált szövetminta-csoportok immunfestődési intenzitásában meglévő különbségek jól korreláltak a verzikán, agrin, szindekán és a MMP-2 mRNS-expressziójában észlelt eltérésekkel. Az immunhisztokémiai analízis során az agrin, a szindekán és a MMP-9 predominánsnak bizonyult a hörgő eredetű adenokarcinómában, míg a MMP-2, a neurokán és a HA a legerősebb immunfestődést a GBM-ben mutatta.

Az MMP-9 a legerősebb immunfestődési intenzitást a tüdő adenokarcinóma metasztázisaiban mutatta, de a legerősebb mRNS expressziót a GBM csoportban mértük. Bár a legmagasabb neurokán mRNS-expressziót normál agyszövetben találtuk, de az immunhisztokémiai reakció a tumorokban mutatott kissé emelkedett festődési intenzitást. Ezek az eltérések valószínűleg poszt-transzkripciós eseményekhez köthetők és pontos tisztázásukhoz további vizsgálatok szükségesek.

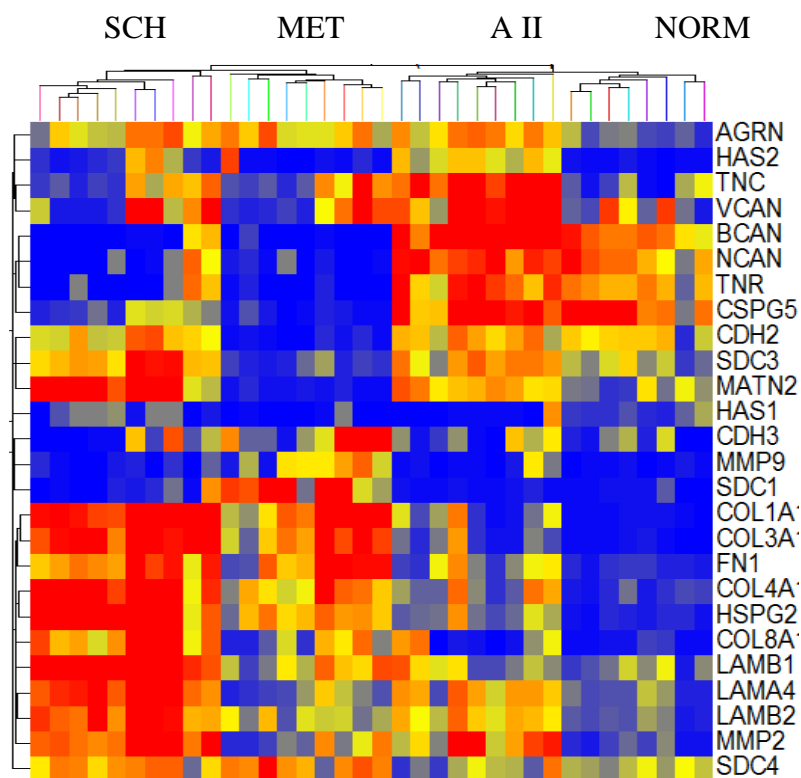
A HA leginkább GBM-ben volt jelen. Mivel receptorának, a CD44-nek ugyancsak magasabb mRNS expresszióját mértük, általános szerepe az invázió folyamatában megerősíthető.

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

2.8.2. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában, alacsony grádusú asztrocitómában és schwannómában

Az inváziós panel génextpresszióját infiltratív „szemibenignus” II-es grádusú asztrocitoma, non-infiltratív és benignus schwannoma és a non-infiltratív, de malignus NSCLC agyi metasztázisából származó szövetmintákon vizsgáltuk. A 26 tagú inváziós panel mRNS expressziójának meghatározásával az egyes csoportokra jellemző expressziós

mintázatot sikerült alkotni. Cluster analízis útján vizsgáltuk ezeknél a molekuláknál az expressziós mintázatban bekövetkezett változások jellemző voltát (8. ábra). E statisztikai teszt által világosan kimutatható, hogy minden egyes szövetsoporthoz megvan a maga jellegzetes inváziós molekula mintázata (*inváziós spektrum*), ami arra utal, hogy az inváziós panel molekuláinak az mRNS expressziós mintázata az illető tumorszövetre erősen jellemző. A brevikan, neurokan, neuroglukan, tenascin, verzikan és a MMP-2 a normál agyszövetre és a II-es grádusú asztrocitómára voltak jellemzőek, míg a schwannoma és az adenokarcinóma ECM-a döntően kollagéneket, fibronektint, szindekánokat, laminineket és kadherineket tartalmazott. Ezek a jellegzetes inváziós spektrumok jelentős mennyiségű kötőszövetes állományra utalnak a schwannomában és a metasztázisban, míg a gliomás szövetekben a saját jellemző GAG-ok és PG-k jelennek meg. A nagyfokú hasonlóság a II-es grádusú asztrocitoma és a normál agy között magyarázatul szolgál a gliomasejtek környező agyszövetbe történő kiterjedt migrációjára. Ugyanakkor a jelentős különbség az adenokarcinóma és a normál agy inváziós spektruma között segít megérteni a csökkent peritumorális infiltrációt a metasztázis esetében.



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

A különböző csoportok között az egyes molekulák expressziójában észlelt szignifikáns eltéréseket elemezve négy molekula (brevikán, neurokán, tenaszcin-C, verzikán) szintje jellemzően magasabbnak bizonyult a II-es grádusú asztrocitómában, mint a többi szövettípusban, ami a gliomák peritumorális inváziójában játszott egyedi szerepüket támasztja alá. Az immunhisztokémiai eredmények ezt a megfigyelést megerősítették.

2.9. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára

A ma már rutinszerűen alkalmazott konkuráló kezelés sikere mellett is jelentkező gyakori terápia-rezisztencia alapján felmerült az igény a glioblastomák minél szélesebb körű génextpressziós és fehérje változásainak feltérképezésére. Többek között a sejtmotilitást, a membránösszetételt, valamint az ECM felépítését, és olyan jellegű változásait vizsgálják, melyek hatással vannak a GBM sejtek infiltrációjára és ezáltal meghatározzák a kezelés

hatékonyságát. Ezen változások mélyebb ismerete megismertetheti a jelenlegi protokoll korlátait és utat nyithat új célpontú terápiák megtervezéséhez. Jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk a konkuráló kezelés okozta részletes molekuláris mechanizmust illetően, a kezelés infiltrációra gyakorolt hatása sem tisztázott, és az eddigi vizsgálatok sejtenyészetekken, nem pedig emberi agyszöveten történtek. Felmerült tehát az igény a glioblasztomák konkuráló kezelése eredményességének molekuláris szintű vizsgálatára, hogy választ kapjunk arra a kérdésre, hogy a jelenlegi onkoterápia gén és fehérje szinten létrehoz-e változásokat a GBM sejtek infiltrációját befolyásoló molekulák expressziójában? Jelen kutatásunk során 19, peritumorális infiltrációban szerepet játszó ECM-komponens mRNS és protein szintű expresszióját határoztuk meg kezelés előtti és konkuráló kemoirradiáció után kiújult humán GBM mintákban.

Méréseink szerint a kombinált sugár- és kemoterápiát követően mindössze a MMP-9 mRNS expressziója és a brevikán fehérje szintje mutatott szignifikáns csökkenést. A többi vizsgált molekula esetében nem volt szignifikáns változás.

Mint mátrix-degradáló enzim, az MMP-9 szintje glioblasztomákban emelkedést mutat a normál agyszövethez képest. Trog D. és mtsai TMZ és besugárzás hatását vizsgálták GBM sejtvonalon és a kezelést túlélő sejtekben szignifikáns metalloproteináz emelkedést tapasztaltak, ami korrelált az agresszív, infiltratív tulajdonsággal. A mi eredményünkben a MMP-9 RNS szinten még csökkenést mutatott, fehérje szinten azonban ennek ellenkezője volt tapasztalható.

A brevikán fehérjeszintű csökkenése összevág Nakada M. és mtsai valamint Held-Feindt J. és mtsai eredményeivel, akik a glioblasztomában szintén összefüggést találtak a brevikán szint csökkenése és a sejtinvázió között.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a konkuráló kemoirradiáció nem hat lényegesen a GBM inváziós képességére. A jelenlegi onkoterápia mindkét fő elemének (irradiáció és TMZ) elsődleges támadáspontja a DNS-replikáció gátlása, és így anti-proliferatív hatással bírnak. Vizsgálataink azt mutatják, hogy emellett, a sejtosztódást gátló hatás mellett az alkalmazott kezelésnek invázió-gátló hatása nem igazolható, így a hatályos konkuráló kemo-irradiációnak a recidív GBM peritumorális infiltrációját jelentősen mérsékelő hatása nem várható. Az invázióban szerepet játszó ECM komponensek közül jelen

tanulmányban kiszűrt és szignifikáns eltérést mutató két molekula a célzott anti-inváziós kezelések kifejlesztéséhez lehetséges targetként szolgálhat.

2.10. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban

Ebben a tanulmányban az invázióval összefüggő ECM komponenseket és transzmembrán receptorokat vizsgáltunk primer (GBM) és szekunder (adenokarcinóma metasztázis) agydaganatok peritumorális területében és nem tumoros agyszövetben. Mindegyik elemzésre kerülő molekulát a releváns irodalom áttekintése és a hasonló területen végzett korábbi kutatásaink eredménye alapján választottunk ki.

Vizsgálataink során az mRNS expressziós mintázat létrehozása és a fehérje szintek kvantifikálásának eredményeképpen több ECM alkotóelem és receptor is összefüggésbe 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. Eredményeinket a korábbi irodalmi adatokkal összevetve a jelentős különbséget mutató molekulákkal kapcsolatban az alábbi megfigyelések tehetők.

A tenaszcinok ötféle tagból (tenaszcin-C, -R, -X, -Y, -W) álló nagyméretű ECM glikoprotein családot alkotnak. Közülük a különböző ún. alternative *splicing* során létrejött többféle izoformával rendelkező tenaszcin-C kulcsszereppel rendelkezik az embriógenézisben, sebgyógyulásban, valamint a tumorprogresszióban. Malignus gliomákban a tenaszcin-C autokrin módon növeli a glioma sejtek invazivitását, létrehozva egy reaktív változást a tumor körüli agyszövetben. Hirata és munkatársai azt találták, hogy a tenaszcin-C expresszió arányos az MRI képeken lévő peritumorális reaktív elváltozások nagyságával és a GBM betegek prognózisával. Herold-Mende és munkatársai egyenes arányosságot találtak a tenaszcin-C szint emelkedése és a daganat malignitása között. A tenaszcin család egy másik tagjáról, a tenaszcin-R-ről bizonyosodott be, hogy fontos szereppel bír a KIR kialakulásában, regeneráció során, valamint többféle sejt-mátrix interakcióban pl. a tumorsejtek adhéziójában és migrációjában. Mind mRNS mind fehérje szinten a tenaszcin-R szint növekedése figyelhető meg pilocitás (WHO Gr. I.) asztrocitómákban glioblasztomákkal szemben. Ezzel megegyezően a tenaszcin-R expresszió csökkenését írták le az asztrociter tumorok grádusának emelkedésekor. Eredményeink az irodalmi adatokkal összhangban vannak: szignifikáns mRNS szint-emelkedést találtunk tenaszcin-C és csökkenést tenaszcin-R esetében a peri-

GBM mátrixban. Ezek alapján feltételezhető, hogy a tenascin-R akadályozza a peritumorális inváziót, míg a tenascin-C segítheti azt.

A fibronectin 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 embriogenezisben, sebgyógyulásban, daganatnövekedésben és áttétek kialakulásában. A gliomákban a fibronectin expressziója emelkedik, elősegítve ezzel a sejt migrációt és az inváziót egyenes arányban a tumor grádussal. Másfelől Sabari és munkatársai vizsgálatai alapján a fibronectinben gazdag mátrix jelentősen gátolhatja a GBM sejtek szétszóródását. Mi szignifikánsan alacsonyabb fibronectin fehérje szintet detektáltunk peri-GBM-ben, mint peri-Met-ben, mely alapján valószínűsíthető, hogy a fibronectin gátolja a tumorsejtek szomszédos agyszövetbe történő migrálását.

Bizonyos enzimek szintén nagy hatással bírnak a peritumorális invázióra. A MMP család úgy járul hozzá a daganat progresszióhoz, hogy különböző ECM komponenseket és sejt felszíni 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 MMP-9-nek nagy hatása van a glioma sejtek migrációjára és inváziójára. Kísérletünkben az MMP-9 nagymértékű emelkedését tapasztaltuk peri-GBM-ben mind RNS, mind fehérje szinten, ami feltehetően a peritumorális szövetbe történő tumor inváziót segíti.

A CD168 (úgy is ismert mint HMMR vagy RHAMM) egy HA 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. Mi szignifikánsan magasabb CD168 mRNS és fehérje szintet találtunk a peri-GBM mintákban mind a Peri-Met-hez, mind a Norm szövethez viszonyítva, ami erősen alátámasztja ezen molekula GBM peritumorális infiltrációjában betöltött szerepét.

Az intracerebrális daganatokat övező agyállomány vizsgálata alapján összefoglalásként elmondható, hogy az invázióval összefüggő ECM molekulák (inváziós panel) mRNS és fehérje szintű vizsgálata mindkét esetben definitív különbségeket talált a peritumorális szövetekben, azokat akár egymáshoz, akár tumormentes agyszövethez hasonlítottuk. Ami a peri-GBM mintákat illeti, a vizsgált molekulák nagy része nem mutatott szignifikáns eltérést, kivéve a tenascin-C és a CD168 emelkedését. Ez alapján feltételezhető, hogy a glioblastomát 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 emellett kiemelik e két molekula glioma sejt invázióban betöltött szerepét. Másfelől azok a kiterjedt molekuláris változások, amelyek az áttéti daganattal szomszédos agyállományban jönnek létre, valószínűleg csökkentik a tumorinfiltrációt azáltal, hogy kialakul egy olyan peritumorális „háló” a metasztázis körül, ami gátolja a tumorsejtek terjedését.

2.11. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában

Mivel a gyógyuláshoz szükséges teljes műtéti eltávolítást a peritumorális invázió teszi kivitelezhetetlenné, és így a mindig bekövetkező lokális recidiváért is ez tehető felelőssé, ezért az inváziós molekulák kutatása az elmúlt időszakban egyre nagyobb hangsúlyt kapott. Jelen tanulmány azt vizsgálta, hogy az invázióban szerepet játszó ECM alkotók expressziója milyen összefüggést mutat a glioblasztomás betegek túlélésével? Az expresszió meghatározásához 20 ECM alkotóból állítottuk össze az inváziós spektrumot, és erre vonatkozóan végeztünk mRNS és protein szintű meghatározást.

A vizsgálatba azonos kezelési protokoll szerint kezelt glioblasztomás betegeket válogattunk be, és a mintákat a tapasztalt túlélés alapján két csoportra bontva vizsgáltuk az invázióban szerepet játszó ECM komponensek expresszióját.

A statisztikai elemzések során önmagában egyetlen molekula esetében sem találtunk szignifikáns különbséget. Azonban az inváziós molekulák csoportjának expressziós értékei együtt a csoportra jellemző inváziós spektrumot képeznek, melynek statisztikai elemzésével nagy pontosságú találati eséllyel meghatározható, hogy az adott minta az alacsony vagy magas túlélésű csoportba tartozik-e? Az inváziós spektrum elemzése továbbá olyan ECM alkotókra hívta fel a figyelmet, amelyek szerepe kiemelkedően fontosnak tűnik a betegek túlélése alakulásának szempontjából, így ezek potenciális terápiás célpontok lehetnek. A statisztikai osztályozóprogramok (LWL és J48 *pruned tree*) alapján a brevikán, kadherin-12, integrin β 1, integrin α 3, laminin α 4, illetve β 1 kulcsmolekulaként azonosítható.

Mind az RNS, mind a protein expressziós eredmények együttes elemzése alkalmas volt arra, hogy a minták inváziós spektrumának vizsgálata alapján a betegség kimenetelére, a beteg túlélésére magas találati valószínűséggel következtethessünk. Nagy jelentőségű klinikai szempontból, hogy a módszer pozitív prediktív értéke magas, különösen a rosszabb túlélésű

csoportha vonatkoztatva. A klinikai vizsgálómódszerek megbízhatóságát jellemző ROC analízis is a módszer használhatóságát támasztja alá. Az inváziós spektrum RNS expressziós vizsgálati eredményeiben 0,775; a protein expresszió esetében pedig 0,875 volt a görbe alatti terület, mely értékek – különösen a proteomikai mérések esetén – megbízható módszerről tesznek tanúbizonyságot és az inváziós spektrum prognosztikai faktorként való szerepeltetése mellett szólnak.

3. AZ ALACSONYABB GRÁDUSÚ GLIOMÁK MOLEKULÁRIS ONKOLÓGIAI MEGKÖZELÍTÉSE ÉS KEZELÉSI IRÁNYVONALAI

Az alacsony grádusú gliomák (*low grade gliomas*, LGG) pontos besorolása, valamint kezelési stratégiájának meghatározása jelentős kihívásokat jelent a tudomány mai állása szerint. A helyzetet nehezíti, hogy a legújabb eredmények tükrében a jelenleg széles körben alkalmazott, hisztológiai jellemvonásokon, gliasejtípuson és a mitotikus aktivitás értékelésén alapuló szövettani beosztás és grádusmeghatározás is felülbírálásra szorul. Ez tetten érhető az epidemiológiai adatok tekintetében is, hiszen a legtöbb esetben még nem az új klasszifikáció szerint történik az adatok rögzítése. CBTRUS adatok szerint az incidencia 0,46 / 100.000 fő a diffúz asztrocitómák esetében és 0,23 / 100.000 fő diffúz oligodendrogliomák esetében, ugyanezen adatbázis szerint a prevalencia a diffúz asztrocitómák esetében 4,68 / 100.000 fő, míg a diffúz oligodendrogliomák esetében 3,57 / 100.000 fő. A háttérben álló rizikófaktorok közül az ionizáló sugárzás, valamint néhány örökletes szindróma emelhető ki (Li-Fraumeni, Lynch). Az alacsony grádus ellenére a gliomák teljes gyógyulása csak kevés esetben érhető el, mert az infiltratív jelleg miatt teljes eltávolításukra ritkán van lehetőség. Jelentőségüket tovább növeli, hogy malignizálódási hajlamuk miatt előbb-utóbb progresszióra számíthatunk, ami a beteg életkilátásait markánsan redukálja. A WHO jelenlegi megfogalmazását követve jelen összefoglalóban a diffúz, infiltratív tulajdonságokkal bíró alacsony grádusú gliomák (LGG) csoportjával kapcsolatos ismereteket foglaljuk össze (13. táblázat). Ez alapján a diffúz, infiltratív, de malignus jegyeket nem mutató gliomákat egy csoportként, az újabb szakirodalmi terminus szerint alacsonyabb grádusú gliomák (*lower grade glioma*) csoportjaként említik. Ennek alapja, hogy a mitotikus aktivitáson alapuló egzakt elkülönítés nehezen kivitelezhető, valamint bizonyos molekuláris alterációk által kijelölt alcsoportokban a túlélési paraméterek nem annyira a grádussal mutattak összefüggést, hanem sokkal inkább a tumor agresszivitását, kemo- és sugárszenzitivitását egyaránt befolyásoló molekuláris eltérésektől függték. A molekuláris markerek fontosságát hangsúlyozza továbbá, hogy azonos szövettani csoportba sorolható alacsonyabb grádusú gliomák a megegyező terápia ellenére is igen eltérő progressziómentes (PFS) és teljes túlélési adatokat (OS) mutatnak. Ennek megfelelően ma már a korábban homogénnek tekintett alacsonyabb grádusú gliomák csoportján belül a különböző terápia meghatározásának elősegítésére alacsony és magas rizikójú alcsoportokról beszélhetünk.

A kezelési stratégiák felállításával kapcsolatban elmondható, hogy a folyamatosan bővülő ismeretanyagot a klinikai vizsgálatok nem képesek naprakészen követni. A vizsgálatok elvégzését, értékelését nehezíti az altípusok eltérő biológiai viselkedése, terápiás válaszkészsége, valamint az, hogy az általában hosszú követést igénylő tanulmányokban az altípusok reprezentáltsága nem kellő mértékű, így a levonható következtetések is korlátozott értékűek. A bővülő irodalmi adatokban jelentkező molekuláris patológiai markerek jelentősége és megbízhatósága a biológiai szerepüket bizonyító adatok alapján evidenciaszintekkel jellemezhető (14.-15. táblázat). A számos prognosztikai faktor ismeretének köszönhetően a jelenkor onkológiai irányvonalának tekinthető individuális kezelés igénye az LGG esetében is egyre sürgetőbbben jelentkezik. Azonban az elérhető kezelési alternatívák közötti terápiás döntés meghozása rendkívül nehéz, az exponenciálisan bővülő vonatkozó szakirodalom ismerete, megfelelő kritika melletti minél szélesebb körű felhasználása a döntés megkönnyítésére elengedhetetlen. A nehézségekre adott válaszként a LGG rizikócsoportjainak elkülönítésére jelentős erőfeszítések történnek, jelen állás szerint – a WHO által propagált integratív diagnózisalkotásnak köszönhetően –, a rizikócsoportok beosztásában a korábban is alkalmazott klinikai és hisztopatológiai tényezők, valamint az egyre bővülő molekuláris alterációk együttesen segítik a terápiás döntéshozatalt.

A low-risk és high-risk LGG csoportok elkülönítéséhez a hagyományosan bevált klinikopatológiai faktorok mellett hisztopatológiai, radiológiai és molekuláris patológiai markereket különböztetünk meg (16. táblázat). Ezen tényezők több, egymástól néhány paraméter tekintetében különböző vizsgálat eredőjeként kerültek meghatározásra, azonban a rohamosan gyarapodó faktorok klinikai relevanciája még nem tisztult le, és így a low-risk – high-risk LGG csoportok meghatározására sincs még összefoglaló, egyértelmű ajánlás.

Az elkülönítésben szerepet játszó molekuláris alterációk vonatkozásában kiemelhető néhány, közelmúltban végzett nagy volumenű vizsgálat, amelyek a következményes kutatási irányvonalat nagyban befolyásolták: a több mint 1000 diffúz gliomát 3 molekuláris marker (*IDH* mutáció, 1p/19q kodeláció, *TERT* mutáció) alapján csoportokba soroló vizsgálat, valamint a közel 300 alacsonyabb grádusú gliomát *IDH* mutáció, valamint kodelációs státusz alapján csoportokba soroló vizsgálat. Javarészt ezen vizsgálatoknak köszönhetően, ma már a LGG alcsoportok, ezzel rizikócsoportok elkülönítését szolgálja mind az *IDH* mutációs, mind az 1p/19q kodelációs státusz is. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy mind az *IDH* mutáns, mind az *IDH* vad típusú diffúz gliomák csoportján belül a további alcsoportok jelentősége is igazolást nyert, alátámasztva a grádusokba sorolás átértékelésének fontosságát.

Jól látható, hogy jelenleg nincs egyértelmű lehetőség a kívánt bináris jellegű döntés meghozására, hiszen míg a klinikopatológiai faktorok többsége (pl. életkor, tumor méret, MIB-1 LI, stb.) folyamatos spektrummal bír, ahol a meghatározott *cut-off* értékek sok esetben pontatlanok, addig a molekuláris paraméterek meghatározása még nem megfelelően standardizált, sok szempontból szubjektív elemet tartalmaz, így ezek további pontosítása szükséges. Hiszen például eredetileg a 40 éves életkor meghatározása azon alapszik, hogy ebben az életkorban magasabb a malignus transzformáció veszélye, azonban jogosan merült fel a kérdés, hogy az indolensebb lefolyású oligodendrogliomák esetében is fenntartható-e ez a határérték. Következésképpen, a kezelési algoritmusok meghatározásánál gyakorlatilag minden beteg esetében egyedi megközelítés szükséges, minél több paraméter együttes értékelésével, azok vonatkozó evidenciaszintjeinek figyelembevételével közelíthető meg a legpontosabb rizikócsoportha sorolás. Ezt a folyamatot segíti elő a molekuláris markerek meghatározása, de ezek egyre bővülő csoportjának áttekintése és az egyes markerek jelentőségének megítélése alapos irodalmi áttekintést igényel.

3.1. Jelenlegi terápiás ajánlások

A fentiek figyelembevételével elmondható, hogy minden alacsonyabb grádusú glioma esetében a diagnózis megállapítását követően elsősorban a minél kiterjedtebb sebészi eltávolítás ajánlott, amennyiben a beteg funkcionális állapota, valamint a műtét technikai kivitelezhetősége ezt lehetővé teszi. (Level II; UpToDate 2C-szintű evidencia). Mivel a daganat diffúz, infiltratív természetének köszönhetően a sebészi eltávolítás nem jelent definitív megoldást, ezért posztoperatív terápia alkalmazása szükséges, amelyben a kombinált sugár- és kemoterápia alkalmazása tűnik a legjobb választásnak (RTOG 9802, (Level I; UpToDate 1B-szintű evidencia). A posztoperatív terápia időzítése (adjuváns vagy késleltetett időpontban történő alkalmazása) azonban az egyes betegek esetében egyéni mérlegelés kérdése.

A műtét utáni onkoterápia sugár- és kemoterápiát tartalmazhat. Annak eldöntése, hogy az egyes alcsoportok esetében, mely betegeknél elegendő a képalkotó vizsgálatokkal való követés (alacsony rizikójú csoport), és mely esetekben szükséges a műtét után onkoterápia (magas rizikójú csoport), ma is nagy kihívást jelent a neuro-onkológusok számára. Az alább részletezett EANO (European Association of Neuro-Oncology) ajánlason túl az NCCN (National Comprehensive Cancer Network), a NICE, valamint a SEOM (Spanish Society of

Medical Oncology) ajánlások is alkalmazzák low-risk és high-risk csoportokba történő besorolást, elsősorban annak eldöntésére, hogy az obszerváció vagy az azonnali posztoperatív terápia alkalmazása szükséges. A besorolás alapját elsősorban a korábban részletezett klinikopatológiai faktorok alkotják, illetve az *IDH* mutációs státusz, valamint az 1p/19q kodeléciós státusz.

Az EANO ajánlás a molekuláris alcsoportok szerint csoportosítva tünteti fel a kezelési alternatívákat:

Low risk LGG-nek minősül az *IDH* mutáns diffúz asztrocitoma k.m.n. (NOS), az *IDH* mutáns gemisztocitás asztrocitoma, az *IDH* mutáns, 1p/19q kodeletált oligodendroglioma, illetve a diffúz oligodendroglioma k.m.n. (NOS). Ezekben az esetekben műtét vagy biopszia után opció az obszerváció. Az obszerváció alternatívája (1) a sugárterápia adjuváns PCV alkalmazásával, vagy (2) a konkuráló radioterápia és temozolomid alkalmazása, adjuváns temozolomiddal. Low risk LGG-k között a diffúz oligodendroglioma k.m.n. (NOS) tumorokban, valamint diffúz *IDH* mutáns, 1p/19q kodeletált oligodendrogliomákban a radioterápia és adjuváns PCV terápia együtt alkalmazandó.

High risk LGG-nek minősülnek az *IDH* vad típusú diffúz asztrocitomák. Ezekben az esetekben a következő posztoperatív terápiás alternatívák választhatók: (1) radioterápia, (2) a radioterápia adjuváns PCV alkalmazásával, valamint (3) a konkuráló radioterápia és temozolomid alkalmazása, adjuváns temozolomiddal (az MGMT státusz döntéstámogató szerepe ellentmondásos). High risk 1p/19q intakt Gr. II asztrocitomák esetében az esetleges sebészi beavatkozáson túl radioterápia és fenntartó PVC terápia alkalmazása szükséges (evidencia: Level II).

A sebészeti eltávolítást vagy radioterápiát követő progrediáló low vagy high risk LGG esetében temozolomid kemoterápia alkalmazása esetében szükséges (evidencia: Level II).

Az UpToDate szakmai portál szerint megállapított ajánlás az obszerváció vs. posztoperatív terápia alkalmazásának vonatkozásában

Az UpToDate egy 1992-ben létrehozott internetes portál, a bizonyítékon alapuló orvoslás eszméjének minél szélesebb körű terjesztésének támogatására. A világ 191 országában, körülbelül 1,7 millió egészségügyben dolgozó felhasználó alkalmazza napi szinten, klinikai döntéstámogatás szempontjából. Összehasonlítások alapján a legmegbízhatóbb és az egyik leggyorsabb platformnak tekinthető a klinikai kérdések megválaszolásában. Jelentőségét adja, hogy adott téma szakirodalmát a szakterület elismert

képviselői dolgozzák fel naprakészen és fogalmazzák meg a tudomány jelen állása szerinti legmegalapozottabb véleményt.

Low risk LGG-nek minősül az *IDH*-mutáns, 40 évnél fiatalabb, teljes vagy near-total műtéti eltávolításon átesett tumor. Ilyenkor általában betegkövetés (observatio, MRI-követés) a választott kezelési stratégia, különösen, ha 1p/19q kodelécio igazolható (oligodendrogliomák). (AANS Level III; UpToDate 2C-szintű evidencia).

High risk LGG az *IDH*-vad típusú, vagy malignus jellemvonásokkal bíró alacsony grádusú diffúz infiltratív glioma, továbbá az az *IDH*-mutáns eset, ahol jelentős mértékben maradt vissza reziduum a műtétet követően. Ezeknél a betegeknél posztoperatív onkoterápia szükséges (AANS Level III; UpToDate 2C-szintű evidencia).

Jelen ajánlásokban korlátozott mennyiségű információ integrálása szerepel csupán, amely elsősorban a magas minőségű evidenciák hiányának köszönhető, azonban véleményünk szerint elengedhetetlen a jelenleg alacsonyabb minőségű evidenciákon alapuló markerek szerepének, jelentőségének taglalása is.

Kiújuló, progrediáló LGG kezelése

A kiújuló, progrediáló LGG-k esetében a kezelési algoritmusokban jelentős különbség nincs. Recidívák esetében a műtéti eltávolítás akkor javasolt, ha azt a radiológiai kép megengedi, vagy a tumor tünetképző jellege szükségessé teszi. Ezt követően, amennyiben korábban komplett sugárterápia történt, úgy a konvencionális radioterápia helyett a sztereotaktikus frakcionált irradáció szerepét erősítették meg, a radiáció indukálta nekrosis, valamint neurotoxikus hatások csökkentésének érdekében. A kemoterapeutikumok közül a temozolomid, valamint nitrozurea származékok ajánlottak elsősorban, azonban recidívák esetén különösen fontos hangsúlyozni az individuális terápias terv felállításának szükségességét.

Konszenzus-keresési törekvések

A LGG kezelésének meghatározásakor az alacsony és magas rizikójú csoportok elkülönítése alapvető jelentőségű, de erre eddig még teljes körű konszenzus nem született. Jelen közlemény célja áttekintést adni a LGG esetében előforduló molekuláris patológiai faktorok jelentőségéről, azok háttérmechanizmusairól, diagnosztikus – terápias döntéseket befolyásoló hatásaikról, valamint jelenlegi illetve jövőbeli alkalmazhatóságukkal kapcsolatos

szakirodalmi ajánlásokról. Ezek táblázatszerű összefoglalásával az alacsony- és magas rizikójú LGG csoportok meghatározását kívánjuk egyértelműbbé tenni, illetve előmozdítani, hogy a frissen diagnosztizált betegek esetében az onkoterápiás algoritmus kiválasztását megfelelő evidencia szintű adatokra támaszkodva lehessen meghatározni. Ehhez első lépésben a diagnózis meghatározásában kell konszenzusra jutni, ami önmagában sem egyszerű feladat. Ezt a célt szolgálja a cIMPACT-NOW konzorcium is: Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy– Not Official WHO. 2016-ban 3 munkacsoport alakult azzal a céllal, hogy a WHO központi idegrendszeri klasszifikációjának frissítései közötti időintervallumban is fórumot biztosítson a téma legújabb kutatási eredményeinek értékeléséhez, interpretálásához, új ajánlások megfogalmazásához. A 3 munkacsoport ajánlásait a „NEC – not elsewhere classified – és „NOS – not otherwise classified” – jelzők; a *H3K27M* mutáns, diffúz középvonali glioma és *IDH* mutáns diffúz és anaplasztikus asztrocitoma; a glioblasztomaszerű jellemvonásokkal bíró *IDH* vad típusú diffúz asztrocitaer gliomák valamint a „gyermekkorai típusú” diffúz gliomák (*IDH* vad típusú alcsoport) vonatkozásában adta ki.

Összességében megállapítható, hogy a LGG tumorcsoport számos alcsoportra osztható, és hogy a csoportosítás során kikerülhetetlen szerephez jutnak a molekuláris patológiai faktorok. Ezek közül a fontosabbakat részletezzük az alábbiakban.

3.2. Molekuláris patológiai faktorok

3.2.1. IDH1/2 (izocitrát-dehidrogenáz) mutáció

1. Háttérmechanizmus

A mutáció 2008-as azonosítása jelentős mérföldkövet jelentett a glioma kutatásban. Először a szekunder glioblasztomák prognosztikus szempontból is releváns alcsoportját sikerült elkülöníteni. A későbbi vizsgálatokban igazolódott azonban, hogy az elváltozás alacsonyabb grádusú, Gr. II, valamint Gr. III asztrocitomák, oligodendrogliomák 70-80%-ában is azonosítható. Az *IDH1/2* mutációk több más daganat esetében is ismertek, pl. az akut myeloid leukémia, akut limfocitás leukémia, myelofibrosis, vagy a melanoma esetében.

Az *IDH1*, illetve *IDH2* enzimek az izocitrát alfa-ketoglutaráttá történő átalakulását katalizálják. A katalitikus folyamatban mindkét enzim a nikotinamid adenin dinukleotid foszfátot (NADP+) használja kofaktorként, amelynek révén NADPH-t állítanak elő. Az *IDH1*

a citoszolban és peroxiszómákban, míg az *IDH2* a mitokondriumban lokalizálódik. Fiziológias körülmények között mindkét enzim az intrinsic (metabolizmus) és extrinsic (sugárzás) faktoroknak köszönhető oxidatív károsodás mérséklésében játszik szerepet. Heterozigóta missense mutációkról van szó, amelyek közül leggyakrabban az *IDH1* 132. pozíciójában lévő arginin érintett, arginin – hisztidin cserét eredményezővel van dolgunk (R132H; Gr. II – Gr. III gliomák kb. 90%-a). Ritkábban ugyanezen aminosav más módosulásai is előfordulhatnak (pl. R132C, R132S), illetve az *IDH2* 172. pozíciójában lévő arginin is érintett lehet. Az érintett aminosav minden esetben egy szubsztrátkötő helyen található, ezzel összefüggésben a mutáció „neo-enzimatikus” aktivitást eredményez. A korábbi magas izocitrát iránti affinitás lecsökken, következésképpen lecsökken az alfa-ketoglutarát (aKG), valamint NADPH szintje és megnő az onkometabolitnak számító 2-hidroxioglutarát termelése. Ez utóbbi kompetitívan gátolja az aKG-dependens enzimeket, amelyek (1) hiszton, valamint a (2) DNS demetilációban játszanak szerepet.

(1) A hiszton metiláció esetében fontos kiemelni a *H3F3A* gént, valamint az általa kódolt H3.3 fehérjét, amely több, a gliomák onkogenezisében, valamint prognosztikájában is jelentős szerepet játszó pathomechanizmust kapcsol össze. A H3.3 fehérje nyitott, aktív kromatinállomány jelenlétével párosul a telomer régiókban, a hisztonfehérje DNS-hez történő kötődésének megvalósulásához az asztrocitomák esetében fontos diagnosztikus markernek (lsd. ATRX mutáció) tekinthető ATRX fehérjével alkotott komplex szükséges. A komplex kötődésének következményeként a telomer régiók rövidülése válik elégtelenné, az ALT (Alternative Lengthening of Telomers) folyamat részeként. Megemlítendő, hogy a glia sejt eredetű daganatok egy új alcsoportját eredményező H3K27M mutáció is ezt a gént érinti, azonban az említett hipermetilációs mechanizmussal ellentétben, ott éppen a metiláció válik lehetetlenné. (lsd. H3K27M mutáció).

(2) A DNS metiláció nagy jelentőséggel bíró következménye a G-CIMP [a glioma citozin-foszfát-guanin (CpG)-sziget metilátor] fenotípus kialakulása, melynek keretében valósul meg az *MGMT* promoter régiójának hipermetilációja is (lsd. G-CIMP fenotípus; *MGMT* hipermetiláció). A fentiekből látható, hogy az *IDH1/2* gének mutációiból több, a gliomák onkogeneziséhez kapcsolható folyamat eredeztethető, központi szerepet tölt be diagnosztikus és prognosztikus szempontból egyaránt.

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: 2A (NCCN)

Diagnosztikus szempontból a szekunder glioblasztomák, a Gr. II és Gr. III asztrocitomák és oligodendrogliomák azonosításában tesz szolgálatot, míg tumorra bizonytalan eredetű szövetminták esetében a mutáció azonosítása bizonyítékkal szolgálhat diffúz infiltratív glioma komponens jelenlétére. Prognosztikai szempontból a mutáns típus esetében a Gr. II és Gr. III diffúz infiltratív gliomák esetében jobb prognózissal, indolensebb lefolyású tumorról számolhatunk.

Összefüggésben van továbbá az alkiláló kemoterápiára adott kedvező válaszreakcióval is, amelyhez részben hozzájárul a mutációhoz társuló G-CIMP hipermetilátor fenotípus, ezen belül – jelenlegi ismereteink alapján – legfőképp az *MGMT* promoter régió metilációja.

A mutáció klinikai relevanciájából kiindulva az alacsony grádusú tumorok alcsoportjainak elkülönítésében kiemelt szereppel bír. Elmondható, hogy az integratív diagnózisalkotás következtében az *IDH* mutáns diffúz infiltratív gliomák különböző, hasznos információkat szolgáltató alcsoportokkal rendelkeznek, amely azonban hasonló mértékben nem igaz az *IDH* vad típusú társaikra. Ezért a 2016-os WHO KIR klasszifikációban az *IDH* vad típusú daganatok, mint „provisional entities” szerepelnek. Az egyéb molekuláris alterációk integrálása elengedhetetlen, hiszen ezen csoport esetében sokszor nehéz a differenciáldiagnózisok megfelelő értékelése, előfordul az alul- és túldiagnosztizálás lehetősége egyaránt. Az előbbi eshetőség keretében több alacsony grádusúnak minősített daganat esetén merül fel, hogy az valójában primer glioblasztoma lehet, míg túldiagnosztizálás is előfordulhat, hiszen egyes tanulmányok a gliális, glioneurális eredetű, *IDH* vad típusú daganatokkal (pl. ganglioglioma, pilocitás asztrocitoma, gyermekkori low-grade diffúz asztrocitoma) fedeztek fel hasonlóságokat.

Ebből következtethető a cIMPACT-NOW munkacsoport legújabb ajánlása is, miszerint az EGFR amplifikáció azonosítása – a *TERT* mutáció, valamint a kombinált teljes 7-es kromoszómaszerzés és teljes 10-es kromoszómavesztés mellett (+7/-10) – fontos plusz információt szolgáltat az *IDH*-vad típusú Gr. II, valamint Gr. III asztrocitomák esetében. A +7/-10 kromoszómális alteráció esetében a teljes kromoszómákat érintő elváltozások bizonyultak egyelőre prognosztikai tényezőnek a részleges kromoszómavesztéssel/-szerzéssel szemben, azonban ezek azonosítása is többlet információt szolgáltat. A fent említett 3 molekuláris eltérésből 2 egyidejű előfordulása kimondottan az *IDH* vad típusú GBM-re jellemző, a 3 együttes előfordulása azonban gyakran és exkluzív módon fordul elő ebben a csoportban (glioblasztoma-szerű jellemvonások). Ennek következtében a Gr. II -Gr. III diffúz asztrocitomák esetében a prognózis meghatározásában ezen markerek azonosítása nagyobb

hatásfokkal bír, mint a szövettani jellegzetességek alapján történő csoportosítás. A fenti alterációk együttes előfordulása sokkal agresszívebb, prognózis tekintetében a vad típusú GBM-hez hasonló klinikai lefolyást jelez. A kedvezőbb prognózisú daganatokra jellemző alterációk azonosítása is említésre kerül, ezen esetekben *MYB* amplifikáció, valamint *BRAF* mutáció tehet szolgálatot a jelenlegi ismereteink alapján.

Egy másik cIMPACT ajánlás az *IDH* vad típusú és H3K27M mutációval nem rendelkező (H3 vad típusú) diffúz gliomák csoportosításának lehetséges további csoportosítását vizsgálta és több molekuláris alteráció lehetséges szerepét is felvetette, megkülönböztetve a diffúz gliomák csoportján belül egy „gyermekkori típusú” alcsoportot. Meghatározó alterációknak tekintette a *BRAF* V600E mutációt, a *MYB* vagy *MYBL1* strukturális variánsait (az amplifikációt is ideértve), *FGFR1* alterációkat [tirozin kináz domén belső tandem duplikáció; egyedi nukleotid variánsok (SNV)]. A csoportosítás jelentősége lehet, hogy ezen daganatok inkább a Gr. I besorolású tumorok viselkedéséhez hasonlatosak. Ezzel szemben, mivel ezen alterációk gyakorta fordulnak elő pilocitás asztrocitómákban, gangliogliómákban, pleomorfxanthoasztrocitómákban, detektálásuk nehezítheti a differenciál diagnosztikát azokban az esetekben, ha a fent említett entitások klasszikus hisztológiai jellemvonásai nem azonosíthatóak, valamint azon tényből kifolyólag, hogy a „gyermekkori típusú” diffúz gliomák infiltrációs potenciálja különböző intenzitású. Erre szolgálhat megoldásul a cIMPACT munkacsoportok azon elhatározása, hogy a jövőben az említett daganatok esetében is integrált szövettani és genetikai információk figyelembevételével lehessen megállapítani a diagnózist.

Habár az *IDH* mutációval bíró diffúz, infiltratív gliomák esetében különböző alcsoportokkal rendelkezünk, egy közelmúltban végzett vizsgálat rámutatott a grádusok szerinti beosztás felülbírálásának szükségességére ezen csoporton belül is. Az eredmények tükrében a *CDKN2A/B* homozigóta deléciójának, a nekrozisnak, valamint a kópiaszám változások (CNV) szerepe bizonyult jelentősnek az *IDH* mutáns asztrocitómák grádusainak felülbírálásában. A *CDKN2A/B* deléció bizonyult a legerőteljesebb paraméternek a rossz túlélés vonatkozásában, jelenléte, függetlenül a nekrozistól, a legrosszabb túlélési mutatókkal társult. Megállapították, hogy a *CDKN2A/B* delécióval nem bíró, Gr. III szövettani besorolású daganatok túlélési mutatói inkább a Gr. II daganatokéhoz állnak közel, míg a deléció jelenléte, annak ellenére is, hogy ezen daganatok nem mutattak nekrotikus területeket, a GBM túlélési mutatóival voltak átfedésben.

3. Diagnosztika

Az IDH mutáció interpretációjában fontos figyelembe vennünk azt, hogy 2 gén is érintett lehet, ezért a WHO a következő elv követését ajánlja. Amennyiben immunhisztokémiával IDH1 R132H mutáció negativitása együttesen igazolódik a szekvenálás révén kimutatott IDH1 132-es, valamint az IDH2 172-es kodonok mutációjának negativitásával, úgy vad típusról beszélünk. Vad típusról beszélünk továbbá abban az esetben is, amennyiben önmagában végzett szekvenálás eredményeképpen a fent említett kodonok a mutációk vonatkozásában negatív eredményeket mutatnak. Következésképpen, negatív R132H mutációt célzó immunhisztokémiai vizsgálat esetén a szekvenálás elvégzése javasolt, különösen 55 év alatti életkorban, ahol az egyéb mutációk gyakorisága sokkal kifejezettebb. 55 év feletti GBM-es betegek esetében, amennyiben immunhisztokémiával negatív eredményt kapunk, úgy a szekvenálás elvégzésére nem feltétlenül szükséges, az *IDH* vad típusú GBM diagnózisa önmagában ezen eredmény alapján is felállítható.

3.2.2. *G-CIMP fenotípus*

DNS demetiláció gátlás révén az *IDH* mutáns gliomák szoros összefüggést mutatnak a G-CIMP fenotípussal. Ez a hatás egy epigenetikai módosító tényezőnek tekinthető, hiszen a gének promoter régióiban található CpG-szigetek hipermetilálódnak, következményesen gátolva az érintett gének transzkripcióját. *IDH* mutáns, G-CIMP poz., 1p/19q kodeletált tumorok jobb túlélési adatokkal rendelkeztek, mint a szintén *IDH* mutáns és G-CIMP poz., de kodelációval nem rendelkező tumorok.

Klinikai relevancia – Evidencia szintje: III

3.2.3. *MGMT promoter hipermetiláció*

1. Háttérmechanizmus

A hipermetilátor fenotípussal összefüggésben említhető egy fontos, prognosztikai és prediktív markerként is használatos elváltozás, az *MGMT* gén promoter régiójának hipermetilációja. A hipermetiláció, mint epigenetikai mechanizmus gyakorta fordul elő az onkogenezis során, elsősorban DNS-repair gének, valamint tumor szuppresszorok vonatkozásában. Jelen esetben is erről beszélünk, hiszen az *MGMT* funkcióját tekintve egy DNS hibajavító enzim (O⁶-metilguanin-DNS metiltranszferáz), amely az alkiláló ágensek (pl.

temozolomid, procarbazin, nitrozurea származékok) által okozott DNS károsodások kijavításáért is felelős. A kemoterapeutikumok által okozott alkiláció leggyakrabban a guanin O⁶ pozíciójában következik be, amelynek révén a DNS két szála között keresztkötés alakul ki, a sejt apoptotikus folyamatainak elindulását indukálva ezáltal. Az MGMT eredendően DNS hibajavító enzimeként ezen alkilációs folyamatok ellenében hat, csökkentve ezzel a malignus KIR daganatok kezelésben használt alkiláló kemoterapeutikumok hatását. A hipermetiláció következményes transzkripció gátló hatásával azonban potenciózza ezen szerek hatékonyságát.

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: 2A (NCCN)

Előfordul az *MGMT*-t érintő hipermetiláció jelensége az *IDH* mutáns és következményes G-CIMP fenotípusú gliomák döntő többségében, valamint a primer glioblastomák kb. 40%-ában. Prognosztikai szerepe alacsony grádusú gliomák esetében is igazolható, azonban egyes vizsgálatok értelmében ez az *IDH* mutációval való összefüggéssel magyarázható. A glioblastoma miatt intenzívebb fókuszban vannak azonban *IDH* vad típusú esetek, ahol elsősorban prediktív vonatkozása (temozolomid terápia hatásának előrejelzése) dominál. Ezen utóbbi csoporton belül, idős, primer GBM-el rendelkező (>65-70 év) betegek esetében az EANO (European Association for Neuro-oncology) kimondottan ajánlja meghatározását, hiszen a terápiás döntés meghozatalában elengedhetetlen segítséget nyújthat. Jelentőségét fokozza továbbá a TMZ terápia következtében kialakuló rezisztencia, amely során inaktiválódhatnak *mismatch* repair fehérjék, amelyek egy „hipermutatátor” fenotípushoz vezetve, elősegítik az alacsony grádusú gliomák malignus transzformációját. A malignus gliomák vonatkozásában mutatott előnyeinek ellenére egyelőre a mindennapi diagnosztikában nem játszik a jelentőségének megfelelő szerepet. Ennek hátterében elsősorban a detektálási mechanizmusok között lévő ellentmondások, a standardizáció hiánya állnak.

3. Diagnosztika

Azonosításában használt technikák közül a legjelentősebbek metiláció-specifikus PCR, pirosekvánálás, valamint immunhisztokémiai detektálás.

3.2.4. 1p/19q kodeláció

1. Háttérmechanizmus

A háttérben egy kiegyensúlyozatlan, a teljes kromoszóma karokat [1-es kromoszóma rövid karját (1p), valamint a 19-es kromoszóma hosszú karját (19q)] érintő transzlokáció áll [t(1;19)(q10;p10)], amelynek köszönhetően kialakulnak a komplett deléciók és a del(1;19)(p10;q10) részlet elveszik. A pathogenezisben egy korai eseménynek tekinthető, amelynek perzisztálása látható a tumor progressziója során is. Az oligodendrogliális tumorokkal gyakorta társulnak még a CIC és FUBP1 gének mutációi is. A CIC mutáció kb. az oligodendrogliomák 2/3-ában, míg a FUBP1 mutáció az esetek 1/3-ában detektálható. A CIC fehérje a *Drosophila capicua* fehérjéjének homológjának tekinthető és transzkripció represszorként funkcionál, a FUBP1 gén pedig egy DNS kötő fehérje kódolásáért felelős, amely révén a c-myc regulációban játszik szerepet. A hemizigóta CIC mutációknak szerepe fontos, feltehetőleg jelentős mértékben hozzájárulnak az oligodendrogliomák patogeneziséhez.

2. Klinika relevancia — Evidencia: 2A (NCCN)

Az 1p/19q kodeláció több szempontból is fontos molekuláris patológiai elváltoznak tekinthető. A 2016-os WHO KIR klasszifikációban már csak azon gliális daganatok diagnosztizálhatóak oligodendrogliomaként, amelyek *IDH* mutációval, valamint 1p/19q kodelációval egyaránt rendelkeznek. Az 1p/19q kodeláció a legtöbb esetben *IDH* mutációval társul. A kodeláció ugyan a hisztológiai jellemvonásokkal jelentős átfedést mutat (perinukleáris háló, „chicken-wire” vaszkuláris mintázat), azonban nem olyan mértékű, hogy egyértelműen kimondható legyen hisztológiai diagnózisalkotás eredményeképpen. Használata így nagy segítséget nyújt bizonytalan vagy kevert szövettani eredetű daganatok azonosításában.

Azonosításának szükségessége bizonyos ellentmondásokat felvet, hiszen a WHO legújabb KIR ajánlásából az következik, hogy a szövettani képen oligodendrogliomának, valamint asztrocitaer komponenssel is bíró, korábban oligoasztrocitomának diagnosztizált tumorok esetében szükséges az 1p/19q kodeláció státusz analízise. Ezzel szemben, a kérdéskörben végzett további vizsgálatok (cIMPACT-NOW munkacsoport) kiegészítést tesznek szükségessé, hiszen így teljes mértékben kizárásra kerülnek az analízis szükségessége alól a tisztán asztrocitaer minősítést kapott daganatok. A munkacsoport konszenzusa szerint, amennyiben *IDH* mutált diffúz asztrocitoma vonatkozásában az *ATRX* funkcióvesztő

mutációja azonosítható (immunhisztokémiai negativitás) és/vagy erős a p53 immunopozitivitása, akkor az 1p/19q kodeléciós státusz analízise nélkül is indokoltak az *IDH* mutált Gr. II diffúz asztrocitoma és a Gr. III anaplasztikus asztocitoma diagnózisok. Ezen tényezők hiányában azonban indokolt szövettanilag asztrocitaer kép esetében is a kodeléciós vizsgálat.

Az *IDH* vad típusú tumorok esetében nem javasolt a kodeléciós státusz analízisének elvégzése, hiszen az ilyen esetekben azonosított 1p/19q kodeléció esetében gyakran előfordul, hogy csak inkomplett delécióval állunk szemben, amely nem tekinthető diagnosztikusnak oligodendrogliomák vonatkozásában. Ezen alteráció bizonyos esetekben magas grádusú asztrocitomák csoportjában fordulhat elő és agresszív klinikai lefolyással társul.

Jelentősége azonban nem megkérdőjelezhető, független prognosztikai faktornak is tekinthető, a gliális daganatok közül az *IDH* mutált és 1p/19q kodelétált tumorok rendelkeznek a legjobb prognosztikai adatokkal. Hozzájárul ehhez továbbá, hogy az MGMT alterációjával kombinálva, tovább növelhető ezen 3 független prognosztikai faktor egyedi relevanciája. A diagnosztikus és prognosztikus szerepén túl prediktív szerepe is igazolásra került a PCV kemoterapeutikumra adott válaszreakcióban.

3. Diagnosztika

A kodeléció kimutatása leggyakrabban FISH (fluoreszcens in situ hibridizáció) és aCGH (comparative genomic hybridization array), és PCR technikák alkalmazásával történik.

3.2.5. *TERT* mutáció

1. Háttérmechanizmus

A telomer régiók meghosszabbításában az ALT folyamatán túl a telomeráz enzimek töltenek be fontos szerepet. A malignus gliomákban kulcsszerepet játszó *TERT* gén is egy ilyen telomeráz enzim kódolását végzi. A gén promoter régióját érintő mutációnak köszönhetően fokozódik az enzim aktivitása, ezáltal a telomer szekvenciák elongációja következik be. A két legfontosabb és egyben egymást kölcsönösen kizáró mutációs hotspot az 5-ös kromoszóma C228T, valamint C250T mutációi.

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: 2A (NCCN)

A *TERT* mutációk rendkívül gyakran fordulnak elő primer glioblasztoma (80%), valamint *IDH* mutáns, 1p/19q kodelétált oligodendrogliomák esetében (>95%), a gliomagenezis egy

korai lépésének tekinthetőek. A Gr. II, valamint Gr. III asztrocitaer eredetű daganatokban jellemző, ugyancsak a telomer integritás szabályozásában szerepet játszó ATRX funkcióvesztő mutációjával ritka kivételektől eltekintve kölcsönösen kizárják egymást, így ezen *IDH* mutáns asztrocitómákban jellemzően nem fordul elő, diagnosztikus segítséget nyújtva ezáltal.

Prognosztikai szempontból amennyiben a *TERT* mutáció *IDH*-mutációval, 1p/19q kodelációval együttesen fordul elő, úgy kedvező tényezőnek számít, hasonlóan igaz ez azokban a ritka esetekben is, hogyha nem társul az 1p/19q kodeláció. Azon esetekben azonban, amikor *IDH* mutáció, valamint 1p/19q kodeláció nélkül fordul elő, a *TERT* mutáció kedvezőtlen prognózist jelent.

Gyakran fordul elő a kedvezőtlen prognózist eredményező +7/-10 kromoszómális alterációval, valamint *EGFR* amplifikációval (ld. *IDH* mutáció), így az cIMPACT-NOW ajánlás értelmében az *IDH* vad típusú asztrocitómák további felosztásában játszhat kulcsfontosságú szerepet. Az *IDH* vad típusú esetekben a mutáció konzekvenciáinak értékelése kellő körültekintést igényel, mivel a *TERT* mutáció kimutatható más glia eredetű központi idegrendszeri neoplazmák (pleomorf xanthoasztrocitoma, ependimóma, piloid jellemzőkkel bíró anaplasztikus glioma) esetében is. Értékelés előtt a morfológiai képen azonosítani szükséges a diffúz infiltratív természetet, asztrocitaer eredetet, valamint az *IDH* mutációs státusz meghatározása is szükséges.

3. Diagnosztika

Jelenleg nincs rutinszerűen alkalmazott diagnosztikus eljárás, azonosítása elsősorban szekvenálás révén történik.

3.2.6. *ATRX* mutáció

1. Háttérmechanizmus

Funkcióját tekintve az *ATRX* (α -thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked) fehérje a DAXX transzkripciós faktorral komplexet alkotva több sejtszintű folyamatban is részt vesz, melyek közül kiemelendő a telomer régiók kromatin állományának remodellációja. A *H3F3A* mutációk előfordulásával is szorosan korrelál diffúz asztrocitómákban, a kódolt H3.3 hisztonfehérje nukleoszómába történő inkorporációját segíti, az említett kromatin remodellációs komplex révén. Az *ATRX* funkcióvesztő mutációjának következtében az említett hisztonfehérje inkorporációja elégtelen lesz, amely így a telomer szekvenciák

meghosszabbítását eredményezi, az ALT mechanizmus révén. Az ALT, a telomeráz enzimek funkciójához hasonlóan, de attól eltérő mechanizmussal képes a telomer szekvenciák elongációjára, a sejtek immortalizációs képességét növelve ezzel. Ezen felül, a gliomákban szerepet játszhat még az invázió gátlásában, az apoptózis elősegítésében és a glioma sejtek proliferációjának gátlásában.

2. Klinikai relevancia — Evidencia: 2A (NCCN)

A legújabb WHO ajánlás értelmében az *ATRX* funkcióvesztő mutációja az asztrocitaer daganatok azonosítását segítő molekuláris biológiai marker. Szinte kivétel nélkül az *IDH* mutációval együtt fordul elő, valamint gyakorta asszociálódik még a *TP53* mutációval, azonban az esetek többségében nem fordul elő – az oligodendrogliomákra jellemző – *TERT* mutációval együttesen. Ebből következik a cIMPACT ajánlásban is megfogalmazott állítás, miszerint megfelelő alteráció társulások esetén felesleges az 1p/19q kodeléción vizsgálat elvégzése. Prognosztikai markerként történő alkalmazhatósága is vizsgálat tárgyát képezte, a vizsgálatban, melyben *IDH* mutációval, valamint 1p/19q kodeléciónal bíró tumorok csoportját vetették össze *TP53* és *ATRX* mutációval bíró daganatok, valamint ezen csoportokba nem illeszkedő gliomák csoportjaival, ott az *ATRX* és *TP53* mutációval bíró csoport intermedier prognózissal bírt, azonban prognosztikai szerepe nem volt statisztikailag kellő biztonsággal megerősíthető, ezért további vizsgálatok is szükségesek ennek pontos meghatározásához.

3. Diagnosztika

Az *ATRX* funkcióvesztő mutációja immunhisztokémiai módszerrel pontosan azonosítható, hiszen a festődési intenzitás csökkenése (loss of staining) tapasztalható. Az immunhisztokémiai eredmény pozitivitása esetében vad típusról, míg negativitás esetében mutációról beszélhetünk.

3.2.7. *H3K27M* – mutáció

1. Háttérmechanizmus

Az *IDH* mutáció következményes változásainak már említésre kerülő H3.3. hisztonfehérjét kódoló *H3F3A* génben (kisebb mértékben érintett lehetnek a H3.1 fehérjét kódoló *HIST1H3B/C* gének is) bekövetkező funkciónyerő mutációról van szó. A mutáció következtében egy hipometilációs fenotípus alakul ki, lehetlenné válik a metionin

metilálódása a 27-es pozícióban, amely végeredményben a kromatin állomány csendesítését jelenti.

2. Klinikai relevancia — Evidencia: 2A (NCCN)

A WHO 2016-os KIR klasszifikációjában a H3K27M mutációval rendelkező daganatok külön entitásként – diffúz középvonali gliomaként – kerültek feltüntetésre. Ezen mutációval rendelkező daganatok esetében minden esetben középvonali érintettségről (agytörzs [korábban: agytörzsi glioma] híd [korábban: DIPG – diffuse intrinsic pontine glioma], talamusz, kisagy, hipotalamusz, gerincvelő) beszélünk. A középvonali, *IDH* vad típusú gliomák csoportján belül képez egy alsoportot, amelyet ezen felül alacsony *MGMT* promotor metilációs állapot, valamint rossz prognózis jellemez. A WHO klasszifikáció Gr. IV-be sorolja ezeket a daganatokat, amely több hisztopatológiailag alacsony grádusú daganat esetében jelenti azt, hogy a mutáció azonosításával a grádus meghatározása felülbírálandó. Ebben a vonatkozásban tehát azt mondhatjuk, középvonali elhelyezkedésű, hisztológiailag alacsony grádusú gliomának imponáló térfoglalás esetében fel kell, hogy merüljön a mutáció azonosításának kérdése. A WHO ajánlás értelmében fennáll a mutáció azonosításával járó pozitív hozadék abban az esetben is, amikor egy középvonali daganat esetében nem sikerül kellő minőségű biopsziás mintát venni, hogy fénymikroszkóppal az infiltratív glioma diagnózisát felállíthassuk. Tökéletes példaként tekinthető arra vonatkozóan, hogy a korábbi grádusokra alapuló prognosztikai beosztások a jövőben átalakulhatnak, jelentőségük háttérbe szorulhat a molekuláris patológiai tényezők mellett.

Azonban, a klasszifikáció vonatkozó részének szükséges módosítást vetíti előre a cIMPACT-NOW munkacsoport által kidolgozott legfrissebb ajánlás. Ennek értelmében, több, nem diffúz középvonali gliomának tekinthető daganat (pilocitás asztrocitoma, ependimóma, gyermekkori diffúz asztrocitoma, ganglioglioma) esetében azonosításra került a H3K27M mutáció, amely megkérdőjelezi kizárólagos diagnosztikus szerepét, azaz, hogy kimutatása minden esetben diffúz középvonali glioma diagnózisát jelenti.

Az ajánlás szerint, ha mind a középvonali lokalizáció, mind a diffúz, infiltratív természet, mind a mutáció igazolható, abban az esetben diagnosztizálható ez az entitás. A fent említett egyéb daganatok vonatkozásában eddig nem igazolták a H3K27M mutáció prognosztikai jelentőségét, így a diffúz középvonali glioma, H3K27M-mutált változatához hasonló megkülönböztetésük külön entitásként nem indokolt.

Jelenleg kisebb jelentőséggel bír, de szintén a H3.3 hisztonfehérjét érinti a G34R/V mutáció is. A H3K27M, valamint G34R/V mutációk egymást kölcsönösen kizárják. Előfordulásuk és

prognózisuk is más, mert az előbb felsoroltaktól eltérően a G34R/V mutációval bíró daganatok jobb prognózissal jellemezhető, nagyagyféltekei lokalizációval bíró diffúz gliomák, amely elsősorban idősebb gyermekek esetében fordulnak elő. A cIMPACT ajánlás értelmében – habár általuk is kiemelten, ritkán fordul elő ez a mutáció a diffúz gliomák esetében –, érdemes „NEC - not elsewhere classified” jelöléssel ellátni őket, jelezvén, hogy nem képezi a hivatalos klasszifikáció részét, azonban a későbbi kiadások összeállításában információt szolgáltathatnak egy új alcsoport létrehozásához. A NEC diagnózis a patológusok által adott deskriptív diagnózisnak feleltethető meg leginkább, amikor az adott tumor nem illeszkedik a meglévő diagnosztikus kritériumokba, valamint ellentmondás van a hisztológiai, immunohisztokémiai, genetikai alterációk vonatkozásában, így részletesebb leírásuk válik szükségessé.

3. Diagnosztika

Jelenleg nincs rutinszerűen alkalmazott diagnosztikus eljárás, azonosítása elsősorban szekvenálás és immunhisztokémiai azonosítás révén történik. Az ajánlás megjegyzi, hogy az immunhisztokémiai eredmény interpretációjában különös figyelmet érdemes fordítana arra, hogy a neoplasztikus sejtek nukleáris pozitivitását ne tévesszük össze a makrofágok és/vagy mikroglia sejtek citoplazmatikus pozitivitásával.

3.2.8. *BRAF V600E mutáció*

1. Háttérmechanizmus

A *BRAF* egy humán proto-onkogén, amelyről a B-Raf protein transzkripciója történik meg. Funkcióját tekintve egy szerin/treonin kináz, jelentős szerepet tölt be jelátviteli folyamatokban a MAPK/ERK útvonal részeként. A V600E missense pontmutáció esetében az enzim konstitutív aktivációja történik meg. A MAPK útvonal több folyamatban is pl. differenciáció elősegítésében és sejtöregedésben (szeneszcencia) éppúgy szerepet játszik, mint a neoplasztikus átalakulás triggerelésében.

2. Klinikai relevancia — Evidencia: 2A (NCCN)

A mutáció jellemzően inkább a jobb prognózissal társuló Gr. I pilocitás asztrocitomákban (5%), Gr. II-III supratentoriális pleomorf xanthoasztrocitomákban (PXA) (60-80%), Gr. I gangliogliomákban (20%), dysembrioplasztikus neuroepitheliális daganatokban (30%) fordul elő nagyobb gyakoriságban, gyermekkori túlsúllyal, de nem diagnosztikus egyik fent említett

daganat esetében sem. Ezel felül, a 2016-os WHO KIR klasszifikációban a glioblasztoma új provizionális variánsának, az agresszív, rossz prognózissal bíró epitheloid glioblasztomának gyakori mutációjaként említett, amely a PXA malignus változatának is tekinthető.

Ezen felül, az alacsony grádusú diffúz gliomák esetében kb. az *IDH* vad típusú formák 1%-ában azonosítható. A legfrissebb, kb. 1300 gliomás beteget magában foglaló meta-analízis eredményeképpen kimutatták életkorfüggő pozitív prognosztikai szerepét az átlagos teljes túlélés vonatkozásában, hiszen prognosztikus szerepe csak gyermeknél, illetve 35 évnél fiatalabb felnőttek esetében áll. Mivel azonban a mutáció előfordulása a fent említett daganatokhoz képest ilyen kis arányú, valamint, hogy a különböző prognózisú daganatok ilyen széles spektrumában azonosítható, interpretációja csak a megfelelő hisztológiai diagnózissal, más klinikopatológiai tényezők azonosításával történhet. Példaként, az *IDH* vad típusú, pilocitás jellegzetességekkel bíró anaplasztikus asztrocitomákban a V600E mutáció *ATRX* funkcióvesztő mutációval, valamint *CDKN2A/B* delécióval társulva jobb prognózissal bíró alcsoportot jelöl ki a szövettanilag pontosan nem mindig jól elkülöníthető *IDH* vad típusú glioblasztomákhoz képest.

Feltüntetése a G34R/V mutációhoz hasonlóan NEC kategóriaként feltüntethető, hogy a lehetséges implementálásához szükséges információk minél szélesebb körben rendelkezésre álljanak a jövőben.

A mutáció jelentőségét növeli, hogy azonosítása terápiás célpontként is szolgálhat, a későbbiekben prediktív markerként funkcionálva, hiszen – a melanoma malignumhoz hasonlóan – kísérletek igazolják a dabrafenib (b-raf inhibitor) hatékonyságát gliomák esetében is. Korlátozó tényező a kialakuló rezisztencia, amely a MEK-inhibitorokkal (trametinib, cobimetinib) kombinált terápia kifejlesztéséhez vezetett. Közös alkalmazva ígéretes hatásának bizonyulnak a klinika tesztek alapján.

3. Diagnosztika

A mutáció azonosításában jelenleg a legeredményesebb módszernek a mutációra specifikus BRAF – VE1 immunhisztokémiai azonosítás tekinthető.

3.2.9. *BRAF* fúzió

1. Háttérmechanizmus:

A *BRAF* gént érintő további aberráció, a 7q34 lókusztandem duplikációja által előidézett fúzió a *KIAA1549* (ritkábban *FAM131B*) és a *BRAF* gének között. Ezen elváltozás is a MAPK jelátviteli útvonalhoz tartozó B-Raf konstitutív aktiválásával jár.

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: 3

Habár egy jelentős jelátviteli útvonal egyik tagjának állandó aktiváltságáról beszélünk, leggyakrabban ezen alteráció is indolens lefolyású daganatokban, a hátsó székálabá lokalizálódó Gr. I. pilocitás asztrocitomában (85%), valamint pleomorf xanthoasztrocitomában azonosítható. A *BRAF* V600E mutációval összehasonlítva, ezen daganatok esetében a fúzió diagnosztikus segítsége is nagyobb mérvű, meglehetősen megbízható marker főleg a pilocitás asztrocitoma esetében, ezen felül – függetlenül a háttérben álló hisztológiai képtől – pozitív prognosztikai szereppel is bír.

Ritkábban azonosítható alacsony grádusú diffúz gliomák esetében is, egyes vizsgálatok szerint akár *IDH*-mutációval együttesen is előfordulhat. Gyakoriságából kiindulva, detektálás esetén fel kell mérüljön, hogy nem diffúz gliomával, hanem pilocitás asztrocitomával állunk szemben. Ebből a szempontból prognosztikus, diagnosztikus, valamint akár prediktív (MAPK útvonalon ható ágensek) szempontból is jelentős segítséget nyújthat az alacsony grádusú diffúz gliomák esetében.

Differenciál diagnosztikai szempontból kiemelő a szintén *BRAF-KIAA1549* fúzióval jellemezhető diffúz leptomeningeális glioneuronális tumor, amely, mint új entitás került bele a 2016 WHO KIR klasszifikációba. Gyakran hordoz az oligodendrogliomákra jellegzetes hisztológiai jellemvonásokat is, valamint gyakran 1p delécióval, 1p/19q kodelécióval társul, habár *IDH* vad típusú daganatnak számít.

3. Diagnosztika

RNS szekvenálással, a töréspontok (16-9; 15-9; 16-11) azonosítását célzó PCR módszerrel valamint FISH technikával azonosítható.

3.2.10. EGFR overexpresszió, amplifikáció, kópiaszám változások

1. Háttérmechanizmus:

Az EGFR (HER1/ERBB1) egy ErbB családba tartozó transzmembrán receptor tirozin kináz, aktivációja a PI3K, AKT, RAS, RAF, és MAPK foszforilációjával jár (*EGFR* lókuszt: 7p12). Egyike az első GBM-specifikus onkogéneknek, a GBM betegek többségében azonosítható bizonyos *EGFR* aberráció, mely lehet amplifikáció (40%), overexpresszió (60%) pontmutáció, deléción (24-67%) egyaránt. A GBM mellett alacsonyabb grádusú gliomákban is előfordul, általában azok *IDH* vad típusával társul, a korábban említetteknek megfelelően az alcsoportok elkülönítésében játszhat szerepet (lsd. *IDH* mutáció).

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: 3

Az egyik fontos aberráció az amplifikáció, melynek háttérében a szomatikus gén kópiaszám eltérések (somatic copy number alterations - SCNA) állnak. Fontos különbséget tenni azonban a csak néhány kópiaszám változást (3-5 gén kópia) eredményező aberrációk és a valódi amplifikáció között. Az előbbi eset általában az egész 7-es kromoszóma poliszómiájával magyarázható, de előfordulnak csak a 7q kromoszóma régiót érintő kópiaszám változások is. A GBM-re kimondottan specifikus amplifikációval ellentétben, ezek a gliomák jelentős részében azonosíthatóak. A kutatások értelmében az említett alterációk nem is minden esetben jelentik a receptor megváltozott tulajdonságát, fokozott működését is egyben. A GBM esetek több, mint 40%-ban az amplikonok száma fokálisan akár 50-100 is lehet, azonban prognosztikai szerepe ezen elváltozásnak sem egyértelmű, használatuk ezért inkább a diagnosztikában fontos, ahol a GBM elkülönítését segíthetik glioblasztomaszerű jellemvonásokkal bíró alacsonyabb grádusú tumoroktól. Ilyen mérvű amplifikáció azonosítása biopsziában (ellentétben azzal, ahol csupán 1-2 kópiaszám változást jelentő amplifikációk vannak), alacsony grádusú hisztológiai kép mellett fel kell, hogy vesse a mintavételezés elégtelenségének lehetőségét is, amelyet elsősorban a GBM magas fokú intratumorális heterogenitása okozhat. Hasznát, mint prediktív marker, egyelőre nem sikerült igazolni a tirozin kináz inhibitor terápiaiban sem.

A másik aberráció, vad típusú receptor génjének overexpressziója, a legtöbb GBM, valamint alacsonyabb grádusú gliomában is kimutatható. A gén overexpressziójával gyakorlatilag minden esetben társul a transzkriptálódott fehérje overexpressziója is. Habár szoros korreláció tapasztalható az EGFR amplifikációval mind gén, mind protein overexpresszió szintjén, nem mondható kellően specifikusnak ahhoz, hogy immunhisztokémiai eredmény alapján

kimondható legyen az amplifikáció. A protein overexpresszió ezen felül a széles körű vizsgálatok tárgyát képező tirozin-kináz inhibitor készítmények klinikai vizsgálataiban került azonosításra, azonban az eredmények tükrében nem sikerült konkrét indikációs kört meghatározni azonosítására. Egyelőre a vad típusú receptor overexpresszióját nem sikerült sem diagnosztikus, sem prognosztikai szempontból a klinikai gyakorlatba építeni.

EGFR gént érintő leggyakoribb kromoszómális átrendeződést az **EGFRvIII** elnevezéssel illetik. A GBM vonatkozásában is viszonylag gyakorinak tekinthető, hiszek az esetek ötödében előfordul, legtöbbször az *EGFR* amplifikációval együttesen fordul elő. Az *EGFR* gén 2-7 exonjainak deléciója áll a háttérben, amelynek köszönhetően 267 aminosav deletálódik a génből, annak az EGFR extracelluláris doménját kódoló részéből. Habár a ligand kötődése így lehetetlenné válik, a receptor mégis konstitutív módon aktiválódik, rendkívüli onkogén potenciállal bírva. Összeségében azonosítása releváns információt szolgáltat, azonban ennek inkább diagnosztikus jelentősége van, prognosztikai szerepéről ellentmondásos eredmények születtek eddig.

3. Diagnosztika

Az overexpresszió, valamint az EGFRvIII elváltozás esetében reverz transzkriptáz PCR reakció, valamint immunhisztokémiai azonosítás szerepel elsősorban a technikák között. Az amplifikáció azonosítása a pontos kvalitatív meghatározást lehető tevő FISH, valamint kolometriás in situ hibridizációs technikákkal történnek, valamint egyre inkább előretérbe kerülnek a multiplex DNS hibridizációs array-k.

3.2.11. TP53 mutáció

1. Háttérmechanizmus:

Az egyik legrészletesebben tanulmányozott fehérje a p53, közel a humán daganatos megbetegedések felében kimutatható mutációja, a gliomákban is gyakran előforduló aberrációnak tekinthető. Tumor szuppresszor génnek tekinthető, funkcióját tekintve transzkripciós faktor. Szerepet játszik a sejtciklus, DNS replikáció, apoptózis, valamint motilitás szabályozásában is. A sejtet ért stressz stimulus válaszreakciójáért felelős (pl. DNS károsodás érzékelésével az apoptózis folyamatát indítja el). A *TP53* mutáció, amely a gliomagenezisben egy korai alterációnak tekinthető, leggyakrabban a mutációs hotspotnak számító exon 4-8 régióban következik be, missense mutáció formájában.

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: 3

Az alacsony grádusú gliomák esetében elmondható, hogy azok, amelyek *IDH* mutáció gyakran társul, az *ATRX* funkcióvesztő mutációjával, valamint *TP53* missense mutációjával, de a *TP53* mutáció, valamint az 1p/19q kodelécio kölcsönösen kizárja egymást. A *TP53* erős nukleáris immunhisztokémiai pozitivitása (tumorsejt magok >10%-ának pozitivitása) ezért önmagában, vagy az *ATRX* funkcióvesztő mutációjával és *IDH* mutációval társulva lehetővé teszi az 1p/19q kodelécio vizsgálatának mellőzését és az asztocitaer eredet igazolását.

Prognosztikai szempontból, a vad típusú *IDH*-, valamint *TP53*-státusz együttes előfordulásához viszonyítva jobb prognózissal bírnak a *TP53* mutációval bíró tumorer, azonban nem biztosít olyan mértékű prognosztikus előnyt, mint az 1p/19q kodelécio az oligodendrogliomák esetében, összességében inkább negatív prognosztikai faktornak tekinthető. A mechanizmus hátterében állhat, hogy mutált esetben a DNS hibajavító mechanizmus elégtelensége miatt a hibás DNS javítása nem történik meg, ezért elindul az apoptózis folyamata. Ezzel szemben, vad típus esetében a már eredendően nagyfokú genetikai instabilitásokkal jellemezhető DNS javítása további genetikai instabilitásokhoz vezet. Más tanulmányok továbbá megjegyzik, hogy a *TP53* mutáció akár együtt járhat az alacsony grádusú gliomák fokozott malignus transzformációjával is. Ez utóbbi tény alátámaszthatja, hogy a szekunder glioblasztomák esetében bizonyítottan gyakoribb előfordulású az alacsony grádusú gliomákra is jellemző missense mutáció. Összességében azonban elmondható, hogy prognosztikai szerepe – az intenzív kutatások ellenére is – egyelőre meglehetősen ellentmondásos, inkább az asztocitómák diagnosztikáját segítő markerként érdemes tekintenünk rá.

3. Diagnosztika

A legtöbb, a hotspotokat érintő, missense mutáció következtében a p53 fokozott expressziója detektálható immunhisztokémiai azonosítás mellett. Azonban, azon mutációk, amelyek nem missense formában valósulnak meg, gyakran nem járnak a protein expresszió fokozódásával, így detektálásuk is nehéz. A vonatkozó ajánlás alapján a protein overexpresszió interpretálásában a tumorsejtek >10%-nak nukleáris festődése szükséges a mutáció immunhisztokémiai azonosításához.

3.2.12. CD68

1. Háttérmechanizmus:

A CD68 receptor a lizoszóma/endoszóma-asszociált membrán glikoproteinek családjába tartozik, azonosításával monociták és szöveti makrofágok detektálása válik lehetővé, amely a központi idegrendszerben elsősorban a mikroglia sejteket, valamint tumor-asszociált makrofágokat jelenti. A mikroglia sejtek tekintetében megkülönböztetjük a perivaszkuláris és a klasszikus, állandóan jelenlévő mikroglia csoportokat. Az idegszövet károsodása triggereli a makrofágok válaszreakcióját, amelyek az élettelen szövettörmelék eltávolításában és – lévén antigénprezentáló sejtek – a szerzett immunválasz indukciójában játszanak szerepet.

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: 3

A tumor-asszociált makrofágok a keringő makrofágokból és/vagy mikroglia sejtekből eredeztethetőek. Vizsgálatok tárgyát képezi azonban az is, hogy létezhet-e a mikroglioma mint önálló entitás, hiszen glioma sejtek esetében olyan területeken is sikerült CD68 pozitivitást detektálni, ahol nem voltak habos sejtek, valamint nekrotikus állomány sem. Ennél is érdekesebb módon, az asztrocita sejtek is mutattak CD68 pozitivitást, melynek háttérében több tényező oki szerepe is felmerült: a transzformált asztrociták genetikai alterációja; a makrofág-asztrocita fúzió, valamint az esetleges géntranszfer lehetősége a gliomák progressziója során. Habár önálló entitásként eddig nem sikerült azonosítani, valószínű, hogy a gliomák esetében a makrofágok a tumorsejtekkel fuzionálva invazív és tumornövekedés promotáló sejteket eredményeznek.

Prognosztikai szerepének pontos tisztázása további vizsgálatok elvégzését teszi szükségessé, de az eddigi eredmények negatív prognosztikai szerepét vetítik előre, mivel a CD68 expressziója a grádussal összefüggésben nő, ezen felül korrelációt mutat az *IDH* vad típusú formákkal, valamint GBM esetében a legrosszabb prognosztikus adatokkal jellemezhető mesenchymális alcsoporttal.

3. Diagnosztika

Azonosítása elsősorban immunhisztokémiával, valamint szekvenálással történik.

3.2.13. *PTEN*

1. Háttérmechanizmus:

A *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) tekinthető a malignitások vonatkozásában a leggyakrabban aberrált génnek. Tumor szuppresszor, amely foszfatázként funkcionál, a PI3K-Akt útvonal kinázainak defoszforilálásával vesz részt elsősorban a sejtciklus, proliferáció, valamint az invázió szabályozásában.

2. Klinikai relevancia — Evidencia szintje: nem meghatározott

A *PTEN* elvesztésével a gliomák között leggyakrabban a glioblasztoma esetében találkozunk. A glioblasztomák 60-85%-ában kimutatható a 10 kromoszóma részleges (10q LOH), vagy akár az egész 10-es kromoszóma elvesztése, amely a *PTEN* (lókus: 10q23.3) érintettségét is jelenti. Ezen felül, a *PTEN* mutációja is azonosítható a GBM-s esetek kb. negyedében.

A *PTEN* elvesztése/mutációja a magas grádusú gliomákban negatív prognosztikai faktornak tekinthető több tanulmány szerint is, anaplasztikus daganatok esetében ritkán fordul elő, de annak malignus transzformációt jelezheti. Több tanulmány által igazolt, hogy nem fordul elő a *PTEN* érintettsége alacsony grádusú gliomák esetében, ezért jelenleg nincsen kimutatható prognosztikai szerepe ezen csoportban.

3.2.14. *Kisebb jelentőséggel bíró markerek*

Olig-2

Az Olig-2 egy transzkripciós faktor, amely a neuronális progenitor sejtekben expresszálódik és az oligodendrociták differenciációjában játszik fontos szerepet. Expressziója az alacsony grádusú oligodendrogliomákban a legnagyobb, mígependimómákban, valamint nem glia sejt eredetű daganatokban kis mértékben, vagy egyáltalán nem expresszálódik. Gyakorlati szempontból fontosabb azonban, hogy a diffúz gliomák mindegyikében azonosítható, így a korábbi elképzeléseknek megfelelően önmagában nem alkalmas az oligodendrocita eredetű daganatok egyértelmű differenciálására. Immunhisztokémiai módszerrel festődési intenzitásának meghatározása (Olig2 LI) azonban korrelációt mutat az oligodendrogliomákra, valamint asztrocitomákra diagnosztikusnak tartott markerekkel (*IDH1/2*-mutáció + 1p/19q kodelécio; *IDH1/2*-mutáció + *TP53*-mutáció). A

vizsgálat értelmében 60% feletti Olig2 LI *IDH1/2*-mutált, 1p/19q kodeletált tumorokra jellemző. A vizsgálat megfelelő értékeléséhez a tumor közepének megfestésére való törekvés fontos kitételnek bizonyult. Az utóbbiak következményeként sem állítható azonban, hogy az Olig2 önmagában helyettesíteni tudná a WHO klasszifikációban szereplő markereket, azonban kiegészítő információt nyújthat.

CD34

A CD34 egy transzmembrán foszfolipoprotein, amelyet először a haemopoetikus őssejteken, haemopoetikus progenitor sejteken, majd a későbbiekben a vaszkuláris endothel progenitorokban, embrionális fibroblastokban azonosítottak. Mind a fiziológiás, mind a patológiás erek esetében festődést mutat, optimális marker a mikrovaszkuláris denzitás (MVD) kimutatásában. Szerepét a neoplazmák esetében is széleskörben vizsgálták, a gliomák vonatkozásában, mint az angiogenezist reguláló molekula vesz részt, hozzájárulva új erek kialakulásához, végérvényben a daganat növekedéséhez. Egy vonatkozó meta-analízis alapján a magasabb grádusú gliomákkal mutat szoros korrelációt a CD34 fokozott expressziója, azonban prognosztikai szerepe egyelőre ellentmondásos az elvégzett tanulmányokban.

Nestin

A nestin egy VI. típusú intermedier filamentum fehérje, a primitív neuroepitheliális sejtek, valamint a neuron prekursor sejtek, neuronális őssejtek (NSC) fejezik ki a fejlődés során. Az asztrocita sejtekre jellemző GFAP, valamint a neuronokra jellemző neurofilament triplet fehérjék (NF) is az intermedier filamentumok közé tartoznak. Szerepüket tekintve, egyrészt a sejtek mechanikai ellenállóképességét növelik, másrészt pedig részt vesznek az apoptózis folyamatában, valamint a metabolikus stresszre adott válaszreakció kialakításában. Az agydaganatok vonatkozásában elmondható, hogy az intermedier filamentumokra jellemző azok koexpressziója (glioblasztoma esetében a GFAP, vimentin, synemin különböző koexpressziós mintázata korrelál a különböző GBM altípusokkal), valamint azon tulajdonság, hogy más sejtvonalból származó IF-ot is kifejeznek. Prognosztikai szerepük egyelőre korlátozott, további vizsgálatok elvégzése indokolt.

A nestin szintje az érett központi idegrendszerben csökkent, de az őssejtek kimutatására használható a subependymális régióban, azaz a kamrák falában, valamint a *canalis centralis*-

ban. Elmondható továbbá, hogy felnőtt korban patológiás agysérülés, gyulladás, iszkémia, valamint neoplasztikus transzformáció következtében is re-expresszálódik. Ez utóbbiból következően a gliomák esetében is fokozott expresszióval bír, amely a grádus növekedésével emelkedő tendenciájú, legmagasabb expressziót a glioblasztoma esetében mutat. Segítségével a gliomák őssejtjeinek (GSC) azonosítása történhet meg, amely óriási lökést adott az onkogenezist az őssejt-elmélet szempontjából vizsgáló kutatók számára. Ezen fokozott expresszió pedig bizonyítottan összefüggést mutat a betegek túlélési idejével, így negatív prognosztikai faktornak tekinthető mind a gliomákban, mind más központi idegrendszeri daganat esetében.

Ezen felül, kimutatása a kevésbé differenciált glia sejtek azonosításában is nagy szolgálatot tesz. A szintén őssejt markerként használt CD133-hoz képest több éretlen sejt megjelölésére volt képes, amely előrevetíti, hogy más markerekkel használva további, dedifferenciált sejtpopulációk azonosítása válhat lehetővé. Kimutatása különösen hasznos lehet az infiltrációs zóna fokozott invazivitású sejtjeinek azonosításában, valamint az újonnan formálódó kapillárisokban, ahol a fokozott mértékű angiogenezist valószínűsíti.

Vimentin – Neu-N – α -internexin

Az IF-ok közül kiemelendő még a neuron specifikus, azonban az oligodendrogliomákban is nagymértékben expresszálódó α -internexin (INA). Expressziója szorosan korrelál az oligodendrogliomákra jellemző hisztológiai képpel, és ami még fontosabb, az 1p/19q kodelíciós státusszal. Ennél fogva, egy hasznos, a diagnózis alkotását segítő markernek bizonyul oligodendrogliomák esetében.

Az asztrocita sejtek motilitásának fokozásában kiemelt szerepe igazolódott a vimentin vonatkozásában. Mind a gén-, mind a fehérje expresszió tekintetében elmondható, hogy értékeikben a grádus emelkedésével növekedő tendencia azonosítható. Oligodendrogliomák esetében kisebb esetszám esetében igazolták, hogy alacsonyabb expressziója jobb prognózissal jár. Hasonló megállapítás tehető a GBM esetében is, ahol alacsonyabb expressziója jobb prognózissal, valamint a temozolomidra adott jobb válaszreakcióval társult. A NEU-N az emlősök idegrendszerében, az érett, terminális neuronok sejtmagjaiban expresszálódó fehérje. Kimutatása korábban a neuronális differenciáció vizsgálatában biztosított óriási előnyt, manapság azonban a neoplasztikus elváltozások morfológiai differenciál diagnosztikájában is szerepet kap. Több központi idegrendszeri daganat esetében is expresszálódik, a gliasejt eredetű daganatok mindegyikében kimutatható, a pilocitás

asztrocitoma kivételével. Szerepe korlátozott, használata egyedül oligodendrogliomák esetében vetődött fel, ahol expressziójának hiánya nagy arányban korrelált az oligodendroglioma diagnózisával.

Releváns szövettani jellegzetességek:

Az uniform, kerek sejtmagokat általában oligodendroglioma jellemzőként tartjuk számon, míg az irreguláris, elongált sejtmag, hiperkromázia, valamint az eozinofil, fibrilláris citoplazma elsősorban asztrocitomákra jellemző. Az oligodendrogliomák körében több olyan hisztológiai jellemvonás is megkülönböztethető, amelyeknek a szenzitivitása nem kimagasló, azonban a diagnosztikus munkát segíthetik. Ilyen jellemző a perinukleáris háló mintázat, amely valójában a formalin fixáció egy artefaktumának tekintendő, de a kerek sejtmagokkal együtt az egyedi sejtek tipikus „fried-egg” tükörtojás mintázatát, míg a sejtcsoportok lépesméz mintázatát kölcsönzi. Ilyen mintázat továbbá az elágazódó kapillárisok hálózata („chicken-wire” drótkerítés-mintázat), a kalcifikáció, a nukleáris membrán éles határa, finom kromatinállomány és a kis méretű nukleóluszok. A jelenlegi grádus beosztásban kifejezett szereppel bír a szövettan, ahol az anaplázia jellemzőiként számon tartott a megnövekedett sejtméret epitheloid jellemvonásokkal, kifejezetett pleomorfizmussal, vezikuláris kromatin mintázattal és prominens nukleóluszokkal. A diffúz gliomák jellemző sajátossága még a Scherer-féle szekunder jelek kialakulása, amelyek neuronok körül (szatellózis), subpiálisan (subpiális aggregáció) és a kis kortikális véredények (perivaszkuláris aggregátumok) körül kialakuló tumorsejt csoportok következményei.

A diffúz asztrocitomák egyetlen WHO által is megkülönböztetett variánsa a gemisztocitás asztrocitoma, amelynek jellemzője, hogy több, mint 20%-ban tartalmaz gemisztocitás komponenst (excentrikus, abundáns citoplazmával bíró sejtek), valamint perivaszkuláris limfocitás infiltrációval jellemezhető. A variáns jelentősége, hogy gyorsabb lefolyású malignus progresszióval jellemezhető.

Releváns radiológiai jellemzők:

Az oligodendroglioma jellegzetességei közé tartozik a kalcifikáció jelenléte (70-90%), valamint a szubkortikális-kortikális lokalizáció. A kalcifikáció CT felvételeken azonosítható biztonsággal, MRI felvételek esetében kevésbé kifejezett vagy egyáltalán nem látható. Jellemző továbbá a genetikailag meghatározott, IDH mutáns, 1p19q kodelációval rendelkező daganatok esetében, hogy kevésbé körülírt tumorhatárral, valamint heterogén

szignálintenzitás eloszlással bírnak T1 és/vagy T2 MRI felvételeken, szemben a kodelációval nem bíró esetekkel, ahol az MRI felvételeken körülírtabb határokkal és homogén szignálintenzitás eloszlással rendelkeznek a daganatok.

Inváziós spektrum:

A kutatók jelentős érdeklődésére tartott számot az elmúlt időszakban az alacsony grádusú gliomák környező agyállományt diffúzan infiltráló jellegzetessége is. Igazolásra került, hogy az extracelluláris mátrix (ECM) összetétele nem független a daganatok invazív fenotípusától. Az invázió minden lépésében, a tumorsejtek dezorganizálódásától, a migrációs útvonalak kialakításán át, sejt-sejt, sejt-ECM kapcsolatok kialakításáig jelentős szerepet játszanak az ECM molekulák. A fiziológias körülmények között igazolható szerepük is alátámasztani látszik a malignus daganatokban közreműködésük révén kialakuló fokozott inváziós potenciált, hiszen normál esetben az idegrendszer fejlődése során, valamint traumás sérülések által indukált reparatív folyamatokban játszanak szerepet. Kiemelendő többek között az idegszövetre specifikus brevikan, neurokan, az endopeptidáz funkciót betöltő mátrix metalloproteinázok, a sejt – sejt, sejt – ECM kapcsolatok kialakításában szerepet játszó integrin – laminin összeköttetések, valamint CD44 – hialuronsav kapcsolat egyaránt. Egyedi expressziós eltéréseiken túl inváziós spektrum formájában történő együttes vizsgálatuk is jelentős eredményekkel szolgált. Az inváziós spektrum olyan ECM molekulákból épül fel, amelyek önmagukban is számottevő jelentőségűek az invázió szempontjából, azonban egyedi relevanciájuk együttes alkalmazásukkal felülmúlható. Az inváziós spektrum révén akár a diffúz gliomák különböző grádusainak, különböző hisztológiai eredetű primer agydaganatoknak, primer és szekunder agydaganatoknak, valamint az eltérő prognózisú gliomáknak az elkülönítése valósulhat meg az előzetes eredmények alapján. Ebből kifolyólag szerepe az alacsony, valamint magas rizikójú LGG csoportban is nagy jelentőségű lehet a jövőben.

3.3. Konklúziók

Az alacsony grádusú gliomák kezelése az igen széles szórást mutató túlélési paraméterek miatt a mai napig komoly kihívás a neuro-onkológiával foglalkozók számára. A tumorprogresszió időben várható megjelenésének és rapiditásának megítélése és az onkoterápiára adott tumorválasz felbecsülése képezik az alapját a frissen diagnosztizált esetek

kezelési tervét megalapozó stratégiának. Ehhez ma már a molekuláris patológiai markerek jelentős többletinformációt nyújtanak, de a szinte hónapról hónapra bővülő vizsgálati eszköztárban nem könnyű tájékozódni. Ehhez nyújt segítséget jelen összefoglaló tanulmány, melynek során az evidenciaszintekkel jellemzett különböző prognosztikai és prediktív markerek áttekintése kézzelfogható segítséget jelenthet az alacsony grádusú gliomás betegek esetében az alacsony és magas rizikójú betegcsoport szétválasztásához, és ezáltal az onkoterápia indikációjának és időzítésének meghatározásához. A 14. táblázat evidenciaszintekkel alátámasztva tartalmazza azokat a markereket, melyek befolyással vannak a betegek prognosztikai csoportosítására.

A különböző nemzetközi társaságok, valamint szakmai fórumok (EANO, NICE, SEOM, UpToDate) által megfogalmazott kezelési ajánlások a számos, jelen tanulmányban tárgyalt faktorok ismeretében az alábbiakban összegezhető:

1. LGG esetében az alacsony rizikójú csoport kritériumai: IDH-mutáció, 40 évnél fiatalabb életkor és teljes vagy near-total műtéti eltávolítás. Az alacsony rizikójú csoportba soroláshoz a felsorolt kritériumok mindegyikének együtt kell teljesülnie.
2. LGG esetében a magas rizikójú csoport jellemzői: IDH-vad típus, egyértelmű reziduum a műtét után 48 órán belül készült MRI-n, glioblasztoma szerű jellemvonások, 40 évnél magasabb életkor. Ezek közül a kritériumok közül bármelyik is teljesül, a beteg a magas rizikójú csoportba sorolandó.
3. Az egyes betegek megítélésénél akkor lehet egyedi elbírálás alapján a rizikó-csoport beosztáson módosítani, ha a 16. táblázatban szereplő prognosztikai faktorok releváns eltérései ezt egyértelműen alátámasztják. Ennek elsősorban akkor van jelentősége, ha a műtét utáni reziduum mértéke nehezen megítélhető, vagy az életkor közel 40 év. Ilyen esetekben a molekuláris patológiai faktorok szerepe határozottan felértékelődik.
4. Az alacsony rizikójú csoportban megengedett a posztoperatív obszerváció és MRI követés, míg a magas rizikójú csoportban mindenképpen adjuváns onkoterápia javasolt. Ez esetben az alkalmazható kezelési megközelítések: (1) radioterápia önmagában, (2) radioterápia adjuváns PCV alkalmazásával, vagy (3) a konkuráló radioterápia temozolomiddal, majd adjuváns temozolomid monoterápia (4) radioterápia adjuváns temozolomiddal.
5. A különböző terápiás modalitások közötti választáshoz az eddig feldolgozott tanulmányok alapján asztrocitómák esetében elsősorban a radioterápia és temozolomide, míg oligodendrogliómák esetében a radioterápia és PCV kezelés javasolható.

6. A sugárkezelés adjuváns monoterápiaként csak egyedi elbírálás alapján javasolható akkor, ha a beteg – 16. táblázatban felsorolt – prognosztikai faktorai az alacsony-rizikójú csoportra jellemzőek.

Fontos megjegyezni, hogy az említett vizsgálatok alapján a kemoterápia önmagában történő alkalmazása, mint első vonalbeli kezelés, a diffúz gliomák esetében nem kellően alátámasztott terápiás modalitás.

Az alacsony grádusú gliomák különböző kezelésének objektív megítélését célzó tanulmányok különböző célkitűzései és a meghatározott indikátorokban való eltérés nem könnyíti meg a neuro-onkológiával foglalkozó klinikusok helyzetét. Ez az elemzés és összefoglalás a gyakorló terapeuták számára készült, hogy a kezelési algoritmus meghatározásához támpontot szolgáltasson, azonban ahhoz, hogy gliomák kezelésében történő előrelépéseket és változtatási javaslatokat követni lehessen, rendszeres frissítés és aktualizálás szükséges.

Táblázatok

Kritériumok

1. Nukleáris atípiá
2. Mitózis
3. Endothel proliferáció („piled up” endothel sejtek, nem hipervaszcularitás)
4. Nekrózis

Tulajdonságok		Korábbi elv	WHO 2016	Jövőbeli csoportosítási elv
Gr. I	Egyik fent említett kritérium sem	Alacsony grádusú glioma	Nem diffúz, infiltráló daganatok	
Gr. II	1 fent említett kritérium (általában nukleáris atípiá)		Alacsony grádusú glioma	Alacsonyabb grádusú glioma*
Gr. III	2 fent említett kritérium (általában nukleáris atípiá és endothel proliferáció)	Magas grádusú glioma	Magas grádusú glioma	
Gr. IV	3 v. 4 fent említett kritérium			Magasabb gr.gl.

13. táblázat. A gliális daganatok grádusba sorolására a WHO által alkalmazott módszer (St. Anne Mayo rendszer), valamint az alacsony grádusú glioma definíciójának változása

*Bizonyos molekuláris alterációkkal jellemzett, korábban Gr. III-ba sorolt daganatok is tekinthetőek Gr. II ekvivalens entitásoknak biológiai viselkedésük alapján ebben a táblázatban a jövőbeli elv esetében az alacsonyabb grádusú glioma és a magasabb gr. gl. sorok közötti elválasztó vonalat a Gr III sor közepe tájára tenném.

Evidencia szintek

AANS	UpToDate	NCCN evidencia szintek
I Egy vagy több randomizált, kontrollált klinikai vizsgálat vagy ezen vizsgálatok meta-analíziséből származó bizonyítékon alapul	1A Erős ajánlás, magas minőségű evidencia	1.Kategória Magas fokú evidencián alapul, széleskörű NCCN konszenzus van a hatásosságára vonatkozóan.
	1B Erős ajánlás, közepes minőségű evidencia	2A. Kategória Alacsonyabb fokú evidencián alapul, széleskörű NCCN konszenzus van a hatásosságára vonatkozóan.
II Parallel kontrollok bevonásával zajló megfigyeléses vizsgálatokból származó bizonyítékon alapul (pl. eset-kontroll tanulmányok, kohorsz vizsgálatok) Szakmai állásfoglalásból, esetsorozat vizsgálatból, eset ismertetésből, valamint történelmi	1C Erős ajánlás, alacsony minőségű evidencia	
	2A Gyenge ajánlás, magas minőségű evidencia	2B. Kategória Alacsonyabb fokú evidencián alapul, NCCN konszenzus van a hatásosságára vonatkozóan.
III Szakmai állásfoglalásból, esetsorozat vizsgálatból, eset ismertetésből, valamint történelmi kontrollok alkalmazásával készült esettanulmányokból származó bizonyítékon alapul	2B Gyenge ajánlás, közepes minőségű evidencia	
	2C Gyenge ajánlás, alacsony minőségű evidencia	3.Kategória Bármilyen fokú evidencián alapulhat, jelentős NCCN aggály van a hatásosságára vonatkozóan.

14. táblázat. Evidencia szintek az AANS (American Association of Neurological Surgeons) (hivatkozás: Robinson PD, Kalkanis SN, Linskey ME, Santaguida PL: Methodology used to develop the AANS/CNS management of brain metastases evidence-based clinical practice parameter guidelines. J Neurooncol 96:11–16, 2010), UpToDate (hivatkozás: Grading guide: UpToDate Inc. <https://www.uptodate.com> Accessed on: July 28 2019) és az NCCN (National Comprehensive Cancer Network) alapján.

	Onkogéneket érintő tényezők	Tumorszuppresszor géneket érintő tényezők
A, Genetikai alteráció	TERTp mutáció H3K27M mutáció G34R/V mutáció	1p/19q kodeléción ATRX mutáció TP53 mutáció PTEN mutáció/ LOH
B, Epigenetikai alteráció	G-CIMP fenotípus MGMT promóter hipermetiláció EGFR eltérések	-
C, Szignáltranszdukciós alteráció	BRAF V600E mutáció BRAF fúzió	-
D, Metabolizmust érintő alteráció	IDH mutáció	-

15. táblázat. Genetikai alterációk csoportosítása

Alacsony grádusú gliómák (LGG)

Paraméter	Low-risk alcsoport	High-risk alcsoport	Evidencia-szint
Klinikopatológiai faktork			
Életkor	<40 év	≥ 40 év	II
KPS	KPS > 70	KPS ≤ 70	II
Első tünet	Epilepsziás roham	Fokális neurológiai deficittel, intrakraniális nyomásemelkedés tüneteivel stb. kezdődő folyamat	II
Sebészi eltávolítás	Radikális	Inkomplett / parciális	II
Radiológiai faktork			
Lokalizáció	Frontális / parietális lokalizáció	Temporális, Occipitalis, Törzsdúci, Agytörzsi ill. egyéb lokalizációk	II
Méret	< 5 cm preoperatív tumorméret	≥ 5 cm preoperatív tumorméret	II
Kontraszthalmozás	Nincs	Szignifikáns halmozás a tumorállományban	II
Kalcifikáció	+	nem jellemző	III
Bilaterális /multifokális érintettség	-	+	II
FDG - PET	metabolikusan inaktív	metabolikusan aktív	III
Hisztopatológiai faktork			
MIB-1 LI	MIB-1 < 3%	MIB-1 ≥ 3%	II
Variánsok	diffúz, infiltráló, NOS oligodendroglialis komponens	gemisztocitás asztrocitoma	II
Hisztológiai jellemzők	Kerek, uniform sejtmagok Kis méretű nukleóluszok	Irreguláris, pleomorf sejtmag, hiperkromázia Nagyobb sejtméret, epitheloid jellemzők Prominens nukleóluszok	III
Molekuláris patológiai faktork			
IDH mutáció	Mutáns (+)	Vad típus (-)	II
G-CIMP fenotípus	+	-	III
(de, vannak alacsony-magas metiláltságú alcsoportok)			
MGMT promoter hipermetiláció	+	-	III
1p/19q kodeléción	+	-	II
TERT mutáció	1p/19q kodeléción + IDH mutációval társulva előnyös	IDH vad típus + TERT mutáció és/vagy EGFR amplifikáció és/vagy teljes 7 kromoszómaszerzés és 10-es kromoszómavesztés (+7/-10): GBM szerű viselkedés	III
ATRX mutáció	IDH mutáció + TP53 mutáció + ATRX mutáció	<u>asztrocitomák között</u> jobb prognózis	III
TP53 mutáció	-	TP53 mutáció összességében negatív prognosztikai faktor Ad.1: IDH vad típus + TP53 vad típus társulás rosszabb prognózisú, mint TP53 mutált esetek	III
	Ad. 2: IDH mutáció + TP53 mutáció + ATRX mutáció	<u>asztrocitomák között</u> jobb prognózis	III

H3K27M mutáció	-	+	(középvonali lokalizáció esetén releváns; Gr. IV-nek tekintendő)	III
BRAF V600E mutáció	+	-	(35 évnél fiatalabb életkor esetén releváns)	III
BRAF fúzió	+	-	(más, jobb prognózisú szövettani altípust jelölhet)	III
CIC; FUBP1 mutációk		-	Oligodendrogliomák esetében detektálhatóak	III
EGFR amplifikáció	-		IDH vad típus + TERT mutáció és/vagy EGFR amplifikáció és/vagy teljes 7 kromoszómaszerzés és 10-es kromoszómavesztés (+7/-10): GBM szerű viselkedés	III
EGFR vIII	-		GBM jellemvonás (diagnosztikus segítség)	III
PTEN mutáció/LOH	-		GBM jellemvonás (diagnosztikus segítség)	n.m.
CD68 expresszió	-		Expressziója a magasabb grádussal korrelál	III
CD34 expresszió	-		Expressziója a magasabb grádussal korrelál	III
Vimentin expresszió	-		Expressziója a magasabb grádussal korrelál	III
NEU – N expresszió			Expressziójának hiánya az oligodendrogliomával korrelál	III
Olig – 2 expresszió		-	Expressziója az oligodendroglioma markerekkel korrelál	III
α-internexin expresszió		-	Expressziója az oligodendroglioma markerekkel korrelál	III
Nestin expresszió	-		Expressziója a magasabb grádussal, dedifferenciáció szintjével korrelál	III
Inváziós spektrum			low-risk csoportra jellemző spektrum vs. high-risk csoportra jellemző spektrum	III

16. táblázat. A terápiás megközelítések meghatározásában alapul szolgáló prospektív, randomizált klinikai vizsgálatok

(Magyarázat: LGG: alacsony grádusú glioma (low-grade glioma); AO: anaplasztikus oligodendroglioma; AG: anaplasztikus glioma; AA: anaplasztikus asztrocitoma RT: radioterápia; RT/PCV: radioterápia adjuváns PCV-vel; konk.: konkuráló; adj.: adjuváns; TMZ: temozolomid; RT/TMZ: radioterápia adjuváns TMZ-vel; NR: nem sikerült elérni (not reached); HR: relatív kockázat (hazard ratio); KI: 95%-os konfidencia intervallum; OS: teljes túlélés (overall survival)

4. A TEMOZOLOMID SZEREPE A GLIOBLASZTOMA KEZELÉSÉBEN

4.1. A glioblasztoma általános neuro-onkológiai megközelítése

A primer agydaganatok az összes felnőttkori malignus daganatos megbetegedésnek ugyan csak 2 %-át adják, de mortalitásuk szempontjából jelentőségük kiemelkedő. Legnagyobb csoportjuk, a gliomák az összes intrakraniális tumor 30-40%-át teszi ki. Leggyakoribb típusa az asztrocitoma, melynek a WHO szerinti legmagasabb, IV-es grádusú és egyben leggyakoribb képviselője a *glioblastoma* (GBM). A GBM incidenciája az Egyesült Államokban 3/100.000/év, férfiakban mintegy másfélszer gyakoribb, mint nőkben. Tipikusan az aktív keresőképes középkorúak betegsége, 40 és 65 év között fordul elő a leggyakrabban, a betegek átlagéletkora 54 év. Felnőttekben a gliomák nagyjából fele (46%) GBM. A hosszútávú túlélés nagyon ritka, és a legújabb terápiás eszközök bevezetésével is csak 9.8%-os 5 éves túlélés érhető el, míg onkoterápia nélkül a várható átlagos túlélés nem több mint 3-6 hónap.

A GBM kezelésének első lépése az esetek többségében a műtéti reszekció. A tumor egy része elhelyezkedésétől függő mértékben sebészileg eltávolítható, de az igen kiterjedt peritumorális infiltráció miatt a radikális reszekció szinte soha nem valósítható meg. Az idegsebész lehetőségeit a daganat elhelyezkedése, kiterjedtsége jelentősen befolyásolja, és a többlebenyi, valamint kétoldali érintettség a megfigyelések szerint igen rossz prognózissal jár. A jelenlegi irodalmi adatok szerint a rossz preoperatív *Karnofsky Performance Score* (KPS), a domináns féltekei érintettség és a nagy tumorméret is csökkenti a túlélési esélyeket.

Korábban a glioblasztomás betegek kezelésére általánosan elfogadott és alkalmazott posztoperatív terápiaként évtizedeken keresztül egyedül az egész agy besugárzás (*whole brain radiotherapy*, *WBRT*) szolgált, ami az átlagos túlélést a kezelés nélkül várható 3-6 hónapról 9-12 hónapra emelte. A WBRT-t a későbbiekben felváltotta a *focal brain radiotherapy* (*FBRT*) amit kemoterápiával (KT) – temozolomid (TMZ) – egészítették ki, ami a túlélési paraméterek jelentős javulását hozta. A 2005-ben készült Stupp-tanulmányt követően a 70 év alatti, jó KPS ponttal rendelkező betegek számára a standard terápia részévé vált a sugárterápiával (RT) egy időben adott adjuváns kemoterápia (75 mg/m²/nap), amelyet további kemoterápiás kezelés

követ (havi ciklusban 150-200 mg/m²/nap dózisban általában 6-12 hónapon át, havonta 5 napig). A jelenleg is standard protokollnak számító konkuráló kemo-irradiációs kezelés növelte mind a progressziómentes túlélést (PFS) (4,5 hónapról 6,9 hónapra), mind a teljes túlélést (OS) (8,6 hónapról 14,6 hónapra).

A konkuráló kemo-irradiáció ellenére kialakuló tumorprogresszió esetén a kezelés folytatható bevacizumab monoterápiával, mely a biológiai válaszmódosító kezelés eszköze. A bevacizumab monoklonális humanizált antitest, amelyet a *vascular endothel growth factor-A* (VEGF-A) ellen termeltek. A GBM jelentősen vaszkularizált tumortípus, és fokozottan igényel VEGF-et és egyéb proangiogenetikus faktorokat az érújdonképződéshez. Világszerte számos tanulmány vizsgálta a bevacizumab antitumor hatását, melyekből az a következtetés vonható le, hogy bár a bevacizumab nem befolyásolja szignifikánsan az OS-t, ugyanakkor a PFS időtartamát meghosszabbítja. A gyakorlatilag mindig bekövetkező tumorprogresszió után a másodvonalbeli terápia indikációjának klinikai állapothoz kötött feltételei azonban az esetek nagy részében nem engednek meg további kemoterápiát. Továbbá, a bevacizumab monoterápia alatt bekövetkező progresszió esetén a további kezelések megválasztása általánosan elfogadott protokoll híján erősen intézetfüggőnek és experimentális jellegűnek mondható. Nem véletlen, hogy napjainkban egyre több kutatás irányul mind a jelenlegi onkoterápia ineffektivitása okának felderítésére, mind pedig további kemoterapeutikumok bevezetésére. A hazai betegállomány terápiafüggő túlélési paramétereiről kevés adat áll rendelkezésre, ezért ahhoz, hogy klinikai konzekvenciákat eredményező kutatást végezhessünk, a saját betegadataink feldolgozása adja meg a kiindulási és viszonyítási alapot.

4.2. A temozolomid klinikai jelentősége

A glioblasztomás betegek jelenlegi standard terápiájának gerincét képező kemoterapeutikum, a TMZ alkalmazása mellett előbb-utóbb mindig bekövetkező tumorprogresszió okainak megértése fontos lépés a kezelés hatékonyságának javítására irányuló törekvésekhez.

A TMZ egy olyan orális alkiláló ágens, melyet a vér-agy gáton történő permeabilitási tulajdonságai alkalmassá tesznek a *high grade* gliomák kezelésére. A TMZ fiziológiás pH értéken spontán hidrolizál (3-metil-triazén-imidazole-4-carboxamiddá, MTIC). A MTIC tovább hidrolizál 5-amino-imidazol-4-carboxamiddá (AIC), amely a tulajdonképpeni aktív alkiláló ágenssé, metilhidrazinná alakul. Ez az erősen reaktív kation a DNS-ben az O6

pozícióban lévő guaninokat metilálja és így bázispár *mismatch*-et okoz. A sikertelen *mismatch* javítások vezetnek a DNS leány szálának töréséhez, ami a sejt apoptózisát okozza.

A TMZ dozírozásánál a szövődmények előfordulási valószínűsége (mieloszupresszív hatás) az elsődleges korlátozó szempont. Az intratumorális lokális koncentráció emelése anélkül fokozná az antiproliferatív hatást, hogy a mellékhatások előfordulási gyakorisága növekedne. A glioblasztomás betegek kezelése során alkalmazott Stupp-protokollban az irradiáció fizikai hatásának tulajdonított átmeneti vér-agy-gát permeabilitás fokozódástól a magasabb intratumorális gyógyszerkoncentráció elérése várható. A kérdés az, hogy a TMZ orális bevitele és az irradiáció kivitelezése időben hogyan viszonyuljon egymáshoz a maximális hatékonyság elérése érdekében? Ehhez első lépésben egy megbízható gyógyszeranalitikai módszer kidolgozására van szükség, mely az igen alacsony koncentrációjú TMZ-t olyan, erősen komplex biológiai mintából, mint a humán szérum nagy biztonsággal detektálni képes.

A TMZ koncentráció meghatározása több nehézségbe ütközik, szérumbeli koncentrációja igen gyorsan változik, melynek időbeni lefolyását több paraméter is erősen befolyásolja. A TMZ lebontása elsősorban a pH-függő MTIC-é történő hidrolízisen keresztül megy végbe és a hepaticus metabolizmus csak kisebb szerepet tölt be. A TMZ savas pH-n stabil, viszont gyorsan lebomlik neutrális vagy bázikus környezetben. Mivel a TMZ az antitumorális hatását a MTIC, mint degradációs termékén keresztül fejt ki, a MTIC plazma koncentrációjának monitorozása a TMZ adagolása során fontos lenne, annak érdekében, hogy hatékonyságát és farmakokinetikáját kiértékeljük.

Állandóan felmerülő kérdés a szakirodalomban, hogy a különböző gyógyszerek milyen lokális koncentrációt érhetnek el az agyállományban, ill. az agydaganatban, jelen esetben a glioblasztómában? Mivel a kezelés hatékonysága leginkább a tumorban megjelenő gyógyszerkoncentrációtól, a mellékhatások mértéke pedig a szisztémásan keringő hatóanyagkoncentrációtól, és végső soron e kettő érték egymáshoz viszonyított arányától függ, ezekre az adatokra égető szükség lenne. A kemoterápiás készítmények összehasonlításához, a legmegfelelőbb kiválasztásához az elérhető maximális intratumorális gyógyszerkoncentráció ismerete jelentős segítséget nyújtana, de erre vonatkozó irodalmi adatok eddig még nem születtek.

A klinikumban egyre nagyobb jelentőségre szert tevő kapilláris elektroforézis (CE) potenciálisan mindkét célra megfelel, így tanulmányainkat ezirányban is kiterjesztettük.

4.3. A temozolomid vizsgálata glioblasztomában

4.3.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztomás betegekben - mintavétel és mérési módszerek

A CE méréseinkhez két glioblasztomás beteg szérum mintáját (a vérmintákat az egyszeri 400 mg dózisú TMZ orális alkalmazása után 60 perccel vettük le) és nem tumoros betegek szérum mintáját alkalmaztuk (a minták a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbankból származtak, a mintagyűjtés a betegek beleegyezésével, aláírásával és etikai engedély alapján történt). Mindkét beteg részleges tumoreltávolítás, konkuráló kemoirradiáció után állt és a TMZ monoterápiás fázisban napi 1x400mg *per os* gyógyszerbevitelben részesült, mely után 60 perccel történt a mintavétel perifériás vénából. A szérum mintákat centrifugálással nyertük (3000 rpm). Minden minta oldatot -80 °C-on tároltunk az analízisig, majd 0,45 µm-es fecskendőszűrőn szűrtük, és további mintaelőkészítés nélkül injektáltuk a kapillárisba.

Méréseinkhez választott CE készülék egy HP3D CE modell volt (Agilent, Waldbronn, Germany). A minták injektálására minden mérés esetében hidrodinamikus mintabevitelt (50 mbar, 2 s) alkalmaztunk. A mintaoldatokat a kapillaris anódos végénél juttatuk be. A szeparációt 68 cm x 50 µm belső átmérőjű polyimidréteggel ellátott kvarckapillárisban végeztük (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA). A kapillaris effektív hosszúsága a szokásos módszerű injektálásnál 60 cm, az ún. "short end" injektálásnál pedig 8 cm volt). Az alkalmazott feszültség 25 kV volt. A vizsgálatot diódasoros fotometriás detektálással végeztük 200 nm, 214 nm, 260 nm és 325 nm hullámhosszakon. Az elektroferogramokat a ChemStation számítógépes program 7.01-es verziójával (Agilent) rögzítettük és dolgoztuk fel. A stabilitási vizsgálatok elvégzésére a CE készülék automatikus mintainjektáló/elemző rendszere volt segítségünkre.

Az analitikai elválasztáshoz használt pufferelektrolitok összetevői közül a nátrium-dihidrogén-foszfát, a dinátrium-hidrogén-foszfát, a HCl, a NaOH és a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) a Reanalból (Magyarország) származtak. A 180 µg/mL törzsoldatot TMZ (Temodal 20 mg, Schering-Plough, Magyarország) vízben történő feloldásával készítettük.

A kapillárisokat puffer elektrolittal 5 percen keresztül előkondicionáltuk: 1 M NaOH-al (10 perc), 0,1 M NaOH-al (10 perc), vízzel (5 perc) és pufferrel (20 perc) mostuk. A szérum minták analízise esetén utókondicionálásként 0,5 M NaOH-ot (3 perc), 0,3 M SDS-t (3 perc) és puffert (3 perc) alkalmaztunk, hogy eltávolítsuk az összes lehetséges adszorbeált

anyagot a kapillárisról. A CE analízis előtt az összes puffert 0,45 µm-es szűrőn filtráltuk és hűtőben + 4 °C-on tároltuk.

Mivel a TMZ és bomlástermékei minimális töltéssel rendelkeznek, a micelláris elektrokinetikus kromatográfiát (MEKC) használtuk arra, hogy elválasszuk őket egymástól és a neutrális komponensektől. 20 mM alatti SDS tartalmú elektrolit esetében a neutrális komponensek közötti elválasztás nem volt elérhető, viszont 100 mM SDS tartalmú puffer elektrolit alkalmazásával nagyon jelentős hőtermelődést tapasztaltunk. Az optimális SDS tartalom a puffer elektrolit számára 40 mM-nak bizonyult. Az elektrolitok pH-ja, illetve ionerőssége szinte egyáltalán nincs hatással a vizsgált komponensek effektív mobilitására, csak az elektroosmotikus áramlást (EOF) befolyásolta. Az analízis ideje pH 9-es értéken volt a legrövidebb, viszont a felbontás rosszabb volt, mint az alacsonyabb pH értékeken. Savas puffert alkalmazva az elektroforetikus futtatás során a TMZ degradációja nagyobb fokú volt. Az optimális pH érték a szeparáció számára 7-nek bizonyult, és ezen a pH-n elfogadható felbontást lehetett elérni és az analízis ideje is rövid maradt. A felbontás és a puffer ionerősségének összefüggését (5-100 mM foszfát) is vizsgáltuk, de utóbbinak számottevő hatása a szeparációra nem igazolódott.

A puffer koncentrációjának növelésekor a migrációs idő enyhén megemelkedett. 75 mM fölötti foszfát puffert használva (40 mM SDS a pufferben), az áramerősség 75 µA lett, ami a csúcsok kiszélesedését okozta. A MEKC technika optimalizálása után a puffer elektrolit 25 mM foszfátot, 40 mM SDS-t tartalmazott pH 6,8-as értéken. Minden egyes komponenst a migrációs idejük és jellegzetes UV spektrumuk alapján azonosítottunk.

4.3.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztómában

Az agydaganatmintákat jobb frontális rekurrens glioblasztómás beteg idegsebészeti műtete során szereztük be. A hullámzó panaszok miatt hospitalizált beteg TMZ monoterápiás kezelés alatt állt, de rapid állapotrosszabbodás követően sürgős műtetre került sor. Az utolsó TMZ adagját (400 mg) a műtét előtt 1 órával vette be. A műtét során 3 daganatmintát (0,9915 g, 0,7803 g és 0,7647 g) és egy nem daganatos, normál agyi szövetmintát (peritumorális agyállomány a daganatot fedő frontális póluson, 0,3782 g) gyűjtöttünk 15 perces időintervallumokkal, majd a mintákat egyből folyékony nitrogén felszínén lefagyasztottuk és azokat -80 °C-on tároltuk az analízisig.

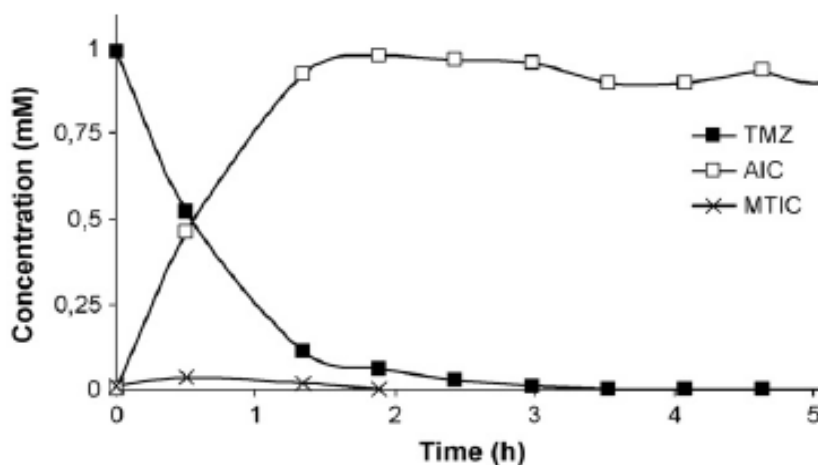
Az intratumorális gyógyszer szint vizsgálatához a szérum szint meghatározására is szükség volt. A glioblasztomás beteg szérum mintáit az egyszeri 400 mg dózisú TMZ orális alkalmazása után 30-250 perccel gyűjtöttük. Továbbá nem tumoros betegektől származó szérum mintákat is alkalmaztunk kontrollként, illetve a mátrix hatások tanulmányozásához. A mintákat tömény sósavval savanyítottuk 2 körüli pH-értékre (1 mL szérumhoz 10 µL tömény HCl-ot adtunk és összekevertük), hogy elkerüljük a TMZ hidrolízisét. Minden mintát -20 °C-on tároltuk az analízis előtt. A CE analízist megelőzően a szérum mintákat 15 percen keresztül 4 °C-on 9000 rpm-en centrifugáltuk.

A nem tumoros agyszövet- illetve tumormintákat liofilizáltuk, majd homogenizáltuk. Ezután a homogenizátumokat (0,0075-0,12 g) kis térfogatú (300-600 µL) 1 M-os HCl-ban gondosan feloldottuk. A vizes oldat pH-ját az előkészítési folyamatok során erősen savas tartományban, 2 alatt tartottuk, hogy elkerüljük a TMZ hidrolízisét. Az így nyert sűrű, viszkózus oldatot lehűtöttük és 15 percen keresztül 4 °C-on 9000 rpm-en centrifugáltuk. A szupernatánst közvetlenül a CE eszközbe injektáljuk. Az elődúsításhoz a felülúszóból 50 µL térfogatot extraktáltunk 3x 300 µL etil-acetáttal (10 perc vortex-keveréssel). A mintákat -20 °C-on tároltuk az analízis előtt.

4.3.3. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztomás betegekben - eredmények

A TMZ koncentrációjára vonatkozó érték egy adott minta esetében csak a CE készülékbe történő injektálás idejére tekinthető érvényesnek és csak ritkán biztosít releváns információt a mintavételi lépéskor fennálló valós koncentrációról (pl. amikor a vérmintát leveszik a betegtől). A MEKC technikát alkalmazva lehetőség van arra, hogy egyszeri futtatások során rövid idő alatt határozzuk meg a TMZ-t és két további bomlástermékét, az MTIC-t és az AIC-t. Az összetevők koncentrációját a TMZ bomlása után vizes oldatban 1-13 pH értékeken határoztuk meg (a pH-t HCl, NaOH és foszfát puffer segítségével állítottuk be). Az oldatok előkészítése és a CE kapillárisba történt injektálásuk között kevesebb, mint 1 perc telt el (az oldat hőmérsékletét a minta előkészítés során 4 °C-on kellett tartani). pH 6 és 8 között a pH-ban történt kis változtatás is nagy eltérést idézett elő a három összetevő koncentrációjának eloszlásában. Számos elektroforetogram készült a TMZ oldatról pH 7,9-es értéken, különböző időtartamok elteltével, ahogyan azt a 9. ábra illusztrálja. Míg ezen a pH értéken a TMZ felezési ideje 28 perc, a MTIC-nek 13 perc, addig ez pH 9,1-es értéken 9 és 11

perc volt. A TMZ és MTIC koncentrációi gyorsan változtak, viszont az AIC 4 óra után is állandó maradt. Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy az AIC állandó mennyiségei egyenlők a TMZ kezdeti koncentrációjával és sokkal nagyobbak, mint a MTIC maximális koncentrációja.



9. ábra. A TMZ, MTIC és AIC egy időben történő monitorozása humán szérumban a TMZ feloldása után. A TMZ kezdeti koncentrációja 180 $\mu\text{g/mL}$ volt.

A TMZ és bomlástermékei közel fiziológiás pH értéken jól detektálhatók, azonban jelentősen eltérő pH érték esetében csak egy összetevő mutatható ki. Alacsonyabb pH értéken a TMZ stabil, pH 12 fölött a TMZ-ből AIC-be történő konverzió gyakorlatilag azonnal lezajlik és az AIC koncentrációja szobahőmérsékleten legalább egy hétig állandó marad.

Az MTIC stabilitása szerves oldószerek alkalmazásával sem fokozható. Habár a MTIC oldódása 20/80 arányú izopropanolol/metilén-klorid (v/v) oldatban magas, a stabilitása rendkívül gyenge. Egy sokkal hidrofób tulajdonságokkal rendelkező oldószer használata esetén pedig az analitokat nem lehet jól kivonni, így ennek a használata sem célravezető CE esetén.

Humán szérum vizsgálata során egyszeri 400 mg TMZ orálisan alkalmazása után 60 perccel történt a mintavétel, majd a vért azonnal cc. HCl-al savasítottuk pH 1-es értékre és a fagyasztóba tettük ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), így a lebomlási folyamat megállt és a vér TMZ mennyisége a mintavételezési időpontnak megfelelő koncentrációt tükrözött. A TMZ legmagasabb detektált koncentrációja az analizált mintákban 14.2 $\mu\text{g/mL}$ -nek bizonyult; ez a koncentráció a c_{max}

körül van. Az MTIC és AIC ekkor még csak kis mennyiségben detektálható, mert a mintavételi időpont a TMZ vérbe történő maximális abszorpciójához közeli időpontban volt és a TMZ lebontása még nem kezdődött el a gyomorban fennálló savas pH által biztosított stabilitás miatt. A TMZ és a lebomlási termékeinek mennyisége legalább 2 hónapig állandó maradt az acidifikálás és a -20 °C-on történő tárolás után.

Az elektroferogramokat 260 nm és 325 nm-en rögzítve azt tapasztaltuk, hogy gyakorlatilag csak az AIC és a TMZ mutat abszorpciót, a szérumban lévő komponensek nem interferálnak, így az elérhető detekciós szenzitivitás jelentős.

4.3.4. A temozolomid intratumorális koncentrációjának közvetlen meghatározása humán glioblasztómában - eredmények

Amíg a szérumban lévő minták közvetlen injektálása a szeparációs kapillárisba nem jelent gondot, addig ezt nem lehet elvégezni az agydaganat minták esetében a szilárd konzisztenciájuk miatt. További problémát jelent az is, hogy a gyógyszerek koncentrációja az agyban (a tumorban) jellemzően kisebbek, mint a szérumban, valamint az elérhető *in vivo* tumor minták igen kis mennyiséget képviselnek (kevesebb, mint 1 g). Az általunk kidolgozott új analitikai módszer, a liofilizáció és a szárított anyag ezt követő feloldása egyszerű és hatékony módszernek bizonyult arra, hogy biztosítsuk a minta homogenitását illetve, hogy feloldjuk az analitot egy megfelelő oldatban. A liofilizált tumor mintákat kis térfogatú 0,1 M-os HCl-ban (300-600 µL) oldottuk, hogy megakadályozzuk a TMZ hidrolízisét, illetve, hogy az analit hígítását alacsony szinten tartsuk. Annak ellenére, hogy a kapott oldat sűrű volt, a direkt injektálás és meghatározása lehetővé vált. A TMZ csúcsa még éppen mérhető volt 165 perccel az egyszeri 400 mg-os TMZ beadása után a beteg mintájában, viszont már nem volt mérhető a többi tumoros mintákban.

Minta	A mintavétel és a TMZ bevétele között eltelt idő (min)	Liofilizáció előtti tömeg (g)	Liofilizáció utáni tömeg (g)	TMZ tartalom ($\mu\text{g/g}$)
nem tumoros agyszövet	105	0,3782	0,0748	0,0476
Tumor 1	135	0,9915	0,1047	0,0852
Tumor 2	150	0,7803	0,1217	0,0614
Tumor 3	165	0,7647	0,1211	0,117

17. táblázat. A temozolomid koncentráció humán glioblasztómában és peritumorális agyszövetben 400 mg TMZ per os alkalmazása után 105-165 perccel.

A tumor minták (17. táblázat) eredményeiből összefoglalható, hogy a TMZ képes áthatolni a vér-agy gáton, de a csúcskoncentráció az analizált tumormintákban nem magasabb, mint 0,12 $\mu\text{g/g}$.

4.3.5. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztómás betegen - konklúzió

Jelenleg az egyetlen rutinszerűen adott elsővonalbeli kemoterapeutikum a GBM terápiájában a TMZ, melynek glioblasztómás beteg vérmintáiban, humán agyszövetben vagy daganatszövetben elért lokális koncentrációjáról az irodalomban alig található direkt mérésből származó adatok. Ezek hiányában nem is szerepel ajánlás az orális alkiláló ágens bevitelének és a sugárkezelés kivitelezésének időbeni tervezésére, pedig a gyógyszerpenetrációt fokozó sugárhatás és a vérben elérhető maximális gyógyszerkoncentráció összehangolásától az onkoterápia effektivitásának optimalizálása lenne várható. Az igen kis mennyiségű és igen gyorsan lebomló kemoterapeutikum komplex biológiai mintából (vérből) történő kimutatása azonban nem tekinthető könnyen elérhető rutinszerű módszernek, így érthető, hogy klinikai betegellátásból származó adatokat nem könnyű találni az irodalomban.

Az elmúlt két évtizedben, a kapilláris elektroforézis hatékony és sokoldalú szeparációs eszközzé vált magas felbontási képességének, továbbá annak köszönhetően, hogy képes igen kis mennyiséget detektálni még komplex (biológiai) mátrixokban is, de közismert előnyeinek ellenére sem volt eddig olyan tanulmány, amely a TMZ és annak lebomlási termékeinek CE-vel kivitelezett analíziséről számolt volna be. Jelen tanulmányban MEKC-t alkalmazva glioblasztómás betegek szérumának TMZ koncentrációját monitoroztuk egyszeri 400 mg-os

per os dózis után. Vizsgálataink során igazolni tudtuk, hogy a MEKC technika UV spektrofotometriás detektálással jól alkalmazható a TMZ *in vivo* direkt meghatározására daganatos betegek szérumában. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy sikerült glioblasztomás betegek vérében a TMZ és lebomlási termékeinek (MTIC és AIC) mennyiségét megfelelő pontossággal meghatározni.

Eredményeink alapján a radioterápiát a TMZ bevétele utáni 1-2 óra közötti intervallumban javasolt elvégezni. Tanulmányunk eredményeképpen a Debreceni Egyetemen a glioblasztomás betegek kezelése már ezzel az ajánlással kiegészített protokoll szerint zajlik.

4.3.6. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztómában - konklúzió

A gyógyszerek intratumorális lokális koncentrációjának ismerete kulcsfontosságú lehet a gyógyszer hatékonyságának és akkumulációjának meghatározásához, hiszen ha össze lehetne hasonlítani direkt mérésekkel a különböző készítmények intratumorális csúcskoncentrációját, akkor a legmegfelelőbb ágens kiválasztása is kézenfekvő lenne.

A jelenlegi vizsgálatot egy olyan ritka lehetőség szülte, melynek során egy ismert glioblasztomás beteg a monoterápiás TMZ kezelés alatt állapotrosszabbodás miatt került klinikai felvételre, ahol első lépésben a tumor okozta térfoglaló hatás miatt dehidrálást célzó kezelés indult és a beteg a szokásos 400 mg TMZ adagját is bevette. Nem sokkal ezután azonban tudatzavara alakult ki és a térfoglaló hatás redukálása érdekében sürgős műtét történt. Ennek során a tumor reszekálásával sikerült a beteg neurológiai állapotát stabilizálni, és a szövettani vizsgálatra szánt szövetmintákból gyógyszer szint meghatározást is tudtunk végezni.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a MEKC hasznosnak bizonyult agydaganatminták mérésének esetében is. A jelen kutatásban viszonylag kevés előkészületi folyamatot alkalmaztunk és csupán 0,8 g-os minta (tumor) elegendő volt az elődúsításhoz és analízishez. Az új analitikai módszerként alkalmazott szövetminta-lyofilizálás, majd homogenizált oldatba vitele megbízható módszernek bizonyult és megfelelő érzékenységgű méréseket tett lehetővé.

A tumor minták eredményeiből összefoglalható, hogy a TMZ képes áthatolni a vér-agy gáton, de a csúcskoncentráció az analizált mintákban nem magasabb, mint 0,12 µg/g. Ez az általunk *in vivo* mért TMZ koncentráció érték kisebb, mint más kutatók által megállapított értékek. Egy intracerebrális mikrodialízis tanulmányban a TMZ csúcskoncentrációja az agy

interstitiumában 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ körülnek mutatkozott. Egy prediktív farmakokinetikai modell alapján pedig a jósolt TMZ csúcskoncentráció 1,8-3,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ közötti értéket ér el az agyban. A különbségek elsődleges oka a mintavétel helyéül szolgáló fiziológias kompartmentek különbségei lehetnek, de az általunk végzett direkt gyógyszer szint-meghatározás módszertani megbízhatóság szempontjából elsőbbséget élvezve felülírhatja az eddig közölt eredményeket.

Összefoglalva, tanulmányunkban először az irodalomban sikerült a TMZ lokális intratumorális koncentrációt humán glioblastomában meghatározni. Ennek során kidolgoztuk a szilárd halmazállapotú tumorállomány CE-vel történő meghatározásának technikáját, mely az irodalomban szintén novumnak számít. Az általunk detektált érték a korábbi közlésekben található indirekt számított értékeknél egyértelműen alacsonyabbnak bizonyult. A jelenlegi onkoterápia során elérhető intratumorális gyógyszer szint további, magasabb lokális koncentráció biztosítására alkalmas készítmények iránti igényt alapoz meg.

5. A GLIOBLASZTÓMA HETEROGENITÁSÁNAK KLINIKAI JELENTŐSÉGE

A glioblasztoma multiforme a központi idegrendszer és tulajdonképpen az egész szervezet egyik legrosszindulatúbb, gyógyíthatatlan daganatos betegsége. Viszonylag rövid időn belül halálos, a kezelések csak a kiújulást tudják némileg halogatni, illetve a daganat elhatalmasodásáig teremthetnek egy elfogadható klinikai állapotot. A glioblasztomát nagyfokú inter- és intratumorális genetikai heterogenitás jellemzi. Ahogy az entitás neve is mutatja, a „multiforme” szó a szövettani sokszínűséget mutatja, melyből a mikrovaszkuláris proliferáció, a nekrozis, illetve a magas mitotikus aktivitás jelentette korábban a diagnózis gerincét. Az intenzíven folyó molekuláris genetikai vizsgálatok révén először olyan kromoszómákat, géneket, molekulákat lehetett azonosítani, amik a gliomák diagnosztikájában, a túlélés becslésében, illetve egy adott kezelés hatékonyságának mérésében bizonyultak rendkívül hasznosnak. Ezt követően a közelmúltban az is egyre világosabbá vált, hogy a klasszifikáció során egy molekuláris profil kialakítása sokkal jobban körül tud írni egy adott alcsoportot, sőt a molekuláris patológiai markerek fontosságban felül is múlják a hisztológiai markereket. Tekintve, hogy a korábbi glioblasztoma klasszifikációk csak ez utóbbiakra támaszkodhattak, a molekuláris markerek alkalmazása teljesen átírta a korábbi csoportokat új entitásokat létrehozva, egyeseket eltörölve, míg másokat összeolvasztva. A klasszikus szövettani meghatározáson túl az első mérföldkövet a primer („de novo”) és a szekunder glioblasztomák szétválasztása jelentette, melyeket már eltérő genetikai eseményekkel jellemeztek. Ezt követte 2010-ben Verhaak és munkacsoportjának széles körben elfogadott és használt felosztása, melyben génexpressziós profilok megalkotása révén transzkripció alapú csoportosítást sikerült megalkotni. Az egyes típusok (proneurális, neurális, klasszikus és mezenhímális) önálló, jól jellemezhető genetikai defektusokkal rendelkeznek és a kezelhetőség és túlélés szempontjából is relatíve jól különválnak egymástól. Az omikai vizsgálatok mind szélesebb körben történő alkalmazása már komplett genom szintű analízist tett lehetővé és egyre több epigenetikai változást is ki lehetett mutatni. Ez utóbbi révén Brennan és munkatársai 2013-ban a DNS metiláció mértéke alapján 6 csoportba sorolták a glioblasztomákat (M1-M6). A genomszintű analízisnek az izocitrát dehidrogenáz (IDH) enzim óriási prediktív és prognosztikus értékének felismerése adott nagy jelentőséget. Ennek következményeként a Louis és munkatársai 2016-ban publikálták a WHO

által hivatalosan jelenleg is használatban lévő klasszifikációt: IDH-vad típus/ IDH mutáns / NOS.

5.1. A tumorheterogenitás szerepe a kezelés ineffektivitásában

A GBM heterogenitása kezdetektől ismert jellemvonás, mely a „multiforme” jelzővel is kifejezésre kerül. Kialakulásában a gyors sejtszaporodás során létrejövő számtalan mitózis okozta szubklón kialakulása áll. Az így kialakuló heterogenitás ráadásul dinamikus jellegű, hiszen osztódásról osztódásra változhat, ami egyrészt a tumor aktuális genomikai státusának meghatározását teszi lehetetlenné, másrészt az alkalmazott terápia elleni rezisztencia kialakulásáért is felelősségre vonható. Így összességében a tumor-heterogenitás két fontos szempontból nehezíti az effektív terápiát: mind a pontos, molekuláris szintű diagnózis felállítását, mind pedig a célzott onkoterápia meghatározását megakadályozza. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy a szubklónok nagy számából adódóan a diagnózis a szövetszövetmintavétel helyétől is nagymértékben függ, és így az alágradálás és a helytelen genomikai diagnózis felállításának veszélye nem elhanyagolható. A fenti mechanizmusok kivédésére vagy csökkentésére két új irányvonal van kialakulóban. Az egyik a pontosabb diagnózist szolgálja oly módon, hogy a lokoregionális szövetszövetminta elemzése helyett a tumor egészét jellemző folyadékbiopsziából származó mintából történik a kezelést meghatározó genotípus meghatározása. A másik irányvonal a kezelés kombinált jellegének előnybe helyezésével a minél több tumor-klón lefedését eredményező több hatásmechanizmusú és támadáspontú készítmény alkalmazásától reméli a terápia effektivitásának javulását. A jövőkép természetesen ezek ötvözését jelenti, amikor a folyadékbiopszia nyújtotta lehető legpontosabb molekuláris patológiai diagnózis szolgáltatja a személyre szabott kombinált onkoterápiához szükséges információkat. Emellett pedig a folyadékbiopszia igen komoly előnye a szövetszövetmintavétellel szemben, hogy a gyakorlatilag szabadon ismételhető a terápia során, így a tumor változó genetikai állománya sokkal hamarabb tetten érhető, mint a hagyományos MRI követéssel vagy reoperáció/rebiopsziával, amikor már a kiújult terápia rezisztens szubklónokból kifejlődött daganat makroszkóposan is vizualizálható méretet ér el. A gyakori folyadékbiopsziás mintavétellel tehát a tumor heterogenitása leképezhető, ennek változása követhető és a terápia módosítása személyre szabott szoros módosításokkal lesz megvalósítható. Jelen review-ban a GBM heterogenitásából származó nehézségeket és ennek az ellenszerét szolgáló eszköztárat tekintjük át részletesebben.

5.2. Jelenlegi terápiás lehetőségek

Annak ellenére, hogy a diagnosztika szinte elképzelhetetlen fejlődésen ment és manapság is keresztül, sajnos a glioblasztoma kezelési protokollja az elmúlt időben nem sokat változott. Független a diagnosztikus alcsoportoktól, sablonszerű, a legtöbb beteg a sztenderd kezelési sémában részesül. Léteznek ugyan már a rutin molekuláris patológiai gyakorlatban is olyan vizsgálatok (pl.: MGMT, 1p19q), amelyek módosíthatják a kezelést, de a molekuláris profil alapú célzott terápia még várat magára. A nemzetközi irodalommal összehangban saját beteganyagunkon végzett vizsgálat során is egyértelmű javulást tapasztaltunk mind a progressziómentes túlélés, mind az összesített túlélést tekintve a Stupp protokoll bevezetése óta, sőt a bevacizumab bevezetése a terápiás protokollba is tovább javította a túlélési görbéket. Intézetünkben kezelt betegeink analízise során azonban azt találtuk, hogy az életkor és a nem mellett a tumor mérete – oldalisága –, illetve elhelyezkedése és a sebészi eltávolítás radikalitása sem mutatott szignifikáns összefüggést a betegek túlélésével. Az eleve rossz Karnofsky értékkel rendelkező (KPS<70) betegek protokoll szerint nem részesülnek kemoterápiás kezelésben, esélyeik a túlélésre sajnos minimálisak. A túlélésben mutatott jelentős eltérések tehát azoknál a betegeknél, akik posztoperatív állapotuk alapján alkalmasak voltak a konkuráló kezelésre a radio-kemoszenzitivitástól függött. Itt élesen kettévált az úgynevezett 'responder' (PFS = 13.4 ± 7.5 hónap, OS = 25.7 ± 7.4 hónap) és 'non-responder' (PFS = 4.5 ± 2.3 hónap, OS = 10.2 ± 4.2 hónap) csoport. Ez utóbbi azokat jelenti, akiknél a daganat nem radio-kemoszenzitív és a kombinált kezelés ellenére lényegesen hamarabb újul ki, illetve növekszik. A betegek közel fele tartozik ebbe a csoportba. A kezelés sikertelenségének két fő oka a daganat heterogenitása és az invazív tulajdonsága. A glioblasztoma genetikai mutációja a 3 fő jelátviteli útvonal valamelyik szintjén bekövetkezett változás révén valósul meg: az RTK/RAS/PI3K, a P53 és a RB. Ezek kombinációja gyakorlatilag határtalan és az elsődleges eltérést hamar több követi, megteremtve ezzel az intratumorális és intertumorális heterogenitást. Emellett a glioblasztoma intrinzik tulajdonsága, hogy a tumorsejtek képesek messze elvándorolni kiindulási pontjuktól, melynek következtében a daganat határ nélkülivé válik. Ellentétben egy agyi metasztázistól, ami jól körülírható és az ép agytól kellőképpen demarkálódik, egy malignus glioma rendkívül magas invazív potenciállal rendelkezik, azaz a sejtek egymással és az extracelluláris mátrix alkotóelemeivel kommunikálva mélyen (akár a daganat várt határától 4-5 cm-re) az úgynevezett peritumorális állományba jutnak. Ennek következtében a sebészi eltávolítás eleve

kudarca ítélt. A jelenlegi sztenderd sugárkezelés és kemoterápia a sejtproliferációt gátolja, tehát anti-proliferatív, nem hat azonban az invazivitásra. Így a gliomasejtek migrációja és az intratumorális heterogenitás miatt a radikális tumoreliminációs kezelések nem kivitelezhetők, a citoredukciós kezelések hatásai pedig csak átmenetiek, a daganat kiújulása és előrehaladása törvényszerű. Ezen recidíva során tulajdonképpen a terápia rezisztens tumorsejt klónok szelektálódnak ki, amihez újabb genetikai defektusok társulnak és a daganat nem reagál a sztenderd terápiára, kezelhetetlenné válik és rövid időn belül a beteg halálát okozza.

5.3. Új diagnosztikai módszerek a személyre szabott terápia megvalósításához

Tekintettel arra, hogy a jelenlegi szövettani analízis nem teszi lehetővé a célzott kezelést, egy teljesen új koncepcióra van szükség, ami magában foglalja az új diagnosztikai eszközöket is. A daganatból vett minta egy adott populációt vizsgál egy adott időpontban, így az a tumor heterogenitása és dinamikus változása miatt nem reprezentatív. Egyre több kutatás támasztja alá a vérben (vagy egyéb testnedvben) keringő tumorsejtek, exoszómák, illetve DNS és RNS részecskék hatalmas diagnosztikus, prediktív és prognosztikus potenciálját. Az úgynevezett folyadék biopszia révén szinte folyamatosan információt nyerhetünk a glioblastoma genetikai defektusairól és az adott terápia sikerességéről. Szükség van új, nagy érzékenységgű, pontos és relatíve gyors vizsgáló módszerek rutinszerű alkalmazására is. Az új generációs DNS-szekvenálási (NGS) módszerek megjelenése minden bizonnyal forradalmasítani fogja a genom szintű analíziseket. A folyadék biopsziához pedig jól illeszkedik a kvantitatív vizsgálatra alkalmas droplet digitális PCR (dd PCR). Ezek mellett a kinyert sejtek speciális tenyésztése olyan in vitro modell formát tesz lehetővé, mint a glioma organoid, ami a genom megismerése révén szintén alapja lehet a személyre szabott kezelésnek.

5.3.1. Keringő nukleinsavak

A daganatból származó, keringő nukleinsavak előfordulhatnak sejttől függetlenül, egy lipid vagy fehérje struktúrához kapcsolódva, vagy keringő extracelluláris vezikulumokhoz kötődve is. Megkülönböztetünk DNS és RNS fajtát.

A keringő DNS típusai: sejttől független DNS (cfDNA), keringő tumor DNS (ctDNA), mitokondriális DNS (mtDNA). A cfDNA 150-200 bázispárból álló kettősspirál, melynek

plazmában mért koncentrációja egészséges ember esetén 10-15 ng/ml. Ez az igen alacsony mennyiség daganatos betegség esetén növekszik, illetve összetétele is változik, legnagyobb részét a tumorsejtekből származó ctDNA frakció teszi ki. A ctDNA által hordozott mutációk felbecsülhetetlen információkkal szolgálnak a daganat genetikai állományának alakulásáról és szintjének időbeli változása jól jelezheti a terápia hatásosságát is. Egyelőre a diagnózist nehezíti a keringő ctDNA rendkívül alacsony koncentrációja, valamint rövid féléletideje és ez a glioblasztomára különösen igaz, azonban megfelelő érzékenységgű és tumor specifikus NGS panel segítségével már sikerült igazolni például BRAF/IDH1/IDH2 mutációkat vagy ERBB2/MET/EGFR/PDGFR/A amplifikációkat. Primer agydaganatok esetében a CSF-ben található a legnagyobb mennyiségben ctDNA. A ctDNA mellett a mtDNA (mennyiségi és minőségi) változása is tumoros folyamatot jelezhet. A mtDNA-ban bekövetkező változások már a premalignus lézióknál elkezdődnek, magas szintje rossz prognózist jelent. Rendkívüli szerepe a glioblasztomák korai diagnózisában és a kiújulás minél hamarabbi felfedezésében lehet.

A keringő RNS típusai: 'messenger' RNS (mRNA), nem kódoló RNS-ek (lncRNA, sncRNA) és a kis nem kódoló RNS-eken belül mikroRNS (miRNA) és cirkuláris RNS (circRNA). Kiemelt jelentőséggel bírnak a miRNA-k, amik 19-25 bázispár nagyságúak és bármelyik testnedvben bőségesen megtalálhatóak. Kiváló biomarkerek, glioblasztomában a miR-21, miR182, miR210, miR221, miR222, miR454 emelkedő szintet, a miR128 és a miR342 csökkenő szintet mutat és mennyiségük korrelál a terápia hatására változó tumormérettel is. A lncRNA-k jelátviteli utak módosítása révén aktívan is részt vesznek a tumorprogresszióban, melyek közül az alacsony HOTAIR szint és a magas GAS5 szint jó prognosztikus faktornak bizonyult glioblasztomák esetén. A circRNA-k jelentőségét leginkább az adja, hogy sncRNA-ként részt vesznek gátló miRNA „szivacsok” létrejöttében, amik a gliomagenezist és progressziót segítik elő.

5.3.2. Egyéb keringő anyagok

Exoszómák és tumorsejtek. Az exoszómák 40-150 nm átmérőjű extracelluláris vezikulumok, amiknél nukleinsavak, fehérjék, lipidek és metabolitok vannak egy kettős-membrán rétegbe zárva elkerülve így a degradációt. A sejt-kommunikációban betöltött szerepük határozza meg jelentőségüket a megfelelő sejt-mikrokörnyezet kialakításában és így a tumorigenezisben és progresszióban. Emellett a sejt-kommunikáció alapot adhat a gyógyszer-rezisztencia (például TMZ) és sugár-rezisztencia daganaton belüli terjedésére is,

ami rezisztens klónok kialakulásához vezet. Éppen ezért a tumor-specifikus exoszómák eliminálása a szérumból ígéretes terápiás potenciállal kecsegtet. A keringő tumorsejtek (CTC) rendkívül alacsony szintje (vérben 10^9 sejtől 1 CTC) és dúsítási nehézsége miatt szerepük egyelőre nem tisztázott.

5.4. Új terápiás lehetőségek

Elengedhetetlen új terápiás célpontok keresése is, hogy egyszerre több jelátviteli út blokkolása is elérhető legyen így megakadályozva a terápia-rezisztens szubklónok elszaporodását. A komplex molekuláris genetikai vizsgálatok eredményeként megalkotott inváziós spektrum a kezelési célpontok kiválasztásában lehet a klinikus segítségére. Kutatócsoportunk már megalkotott ilyen inváziós spektrumokat, melyekkel a különböző glioma grádusok is jól összehasonlíthatók.

Számtalan klinikai vizsgálat van jelenleg is folyamatban, melyek többféle mechanizmussal próbálják kordában tartani a glioblasztoma terjedését, azonban az átütő siker még várat magára. Az új terápiák hatékonyságának legfőbb gátjai a szelektivitás hiánya, a változó hatékonyság, az erős mellékhatások (toxicitás), és az alternatív útvonalak aktiválódása. Emellett probléma a megfelelő gyógyszer koncentráció elérése a daganatban (a vér-agy gát miatt) és a daganat erős immunszuppresszív hatása is. Glioblasztoma esetén az FDA jelenleg 2 kemoterápiás kezelést (temozolomid és bevacizumab) és a tumor treating field pulzáló elektromos kezelést ismeri el bizonyított terápiaként. Egyes kutatócsoportok ezt a meglévő kezelést egészítik ki más szerekkel (pl.: bevacizumab mellé irinotecan vagy lomustin). A BELOB klinikai vizsgálatnál kézzel fogható eredménye van annak, ha rekurrens GBM esetén a bevacizumab mellé lomustint is adnak, ez szignifikánsan növelte az OS-t. Emellett szintén rekurrens, operatív GBM-ben próbálkoznak neoadjuváns kezeléssel (pembrolizumab) is. A másik koncepció, hogy más daganatok esetén már bizonyítottan hatékony kezelést alkalmaznak GBM-nél. A harmadik vonal pedig a teljesen új támadáspontú szerek kifejlesztése. GBM esetében az új terápiás célpontok számtalan csoportra oszthatóak, mégis a daganat által létrehozott elkerülési mechanizmusok és direkt immunszuppresszió következtében különös jelentőséggel bír az immunterápia. Ebbe tartoznak bele az immunellenőrzőpont gátlók (pl.: CTLA-4: nivolumab, ipilimumab, PD-1: pembrolizumab, indoleamine 2,3-dioxygenase: indoximod), a vakcina alapú terápiák (rindopepimut, SurVaxM – fehérje, DCVax - dendritikus sejt), a vírusterápiák, melyek esetén megkülönböztetünk vektorvírusokat, amik a

kiválasztott gént juttatják be a célpontig, illetve onkolitikus vírusokat (pl.: Toca-511, talimogene laherparepvec, PVSPIRO, DNX-2401), amik maguk generálnak immunválaszt és így pusztítják a daganatsejteket, valamint a CAR-T sejtek, amik a daganat egy specifikus antigénjét ismerik fel (pl.: EGFRvIII, HER2, IL13RA2) és specifikusan a daganatsejteket eliminálják. Az immunterápiás lehetőségek mellett említést érdemel az őssejt (NSC) való terápiás próbálkozás (pl.: NSC viszi be az onkolitikus adenovírust a célpontba), az epigenetikus terápia (pl.: hiszton deacetáz inhibitorok: vorinostat, panobinostat) és az monoklonális antitest alapú célzott terápiák, melyek hathatnak önmagukban (pl.: EGFR ellenes cetuxizumab) vagy az antitesthez kötött antimitotikus szer, bakteriális toxin vagy radioaktív izotóp révén. A MAB-k mellett fontosak az úgynevezett multi target inhibitorok is (pl.: regorafenib), melyek több enzimet is képesek gátolni és ezzel a jelátviteli utak több szintjén is beavatkozni. Vannak terápiás próbálkozások új radiosenzitizerekkel, PARP inhibitorokkal (olaparib, veliparib), DNA-PK inhibitorokkal, illetve ATM/ATR inhibitorokkal.

Összességében elmondható, hogy rendkívül sok szer van kipróbálás alatt, melyek egy része más daganattípusban már bizonyított. Egyre inkább előtérbe kerülnek olyan klinikai vizsgálatok (pl.: GBM AGILE trial), amik a többféle kezelési lehetőségből a beteg szubtypusához illesztik a megfelelőt, illetve megfelelőek kombinációját. Folyamatosan érkeznek új eredmények és tapasztalatok, de részben a korábban említett nehézségek miatt, részben pedig azért, mert sok vizsgálat még az elején jár, nem ismert olyan szer vagy szerek kombinációja, ami az arany sztenderd kezelést megingatná. A glioblasztoma jelenleg elfogadott sztenderd kezelése klinikai állapottól függően a biztonságosan maximális tumorreszekcióból és az azt követő, temozolomid alapú konkuráló kemo-irradiációból áll, melyet kiújulás esetén újabb sebészeti beavatkozás vagy egyéb kemoterápiás szer (bevacizumab) használata követ. A jelenlegi molekuláris genetikai ismeretség messze túlszárnyalja a kezelési lehetőséget. A korábban egy entitásként kezelt glioblasztoma a genetikai állományát és defektusait figyelembe véve több szempontból is számtalan alcsoportba bontható. Ezek a csoportok diagnosztikus, prediktív és prognosztikai szempontból is jól elkülöníthetők egymástól és kezelhetőségük, valamint kezelési célpontjaik is különbözőek. Az egyre inkább teret nyerő folyadék-biopszia alkalmas a heterogén daganat pontos molekuláris feltérképezésére, a kezelés alatt bekövetkezett változások nyomon követésére, illetve az adott kezelés hatékonyságának monitorizálására. Mindezeket látva kimondható, hogy a jövőben többféle hatásmechanizmusú kombinált terápiára van szükség, ami egyszerre több célpontra is irányul. A kezelési lehetőségeket és a terápiás hatékonyságot

is figyelembe véve legfontosabb kritérium a beteg jó fizikai állapota. A jó Karnofsky érték minél további megtartása a hosszú túlélés kulcsa. Emiatt azt a korábbi sebészi hozzáállást, hogy: 'biztonságosan maximális tumorreszekció' egyre inkább fel kell, hogy váltsa a 'maximálisan biztonságos tumorreszekció' fogalma. A posztoperatív, célzott, kombinált kezelés célja pedig a citoredukció helyett egyre inkább a migráció redukciója és a demarkáció elősegítése kell, hogy legyen. Az ilyen módon már éles határral rendelkező daganatok klasszikus sebészeti vagy sugársebészeti módszerrel sokkal jobban kezelhetők. Ezzel elérhető, hogy a jelenlegi citocid kezelések helyét a teljes tumorelimináció válthassa fel, mely vagy teljes gyógyuláshoz vezet, vagy recidiva, novum lokalizáció esetén szisztémás mellékhatások nélkül megismételhető akár többször is, így a jelenlegi átlagos túlélés megtöbbszöröződése várható.

6. A GLIOBLASZTOMA IDEGSEBÉSZETI MEGKÖZELÍTÉSE

6.1. A jelenlegi onkoterápia effektivitásának meghatározása glioblasztoma esetében saját beteganyagon

A glioblasztomás betegek nemzetközi szinten 2006-ban bevezetett kezelési protokollja a kemoterápiás készítmények rutinszerű alkalmazásával jelentősen javított a túlélési adatokon. Felmerült tehát az igény a betegek kezeléstől függő túlélési esélyeinek összehasonlítására, valamint az idegsebészeti, klinikai szempontból meghatározható prognosztikai paraméterek újrabecslésére. Továbbá felmerül a kérdés, hogy a szisztémás hatású kemoterápiás készítményekkel elért eredmények megváltoztatják-e a műtéti radikalitás kedvező hatását feltételező teljes tumorexstirpációra való törekvést? Az onkoterápia hatékonyságának ismeretében átértékelődik-e bizonyos klinikai paraméterek prognosztikai jelentősége?

A Debreceni Idegsebészeti Klinikán szintén 2006-ban került bevezetésre glioblasztomás betegek kezelésére a TMZ rutinszerű alkalmazása. A konkuráló kemo-irradiáció és a TMZ monoterápia ellenére kiújult tumor esetében pedig 2009 óta alkalmazzuk a bevacizumab monoterápiát. Jelen vizsgálatban a különböző kezelési metódusok (hagyományos irradiáció, konkuráló kemo-irradiáció, kiegészítő bevacizumab kezelés) hatékonyságát elemeztük a klinikai paraméterek túlélést befolyásoló szerepének tükrében saját beteganyagon.

Vizsgálatunkban 104 olyan agydaganatos beteg adatait dolgoztuk fel, akiknél 2002 és 2012 között GBM miatt a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Idegsebészeti Klinikáján műtét történt. A posztoperatív terápia alapján a 104 páciens öt csoportba osztottuk.

1. Az első csoportba tartozó 15 betegnél az igen rossz Karnofsky pontszám (KPS érték) alapján műtét után sem sugár-, sem kemoterápia nem történt (*best supportive care*, BSC).
2. Kilenc esetben a betegek a műtét utáni állapot alapján csak palliatív radioterápiában (pRT) (10x3 Gy) részesültek.
3. A harmadik csoportba 20 beteg tartozott, akik 2002-2005 között estek át műtéten és utána teljes dózisu sugárkezelésben részesültek, de kemoterápiát nem kaptak (30x2 Gy WBRT).

4. A negyedik csoportba azok a 2006-2008 között operált betegek tartoztak, akik műtéti eltávolítást követően konkuráló kemo-irradiációs kezelésben (Stupp protokoll szerint) részesültek (30x2 Gy *FBRT* + *per os* TMZ, + 6-12 ciklus (állapottól és radiológiai progressziótól függően) TMZ monoterápia, RT+TMZ). Ebbe a csoportba 35 beteg tartozott.

5. Az ötödik csoportba azokat a betegeket soroltuk (25 beteg), akiknél a Stupp protokoll után a daganat progresszióval és ezt követően bevacizumab kezelésben részesültek (RT+TMZ+BC).

A feldolgozás során figyelembe vettük a betegek korát, nemét, a tumor oldaliságát, lokalizációját, legnagyobb átmérőjét, a műtét előtti és utáni KPS-t és a műtéti beavatkozás kiterjesztettségét. Ez utóbbit 3 típusba soroltuk: 1. biopszia, 2. részleges reszekció, 3. makroszkóposan teljes reszekció.

Munkánk során az egyes klinikai paraméterek és különböző kezelési módszerek túlélésben játszott szerepét vizsgáltuk.

A tumor oldaliságának szerepét aránybecsléssel vizsgáltuk, a pre- és postoperatív KPS-t, a progresszió előtti, utáni, illetve OS szignifikáns voltát kétmintás t-próbával, illetve Mann-Whitney próbával ellenőriztük. A két túlélési csoportban a betegek nemének, a különböző műtéttípusok, illetve a tumorok lokalizációjának arányait aránybecsléssel vizsgáltuk. Statisztikai számításaink során minden alkalommal 5%-os szignifikancia szintet alkalmaztunk.

A DE KK Idegsebészeti Klinikán 2002 és 2012 között a vizsgálati feltételeknek megfelelő 104 glioblasztomásos beteg terápiafüggő túlélési adatainak elemzéséhez felhasznált klinikai paramétereket a 18. táblázat tartalmazza.

Megfigyeléseink szerint az átlagéletkorokban (BSC: $66,1 \pm 10,3$; pRT: $65,6 \pm 18,9$; RT: $63,7 \pm 8,5$; RT+TMZ: $51,8 \pm 13,5$; RT+TMZ+ BC: $55,2 \pm 9,6$) szignifikáns eltérés nem volt. Az egyes csoportokban megvizsgáltuk a betegek nemi összetételét is, mely egyedül a pRT csoportban mutatta a férfiak többségét, egyébként a többi csoport között jelentős különbség nem igazolódott. A tumor oldaliságának tekintetében a csoportok nem különböznek egymástól szignifikánsan.

Kutatásunkban a RT+TMZ csoportba tartozó betegek esetében a preoperatív és posztoperatív Karnofsky érték 77,7 illetve 80,3 volt. Ehhez nagyon hasonló a változás az RT+TMZ+ BC csoportban: a preoperatív KPS 76,0-ról műtét után 81,0-ra emelkedett. A RT

csoportban a Karnofsky értékek 72,0 illetve 74,0. Itt is javulás volt megfigyelhető, habár a kiindulási érték is alacsonyabb volt az előző csoporthoz viszonyítva. A csak pRT-ban részesült betegeknél a Karnofsky érték nem változott, mind operáció előtt, mind utána 60,0 pontnak adódott, míg a BSC csoport esetében a preoperatív 70,0 pont 56,0-ra csökkent a terápiás beavatkozást követően. A preoperatív KPS esetén a pRT csoport értékei különböztek a RT+TMZ, illetve az RT+TMZ+BC csoport értékeitől, de más különbség nem volt igazolható. Ugyanakkor a BSC csoportban a posztoperatív KPS szignifikánsan kisebb volt a többi csoporthoz képest, a pRT csoportot leszámítva. A csak sugárterápiában részesülő betegek posztoperatív KPS értékei továbbá szignifikánsan különböztek a konkuráló kemo-irradiációs kezelésben részesülő betegek értékeitől.

Kezelés	Esetszám	Életkor (átlag, év)	Méret (cm)	Preop. KPS	Postop. KPS	Nem (%)	Oldal (%)	PFS (átlag, hó)	OS (átlag, hó)
BSC	15	66,1	5,2	70,0	56,0	f: 53	b: 70	1,4	3,7
Palliatív RT	9	65,6	5,1	60,0	60,0	f: 78	b: 56	1,1	4,2
RT	20	63,7	4,3	72,0	74,0	f: 45	b: 60	4,7	9,1
RT + TMZ	35	52,4	4,4	77,7	80,3	f: 64	b: 60	7,4	15,3
RT + TMZ + BC	25	55,2	4,3	76,0	81,0	f: 52	b: 56	11,8	22,9

18. táblázat. 104 glioblasztoma miatt operált beteg fontosabb klinikai paraméterei (BSC = best supportive care; RT = sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia BC kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén; KPS = Karnofsky Performance Scale pontértéke; PFS = progressziómentes túlélés; OS = teljes túlélés f = férfi; b = bal).

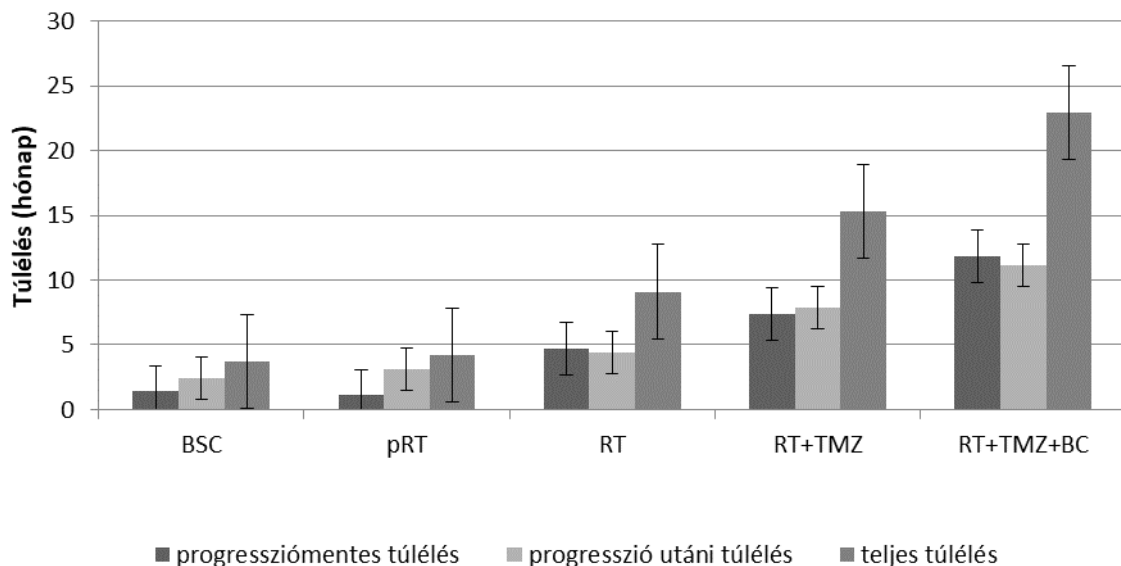
6.1.1. Progressziómentes és teljes túlélés

Terápiát követően megfigyeltük a betegek progressziómentes túlélését az egyes csoportokban. Progressziónak az MRI vizsgálat által igazolt 20 %-ot meghaladó volumen-növekedést, vagy új tumor megjelenését tekintettük. A BSC-ben részesült betegcsoportban az átlagos PFS $1,4 \pm 1,4$ hónapnak bizonyult. A pRT-t kapott betegekben az előzővel szemben rosszabb eredményt kaptunk: $1,1 \pm 0,4$ hónap. A sugárkezelést kapott betegek körében $4,7 \pm 4,7$ hónapnak adódott a PFS, míg a kombinált RT+TMZ-ban részesült betegek esetében: $7,4 \pm 5,5$ hónap. A RT+TMZ+BC csoportban a konkuráló kezelés utáni TMZ monoterápia utáni radiológiai progresszióig eltelt idő $11,8 \pm 8,5$ hónap volt. Ugyanebben a csoportban a

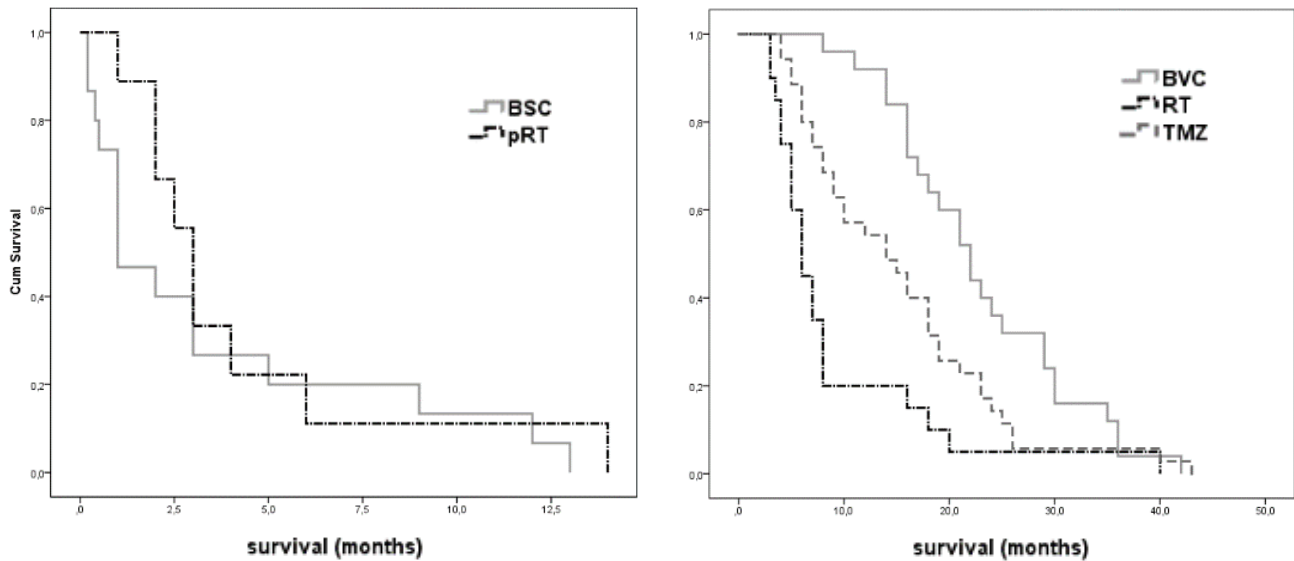
bevacizumab kezelés után megjelenő további progresszióig eltelt idő $8,5 \pm 5,4$ hónap volt (10. ábra).

A terápia hatékonyságát hivatott jelölni a progresszió utáni átlagos teljes túlélési idő is. A mi esetünkben a következő eredményeket kaptuk: BSC-ben részesült betegek esetében a progresszió utáni átlagos túlélés $2,4 \pm 3,7$ hónap, pRT esetében $3,1 \pm 3,9$, RT esetében $4,4 \pm 5,8$, míg a túlélés a kombinált RT+TMZ esetében $7,9 \pm 7,6$ hónap, RT+TMZ+BC csoportban a TMZ kezelés utáni progresszió utáni átlagos túlélés: $11,1 \pm 5,8$ hónap, viszont a bevacizumab kezelést követő progresszió utáni túlélés $2,6 \pm 2,6$ hónapnak bizonyult.

Az adatokból kitűnik, hogy a TMZ kezelés szignifikánsan növelte a PFS-t az RT-hez képest, amit a bevacizumab kezelés tovább emelt (PRT vs. RT+TMZ = 0,0098 illetve PRT+TMZ vs. RT+TMZ+BC = 0,0232). Ezzel szemben az is megállapítható, hogy a pRT-nak a tumorprogresszió szempontjából számottevő effektivitása nem bizonyítható (PBSC vs pRT = 0,7186). A diagnózist követő teljes átlagos túlélés a különböző csoportokban: BSC-ben részesült betegek esetében $3,7 \pm 4,3$, pRT-t kapott betegeknél $4,2 \pm 4,0$, RT-ban részesülteknél $9,1 \pm 8,7$, míg RT+TMZ terápia esetén $15,3 \pm 9,5$ hónap, ill. RT+TMZ+BC csoportban $23,0 \pm 8,6$ hónap.



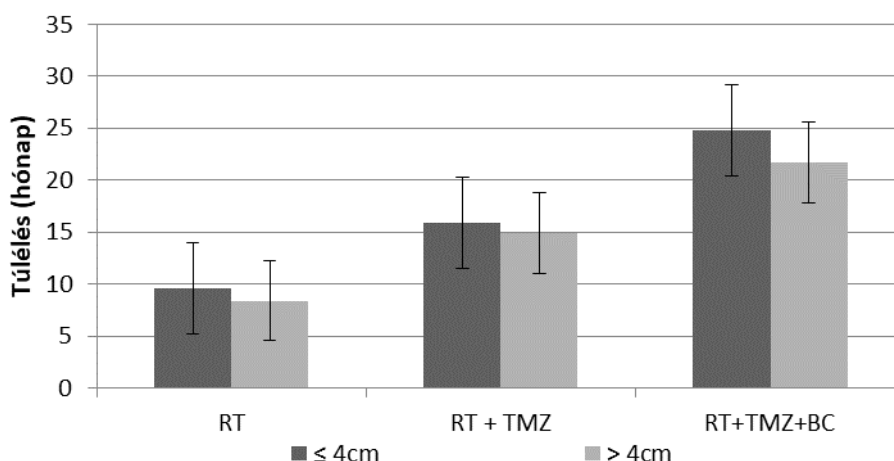
10.a. ábra. Különböző módon kezelt glioblasztomás betegek túlélése (BSC = best supportive care; RT = sugárterápia; pRT = palliatív sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)



10.b. ábra. Különböző módon kezelt glioblasztomás betegek kumulatív túlélése Kaplan-Meier analízissel (BSC = best supportive care; RT = sugárterápia; pRT = palliatív sugárterápia; TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; BVC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)

6.1.2. Tumorméret

Az átlagos túlélést vizsgálva a felfedezéskor mért tumorméret függvényében a következő eredményekre jutottunk. 4 cm alatti tumor esetében a RT-ban részesült betegek átlagos túlélése $9,6 \pm 10,6$ hónap, míg az ugyanilyen méretű, de kombinált, RT+TMZ-ban részesült betegek esetében $15,9 \pm 9,1$ hónap, a RT+TMZ+BC csoportban $24,8 \pm 7,6$ hónap. A 4 cm feletti tumorok esetében a számok a következőképpen alakulnak: csak RT-ban részesült betegeknél $8,4 \pm 5,6$ hónap, RT+TMZ kezelés esetén $14,9 \pm 9,7$ hónap, míg RT+TMZ+BC csoportban $21,7 \pm 9,3$ hónap. Az adatokból egyértelműen kitűnik, hogy sem a csak RT-t kapott betegek esetében, sem kemoterápiával kombinált kezelés esetében sem volt a tumorméret statisztikailag igazolható befolyással a túlélésre (PRT = 0,7824, PRT+TMZ = 0,5593, PRT+TMZ+BC = 0,3949) (11. ábra).



11. ábra. Túlélés a tumorméret és a kezelés függvényében glioblasztomás betegekben. (RT = sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)

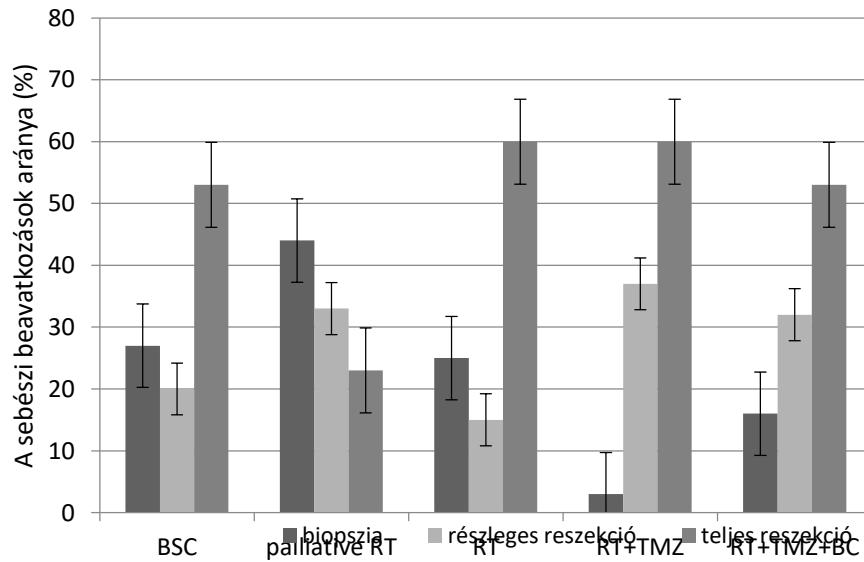
A tumorok átlagos átmérője a különböző csoportokban: 5,2 cm (BSC), 5,1 cm (pRT), $4,3 \pm 1,5$ cm (RT), $4,4 \pm 0,9$ cm (RT+TMZ) és $4,6 \pm 1,1$ cm (RT+TMZ+BC) csoportban. Ezek alapján látható, hogy a különböző posztoperatív kezelésben részesülő betegek tumormérete között szignifikáns eltérés nem igazolódott.

6.1.3. Műtéti típus

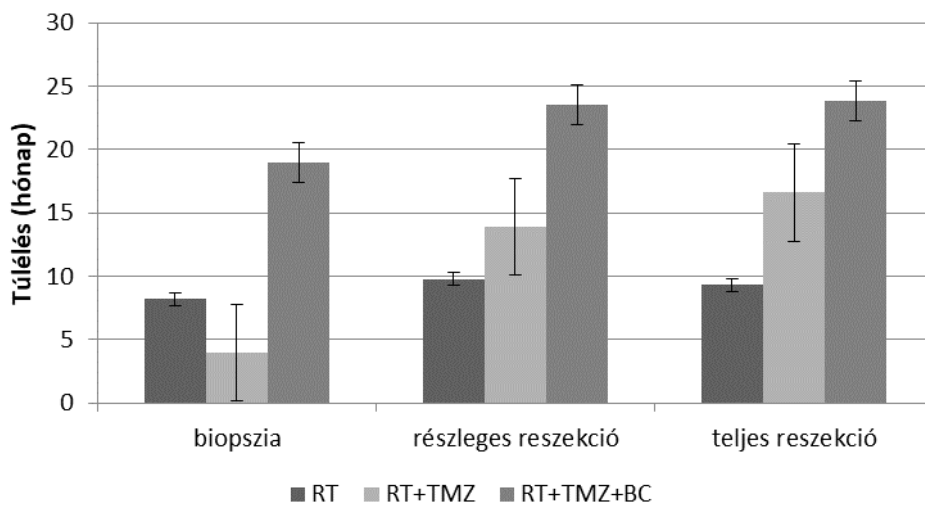
Megállapítható, hogy a biopszia aránya az RT+TMZ csoportban szignifikánsan kisebb volt, mint a BSC csoportban ($p=0,0394$), a pRT csoportban ($p=0,0042$) és a teljes dózisú RT csoportban ($p=0,0394$), ugyanakkor a különbség nem szignifikáns a bevacizumabbal kezelt csoporthoz képest ($p=0,18$). A RT, RT+TMZ, RT+TMZ+BC csoportokban a radikális és parciális tumorresekciós műtétek aránya közel azonos volt (PRT vs. RT+TMZ = 0,2668, PRT vs. RT+TMZ+BC = 0,2668, PRT+TMZ vs. RT+TMZ+BC = 0,7246) (12. ábra).

A túlélést a műtéti típus szerint osztályozva azt az eredményt kaptuk, hogy a biopsziás műtét esetén, ahol csak RT történt, az átlagos túlélés $8,2 \pm 5,7$ hónap, míg kombinált kezelés esetében csak $4,0 \pm 0,8$ hónap (13. ábra). Parciális műtét és RT esetében a túlélés átlagosan $9,8 \pm 8,9$ hónap, míg kombinált kezelésnél $15,2 \pm 11,6$ hónap (PRT vs. RT+TMZ = 0,4768). Radikális eltávolítás esetében kaptuk a leghosszabb túlélési időt. Radikális eltávolítás esetében RT-val kombinálva az átlagos túlélési idő $9,3 \pm 10,3$ hónap, míg kombinált RT+TMZ csoportban az átlagos túlélés $18,3 \pm 15,6$ hónap (PRT vs RT+TMZ = 0,0841). Az RT+TMZ+BC csoportnál a

parciális műtéti típus teljes túlélése $23,5 \pm 11,1$, míg a radikális csoport esetében $23,8 \pm 5,9$ hónap volt (Ppart. RT+TMZ+BC vs. rad. RT+TMZ+BC = 0,9262).



12. ábra. A műtét típusának megoszlása a különböző posztoperatív kezelés szerint (BSC = best supportive care; RT = sugárterápia; pRT = palliatív sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)



13. ábra. Túlélés a műtéti típus és a kezelés függvényében glioblasztomás betegekben. (RT = sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)

A DE KK Idegsebészeti Klinikán 2002 és 2012 között operált 104 primer glioblasztomás beteg kórlefolását elemeztük a különböző kezelési metódusok hatékonyságának és a klinikai paraméterek prognosztikai szerepének megítélésére. A klinikai paraméterekkel kapcsolatos megfigyeléseink alapján elmondhatjuk, hogy a jó preoperatív Karnofsky pontszámú, jó általános állapotú betegek esetében a beteg neme, kora, a daganat oldalisága, mérete és lokalizációja önálló prognosztikai faktor szerepét igazolni nem tudtuk. A műtét radikalitása a konkuráló kemo-irradiációban részesült betegek (RT+TMZ) csoportjában kedvezően befolyásolta a teljes túlélést, de a többi csoportban nem igazolódott statisztikai összefüggés a műtét típusa és a túlélés között. Mivel a posztoperatív kezelést a KPS pontszám és a neurológiai status egyértelműen befolyásolja, megállapítható, hogy a jó posztoperatív státusz megőrzése a túlélés szempontjából nagyobb jelentőségű, mint a műtéti reszekció kiterjedtsége. Ezért a korábbi ajánlásokkal ellentétben a magas műtéti rizikót jelentő tumorlokalizáció esetében csak biztonságosan elvégezhető mértékű parciális reszekció javasolható.

Kiemelendő, hogy a vizsgált betegpopulációban sem a csak radioterápiát kapott betegek esetében, sem a kemoterápiával kombinált kezelés esetében a tumorméret önmagában nem volt statisztikailag igazolható befolyással a túlélésre. Eredményeink azt támasztják alá, hogy a daganatellenes kezelést képviselő irradiáció, ill. kemoterápia a tumormérettől függetlenül fejt ki hatását. Ugyanezt az eredményt kapták Back MF és mtsai is. Általánosan elfogadott irodalmi adat azonban, hogy idős korban viszont (átlag 73 +/- 5 év) a 4 cm-nél nagyobb tumor méret a rossz prognosztikai tényezők közé tartozik, amelyek szignifikánsan csökkentik az átlagos túlélési időt. Ehhez hasonlóan, Donato V. és mtsai szerint a glioblasztomás betegek túlélésének kimenetelét több egymástól független tényező együttesen, összetett módon határozza meg, melyek közül a 4 cm-nél nagyobb tumor méret rossz prognosztikai markernek számít.

A különböző kezelési metódusok effektivitásával kapcsolatban saját tapasztalataink szerint a palliatív sugárkezelésnek a progressziómentes túlélést szignifikánsan befolyásoló hatása nem igazolható, sőt, a tüneti terápiához képest a teljes túlélést is csak kis mértékben hosszabbította meg. Mivel a pRT által nyújtott túlélésbeli hatás nagyrészt a progresszió utáni rossz neurológiai állapotra vonatkozik, effektivitása és indikációja erősen kétséges.

A teljes sugárkezelést kapott betegek (RT) túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a BSC-hez és a pRT-hoz képest, mint ahogy a RT+TMZ-ban részesülő betegek teljes túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a csak sugárkezelésben részesülő betegekéhez képest. A konkuráló kemo-irradiációs kezelést követő bevacizumab

monoterápiában részesülő betegek túlélése szintén szignifikánsan hosszabb volt az összes többi csoporthoz képest, de ha közelebbről megvizsgáljuk a konkuráló kezelésben részesült betegek adataihoz képest elért eredményeket, a különbség már nem lesz statisztikailag definitív. Ugyanis a RT+TMZ és a RT+TMZ+BC csoport betegeinek a progresszióig eltelt ideje 8,4 hónap *versus* 11,8 hónap, melyek között a fennálló 3,4 hónap különbség a két csoport OS-e közötti 6,9 hónapot 3,5 hónapra csökkenti. Ez a különbség a két terápia között azonban nem bizonyul szignifikánsnak. A két csoport progresszióig eltelt idejében észlelt jelentős különbség magyarázata valószínűleg abban rejlik, hogy bevacizumab kezelésben csak a jó neurológiai állapotú, és progresszió ellenére legalább KPS 70 ponttal rendelkező betegek részesülhetnek, ami tulajdonképpen egy előzetes szelekciót eredményez a lassúbb lefolyású, kemoterápiára jobban reagáló betegek javára. Összességében tehát annak ellenére, hogy a bevacizumab kezelésben részesült csoport esetében az OS egyértelműen hosszabb, mint a bevacizumab kezelést nem kapott betegek esetében, a különbséget statisztikailag igazolni nem lehetett.

6.2. Azonos bázisterápiában részesülő betegek túlélési adatainak elemzése

Az általunk vizsgált glioblasztomás betegek közül összesen 60 beteg részesült a műtéti ellátást követően konkuráló kemo-irradiációs kezelésben. Minden beteg posztoperatív Karnofsky pontja legalább 70 volt, minden beteg 60 Gy FBRT-ben részesült és minden betegnél addig folytattuk a TMZ kezelést, amíg vagy a neurológiai állapota vagy a koponya MRI nem mutatott egyértelmű rosszabbodást. Elmondhatjuk tehát, hogy a „bázisterápia” minden beteg esetében azonos volt, az OS mégis igen nagy szórást mutatott (min. 4, max. 43 hónap). Ennek az igen nagy eltérésnek a magyarázatát keresve a betegeket két csoportra osztottuk: az első csoportba tartoztak azok, akiknek a túlélése 16 hónapnál rövidebb volt (átlag: 10,2±4,2 hónap). A második csoportba a 16 hónapnál hosszabban túlélő betegeket soroltuk (átlag: 25,7±7,4). E két csoport paramétereinek összehasonlításával próbáltunk a nagyfokú eltérésre klinikai szempontból magyarázatot találni és egyben klinikai prognosztikai faktort meghatározni. A 16 hónapos átlagos túlélési határvonalat a jelenlegi bázis-terápiának minősülő standard konkuráló kemo-irradiációban részesült betegek irodalmi adatok szerinti átlagos túlélési időtartama adta. A két csoport klinikai adatait a 19. táblázat tartalmazza.

	Eset- szám	Bevacizumab kezelésben részesült betegek	Reoperált betegek	OS (hónap)	PFS (hónap)	Nem (F/N)	Életkor (év)	Oldal (J/B)	Preop. KPS	Postop. KPS	Tumor- méret (cm)
1. csop.	28	7	7	10,2 ±4,2	4,5 ±2,3	15/1 3	52,0 ±13,2	16/12	75,4 ±19,3	77,5 ±8,0	4,3 ±1,0
2. csop.	32	18	15	25,7 ±7,4	13,4 ±7,5	19/1 3	54,3 ±11,0	11/21	78,4 ±13,5	78,4 ±10,3	4,1 ±1,1

A tumor lokalizációja	frontális	temporális	parietális	occipitális	többlebenyi
1. csop.	11	3	4	1	9
2. csop.	8	11	5	2	6

A sebészi beavatkozás típusa	biopszia	részleges eltávolítás	teljes eltávolítás
1. csop.	4	10	14
2. csop.	1	11	20

19. táblázat. A különböző átlagos túlélést mutató csoportok klinikai paramétereit. OS= teljes túlélés, PFS = progressziómentes túlélés, F=férfi, N=nő, J=jobb, B=bal, KPS=Karnofsky Performance Score

6.3. Összefoglalás

A két csoport összehasonlításánál megállapítható, hogy a nemek aránya, a betegek kora, a tumor oldalisága, mérete, lokalizációja, a preoperatív és posztoperatív KPS nem különbözött jelentősen. A makroszkóposan teljes műtéti tumoreltávolítás aránya valamivel magasabb volt a hosszabb túlélést mutató csoportban, mint a hamarabb elhalálozottak között (62,5 % *versus* 50,0 %), de a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,4754$). Egyértelműen szignifikáns különbség csak a szelekciós paraméterként meghatározott túlélési időtartamokban mutatkozott (PFS $4,53 \pm 5,29$ hónap *versus* $13,37 \pm 7,51$ hónap, $p < 0,0001$, OS $10,21 \pm 4,19$ *versus* $25,68 \pm 7,39$, $p < 0,0001$), ami a két csoportot elválasztó paraméter megfelelő szelekciós erősségét igazolta.

A túlélések elemzésénél megállapítható, hogy az azonos kiinduló neurológiai státusz mellett azonos bázisterápiában részesülő, mégis igen nagy PFS és OS különbséget mutató

csoporthoz klinikai paramétereinek elemzésénél a két csoport között statisztikailag szignifikánsnak mondható különbség egyetlen klinikai paraméter esetében sem igazolódott. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy eredményeink azt bizonyítják, hogy az azonos neurológiai státuszú és azonos bázisterápiában részesült betegek túlélését nem a vizsgált klinikai paraméterek, hanem a daganat sugár- és kemoszenzitivitása határozza meg.

7. AZ1p19q KODELÉCIÓ

7.1. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagban: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliómákban és oligoasztrocitómákban

A Debreceni Egyetemen 2006-tól érhető el az 1p19q kodeláció rutinszerű vizsgálata, mely klinikai jelentőségének megítéléséhez minimálisan szükséges 2,5 év átlagos követési idő adatait elemeztük 2006 és 2008 között összesen 28, klinikánkon kezelt oligodendroglioma komponensű tumoros beteg esetében. Vizsgáltuk a kodeláció és a PFS összefüggését a terápia függvényében, majd eredményeinket összehasonlítottuk a nemzetközi irodalomban található adatokkal. Ezek mellett számos további klinikai paraméter és az 1p19q státusz összefüggéseit elemezve kerestünk klinikai relevanciájú következtetéseket.

A betegek klinikai adatait az 20. táblázat tartalmazza. 2006 és 2008 között összesen 28, a DE KK Idegsebészeti Klinikán operált beteg esetében történt a műtét után rutinszerű 1p/19q-kodeláció meghatározás. 9 II-es grádusú oligoasztrocitómás, 10 II-es grádusú oligodendrogliómás, 3 III-as grádusú oligoasztrocitómás és 6 III-as grádusú oligodendrogliómás beteg klinikai adatait vetettük össze a genetikai vizsgálat eredményével.

Szövegtan	Átlagéletkor	46±14	Posztoperatív kezelés	Lokalizáció			
oligoasztrocitoma	12	grade II.	44±13	BCNU	2	grade II.	
grade II.	9	oligoasztrocitoma	35±80	PCV	7	bal	11
grade III.	3	oligodendroglioma	51±13	sugárterápia	3	jobb	7
oligodendroglioma	16	grade III.	51±17	radio- és kemot.	8	kétoldali	1
grade II.	10	oligoasztrocitoma	56±90	nem történt	8	grade III.	
grade III.	6	oligodendroglioma	47±21			bal	2
						jobb	7
Nem	Műtéttípus	1p19q kodeláció					
férfi	14	totális reszekció	15	pozitív	14		
nő	14	parciális reszekció	7	negatív	14		
		biopszia	6				

20. táblázat. 28 oligodendroglioma komponensű tumoros beteg klinikai adata

Vizsgáltuk a daganat grádusa, a betegek neme, életkora, a műtét típusa, a tumor lokalizációja (féltekék, illetve lebenyek szerinti elhelyezkedés), valamint a szövettani típus és a tumor 1p/19q-kodeláció közötti összefüggéseket. Emellett tanulmányoztuk az 1p/19q-kodeláció recidívamentes túlélésre vonatkozó prognosztikai szerepét a különböző grádusú tumorok, illetve a különböző posztoperatív onkoterápiában részesült betegek vonatkozásában.

Az összehasonlítható számcsoportok eloszlását a Shapiro-Wilk-teszttel vizsgáltuk. Normál eloszlás esetén a szignifikáns különbségek meghatározásához a páros, illetve páratlan T-próbát, ellenkező esetben a Mann-Whitney-tesztet, illetve a Wilcoxon-tesztet használtuk. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

7.2. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagban: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliomákban

II-es grádusú, oligodendroglioma komponensű gliomákban 1,4-szer gyakrabban fordult elő 1p/19q-kodeláció, mint annak hiánya, míg a III-as grádusú gliomák között kétszer több 1p/19q-kodelációra nézve negatív esetet találtunk, mint pozitívat.

A daganat grádusa és 1p/19q-kodelációs státusza között nem tapasztaltunk szignifikáns korrelációt, de az alacsonyabb grádusú gliomákban számszerűen gyakrabban fordult elő a jobb prognózist jelentő 1p/19q-kodeláció, mint a magasabb grádusúakban.

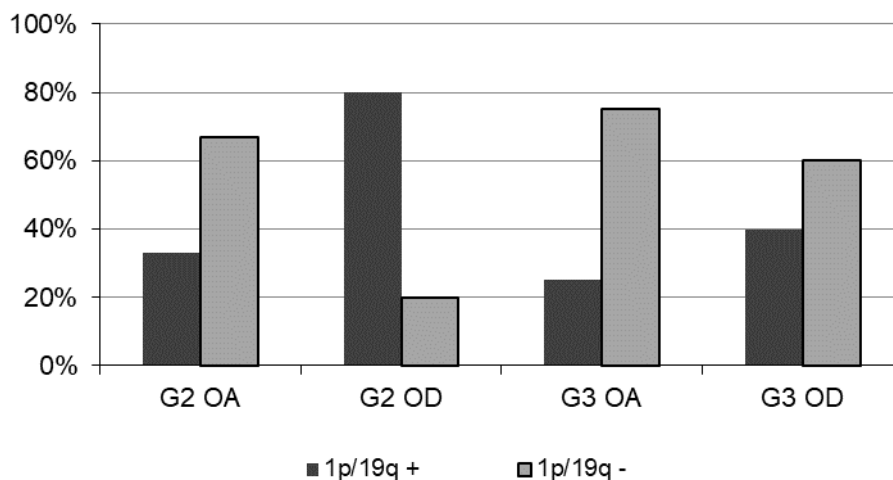
Az általunk vizsgált betegek esetében nem tapasztaltunk összefüggést a nem és az 1p/19q-kodeláció előfordulási gyakorisága között, amely 50%-osnak adódott mind a férfiak, mind a nők körében.

II-es grádusú tumorok esetében a betegek életkora és az 1p/19q-státusz között összefüggés nem igazolódott. III-as grádusú tumorokban az életkor előrehaladtával egyre ritkábban fordult elő 1p/19q-kodeláció. A kodelációval bíró betegek átlagéletkora szignifikánsan alacsonyabb az azzal nem rendelkezőkéhez képest (39 versus 56 év, $p = 0,043$).

A daganatok reszekábilítását a műtét típuson keresztül vizsgáltuk. II-es grádusú daganatok esetében az 1p/19q-kodeláció előfordulása egyértelmű összefüggést mutatott a daganatok reszekábilításával. A III-as grádusú tumorok esetében a kiterjedt, csak parciálisan reszekálható gliomák közül egyben sem volt kimutatható 1p/19q kodeláció.

A lebenyek szerinti tumorlokalizáció vonatkozásában az 1p/19q-kodelécióra nézve messzemenő összefüggés nem állapítható meg.

A II-es grádusú oligoasztrocitómákban kétszer ritkábban tapasztaltuk az 1p/19q-kodeléciót, mint annak jelenlétét a daganatsejtekben. II-es grádusú oligodendrogliomáknál négyszer gyakrabban fordult elő a kodeléció, mint annak hiánya. III-as grádusú oligoasztrocitomáknál szintén a kodeléció hiánya volt gyakoribb, míg oligodendrogliomáknál nem találtunk jelentős különbséget. Tehát az 1p/19-kodeléció gyakrabban fordul elő oligodendrogliomákban, mint oligoasztrocitómákban (14. ábra).

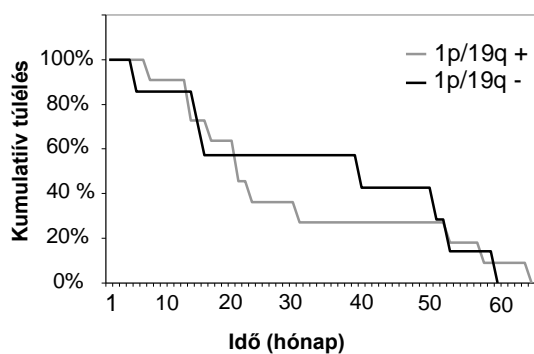


14. ábra. 1p/19q-kodeléció százalékos előfordulása a daganatok szövettani típusának és grádusának függvényében. 1p/19q+ = kodeléció igazolható, 1p/19q- = kodeléció nem igazolható, G = grade, OA = oligoasztrocitoma, OD = oligodendroglioma.

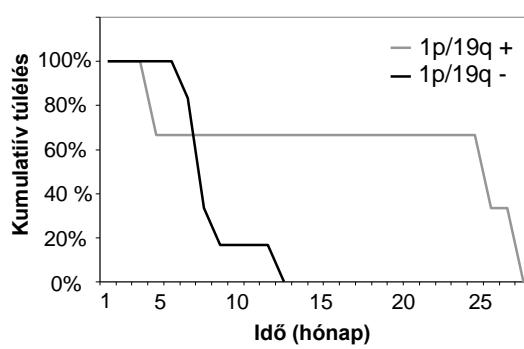
A progressziómentes túlélés és az 1p/19q státusz kapcsolata a grádus, a szövettan, illetve az alkalmazott sebészi és posztoperatív onkoterápia függvényében

II-es grádusú daganatok esetében az 1p/19q-státusz és a PFS között összefüggés nem volt igazolható (15.a. ábra). III-as grádus esetén az 1p/19q-kodeléciós betegek PFS-e jelentősen hosszabbnak bizonyult az azzal nem rendelkezőkéhez képest (25,0 versus 6,8 hónap, $p = 0,009$; 15.b. ábra), azaz az 1p/19q-kodeléció előfordulása a PFS-sel III-as grádusú gliomák esetében pozitív összefüggést mutatott.

II-es grádus esetén a műtét radikalitása statisztikailag nem befolyásolta jelentősen a recidívamentes túlélést, a totális reszekcióval kezelt III-as grádusú tumorok esetében azonban 1p/19q-kodeléció esetében a recidívamentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt a kodelécióval nem rendelkező esetekéhez képest (25 versus 7,6 hónap, $p = 0,0028$) (16. ábra).

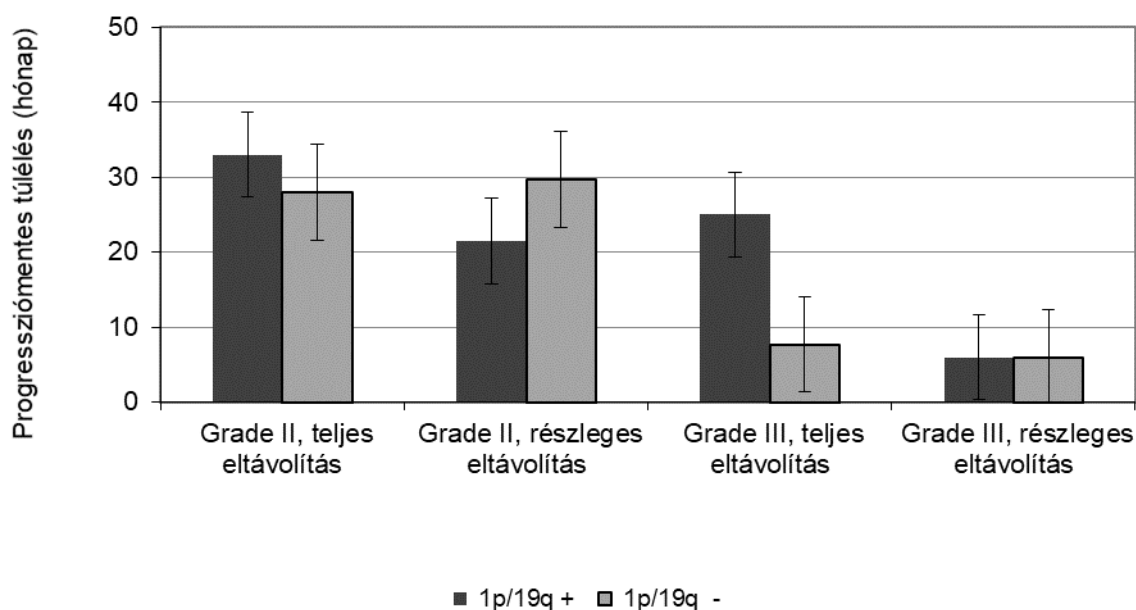


15.a. ábra



15.b. ábra

15. ábra. Progressziómentes túlélés Gr. II-es (15.a.) és Gr. III-as (15.b.) oligoasztrocitómák és oligodendrogliómák esetén. 1p/19q+ = kodelécio igazolható; 1p/19q- = kodelécio nem igazolható. 15.a. ábra: II-es grádusú daganatok esetén, 15.b. ábra: III-as grádusú daganatok esetén.



16. ábra. Különböző 1p/19q-kodelécio státuszú oligoasztrocitómás és oligodendrogliómás betegek progressziómentes túlélése a műtéti típus és a grádus függvényében. 1p/19q+ : kodelécio igazolható; 1p/19q- : kodelécio nem igazolható.

Terápia

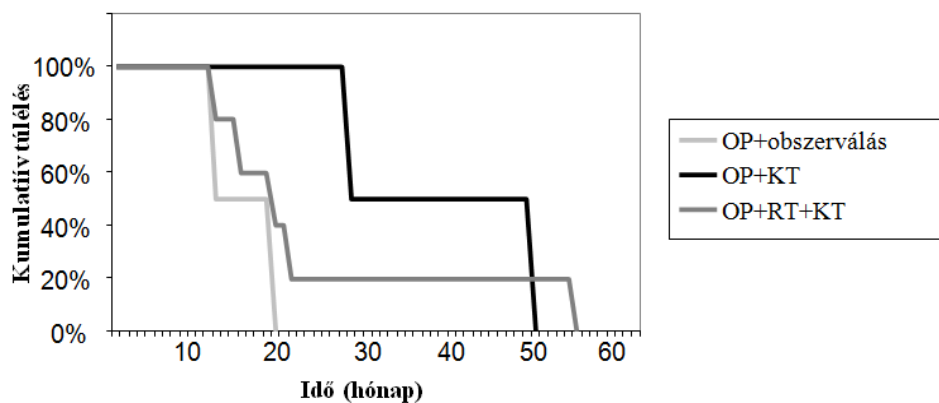
Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy az 1p/19q-kodelécio jelenléte a daganatban befolyásolja-e – és ha igen, hogyan – a sebészi, illetve komplex daganatellenes terápiában részesült betegek PFS-ét? A kezelés szempontjából a betegeket a következő csoportokba

lehetett osztani (mind II-es, mind III-as grádusú daganatok esetén): műtét; műtét és sugárterápia; műtét és kemoterápia; műtét és komplex kezelés (sugárterápia + kemoterápia). A terápiára vonatkozó konzekvenciákat túlélési görbék alapján vontuk le.

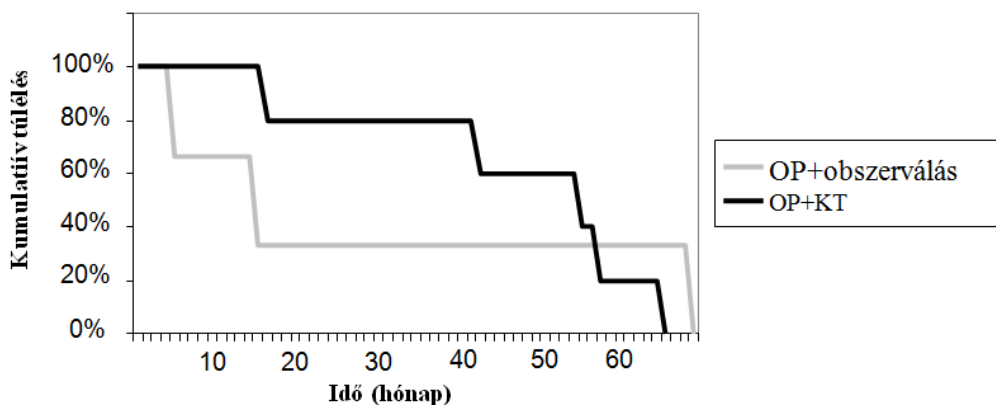
A II-es grádusú, pozitív 1p/19q-kodelációs státuszú oligoasztrocitomás, illetve oligodendrogliomás betegek közül azon betegcsoport túlélése, amelynek tagjai nem kaptak további kezelést a műtét után, lényegesen rövidebb volt a másik két csoportéhoz képest, tehát a posztoperatív onkoterápia jelentősen meghosszabbította a PFS-t. A csak kemoterápiával kezelt PFS-e nem tért el számottevően a komplex módon kezeltétől (17. ábra).

A II-es grádusú, negatív 1p/19q-kodelációs státuszú oligoasztrocitomás, illetve oligodendrogliomás betegek 37,5 %-a nem részesült a műtét után további kezelésben, 62,5 %-a viszont posztoperatív kemoterápiát kapott. A két csoport PFS-ének maximumában nem volt jelentős különbség, de a posztoperatív kezelésben nem részesülő betegek túlélési görbéjének meredeksége nagyobb (túlélési átlaga kisebb) volt (18. ábra).

A III-as grádusú tumorok esetében jóllehet a kombinált kezelés előnyei egyértelműen megmutatkoztak, az alacsony esetszámok miatt definitív összefüggések nem voltak megállapíthatók.



17. ábra. Recidívamentes túlélés II-es grádusú, 1p/19q kodeláció pozitív oligoasztrocitómák és oligodendrogliómák esetén a terápia függvényében. OP = műtét; KT = kemoterápia; RT= radioterápia.



18. ábra. Recidívamentes túlélés II-es grádusú, 1p/19q kodeléción negatív oligo-asztrocitómák és oligodendrogliómák esetén a terápia függvényében. OP = műtét; KT = kemoterápia.

7.3. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagban: az 1 p19q kodeléción klinikai relevanciája oligodendrogliómákban és oligoasztrocitómákban

Az oligodendroglioma a harmadik leggyakoribb gliális eredetű tumor, a gliomák 5-20%-át alkotják. Európában az éves incidencia 0,2 eset 100.000 lakosra. Megkülönböztetünk kizárólag oligodendrogliális komponensű daganatokat (oligodendro-glioma), illetve asztrociter elemeket is tartalmazó tumorokat (oligoasztrocitoma). Az oligodendrogliómák prognózisa kedvezőbb, mint az asztrocita komponens is tartalmazó daganatoké. Az oligodendrogliómák a WHO klasszifikáció alapján *low grade* (II. grádus) és *high grade* (III. grádus) csoportokra oszthatók szövettani tulajdonságaik alapján. Mivel a gliomák jelentős része kevert tumor (oligo-asztrocitoma), ezért az asztrocitómák neuro-onkológiai kezelésének megtervezéséhez az oligodendroglioma-komponens prognózist befolyásoló szerepének ismerete feltétlenül szükséges. Irodalmi adatok szerint a DNS replikációt gátló onkoterápia hatékonyságát csökkentő repair-mechanizmusok enzimeit kódoló géneket érintő kromoszóma rendellenességek hozhatók leginkább összefüggésbe a prognózissal. A leggyakrabban észlelt kromoszómális rendellenesség oligodendrogliómákban az 1p, illetve a 19q lókuszon elvesztése. Az oligodendrogliómák 75%-ában kimutatható vagy az 1p, vagy a 19q deléción, míg az együttes deléción (kodeléción) az esetek 60-70%-ában van jelen. A II. grádusú tumorok kb. 80-90%-ban kimutatható az 1p/19q kodeléción, amit a kiegyensúlyozatlan transzlokáció [t(1;19)(q10;p10)] okoz. Ehhez az eltéréshez mind II-es, mind III-as grádus esetén jobb kemoterápiás válaszreakció és hosszabb PFS társul. A jelenség hátterében egyrészt a sejtek

eltérő osztódási és apoptotikus képessége állhat, illetve több tanulmány szerint az 1p/19q-kodeláció jelenléte alacsony grádusú gliomákban a tumor alkilálószerre való érzékenységének jelzője. Egyes felmérések alapján a kodeláció jelenléte a frontálisan daganatokban gyakrabban észlelhető, mint a temporalis lebenyben elhelyezkedő tumorok esetén. A gyermekkori oligodendrogliomákban – főleg az első évtizedben – az 1p/19q kodeláció ritkábban fordul elő.

Jelen tanulmányunkban az eddig elvégzett vizsgálatokkal kapcsolatos klinikai tapasztalatokat gyűjtöttük össze. 2006. és 2008. között a DE KK Idegsebészeti Klinikán 28 oligodendroglioma komponenssel rendelkező gliomás beteg esetében történt 1p/19q-kodeláció-analízis, melynek eredményeit klinikai adatokkal vetettük össze. Emellett a különböző kezelési protokollokban részesült betegek adatainak elemzésével az 1p/19q-kodelációnak a kemoterápiára érzékeny („responder”) betegcsoport meghatározásában betöltött prognosztikai alkalmazhatóságát teszteltük. Eredményeink alapján az oligodendroglioma komponensű gliomák vonatkozásában az alább részletezett következtetésekre jutottunk.

III-as grádusú daganatokban a kor előrehaladtával csökkent a kemoterápiára érzékeny, jobb prognózisú betegek aránya, ami az idősebb korban jelentkező tumorok agresszívebb jellege mellett szól.

Az 1p/19q-kodeláció a reszekábilítással pozitív korrelációt mutatott. Bár II-es grádusú daganatok esetében a műtét radikalitása nem befolyásolta jelentősen a recidívamentes túlélést, a III-as grádusú tumorok esetében azonban 1p/19q-kodeláció jelenlétében a recidívamentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt a teljesen reszekálható tumorok esetében a parciális tumoreltávolításhoz képest.

Az 1p/19q kodeláció előfordulási gyakorisága gliomákban asztrocita komponens esetén kisebb, mint oligodendrogliomákban. Ez a megfigyelés egybecseng az asztrocitómák kisebb kemoszenzitivitásával, így kevert komponensű daganatok esetén a sugárkezelés indikációja – különösen 1p/19q kodeláció nélküli esetekben – megerősíthető.

A recidívamentes túlélést befolyásolta a tumor lokalizációja: a szubdomináns féltekében valószínűleg nagyobb arányban lehetett teljes reszekciót végezni.

1p/19q-kodeláció kemoterápiára való érzékenységet prognosztizáló szerepe II-es grádusú eseteket tekintve saját beteganyagban is bizonyítható volt.

Végül, eredményeink alapján az 1p/19q státusznak a kemoterápiára való érzékenységet jellemző szerepét tekintve az oligodendroglioma komponensű tumorok esetében az onkoterápia megválasztásában betöltött prediktív funkciója megerősítést nyert.

8. A FOLYADÉK BIOPSZIA KUTATÁSI PERSPEKTÍVÁI

A glioblasztoma egy primer központi idegrendszeri malignus daganat, melyet igen rövid túlélési idő jellemez. A kezelési lehetőségek szűkösek, és a betegség rendkívül heterogén jellege ellenére a klinikusok nem rendelkeznek elég prognosztikai és prediktív markerekkel az eltérő kimenetelű betegek jellemzésére. Immunhisztokémiai, FISH vagy PCR módszerekkel jól leírható molekuláris markerek igazolhatók, mint az IDH1 / 2 mutációk, az EGFRvIII mutáció, a VEGF overexpresszió vagy az MGMT promoter metilációs státusz, azonban ezek klinikai hasznossága és pontossága korlátozott, ezért a pontos meghatározáshoz még mindig szükségünk van szövetmintákra a tumorból.

A folyadék biopszia jelenleg a diagnosztika és a betegek követésének egy fejlődő területe a tumoros betegségek különböző típusaiban. A keringő nukleinsav fragmentumokat különféle formákban gyűjtik össze különböző testnedvekből, beleértve a szérumot, vizeletet vagy cerebrospinalis folyadékot, az említett markerek minőségének és mennyiségének mérése céljából. Számptalan nukleinsav típus elemezhető folyadék biopszia alkalmazásával. A keringő szabad DNS-t, a mitokondriális DNS-t vagy a stabilabb hosszú és kis nem kódoló RNS-eket, cirkulációs RNS-eket vagy mikroRNS-eket új PCR és új generációs szekvenáláson alapuló módszerekkel lehet azonosítani és mérni.

E markerek felhasználhatók a korábban leírt eltérések azonosítására minimálisan invazív módszerrel. Ezekkel a markerekkel rossz vagy jobb prognózisú betegeket lehet megkülönböztetni, vagy azonosítani azokat a betegeket, akik nem reagálnak a kezelésre. A folyadék biopszia felhasználható recidíva kimutatására, gyakran korábban, mint az képalkotó vizsgálattal láthatóvá válna.

A folyadék biopszia gyorsan fejlődő terület, és a daganatok más típusaihoz hasonlóan a daganatból származó keringő nukleinsavak biológiai folyadékmintákból történő mérése differenciáldiagnosztika és követés jövője lehet glioblasztoma esetén.

8.1. Glioblastoma – háttér

A glioblastoma (GBM) egy pusztító primer központi idegrendszeri malignus daganat. A betegség leküzdése kihívást jelent mind a betegek, mind az egészségügyi ellátórendszer számára. A túlélés nagyon rövid és a kezelési lehetőségek korlátozottak. A GBM a központi idegrendszer diffúzan növekvő gliomáihoz tartozik, pontosabban a glia, leggyakrabban asztrocita vagy oligodendroglia eredetű daganatok heterogén csoportjához. A betegségek ezen spektrumát növekedési mintázatuk jellemzi, nevezetesen az, hogy a daganatsejtek agresszív módon beszűrik a szomszédos agyi parenchymát, ami kiterjedt peritumorális infiltrációt eredményez. A behatoló sejtek elhagyják a centrális tumorrészt és viszonylag nagy távolságot is megtehetnek az agyban, ami a műtéti reszekció sikerét korlátozza, majd később ezek a sejtek a tumor kiújulásának forrásává válnak. Annak ellenére, hogy a közelmúlt eredményei – például a molekuláris alcsoportok igazolása, a gyakori mutációk jellemzése, a megnövekedett invazivitáshoz vezető jelátviteli utak feltérképezése, a glioma inváziójához hozzájáruló molekulák azonosítása – nyomán egyre jobban értjük a betegség természetét, egyelőre nem látható lényeges fejlődés a kezelést és a betegség esetleges kimeneteleinek javítását illetően. A GBM-et kiterjedt intratumorális heterogenitás jellemzi, ami tovább gátolja a hatékony kezelést. Ezenkívül a látszólag hasonló klinikai vagy hisztopatológiai jellemzőkkel rendelkező betegek válaszreakciói is rendkívül eltérőek ugyanarra a kezelési módra, és gyakran nagyon eltérő a túlélésük. Ennél is fontosabb, hogy jelenleg nincs mód azon betegek azonosítására, akik reagálnak a konvencionális kezelésre, illetve akiknél a daganat agresszívabb formája van jelen. A mai napig csak néhány klinikai tényezőt sikerült azonosítani, melyek mutatnak némi összefüggést a várható kimenetellel, és azon molekuláris markerek száma rendkívül korlátozott, melyek a glioblastoma prognosztikai vagy prediktív markereként használhatók.

8.2. Molekuláris markerek glioblastomában

Az IDH mutációkat, az MGMT promoter metilációját, az EGFR amplifikációját / mutációit, a VEGF fokozott expresszióját korábban már összefüggésbe hozták a betegség kimenetelével vagy a kezelés hatékonyságával.

Az IDH1 / 2 mutációk immár a diagnosztikai rutin részét képezik, és nemcsak diagnosztikai, hanem prognosztikai jelentőséggel is bírnak, mivel az IDH mutáns glioblastomák prognózis

jobb az IDH vad típushoz képest. Jelen álláspont szerint az IDH-mutáció az onkometabolit-2-hidroxi-glutarát felhalmozódása révén részt vehet a gliomagenesisben úgy, hogy a progenitor sejteket különböző folyamatokon keresztül vezetik át gliomák kifejlődésébe. Az IDH mutációk a glioblastomáknak csak körülbelül 10% -ában vannak jelen, de jelenlétük jobb túlélésre utal. Az MGMT promóter metilációja a temozolimid (TMZ) alikiláló ágensre adott válasz prediktív markere, amely rutinszerűen alkalmazott kemoterápiás szer a glioblastoma kezelésében. Az MGMT gén transzlációja DNS-javító enzimet eredményez, az MGMT promóter régió hipermetilációja pedig a gén elnémítását eredményezi, mely hozzájárul a TMZ terápiás hatásának kifejlődéséhez. A fokozott expresszió vagy a mutációk (különösen az EGFRvIII mutáció) gyakoriak a glioblastomákban, és köztudottan hozzájárulnak a glioma invazivitásához. Számos más típusú tumorban az EGFR jelátviteli folyamatainak gátlása hatékony módszernek bizonyult a daganatok elleni küzdelemben, azonban GBM-ben ez eddig kudarcot vallott.

Az EGFRvIII mutáció más ismert tényezőkkel kombinálva (pl. Ki67 <20%, a PTEN vad típusú vagy az MGMT hipermetiláció) jobb prognózist jelezhet, és az EGFRvIII pozitív tumorok az oltásalapú új kísérleti terápiák jelöltjei.

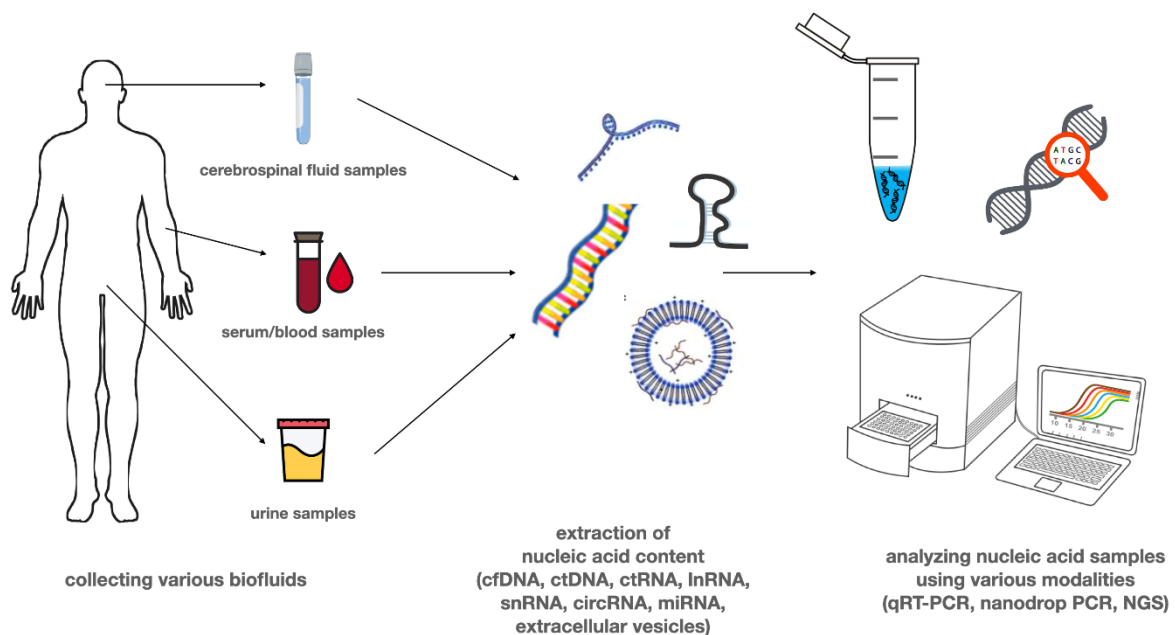
A VEGF a gliomákban overexpresszálódik, és jelenleg ez az egyetlen molekula, amely célzott terápiára alkalmas (visszatérő) gliomában. Megállapítást nyert, hogy a VEGF inhibitor Bevacizumab növeli a recidíva megjelenéséig eltelt időt azoknál a betegeknél, akiket korábban temozolomiddal kezeltek. A fent említett markerek immunhisztokémiai, FISH vagy PCR alapú módszerekkel azonosíthatók. Rendszeresen rendelkezésre állnak a klinikai gyakorlatban, azonban ezek a módszerek mindig daganatmintákat igényelnek, és nem alkalmazhatók a kezelési válasz valós idejű megfigyelésére, a daganat kiújulásának szűrésére vagy differenciáldiagnosztika céljából. Szükség van új prognosztikai és prediktív markerekre a glioblastoma kezelésében, amelyek jelezhetik a tumor korai kiújulását vagy hatástalan kezelését. Más daganattípusokban a folyadék biopsziás módszerek eredményeiről kiderült, hogy akár egyetlen kezelés után is összefüggést mutathatnak a kezelésre adott válasszal. A folyadék biopszia egy minimálisan invazív vagy nem invazív módszer, mely során vér-, vizelet-, nyál- vagy egyéb testfolyadék-minták kerülnek felhasználásra egy betegség azonosítására vagy követésére, általában a biológiai folyadékokban található nukleinsavfragmensek kis molekuláinak kimutatásával. Mivel a glioblastoma a központi idegrendszer daganata, még a szövettani mintavétel is nagy kockázatot rejthet, azonban ma kezelés megállapítására vonatkozó döntések a szövettani minták elemzésén alapulnak.

Számos más típusú daganat esetében azonban a folyadék biopszia technikája a döntési folyamat standard elemének számít a diagnosztikai és terápiás tervezésben.

8.3. Keringő tumor nukleinsavak

Számos daganat eredetű keringő nukleinsav (pl. CtDNS, cmtDNS, mRNS, nem kódoló RNS-ek, beleértve miRNS-eket, hosszú láncú nem kódoló RNS-ek) kimutatható a vérből vagy más testnedvekből, például vizeletből, cerebrospinalis folyadékból (CSF), nyálból, pleurális folyadékból és ascitesből. A vérben ezek a különböző típusú potenciális biomarkerek szabad formában, lipid- vagy fehérjestruktúrákhoz kötődve lehetnek jelen, vagy keringő EV-ok, esetleg vérlemezkék által szállítódnak.

A 19. ábra a glioblastoma-kutatás leggyakrabban használt folyadék biopsziás mintáit mutatja.



19. ábra. A glioblastoma kutatásában használt folyadék biopsziás minták. Folyadék biopsziás mintákat lehet gyűjteni bármilyen testfolyadékból, beleértve a vért, a vizeletet, a nyálát, a hörgő váladékot, az ascitest vagy a CSF-t. A betegség jellemzői miatt a glioblastomában leggyakrabban a szérum, a CSF és vizelet kerül felhasználásra.

8.4. Keringő DNS

Szabad, sejttől független DNS (cfDNS) kettősszálú, körülbelül 150-200 bázispár hosszúságú DNS-fragmentként felszabadulhat a sejtekből fiziológias és kóros körülmények között is. A cfDNS származhat apoptotikus, nekrotikus, gyorsan osztódó sejtekből vagy CTC-kből. Ezen kívül a makrofágok is aktívan felszabadíthatják a cfDNS-t a szérumba. A cfDNS molekulái fagocitózis révén gyorsan eltávolításra kerülnek, és ennek következtében egészséges egyéneknél a cfDNS szintje tipikusan alacsony, a plazmában körülbelül 10-15 ng / ml. Daganatos betegeknél a daganatos sejtekből felszabaduló cfDNS-t keringő tumor DNS-nek (ctDNS) nevezik, és a teljes cfDNS-nek csak a töredékét adja, amely széles tartományban változhat, kevesebb, mint 0,1% és több mint 90% között. A ctDNS általában emelkedett koncentrációban van jelen, különféle folyadék biopsziás mintákban, például tumoros betegek (beleértve a glioblastomát is) vérmintáiban, összehasonlítva a kontroll egyénnel. Bettgowda és munkatársai, 640 betegről nyert ctDNS elemzésével összefüggést találtak a plazmában kimutatott tumor-specifikus variánsok koncentrációja és a túlélés között a metasztázissal szövődött betegeknél. Egyes tanulmányok szerint a terápiára reagáló betegeknél a daganat-specifikus ctDNS-variánsok szintje a kezelés megkezdése után 1-2 héten belül drasztikus módon csökken. A ctDNS tumor-specifikus mutációi fontos információforrások lehetnek az adott daganattípusról. A ctDNS által hordozott mutációk elemzése hatékony eszköz lehet a korai felismeréshez, továbbá segíthet azonosítani azokat a molekuláris változásokat, amelyek egy adott terápiával szemben rezisztenciához vezetnek. Több rezisztens szubklón is jelen lehet egy időben az elváltozásban, melynek következtében a biopszia során nyert egyetlen minta nem tükrözi a tumor molekuláris heterogenitását. A különböző daganattípusok számottevő eltérést mutatnak a detektálható ctDNS gyakoriságát illetően. A glioblastoma esetében a tumorsejtekből származó ctDNS koncentrációja a plazmában alacsony a többi daganattípushoz képest, amely elsősorban a vér-agy gát (BBB) jelenlétének következménye tulajdonítható. Számos kihívás felmerül a ctDNS elemzésével kapcsolatban glioblastoma esetén. Az általában fennálló problémák mellett, mint például a ctDNS-fragmensek rövid felezési ideje (<1,5 óra), a fő probléma a mintákban található alacsony ctDNS-mennyiség. Új technológiák, mint a cseppalapú digitális PCR (ddPCR) és az új generációs szekvenálási (NGS) technikák optimalizált formáinak alkalmazása javította a cfDNS mutációk detektálásának érzékenységét és specificitását. A jövőben mindkét módszer alkalmazható lesz a klinikai vizsgálatokban. Míg az NGS lehetővé teszi egy adott ctDNS-

fragmensen előforduló lehetséges új mutációk széles körének feltárását, a ddPCR segítségével ismert specifikus mutációk tesztelhetők. A ddPCR módszer szintén hasznos az új generációs szekvenálással azonosított mutációk megerősítésében.

Bettegowda és munkatársai által végzett kezdeti tanulmány a kimutatott mutációk, mint az IDH1, TP53, EGFR és PTEN jelenléte, a glioblastomában szenvedő betegek egy részére (10%) korlátozódtak. Másrészt egy újabb, Piccioni és mtsai által végzett tanulmány egy nagyon érzékeny és specifikus NGS panel segítségével a 222 GBM páciensből gyűjtött plazmaminták 55%-ában detektáltak ctDNS mutációkat. Némelyik ebben a betegcsoportban azonosított eltérés, beleértve a BRAF / IDH1 / IDH2 mutációkat, az ERBB2 / MET / EGFR / PDGFRA amplifikációkat és a DNS károsodást helyreállító gének mutációit, molekuláris célzott terápiákra adhat lehetőséget. Ezeknek a genomiális eltéréseknek a ctDNS-analízissel történő kimutatása átfogó képet adhat a glioblastoma genomról, beleértve a különböző tumorrégiókból származó ctDNS-t. Eltérő epigenetikai módosításokat azonosítottak a GBM-es betegek plazma- és CSF-folyadékmintáiban is. A DNS-metilációs státusz változása például egy bizonyos kezeléssel szembeni szerzett rezisztenciát jelezhet, ezért figyelembe véve ezeket az eltéréseket lehetőségünk lehet személyre szabott terápiát választani. Lavon és munkatársai megvizsgálták az MGMT promoter metilációját a szövettani mintákban és a hozzájuk tartozó szérumban, melyeket különböző grádusú (grade II-IV) gliomában szenvedő betegektől nyertek. A teszt szenzitivitása az MGMT gén promoter metilációjára a szérumban 51%, a specificitás 100% volt. A vér-agy gát jelenléte miatt a cerebrospinalis folyadéknak (CSF) nagyobb mennyiségű keringő tumor DNS-t kell tartalmaznia, különösen a primer idegrendszeri daganatok esetében, mint a gliomák. Wang és társai elemezték az MGMT gén promoter metilációját a szérumban és CSF-mintákban különböző grádusú gliomás betegeknél. Az összes CSF- és vérminta közül a vérminták 21,3% -ának és a CSF-minták 33,3% -ának pozitív volt az MGMT promoter metilációja, ami azt sugallja, hogy a CSF-minták elemzése előnyösebb lehet a szérumban mintákkal szemben. A lumbalpunkció azonban ellenjavallt azoknál a betegeknél, akiknek megnövekedett koponyaűri nyomása van. Az MGMT promoter metilációjának eltérései mellett Chen és munkatársai szerint a glioblastomás betegek alacsonyabb Alu-metilációs szintet mutattak, mint a kontroll csoport plazmamintái. A vizsgálat során egyértelmű összefüggés volt megfigyelhető a túlélés és a metilációs szintek között. Minél magasabb volt az Alu-metiláció foka, annál hosszabb volt a beteg teljes túlélése. Számos tanulmány eredménye utal rá, hogy a ctDNS mellett az mtDNS tartalom megváltozása szintén szerepet játszik a daganatok kialakulásában. Cormio és mtsai által végzett tanulmány szerint az mtDNS-tartalom változásai korán jelentkeznek a premalignus

elváltozásokban. Zhang és mtsai. szintén kimutatták, hogy a perifériás leukocitákban mérhető magasabb mtDNS-tartalom fokozott eséllyel glioma jelenlétére utalhat. Továbbá Chen és mtsai. valós idejű PCR-alapú módszerrel elemezték az mtDNS-szintek korrelációját gliomás betegek tumor reszekció utáni teljes túlélésével (OS) és progressziómentes túlélésével (PFS). Arra a következtetésre jutottak, hogy a magas mtDNS-tartalmú mintákhoz tartozó betegek szignifikánsan gyengébb OS-t és PFS-t mutattak, mint az alacsony mtDNS-esek. Ezenkívül az emelkedett mtDNS szint alacsonyabb NK-sejt frekvenciával, valamint magasabb IL-2 és TNF-a koncentrációval társult, ami arra utal, hogy a magas mtDNS tartalom esetleg az immunfunkciók rendellenes megváltoztatása révén járulhat hozzá a gliomák progressziójához. Mair és mtsai egy kísérletben GBM betegektől nyert tumormintákat felhasználva vizsgálta a mtDNS és ctDNS szintjét GBM különböző patkány PDOX modelljeiben. Ebben a vizsgálatban a mtDNS kimutatási aránya 82%, míg a ctDNS-é csupán 24% volt a plazmamintákban. Ezenkívül a mtDNS a vizeletminták 60%-ában volt azonosítható, míg a vizeletben a ctDNS nem volt kimutatható. A tanulmány eredménye rávilágít a mtDNS szerepére a GBM korai diagnózisában és követésében.

8.5. Keringő RNS

A keringő tumor RNS (ctRNS) magában foglalja mRNS-eket, hosszú, nem kódoló RNS-eket (lnRNS-eket) és kicsi, nem kódoló RNS-eket (snRNS-eket). A kis ncRNS-ek között található például mikroRNS-eket (miRNS-ek) és cirkuláris RNS-eket (circRNS-ek). A keringő RNS-ek rendkívül stabil formában vannak jelen a plazmában, valószínűleg a szubcelluláris részecskékkel való kapcsolatuk vagy exoszóma csomagolásuk következtében.

A miRNS-ek az egyik ígéretes biomarker család a rákbetegség diagnosztikájában. A miRNS-ek, mint kicsi, általában 19-25 bázispár hosszú ncRNS-ek, részt vesznek a legtöbb fiziológias és patológias folyamatban, úgy mint az apoptózisban, proliferációban, differenciációban, migrációban vagy invázióban a poszttranszkripciós génexpresszió szabályozásán keresztül. A miRNS-ek a leggyakrabban keringő szabad molekulák a vérben, ráadásul számos más típusú testnedvben is kimutathatók, például vizeletben, nyálban és CSF-ben. Bár úgy tűnik, hogy ctDNS esetén a CSF jobb forrás az elemzésre olyan agydaganatokban, mint a glioblasztoma, nincs egyetértés a miRNS optimális forrása tekintetében. Qu és munkatársai által végzett metaanalízis arra a következtetésre jutott, hogy a miR-21-et tartalmazó panelek, a forrástól függetlenül, specifikusabbak lehetnek a gliomára. A

GBM-ben szenvedő betegeknél a miR-21 upregulációja figyelhető meg, és rosszabb túlélési paraméterekkel és tumor grádussal jár együtt. Ezen túl, szintje csökkent a kemo-irradiáció után, így biomarkerként használható. A miR-21 kifejezett upregulált állapota mellett Wang és mtsai. a miR-128 és miR-342 downregulációját detektálták, korrelálva a glioma grádusával a glioblasztomás betegek plazma- és szövetmintáiban az egészséges kontrollokkal összehasonlítva. A miR-21 szinttel ellentétben a miR-128 és a miR-342 koncentrációja megemelkedett a műtét és kemo-irradiáció után, ami arra utal, hogy felhasználhatók a kezelésre adott válasz monitorozásában is. Ezenkívül a fent említett miRNS-ek mellett különböző tanulmányok számos más miRNS expressziós szintjét is eltérőnek találta. A miR-221, miR-222, miR-210, miR-182 vagy miR-454 emelkedett szintje figyelhető meg a glioblasztomás betegek szérummintáiban, és fokozott tumorprogresszióval, valamint rossz túlélési adatokkal jár együtt.

A miRNS-ekkel együtt a keringő lncRNS-ek diagnosztikai és prognosztikai biomarkerek lehetnek a glioblastomában is. Az lncRNS-ek hossza 200 nukleotidtól 100 kilobázisig terjedhet, hasonlóan az 5'm7G-cap-vel és 3'-poli(A) farokkal rendelkező mRNS-ekhez, de nem rendelkeznek jelentős fehérje-kódoló képességgel. A lncRNS-ek a fehérjét kódoló génekhez képest szövetspecifikusabb expressziós mintázatokkal rendelkeznek, és expressziójuk nagymértékben összefügg biológiai funkcióikkal és a tumor státusszal. Az lncRNS-ek számos jelátviteli út deregulációján keresztül vesznek részt a malignus folyamatok beindításában és progressziójában, mint például a proliferáció, angiogenezis és gyógyszerrezisztencia. A HOTAIR számos daganattípusban negatív prognosztikai faktorként ismert, beleértve a glioblasztomát, és egyértelmű összefüggést mutat a teljes túléléssel. Jie és mtsai. 106 primer glioblastomában szenvedő betegtől nyert szérummintában elemzett hat onkogén vagy tumorszuppresszor lncRNS-t (CRNDE, GAS5, H19, HOTAIR, MALA1 és TUG1). A HOTAIR és a GAS5 szintek 2 éves teljes túléléssel és betegségmentes túléléssel voltak összefüggésben a glioblastomában szenvedő betegeknél. Ezen eredmények szerint a magas HOTAIR és az alacsony GAS5 szintek rosszabb túlélési adatokat mutatnak, mint az az alacsony HOTAIR és magas GAS5 szinttel rendelkező betegeknél tapasztalható. Ezenkívül a HOTAIR magas szintje a kiújulás vagy a progresszió valószínűségének 1,82-szeres növekedésével járt együtt, míg a GAS5 magas szintje a kiújulás vagy a progresszió valószínűségének 54% -os csökkenésével járt. Fontos megemlíteni, hogy az lncRNS-ek és a miRNS-ek komplex szabályozó szerepet játszanak az mRNS stabilizálásában és lebontásában. Továbbá a miRNS-ek nagy valószínűséggel egyfajta hídként működnek a nem kódoló RNS-ek és az mRNS-ek között.

A miRNS-ek és az lncRNS-ek mellett a rendkívül stabil, evolúciósan konzervált, szövetspecifikus cirkuláris RNS-ek a tumorigenesis és -fejlődés másik kulcselemei. A kovalensen zárt hurkú struktúrából álló kör alakú RNS-eket a közelmúltban újra felfedezték, mint egy kis, nem kódoló típusú RNS-t, amely 5' sapka 3' poly-A farokkal rendelkezik, amely ellenállóvá teszi őket az exonukleázsal szemben. A circRNS-ek többnyire nem kódolnak, de néhányat polipeptidekké lehet átalakítani. Különböző típusú cirkuláris RNS-ek léteznek, mint például exonikus circRNS-ek (ecircRNS-ek), intronikus RNS-ek (ciRNS-ek), exon-intron circRNS-ek (EIciRNS-ek), intergenikus circRNS-ek.

A circRNS-ek számos különböző mechanizmus mentén onkogénekként vagy tumorszuppresszorként részt vehetnek a daganatok kialakulásában: miRNS-szivacsoként működnek, génexpressziót szabályoznak, RBP-kel lépnek kölcsönhatásba, vagy részt vesznek az RNS és fehérje transzferben és tárolásban. A vizsgálatok szerint a glioma progressziójában részt vevő circRNS-ek főleg miRNS-szivacsoként működnek. Az idegsejtek sokkal gazdagabbak cirkuláris RNS-ekben, mint más szövetek, részben a cirkularizációt elősegítő specifikus gének bőségének köszönhetően. Ez a tény arra enged következtetni, hogy a circRNS-ek aberrált expressziója szorosan összefügg az idegrendszer betegségeivel, beleértve a gliomákat is. A GO-elemzés igazolta, hogy az downregulált circRNS-ek fehérjékkel alkotnak nagy komplexeket, melyek szabályozhatják az RNS-kötő fehérjék készletét. Ezenkívül az upregulált circRNS-ek a G0-G1 átmenetben, a mangánion transzportban vagy *store-operated* kalciumcsatorna aktivitásban játszanak szerepet, és ezek a folyamatok részt vehetnek a gliomák kialakulásában. A circRNS-ek jelen vannak a vérben és más testnedvekben, azonban a mai napig alig vizsgálták a circRNS-ek diszregulációjának szerepét a glioma tumorigenesisben GBM-es betegek szövettani és exoszómamintáiban. Wang és mtsai. számoltak be arról, hogy a circ_0001649 downregulációja, amely normális körülmények között facilitálja az apoptózist a Bcl-2 / kaspáz-3 útvonal szabályozásán keresztül, nagyobb daganatmérettel és magasabb WHO grádussal társult, jelezve, hogy a circ_0001649 független prognosztikai markere lehet a GBM műtét utáni követésének. Zhu és mtsai tanulmánya szerint a circBRAF upregulációja független prediktív tényező lehet, jó progresszió nélküli túléléssel és teljes túléléssel a gliomás betegeknél Cox-analízis segítségével. Továbbá Circ_0034642, circ_0074362, circ_ITCH, circHIPK3 és circCPA4 a súlyosabb klinikai lefolyáshoz és rossz prognózishoz köthetők gliomában szenvedő betegeknél. A jövőben a circRNS-ek azonosítása a különböző testnedvekből származó

mintákból elősegíthetné, hogy a circRNS értékes biomarkerként szolgáljon a gliomák diagnosztikájában, prognózisának meghatározásában és követésében.

8.6. Extracelluláris vezikulumok

Az extracelluláris vezikulumok a folyadék biopsziával nyerhető makromolekulák ígéretes új forrása az emberi daganatos megbetegedések minimál invazív vagy nem invazív diagnosztikájához és klinikai követéséhez. A vér-agy gáton (BBB) átjutni képes exoszómák kicsiny (átmérőjük 40-150 nm), membránnal határolt, különféle sejttípus által termelt extracelluláris vezikulumok, melyek különböző típusú testnedvekben vannak jelen, mint pl. vér, cerebrospinalis folyadék (CSF), vizelet vagy nyál. Az exoszómák molekuláris összetétele változatos, nukleinsavakat, fehérjéket, lipideket és metabolitokat tartalmaznak, amelyeket kettős membránréteg véd a proteázoktól, nukleázoktól és más lebontó elemektől. Tanulmányok szerint egyes molekulák nagy mennyiségben fordulnak elő exoszómákban, míg mások csak sejttípustól függően vannak jelen, és ez a specifikus ingerre reagálva változhat. A szekréción követően az EV-k közvetlen membránfúzióval, ligand-receptor kölcsönhatással vagy endocitózissal léphetnek kapcsolatba a szomszédos vagy távoli sejtekkel, modulálva a befogadó sejtek aktivitását. Ebben az összefüggésben számos tanulmány bizonyította, hogy az exoszómák fontos szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban, és részt vesznek a daganatok kialakulásában, a befogadó sejtekhez onkogén jelek továbbítása által, iniciálva azok tumorigenezissel összefüggő aktivitását. Ehhez kapcsolódóan a tumor eredetű exoszómák a környező strómasejtek viselkedésének megváltoztatásával tumor-permisszív mikrokörnyezetet teremthetnek, amely válaszként exoszómákat is szekretál, elősegítve a proliferációt, inváziót, angiogenezist, metasztázisok kialakulását, immun-menekülést vagy a kezeléssel szembeni ellenállást. Számos bizonyíték erről a területről azt sugallja, hogy az exoszómális bioaktív molekulák átjárhatnak a különböző sejtpopulációk között, és részt vesznek a gliomák kialakulásához vezető folyamatok iniciálásában és progressziójában. Osti és mtsai tanulmánya feltárta, hogy az EV-k koncentrációja nőtt a GBM-ben szenvedő betegeknél az egészséges kontrollokhoz képest, továbbá az EV-koncentrációk korrelációt mutattak a tumor kiújulásával. Ezen túlmenően ezen EV-k által tárolt fehérjék meghatározása glioblastoma-specifikus mintázatot mutatott EGFR amplifikációkkal, PTEN deléciókkal, IDH1 / 2 és TP53 mutációkkal. Egy másik tanulmányból kiderült, hogy a plazma EV-kben jelen lévő syndecan-1 hasznos lehet az alacsony és magas grádusú gliomák elkülönítéséhez,

melyre 71%-os szenzitivitása és 80%-os specificitása ad lehetőséget. Bizonyos miRNS-ek, amint azt például Ebrahimkhani és munkatársai kimutatták, szelektív csomagokként kerülnek a glioma sejtproliferációját szabályozó exoszómákba. Ez a kutatócsoport hét exoszomális miRNS-panelt használt – miR-182-5p, miR-328-3p, miR-339-5p, miR-340-5p, miR-485-3p, miR-486-5p és miR-543 – megkülönböztetni a GBM-es betegeket az egészséges kontroll csoporttól 91,7%-os pontossággal. Santangelo és mtsai. három miRNS, miRNS-21, miR-222 és miR-124-3p upregulációját detektálta a glioma betegek szérummintáiban, és a kombináció segíthet a magas grádusú gliomák megkülönböztetésében más daganatok agyi metasztázisaitól. Új bizonyítékok arra utalnak, hogy a TMZ-rezisztens glioma sejtekből felszabaduló EV-k, molekuláris rakományaik révén, képesek átadni a gyógyszerrezisztenciát a recipiens sejtjeinek, amelyek még TMZ-érzékenyek. Zhang és mtsai. számoltak be arról, hogy az lncRNS SBF2-AS1 upregulált formában összefügg a TMZ-rezisztenciával, és exoszomális transzport révén tovább segítheti a TMZ-rezisztencia terjedését a TMZ-érzékeny sejtek felé. A kemorezisztencia terjedésének elősegítése mellett az EV-on belüli makromolekulák befolyásolhatják a sugárterápia hatékonyságát is. Zhao és mtsai kimutatták, hogy a radiorezisztens GBM sejtek EV-aiból származó circRNS-ATP8B4 terjesztheti a glioma radiorezisztenciáját a miR-766 sponging-val. Figyelembe véve az EV-k jelentőségét a tumorok evolúciójában és a kezelésre adott válasz arányában, számos tanulmány kapcsolódik az exoszóma-termelés modulálásához vagy az exoszóma felvételi útvonalak blokkolásához. A keringő tumor-specifikus exoszómák mennyiségének csökkentését célzó koncepció ígéretes kezelés lehet a daganatos betegek számára (21. táblázat). Marleau és mtsai. megállapították, hogy az Aethlon ADAPTTM (adaptív dialízis-szerű affinitás-platform technológia) nevű plazmaferezis platform alkalmazásával beépíthetők különféle affinitás-ágensek a tumor-specifikus exoszómák megragadásához felületi fehérjék vagy glikoproteinek megjelenítésével.

<i>miRNA</i>	<i>Expresszió GBM-ben</i>	<i>A megváltozott expresszió hatása</i>	<i>Minták forrása</i>
<i>miR-21</i>	upregulálódás	a magas szint rossz prognózissal jár, a kemo-irradiáció után a szint csökken	Ev-k
<i>miR-128</i>	downregulálódás	gliómában downregulálódva, a szint emelkedik a műtét és a kemo-irradiáció után	plazma és szövet
<i>miR-342</i>	downregulálódás	gliómában downregulálódva, a szint emelkedik a műtét és a kemo-irradiáció után	plazma és szövet
<i>miR-221</i>	upregulálódás	az emelkedett szint a tumor prognózisával és rövid túléléssel jár	szérum
<i>miR-210</i>	upregulálódás	az emelkedett szint a tumor prognózisával és rövid túléléssel jár	szérum
<i>miR-182</i>	upregulálódás	az emelkedett szint a tumor prognózisával és rövid túléléssel jár	szérum
<i>miR-454</i>	upregulálódás	az emelkedett szint a tumor prognózisával és rövid túléléssel jár	szérum
<i>lncRNA</i>			
<i>HOTAIR</i>	upregulálódás	az emelkedett szint rossz prognózissal, a tumor korai kiújulásával jár	szérum
<i>GAS5</i>	upregulálódás	az emelkedett szint jobb prognózissal és a kiújulás esélyének csökkenésével jár	szérum
<i>SBF2-AS1 lncRNA</i>	Ev-k	TMZ-rezisztenciával társul	EV-k
<i>circRNA</i>			
<i>circ_0001649</i>	downregulálódás	nagyobb tumormérettel és előrehaladott WHO-grádussal társul	szövet
<i>circ_BRAF</i>	upregulálódás	jobb progressziómentes és teljes túléléssel jár	szövet
<i>circ_0034642</i>	upregulálódás	rossz prognózissal jár	szövet
<i>circ_0074362</i>	upregulálódás	rossz prognózissal jár	szövet
<i>circ_ITCH</i>	upregulálódás	rossz prognózissal jár	szövet
<i>circHIPK3</i>	upregulálódás	rossz prognózissal jár	szövet
<i>circCPA4</i>	upregulálódás	rossz prognózissal jár	szövet
<i>ATP8B4 circRNA</i>	upregulálódás	a sugárterápia iránti érzékenységgel társul	EV-k

21. táblázat. Különböző miRNS-ek, lncRNS-ek, circRNS-ek diagnosztikai / prognosztikai biomarkerként GBM-ben

8.7. Keringő tumorsejtek

A primer tumor helyét elhagyó és a keringésbe kerülő tumorsejteket keringő tumorsejteknek (CTC) nevezzük. Az epiteliális-mezenchymális változáson áteső CTC-k metasztatikus prekursor sejtek, melyek felszabadulhatnak egyedi sejtként, ugyanakkor homotípusos vagy heterotípusos csoportokban, mely utóbbinak magasabb áttétképző hajlama lehet, mint az egyedi sejtnek. Nem ismert, hogy a CTC-k csak a központi daganat szubpopulációit képviselik-e, vagy inkább az egész eredeti daganatot. A glioblasztomák extracranialis áttéte nagyon ritka esemény (a betegek 0,4–0,5%-a), amely főleg a tüdőt és a mellhártyát, a regionális nyirokcsomókat, a csontokat és a májat érinti. A kimutatható áttétek alacsony arányának számos oka lehet, például a GBM-betegek rövid túlélési ideje, a BBB jelenléte, ami megnehezíti a sejtek keringésbe való bejutását, vagy lehetséges, hogy a GBM-sejtek kritikus idegsejt specifikus növekedési faktorokat igényelnek, amelyek hiányoznak az agyon kívül. A CTC-k rendkívül ritkák, csupán 1 CTC jut 10^9 vérésejtre, és elkülönítésük bonyolult a szükséges technikák összetettsége miatt. A CTC-eket számos daganattípusokban leírják már, jelenlétük a gyenge túlélési adatokkal hozható összefüggésbe. A CTC-k különféle megközelítések alapján különíthetők el. A negatív dúsítási technikák a CTC méretén (a CTC-k nagyobbak, mint a normál vérésejtek) vagy más biofizikai tulajdonságokon alapulnak, míg a CTC pozitív kiválasztása specifikus tumormarkerek kimutatásával érhető el, amelyek e sejtek felszínén általában expresszálódnak.

Glioblastoma esetén a CTC-eket először Muller és munkatársai határozták meg. Ez a csoport fibrilláris savfehérje-pozitivitást (GFAP), CD45-negatív CTC-eket detektált a glioblastomában szenvedő betegek 20,6%-ánál, és azt találták, hogy a primer tumor specifikus aberrációit hordozzák magukban, beleértve az EGFR gén amplifikációt vagy a kromoszóma inszerciókat vagy deléciókat. A műtétet követően nem figyeltek meg szignifikáns különbséget a műtét előtti, alatti vagy utáni CTC-számokban, és nem volt összefüggés a CTC-számok és a klinikai eredmények között. MacArthur és mtsai. a perifériás vérben igazoltak agydaganatból származó sejteket telomeráz promotor alapú vizsgálattal, a nestin (mint glioma sejt marker) expressziójának tesztjével kombinálva. A vizsgálat egy telomeráz reszponzív adenovirális vektort alkalmaz, amely fluoreszcens *receptort* kódol a hTERT-pozitív sejtek kimutatására. Ennek a módszernek a segítségével sikerült a CTC-eket kimutatni a sugárterápia és a TMZ kezelés előtt elemzett 11 (72%) glioblastoma beteg közül 8-ban, míg a posztradioterápiás betegek kimutatási aránya a 8-ból egy volt (8%). Sullivan és munkatársai kifejlesztettek egy

„negatív kimerülésű” CTC-iChip-et, amely mágnesezen jelölt antitestek (CD16, CD45) révén hatékonyan távolítja el a leukocitákat a vérmintákból, címkézetlen és manipulálatlan CTC-eket eredményezve. Ebben a vizsgálatban 33, glioblastomában szenvedő felnőtt beteg közül 13 tartalmazott CTC-t. A CTC-eket ezután SOX2, tubulin β -3, EGFR, A2B5 és c-MET elleni antitestek felhasználásával jellemezték, amelyek a GBM összes molekuláris altípusát (proneurális, idegi, klasszikus és mezenchymális) képviselik. Az expressziós markerek molekuláris jellemzése az egyes GBM CTC-kben a mezenhimális transzkriptumok felhalmozódását és az idegi differenciálódási markerek redukcióját azonosította. Megállapítható, hogy a CTC-k GBM-ben történő kimutatását bemutató vizsgálatok száma még mindig korlátozott, és a CTC-k diagnosztikai, prognosztikai, prediktív és monitorozási lehetőségei glioblastoma esetén még további vizsgálatot igényelnek.

8.8. Összegzés

Annak ellenére, hogy a közelmúlt eredményei nyomán egyre jobban értjük a betegség természetét, a glioblastoma még mindig egy olyan rejtvény, amelyet nem egyszerű megfejteni. A kezelési lehetőségek rendkívül korlátozottak, a legtöbb beteg rossz prognózissal szembesül, míg a klinikumban küzdünk azon betegek azonosításáért, akik rezisztensek a szokásos kezelési protokollokkal szemben. Az elmúlt évtizedben a gliomák molekuláris biológiai kutatásainak eredményei jelentős mérföldkövekhez vezettek, azonban a várva várt áttörés még nem érkezett meg. Néhány eredmény, például a genetikai mutációk elemzése, segített az egyes betegek között fennálló különbségeket a glioblastoma új, molekuláris genetikai alapokon történő klasszifikációjában megjeleníteni. Mások, mint az IDH mutációk, vagy az 1p/19q kodeleció a gliális tumorok diagnosztikai vizsgálatában vesznek részt. Prognosztikai és a prediktív markerek azonban továbbra sem állnak rendelkezésre rutinszerűen. Egyes markerek, köztük az MGMT promoter hipermetilációja vagy az IDH mutációi jól ismertek, mégis, vagy ritkák (IDH mutációk), vagy korlátozott terápiás következményekkel járnak (MGMT promoter hipermetiláció). A folyadék biopszia egyre inkább fejlődő kutatási terület, és folyamatosan növekszik azon tumorok száma, ahol a folyadék biopsziás módszereket rendszeresen alkalmazzák a klinikai gyakorlatban. A szérum, a vizelet, a CSF és más testnedvek kis nukleinsavrézecskeket tartalmaznak, amelyek a prognózissal és a kezelésre adott válasszal hozhatók összefüggésbe. E részecskék széles skáláját tanulmányozták glioblastomában, és napjainkban a glioblastoma prognózisának

vagy a kezelésre adott válasz mérésére alkalmas új markereknek tekintik őket (lásd 21. táblázat). Ezek egy része hasznos lehet a diagnózis felállításában, másokat a műtét vagy a radiokemoterápia utáni korai nyomon követés során, másokat a tumor kiújulásának vagy a terápiás rezisztencia kialakulásának azonosítására lehet felhasználni. E markerek alkalmazásának előnyei a hagyományos módszerekkel szemben egyrészt a minimálisan invazív mintavétel, továbbá a keringő nukleinsavrézecskek szintjének méréséhez alkalmas technikai feltételek egyre szélesebb körben elérhetővé válnak a klinikai laboratóriumokban is. További vizsgálatokra van azonban szükség ezen ígéretes markerek klinikai előnyeinek igazolásához.

9. A DEBRECENI IDEGSEBÉSZETI AGYDAGANATBANK

9.1. A Debreceni Neuro-onkológiai Labor kialakítása

9.1.1. Szervezeti háttér

Az Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank (a továbbiakban Agydaganatbank) egy OTKA pályázat anyagi támogatásának köszönhetően 2005-ben jött létre. Az Agydaganatbank működéséhez a mintát a Kölni Idegsebészeti Klinikán működő Neuro-onkológiai Laborban található hasonló tumorbank adta, ahol a szerző 1 éves német akadémiai ösztöndíjjal (*Deutsche Akademische Austauschdienst, DAAD*) eltöltött kutatómunka során ennek működési feltételeiről részletes ismereteket szerzett. Az OTKA keretből beszerzett nagy kapacitású ultramélyhűtő, a mintafeldolgozáshoz szükséges folyékony nitrogén kezelésére alkalmas tartályok, az intraoperatív mintagyűjtés kidolgozása, a szövetminta archiválás meghatározása, a klinikai adatgyűjtés megszervezése, ennek tárolása és a minta- valamint betegadatbank szintézise eredményezte azt a nélkülözhetetlen tudományos háttérrel, melyre azóta is kutatások sora épül. Az Agydaganatbank az első perctől kezdve TUKÉB engedéllyel rendelkezik, melyet két évente beszámoló alapján hosszabbít meg az illetékes Bizottság.

Az Agydaganatbank működésének szervezeti keretét az e célból szintén 2005-ben megalakított Neuro-onkológiai Labor alkotja, melynek fő feladata a Bank nyújtotta lehetőségek tudományos kutatások céljaira történő felhasználásának elősegítése és kivitelezése. A Neuro-onkológiai Labor működéséhez több kutatási pályázat biztosította és biztosítja ma is az anyagi háttérrel. Az Agydaganatbanknak köszönhetően ma már a saját kutatások mellett igen jelentős hazai és nemzetközi kollaborációban megvalósuló tudományos eredmények is születtek.

9.1.2. Az Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank jelentősége

Az Agydaganatbank egyrészt intraoperatív gyorsfagyasztott szövetminta-gyűjtést végez, de emellett egyéb humán szövetminták (likvor, nyál, bronchusváladék, vér) gyűjtését és mélyfagyasztott állapotban történő tárolását is megvalósítja. Az intraoperatív mintagyűjtésnek kiemelkedő előnye, hogy a lefagyasztott szövetminták később nem csak morfológiai vizsgálatokra, molekulák mennyiségi analizésére, hanem funkcionális vizsgálatok

céljára (elsősorban enzimaktivitás meghatározására) is alkalmasak maradnak (szemben pl. a formalin fixált mintákkal). További előny, hogy a rutinszerű mintagyűjtés (a DE KK Idegsebészeti Klinikán majdnem minden nap történik mintagyűjtés) egyrészt a ritka tumorokból évek során nagyszámú mintakollekció létrejöttét eredményezi, másrészt a kiújult daganatokból származó szövetminták vizsgálatával a különböző onkológiai kezelések hatásainak molekuláris szintű meghatározása is megvalósítható. Az Agydaganatbank mintagyűjtési stratégiája ezáltal horizontális és vertikális mintagyűjtési célokat valósít meg. A minél többféle szövettani típusú daganatból származó mintagyűjtés a teljes tumorpaletta lefedésének igényével horizontális síkban eredményez nagyszámú mintagyűjtést, míg az egyes betegek időbeni követésével megvalósuló mintagyűjtés vertikális adatkapcsolási lehetőséget valósít meg.

Külön kiemelendő jelentőségű, hogy az Agydaganatbankban az idegsebészeti műtétek során elkerülhetetlenül eltávolításra kerülő, egyébként nem tumoros agyszövetek is tárolásra kerülnek. Ezekben az esetekben a funkcionális idegsebészeti műtétekből (pl. epilepsziasebészet) származó mintákat gyűjtjük, de a beékelődés elhárítását célzó *uncus gyri hippocampi* vagy *tonsilla cerebelli* eltávolítása, illetve alkalmanként a frontális vagy temporális polus reszekció is felbecsülhetetlen értékű mintagyűjtésre ad alkalmat. Ennek köszönhetően alakult ki ugyanis egy nem-tumoros, számos szempontból normálisnak tekinthető agyszövet-gyűjtemény, mely nemzetközi szinten is egyedülálló és minden tumorszövetet célzó tudományos kutatáshoz referenciaszövetként funkcionáló mintákat szolgáltat.

Az Agydaganatbank emellett számos, a későbbi szövettani feldolgozás során un. peritumorális agyszövetnek bizonyult szövetmintát is tartalmaz, mely műtét során ugyan tumornak tűnik, és az anatómiai szituációból adódóan a tumorrall együtt eltávolításra kerül (frontális, temporális pólus, hippocampus), de nem tumorszövet alkotja. Ezek a szövetminták a peritumorális reakciók és invazív folyamatok vizsgálatához jelentenek pótolhatatlan vizsgálati anyagot.

Az Agydaganat- és Szövetbankban tárolt, célzottan gyűjtött bronchusváladék és nyálminták az intravénásan alkalmazott gyógyszerek (elsősorban antibiotikumok) szekréciójának és lokális koncentrációjának, azaz az intraorális és pulmonális effektivitást meghatározó minimális inhibitorikus koncentráció meghatározásához szükségesek.

További fő szövetmintagyűjtemény a tumoros betegektől származó teljes vér- és szérum- vagy plazmagyűjtemény, mely egyrészt a tumoros betegek genomikai vizsgálatát, másrészt a tumorból származó és a vérkeringésbe került derivátumok (pl. mikro-RNS,

mikrovezikulumok) izolálását és analízisét teszi lehetővé. A horizontális és vertikális mintagyűjtési metódus ezekben az esetekben is megvalósulhat, és igen jelentős kutatási potenciált hordoz magában.

9.1.3. Az Agydaganatbank gyakorlati működése során kifejlesztett debreceni technikák

1. A tumorminták mélyfagyasztott tárolása után történő mintafeldolgozás a minták felolvasztásával jár, így a több különböző, időben is elkülönülő vizsgálatokhoz való mintafeldolgozás során az eredeti minta minőségi romlása következhet be. A Debreceni Agydaganatbank esetében a mintatárolási procedúrába beépítettünk egy előzetes mintadarabolási lépést, amikor a folyékony nitrogénben lefagyasztott mintát a nitrogénben tördelve darabokra, az így keletkezett darabokat egyenként külön eppendorf tubusokban fagyasztjuk le. Ezáltal minden vizsgálathoz egy kis mintadarabot tartalmazó külön tubust veszünk elő az ultramélyhűtőből, és elkerüljük az eredeti minta darabolásával járó felolvadási és mintavesztési kockázatot.
2. A folyékony nitrogénben történő szövetminta-fagyasztás már régen bevált mintatárolási módszer, melynek azonban nem csak előnyei, hanem hátrányai is vannak. A folyékony nitrogénbe helyezett szövetminta körül ugyanis a nagy hőmérsékletkülönbség miatt a nitrogén forrni kezd, és számos mikrobuborék képződik, melyek mechanikai hatása a szövetmintát károsítani képes. Ennek elkerülésére különböző médiumokban történő fokozatos lefagyasztás technikái már kidolgozottak tekinthetők (pl. izopentán), de ezeknek sem rutinszerű technikai kivitelezése (nehezen várható el a műtőszemélyzettől az ehhez hasonló összetett mintapreparálási technikák alkalmazása), sem pedig gazdasági vonatkozása nem tette vonzóvá az egyébként valóban ajánlatos módszert. A Debreceni Agydaganatbank gyakorlatában sikerült kidolgozni egy olyan módszert, mely kihasználja ugyan a folyékony nitrogén adta fagyasztási lehetőségeket, mégsem jár szövetroncsoló jellegű buborékképződéssel. A mi gyakorlatunkban alufóliával bevont parafaszigeteket használunk, melyek szabadon úsznak a folyékony nitrogén felületén. A fémtartalmú bevonatnak köszönhetően a szigetek felszínének hőmérséklete gyakorlatilag megegyezik a nitrogénével, így a ráhelyezett friss szövetminta azonnal átfagy – anélkül azonban, hogy forrásból származó mechanikai hatással számolni kellene. A módszer további előnye, hogy a fémtermoszban lévő nitrogén felszínén úszó

alufóliázott szigeteket filctollal több mezőre lehet osztani, mely így az előzetes mintaszelekciót is lehetővé teszi, és az egy műtét során vett többféle szövetminta (pl. tumor, ép, centrális régió, tumorperiféria) biztonsággal elkülöníthető és nem áll fenn annak a veszélye, hogy a termoszba ejtett minták később összekeveredhetnek.

9.2. A Neuro-onkológiai Labor kutatási hatékonysága 2005-2017 között

A DE Idegsebészeti Klinikán 2005-ben létrehozott Laborral sikerült megteremteni a klinikai beteganyag tudományos feldolgozához szükséges szövet- és adatgyűjtemény feltételeit, és az e célra kialakított Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank messzemenően beváltotta a hozzá fűzött reményeket. 2005-2012 között eltelt 12 évben összesen 1121 műtét során 68 különböző szövettani entitásból vettünk intraoperatív gyorsfagyasztott szövetmintát, majd a darabolt tárolás eredményeképpen végül 6324 minta katalogizált tárolása valósult meg. A későbbi kutatási támogatások (TÁMOP, NAP) segítségével a Labor kapacitásának növelésével teljes vér- és szérumminta gyűjtése is megkezdődhetett, melynek köszönhetően 2017-ig 307 betegből rendelkezünk mélyfagyasztott aliquotba rendezett mintákkal.

Különösen nagy értéke az Agydaganatbanknak a nagyszámú, funkcionális idegsebészeti műtétből vagy térfoglaló folyamat esetén elvégzett dekompresszióból származó nem-tumoros agyszövetminta, mely minden agydaganatkutatásban végzett vizsgálathoz nélkülözhetetlen referenciaanyagként szolgál. E tekintetben az Agydaganatbankunk nemzetközi szinten is kuriózumnak tekinthető és a kollaborációs vonzereje is kiemelkedő.

A Tumorbanknak köszönhetően igen kiterjedt kollaborációs hálózatot hoztunk létre, melynek során 11 hazai, 2 kanadai és 1 németországi kutatólaborral alakítottunk ki nemzetközi közleményekben mérhető aktív tudományos kapcsolatot.

9.2.1. Az Agydaganat- és Szövetbankban rejlő kutatási potenciál

A Tumorbankban rendelkezésre álló szövetminták tudományos igényű feldolgozása számos további klinikai relevanciával bíró témakört hordoz magában. A három fő szövetminta típus (tumor, szérum, teljes vér) ugyanis különböző módon nyújtva információt az intrakraniális daganatról a betegellátás különböző megközelítési módját is előrevetíti:

1. A jelenlegi tumorminta-kutatás a már radiológiai képalkotó módszerekkel diagnosztizált, kialakult intrakraniális szövetszaporulat idegsebészeti műtétén átesett

betegek pontos diagnózisát és a személyre szabott onkoterápiájának megvalósulását célozza.

2. A szérum-minták vizsgálatával az exosomák kutatása valósulhat meg. Ezek a tumorból származó különböző molekulákat (proteinek, miRNS, stb.) tartalmazó mikrovezikulumok műtéti beavatkozás nélkül is lehetőséget adhatnak a jövőben a szövettani típus, a proliferációs hajlam, vagy éppen az inváziós aktivitás meghatározására. Ezáltal a radiológiai és laborvizsgálatok együttes elemzésétől az onkoterápiás stratégia megállapítása is lehetségessé válhat. Különösen hasznos lehet ez elokvens régiók kisméretű infiltratív tumorai esetében, vagy olyan szövettani entitások eseteiben, amikor a tumorelimináció a daganat sugár- és kemoszenzitivitásának köszönhetően műtéti rizikó nélkül megoldható. Az első kategóriába tartozik a gliomák nagy csoportja, míg a másodikba az intracerebrális limfómák, germinómák, valamint a stereotaxiás sugársebészeti beavatkozással jól kezelhető áttéti daganatok nagy esetszámú csoportja tartozik.
3. A teljes vér vizsgálatával a genom feltérképezése, az onko- és szupresszorgének meghatározása, a tumor kialakulásának előrevetíthető valószínűsége határozható meg, így az ezirányú kutatások már a prevenció, a korai diagnózis, a korai, jóval effektívebb onkoterápia lehetőségét hordozzák magukban.

10. ZÁRSZÓ

A neuro-onkológiában legnagyobb kihívást jelentő glioblasztoma kezelését sokáig a műtéti reszekció és az azt követő sugárkezelés jelentette. A standard WBRT protokollt később felváltotta a konformális fokális agyi besugárzás. Ezt követően a terápiás stratégia a különböző kemoterápiás szerek megjelenésével bővült, de 2005 óta világszerte a TMZ-ra épülő konkuráló kemo-irradiációs kezelés a rutin terápiás protokoll. Ennek köszönhetően a túlélési eredmények egyértelműen javultak ugyan, de még messze nem tekinthetők kielégítőnek. Úgy tűnik, hogy a DNS replikáció gátlásán alapuló antiproliferatív konkuráló kemo-irradiáció GBM esetében megközelítette korlátait, ezért egyre nagyobb szerepet kapnak a biológiai válaszmódosító anyagok alkalmazhatóságára irányuló kutatások. Egyéb szervi daganataink esetében mára már a rutinszerű protokoll részét képezi, hogy hormonokat, szintetikus hormonszerű anyagokat vagy éppen hormonok, hormonreceptorok elleni ellenanyagokat és enzim inhibitorokat alkalmaznak. Hasonlóképpen eredményesnek tűnő próbálkozás az angiogenezis-gátló gyógyszerek bevetése, vagy az ún. epigenetikus modulátorok alkalmazása. A GBM esetében a jelenlegi szerény eredményeket felmutató onkoterápia ismeretében felértékelődik minden olyan új eredmény, eljárás és gyógyszer, amely a gliomák fejlődését, progresszióját vagy invázióját gátolni képes.

Jelen tanulmányban klinikai betegvizsgálatok során megállapítottuk a glioblasztomás betegpopuláció aktuális kilátásait és az idegsebészeti, sugár- és kemoterápiától túlélésben várható eredményeket. Ezt követően megbecsültük az 1p19q kodeláció, az EGFR és integrin receptorok státusának prognosztikai jelentőségét, majd a jelenlegi terápia tökéletesítése érdekében meghatároztuk a TMZ koncentrációját szérumban és glioblasztomában.

Vizsgálataink során egyértelművé vált, hogy a GBM kezelésében is új utakat kell keresni. Miután a széleskörű irodalmi adatok szerint az asztrocitomák kezelésének kudarcáért leginkább invazív jellegük tehető felelőssé, kutatásainkat ez irányban folytatva több különböző eredetű és grádusú intracerebrális daganat peritumorális infiltrációjában szerepet játszó molekulát azonosítottunk. Meghatároztuk a molekuláris inváziós panel és a tumorspecifikus inváziós spektrum fogalmát, lelepleztük a jelenlegi onkoterápia inváziós mechanizmusokkal szembeni ineffektívitasát, és adatokat szolgáltatunk a normál agyszövet tumoros infiltrációval szembeni védelmi reakcióiról.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a glioblasztomás betegek túlélési paramétereinek javulása valószínűleg a különböző támadáspontú kemoterapeutikumok kombinált alkalmazásától várható.

Az inváziós spektrum nagy specifitású és szenzitivitású statisztikai valószínűséggel bíró prognosztikai faktorként megvalósítható klinikai jelentősége kiemelendő - hiszen a műtét utáni adjuváns onkoterápia meghatározásában elsődleges szereppel bírhat. Ez leginkább abban realizálódhat, hogy a jelenlegi sablonszerű kezelés mellett objektívan megjósolható „non-responder” csoportnak vagy a protokolltól eltérő vagy amelletti kiegészítő kemoterapeutikum lenne indikálható, ami a személyre szabott neuro-onkológia megvalósulása felé már egy definitív előrelépést jelentene.

Emellett tanulmányunk alapján a jelenlegi citocid, antiproliferatív hatóanyagok mellé anti-invazív készítmények alkalmazása javasolható, melyhez az inváziós spektrum – jelentős anyagi megterhelést nem jelentő – meghatározása az igen heterogén magas grádusú asztrocitómák esetében pontos molekuláris célpontok azonosításával járulhat hozzá. Amennyiben ezek alkalmazásával sikerül a glioblasztomás betegek esetében a peritumorális inváziót redukálni, akkor nem csak a teljes műtéti eltávolítás esélye javulhat, hanem a stereotaxiás sugársebészeti kezelés indikációja is megfontolható lenne. Mindezen széleskörű kezelési eszközök tumorspecifikus összeválogatásának individuális alkalmazása pedig megteremtheti a heterogén tumorokra jelenleg egyedül választható sablonszerű kezelés helyett a molekuláris patológiai leleteken nyugvó személyre szabott neuro-onkoterápia alapjait.

11. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIC – 5-amino-imidazol-4-carboxamid
BC – bevacizumab
BSC – best supportive care
CE – kapilláris elektroforézis
DE KK – Debreceni Egyetem Klinikai Központ
ECM – extracelluláris mátrix
EGFR – epidermal growth hormone receptor
EOF – elektroosztatikus áramlás
FBRT – focal brain radiotherapy
FISH – fluoreszcens in situ hibridizáció
FRET – fluoreszcencia energia transzfer
GAG – glükózaminoglikán
GBM – glioblasztoma
HA – hialuronsav
HAS – hialuronsav szintetáz
KIR – központi idegrendszer
KPS – Karnofsky Performance Score
KT - kemoterápia
MEKC – micelláris elektrokinetikai kapilláris kromatográfia
MMP – mátrix metalloproteináz
MTIC – 3-metil-triazén-imidazole-4-carboxamid
NSCLC – non-small cell lung cancer
OA – oligoasztrocitoma
OD – oligodendroglioma
OS – overall survival
PFS – progression free survival
PG – proteoglikán
pRT – palliatív radioterápia
QRT-PCR – quantitative real time polymerase chain reaction
RHAMM – receptor for hyaluronate-mediated motility
RT – radiotherapy

TK – tirozin kináz

TKI – tirozin kináz inhibitor

TMZ – temozolomide

VEGF – vascular endothel growth hormone

WBRT – whole brain radiotherapy

12. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abacioglu U, Caglar H, Atasoy BM, et al. (2010) Gamma knife radiosurgery in non small cell lung cancer patients with brain metastases: treatment results and prognostic factors. *J BUON* 15:274–280.
2. Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, et al. (2005) Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11:6270–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1223
3. Akiyama Y, Jung S, Sahlia B, et al. (2001) Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. *Journal of Neuro-Oncology* 53:115–127.
4. Aldape KD, Ballman K, Furth A, et al. (2004) Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63:700–7.
5. Andrási M., Bustos R., Gáspár A., Gomez F.A., Klekner A.: Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010 Jul 1;878(21):1801-8.
6. Arnold SM, Young AB, Munn RK, et al. (1999) Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in paired primary tumors and brain metastasis. *Clinical Cancer Research* 5:4028–4033.
7. Back MF, Ang ELL, Ng W-H, et al. (2007) Improved median survival for glioblastoma multiforme following introduction of adjuvant temozolomide chemotherapy. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 36:338–42.
8. Baker SD, Wirth M, Statkevich P, et al. (1999) Absorption, metabolism, and excretion of 14C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 5:309–317.
9. Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE (2004) Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *The New England journal of medicine* 351:2883. doi: 10.1056/NEJM200412303512724
10. Basson MD (2008) An intracellular signal pathway that regulates cancer cell adhesion in response to extracellular forces. *Cancer research* 68:2–4. doi: 10.1158/0008-5472.
11. Beadle C, Assanah MC, Monzo P, et al. (2008) The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Molecular biology of the cell* 19:3357–68. doi: 10.1091/mbc.E08-03-0319
12. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, et al. (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36:1046–69. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.013
13. Birkó Zs, Nagy B, Klekner A, Virga J: Novel Molecular Markers in Glioblastoma-Benefits of Liquid Biopsy, *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 12;21(20):7522. doi: 10.3390/ijms21207522.
14. Birol Sarica F, Tufan K, Cekinmez M, et al. (2010) Effectiveness of temozolomide treatment used at the same time with radiotherapy and adjuvant temozolomide; concomitant therapy of glioblastoma multiforme: multivariate analysis and other prognostic factors. *Journal of neurosurgical sciences* 54:7–19.
15. Blankley RT, Fisher C, Westwood M, et al. (2013) A label-free selected reaction monitoring workflow identifies a subset of pregnancy specific glycoproteins as potential predictive markers of early-onset pre-eclampsia. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12:3148–59. doi: 10.1074/mcp.M112.026872
16. Bloom HJ (1975) Combined modality therapy for intracranial tumors. *Cancer* 35:111–20.
17. Bouterfa H, Darlapp AR, Klein E, et al. (1999) Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. *Journal of neuro-oncology* 44:23–33.
18. Bowers G, Reardon D, Hewitt T, et al. (2001) The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 20:1388–97. doi: 10.1038/sj.onc.1204255
19. Bozzi M, Morlacchi S, Bigotti MG, et al. (2009) Functional diversity of dystroglycan. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 28:179–87. doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.003
20. Bradford M (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
21. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, et al. (2002) Integrins in invasive growth. *The Journal of clinical investigation* 109:999–1006. doi: 10.1172/JCI15468
22. Bukva M, Dobra G, Gomez-Perez J, Koos K, Harmati M, Gyukity-Sebestyen E, Biro T, Jenei A, Kormondi S, Horvath P, Konya Z, Klekner A, Buzas K: Raman Spectral Signatures of Serum-Derived

- Extracellular Vesicle-Enriched Isolates May Support the Diagnosis of CNS Tumors, *Cancers* (Basel) 2021 Mar 19;13(6):1407. doi: 10.3390/cancers13061407.
23. Burger P, Scheithauer B, Vogel F Surgical pathology of the nervous system and its coverings, 2nd editio. Churchill Livingstone, New York
 24. Cairncross JG, Macdonald DR (1991) Chemotherapy for oligodendroglioma. Progress report. *Archives of neurology* 48:225–7.
 25. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *Journal of the National Cancer Institute* 90:1473–9.
 26. Calogero A, Pavoni E, Gramaglia T, et al. (2006) Altered expression of alpha-dystroglycan subunit in human gliomas. *Cancer biology & therapy* 5:441–448.
 27. Chaichana KL, Chaichana KK, Olivi A, et al. (2011) Surgical outcomes for older patients with glioblastoma multiforme: preoperative factors associated with decreased survival. *Clinical article. Journal of neurosurgery* 114:587–94. doi: 10.3171/2010.8.JNS1081
 28. Chi A, Komaki R (2010) Treatment of brain metastasis from lung cancer. *Cancers* 2:2100–37. doi: 10.3390/cancers2042100
 29. Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology* 7:505–16. doi: 10.1038/nrm1962
 30. Cloughesy, T. F.; Prados, M. D.; Wen, P. Y.; Mikkelsen, Abrey, L. E.; Schiff, D. ; Yung, W. K. ; Maoxia, Z.; Dimery, I; Friedman HS (2010) A phase II, randomized, non-comparative clinical trial of the effect of bevacizumab (BV) alone or in combination with irinotecan (CPT) on 6-month progression free survival (PFS6) in recurrent, treatment-refractory glioblastoma (GBM). *Journal of Clinical Oncology, 2008 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 2010b.*
 31. Czirok A, Zamir EA, Filla MB, et al. (2006) Extracellular Matrix Macroassembly Dynamics in Early Vertebrate Embryos. *Current Topics in Developmental Biology* 73:237–258. doi: 10.1016/S0070-2153(05)73008-8
 32. Daley WP, Peters SB, Larsen M (2008) Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of cell science* 121:255–64. doi: 10.1242/jcs.006064
 33. Darkes MJM, Plosker GL, Jarvis B (2002) Temozolomide: A review of its use in the treatment of malignant gliomas, malignant melanoma and other advanced cancers. *American Journal of Cancer* 1:55–80.
 34. Delpech B, Maingonnat C, Girard N, et al. (1993) Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *European Journal of Cancer* 29:1012–1017. doi: 10.1016/S0959-8049(05)80214-X
 35. Demuth T, Berens ME (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *Journal of neuro-oncology* 70:217–28. doi: 10.1007/s11060-004-2751-6
 36. Dobra G, Bukva M, Szabo Z, Bruszel B, Harmati M, Gyukity-Sebestyen E, Jenei A, Szucs M, Horvath P, Biro T, Klekner A, Buzas K: Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(15), 5359; doi.org/10.3390/ijms21155359. Received: 26 June 2020 / Revised: 17 July 2020 / Accepted: 24 July 2020 / Published: 28 July 2020.
 37. Dogan A (2014) Advances in clinical applications of tissue proteomics: opportunities and challenges. *Expert review of proteomics* 11:531–3. doi: 10.1586/14789450.2014.953062
 38. Donato V, Papaleo A, Castrichino A, et al. Prognostic implication of clinical and pathologic features in patients with glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide. *Tumori* 93:248–56.
 39. El Ayachi I, Baeza N, Fernandez C, et al. (2010) KIAA0510, the 3'-untranslated region of the tenascin-R gene, and tenascin-R are overexpressed in pilocytic astrocytomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36:399–410. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01074.x
 40. Eller JL, Longo SL, Kyle MM, et al. (2005) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo. *Neurosurgery* 56:155–62; discussion 162.
 41. Friedlander DR, Zagzag D, Shiff B, et al. (1996) Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alphaV and beta1 integrins. *Cancer research* 56:1939–47.
 42. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. (2009) Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 27:4733–4740. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8721
 43. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. (2003) Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected].

- Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 21:2237–46. doi: 10.1200/JCO.2003.10.038
44. Gary SC, Hockfield S (2000) BEHAB/brevikán: an extracellular matrix component associated with invasive glioma. *Clinical neurosurgery* 47:72–82.
 45. Géczy D, Nagy B, Szilágyi M, Penyige A, Klekner A, Jenei A, Virga J, Birkó Z: Analysis of Circulating miRNA Profile in Plasma Samples of Glioblastoma Patients, *Int J Mol Sci* . 2021 May 11;22(10):5058. doi: 10.3390/ijms22105058.
 46. Giese A, Kluwe L, Laube B, et al. (1996) Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38:755–764.
 47. Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME (1994) Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Research* 54:3897–3904.
 48. Gladson CL (1999) The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58:1029–1040.
 49. Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC (1999) Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochirurgica* 141:295–305.
 50. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry* 65:475–502. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355
 51. Griffin C a, Burger P, Morsberger L, et al. (2006) Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65:988–994. doi: 10.1097/01.jnen.0000235122.98052.8f
 52. Grossman SA, Ye X, Piantadosi S, et al. (2010) Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16:2443–2449. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3106
 53. Guo P, Imanishi Y, Cackowski FC, et al. (2005) Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. *The American journal of pathology* 166:877–890. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62308-5
 54. Guo W, Giancotti FG (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews Molecular cell biology* 5:816–26. doi: 10.1038/nrm1490
 55. Han JY, Kim HS, Lee SH, et al. (2003) Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Lung cancer* 41:65–70. doi: S0169500203001466 [pii]
 56. Hehlhans S, Haase M, Cordes N (2007) Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1775:163–80. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.09.001
 57. Held-Feindt J, Paredes EB, Blömer U, et al. (2006) Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *International Journal of Cancer* 118:55–61. doi: 10.1002/ijc.21258
 58. Henriksson R, Asklund T, Poulsen HS (2011) Impact of therapy on quality of life, neurocognitive function and their correlates in glioblastoma multiforme: A review. *Journal of Neuro-Oncology* 104:639–646. doi: 10.1007/s11060-011-0565-x
 59. Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, et al. (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 98:362–9. doi: 10.1002/ijc.10233
 60. Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, et al. (1993) Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis. *Acta neuropathologica* 85:481–7.
 61. Hilton DA, Melling C (2004) Genetic markers in the assessment of intrinsic brain tumours. In: *Current Diagnostic Pathology*. pp 83–92
 62. Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M, et al. (2009) Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Science* 100:1451–1459. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01189.x
 63. Holdhoff M, Grossman S a (2011) Controversies in the adjuvant therapy of high-grade gliomas. *The oncologist* 16:351–358. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0335
 64. Huang J, Hu J, Bian X, et al. (2007) Transactivation of the epidermal growth factor receptor by formylpeptide receptor exacerbates the malignant behavior of human glioblastoma cells. *Cancer research* 67:5906–13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0691
 65. Hutóczki G, Bognár L, Tóth J, Scholtz B, Zahuczky G, Hanzély Z, Csósz E, Reményi-Puskár J, Kalló G, Hortobágyi T, Klekner A: Effect of concomitant radiochemotherapy on invasion potential of glioblastoma. *Pathol Oncol Res*. 2016 Jan;22(1):155-60.
 66. Hutóczki G, Virga J, Birkó Z, Klekner A: Novel Concepts of Glioblastoma Therapy Concerning Its Heterogeneity. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 16;22(18):10005

67. Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K (2007) Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. *Current opinion in oncology* 19:606–11. doi: 10.1097/CCO.0b013e3282f075f3
68. Iuga C, Seicean A, Iancu C, et al. (2014) Proteomic identification of potential prognostic biomarkers in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 14:945–955.
69. Jaeckle KA, Ballman K V, Rao RD, et al. (2006) Current strategies in treatment of oligodendroglioma: evolution of molecular signatures of response. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:1246–52. doi: 10.1200/JCO.2005.04.9874
70. Jenkins RB, Blair H, Ballman K V, et al. (2006) A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer research* 66:9852–61. doi: 10.1158/0008-5472.1796
71. Johnson JD, Young B (1996) Demographics of brain metastasis. *Neurosurgery clinics of North America* 7:337–44.
72. Jung S, Ackerley C, Ivanchuk S, et al. (2001) Tracking the invasiveness of human astrocytoma cells by using green fluorescent protein in an organotypical brain slice model. *Journal of neurosurgery* 94:80–89. doi: 10.3171/jns.2001.94.1.0080
73. Jung S, Moon K-SS, Kim S-TT, et al. (2007) Increased expression of intracystic matrix metalloproteinases in brain tumors: relationship to the pathogenesis of brain tumor-associated cysts and peritumoral edema. *Journal of Clinical Neuroscience* 14:1192–1198. doi: 10.1016/j.jocn.2006.11.009
74. Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 3:422–433.
75. Katz M, Amit I, Citri A, et al. (2007) A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nature cell biology* 9:961–9. doi: 10.1038/ncb1622
76. Khan ZA, Caurtero J, Barbin YP, et al. (2005) ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma. *Exp Lung Res* 31:701–711. doi: W40P58018XP1477U [pii]r10.1080/01902140591007236
77. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennström S, et al. (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *The EMBO journal* 16:2783–93. doi: 10.1093/emboj/16.10.2783
78. Kim HK, Lin CC, Parker D, et al. (1997) High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazin-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 703:225–33.
79. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, et al. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Molecular and cellular biology* 17:4406–18.
80. Kleihues P, Cavenee W (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. 2nd edition World Health Organization Classification of Tumours., IARC Press, Lyon
81. Klekner A, Varga I, Bognár L, et al. (2010) Extracellular matrix of cerebral tumors with different invasiveness. *Ideggyógyászati szemle* 63:38–43.
82. Klekner A, Fekete G, Rencsi M, Méhes G, Szabó P, Bognár L: Az 1p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliomákban a Debreceni Idegsebészeti klinikán. *Clin Neurosci* 2012 Jan 65(1-2) 17-24.
83. Klekner A, Hutóczki G, Virga J, Reményi-Puskár J, Tóth J, Scholtz B, Csösz E, Kalló G, Steiner L, Hortobágyi T, Bognár L: Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain. *Clin Neurol Neurosur.* 2015; 139:138-143.
84. Klekner A, Szivos L, Virga J, Árkosy P, Bognár L, Birkó Zs, Nagy B: Significance of Liquid Biopsy in Glioblastoma – A Review. *J Biotechnol.* 2019 Jun 10;298:82-87. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.04.011. Epub 2019 Apr 12.
85. Klekner A, Tóth J, Virga J, Hortobágyi T, Dér Á, Szemcsák C, Reményi-Puskár J, Bognár L: Influence of Oncotherapy and Clinical Parameters on Survival of Glioblastoma Patients: A Single Center Experience. *Neurol India.*2019 Jul-Aug; 67(4):1066-1073. doi: 10.4103/0028-3886.266257.
86. Klekner A, Varga I, Bognár L, Hutóczki G, Kenyeres A, Tóth J, Hanzély Z, Scholtz B: Különböző invazivitású agydaganatok extracelluláris mátrixának expressziója. *Ideggyógyászati Szemle* 63(1-2):38-43, 2010. Jan.
87. Klekner A, Virga J, Tóth J, Hortobágyi T, Dér A, Szemcsák C, Bognár L: The role of extracellular matrix components in the invasion of intracranial malignancies. *Magyar Onkológia* 2013 Dec 18;57(4):222-31.
88. Klekner A: Brain Tumor Invasion and Angiogenesis. In: Terry Lichtor (szerk.) *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications: Open Access Book*, Rijeka: InTech, 2013. p. Open Access. (ISBN:978-953-51-0989-1) Link(ek): Dokumentum a kiadónál, Befoglaló mű link(ek): DOI / <http://www.intechopen.com/articles/show/title/brain-tumor-invasion-and-angiogenesis>

89. Klekner A, Fekete G, Tóth J, Adamecz Zs, Ruzshti P, Varga I, Szabó P, Bogнар L (2010) Glioblasztomás betegek várható túlélésének alakulása a terápia függvényében saját beteganyagon. MANOT 2010
90. Kreisl TN, McNeill KA, Sul J, et al. (2012) A phase I/II trial of vandetanib for patients with recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology* 14:1519–26. doi: 10.1093/neuonc/nos265
91. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. (2003) Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 290:2149–58. doi: 10.1001/jama.290.16.2149
92. Kroening S, Goppelt-Struebe M (2010) Analysis of matrix-dependent cell migration with a barrier migration assay. *Science signaling* 3:p11. doi: 10.1126/scisignal.3126p11
93. Kushnir I, Tzuk-Shina T (2011) Efficacy of treatment for glioblastoma multiforme in elderly patients (65+): a retrospective analysis. *The Israel Medical Association journal: IMAJ* 13:290–294. doi: papers2://publication/uuid/B5B77DD1-5B6B-4EA1-8507-C8D9FE400CC7
94. Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, et al. (2010) Phase II Study of Bevacizumab Plus Temozolomide During and After Radiation Therapy for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. *Journal of Clinical Oncology* 29:142–148. doi: 10.1200/JCO.2010.30.2729
95. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD (2004) Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro-oncology* 6:227–35. doi: 10.1215/S1152851703000620
96. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular systems biology* 4:222.
97. Langley RR, Fidler IJ (2011) The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International Journal of Cancer* 128:2527–2535.
98. Lee EQ, Kuhn J, Lamborn KR, et al. (2012) Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro-oncology* 14:1511–8. doi: 10.1093/neuonc/nos264
99. Lee L-N, Kuo S-H, Lee Y-C, et al. (2005) CD44 splicing pattern is associated with disease progression in pulmonary adenocarcinoma. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 104:541–8.
100. Lee L-T, Huang Y-T, Hwang J-J, et al. (2004) Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effect on invasive potential of human carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* 67:2103–14. doi: 10.1016/j.bcp.2004.02.023
101. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, et al. (2004) Prognostic value of szindekán-1 expression in breast cancer. *Oncology* 67:11–18. doi: 10.1159/000080280
102. Lin Z-X, Yang L-J, Huang Q, Fu J (2010) Activated vascular endothelia regulate invasion of glioma cells through expression of fibronectin. *Chinese medical journal* 123:1754–61.
103. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25:402–408.
104. Lo CK, Yu CH, Ma CC, et al. (2010) Surgical management of primary non-small-cell carcinoma of lung with synchronous solitary brain metastasis: Local experience. *Hong Kong Medical Journal* 16:186–191.
105. Lomonaco SL, Finnis S, Xiang C, et al. (2011) Cilengitide induces autophagy-mediated cell death in glioma cells. *Neuro-oncology* 13:857–65. doi: 10.1093/neuonc/nor073
106. Lortat-Jacob H, Grimaud JA (1994) [The extracellular matrix: from supporting tissue to regulation of cytokines]. *Pathologie-biologie* 42:612–20.
107. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 114:97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
108. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* 350:2129–39. doi: 10.1056/NEJMoa040938
109. Mahesparan R, Read T-A, Lund-Johansen M, et al. (2003) Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropath* 105:49–57.
110. Martínez-Aguilar J, Molloy MP (2013) Label-free selected reaction monitoring enables multiplexed quantitation of S100 protein isoforms in cancer cells. *Journal of proteome research* 12:3679–88. doi: 10.1021/pr400251t
111. Masuda-Nakagawa LM, Nicholls JG (1991) Extracellular matrix molecules in development and regeneration of the leech CNS. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 331:323–35. doi: 10.1098/rstb.1991.0024
112. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *The New England journal of medicine* 353:2012–24. doi: 10.1056/NEJMoa051918
113. Mikkelsen T, Brodie C, Finnis S, et al. (2009) Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *International journal of cancer* 124:2719–27. doi: 10.1002/ijc.24240

114. Mocanu M-M, Fazekas Z, Petrás M, et al. (2005) Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer letters* 227:201–12. doi: 10.1016/j.canlet.2005.01.028
115. Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, et al. (2002) Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *The American journal of pathology* 161:313–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64183-1
116. Murnyák B, Csonka T, Hegyi K, Méhes G, Klekner A, Hortobágyi T: Occurrence and molecular pathology of high grade gliomas. *Ideggyógyászati Szemle* 2013;66(9–10):312–321.
117. Murnyák B, Csonka T, Klekner A, Hortobágyi T: Occurrence and molecular pathology of low grade gliomas. *Ideggyógyászati Szemle* 2013;66(9–10):305–311.
118. Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, et al. (2007) Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:1651–7. doi: 10.1200/JCO.2006.06.6514
119. Nackaerts K, Verbeken E, Deneffe G, et al. (1997) Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells. *International Journal of Cancer* 74:335–345. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970620)74:3<335::AID-IJC18>3.0.CO;2-A
120. Naggi A (1991) Characterisation of the glycosaminoglycan component of matrix. *Drugs under experimental and clinical research* 17:21–5.
121. Nakada M, Miyamori H, Kita D, et al. (2005) Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevikan. *Acta Neuropathologica* 110:239–246. doi: 10.1007/s00401-005-1032-6
122. Nathoo N, Goldlust S, Vogelbaum MA (2004) Epidermal growth factor receptor antagonists: novel therapy for the treatment of high-grade gliomas. *Neurosurgery* 54:1480–8; discussion 1488–9.
123. Nicholson C, Syková E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences* 21:207–215. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01261-2
124. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 37 Suppl 4:S9–15.
125. Niki T, Kohno T, Iba S, et al. (2002) Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *The American journal of pathology* 160:1129–41. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64933-4
126. Nolte SM, Venugopal C, McFarlane N, et al. (2013) A cancer stem cell model for studying brain metastases from primary lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 105:551–62. doi: 10.1093/jnci/djt022
127. Novak U, Kaye AH (2000) Extracellular matrix and the brain: components and function. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 7:280–290. doi: 10.1054/jocn.1999.0212
128. Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I (2011) Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathology* 28:13–24. doi: 10.1007/s10014-010-0007-z
129. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. (2014) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncology* 16 :iv1–iv63. doi: 10.1093/neuonc/nou223
130. Oz B, Karayel F a, Gazio NL, et al. (2000) The distribution of extracellular matrix proteins and CD44S expression in human astrocytomas. *Pathology oncology research: POR* 6:118–124. doi: 10.1007/BF03032361
131. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, NY)* 304:1497–500. doi: 10.1126/science.1099314
132. Pakula R, Melchior A, Denys A, et al. (2007) Szindekán-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* 17:492–503. doi: 10.1093/glycob/cwm009
133. Paulus W (1998) *Brain extracellular matrix, adhesion molecules, and glioma invasion. Brain tumor invasion: biological, clinical and therapeutic considerations* Wiley-Liss, New York 301–322.
134. Paulus W, Baur I, Beutler AS, Reeves SA (1996) Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 75:819–826.
135. Petrás M, Hutóczki G, Varga I, et al. (2009) [Expression pattern of invasion-related molecules in brain tumors of different origin]. *Magyar onkológia* 53:253–8. doi: 10.1556/MOnkol.53.2009.3.3
136. Petrás M, Hutóczki G, Varga I, et al. (2009) Expression pattern of invasion-related molecules in cerebral tumors of different origin. *Magyar Onkológia* 53:253–258. doi: 10.1556/MOnkol.53.2009.3.3
137. Petrás M, Lajtós T, Friedländer E, Klekner A, Pintye E, Feuerstein BG, Szöllösi J, Vereb G: Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin-β1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt mediated in vitro radioresistance. *Neuro Oncol.* 2013 Aug;15(8):1027-40.

138. Petrás M, Varga I, Vereb G, Szöllösi J, Hutóczki G, Bognár L, Ruzshti P, Kenyeres A, Tóth J, Hanzély Z, Scholtz B, Klekner A: Különböző eredetű malignus agydaganatok invazivitásának panelszerű vizsgálata. *Magyar Onkológia*, 2009; 53(3):253-8.
139. Pfannschmidt J, Dienemann H (2010) Surgical treatment of oligometastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 69:251–258. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.05.003
140. Pirinen R, Leinonen T, Bohm J, et al. (2005) Verzikán in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis. *Human pathology* 36:44–50. doi: 10.1016/j.humpath.2004.10.010
141. Pirinen R, Tammi R, Tammi M, et al. (2001) Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 95:12–17. doi: 10.1002/1097-0215(20010120)95:1<12::AID-IJC1002>3.0.CO;2-E
142. Portnow J, Badie B, Chen M, et al. (2009) The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15:7092–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1349
143. Raghavan R, Balani J, Perry A, et al. (2003) Pediatric oligodendrogliomas: a study of molecular alterations on 1p and 19q using fluorescence in situ hybridization. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:530–7.
144. Ranuncolo SM, Ladedo V, Specterman S, et al. (2002) CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol* 79:30–5; discussion 35–6.
145. Razis E, Selviaridis P, Labropoulos S, et al. (2009) Phase II study of neoadjuvant imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15:6258–66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1867
146. Reddy KS (2008) Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas. *Cancer genetics and cytogenetics* 184:77–86. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.03.009
147. Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:111–26.
148. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, et al. (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *The American journal of pathology* 145:1175–90.
149. Rich JN, Hans C, Jones B, et al. (2005) Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer research* 65:4051–8. doi: 10.1158/0008-5472
150. Rich JN, Rasheed BKA, Yan H (2004) EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *The New England journal of medicine* 351:1260–1; author reply 1260–1.
151. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A (2004) From cell-ECM interactions to tissue engineering. *Journal of cellular physiology* 199:174–80. doi: 10.1002/jcp.10471
152. Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M (1988) The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *Journal of neurosurgery* 69:155–70. doi: 10.3171/jns.1988.69.2.0155
153. Sabari J, Lax D, Connors D, et al. (2011) Fibronectin matrix assembly suppresses dispersal of glioblastoma cells. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0024810
154. Salazar OM, Rubin P, Feldstein ML, Pizzutiello R (1979) High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 5:1733–1740.
155. Sartor CI (2003) Epidermal growth factor family receptors and inhibitors: radiation response modulators. *Seminars in radiation oncology* 13:22–30. doi: 10.1053/srao.2003.50003
156. Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, et al. (2003) ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* 22:5855–65. doi: 10.1038/sj.onc.1206698
157. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, et al. (2010) Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* 107:799–807. doi: 10.3238/arztebl.2010.0799
158. Shah L, Walter KL, Borczuk AC, et al. (2004) Expression of szindekán-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 101:1632–1638. doi: 10.1002/cncr.20542
159. Shibata S, Fukada K, Suzuki S, et al. (2001) Histochemical localisation of verzikán, aggrecan and hyaluronan in the developing condylar cartilage of the fetal rat mandible. *J Anat* 198:129–135.
160. Shirai K, Siedow MR, Chakravarti A (2012) Antiangiogenic therapy for patients with recurrent and newly diagnosed malignant gliomas. *Journal of oncology* 2012:193436. doi: 10.1155/2012/193436
161. Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al. (1999) Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 18:4144–52. doi: 10.1038/sj.onc.1202759

162. Smith JS, Jenkins RB (2000) Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 5:D213–31. doi: 10.2741/Smith
163. Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al. (2000) Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18:636–45.
164. Soroceanu L, Manning TJ, Sontheimer H (2001) Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33:107–17.
165. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al. (2007) Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science (New York, NY)* 318:287–90. doi: 10.1126/science.1142946
166. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 10:459–466. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
167. Stupp R, Hottinger AF, van den Bent MJ, et al. (2008) Frequently asked questions in the medical management of high-grade glioma: A short guide with practical answers. *Annals of Oncology*. doi: 10.1093/annonc/mdn474
168. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* 352:987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
169. Sunami E, Tsuno N, Osada T, et al. (2000) MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *The oncologist* 5:108–14. doi: 10.1634/theoncologist.5-2-108
170. Szelachowska J, Jelen M, Kornafel J (2006) Prognostic significance of intracellular laminin and Her2/neu overexpression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* 26:3871–3876.
171. Szivos L, Virga J, Hortobágyi T, Zahuczky G, Uray I, Jenei A, Bognár L, Árkosy P, Klekner A: [Prognostic significance of invasion in glioblastoma] *Ideggyogy Sz* . 2020 Sep 30;73(9-10):317-325. doi: 10.18071/isz.73.0317.
172. Szivos L, Virga J, Klekner A, Árkosy P: [The role of low grade glioma prognostic factors in therapeutic choices - summary of international literature and recommendations with conclusions] *Magy Onkol* 2021 Mar 17;65(1):59-70. Epub 2020 Aug 24.
173. Tews DS (2000) Adhesive and invasive features in gliomas. *Pathol Res Pract* 196:701–711. doi: 10.1016/S0344-0338(00)80122-3
174. Tóth J, Egervári K, Klekner A, Bognár L, Szántó J, Nemes Z, Szöllösi Z: Analysis of EGFR gene amplification, protein over-expression and tyrosine kinase domain mutation in recurrent glioblastoma. *Pathol Oncol Res*. 2009 Jun;15(2):225-9.
175. Trog D, Yeghiazaryan K, Fountoulakis M, et al. (2006) Pro-invasive gene regulating effect of irradiation and combined temozolomide-radiation treatment on surviving human malignant glioma cells. *European Journal of Pharmacology* 542:8–15. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.05.026
176. Van den Bent MJ, Looijenga LHJ, Langenberg K, et al. (2003) Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer* 97:1276–84. doi: 10.1002/cncr.11187
177. Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C (2008) Oligodendroglioma. *Critical reviews in oncology/hematology* 66:262–72. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.11.007
178. Varga I, Hutóczki G, Petrás M, et al. (2010) Expression of invasion-related extracellular matrix molecules in human glioblastoma versus intracerebral lung adenocarcinoma metastasis. *Zentralblatt für Neurochirurgie* 71:173–180. doi: 10.1055/s-0030-1249698
179. Varga I, Hutóczki G, Szemcsák CD, et al. (2012) Brevikán, neurokán, tenascin-C and verzikán are mainly responsible for the invasiveness of low-grade astrocytoma. *Pathology and Oncology Research* 18:413–420.
180. Varga I, Hutóczki G, Petrás M, Kenyeres A, Scholtz B, Mikó E, Hanzély Z, Tóth J, Bognár L, Zahuczky G, Klekner A: Expression of invasion-related extracellular matrix molecules in human glioblastoma versus intracerebral lung adenocarcinoma metastasis. *Cen Eur Neurosurg*, 2010 Nov;71(4):173-80.
181. Varga I, Hutóczki G, Szemcsák C, Zahuczky G, Tóth J, Adamecz Z, Kenyeres A, Bognár L, Hanzély Z, Klekner A.: Brevican, neurocan, tenascin-C and versican are mainly responsible for the invasiveness of low-grade astrocytoma. *Pathol Oncol Res*, 2012 Apr;18(2):413-20.
182. Veeravalli KK, Rao JS (2012) MMP-9 and uPAR regulated glioma cell migration. *Cell Adhesion and Migration* 6:509–512. doi: 10.4161/cam.21673
183. Vereb G, Nagy P, Park JW, Szöllösi J (2002) Signaling revealed by mapping molecular interactions. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2:169–186. doi: 10.1016/S1529-1049(02)00044-2

184. Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT (2008) BEHAB/brevikan requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 88:261–272. doi: 10.1007/s11060-008-9575-8
185. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, Csósz É, Kalló G, Zahuczki G, Steiner L, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Klekner A: The experimental pattern of invasion-related extracellular matrix molecules in CNS tumors. *Cancer Invest.* 2018 Dec 3:1-12. doi: 10.1080/07357907.2018.1545855. [Epub ahead of print]
186. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, Zahuczky G, Csósz E, Kalló G, Tóth J, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Steiner L, Klekner A: Prognostic role of the expression of invasion-related molecules in glioblastoma. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg.* 2017; 78(01): 12-19.
187. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, Zahuczky G, Csósz E, Kalló G, Tóth J, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Steiner L, Klekner A: Tumor grade versus expression of invasion-related molecules in astrocytoma. *Pathol Oncol Res.* 2018 Jan;24(1):35-43.
188. Virga J, Szemcsák C., Reményi-Puskár J, Tóth J, Hortobágyi T, Csósz E, Zahuczky G, Szivos L, Bognár L, Klekner A: Differences in extracellular matrix composition and its role in invasion in primary and secondary intracerebral malignancies. *Anticancer Res.* 2017 Aug;37(8):4119-4126.
189. Virga J, Szivos L, Hortobágyi T, Kouhsari MC, Zahuczky G, Steiner L, Tóth J, Reményi-Puskár J, Bognár L, Klekner A: Extracellular matrix differences in glioblastoma patients with different prognoses. *Oncol Lett.* 2019 Jan;17(1):797-806. doi: 10.3892/ol.2018.9649. Epub 2018 Oct 31.
190. Walker MD, Alexander E, Hunt WE, et al. (1978) Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *Journal of neurosurgery* 49:333–343. doi: 10.3171/jns.1978.49.3.0333
191. Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. (1980) Randomized Comparisons of Radiotherapy and Nitrosoureas for the Treatment of Malignant Glioma After Surgery. *New England Journal of Medicine* 303:1323–1329. doi: 10.1056/NEJM198012043032303
192. Walker MD, Strike TA, Sheline GE (1979) An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 5:1725–1731. doi: 10.1016/0360-3016(79)90553-4
193. Watanabe A, Mabuchi T, Satoh E, et al. (2006) Expression of szindekán, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of szindekán-1 expression. *Journal of neuro-oncology* 77:25–32. doi: 10.1007/s11060-005-9010-3
194. Westhoff MA, Zhou S, Bachem MG, et al. (2008) Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells. *Oncogene* 27:5169–81. doi: 10.1038/onc.2008.148
195. Wharton SB, Maltby E, Jellinek DA, et al. (2007) Subtypes of oligodendroglioma defined by 1p,19q deletions, differ in the proportion of apoptotic cells but not in replication-licensed non-proliferating cells. *Acta neuropathologica* 113:119–27. doi: 10.1007/s00401-006-0177-2
196. Wiranowska M, Ladd S, Smith SR, Gottschall PE (2006) CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biology* 35:159–172. doi: 10.1007/s11068-007-9009-0
197. Wrensch M, Minn Y, Chew T, et al. (2002) Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology* 4:278–99. doi: 10.1093/neuonc/4.4.278
198. Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, et al. (1996) Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Research* 56:182–189.
199. Zamecnik J., Vargova L., Homola A., et al. (2004) Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 30:338–350.
200. Zhang H, Berezov A, Wang Q, et al. (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *The Journal of clinical investigation* 117:2051–8. doi: 10.1172/JCI32278.