

**ASZTROCITÓMÁK INVAZIVITÁSÁNAK SZEREPE A SZEMÉLYRE SZABOTT
ONKOTERÁPIÁBAN**

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

DR. KLEKNER ÁLMOS



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI KÖZPONT
IDEGSEBÉSZETI KLINIKA**

Debrecen, 2016

BEVEZETÉS

A primer agydaganatok legnagyobb csoportját alkotó asztrocitómák az agyállomány támasztószövetét képező gliasejtekből származtathatók. Megjelenésük és agresszivitásuk alapján a WHO I-IV. grádusba sorolja őket, melyek közül a legnagyobb jelentőségű a külön névvel illetett IV. grádusú asztrocitóma, vagyis *glioblastoma multiforme* (GBM). A glioblasztóma incidenciája az Egyesült Államokban 3,2:100.000/év, férfiakban mintegy másfélszer gyakoribb, mint nőkben. Tipikusan a középkorúak betegsége, 40 és 65 év között fordul elő a leggyakrabban, a betegek átlagéletkora 54 év. A gliómák az összes intrakraniális tumor 30-35%-áért felelősek. A felnőttekben a gliómák között a leggyakoribb (55%) tumor a glioblasztóma, és az összes malignus primer intrakraniális daganat 46%-át képezi. A hosszú távú túlélés nagyon ritka, és csupán a legújabb terápiás eszközök bevezetésével vált elérhetővé a 9,8%-os öt éves túlélés. Terápia nélkül a glioblasztóma várható átlagos túlélése nem több mint 3-6 hónap. A gyakorlatilag biztosra vehető daganatküijulás egyik fő oka, hogy a GBM kifejezett infiltratív tulajdonsággal bír és ezáltal teljes sebészeti reszekciója szinte soha nem kivitelezhető.

A központi idegrendszer (KIR) sejtjeit a szervezet többi sejtjeihez hasonlóan egy fehérjében és rostban gazdag állomány, az extracelluláris mátrix (ECM) veszi körül. Az ECM szövet-specifikus, dinamikus és aktív környezetet biztosít a sejteknek, ill. sejt-ECM kapcsolaton és másodlagos jelátviteli útvonalakon keresztül meghatározó szereppel bír különböző fiziológiás és patológiai folyamatokban, mint például a sejtmozgás, differenciálódás, génexpresszió, hisztogenezis valamint a rosszindulatú daganatok terjedése. A tumorsejtek inváziója során szoros kapcsolat alakul ki a daganatsejt és az ECM között. Az intrakraniális daganatokat igen jól lehet jellemezni eltérő invazív potenciáljukkal, ami nagymértékben függ ettől a sejt-ECM kapcsolattól. A kifejezetten invazív malignus gliómák jelentősen különböznek a csaknem gömb alakú agyi áttétektől és a peritumorális agyszövet infiltrációja a legtöbb esetben lehetetlenné teszi radikális eltávolításukat. Ezzel szemben egy átlagos szoliter agyi áttéti daganat sebészi reszekciója általában rutin idegsebészeti feladatnak számít. Az ECM-nek kiemelkedő szerepe van az anaplasztikus daganatok meglepően eltérő mértékű invazív viselkedésében.

Korábban évtizedeken keresztül egyedül a radioterápia szolgált posztoperatív terápiás lehetőségként a glioblasztómás betegek kezelésében. A sugárterápia önmagában alkalmazva a betegek átlagos túlélési idejét a kezelés nélkül várható 3-6 hónapról körülbelül 9-12 hónapra emelte.

A GBM kezelésében 2006 óta világszerte elfogadott kezelési mód a 6 héten át tartó konkuráló kemo-irradiáció, melynek során a betegek naponta (összesen 30 alkalommal) 1,8-2,0 Gy sugárkezelésben (*focal brain radiotherapy, FBRT*) és ezzel együtt napi 75mg/m² *per os* temozolomid (TMZ) terápiában, majd további legalább 6 ciklus TMZ monoterápiában részesülnek. Ez a jelenleg is aktuális kezelési protokoll a túlélési paraméterek javulását hozta: az átlagos progressziómentes túlélés 4,5 hónapról 6,9 hónapra, a teljes túlélés 8,6 hónapról 14,6 hónapra javult.

A TMZ egy olyan orális alkiláló ágens, amelyet vér-agy gáton történő permeabilitása alkalmassá tesz a gliómák kezelésére. A TMZ fiziológiás pH értéken spontán hidrolizál 3-metil-(triazén-1-yl) imidazole-4-karboxamiddá (MTIC), ami tovább hidrolizál 5-amino-imidazol-4-karboxamiddá (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 a replikáció során a DNS leány-szál törését okozzák, ami a sejt apoptózisához vezet.

A TMZ dozírozásánál a szövödmények előfordulási valószínűsége (mieloszuppresszív hatás) az elsődleges korlátozó szempont. Az intratumorális lokális koncentráció emelése anélkül fokozná az antiproliferatív hatást, hogy a mellékhatások előfordulása növekedne. A glioblasztómás betegek terápiája során alkalmazott kezelési protokollban az irradiáció fizikai hatásának tulajdonított átmeneti vér-agy-gát permeabilitás-fokozódástól 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 módszerre van szükség, mely az igen alacsony koncentrációjú TMZ-t olyan, erősen komplex biológiai mintából, mint a humán szérum gazdaságosan, nagy biztonsággal detektálni képes. A kemoterápiás készítmények összehasonlításához, a legmegfelelőbb kiválasztásához emellett az intratumorális gyógyszerkoncentráció ismerete jelentős segítséget nyújtana, de erre vonatkozó irodalmi adatok eddig még nem születtek.

A TMZ alkalmazása mellett széles körben folynak a kutatások további kemoterápiás készítmények kifejlesztésére, melyek érdemi megoldást jelenthetnének a recidíva problémájára, azonban az átütő siker még várat magára. A jövőbeni elképzelések alapját az antiproliferatív hatásmechanizmust kiegészítő, új támadáspontú készítmények kutatása adja.

A magas proliferációs ráta és az invazív jelleg mellett a malignus gliómák kezelési sikertelensége sokszor a daganatos sejtek csökkent kemo- és radioszenzitivitásának tulajdonítható. Ma már számos, a radiorezisztenciával összefüggésbe hozható mechanizmus felderítésre került, azonban a háttérükben álló molekuláris interakciók még mindig meghatározatlanok. Ráadásul, a DNS károsodásra adott elégtelen válasz, a sejtfelszíni molekulák, köztük a növekedési faktor receptorok kóros együttműködése miatt kialakult szabályozatlan jelátvitel szintén fontos szerephez jut. Az *epidermal growth factor receptor* (EGFR, vagy ErbB1) gyakori funkciószertő mutációja a malignus gliómákban már régóta ismert. Az ErbB1 receptor tirozin-kinázok az ionizáló sugárzásokra adott válaszreakciókban és rezisztencia kialakításában vesznek részt, az emelkedett ErbB1-szint csökkent radioszenzitivitással jár a magas grádusú asztrocitoma sejtekben. Azt is kimutatták, hogy a tumorsejtek több, az ErbB családba tartozó molekulát expresszálhatnak, amelyek homo- és heteroasszociálódhatnak a jelátviteli folyamatok során. Továbbá, a tumoros sejtek túlélése és proliferációja nagyban függ a sejt és annak környezete (ECM) közötti kölcsönhatástól és a funkcionális kapcsolatok bizonyos sejt adhéziós molekulák és a receptor tirozin-kinázok között hozzájárulhatnak a kemo- és radiorezisztencia kialakulásához. Az egymással asszociálódott receptor tirozin-kinázok és sejtadhéziós molekulák koaktivációja redundáns szignálokat küld a citoplazmába és ezzel befolyásolja a sejtek választ a célzott terápiákra. Nem véletlen tehát, hogy az EGFR és kapcsolódó membránreceptorok vizsgálata napjainkban is a kutatások egyik fő témáját képviseli.

Összegzőként elmondhatjuk, hogy jelenleg a primer agytumrok kuratív onkoterápiája még nem ismert. Az intenzív sejtosztódás, a szignifikáns peritumorális beszűrődés, a csökkent radio- és kemoszenzitivitás és a fokozott angiogenezis együttesen felelős a gliómák kiemelkedően magas recidíva-arányáért. A nemrégiben bevezetett kemoterápiás szerek hatékonyságának átmeneti jellege miatt valószínűleg kombinált terápia hozhatna javuló eredményeket. Ezért amellet, hogy komoly erőfeszítések történnek nagy specifitású tumormarkerek kutatására, az aktuális onkoterápia ineffektivitásának vizsgálata és a gliómák inváziója molekuláris spektrumának feltárása sokat elárulna a különböző szövettani típusú és grádusú tumorcsoportok várható biológiai viselkedéséről és jelentősen

hozzájárulna a neuro-onkológia fejlődéséhez. A releváns irodalmi adatok szerint a személyre szabott kemoterápiához, ill. egyedi anti-tumor célpontok kiválasztásához a gliómák inváziójában kulcsszerepet betöltő molekulák meghatározása komoly segítséget nyújthat. Kutatásainkat ezek alapján egyrészt a jelenlegi onkoterápia ineffektivitása okainak feltárása, másrészt a peritumorális invázió molekuláris hátterének megismerése vezette.

CÉLKITŰZÉSEK

A jelenlegi szerény neuro-onkológiai kezelési eredmények hátterének megismeréséhez és az onkoterápia hatékonyságának fokozása céljából kutatásainkhoz a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg.

1. Mivel minden vizsgálat saját beteganyagon történik, ezért első lépésben a Debreceni Idegsebészeti Klinikán kezelt betegek mintagyűjtését szükséges megszervezni. A szabályozott formában, etikai engedéllyel és kutatási célokra alkalmas szövetminták gyűjtése, tárolása és kezelése céljából Tumor- és Szövetbankot kell létrehozni. A glioblasztómás betegek klinikai paramétereinek feldolgozásával párhuzamosan adatbankot is érdemes kialakítani. Ennek segítségével meg lehet majd határozni a jelenlegi onkoterápia effektivitását és újra lehet értékelni a klinikai betegadatok prognosztikai szerepét valamint az idegsebészeti műtéti ellátás kiterjesztésének jelentőségét.
2. A betegadatok feltérképezése után a genetikai prognosztikai faktorok saját betegpopuláción megvalósuló klinikai relevanciájának meghatározását és az 1p19q kodelécio vizsgálati eredményeinek és onkoterápiát befolyásoló prediktív szerepének elemzését tűztük ki célul.
3. A klinikai adatok elemzését követően a primer malignus agydaganatok kezelésében bázisterápiának számító TMZ mérsékelt hatékonyságának okait célszerű meghatározni. Ehhez elengedhetetlenül szükséges a TMZ szérumbeli aktuális koncentrációja rutinszerű kimutatásának és intratumorális koncentrációja objektív meghatározásának technikáját kidolgozni. Ennek során a GBM kezelésének konkuráló fázisában *per os* adott TMZ sugárterápiához viszonyított optimális időbeni alkalmazására tudnánk javaslatot tenni, és célkitűzés az irodalomban még nem szereplő, humán glioblasztómában kemoterápiás készítmény intratumorális koncentrációjára vonatkozó objektív adatot szolgáltatni.
4. Miután megállapítottuk a jelenlegi onkoterápia korlátainak egyes fő tényezőit, a glioblasztómás betegek sugár- és kemoszenzitivitására utaló prognosztikai faktorok meghatározása a cél. A korábbi eredmények alapján e szempontból ígéretesnek tűnő EGFR és integrin expresszió szerepének vizsgálatát tekintettük feladatunknak. Egyrészt a két célmolekula sejtfelszíni asszociációjának asztrocitómákra vonatkozó prognosztikai jelentőségének megítélése, másrészt a TKI-ok GBM kezelésében várható potenciális effektivitását előrevetítő EGFR amplifikáció és mutáció meghatározása a kutatásunk célja.
5. Megértve a kemo- és sugárterápia effektivitásának korlátait, a gliómák műtéti reszekálabilitása molekuláris hátterének vizsgálatát tűztük ki célul. Ehhez elsősorban az invázióban szerepet játszó ECM komponenseket kell azonosítani, majd a környező agyállományt különböző mértékben infiltráló tumorok (intracerebrális metasztázis *versus* glióma) inváziójának elemzését fogalmaztuk meg teendőként. Kérdésünk, hogy milyen molekuláris mechanizmusok állnak a különböző szövettani besorolású, de egyaránt anaplasztikus intracerebrális daganatok igen eltérő mértékű inváziója mögött?

6. Felismerve a GBM kezelési kudarcának egyik fő okaként szerepeltethető kiterjedt peritumorális inváziót, ezen a vonalon tovább kutatva elemeznünk kell a konkuráló kemo-irradiáció gliómák invazivitására gyakorolt hatásának molekuláris szintű manifesztációit kezelés előtti és kezelés utáni GBM mintákon. Kérdésünk, hogy a jelenlegi onkoterápia elősegíti-e a kiújuló GBM műtéti reszekábilítást, azaz van-e kimutatható inváziót gátló hatása?

7. A gliómák peritumorális inváziójának közelebbi megismeréséhez a tumort befogadó környező agyállomány szerepével kapcsolatban merülnek fel kérdések. Így folytatva a különböző eredetű anaplasztikus daganatok (pulmonális adenokarcinóma agyi áttéte *versus* GBM) eltérő mértékű inváziója magyarázatának kutatását, a peritumorális agyállomány tumoros infiltrációval kapcsolatban fellépő védekező reakcióinak feltárását is célkitűzéseink közé soroltuk. Ezáltal az irreszekábilítást eredményező tumorinvázió mindkét oldalának résztvevőjét vizsgálva lehet a folyamatról egységes képet alkotni és tumor-specifikus személyre szabott onkoterápiához új adatokat szolgáltatni.

8. Mivel GBM esetében a hosszútávú túléléshez szükséges teljes műtéti eltávolítás a peritumorális invázió miatt nem kivitelezhető és a mindig bekövetkező lokális recidiváért is ez tehető felelőssé, az inváziós molekuláknak a várható túlélésre gyakorolt hatása nem kérdéses. Ennek a megfigyelésnek az objektív meghatározásához azt szükséges megvizsgálnunk, hogy az invázióban szerepet játszó ECM alkotók expressziója milyen összefüggést mutat a glioblasztómás betegek túlélésével, és ez GBM esetében új prognosztikai faktornak minősíthető-e?

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

1. A Neuro-onkológiai Labor kialakítása

A jelen tézisekben szereplő tudományos eredmények mindegyike a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Idegsebészeti Klinikán kezelt betegek klinikai paramétereinek, tumor- és szövetmintáinak feldolgozásából származik. Ezeket a kutatásokat az Idegsebészeti Klinikán létrehozott Neuro-onkológiai Labor keretei között működő Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank (a továbbiakban Agydaganatbank) által nyújtott lehetőségek alapozták meg. Az Agydaganatbank működéséhez a mintát a Kölni Idegsebészeti Klinikán működő Neuro-onkológiai Laborban található hasonló tumorbank adta. Az Agydaganatbank TUKEB engedéllyel rendelkezik, melyet kétfévente beszámoló alapján hosszabbít meg az illetékes Bizottság.

2. Tumorminták és módszerek

Az Agydaganatbank számára egyrészt intraoperatív gyorsfagyasztott szövetminta-gyűjtést végeztünk, de emellett további humán szövetminták (liquor, nyál, bronchusváladék, vér, szérum) gyűjtése és mélyfagyasztott állapotban történő tárolása is megvalósult. Az intraoperatív mintagyűjtésnek kiemelkedő előnye, hogy a lefagyasztott szövetminták később nem csak morfológiai vizsgálatokra, molekulák mennyiségi analízisére, hanem funkcionális vizsgálatok céljára (elsősorban enzimaktivitás meghatározására) is alkalmasak maradnak (szemben pl. a formalin fixált mintákkal). További előny, hogy a rutinszerű 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 működési 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 archivált szövetmintát, 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 elsősorban a funkcionális idegsebészeti műtétekből (pl. epilepszia-sebészet) származó mintákat gyűjtjük, de a beékelődés elhárítását célzó *uncus gyri hippocampi* vagy *tonsilla cerebelli* eltávolítása, illetve alkalmanként a frontális vagy temporális pólus reszekció is felbecsülhetetlen értékű minták gyűjtésére ad alkalmat. Ennek köszönhetően alakult ki ugyanis egy nem-tumoros, számos szempontból normálisnak tekinthető agyszövetgyűjtemény, mely nemzetközi szinten is egyedülálló és minden tumorszövetet célzó tudományos kutatáshoz referenciaszövetként funkcionáló mintákat szolgáltat.

Jelen kutatásainkhoz a következő szövetmintákat használtuk fel és az alábbi vizsgálmódszereket alkalmaztuk:

1. A jelenlegi onkoterápia hatékonyságának megítélését célzó vizsgálatunkban 104 olyan agydaganatos beteg adatait dolgoztuk fel, akiknél 2002 és 2012 között glioblasztóma miatt idegsebészeti műtét történt. A posztoperatív terápia alapján a pácienseket öt csoportba osztottuk. Voltak betegek, akik állapotuk alapján semmilyen onkoterápiában nem részesültek, ezt követte a palliatív radioterápia csoportja, majd a teljes dózisu sugárterápia, a kombinált radio-kemoterápia és végül az ezt kiegészítő bevacicumabbal is kezelt betegek csoportja.

2. Az 1p/19q kodeláció saját beteganyagon történő klinikai relevanciájának meghatározásához 2006 és 2008 között összesen 28, a Debreceni Idegsebészeti Klinikán operált beteg esetében történt a műtét után 1p/19q-kodeláció meghatározás a DE KK Patológiai Intézetben. 9 Gr II oligoasztrocitómás, 10 Gr II oligodendrogliómás, 3 Gr III oligoasztrocitómás és 6 Gr III oligodendrogliómás beteg klinikai adatait vetettük össze a genetikai vizsgálat eredményével. 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 és teljes túlélésre vonatkozó prognosztikai szerepét a különböző grádusú tumorok, illetve a különböző posztoperatív onkoterápiában részesült betegek vonatkozásában.

3. A TMZ szint meghatározásához két glioblasztómás beteg szérum mintáját (a vérmintákat az egyszeri 400 mg dózisu TMZ orális alkalmazása után 60 perccel vettük le) és két nem tumoros beteg szérum mintáját alkalmaztuk. A TMZ intratumorális koncentrációjának meghatározásához a tumormintákat egy jobb frontális rekurrens glioblasztómás beteg idegsebészeti operációja során szereztük be. A beteg temozolomid monoterápiában részesült és az utolsó temozolomid adagját (400mg) követően rapid állapotrosszabbodás miatt került műtetre. Annak érdekében, hogy közel radikális tumorreszekciót lehessen elérni, a tumorszövet melletti peritumorális agyállomány is eltávolításra került, mely mint nem-tumoros szövetminta szerepelt a vizsgálatok során. A tumormintákat és a nem tumoros agyszövetmintákat liofilizáltuk és homogenizáltuk, majd ezt

követően egy erre a célra kidolgozott oldási technikát követően tettük alkalmassá a kapilláris elektroforézissel (CE) végzett mérésekre.

A CE mérésekhez egy HP3D CE modellt használtunk (Agilent, Waldbronn, Germany).

4. Az EGFR-integrin expresszió és asszociáció vizsgálatához intraoperatív frissen fagyasztott II-es és IV-es grádusú asztrocitómák szöveti metszeteiről készültek fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérések konfokális mikroszkóp (Zeiss LSM510 CLSM, Carl Zeiss, Jena, Németország) használatával.

Az EGFR amplifikáció vizsgálatához 20 rekurrens glioblasztómával rendelkező páciens mintáit vizsgáltunk meg. Minden páciens idegsebészeti beavatkozásban illetve legalább radioterápiában részesült majd ezután újult ki a daganatuk. Az EGFR expressziót immunhisztokémiai vizsgálattal, az EGFR génamplifikációt fluoreszcens in-situ hibridizáció alkalmazásával határoztuk meg. Az EGFR mutáció meghatározásához Nested PCR és DNS szekvenálást végeztünk.

5. Az inváziós panel vizsgálatához összesen 20 GBM, 29 tüdő adenokarcinóma agyi áttéti daganat, 23 nem-tumoros agyszövet, 8 II-es grádusú asztrocitóma és 8 schwannoma szövetmintát használtunk fel, melyeken különböző számú, összesen 92 ECM komponens mRNS és proteinszintű expresszióját határoztuk meg. Az mRNS expressziót TaqMan Low Density Array (TLDA) használatával, (Applied Biosystems 7900HT real-time PCR Micro Fluidic Card upgrade-ben, USA), a fehérje mennyiségi analízist tömegspektrométer alkalmazásával határoztuk meg.

6. Az onkoterápia inváziós panelre gyakorolt hatásának meghatározásához 31, rutin idegsebészeti műtét során eltávolított és intraoperatív gyorsfagyasztott humán GBM szövetmintát vizsgáltunk. 15 minta onkoterápiában még nem részesült betegől származott, 16 esetben pedig sugár- és kemoterápiát követően kiújult daganat reszekciója során nyert tumorszövetet dolgoztunk fel. A szövetmintákban vizsgált inváziós panel 19, korábbi eredményeink alapján kiválogatott extracelluláris mátrix alkotóelemből állt, melyek RNS és fehérje szintű génexpresszióját határoztuk meg.

7. A peritumorális agyállomány ECM szerkezetének vizsgálatához 19 invázióhoz köthető ECM komponensből és sejtmembrán-fehérjéből állítottuk össze az inváziós panelt, majd RNS és fehérje-szintű vizsgálatokat végeztünk. Háromféle, idegsebészeti műtét során eltávolított humán agyszövet minta került feldolgozásra: makroszkóposan közvetlenül glioblasztóma melletti agyállomány (peritumorális zóna, peri-GBM), tüdő adenokarcinóma intracerebrális metasztázisának peritumorális zónája (peri-Met) és nem tumoros betegből származó agyszövet (Norm). A peritumorális mintavételek csak akkor történtek meg, amikor az a tumor eltávolításával együtt elkerülhetetlen volt. A nem tumoros agyszövet mintákat epilepszia sebészet során eltávolított agyrészletekből gyűjtöttük. Mindegyik mintát a további vizsgálatok megkezdése előtt tapasztalt neuropatológus értékelte és osztályozta.

8. Az inváziós spektrum glioblasztómás betegekben betöltött prognosztikai szerepének meghatározásához az mRNS és protein expressziót 20 ECM alkotó esetében vizsgáltuk, melyhez 26 betegből származó GBM mintát választottunk ki. A mintabeválasztásnál alapvető szempont volt, hogy minden beteg azonos kezelési protokoll szerint került ellátásra: a betegek subtotalis daganatreszekció után konkuráló kemo-irradiációban és TMZ monoterápiában részesültek. A mintákat két csoportba osztottuk a teljes túlélés alapján: 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).

3. Statisztikai módszerek

A klinikai adatok vizsgálatához az összehasonlítható számcsoportok eloszlását a Shapiro-Wilk-tesztel vagy Kolmogorov-Smirnov szerint, Lillefors’ korrekciójával 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 és több alkalommal 95%-os konfidencia intervallumot (CI) is számoltunk. A molekuláris expressziós eredmények vizsgálatához a statisztikai analízist a SigmaStat 3.5.0.54 segítségével végeztük (Systat Software, Inc.). A normál eloszlású változókat a prognosztikai faktorok vizsgálata során ANOVA segítségével hasonlítottuk össze, Tukey post hoc tesztje után. A teljes és progresszió-mentes túlélést Kaplan-Meier analízis segítségével vizsgáltuk. Az inváziós spektrum daganatspecifikusságának meghatározására hierarchikus klaszterezés alkalmaztunk komplett kapcsolsági elemzéssel Pearson korrelációval. 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 statisztikai osztályozókat használtuk. A statisztikai elemzést az esetek többségében biomatematikus segítségével a Weka 3.6 statisztikai elemzőszoftverrel végeztük.

EREDMÉNYEK

1. A jelenlegi onkoterápia jelentőségének meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon

A Debreceni Idegsebészeti Klinikán 2006-ban került bevezetésre glioblasztómás 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 saját beteganyagon a klinikai paraméterek túlélést befolyásoló szerepének tükrében.

A feldolgozás során figyelembe vettük a betegek korát, nemét, a tumor oldaliságát, lokalizációját, legnagyobb átmérőjét, a preoperatív és postoperatív Karnofsky pontszámot (KPS) és a műtéti beavatkozás kiterjesztettségét. Munkánk során az egyes klinikai paraméterek és különböző kezelési metódusok túlélésre gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A feldolgozott adatokból kitűnik, hogy a TMZ kezelés szignifikánsan növelte a progresszió mentes túlélést az önmagában alkalmazott radioterápiához képest, amit a bevacizumab kezelés tovább emelt. Ezzel szemben az is megállapítható, hogy a palliatív sugárterápiának a tumorprogresszió szempontjából számottevő hatékonysága nem bizonyítható. A diagnózist követő teljes, átlagos túlélés a különböző csoportokban: onkoterápiában nem részesíthető betegek esetében $3,7 \pm 4,3$, palliatív sugárkezelést kapott betegeknél $4,2 \pm 4,0$, teljes radioterápiában részesülteknél $9,1 \pm 8,7$, míg kombinált radio-kemoterápia esetén $15,3 \pm 9,5$ hónap, ill. a bevacizumabbal kiegészített terápia esetén $23,0 \pm 8,6$ hónap volt.

Azonos bázisterápiában részesülő betegek túlélési adatainak elemzése

Az általunk vizsgált glioblasztómás betegek közül 60 beteg részesült a műtéti ellátást követően konkuráló kemo-irradiációs kezelésben. Minden beteg posztoperatív Karnofsky pontja minimum 70 volt, minden beteg 60 Gy koponya-irradiációban (FBRT) részesült és minden betegnél addig folytattuk a temozolomid kezelést, amíg vagy a neurológiai állapota vagy a koponya MRI nem mutatott egyértelmű progressziót. Elmondhatjuk tehát, hogy a bázisterápia minden beteg esetében azonos volt, a teljes túlélés 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 azok tartoztak, akiknek túlélése a konkuráló kemo-irradiációs kezeléssel az irodalmi adatok szerint várható átlagos 16 hónapnál kevesebb volt (átlag: $10,2 \pm 4,2$ hónap). A második csoportba a 16 hónapnál hosszabban túlélő betegeket soroltuk (átlag: $25,7 \pm 7,4$). E két csoport klinikai paramétereinek összehasonlításával próbáltunk a nagyfokú eltérésre magyarázatot találni és egyben klinikai prognosztikai faktort meghatározni.

A két csoport összehasonlításánál megállapítottuk, hogy a nemek aránya, a betegek kora, a tumor oldalisága, mérete, lokalizációja, a preoperatív és posztoperatív KPS nem különbözött jelentősen. A radikális 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 igazolódott szignifikánsnak ($p=0,475$).

2. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagon: az 1p19q kodeláció klinikai relevanciája oligasztrocitómákban és oligodendrogliómákban

A Debreceni Egyetemen 2006-tól érhető el az 1p19q kodeláció jelenlétének rutinszerű vizsgálata. Klinikai jelentőségének megítéléséhez a 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 progressziómentes túlélés 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. 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. Tanulmányoztuk továbbá az 1p/19q-kodeláció recidívamentes túlélésre vonatkozó prognosztikai szerepét a különböző grádusú tumorok, illetve a különböző posztoperatív onkoterápiában részesült betegek vonatkozásában.

II-es grádusú, oligodendroglioma komponensű gliómákban 1,4-szer gyakrabban fordult elő 1p/19q-kodeláció, mint annak hiánya, míg a III-as grádusú gliómák 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 gliómákban egyértelműen gyakrabban fordult elő a jobb prognózist jelentő 1p/19q-kodeláció, mint a magasabb grádusúakban.

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 év versus 56 év, $p=0,043$). Ezek alapján f, hogy az

idősebb oligodendroglia komponensű tumoros betegek esetén kisebb a kemoterápiára érzékeny, jobb prognózisúak aránya, mint a fiatalabbak esetében.

A daganatok reszekábilítását a műtéti típuson keresztül vizsgáltuk. II-es grádusú daganatok esetében az 1p/19q-kodelécio előfordulása egyértelmű összefüggést mutatott a daganatok reszekábilításával. Különösen érvényes ez a megállapítás a III-as grádusú tumorokra: a kiterjedt, csak parciálisan reszekálható gliómák közül egyben sem volt kimutatható 1p/19q kodelécio. A kiterjedt, környezetét jelentősen infiltráló tumorok között tehát kisebb volt a feltehetően kemoszenzitívebb esetek aránya.

A II-es grádusú oligoasztrocitómáknál kétszer ritkábban tapasztaltuk az 1p/19q-kodeléciót, mint annak jelenlétét. II-es grádusú oligodendrogliómáknál négyszer gyakrabban fordult elő a kodelécio, mint az ép kromoszómaállomány.

III-as grádusú oligoasztrocitómáknál szintén a kodelécio hiánya volt gyakoribb, oligodendrogliómáknál nem találtunk jelentős különbséget.

Az 1p/19q-kodelécio gyakrabban fordul elő oligodendrogliómákban, mint oligoasztrocitómákban.

II-es grádusú daganatok esetében az 1p/19q-státusz és a progresszió valamint recidívamentes túlélés között összefüggés nem volt igazolható.

III-as grádusú esetén az 1p/19q-kodeléciós betegek recidívamentes túlélése jelentősen hosszabbnak bizonyult az azzal nem rendelkezőkhez képest (25,0 versus 6,8 hónap, $p=0,009$), azaz az 1p/19q-kodelécio előfordulása a recidívamentes túléléssel III-as grádusú gliómák esetében pozitív összefüggést mutatott. II-es grádusú esetén a műtét radikalitása statisztikailag nem befolyásolta jelentősen a recidívamentes túlélést, a totális reszekcióval kezelt III-as grádusú tumorok esetében azonban 1p/19q-kodelécio esetében a recidívamentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt a kodelécióval nem rendelkező esetekéhez képest (25 versus 7,6 hónap, $p<0,003$).

Onkoterápiás válasz készség

Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy az 1p/19q-kodelécio jelenléte a daganatban befolyásolja-e - és ha igen, hogyan - a sebészi, illetve komplex daganattelenes terápiában részesült betegek recidívamentes túlélését? A kezelés szempontjából a betegeket a következő csoportokba lehetett osztani (mind II-es, mind III-as grádusú daganatok esetén): műtét, műtét+sugárterápia, műtét+kemoterápia, műtét+komplex kezelés (sugárterápia és kemoterápia). A terápiára vonatkozó konzekvenciákat túlélési görbék alapján vontuk le.

Annak a betegcsoportnak, amelynek tagjai nem kaptak további kezelést a műtét után, lényegesen rövidebb volt a túlélése a másik két csoportéhoz képest, tehát a posztoperatív onkoterápia jelentősen meghosszabbította a recidívamentes túlélést. A csak kemoterápiával kezelt recidívamentes túlélése nem tért el számottevően a komplex módon kezeltétől.

A posztoperatív kemo- és/vagy radioterápia a II-es grádusú, pozitív 1p/19q-kodeléciós státuszú oligoasztrocitómás, illetve oligodendrogliómás betegek recidívamentes túlélését meghosszabbította, míg azoknál a betegeknél, akiknél nem detektáltunk 1p/19q-kodeléciót, nem késleltette jelentősen a recidívát.

A III-as grádusú tumorok esetében, jóllehet a kombinált kezelés előnyei egyértelműen megmutatkoztak, az ebben a csoportban található alacsony esetszámok miatt definitív összefüggéseket nem tudtunk megállapítani.

3. A temozolomid szérumbeli és intratumorális koncentrációjának meghatározása

3.1. A glioblasztóma jelenlegi onkoterápiás protokolljában rutinszerűen használt kemoterápiás készítmény (temozolomid) szérumbeli koncentrációjának objektív meghatározása

Tanulmányunk célja az volt, hogy glioblasztómás betegek vérében meghatározzuk a TMZ koncentrációjának időbeni változását és ezáltal a sugárkezeléshez való szájon át történő gyógyszerbevitel időzítését optimalizálhassuk. Ehhez első lépésben klinikai vérmintákban a gyógyszer szint rutinszerű vizsgálatára alkalmas módszer kidolgozására volt szükség. Mivel kutatócsoportunknak a kapilláris elektroforézissel (CE) már voltak kedvező tapasztalatai, a CE alkalmazhatóságát teszteltük a TMZ és lebomlási termékeinek (MTIC és AIC) szimultán analízisére.

Mivel a TMZ és lebomlási termékeinek féléletideje fiziológiás pH és hőmérséklet alatt rövid (gyakran kevesebb, mint 10 perc) a vizsgálat elvégzésére ideális esetben 1 perc áll rendelkezésre. A CE technikát alkalmazva lehetőség van arra, hogy egyszeri futtatások során rövid idő alatt határozzuk meg mind a három analitot. Amíg pH 7,9 mellett a TMZ féléletideje 28, a MTIC esetében 13 percre adódott, addig ez pH 9,1-es értéken 9 és 11 perc volt, viszont az AIC koncentrációja 4 óra után is állandónak bizonyult. Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy az AIC maximális és tartósan fennmaradó koncentrációja megegyezik a TMZ kezdeti koncentrációjával és egyértelműen nagyobb, mint a MTIC által elért maximális koncentráció.

Megállapítottuk, hogy a TMZ gyorsan és teljesen abszorbeálódik az orális bevitel után és a csúcs plazma koncentrációját 1 óra múlva éri el, mely méréseink szerint 14,2 µg/mL-nek bizonyult. Ezután a TMZ fiziológiás pH-n gyors nem-enzimatis konverzió ment keresztül, először a reaktív MTIC-é, majd a továbbiakban AIC-é konvertálódott.

3.2. A temozolomid koncentráció direkt meghatározása humán glioblasztómában micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MEKC) alkalmazásával

Amíg a szérumbeli minták direkt injektálása a CE eszközbe nem jelent gondot, addig ezt nem lehet elvégezni az agydaganatminták esetében szilárd konzisztenciájuk miatt. További problémát jelent az is, hogy a gyógyszerek koncentrációja az agyállományban és a tumorszövetben jellemzően kisebb, mint a szérumban, valamint az elérhető *in vivo* tumor minták igen kicsik (kevesebb, mint 1 g). Ezért először a mintákat liofilizáltuk, majd feloldva homogén oldatot készítettünk. A szilárd halmazállapotú tumorszövet liofilizálása és oldása egyszerű és hatékony módszernek bizonyult arra, hogy megfelelő homogenitást érjünk el és a minta a CE számára kezelhetővé váljon.

A tumorminták 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 agyban *in vivo* mért TMZ koncentráció kevesebb, mint a más szerzők által megállapított érték.

4. Az EGFR és az integrinek vizsgálata különböző grádusú asztrocitómákban

4.1. Az ErbB1 (EGFR) és az integrin-β1 közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban

Ahhoz, hogy az *in vitro* megállapított összefüggéseket összevessük a klinikai tapasztalatokkal, idegsebészeti műtét során eltávolított és frissen lefagyasztott, II-es és IV-es

grádusú asztrocitómák metszeteiben határoztuk meg az ErbB1 és az integrin- β 1 expressziókat. Az immunfluoreszcenciás módon jelölt szöveti metszetek korrigált átlagos fluoreszcens intenzitása mind az ErbB1, mind az integrin- β 1 esetében magasabb volt a IV-es grádusú daganatokban, mint a II-es grádusúakban.

A különböző grádusú daganatokban az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció mértékében szignifikáns eltérést tapasztaltunk. Az elvégzett statisztikai próbák szerint az ErbB1 és az integrin- β 1 heteroasszociációk önmagukban is képesek az asztrocitómák terápiájának hatékonyságát megőrizni.

Kaplan-Meier analízist végeztünk a teljes és a progresszió-mentes túlélés összehasonlítására a II-es és IV-es grádusú csoportok esetében illetve azokban a csoportokban is, ahol a minták csoportosításának alapját az képezte, hogy a minták expressziós értékei alatta vagy felette helyezkednek el az ErbB1, integrin- β 1 molekulák átlagos expressziós értékeinek. Az átlagos heteroasszociációk számához való viszonyítás is egy külön csoportot képzett az analízis során. A túlélést egyaránt jól határozta meg a hisztopatológiai gradálás, továbbá az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció ($p < 0,001$), míg az ErbB1 és integrin- β 1 expressziós értékek kisebb mértékben, de még szignifikánsnak bizonyultak ($p = 0,014$, $p = 0,004$). Hasonló megfigyeléseket tettünk a progresszió-mentes túlélés és a grádus, integrin- β 1 expresszió és heteroasszociáció összehasonlításakor ($p < 0,001$), valamint az ErbB1 expressziójára vonatkozóan ($p = 0,014$).

4.2. Az EGFR szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómákban

Annak érdekében, hogy megbecsülhessük a kis molekulású EGFR TK inhibitor adjuváns terápia hatását, az EGFR gén protein kináz doménjének, az EGFR fehérje expressziójának és az EGFR gén amplifikációjának vizsgálatát végeztük el kemo- és sugárkezelés utáni rekurrens GBM minták esetében.

Az EGFR fehérje fokozott expresszióját találtuk a vizsgált esetek 65%-ban. Az EGFR fehérje fokozott expressziója 35%-ban függött az EGFR gén amplifikációjától és 15%-ban a nagyfokú poliszómiától. A fennmaradó 15% sem amplifikációt sem nagyfokú poliszómiát nem mutatott.

A betegeket FISH+ (amplifikáció vagy nagyfokú poliszómia) és FISH- (diszómia, alacsony fokú triszómia, magas fokú triszómia és alacsony fokú poliszómia) csoportokba osztottuk. 50% volt FISH+, EGFR amplifikációt 35%-ban találtunk, nagyfokú poliszómiát pedig 15%-ban.

Az EGFR szekvencia analízis vizsgálatok során az EGFR gén 18-21-es exonjai nem mutattak mutációt, és minden esetben megtartott DNS szekvenciát találtunk.

5. Tüdő adenokarcinóma intracerebrális áttéti daganata és különböző grádusú asztrocitómák invazivitásának összehasonlítása

A különböző eredetű és igen eltérő invazivitási aktivitás mutató intracerebrális daganatok vizsgálatát négy fázisban végeztük el. Az első fázisban az irodalom áttekintése alapján összeállítottuk azoknak a molekuláknak a listáját, melyek a peritumorális invázióban szerepet játszhatnak. 96 különböző molekula génjeinek az mRNS expresszióját meghatároztuk glioblasztóma, peritumorális normál agyszövet és tüdő adenokarcinóma intracerebrális áttétéből 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.

A második fázisban az előzetes mérések alapján megállapított inváziós panelt vizsgáltuk tovább glioblasztóma és tüdő adenokarcinóma agyi áttéti daganatában. Az inváziós panel molekuláinak mRNS expressziós szintjét meghatároztuk és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokat is végeztünk.

A harmadik fázisban elvégzett mérésekhez a korábbi glioblasztóma és tüdő eredetű adenokarcinóma szoliter agyi áttéte mellett peritumorális agyszövetmintákat is feldolgoztunk.

A negyedik fázisban elvégzett méréshez az előzőek mellé benignus ill. alacsony grádusú daganatokat válogattunk: II-es grádusú asztrocitóma és schwannoma mintákon végeztük el az inváziós panel meghatározását.

Az inváziós panel négy különböző eredetű intrakraniális daganatban és nem-tumoros agyszövetben történő meghatározásával az egyes szövettani diagnózisokra jellegzetes inváziós spektrumokat azonosítani tudtuk. Az inváziós spektrum az egyes daganatokra igen nagyfokú specifitást mutatott, igazolva ezzel az invázióért felelős ECM komponensek expressziójának daganatspecifikus jellegét.

Vizsgálataink során négy olyan molekulát tudtunk azonosítani (brevikán, neurokán, tenascin-C és verzikán), melyek a tüdőrák intracerebrális áttéte és az asztrocitómák közötti jelentősen különböző peritumorális invázióért leginkább felelősnek mondhatók.

6. A glioblasztóma kezelésére alkalmazott jelenlegi onkoterápiás protokoll hatása az invazivitásban szerepet játszó molekulák expressziójára

Kutatásunkban 31, rutin idegsebészeti műtét során eltávolított és intraoperatív gyorsfagyasztott humán glioblasztóma szövetmintát vizsgáltunk. Tizenöt minta onkoterápiában még nem részesült betegről származott, tizenhat esetben pedig sugár- és kemoterápiát követően kiújult daganat reszekciója során nyert tumorszövetet dolgoztunk fel. A szövetmintákban vizsgált inváziós panel tizenkilenc, korábbi eredményeink alapján kiválogatott extracelluláris mátrix alkotóelemből állt, melyek RNS és fehérje szintű génexpresszióját határoztuk meg.

Az expressziós változásokat RNS és fehérje szinten együtt elemezve nyolc esetben észleltünk konkordáns változást, de a statisztikai elemzések során az eltérések mindössze 2 esetben bizonyultak szignifikánsnak: RNS szinten a mátrix-metalloproteináz-9 (MMP-9) ($p=0,006$), protein szinten pedig a brevikán ($p=0,006$) csökkent szignifikáns mértékben az onkoterápiát követően.

7. A peritumorális agyállomány extracelluláris mátrixának szerepe a tumorinvázióban

A peri-GBM és peri-Met összehasonlításban tíz molekula mutatott relatív mRNS expresszió növekedést a peri-metasztatikus szövetben és kilenc gén esetében volt megfigyelhető fokozott expresszió a glioblasztóma peritumorális mintáiban. Amikor a Peri-GBM mintákat a Norm szövethez viszonyítottuk, tizennégy esetben volt peritumorálisan mRNS expresszió emelkedés, míg öt gén expressziója csökkent Peri-GBM-ben a nem tumoros agyszövethez képest. Összehasonlítva a Peri-Met és a Norm mintákat tizenhárom molekula mRNS szintjénél találtunk Peri-Met mRNS expresszió emelkedést és mindössze hat gén szintje csökkent a peritumorális szövetben a Norm-hoz viszonyítva, de egyik esetben sem igazolódott statisztikailag egyértelműsíthető szignifikáns különbség.

Peri-GBM ill. Peri-Met korrelációban tizenegy ECM fehérje mennyisége volt emelkedett glioblasztóma esetében, amiből öt mutatott az mRNS értékekkel megegyező irányú változást: CD168, integrin beta-1, MMP-9, N-kadherin-2 és neurokán. A metasztázis körül hat fehérje szintjének emelkedését detektáltuk, amiből három volt az mRNS változással megegyező: integrin alfa-1, tenaszcin-R, verzikán. Nem tumoros agyszövethez viszonyítva a peri-GBM mintákban tizenhárom fehérje szintje volt magasabb, amiből tíz a génexpressziókkal megegyező változást mutatott. Mindössze négy fehérje koncentrációja volt magasabb Norm szövetben, ebből kettő mutatott konkordanciát: a tenaszcin-R és a verzikán.

Peri-Met és Norm összehasonlításban nyolc fehérje szintje emelkedett meg a peritumorális szövetben, hét esetben konkordanciával. A peri-GBM - Peri-Met korrelációhoz hasonlóan a fibronectin-szint emelkedés itt is szignifikáns volt annak ellenére, hogy gén szinten csökkenést detektáltunk. Peri-Met-ben nem tumoros mintákhoz képest csökkent koncentrációt mértünk kilenc fehérje esetében, ebből négy volt az mRNS változással megegyező irányú.

8. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata GBM-ben

A tumorok lebenyi lokalizációjában 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 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. A csoport-összehasonlítást végző tesztek emellett bizonyos molekulák kulcsszerepét is meghatározták, melyek együttes expresszióváltozása a szignifikáns különbséghez nélkülözhetetlenek. A két különböző betegcsoportban a brevikan és az integrin- $\beta 1$ 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. Az elemzések során tehát egyértelműen megállapítható, hogy a molekulák inváziós spektruma és a várható túlélés jól igazolható összefüggést mutat.

MEGBESZÉLÉS

1. A jelenlegi onkoterápia jelentőségének meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon

Mivel a glioblasztómás betegek kezelési protokollja a 2006-ban bevezetett kemoterápiás készítmények rutinszerű alkalmazásával jelentősen megváltozott, és a túlélési paraméterek is sok tekintetben módosultak, felmerült az igény a glioblasztómás betegek kezeléstől függő túlélési esélyeinek összehasonlítására valamint az idegsebészeti, klinikai szempontból meghatározható prognosztikai paraméterek újrabecslésére. Továbbá megfogalmazódik a kérdés, hogy a szisztémás hatású kemoterápiás készítményekkel elért eredmények megváltoztatják-e a műtéti radikalitás kedvező hatását célzó teljes tumorexstirpáció jelentőségét? Az onkoterápia hatékonyságának ismeretében ártértékelődik-e bizonyos klinikai paraméterek prognosztikai jelentősége?

A DE KK Idegsebészeti Klinikán 2002 és 2012 között operált 104 glioblasztómás beteg kórlefolyását 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 faktorként nem szerepeltethető. A műtét radikalitása a kombinált kemo-irradiációs kezelésben részesült csoportban kedvezően befolyásolta a teljes túlélést, de a többi csoportban nem igazolódott statisztikai összefüggés a műtét típusa és a túlélés között. Mivel azonban 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 műteti reszekció kiterjedtsége. Ezért magas műteti rizikót jelentő tumorlokalizáció esetében csak biztonságosan elvégezhető mértékű parciális reszekció ajánlható.

Kiemelendő, hogy sem a csak sugárterápiát kapott betegek esetében, sem kemoterápiával kombinált kezelés esetében a tumorméret önmagában nem volt statisztikailag igazolható befolyással a túlélésre. Eredményeink amellet szólnak, hogy a daganatellenes kezelést képviselő irradiáció, ill. kemoterápia hatása tumormérettől függetlenül is képes kifejteni hatását.

A különböző kezelési metódusok effektivitásával kapcsolatban saját tapasztalataink szerint a palliatív radioterápiának progressziómentes túlélést szignifikánsan befolyásoló hatása nem igazolható. Mivel a palliatív sugárkezelés által nyújtott túlélés tartamára vonatkozó hatás nagyrészt a progresszió utáni rossz neurológiai állapotra vonatkozik, effektivitása erősen kétséges.

A konkuráló kemo-irradiációs kezelést követő bevacizumab monoterápiában részesülő betegek (RT+TMZ+BC) túlélése szintén szignifikánsan hosszabb volt az összes többi csoporthoz képest, de ha közelebbről megvizsgáljuk a konkuráló kezelésben részesült betegek (RT+TMZ) 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 fennálló 3,4 hónap különbség a két csoport teljes túlélése közötti 6,9 hónapot 3,5 hónapra csökkenti. Ez a különbség a két terápia között azonban nem tekinthető szignifikánsnak. A két csoport progresszióig eltelt idejében észlelt jelentős különbség magyarázata feltehetően abban rejlik, hogy bevacizumab kezelésben csak a jó neurológiai állapotú, és progresszió ellenére min. 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 a teljes túlélés egyértelműen hosszabb, mint a bevacizumab kezelést nem kapott betegek esetében, a különbséget statisztikailag igazolni nem lehet.

2. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagon: az 1p19q kodeláció klinikai relevanciája oligoasztrocitómákban és oligodendrogliómákban

A gliómákat sokáig rezisztensnek tartották kemo- illetve radioterápiára, de mára egyértelművé vált, hogy a minél korábban megkezdett onkoterápia kulcsfontosságú a progressziómentes és teljes túlélés szempontjából. A gliómák onkoterápiás indikációjának és kezelési tervének felállítása állandó kihívást jelent a neuro-onkológusok számára, hiszen a kiindulási alapként használt fő szövettani csoportosítás és grádusbeosztás a tapasztalatok alapján igen heterogén csoportot képez. Nagy volt az igény tehát olyan prognosztikai marker vizsgálatának a bevezetésére, melynek segítségével a posztoperatív onkoterápia egyértelműen meghatározható. Végül a genetikai kutatások vezettek eredményre és ma már az 1p19q

kodelécio (mely a tumor kemoszenzitív jellegét valószínűsíti) vizsgálata potenciális prognosztikai és klinikai jelentősége miatt a nemzetközi irodalomban az oligodendroglia komponensű daganatok esetén a rutinszerűen javasolt vizsgálatok közé tartozik.

Eredményeink alapján az oligodendroglia komponensű gliómák vonatkozásában arra a következtetésekre jutottunk, hogy az alacsonyabb grádusú gliómákban gyakrabban fordult elő a jobb prognózist jelentő 1p/19q-kodelécio, mint a magasabb grádusúakban; a III-as grádusú daganatokban a kor előrehaladtával csökkent a kemoterápiára érzékeny, jobb prognózisú betegek aránya; az 1p19q kodelécio előfordulási gyakorisága gliómákban asztrocita komponens esetén kisebb, mint oligodendrogliómákban valamint, hogy az 1p/19q-kodelécio recidívamentes túlélésre vonatkozó pozitív prognosztikai szerepe elsősorban III-as grádusú oligodendrogliómákra vonatkozik.

Jóllehet az 1p/19q-kodelécio jelentősége még nem vonult be a rutin betegellátás gondolatmenetébe, tanulmányunk eredményeképpen prognosztikai szerepét klinikai adatelemzéssel saját beteganyagban is meg tudtuk erősíteni. Továbbá, az 1p19q státusznak a kemoterápiára való érzékenységet jellemző szerepét tekintve az oligodendroglia komponensű tumorok esetében az onkoterápia megválasztásában betöltött prediktív funkciója is alátámasztást nyert.

3. A temozolomid szérumból és intratumorális koncentrációjának meghatározása

Jelenleg az egyetlen rutinszerűen adott első vonalbeli kemoterapeutikum a GBM terápiájában a TMZ, melynek glioblasztómás beteg vérmintáiban, humán agyszövetben vagy daganatszövetben elért lokális koncentrációjáról az irodalomban nem találhatók direkt mérésekből származó adatok. Az elmúlt két évtizedben, a CE 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-val kivitelezett analízisére számolt volna be. MEKC-t alkalmazva glioblasztómás beteg szérumban TMZ koncentrációját monitoroztuk egyszeri 400 mg-os per os dózis után. Vizsgálataink során igazolni tudtuk, hogy a MEKC technika UV spektrofotometriás detekcióval jól alkalmazható a TMZ *in vivo* direkt meghatározására daganatos betegek szérumban. Méréseink alapján elmondhatjuk, hogy sikerült glioblasztómás betegek vérében a TMZ és lebomlási termékeinek (MTIC és AIC) mennyiségét és koncentrációgörbét megfelelő pontossággal meghatározni. Eredményeink alapján a sugárkezelést a TMZ bevétele utáni 1-2 óra közötti intervallumban javasolt elvégezni.

A gyógyszerek intratumorális lokális koncentrációjának ismerete kulcsfontosságú lehet a gyógyszer hatékonyságának és akkumulációjának meghatározásához. 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 a preconcentrációhoz és analízishez. Tanulmányunkban először az irodalomban sikerült a TMZ lokális intratumorális koncentrációját humán glioblasztómában meghatározni. Ennek során kidolgoztuk a szilárd halmazállapotú tumorállomány CE-val 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 kemoterápia során elérhető intratumorális gyógyszer-szint további, magasabb lokális koncentráció biztosítására alkalmas készítmények iránti igényt alapoz meg.

4. Az EGFR és az integrinek vizsgálata különböző grádusú asztrocitómákban

4.1. Az ErbB1 (EGFR) és az integrin- β 1 közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban

Az integrinek fokális adhézíós komplexekben különböző fehérjékkel olyan multimer klasztereket alkotnak, amelyek az apoptózist megakadályozó szignálokat képesek generálni. Az ErbB1 az integrin- β 1-el történő kölcsönhatása révén a tumorsejtek leválását, migrációját és metasztatikus képességét is elősegíti. Következésképpen az ErbB1 és integrin- β 1 kölcsönhatása fontos szerepet játszhat a fokozott radiorezisztencia kialakulásában és új terápiás targetként szolgálhat. Az ErbB és integrin molekulák interakciója és expressziós szintje különbözik egyedi *in situ* glioblasztómák esetében, tehát így megjósolhatják a terápia hatékonyságát, a betegség kimenetelét is. A folyamatosan fejlődő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer technika pedig szerepet kap e molekuláris interakciók szöveti metszeteken történő karakterizálásában. Az *in situ* egyedi tumoros szöveteken végzett FRET vizsgálatok eredményei pontos számszerű adatokkal szolgálnak a molekuláris kölcsönhatásokról, így azokat a klinikai adatokkal összevetve sokkal pontosabban megítélhető a prognózis vagy választható ki a vizsgált személynek leginkább megfelelő terápia.

Kutatócsoportunk vizsgálati eredményei alapján kijelenthető, hogy a fokozott integrin- β 1 expresszió és az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociációk emelkedett aránya az asztrocitómák esetében rossz prognózist jelez. Ez alapján a standard onkoterápiára nagy valószínűséggel nem reagáló betegek már a kezelés megkezdése előtt kiszűrhetők, és számukra - személyre szabott – komplex terápia lenne indikálható.

4.2. Az EGFR szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómákban

A recidív tumorok vizsgálata mindig is az érdeklődés középpontjában állt, hiszen a már inefektívvá vált standard kezelés után kell újabb kemoterápiás készítményt választani. Ehhez nyújtanak segédkezet azok a genetikai tesztek, melyek az egyes ágensekkel szembeni válaszkészséget nagy valószínűséggel előre jelezhetik. Kutatócsoportunk ezért rekurrens GBM-ben végzett genetikai vizsgálatokat esetleges prediktív faktor igazolására. A leggyakoribb genetikai eltérés a GBM-ban, az EGFR gén amplifikációja, amely az EGFR fokozott expresszióját okozza. Az EGFR gyakran mutált illetve gyakorta over-expresszált más humán malignitások esetében is, és ez általában agresszív viselkedéssel társul. Korábban az EGFR kináz extracelluláris doménjének delécióját tekintették a leggyakoribb EGFR mutációnak a különböző tumortípusokban, egészen a nem kissejtes tüdőrákban kimutatható EGFR kinázt érintő szomatikus mutáció felfedezéséig. A leggyakoribb mutáció az EGFR III-as variánsának deléciója (EGFRvIII), amely az extracelluláris domén 2-7 exonjainak delécióját jelenti. Ezt a mutációt GBM genomjának szintjén is azonosították, és kimutatták, hogy a deléció aktiváló hatást fejt ki a receptorra, mely a sejtek számára fokozott proliferációt eredményez. Az EGFR szerepére a glioblasztómákban azok a klinikai tanulmányok hívták fel a figyelmet, melyekben rekurrens glioblasztómás betegek 15-20 %-ában a kis molekulásúlyú EGFR tirozin-kináz (TK) inhibitorok szignifikáns tumor regressziót értek el. Eddigi kutatások szerint az EGFR TK doménban lévő mutációk nem mutattak szoros összefüggést a glioblasztómák TK inhibitor terápiával szembeni érzékenységével. Ezekben a tanulmányokban azonban az EGFR státuszt primer daganatokban határozták meg, de rekurrens daganatokban történt mutáció analízisről részletes irodalmi adat nem áll rendelkezésre. Emellett nem ismert a kemo- illetve radioterápia EGFR állapotot módosító lehetséges hatása sem.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy míg az EGFR fehérje fokozott expressziója és a gén amplifikáció jelen lehet a kemoterápia után, az EGFR gén TK doménját érintő

mutációk sajnos nem találhatók meg a rekurrens glioblasztómákban. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a kiújult GBM nem rendelkezik a kináz domén mutációjával, amely döntő tényező lehet a glioblasztómák TK inhibitor terápiára adott elégtelen válaszában. Következésképpen ezekben a betegekben a TMZ után progrediáló tumor esetében a kis molekulású TK inhibitorok helyett más hatásmechanizmusú készítményt érdemes választani.

5. Tüdő adenokarcinóma intracerebrális áttéti daganata és különböző grádusú asztrocitómák invazivitásának összehasonlítása

A tüdőrák hematogén áttétképzésének leggyakoribb helye a központi idegrendszer, mely a tüdőrákos betegek 40-65%-ában jelenik meg. Az USA-ban évi 120-140.000 agyi metasztatízis fordul elő, ez felel az összes tumoros haláleset 20%-áért. Valamennyi egyéb szervi daganat együttesen az esetek 8-10%-ában jár agyi áttétrel. Az agyban talált metasztatikus daganatok leggyakoribb forrása a primer tüdőrák.

Közismert idegsebészeti tapasztalat és dilemma, hogy míg a gliómák radikális sebészeti megoldása az infiltratív növekedés miatt az esetek döntő többségében kivitelezhetetlen, addig a tüdőrák szoliter áttéteinek teljes eltávolítása általában rutin idegsebészeti beavatkozásnak számít. Ez nem utolsó sorban annak a ténynek köszönhető, hogy az agyi áttétek növekedése nem, vagy csak minimális invazivitást mutat. Az igen széles körű nemzetközi kutatásokról beszámoló irodalmi adatok a peritumorális inváziót egyértelműen az ECM komponenseivel hozzák szoros kapcsolatba. A glióma és a tüdőrák áttét között tapasztalható jelentősen különböző reszekabilitást eredményező intracerebrális invázió oka tehát döntően a két tumortípus ECM-ének eltérő szerkezetében, az ott található makromolekulák mikrolokális expressziójában és tulajdonságaiban keresendő.

Kutatásaink során a gliómák és tüdő adenokarcinóma agyi áttétek ECM komponenseinek RNS- és proteinszintű analízisével a két különböző daganattípus eltérő inváziós hajlamának molekuláris hátterét vizsgáltuk. Vizsgálatainkhoz a következő feladatokat foglalmaztuk meg:

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

Az inváziós panel négy különböző eredetű intrakraniális daganatban és nem-tumoros agyszövetben történő meghatározásával az egyes szövettani diagnózisokra jellegzetes inváziós spektrumokat azonosítani tudtuk. Az *inváziós spektrum* az egyes daganatokra igen nagyfokú specifitást mutatott, igazolva ezzel az invázióért felelős ECM komponensek expressziójának daganatspecifikus jellegét.

Vizsgálataink során négy olyan molekulát tudtunk azonosítani (brevikán, neurokán, tenascin-C és verzikán), melyek a tüdőrák intracerebrális áttéte és az asztrocitómák közötti jelentősen különböző peritumorális invázióért leginkább felelősnek mondhatók. Ezek a molekulák a későbbiekben egy esetleges individuális onkoterápiához targetként funkcionálhatnak.

6. A glioblasztóma kezelésére alkalmazott jelenlegi onkoterápiás protokoll hatása az invazivitásban szerepet játszó molekulák expressziójára

A tumorsejtek invázióját alapvetően az ECM-et alkotó molekulák (kollagén, integrinek, lamininek, proteoglikánok, szintetizáló és bontó enzimek, stb.) mikroregionális expressziója szabja meg, melynek tumor indukált változása kulcsfontosságú a daganatsejtek mozgásában. Ezt az ECM-ben bekövetkező változást leginkább a releváns mátrix molekulák expresszióbeli eltéréseinek meghatározásával lehet követni. Amennyiben az onkoterápia megváltoztatja a mátrix molekulák expresszióját, az hatással van a tumor infiltratív képességére. E nélkül azonban a konkuráló kemo-irradiációs kezeléstől a tumor inváziós aktivitásának mérséklődése nem várható, és így sem egy esetleges neoadjuváns kezelés után, sem pedig a kiújult daganat onkoterápia utáni radikális eltávolítására sem lesz remény. Felmerül tehát a kérdés, hogy a glioblasztóma jelenleg elfogadott standard kezelése eredményez-e valamilyen változást a tumor ECM-ben, azaz bír-e a konkuráló kemo-irradiáció az infiltrációt befolyásoló hatással? Ennek megválaszolásához onkoterápia előtti és utáni GBM tumormintákban meghatároztuk az invázióban szerepet játszó releváns ECM komponensek expresszióját és összehasonlító elemzéseket végeztünk.

Vizsgálataink során az onkológiai kezelés utáni mintákban mindössze a MMP-9 mRNS expressziója és a brevikán fehérje szintje mutatott szignifikáns csökkenést, de az inváziós panel többi vizsgált molekulája esetében nem volt szignifikáns változás.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a konkuráló kemo-irradiáció nem hat lényegesen a GBM inváziós képességére. A jelenlegi onkoterápia mindkét fő elemének (irradiáció és temozolomid) elsődleges támadáspontja a DNS-replikáció gátlása, és így anti-proliferatív hatással bírnak. Vizsgálataink azt mutatják, hogy emellett, a sejtsztódást 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.

7. A peritumorális agyállomány extracelluláris mátrixának szerepe a tumorinvázióban

A kifejezetten invazív malignus gliómák nagyban különböznek a csaknem gömb alakú agyi áttéti daganatoktól és az ép agyállomány tumoros infiltrációjának mértéke is jelentősen eltér egymástól. A hasonlóan anaplasztikus, de jelentősen eltérő invazivitású daganatok ez utóbbi képessége egyrészt a saját, tumor-ECM minőségétől, másrészt azonban a „befogadó” (host) szövet ECM szerkezetétől és összetételétől függ. A különböző daganatok ECM szerkezetét korábbi tanulmányainkban már vizsgáltuk, de a peritumorális agyállomány ECM-ben bekövetkező tumor-indukált változások gliómák inváziójában betöltött szerepe szintén a felderítésre váró folyamatok közé tartozik.

Az intracerebrális daganatok normál agyállomány ECM összetételére gyakorolt hatásának megismeréséhez 19 invázióhoz köthető ECM komponensből és sejtmembrán-fehérjéből állítottuk össze az inváziós panelt, majd RNS és fehérje-szintű vizsgálatokat végeztünk. Tanulmányunk célja az volt, hogy meghatározzuk a GBM és tüdő adenokarcinóma körüli peritumorális agyszövet, valamint a nem tumoros betegből származó agyszövet inváziós spektrumát és ezáltal megismerjük az agyállomány ECM szerkezet változásainak szerepét az egyes daganattípusok közötti eltérő mértékű invázióban valamint, hogy a tumoros beszűrődést esetleg gátló molekuláris mechanizmusok feltárásához is közelebb kerüljünk.

Méréseink alapján elmondható, hogy a különböző, invázióval összefüggő ECM molekulák RNS és fehérje szintű vizsgálata mindkét esetben definitív különbségeket talált a peritumorális szövetekben, azokat akár egymáshoz, akár tumormentes agyszövethez hasonlítottuk. A peri-GBM mintákban tapasztalt szerény mértékű eltérések arra engednek következtetni, hogy a GBM-et körülvevő agyszövet inváziós paneljében nem észlelhető határozott reakció a daganat terjeszkedésére. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy az ECM nem tudja megfelelően megakadályozni a tumorsejtek peritumorális szövetbe történő invázióját. Másfelől azok a kiterjedt molekuláris változások, amelyek az áttéti daganattal szomszédos agyállományban észlelhetők, valószínűleg csökkentik a tumoros infiltrációt azáltal, hogy létrejön egy olyan peritumorális „háló” a metasztázis körül, ami gátolja a tumorsejtek terjedését. Végül, az intracerebrális daganatok peritumorális ECM-ének vizsgálata olyan molekulákat tudott azonosítani, amelyek hatással vannak az inváziós folyamatra és így hozzájárulhatnak új anti-invazív targetet célzó terápiás szerek kifejlesztéséhez.

8. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata GBM-ban

A vizsgálatba azonos kezelési protokoll szerint kezelt glioblasztómás betegeket válogattunk be és a mintákat a betegek túlélése 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 $\beta 1$, integrin $\alpha 3$, laminin $\alpha 4$ ill. $\beta 1$ 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 csoportra 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.

ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK

A GBM 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 gliómák fejlődését, progresszióját vagy invázióját gátolni képes.

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

Vizsgálataink során egyértelművé vált, hogy a GBM kezelésében is új utakat kell keresni. Miután a széleskörű irodalmi adatok szerint az asztrocitómák 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 ineffektivitását és adatokat szolgáltatunk a normál agyszövet tumoros infiltrációval szembeni védelmi reakcióiról.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a glioblasztómás 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 glioblasztómás 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.

1. Megerősített vagy módosított korábbi tudományos eredmények

1. Glioblasztómás betegek klinikai paramétereinek elemzése során megállapítottuk, hogy a jó preoperatív Karnofsky pontszámú betegek esetében a beteg neme, kora, a daganat oldalisága, mérete és lokalizációja önálló prognosztikai faktorként nem szerepeltethető. A betegek túlélési esélyeinek növeléséért az idegsebészeti eszköztár egyedül a műtéti radikalitás kiterjesztésével tud hozzájárulni, de amennyiben e szempontból elérte korlátait, a kezelés

effektivitása és a glioblasztómás betegek túlélése elsősorban az onkológiai terápiától és a daganat kemoszenzitivitásától függ. Mivel a teljes dózisú radio- és kemoterápia csak KPS 70 felett adható, ezért a korábbi felfogással szemben a műtéti reszekciónál a jó neurológiai státusz megőrzése előbbre való szempont, mint a tumor eltávolításának kiterjesztésére való törekvés. Fentiek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az azonos esélyekkel induló betegek túlélését nem a klinikai paraméterek befolyásolják, hanem inkább a daganat sugár- és kemoszenzitivitása határozza meg.

2. A különböző sugárterápiás módszerek hatékonyságának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a palliatív radioterápia a progressziómentes túlélést nem befolyásolja, így ebben a betegpopulációban indikációja erősen kérdésesnek tekinthető.

3. Saját beteganyagunkon igazolni tudtuk, hogy oligo-asztrocitómák és oligodendrogliómák esetében a III-as grádusú daganatokban a kor előrehaladtával csökken a kemoterápiára érzékeny, jobb prognózisú betegek aránya, ami az idősebb korban jelentkező tumorok agresszívebb jellege mellett szól. Ugyanebben a csoportban az 1p/19q-kodeláció esetében a teljes reszekció a recidívamentes túlélést egyértelműen meghosszabbította, így egy esetleges előzetes biopsziából kimutatott 1p19q kodeláció pozitívítás anaplasztikus oligodendroglióma esetében az műtéti tömegredukció forszirozása mellett szólhat.

2. Megállapított új tudományos eredmények

1. Kidolgoztuk a temozolomid szérumbeli koncentrációja rutinszerű meghatározásának módszerét. Ennek eredményeképpen megállapítottuk, hogy glioblasztómás betegek esetében a konkuráló fázisban a sugárkezelést a TMZ bevétele utáni 1-2 óra közötti intervallumban optimális elvégezni és erre vonatkozó protokollmódosító javaslatot tettünk.

2. Meghatároztuk a temozolomid lokális intratumorális koncentrációját humán glioblasztómában és az irodalomban elsőként publikáltuk.

3. Igazolni tudtuk, hogy a fokozott integrin- β 1 expresszió és az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociációk emelkedett aránya az asztrocitómák esetében kedvezőtlen prognosztikai faktorként használható.

4. Megállapítottuk továbbá, hogy a rekurrens glioblasztómákra nem jellemző az EGFR kináz domén mutációja, ami a glioblasztómák kezelésére elvben alkalmazható tirozinkináz-inhibitorok várhatóan mérsékelt hatékonyságát vetíti előre.

5. Létrehoztunk egy intracerebrális daganatok peritumorális infiltrációjának vizsgálatára alkalmazható, releváns ECM komponensekből álló inváziós panelt. Ennek segítségével az egyes szövettani diagnózisokra jellegzetes inváziós spektrumot azonosítani tudtuk. Az inváziós spektrum az egyes daganattípusra igen nagyfokú specifikitást mutat, igazolva ezzel egyrészt az invázióért felelős ECM komponensek expressziójának tumorspecifikus jellegét, másrészt az asztrocitómák grádusmeghatározásához is jelentős segítséget nyújthat.

6. Az inváziós spektrum vizsgálata során több olyan molekulát tudtunk azonosítani (brevikán, integrin- β 1, integrin- α 3, kadherin-12, laminin- α 4, - β 1, neurokán, tenascin-C és verzikán), melyek asztrocitómák esetében az anti-invazív onkoterápiához a jövőben targetként szolgálhatnak.

7. Kimutattuk, hogy a konkuráló kemoirradiáció nem hat kellő mértékben a glioblasztóma sejtek inváziós képességére. Az inváziós panel elemei közül csak két molekula expressziója változott meg szignifikánsan (brevikán és MMP-9), melyek azonban új, célzott anti-inváziós kezelések kifejlesztéséhez szintén targetként szerepeltethetők.

8. A peri-tumorális agyállomány inváziós paneljének vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a glioblasztómát körülvevő agyszövet ECM összetételét tekintve nem reagál határozottan a daganat terjeszkedésére. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy az

ECM nem tudja megfelelően megakadályozni a gliómasejtek peritumorális szövetbe történő invázióját. Másfelől azok a kiterjedt molekuláris változások, amelyek az áttéti daganattal szomszédos agyállományban detektálhatók, valószínűleg csökkentik a tumorinfiltrációt azáltal, hogy olyan peritumorális ECM struktúra alakul ki a metasztázisok körül, ami gátolni képes a tumorsejtek terjedését.

9. A glioblasztómás betegek esetében új prognosztikai faktort és potenciális prediktív faktort dolgoztunk ki: az inváziós spektrum a várható túléléssel egyértelmű összefüggést mutatott, így műtét utáni meghatározása egyrészt prognosztikai célból, másrészt az adjuváns onkoterápia megválasztásához prediktív célból javasolható.

Kutatási pályázatok

A tézisek alapjait képező tudományos munka az OTKA F-049050, ETT 396/2003, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 és NAP KTIA_13_NAP-A-V/3 pályázati támogatás segítségével valósult meg. Dr. Klekner Álmos az MTA Bolyai kutatási ösztöndíjban részesül.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Petrás M., Varga I., Vereb G., Szöllősi 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.
2. Tóth J., Egervári K., **Klekner A.**, Bognár L., Szántó J., Nemes Z., Szöllősi 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. IF: 1.152
3. **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. IF: 0.236
4. 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. IF: 0.472
5. András 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. IF: 2.971
6. **Klekner A.**, Fekete G., Rencsi M., Méhes G., Szabó P., Bognár L.: Az 1p19q kodéláció klinikai relevanciája oligodendrogliómákban a Debreceni Idegsebészeti klinikán. Clin Neurosci 2012 Jan 65(1-2) 17-24. IF: 0.348
7. András M., Törzsök B., **Klekner A.**, Gáspár A.: Determination of temozolomide in serum and brain tumor with micellar electrokinetic capillary chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011 Aug 1;879(23):2229-33. IF: 2.888
8. 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. IF: 1.555
9. Petrás M., Lajtos T., Friedländer E., **Klekner A.**, Pintye E., Feuerstein B.G., Szöllősi 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. IF: 5.286
10. Murnyák B., Csonka T., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Occurrence and molecular pathology of low grade gliomas. Ideggyógyászati Szemle 2013;66(9–10):305–311. IF: 0.343
11. 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. IF: 0.343
12. **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.
13. Hutóczki G., Bognár L., Tóth J., Scholtz B., Zahuczky G., Hanzély Z., Csász E., Reményi-Puskár J., Kalló G., Hortobágyi T., **Klekner A.**: Effect of concomitant radiochemotherapy on invasion potential of glioblastoma. Pathology, Oncology and Research. 26th Sept. 2015. IF: 1.855.
14. **Klekner A.**, Hutóczki G., Virga J., Reményi-Puskár J., Tóth J., Scholtz B., Csász E., Kalló G., Steiner L., Hortobágyi T., Bognár L.: Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain. Clinical Neurology and Neurosurgery. IF: 1.127
15. **Klekner A.**, Tóth J., Virga J., Hortobágyi T., Dér A., Szemcsák C., Reményi-Puskár J., Bognár L.: Influence of oncotherapy and clinical parameters on survival of glioblastoma patients – a single centre experience. Neurology India. Közlésre elfogadva: 2015.07.24. IF: 1.232
16. Virga J., Bognár L., Hortobágyi T., Zahuczky G., Csász E., Kalló Gergő, Tóth Judit, Hutóczki G., Reményi-Puskár J., Steiner L., **Klekner A.**: Prognostic role of the expression of invasion-related molecules in glioblastoma. J Neurol Surg A. Közlésre elfogadva: 2016.04.18. IF: 0.608

Egyéb közlemények

1. Csécei G., **Klekner A.**, Sikula J.: Posterior lumbar interbody fusion (PLIF) using the bony elements of the dorsal spinal segment. *Acta Chir Hun*, 36 (1-4): 54-56, 1997.
2. Csécei G., **Klekner A.**, Dobai J., Lajgut A., Sikula J.: Posterior interbody fusion using laminectomy bone and transpedicular screw fixation in the treatment of lumbar spondylolisthesis. *Surg Neurol*, 53 (2-7): 2000. IF: 1,018
3. Ernestus R.I., Röhn G., Schröder R., Els T., **Klekner A.**, Paschen W., Klug N.: Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 88-92, 2001. IF: 3,024
4. **Klekner A.**, Röhn G., Schillinger G., Schröder R., Klug N., Ernestus R.I.: ODC mRNA as a prognostic factor for recurrence in meningiomas. *J Neuro-oncol.* 53: 67-75, 2001. IF: 1,435
5. Gáspár A., Kardos Sz., Andrási M., **Klekner A.**: Capillary electrophoresis for the direct determination of cephalosporins in clinical samples. *Chromatographia* 56: 109-114, 2002. IF: 1.230
6. **Klekner A.**, Gáspár A., Kardos S., Szabó J., Csécei G.: Cefazolin prophylaxis in neurosurgery monitored by capillary electrophoresis. *J Neurosurg Anesth*, 15: 249-254, 2003. IF: 0.959
7. **Klekner A.**, Felszeghy Sz., Tammi R., Tammi M., Csécei G., Módis L.: Quantitative determination of hyaluronan content in cerebral aneurysms by digital densitometry. *Zentralbl Neurochir.* 2005 Nov; 66(4): 207-12. IF: 0.842
8. **Klekner A.**, Bágyi K., Bognár L., Gáspár A., Andrási M., Szabó J.: Effectiveness of cephalosporins in the sputum of patients with nosocomial bronchopneumonia. *J Clin Microbiol*, 2006 Sep; 44(9):3418-21. IF: 3.
9. Bágyi K., **Klekner A.**, Hutóczki G., Márton I.: The role of the oral flora in the pathogenesis of aspiration pneumonia. Review. *Stomatologica Hungarica* 2006 Oct; 99(5): 205-12.
10. Andrási M., Gáspár A., **Klekner A.**: Analysis of cephalosporins in bronchial secretions by capillary electrophoresis after simple pre-treatment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Feb 1;846(1-2):355-8. IF: 2.935
11. Dabasi G., Hauser P., Kertész G.P., Balázs G., Karádi Z., Constantin T., Bognár L., **Klekner A.**, Schuler D., Garami M.: Imaging of pediatric brain tumors using somatostatin analogue 111Ih-DTPA-D-Phe1-octreotide. *Magy Onkol*, 2007, 51(3):229-234.
12. Bágyi K., Márton I., Szabó J., Andrási M., Gáspár A., Varga I., Bognár L., **Klekner A.**: Efficacy of pre-operative cephalosporin prophylaxis in controlling pathogenic oral bacterial growth in comatose patients. *J Med Microbiol.* 2008 Jan 57:128-9. IF: 2.19 –
13. Bágyi K., Haczkú A., Márton I., Szabó J., Gáspár A., Andrási M., Varga I., Tóth J., **Klekner A.**: Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery. *BMC Infect Dis.* 2009 Jun 29; 9(1):104. IF: 2.55
14. Al-Halabi H., Nantel A., **Klekner A.**, Guiot M.C., Albrecht S., Garami M., Bognár L., Kavan P., Gerges N., Shirinian M., Roberge D., Muanza T., Jabado N.: Preponderance of sonic hedgehog pathway activation characterizes adult medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*, 2011 Feb; 121(2):229-39. IF: 9.320
15. Andrási M., Gáspár A., Kovács O., Baranyai Z., **Klekner A.**, Brücher E.: Determination of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, 2011 Aug 32(16): 2223-2228. IF: 3.303
16. Jacob K., Quang-Khuong D.A., Jones D.T., Witt H., Lambert S., Albrecht S., Witt O., Vezina C., Shirinian M., Faury D., Garami M., Hauser P., **Klekner A.**, Bognár L., Farmer J.P., Montes J.L., Atkinson J., Hawkins C., Korshunov A., Collins V.P., Pfister S.M., Tabori U., Jabado N.: Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin Cancer Res.* 2011 Jul 15;17(14):4650-60. IF: 7.742
17. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.Y.... **Klekner A.** et al.: Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in pediatric glioblastoma. *Nature* 2012 Jan, 482(7384):226-231. IF: 38.597

18. Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.A.... **Klekner A.** et al.: Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012 Oct 16;22(4):425-37. IF: 24.755
19. Northcott P.A., Shih D.J., Peacock J.... **Klekner A.**, et al.: Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature*. 2012 Aug 2;488(7409):49-56. IF: 38.597
20. Fontebasso A.M., Schwartzentruber J., Khuong-Quang D.A., Liu X.Y., Sturm D., Korshunov A., Jones D.T.W., Witt H., Kool M., Albrecht S., Fleming A., Hadjadj D., Busche S., Lepage P., Montpetit A., Staffa A., Gerges N., Zakrzewska M., Zakrzewski K., Liberski P.P., Hauser P., Garami M., **Klekner A.**, Bognár L., Zadeh G., Faury D., Pfister S.M., Jabado N., Majewski J.: Mutations in *SETD2* and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol* 2013 May;125(5):659-69. IF: 9.777
21. Zhukova N., Ramaswamy V., Remke M.... **Klekner A.** et al.: Subgroup specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2013 Aug 10;31(23):2927-35. IF: 17.96
22. Csonka T., Szepesi R., Bidiga L., Péter M., **Klekner A.**, Hutóczki G., Csiba L., Méhes G., Hortobágyi T.: The diagnosis of herpesencephalitis – a case-based update. *Ideggyógyászati Szemle* 2013;66(9–10):337–342. IF: 0.343
23. Kleinman C.L., Gerges N., Papillon-Cavanagh S.... **Klekner A.** et al.: Huang A., Majewski J., Jabado N.: Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR. *Nat Genet*. 2014 Jan;46(1):39-44. IF: 29.352
24. Remke M., Ramaswamy V., Peacock J.... **Klekner A.** et al.: TERT promoter mutations are highly recurrent in SHH subgroup medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. 2013 Dec;126(6):917-29. IF: 9.777
25. Shih D.J., Northcott P.A., Remke M.... **Klekner A.** et al.: Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol*. 2014 Mar 20;32(9):886-96. IF: 18.443
26. Fontebasso A.M., Papillon-Cavanagh S., Schwartzentruber J.... **Klekner A.** et al.: Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat Genet*. 2014 May;46(5):462-6. IF: 29.352
27. Mezey G., Treszl A., Schally A.V., Block N.L., Vízkeleti L., Juhász A., **Klekner A.**, Nagy J., Balázs M., Halmos G., Bognár L.: Prognosis in human glioblastoma based on expression of ligand growth hormone-releasing hormone, pituitary-type growth hormone-releasing hormone receptor, its splicing variant receptors, EGF receptor and PTEN genes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 Oct;140(10):1641-9. IF: 3.081
28. Csonka T., Murnyák B., Szepesi R., Kurucz A., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) and p53 labelling index correlates with tumour grade in meningiomas. *Folia Neuropathol*. 2014;52(2):111-20. IF: 1.568
29. Simándi Z., Czipa E., Horváth A., Kőszeghy A., Bordás C., Póliska S., Juhász I., Imre L., Szabó G., Dezső B., Barta E., Sauer S., Károlyi K., Kovács I., Hutóczki G., Bognár L., **Klekner A.**, Szűcs P., Bálint L., Nagy L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology. *Stem Cells*, 2015 Mar; 33(3):726-41. doi: 10.1002/stem.1894. IF: 6.523
30. Murnyák B., Bognár L., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Epigenetics of Meningiomas. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:532451. IF: 1.579
31. Zhukova N., Ramaswamy V., Remke M...., **Klekner A.** et al.: WNT activation by lithium abrogates TP53 mutation associated radiation resistance in medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2014 Dec 24;2(1):3. IF: 10.762
32. Torchia J., Picard D., Lafay-Cousin L....**Klekner A.** et al.: Molecular subgroups of atypical teratoid rhabdoid tumours in children: an integrated genomic and clinicopathological analysis. *Lancet Oncol*. 2015 May;16(5):569-82. IF: 24.690
33. Fontebasso A.M., Shirinian M., Khuong-Quang D.A., Bechet D., Gayden T., Kool M., De Jay N., Jacob K., Gerges N., Hutter B., Şeker-Cin H., Witt H., Montpetit A., Brunet S., Lepage P., Bourret G., **Klekner A.**, Bognár L., Hauser P., Garami M., Farmer J.P., Montes J.L., Atkinson J., Lambert S., Kwan T., Korshunov A., Tabori U., Collins V.P., Albrecht S., Faury D., Pfister

- S.M., Paulus W., Hasselblatt M., Jones D.T., Jabado N.: Non-random aneuploidy specifies subgroups of pilocytic astrocytoma and correlates with older age. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):31844-56. IF: 6.359
34. Thompson E.M., Hielscher T., Bouffet E.... **Klekner A.** et al.: Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncology*, 2016 Mar 11. pii: S1470-2045(15)00581-1. IF: 24.690
35. Bandopadhyay, P., Ramkissoon L.A, Jain P.... **Klekner A.** et al.: MYB-QKI rearrangements in angiocentric glioma drive tumorigenicity through a tripartite mechanism. *Nat Genet*. 2016 Mar;48(3):273-82. IF: 29.352
36. Hortobágyi T., Bencze J., Varkoly G., Kouhsari C. M., **Klekner A.**: Meningioma recurrence. *Open Med. Közlésre elfogadva*: 2016.04.27. IF: 0.15
37. Csonka T., Murnyák B., Szepesi R., Bencze J., Bognár L., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Assessment of candidate immunohistochemical prognostic markers of meningioma recurrence. *Folia Neuropathol. Közlésre elfogadva*: 2016.04.27. IF: 1.568

Összefoglaló tudománymetriai adatok

Tudományos in extenso közlemények száma:	53
Magyar nyelven:	10
Idegen nyelven:	43
Első és utolsó szerzős közlemények száma:	20
Első és utolsó szerzős közlemények IF:	26,135
Első és utolsó szerzős közlemények független hivatkozása:	97
In extenso közlemények impakt faktora:	387,679
Impakt faktor a PhD fokozat megszerzése után:	382,202
A téziseket megalapozó közlemények impakt faktora:	20,416
Könyvfejezetek száma (idegen nyelven):	1
Publikált absztraktok impakt faktora:	7,630
Összes IF:	395,309
Idézettségi mutatók:	
Független citáció:	1288
Összes citáció:	1641
Hirsch index:	15