

**A glia eredetű daganatok hisztológiai  
progressiójának vizsgálata**

**PhD-értekezés**

**DR. GÖMÖRI ÉVA**

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
PATHOLOGIAI INTÉZET**

**2000.**

I.	ÖSSZEFOGLALÁS	4
II.	BEVEZETÉS	6
III.	CÉLKITŰZÉSEK	8
IV.	A GLIOMÁK HISZTOLÓGIAI TÍPUSAI	8
	IV.1. ÁLTALÁNOS JELLEMZŐK	8
	IV.2. A GLIA DAGANATOK EREDETE	9
	IV.3. A GLIA DAGANATOK IMMUNFENOTÍPUSA	9
	IV.4. PILOCYTÁS ASTROCYTOMA - GRADE I.	10
	IV.5. DIFFÚZ ASTROCYTOMÁK - GRADE II.	10
	IV.5.1. <i>Protoplazmás astrocytoma</i>	12
	IV.5.2. <i>Fibrilláris astrocytoma</i>	12
	IV.5.3. <i>Gemistocytás astrocytoma</i>	12
	IV.6. PLEOMORPH XANTHOASTROCYTOMA - GRADE II.	13
	IV.7. OLIGODENDROGLIOMA- GRADE II.	13
	IV.8. EPENDYMOMA - GRADE II.	15
	IV.9. KEVERT GLIA DAGANATOK - GRADE II.	15
	IV.10. ANAPLASTICUS ASTROCYTOMA - GRADE III.	16
	IV.11. ANAPLASTICUS OLIGODENDROGLIOMA- GRADE III.	16
	IV.12. ANAPLASTICUS EPENDYMOMA - GRADE III.	17
	IV.13. ANAPLASTICUS OLIGOASTROCYTOMA - GRADE III.	17
	IV.14. GLIOBLASTOMA - GRADE IV.	17
	IV.15. GLIOSARCOMA - GRADE IV.	18
V.	A SEJTCIKLUS SZABÁLYOZÁSA ÉS A DAGANATOK PROLIFERÁCIÓJÁNAK ELVI ALAPJAI	20
	V.1. A SEJTCIKLUS SZABÁLYOZÁSA	20
	V.2. POZITÍV REGULÁCIÓ	22
	<i>ras-onkogének</i>	22
	V.3. NEGATÍV REGULÁCIÓ	22
	<i>p53 tumor szuppresszor gén</i>	22
	V.4. A SEJTCIKLUS ANALÍZISE	26
	V.4.1. <i>DNS index</i>	26
	V.4.2. <i>S-fázis frakció</i>	26
	V.4.3. <i>Bromdeoxy-uridin (BrdU) jelölődési index</i>	27
	V.4.4. <i>Proliferációs markerek, MIB-1 antitest</i>	28
	V.4.5. <i>Nucleoláris organizációs régió (Ag-NOR)</i>	29
	V.4.6. <i>Mitotikus index</i>	29
	V.5. CITOGENETIKAI VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA	29
	V.5.1. <i>Fluoreszcens in situ hibridizációs-interfázis citogenetika (FISH-IPC)</i>	30
	V.5.2. <i>Számbeli kromoszóma változások gliomákban</i>	31
VI.	ANYAG ÉS MÓDSZEREK	33
	VI.1. BETEGANYAG	34
	VI.2. RUTIN HISZTOLÓGIA	35
	VI.3. IMMUNOHISZTOKÉMIA	35
	VI.4. ÁRAMLÁSOS CITOMETRIA	36
	VI.4.1. <i>Beteganyag</i>	36
	VI.4.2. <i>A mérés kivitelezése</i>	37
	VI.5. FLUORESCENS IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ (FISH)	37
	VI.5.1. <i>Beteganyag</i>	37
	VI.5.2. <i>Próbák, a próbák jelölése</i>	38
	VI.5.3. <i>A minta előkészítése</i>	38
	VI.5.4. <i>Hibridizáció</i>	38
	VI.5.5. <i>Immuncitokémiai kimutatás</i>	39
	VI.6. MOLEKULÁRIS GENETIKAI TECHNIKA, PCR-SSCP-SZEKVENCIA ANALÍZIS	39

VI.6.1	Beteganyag	39
VI.6.2	DNS izolálás	39
VI.6.3	PCR (polimeráz-lánreakció) amplifikáció	40
VI.6.4	„SSCP (single-strand conformation polymorphism)” analízis	40
VI.6.5	A PCR termék klónozása és szekvenálása	41
<b>VII.</b>	<b>EREDMÉNYEK</b>	<b>42</b>
VII.1.	SEJTKINETIKAI, PROLIFERÁCIÓS VIZSGÁLATOK	42
VII.1.1	Recidiváló daganatok	42
VII.1.2	A DNS index	43
VII.1.3	S-fázis analízis	44
VII.1.4	Proliferációs markerek - MIB-1 antitest jelölődési index	44
VII.1.5	A mitotikus index:	45
VII.2.	CITOGENETIKAI EREDMÉNYEK	45
VII.2.1	Alacsony malignitású gliomák citogenetikai eltérései	46
VII.2.2	Magas malignitású gliomák citogenetikai eltérései	47
VII.3.	P53 ÉS RAS GÉNEK VIZSGÁLATA	48
VII.3.1	Klinikai és hisztológiai jellemzők	48
VII.3.2	p53 és ras gének pontmutáció analízise	49
VII.3.3	p53 protein immunhisztokémiai kimutatása	51
<b>VIII.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS</b>	<b>51</b>
<b>IX.</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK</b>	<b>58</b>
<b>X.</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK</b>	<b>61</b>
<b>XI.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>64</b>
<b>XII.</b>	<b>A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK, IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK ÉS ELŐADÁSOK</b>	<b>73</b>

## I. Összefoglalás

Az agy tumorok biológiai viselkedése igen változatos, azonos szövettani diagnózis és kezelés ellenére is különböző a betegek túlélése. A betegség kimenetelét a recidívák és a hisztológiai transzformáció ténye határozzák meg. A heterogén megjelenésű gliá eredetű tumoroknál fénymikroszkópos szövettani jellemzők nem feltétlen prediktívek, ennek alapvető oka a sejt ciklust szabályozó gének szerkezeti, funkcionális és genetikai változásaiban keresendők. Szükségessé vált a daganat sejtek genotípusának meghatározása a hagyományosan alkalmazott szövettani módszerek és az immunfenotípus megadása mellett.

Azon célból, hogy a gliómák biológiai viselkedését jobban tükröző diagnosztikus állásfoglaláshoz jussunk meghatároztuk az alacsony és magas malignitású gliá daganatok proliferációs aktivitását és vizsgáltuk a gliómák progressiójának genetikai hátterét.

A tanulmány első részében elvégzett sejt kinetikai eredményeink arra utalnak, hogy a hisztológiailag heterogén gliómák proliferációs paraméterek szerint jól elkülöníthetők egymástól és kiújuló, második tumoraiktól. Az alacsony malignitású gliómák diploidak, a proliferációs és mitotikus fázisban lévő tumor sejtek aránya alacsony. A gliá daganatok diagnosztikájában a sejtkinetikai adatok megbízhatóan alkalmazhatóak. Kedvezőtlen biológiai viselkedésűek és ezzel magas a recidíva hajlama azoknak a gliá tumoroknak, melyek proliferációs paraméterei a következőképpen alakultak:

- DNS index értéke  $1 \pm 0.1$ -nél kisebb vagy nagyobb
- és/vagy az S-fázis frakció értéke 6%-nál magasabb
- és/vagy 1 nagy nagytítású látótérben 2-3-nál több a MIB 1 index értéke
- és/vagy 10 nagy nagytítású látótérben 1-nél több mitózis látható.

Tanulmányunk második részében a daganat sejtek emelkedett proliferációs aktivitásának hátterében lévő genetikai változásokat vizsgáltuk. Fluoreszcens in situ hibridizációs-interfázis citogenetikai módszerrel kromoszóma számbeli eltéréseket találtunk alacsony és magas malignitású gliómákban. Vizsgálati eredményeinket értékelve felfigyeltünk arra a

körülményre, hogy az alacsony és magas malignitású gliomákban eltérő a különböző kromoszómák genetikai állományának vesztese.

- Alacsony malignitású astrocytomában az 1. és 17. kromoszómák monoszomiája már jelen van, mely a későbbiekben is kimutatható marad a daganat progressziója során. Alacsony malignitású oligodendrogliomában az 1. kromoszómán kívül a 19. kromoszóma monoszomiája jelzi a genetikai defektus jelenlétét.

- Magas malignitású gliomákban főleg a 9., 10. és 22. kromoszómák monoszomiája fordul elő, mely előnytelen biológiai viselkedésre enged következtetni. Ha alacsony malignitású glioma daganatban ezek a citogenetikai eltérések kimutathatók, gyors klinikai progresszióra és hisztológiai transzformáció lehetőségére kell gondolnunk.

Tanulmányunk harmadik részében PCR-SSCP-szekvenálás molekuláris genetikai módszert alkalmazva ras onkogének és p53 tumor szupresszor gén mutációjának szerepét vizsgáltuk primer és sekunder glioblastomákban. A ras onkogének mutációjának úgy tűnik nincs szerepe a glioblastomák kialakulásában. A p53 tumor szupresszor gén mutációja különösen érdekessé vált számunkra a 17. kromoszóma citogenetikai eltérései alapján. Vizsgálataink során néhány nukleotid különbséget mutattunk ki, melyek csak részben okoztak a fehérje aminosav sorrendjében minőségi változást. Eredményeink arra utalnak, hogy a p53 szomatikus mutáció önmagában nem elegendő a glioblastomák kialakulásához és a glioma daganatok késői progressziójához, az általunk alkalmazott molekuláris genetikai vizsgálatok csak az esetek töredékében nyújtanak segítséget. Noha a p53 gén mutáció szerepe nem igazolódott glioblastomákban addig a p53 protein emelkedett arányban kimutatható volt a glioblastok sejtmagjain. A p53 protein strukturális változásából és felhalmozódásából a tumor agresszivitására következtethetünk.

- A hisztológiai transzformáció során kialakult glioblastomában magas, 90-100/HPF volt a jelölődési index.

- Primer glioblastomában jóval alacsonyabb 40-45/HPF intranucleáris jelölődést találtunk.

A hagyományos hisztológiai osztályozás kiegészíthető proliferációs és citogenetikai adatokkal, melyek a gliomák között lévő biológiai különbségeket



reprezentálják. A daganatok diagnosztikája finomodott, melynek következtébe a gliomák prognosztikai megítélése pontosabbá vált.

## II. Bevezetés

A primer intracranialis, neuroepitheliális tumorok leggyakoribb formái a glia eredetű daganatok. A gliomák kezelése máig sem megoldott, annak ellenére, hogy a sebési intervenciós módszerek és a posztoperatív terápiás lehetőségek bővülnek. A komplex kezelési protokollok ellenére a tumorok különböző hosszúságú tünetmentes időszakokat követően gyakran kiújulnak, mely a beteg további sorsát döntően meghatározza.

Az agy tumorok biológiai viselkedése igen változatos. Klinikai megfigyelések utalnak arra, hogy azonos szövettani diagnózis és kezelés ellenére is különböző a betegek túlélése. A betegség prognózisát, a kezelés hatásosságát számos faktor befolyásolja.

Egyrésztől meghatározza a folyamat kimenetelét a tumor lokalizációja és kiterjedése. Gyakran a diagnózis pillanatában a tumor már előrehaladott stádiumban van, vagy a daganat lokalizációja határt szab a komplett reszekciónak, emiatt a kezelés hatásossága elmarad a vártnál.

Másrésztől alapvetően meghatározó a daganat hisztológiai típusa és növekedési sajátosságai. A gliomák nagy és heterogén csoportot alkotnak a központi idegrendszer tumorai között. A glia daganatok kor eloszlása, lokalizációja és morfológiai jellemzőik alapján változatos megjelenésűek. Közülük számos ritkán előforduló, speciális lokalizációjú, meghatározott életkorban kialakuló kevésbé okoznak neuro-onkológiai gyakorlati problémát. Ezek többsége igen kedvező klinikai lefolyású, lassan növekvő és teljes eltávolítás után gyógyulással jár, mint pl. myxopapillaris ependymoma, subependymalis óriás sejtés astrocytoma, subependymoma (33). Nagyobb problémát okoznak az astrocytomák különböző típusai, az oligodendrogliomák, a ependymomák és a kevert gliomák, melyek a felnőttkor leggyakrabban előforduló primer agydaganatai. Az 1993-az évi, revideált WHO megajánlás (47) szerint osztályozzuk őket, melynek alapja a tumor citológiai, hisztológiai megjelenése, a celluláris anaplasia foka és az immunhisztokémiai jellemzők. Ennek alapján a daganatok négy hisztológiai, érettségi fokozatba sorolhatók,

„grade” I.-től - IV-ig. (1. táblázat), beleértve a ritkább hisztológiai variánsokat is. Az eltérő biológiai viselkedésű gliomák csupán patomorfológiai alapon történő diagnózist nehezíti a hisztológiai megjelenés változatossága még egy-egy tumor csoporton belül is. További problémát jelent a daganatok kiújulása és malignus transzformációja, melyek miatt jóval változatosabb és kedvezőtlenebb biológiai viselkedéssel társulnak.

A betegség lefolyása során a gliomák transzformálódnak alacsony malignitásúból magas malignitásúba, vagy a magas malignitású csoporton belül, további dedifferenciáció során, anaplasiasból blastos daganat fejlődik ki. Míg a kiérett, hisztológiailag benignusnak tartott szövet proliferációk, alacsony malignitású tumorok (grade I.-II.) esetén a túlélési idő általában, relative hosszú, 6-8 év, csupán a betegek egy része marad a radikális műtéti eltávolítást követően tartósan panaszmentes, azaz gyógyult. Magas malignitású gliomás betegek első recidíváig eltelt ideje jelentősen lerövidül, legrosszabb prognózisúak a glioblastomák, túlélésük 0,5 és 1,5 év között várható (33, 81).

A gliomák onkológiai tulajdonságai sajátosságok, más nem idegrendszeri tumoroktól eltérőek. Esetükben a szisztémás tumor hatás hiányában: mint paraneoplasticus syndroma, nem lokális kompressziós hatáson alapuló tumoros cachexia és extraneurális metasztázisok kialakulásának elmaradása miatt a betegség kimenetelét a recidívák és a hisztológiai transzformáció ténye határozzák meg. A heterogén megjelenésű glia tumoroknál fénymikroszkópos hisztológiai jellemzők nem feltétlen prediktívek, ennek alapvető okai a sejt ciklust szabályozó gének szerkezeti, funkcionális és genetikai változásaiban keresendők.

A daganat diagnosztika területén a megválaszolandó kérdések köre kibővült, ezek elsősorban a daganat progressziójára vonatkozóak. Lényeges kérdés a glia eredetű daganatok osztályozásának finomítása, a különböző érettségű tumorok új szempontok szerinti jellemzése illetve a tumor sejt transzformáció háttérének újraértékelése. Napjainkban is zajló, a daganat diagnosztika területén bekövetkezett rohamos fejlődés eredményeképpen összegyűlt genetikai adatok segítségével és módszerek alkalmazásával közelebb jutottunk a glia daganatok természetének megismeréséhez. Hazánkban a modern citogenetikai és molekuláris genetikai módszerek alkalmazása még nem terjedt el az agy daganat diagnosztikában. A

hagyományosan alkalmazott szövettani jellemzők, az immunfenotípus és proliferációs aktivitás meghatározása mellett szükségessé vált a daganatsejtek genotípusának meghatározása, melyek együttesen jelölik ki a választandó optimális terápiát és várható prognózist.

### **III. Célkritizések**

Azon elgondolásból, hogy a gliomák biológiai viselkedését jobban tükröző diagnózist állítsunk fel célul tűztük ki, hogy PhD értekezés keretében:

I. Összefoglaljuk a gyakorlati szempontból fontos, glia eredetű daganatok különböző patomorfológiai megjelenési formáit, subtypusait és immunfenotípusát.

II. Meghatározzuk az alacsony és magas malignitású gliomák növekedési aktivitását és annak változását recidíváik során különböző proliferációs paraméterek alapján.

III. A tumorok recidívája és hisztológiai transzformációja során észlelt morfológiai változásokért és emelkedett proliferációs aktivitásért felelős genetikai változások szerepét, a daganatok genotípusát vizsgáljuk:

1. a gliomák dedifferenciációját kísérő citogenetikai, kromoszóma számbeli eltéréseket keressük

2. az egyik legrosszabb prognózisú agy daganat különböző subtypusaiban, primer és sekunder glioblastomák kialakulásában ras-onkogének és p53 tumor szuppresszor gén pontmutációjának szerepét vizsgáljuk.

IV. Mindezek alapján választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a hagyományos osztályozás alapján elkülönített hisztológiai csoportok kiegészíthetők-e csoport specifikus proliferációs és genetikai adatokkal.

## **IV. A gliomák hisztológiai típusai**

### **IV.1. Általános jellemzők**

Az astrocytoma elnevezést a XIX. század második felében Virchow használta először, majd később Bailey és Chushing honosította meg a neuropathológiában századunk húszas éveinek közepére (33,82).



Az agydaganatok a felnőttkori malignus daganatok 2 %-át képviselik. Gyermekkorban nagyobb gyakorisággal fordul elő, a leukémiák után a második leggyakoribb daganat. A neuroepitheliális daganatok jelentik a felnőttkori idegrendszeri eredetű neoplazmák közel 60%-át (33, 82), ezen belül a különböző típusú gliómák (astrocytoma, oligodendroglioma, ependymoma stb.) a daganatok több mint 90%-át alkotják.

#### IV.2. A glia daganatok eredete

#### IV.3. A glia daganatok immunfenotípusa

A glia daganatok immunfenotípusának meghatározása az intracitoplazmálisan elhelyezkedő intermedier filamentum, mint kis citoskeletális komponens, kimutatásán alapul. A glia sejten jelen lévő citoskeletális filamentumok, mint strukturális polimerek, melyek fő polipeptid komponense a savanyú glia-fibrilláris protein (GFAP). Ezen antigén fehérje 49 kD molekulásúlyú, főleg glutamátból aspartáttól és alaninból épül fel. Normál, fejlődésben lévő és patológias glia sejtekben egyaránt kimutatható. A neoplasztikus astrocyták GFAP pozitívítása (18. ábra) irodalmi adatok szerint jól bizonyított és összemérhető a tumor differenciáltsági fokával (82).

WHO grade	Daganat hisztológiai típusa
I.	Pilocytás astrocytoma Subependymalis óriás sejtés astrocytoma Myxopapillaris ependymoma Subependymoma
II.	Desmoplasticus infantilis cerebrealis astrocytoma Pleomorph xanthoastrocytoma Diffúz astrocytoma (fibrilláris, protoplazmás, gemistocytás) Oligodendroglioma Ependymoma ( celluláris, papilláris, világos sejtés) Kevert gliómák
III.	Anaplasticus astrocytoma Anaplasticus oligodendroglioma Anaplasticus ependymoma Anaplasticus kevert glioma
IV.	Glioblastoma Óriássejtés glioblastoma Gliosarcoma

1.táblázat. A neuroepitheliális, glia daganatok hisztológiai típusai, érettségi fokozatai az érvényben lévő WHO osztályozás alapján.

## **Alacsony malignitású gliá eredetű daganatok**

### *IV.4. Pilocytás astrocytoma - Grade I.*

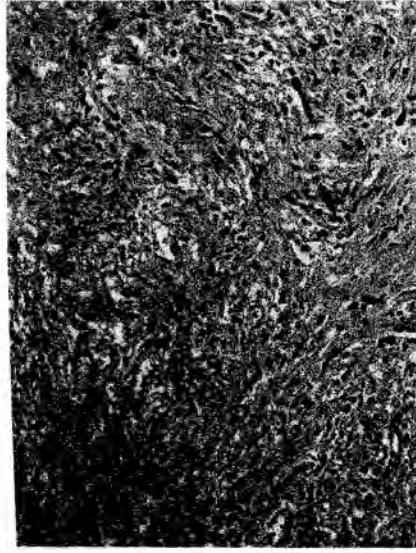
A pilocytás astrocytoma mind biológiai viselkedésében, mind patomorfológiailag a diffúz astrocytomáktól elkülönülő entitás. Gyermekkorban és fiatal felnőtt korban előforduló kiérett daganat. Az 1-es típusú neurofibromatosisban gyakori tumor. A daganat hisztogenezisére vonatkozóan nem egységes az álláspont. Az egyik elmélet szerint a pilocyták egy különálló prekursor, ependogliális sejtől erednek (tanycyta), melyek a kamrák falából származnak. A másik tan szerint nem speciális astrocytából származik, hanem genetikai változás hatására a közös gliá prekursor sejtől ered (33).

**Lokalizáció, makromorfológia:** Általában középvonali lokalizációjú beleértve a nervus opticust, chiasmát, hypothalamust, bazális ganglionokat, a cerebellumot és az agytörzset, de a cerebelláris hemisphaeriumokban is elhelyezkednek. Körtülrítak, lágy, néha rostos, tömöttebb részeket valamint meszet is tartalmazó szürkés-fehér színű, cisztás daganatok. Gyakran egyetlen nagyobb cisztát képez, benne fali nodulussal.

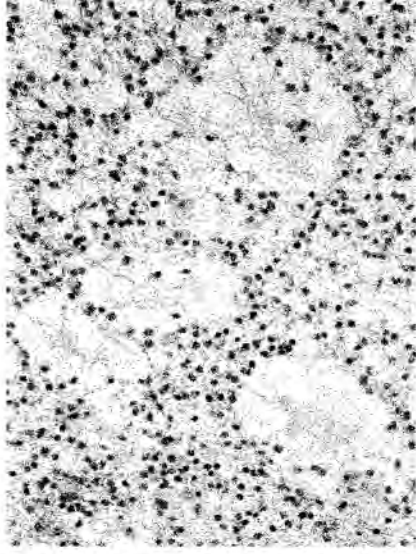
**Mikroszkópos megjelenés:** A tumor relatíve széles bipoláris fibrilláris sejtek szorosan egybefűzött kötegeiből épül fel. A sejtmagok közel egyformák megnyúltak, hyperkromatinizáltak. Nem szokatlan a mag pleomorfizmus sem, amely azonban nem valódi hanem degeneratív atípiakén értékelendő. A daganat változatos tendenciát mutat mikrocisztás elfajulásra. Jellegzetesek az eozinofil hialin granulomok a degeneratív astrocyta elváltozások, Rosenthal-rostok formájában. Felszaporodott hialinos erek mellett az astrocytomák ezen fajtájában a vasculáris endothen proliferáció nem jelent malignus elfajulást (1. ábra). Proliferációs aktivitása alacsony, lehet benne kevés számú mitózis. Malignus transzformációja irodalmi ritkaság (33, 82).

### *IV.5. Diffúz astrocytomák - Grade II.*

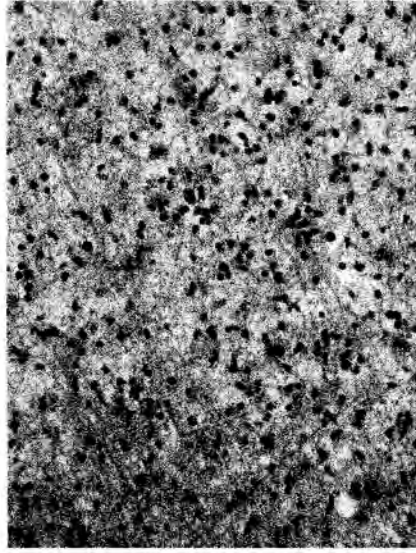
Jól differenciált, kiérett sejtekből felépülő daganatok, melyek hemisphaerikusan helyezkednek el, bármely lebenyben előfordulhatnak. A fiatalabb felnőttkor daganata. Éles határ nélkül infiltrál a környező agyállományban, szürkés-fehér, cisztákat tartalmaz. Lassan növekszik, azonban hajlamos a malignus elfajulásra. Hagyományosan protoplazmás, fibrilláris és gemistocytás



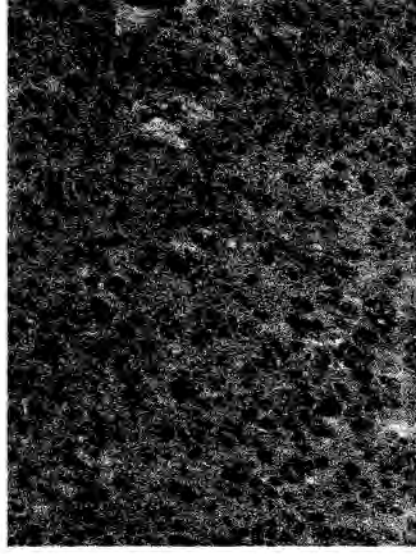
1. ábra. Pilocytás astrocytoma



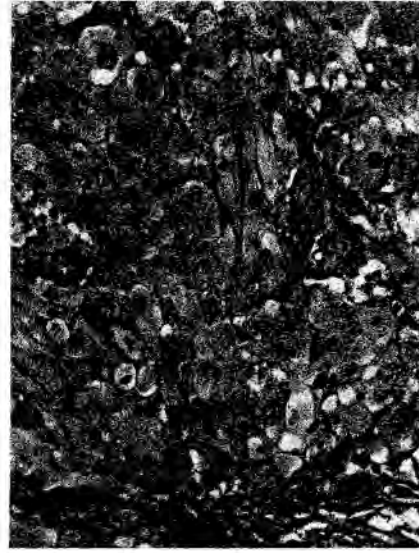
2. ábra. Protoplasmás astrocytoma



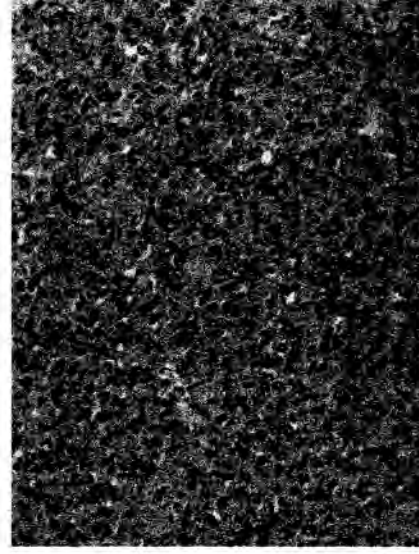
3. ábra. Fibrilláris astrocytoma



4. ábra. Gemistocytás astrocytoma



5. ábra. Pleomorph xanthoastrocytoma



6. ábra. Anaplasticus astrocytoma



subtipusa ismert. Normál agyban a protoplazmás astrocyta nagyrészt a cortexre és a bazális ganglionokra korlátozódik, míg a fibrilláris a fehérállományban található. A gemistocytás astrocyta, mint reaktív sejt az agyféltekékben fordul elő, daganatos sejtként is hemisphaeriális lokalizációjú.

#### IV.5.1 Protoplazmás astrocytoma

Hisztológiailag egynemű formában ritka tumor, a pilocytás astrocytoma tartalmazhat protoplazmás területeket, mely differenciál diagnosztikus problémát okoz. Főleg gyermekkorban fordul elő.

**Makroszkópos megjelenés:** Fehéres, finom szürke szövetszaporulat, a határai elmosottak. A tumorban degeneratív elváltozások, ciszták képződhetnek.

**Mikroszkópos megjelenés:** A tumor sejteket pókhálóra emlékeztető eozinofil mátrix választja el egymástól, amely nem tartalmaz glia fibrillumokat. A daganat alacsony cellularitású, kifejezett a mucoïd degeneráció és a mikrociszta képződés (2. ábra). Mitózisokat nem tartalmaz (33, 82).

#### IV.5.2 Fibrilláris astrocytoma

Leggyakoribb hisztológiai variánsa a diffúz astrocytomának.

**Makroszkópos megjelenés:** Fehéres-szürkés színű, nehéz elkülöníteni az ép fehérállománytól. Különböző méretű cisztákat tartalmaz.

**Mikroszkópos megjelenés:** Alacsony cellularitású, minimális pleomorfizmussal jellemezhető daganat, mely bőséges fibrilláris tumor mátrix-szal rendelkezik (3. ábra). Mitózisok nem vagy ritkán láthatók. A degeneratív elváltozások u.m. mikrociszták és kalcifikáció gyakori (33, 82).

#### IV.5.3 Gemistocytás astrocytoma

Kizárólag az agyféltekékben növe, inkább felnőttekben előforduló, egynemű hisztológiai formában ritka daganat.

**Makroszkópos megjelenés:** szürke alig granulált homogén lágy szövet, határai aránylag körülírtak. Kicsi vagy közepes cisztákat tartalmaz.

**Mikroszkópos megjelenés:** Enyhén emelkedett cellularitású daganat. A sejtek kerek, rövid nyúlványokkal rendelkeznek, a citoplazma homogén és erősen eozinofil, a sejtmag kerek, perifériás elhelyezkedésű. A glia fibrillumok többnyire a sejt szélére és a sejtnyúlványokba vannak zárva, kevés fibrilláris mátrixot képezve (4. ábra). Irodalmi adatok szerint egy részük glioblastoma multiformévé alakul át (33, 82). Újabb megfigyelés, hogy más típusú glia

daganatokban a gemistocytás komponens jelenléte klinikai és hisztológiai progressióval társul (94).

#### IV.6. *Pleomorph xanthoastrocytoma - grade II.*

Az astrocytomák egyik ritka variánsa, döntően gyermekkorban jelentkező, jól körülírt daganat. Lassan növekszik, hemisphaerális, superficialis lokalizációjú, érintheti a meninxet is. A daganatsejtek eredetét subpiális astrocytából származtatják.

*Makroszkóposan:* gyakran cisztát képez, falában murális szolid nodulus látható.

*Mikroszkóposan* jellegzetesen többmagvú óriássejtek és megnyúlt astrocyták láthatók, melyek a „pleomorfi” megjelenést kölcsönzik. A sejtekben lévő lipid miatt, a citoplazma világos, vacuolizált. A daganatsejt proliferációt pericelluláris reticulín rost szaporulat kíséri (5. ábra). Mitotikus aktivitása alacsony, nekrosisok, kóros erek nem láthatók. Egy részük malignusan transzformálódik, glioblastomává alakul (33, 82).

#### IV.7. *Oligodendroglioma- grade II.*

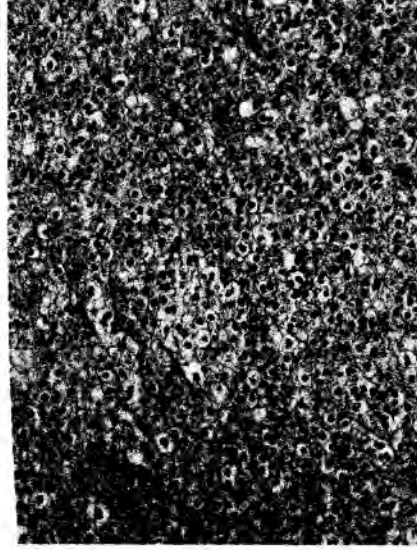
Az oligodendroglioma általában a hemisphaerális fehéralományban, főleg a frontális lebenyben diffúzan infiltráló daganat, mely a közép- és idősebb korosztályt érinti.

*Makroszkóposan* szürkés-rózsaszínű, jól körülhatárolt zselatin-szerű, helyenként elfolyósodó, gyakorta meszet tartalmaz.

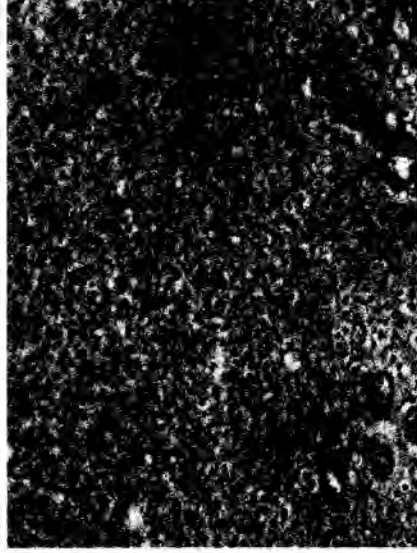
*Mikroszkóposan* a daganat egységes, kis oligodendrogliá sejtekből áll, magjuk kerek, perinucleáris háló figyelhető meg, nagyszámú mész precipitátum jellemzi. Néha minigemistocyták valamint pecsétgyűrű sejtekre emlékeztető tumor sejtek is megfigyelhetők. Jellegzetes erei az elágazódó kapillárisok. Terjedésére jellemző a perineurális satellitosis és a subpiális akkumuláció. Ritkán desmoplasticus reakció kíséri, néha a sejtek paliszád elrendeződése szembevető (7. ábra).

Immunfenotipusát illetően nincs speciális markere csak részben GFAP pozitív, emellett S-100 és leu-7 pozitívítás helyenként kimutatható (33, 82).

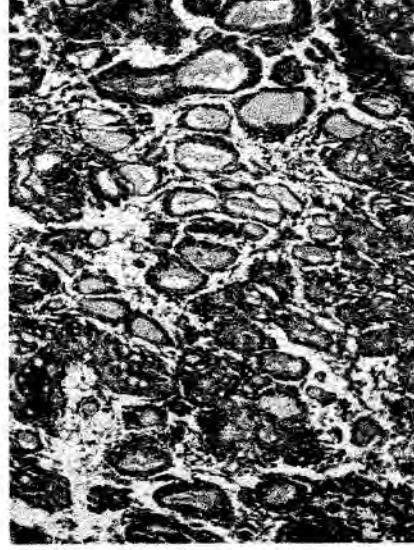




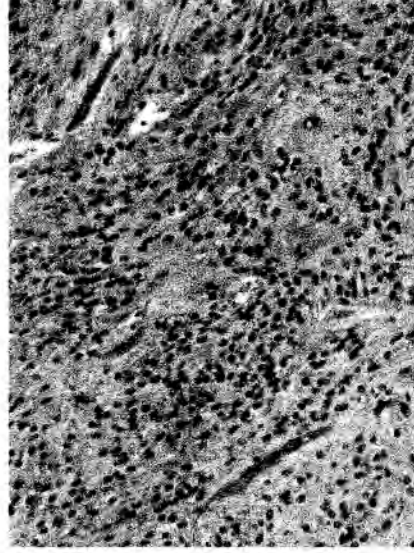
7. ábra. Alacsony malignitású oligodendroglioma



8. ábra. Anaplasticus oligodendroglioma



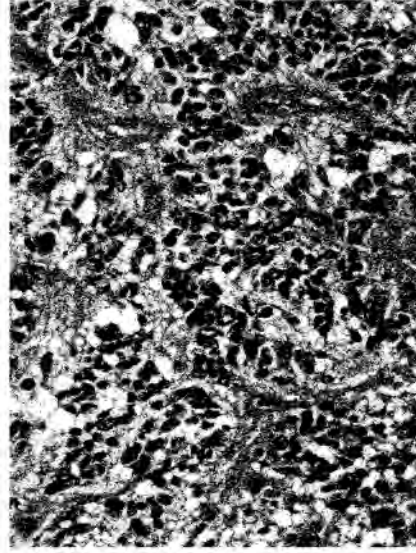
9. ábra. Myxopapillaris ependymoma



10. ábra. Alacsony malignitású ependymoma



11. ábra. Subependymoma



12. ábra. Anaplasticus ependymoma

#### IV.8. Ependymoma - Grade II.

Az ependymoma a kamrarendszerben vagy annak környezetében lévő daganat, mely leggyakrabban gyermekkorban fordul elő, a kor előrehaladtával incidenciájuk csökken, a daganat prognózisa pedig kedvezőbb. Egyaránt előfordul supra- és infratentoriálisan, gerinc lokalizációja gyakori. Multiplex endocrín neoplasma syndroma 1-es típusához és 2-es típusú neurofibromatosishoz gyakran társuló daganat.

**Makroszkóposan** rózsaszínű, törékeny, helyenként kalcifikált, bevérvéseket tartalmazó, körülírt tumorok.

**Mikroszkóposan** jellegzetes csepp alakú, megnyúlt magvú sejtekből épül fel, melyek rozettákat és pseudorosettákat képeznek (10. ábra). Emellett myxoid degeneráció, kalcifikáció, nekrotízisok, bevérvések is láthatók. Glia eredetükre utal GFAP pozitívításuk, emellett S100, valamint az ependymális rozetták felszínén EMA (epitheliális membrán antigén) pozitívítást is találtak.

Négy histológiai variánsa lehet: celluláris, papilláris, valamint világos sejtés és tanyctás subtípusok, nevüket a jellemző morfológiai jegyekről kapták. Speciális variánsa a *myxopapilláris ependymoma*, mely a fillum terminale, cauda equina területére lokalizálódik. Collumnális és cuboidális sejtekkel fedett papillákat képez, melyek degenerált fibrovasculáris vázat tartalmaznak. A daganatban gyakori a hialinos és mucoid degeneráció (9. ábra). A daganat kiérett, alacsony malignitású, Grade I-es (33, 82).

Ugyancsak I-es grádusú ritka daganat az intraventriculáris lokalizációjú *subependymoma*. Hisztogenezise egyértelműen még nem tisztázott, subependymális glia sejt eredete mellett felmerül hamartomatózus jellege is. Normál ependyma sejtre emlékeztető csoportokból áll, melyek között tömött fibrilláris mátrix található. A tumorban mikrocisztás degeneráció, kalcifikáció és ritkán vérvések egyaránt láthatók (11. ábra).

#### IV.9. Kevert glia daganatok - Grade II.

Kevert gliómának nevezzük azokat a daganatokat, melyek kettő vagy több glia sejtől származó daganatos részzel rendelkeznek. Leggyakoribb formája az *oligoastrocytoma*, melynek kritériuma, hogy az astrogliális komponens 25%-ot meghaladja. A két tumor sejt proliferáció morfológiailag elkülönülő (13. ábra),

oligodendroglioma túlsúlyos és astrocytoma túlsúlyos fajtái lehetnek. További ritkább variánsa, amikor a daganat pilocytás részleteket tartalmaz, vagy amikor nincs astroglia komponens csak oligodendrogliá és ependyma. Ezeket a daganatokat *oligoependymomának*, *ependymo-astrocytomának* nevezzük (33, 82).

### **Magas malignitású glia eredetű daganatok**

#### **IV.10. Anaplasticus astrocytoma - Grade III.**

A diffúz astrocytomákhoz hasonlóan a féltékékben növekszik, felnőtt középkorosztályt érinti. Lehet primer vagy transzformált típusú, amely alacsony malignitású astrocytoma progressziója során alakul ki.

**Makroszkópos megjelenés:** A diffúz astrocytoma sima homogén szerkezete helyett morzsalékony, granuláris, szürke tumor szövet, nekrozisokkal és vérzésekkel tarkított.

**Mikroszkópos megjelenés:** A malignus elfajulásra jellemző a megnövekedett sejtszám, a tumor sejtek polimorfizmusa, a mitotikus alakok megjelenésével emelkedik a proliferációs aktivitás (6. ábra). Az astrocytoma transzformációja során kicsi, disszeminált anaplasticus területek keletkeznek. Gyakori a tumoros gemistocyták jelenléte a daganatban (33, 82).

#### **IV.11. Anaplasticus oligodendroglioma- grade III.**

Az anaplasticus oligodendroglioma az astrocytomához hasonlóan, két fajta lehet, primer és transzformált, azaz secunder típusú.

**Lokalizációja, incidenciája** megegyezik az alacsony malignitású formával.

**Makroszkópos elváltozás:** Megegyezik az érettebb formával, azonban nekrozisok tarkíthatják.

**Hisztopatológiai**lag a sejtek jelentősen anaplasziásak, óriás sejtek is jelen lehetnek. A sejtmagban prominens nucleolus látszik, a perinucleáris háló eltűnik, a daganat kifejezett hypercellularitású (8. ábra). Elágazódó erek, ér endothel proliferáció, mikrokalcifikáció és nekrosis is jelen lehetnek (33, 82). Amikor a daganatsejtek anaplasziája kifejezett a glioblastomától elkülöníteni histológiaiilag nehéz, Grade IV. csoportba soroljuk.

#### IV.12. Anaplasticus ependymoma - Grade III.

Az ependymoma malignus változata, mely a kiérett formához képest citológiai és hisztológiai atípiát, anaplastiát, hypercellularitást, atipusos mitózisokat és ér endothel proliferációt tartalmaz. A rosettoid, pseudorosettoid sejtelrendeződés háttérbe szorul, a daganat diffúzabbá válik (12. ábra) (33, 82).

#### IV.13. Anaplasticus oligoastrocytoma - Grade III.

A többi gliomához hasonlóan, a malignus oligoastrocytomára is igazak azok a hisztológiai kritériumok, melyek az anaplasia jelei: nevezetesen celluláris atípiá, pleomorfizmus, magas cellularitás és mitózis szám, vasculáris ér endothel proliferáció és nekrosis (33, 82).

#### IV.14. Glioblastoma - Grade IV.

A glioblastoma a legmalignusabb glia tumor, a kezelés ellenére betegeket egy éven belül elvesztjük. Két fajtája ismeretes a primer és a transzformált típusú, amely alacsony malignitású astrocytoma transzformációja következtében alakul ki. A két glioblastoma fajta nemcsak hisztológiailag, hanem klinikailag, prognosztikailag és genetikailag is eltér egymástól. A primer glioblastoma idősebb betegeket érint, a túlélése rövidebb, míg a secunder típusban hosszabb klinikai anamnézis áll rendelkezésünkre, a betegek fiatalabbak és jobb a prognózisa.

**Incidencia:** Általánosan elfogadott hogy a glioblastoma képezi az összes központi idegrendszeri tumor 15-20%-át. Leggyakrabban 45-55 év között fordul elő, 30 éves kor előtt ritka.

**Lokalizáció:** Az agy bármely részén előfordulhat, az elülső részein gyakoribb, az occipitális lebenyben ritka. Gyakran több lebenyben növekszik, multiplex megjelenésű. A myelinisatio mentén terjed, a pillangó tumor - a corpus callosumon átnőve - jellegzetes a glioblastoma előrehaladott stádiumában. Terjedhet subarachnoidálisan, perineurális satellitosissal és perivascularisan.

**Makroszkópos megjelenés:** A tumor infiltratív természetű. A felületesen elhelyezkedő tumorok gyakran a cortexbe terjednek, beszóvik a leptomeninxeket és a durát. Általában nekrosisokat és a vérzéseket tartalmaz. Már kis méretű tumorhoz is jelentős perifokális oedema társulhat.



**Mikroszkópos megjelenés:** Láthatjuk az anaplasia jellegzetességeit: emelkedett sejtszámot, változó sejtmag méretet. A sejtek celluláris pleomorfizmusára jellemző, hogy a kis glioblastokon kívül regresszív óriás tumor sejtek, lipid tartalmú blastok, granuláris sejtek valamint gemistocyták is jelen vannak. Számos területen a sejtek nyalábokba, kötegekbe rendezettek. Perivascularális reaktív limphocytás beszűrődés kíséri. Ritkán elszarusodó laphám, mirigy-szerű, porc és csont metaplaszia alakul ki. Vasculáris endothel proliferáció, paliszád nekrozisok, magas proliferációs aktivitás mindig jelen van (14-15. ábra).

Hisztológiai variánsa az *óriássejtes glioblastoma*, mely klinikailag is külön entitást képvisel. Gyermekkorban is előforduló malignus daganat, de jóval kedvezőbb prognózissal társul, több éves a túlélése. Jól körülhatárolt, kevésbé infiltratív tulajdonságú. Szövettanilag bizarr többmagvú óriássejtek és bőséges reticulín rostos stroma jellemzi (16. ábra) (33, 82).

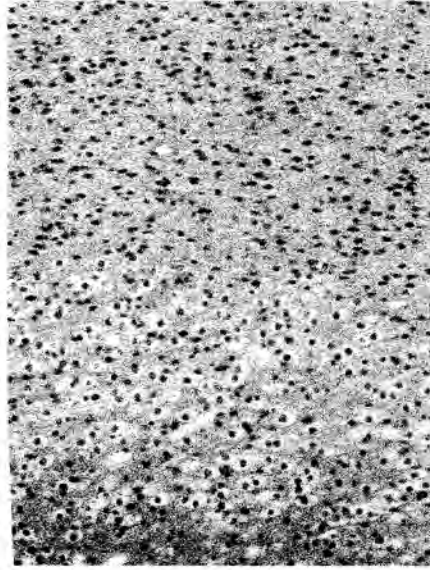
#### IV.15. Gliosarcoma - Grade IV.

A gliosarcoma glioblastokból és sarcomatosus szövet komponensekből felépülő, szintén a hemisphaeriumokat érintő malignus daganat. Előfordulási gyakorisága 60-70 éves kor között a legmagasabb. Hisztogenezisét részben glioblastok, részben pedig vasculáris proliferációval magyarázzák, a sarcomatosus részeket tartják vasculáris eredetűnek.

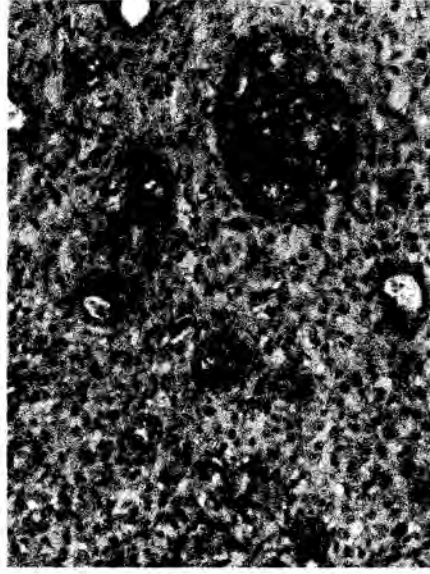
*Makroszkóposan* nekrozisokat, vérezéseket tartalmaz, jellegzetesen tömött tapintatú a sarcomatosus proliferáció miatt.

*Mikroszkópos* megjelenésében a daganat bifázisos jellegű, részben gliás, részben pedig mesenchymális differenciáltságú atípusos sejteket tartalmaz. A gliás komponens kis glioblastokból áll, emellett lehetnek óriás, többmagvú anaplasias nagy glioblastok is (17. ábra). A sarcomatosus komponens megnyúlt sejtekből tevődik össze, mely nyalábokat képez és élesen különválnak a gliomás résztől. A mesenchymális komponens további chondroid vagy osteoid, esetleg izom irányú differenciáltságot mutathat. Immunhisztokémiaiilag is bifázisos a gliás rész GFAP, míg a sarcomatosus komponens vimentin monoklonális antitest pozitív (33, 82).





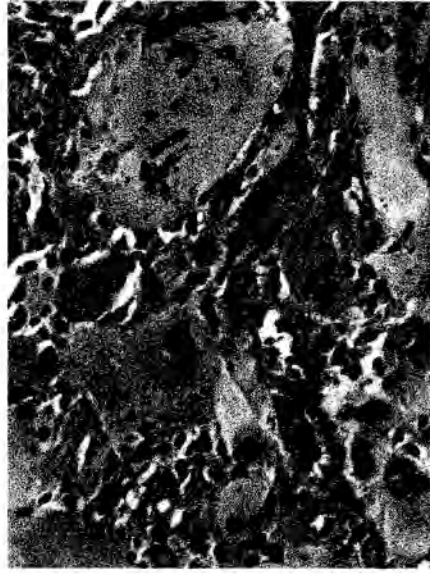
13. ábra. Kevert glia daganat,  
oligoastrocytoma



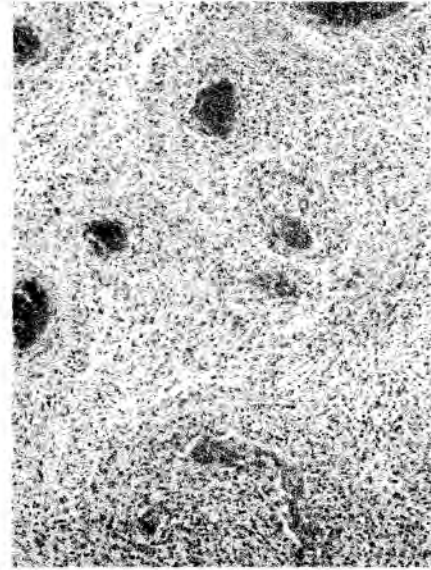
14. ábra. Glioblastoma glomeruloid  
ér endothel proliferációval



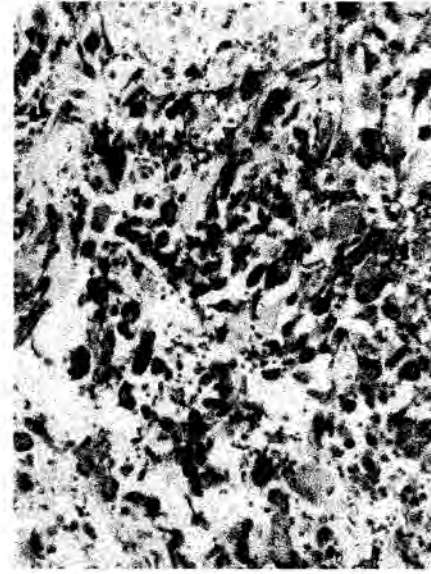
15. ábra. Glioblastoma paliszád  
necrosissal



16. ábra. Óriássejtes glioblastoma



17. ábra. Gliosarcoma



18. ábra. GFAP immunhisztokémiai  
reakció glioblastomában

## V. A sejtciklus szabályozása és a daganatok proliferációjának elvi alapjai

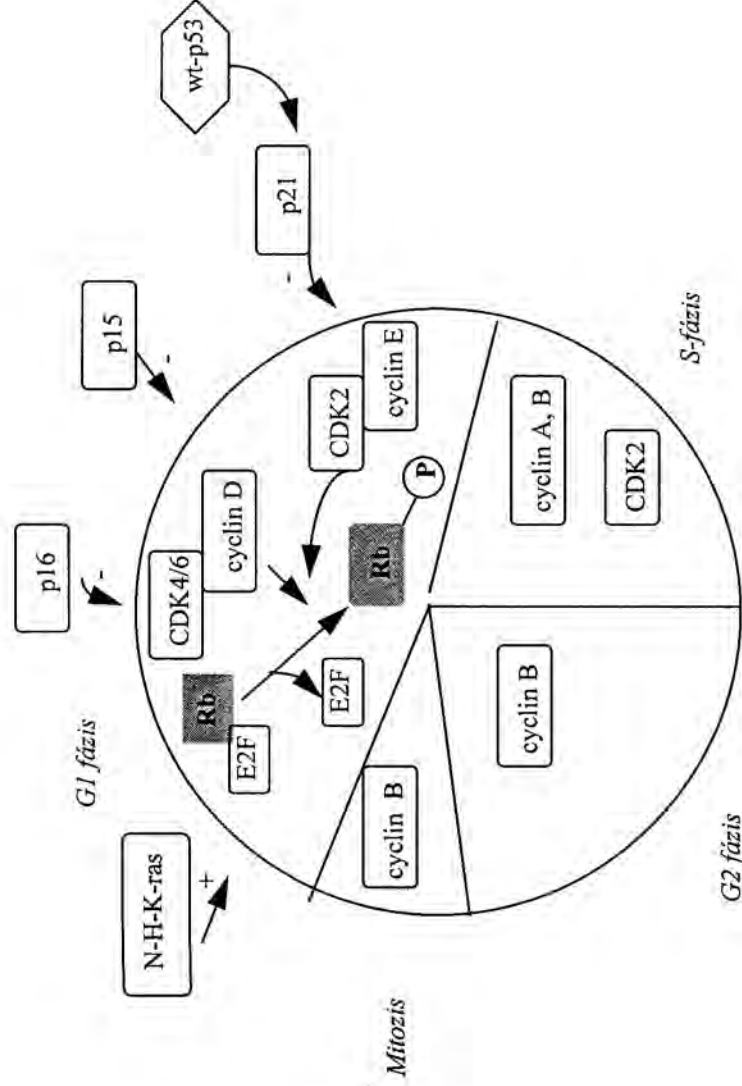
### V.1. A sejtciklus szabályozása

Az eukaryota sejtciklus két különböző ponton szabályozott: egyrészt a G<sub>1</sub> „restrikciós”, ponton, vagyis a sejtek S-fázisba történő progressziójának, a DNS szintézisének regulációja során (55). Másrészt a G<sub>2</sub>/M ponton, amikor a DNS „repair” következik be és a sejtek a mitózis fázisába kerülnek. Mindkét folyamat a foszforiláció mechanizmusán keresztül valósul meg, mely protein kinázok segítségével zajlik.

Az utóbbi évek tumor kutatási eredményei arra engednek következtetni, hogy a daganatok a sejtciklus betegségei (55, 95). A sejtciklus pozitív és negatív szabályozás alatt áll, mely különböző szabályozó fehérjék egymáshoz kapcsolódó komplex folyamata (19. ábra). A fehérjék kódoló gének elsősorban proto-onkogének és tumor szuppresszor gének, melyek működése normál sejtkben egyensúlyban tartott sejtproliferációt eredményez.

A tumor sejtek azonban elvesztik szoros növekedési kontrolljukat, függetlenné válnak a fiziológias szabályozó szignáloktól, mely a sejtciklus felgyorsulását, progresszióját eredményezi. A megváltozott reguláció következtében kialakult kontrollálatlan proliferációt sejtciklus asszociált proteinek funkcióinak változásával magyarázzák, melyek hátterében a fehérjéket kódoló gének genetikai változásai állnak (12, 16, 22, 39, 55, 56, 62, 95).

Az onkogének megváltozott vagy aktivált normál celluláris gének, melyeket proto-onkogéneknek (ras, c-myc, bcl-1, bcl-2 stb.) nevezünk. Ezek növekedési faktorokat, növekedési faktor receptorokat, transcripcionális szabályozó fehérjéket kódolnak, melyek a sejtosztódás irányában hatnak (7, 52, 57, 62, 67, 76, 88).



19. ábra. A sejtciklus szabályozása. A *G1* fázisban szereplő proteinek, melyeket szabályozó gének mutációi gyakran mutathatók ki alacsony és magas malignitású gliómákban.

A tumoros sejt populáció növekedési ütemét az emelkedett proliferációs aktivitáson túl a sejt ciklus különböző fázisokban történő blokkolása is jelentősen befolyásolja. A negatív regulációhoz tartozó tumor szuppresszor gének (retinoblastoma (Rb) gén, p53) inaktivációja, mutációja, deléciónja vagy génátrendeződése során vezet a tumoros transzformációhoz (22, 34, 37, 50, 55, 56, 62).

A fiziológias, belső genetikai hibák kijavításának elmaradása ugyancsak szerepet játszik a karcinogenezis korai iniciatív szakaszában, mely mutáns p53 tumor szuppresszor gén hatás és „mismatch repair gének” (MMR) funkció kiesésével magyarázhatók (22, 55, 95).

Végül az apoptózis folyamatában lévő sejtek arányának megváltozása, az apoptoszt szabályozó gének (bcl-2, bax) mutációja vezet a sejtciklus progressiójához, a daganat növekedési ütemének felgyorsulásához (10, 76).

## V.2. Pozitív reguláció

A sejt ciklus motorja, a proliferációt serkentő cyclin-dependens-protein kinázok, melyek a retinoblastoma (Rb) fehérje foszforilációját segítik elő (16, 20, 21, 22, 55, 84). Az aktív cyclin-dependens-kinázok heterodimer molekulák, melyek cyclin-dependens-kináz alegységből és cyclin- alegységből állnak, ezen kapcsolódás elengedhetetlen a foszforiláció folyamatához. Ezen proteinek aktivációja genetikai változások következtében vezethet a sejtek emelkedett proliferációjához. A bcl-1/cyclin D1/PRAD gén a sejtciklus G<sub>1</sub> fázisának progressiójának szabályozásában vesz részt, a 11 kromoszóma hosszú karján 11q13 helyezkedik el. A gén expressziójának fokozódása vagy amplifikációja a gén átrendeződésén keresztül megváltoztatja a növekedési faktorokra gyakorolt hatását, lecsökkentve azok érzékenységet, amely kontrolálatlan növekedést eredményez. Kísérleti eredmények alapján limphoid tumorokban a cyclin- D1 túltermelődése kimutatott, elsősorban a gén transzlokációja miatt.

### V.2.1 ras-onkogének

Egy további proto-onkogén csoport, a három génből álló ras-familia, mely kis GTP-kötő fehérjét kódol. Funkciójuk a mitogen szignálok átvitelében és az inaktív- aktív GTP-kötő állapot szabályozásában van (3, 57, 71). Mutációjukat már több tumorban kimutatták, mint emlő, pancreas, leukémiák, colon, tüdő daganatokban (57). Az onkogénné váló ras más onkogének hatását felerősítve a tumor szupresszor géneket hatástalanítva a daganatos transzformációban játszik szerepet.

## V.3. Negatív reguláció

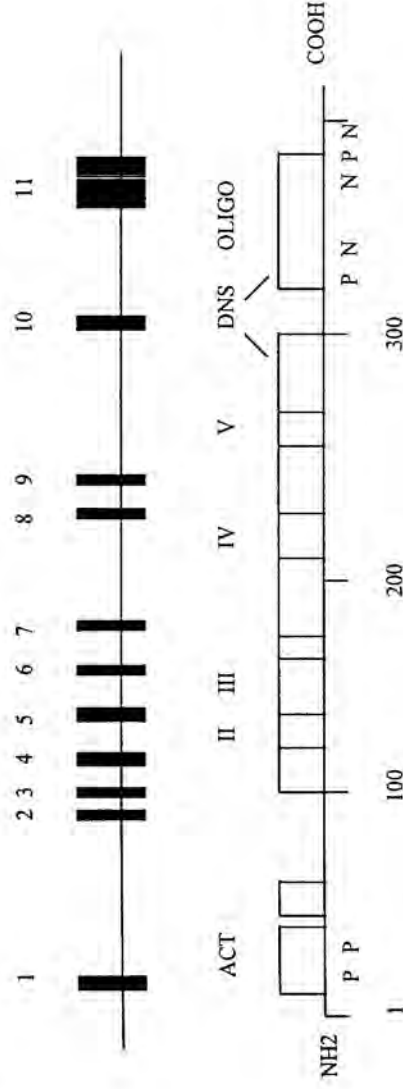
A tumoros sejtciklus különböző fázisokban történő blokkolása és a programozott sejthalál (apoptosis) fékezi a daganat progresszióját. A G<sub>1</sub>-fázis blokkolását végzi a közelmúltban felfedezett cyclin-dependens-kináz inhibitorok családja. Az egyik csoportjához tartozik (WAF1/CIP1) p21 protein, mely képes kötödni a cyclin-cyclin dependens kináz komplexhez, ezzel blokkolva a sejt ciklust (16, 21, 22, 50, 55, 66). A p21 protein inhibitor normál és reaktív agy szöveten minimálisan van jelen, transcriptionálisan aktiválódik p53 protein által.

### V.3.1 p53 tumor szupresszor gén

A p53 tumor szupresszor gén 17-es kromoszóma rövid karján 17p13.1 locuson helyezkedik el, 11 exonból és 10 intronból áll. Az általa kódolt p53 protein 53 kD molekulásúlyú normál celluláris foszoprotein, mely nukleáris lokalizációjú a



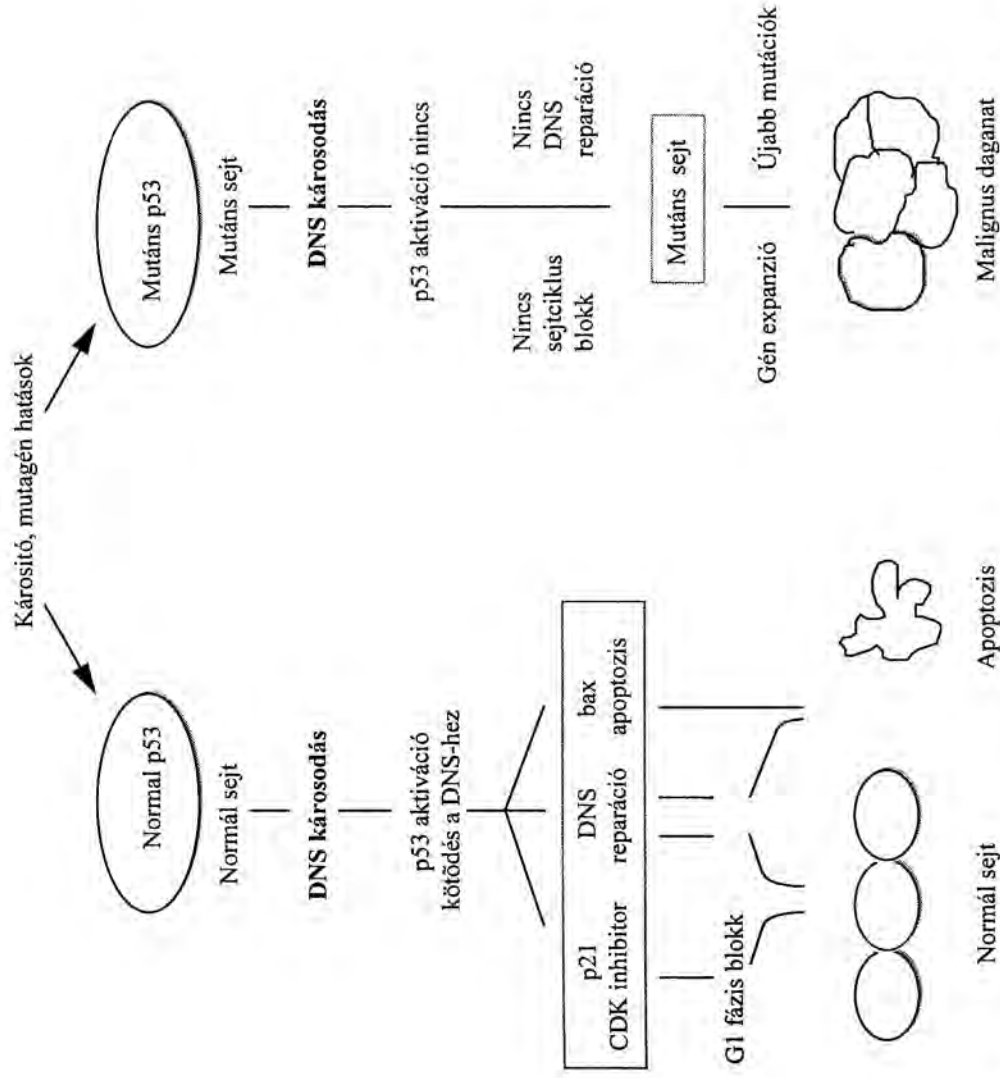
kromatin nucleoláris mátrixával kapcsolódik (9). Fiziológiás állapotban rövid (20 perc) fél életidővel rendelkezik. Korábbi kutatások feltérképezték a gén szerkezetét (20. ábra). A p53 N-terminális része (1-45 aminosav) transzaktivációs doménként szerepel. A középső része (110-290) DNS-kötő régió, multiplex foszforilációja során képes kötődni a két és egy szájú DNS-hez. A C-terminális régiója (310-363) szabályozó funkciójú.



20. ábra. Felül a p53 gén szerkezete látható, az oszlopok az exonokat jelölik. Az alul a fehérje szerkezete látható funkcionálisan fontos helyekkel: ACT=transzaktivációs régió, DNS=DNS-kötő domén, OLIGO=oligomerizációs régió, P=foszforilációs hely, N=nucleáris jel, NH2=amino-terminális, COOH=carboxyl-terminális.

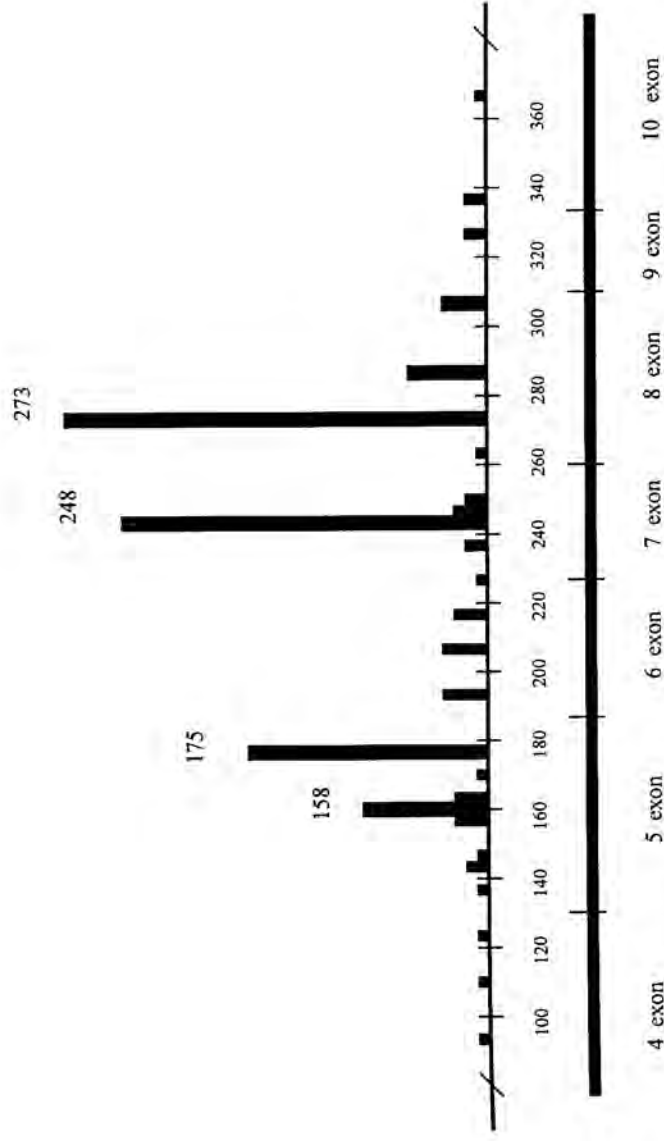
A p53 gén központi szerepet tölt be a sejtciklus szabályozásában és a genom integritásának megőrzésében. Normál u.n. vad-típusú alakja, mint transzkripciósfaktor gátolja az abnormális sejt proliferációt és sejt növekedést a p21-cycindependens-kináz-inhibitor komplexen keresztül. Fontos funkciója a DNS károsodás kijavításában és a deregulált sejtproliferáció blokkolásában van. A sejtciklust G<sub>1</sub> fázisban leállítja, ezzel meggátolja a sejt S-fázisba történő belépését. Harmadik lényeges szerepe az apoptózis indukciójában van, melyet a bax gének kontrollján keresztül valósít meg (16, 34, 37, 44, 53, 55, 89, 95) (21. ábra).





21. ábra. p53 tumor szupresszor gén a genom „sentinel”-je. A normál p53 aktiváció a sejtben a DNS károsodást kijavítja, a sejtciklust blokkolja és apoptoszt indukál. Míg a mutáns mindezek hiányában atípusos sejtek, malignus tumor kialakulásához vezet.

A p53 genetikai változása a legtöbb tumorfajtában kimutatott (19, 24, 26, 32, 35, 42, 48, 52, 56, 58, 62, 65, 68, 73, 75, 81, 89). A gén vesztese, inaktivációja, mutációja kapcsán genetikai instabilitás alakul ki a sejtek kikerülnek a sejt ciklus szabályozás alól, strukturális és funkcionális változást okoz a fehérjében, stabilizálódik és a sejtben felhalmozódik (2, 24, 51). A p53 gén szomatikus mutációjának klonális expansiója a gliómák histológiai progressiójával együtt járhat (26, 48, 89), prognosztikus értéke vitatott (8, 42, 93).



22. ábra. A p53 gén mutációjának eloszlása astrocytomákban. 100-360 kodonig terjedő része látható, mely 4-10 exont jelent. Az oszlopok a mutációk eloszlásának gyakoriságát jelentik a kodonok tükrében.

A p53 gén szomatikus pontmutációját az egyes exonok szekvenciáira specifikus primerek felhasználásával, PCR (polimeráz láncreakció) felerősítéssel tudjuk kimutatni. A primerrel jelölt génszakaszokat termociklométerrel megvizsgáljuk majd SSCP (single strand conformation polymorphism) gélelektroforézissel a standardtól eltérő migrációs csíkot keressük. Az eltérően migráló génszakaszok nukleotid sorrendjét határozzuk meg és a kapott szekvenciát a normál gén szekvenciájával hasonlítjuk össze, keresve a nukleotid eltéréseket, azaz pontmutációkat.

A mutáció a génszakasz szempontjából lehet „silent” vagyis aminosav eltérést nem okozó, lehet „replacement”, amikor a fehérje aminosav sorrendjében cserét eredményez. A módszer alkalmazása során problémát jelenthet az, hogy ha a mutáció a primeren kívüli gén szakaszokon helyezkedik el. Általában a genomon elhelyezkedő „hot spot”-okhoz közel eső genetikai szekvenciákat vizsgáljuk (22. ábra), vagyis azokhoz a kodonokhoz közel eső génszakaszokat, ahol a leggyakrabban alakulnak ki mutációk, a p53 gén esetében az 5-9 exonokat (22, 34, 53).

#### V.4. A sejtciklus analízise

A sejt proliferációjáért felelős gének változása következtében kialakult tumor sejtek érettségi fokának minél pontosabb meghatározása a daganatos sejtciklus analízise, sejt kinetikai paraméterek figyelembe vétele során valósul meg (5, 13, 14, 17, 43, 49, 61).

Sejtciklus analízis alkalmazásával pontos információt kapunk a különböző fázisban lévő sejtek arányáról és DNS tartalmáról. A vizsgálatokat egyrészt áramlások citometriás mérésekkel, ehhez kapcsolódó computeres sejtciklus analízáló programmal végezzük el. A mért adatok alapján össz-DNS mennyiség eloszlást határozzuk meg, vizsgáljuk a ploiditást, a  $G_0/G_1$ , S,  $G_2+M$  fázisban lévő sejtek százalékos arányát és a DNS index értékét (36).

##### V.4.1 DNS index

A DNS index értékét az aneuploid és a normál diploid (standard alkalmazásával) DNS csúcs fluoreszcens intenzitásának hányadosa adja meg. A megtartott kromoszóma készlettel rendelkező, diploid sejtek DNS indexe: 1. Paraffinos anyagon az értéke 0,9-1,1 között helyezkedik el, a nemzetközi irodalom „near diploid”-nak nevezte el. Az eltérést a formalinban fixált minta előnytelen tulajdonságai okozzák s ennek következtében a festék nem megfelelő kötődése a DNS hélixhez. Diploidnak tartjuk a tumort ha egy  $G_0/G_1$  csúcs van jelen és a DNS index a megadott határok közé esik. Aneuploid a tumor ha a diploid sejtciklus mellett addicionális csúcs van jelen és a DNS index értéke 0,9-nél kevesebb vagy 1,1-nél nagyobb. Tetraploid a tumor ha a DNS index értéke 1,9 és 2,1 közötti. Multiplex aneuploid, ha több aneuploid csúcs halmozódik (1, 83).

A tumorok biológiai viselkedésének alakulásában az aneuploid sejtpopuláció jelenlétén kívül a diploidtól való eltérés mértéke is meghatározó (17, 28, 61, 63, 83). Általában a diploiditás a klinikai és hisztológiai malignitást nem zárja ki, a glioblastomák egy része szintén diploid. A diploiditás malignus tumorokban gyakran előnytelen prognózist jelent, elsősorban a kezelésre adott kedvezőtlen reakciója miatt.

##### V.4.2 S-fázis frakció

Az S-fázisban lévő DNS replikációs állapotú sejtek százalékos megoszlása a teljes sejtciklus vonatkozásában prognosztikus értékű, a túléléssel és a

hisztológiai grádussal szoros kapcsolatban áll, bár a benignus és malignus neuroepitheliális tumorok közötti S-fázis frakció határértékeire vonatkozóan nem egységesek az irodalmi adatok (13, 14). A gliomák minden típusát vizsgálták már az S-fázis frakció és a túlélés vonatkozásában. A tanulmányokban három tumor csoportot különítettek el: alacsony S-fázis kedvező prognózissal: 2,9% alatt, intermedier csoport: 3-5,9% között, valamint magas S-fázis kedvezőtlen prognózissal: 6% feletti értékkel (13, 14).

Az S-fázisban lévő sejtek aránya változhat a fixálással. A sejtek izolálása során kialakult sejttörmelék befolyásolhatja a sejtciklus analízáló program (Multicycle, Phoenix Flow System, San Diego, CA) által számított értékét.

#### V.4.3 Bromdeoxy-uridin (BrdU) jelölődési index

Szintén az S-fázisban lévő sejtek arányára enged következtetni a bromdeoxy-uridin jelölődési index. Klinikai alkalmazása során BrdU preoperatív intravénás beadását követően az S-fázis alatt beépül a sejt DNS-ébe, így direkt mérhető a DNS szintézis. A tumor sebési eltávolítása után kimutatható a beépülés mértéke anti-BrdU antitest alkalmazásával immunhisztokémiai módszerrel vagy FITC-konjugált anti-BrdU antitesttel áramlásos citometria analízissal (36, 43, 59, 63). A tumorok növekedési ütemének kimutatására jó módszernek bizonyult, azonban a rutin diagnosztikában széles körben nem terjedt el, mert a tumorok maximális dúsulása individuális különbségeket mutat, valamint retrospektív vizsgálatokra kevésbé alkalmas. A módszer előnyeként említjük, hogy értékes információt nyújt a tumor radioterápiás érzékenységről. Ha összevetjük más proliferációs markerek jelölődési indexével mint pl. a MIB-1, amely 1,7-2,8-szorosa a BrdU indexnek (59, 63). Az irodalmi adatok szerint a kiértékelte astrocytomákban a BrdU jelölődési index 1-9,3% között változott. Nem mutatott szignifikáns kapcsolatot a korrallal, a nemmel, a tumor lokalizációjával vagy a tumor primer avagy recidív voltával. Prognosztikai szempontból csak a BrdU jelölődési index és a sebési eltávolítás radikálitása mutatott szignifikáns kapcsolatot a tünetmentes időszak hosszával recidiváló tumorokban (59, 63). A kiértékelte tumorok 74%-a 1% alatti BrdU jelölődési indexszel rendelkezett. A kiújuló glia tumoroknál az indexének átlagértéke 4,4%, értéke szignifikánsan eltért a primer tumorokétól. Kevert gliomákat vizsgálva a BrdU jelölődési index és a hisztológiai grádus prognosztikai szignifikáns kapcsolata az oligodendro-



gliomás komponensben volt kimutatható. Magasabb volt a BrdU jelölődési index olyan tumorokban, melyekben nekrozisok voltak és a vascularitás emelkedett, ezen jellemzők a főleg a glioblastomák sajátosságai. A mitózisok számával a index értéke nem mutatott szoros kapcsolatot (59, 63).

#### V.4.4 Proliferációs markerek, MIB-1 antitest

A proliferációs markerek közül a MIB-1 antitest, a rutin hisztopatológiában leginkább elterjedten használt módszer, paraffinos anyagon jól használható, retrospektív feldolgozásra alkalmas (78). Az immunhisztokémiai reakciót rutinszerűen végzett Streptavidin-Biotin/ Peroxidáz módszerrel végezzük el. A MIB-1 antitest a nukleáris Ki-67 non-hiszton proteint jelöli. Ez az antigén a proliferáló sejtekben expresszálódik a sejtciklus késői G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, és M fázisaiban, G<sub>0</sub>-ban és a korai G<sub>1</sub> -ben hiányzik. A Ki-67 rövid fél élettíddel rendelkező protein, katabolizmusa a sejtciklus egyes fázisaiban erősödő intenzitással zajlik, a mitózis végén befejeződik. A sejtciklus során az antigén intranucleáris elhelyezkedése jelentősen változik. A G<sub>1</sub> és S-fázisban nucleoláris lokalizációjú tömött fibrilláris állományhoz kapcsolódik. A mitózishoz közeledve a nucleolus feloszlik a nukleáris mátrixban visszamarad az antigén. A kromoszómák kondenzálódásával párhuzamosan azok körül helyezkedik el (5). Ki-67 képes kötődni a DNS-hez, ezzel megváltozik a protein, sokkal immunreaktívabbá válik. MIB-1 jelölődési index tükrözi a malignitás fokát, adott tumor szövet sajátosságai közé tartozik, a daganat növekedést mutató területének kimutatására alkalmazható.

Általában az irodalom mind a glia, mind pedig a meningx daganatokat széles körben vizsgálta a Ki-67 jelölődési index vonatkozásában. A prognózis, a hisztológiai típus és a grádus alapján szintén három csoportra szétválasztva adják meg a Ki-67 jelölődési index értékét. Grade I. érett meningeómákban: 0,7%; grade II, atípusos meningeómában: 2,1%; Grade III. malignus meningeómában: 11%. A gliomákban a jó prognózisú fibrilláris grade II. astrocytoma: 2% alatt, anaplasticus Grade III: 2-5% és a glioblastoma grade IV: 5% feletti a Ki-67 jelölődési index (29, 46, 60). Más szerzők a benignus/malignus határértéket 3-4%-ban adják meg (30, 31).



#### V.4.5 Nucleoláris organizációs régió (Ag-NOR)

A részletesen tárgyalt proliferációs markereken kívül egyéb módszerek is alkalmasak a prognózis, a tumor hisztológiai típusának és grádusának részletesebb elemzésére. Egyike ezen módszereknek az ezüstözési eljárással történő nucleoláris organizációs régió (NOR) feltűntetése. A NOR DNS hurkokból épül fel, melyek riboszómális RNS géneknek (rDNS) felelnek meg és a nucleolusra lokalizálódnak. Emberben az acrocentricus kromoszómák rövid karján helyezkedik el. A reakció során a NOR-hoz társult nem-hiszton fehérjék szulfidril csoportjai mutathatók ki (pl. C23 protein, B23 protein RNS polimeráz I.). Az Ag-NOR szemcse eloszlás a nucleolus diszaggregációs és reaggregációs állapotát tükrözi a fibrilláris állomány területében. Ezzel magyarázható az Ag-NOR rögök méretének és számának fordított arányossága. A magokban a reakció során képződő fekete szemcsék nagysága, száma és alakja a rDNS transzkripció aktivitására, egyben a sejt proliferációs állapotára enged következtetni. A NOR szemcsék nucleoláris profija alapján elkülöníthetők a malignus és benignus daganatok. Az Ag-NOR jelelődési aránya a gliá tumorokban az egyes hisztológiai típuson és gráduson belül tükrözi a biológiai viselkedésbeli különbségeket (65).

#### V.4.6 Mitotikus index

A legrégebbi és legegyszerűbben kivitelezhető módszer a proliferációs aktivitás megítélésére a mitotikus index, melyet nagy nagytűsű látóterre vonatkoztatva adunk meg. A mitotikus index az általános pato-onkológiában a dignitás és különböző hisztológiai osztályozás alapját képezi. A mitotikus index a tumorok érettségi fokozatának (grade) besorolás egyik fontos kritériuma. A mitózisok előfordulásának gyakorisága egyenesen arányos a daganatok érettségi fokozatával (33, 47, 82). alacsony malignitású tumorokban elvétve vagy egyáltalán nem fordulnak elő mitózisok. A malignitással a mitózisok száma emelkedik.

#### V.5. Citogenetikai változások vizsgálata

A sejtkinetikai vizsgálatok során észlelt tumor sejt össz-DNS mennyiségének változása numerikus kromoszóma eltérésekben is megnyilvánulhat. A kromoszóma számbeli eltéréseket interfázis citogenetikai módszerrel,

fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH-IPC) tudjuk nyomon követni (15, 23). Tekintettel arra, hogy a kis DNS tartalom eltérés a áramlásos citometriás mérés érzékenységén kívül esik, valamint arra a körülményre, hogy a tumor sejtek metafázis vizsgálata, különös tekintettel a szolid tumorokra, számtalan technikai buktató miatt csak részlegesen végezhető el, neuroepitheliális tumorok progressziója folyamán bekövetkező kromoszómális számbeli eltérések csak részben felderítettek.

Az aneuploiditás vizsgálatánál mindkét módszer esetében hátrányokkal is kell számolnunk, áramlásos citometriával egy-egy kisebb kromoszóma vesztese vagy plusz kromoszóma jelenléte nem biztosan mutatható ki, míg FISH eredmények értékelésénél figyelni kell az álpozitivitásra és negativitásra, valamint a szigorú standardok alkalmazására. Tehát hátrányaik kiküszöbölése miatt előnyt jelent a két módszer együttes alkalmazása (15, 23, 68).

#### V.5.1 Fluoreszcens in situ hibridizációs-interfázis citogenetika (FISH-IPC)

Az eukaryoták genomjának egy részét a genom fő tömegét alkotó DNS-től elkülönülő szatellita DNS alkotja (sDNS). Az sDNS-re jellemző, hogy különböző hosszúságú egységeik ismétlődnek a genomban, részben a kromoszómák pericentromerikus régiójára lokalizálódnak (55).

A fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatok során a kromoszómák (peri)centromer elhelyezkedésű, nagyfokban ismétlődő DNS „repetitív” szekvenciáira specifikus DNS próbákkal detektáljuk a kromoszóma számbeli változásait interfázis sejtmagokon (68, 72). A próbák magas specificitással felismerik a „tandem” ismétlődő szekvenciákat a kromoszóma centromer régiójában. A fluoreszcens in situ hibridizációs-interfázis citogenetika (FISH-IPC) módszernek számos előnyös tulajdonsága van: relative gyors és könnyű módszer, mind az éretlen, mind a terminálian differenciált sejtek tanulmányozhatók vele. A centromerikus próbák használata során a centromer régión kívül eső kromoszóma részéről információt nem kaphatunk, így a telomerikus részeket érintő deléció, transzlokáció nem mutatható ki. Ezért a FISH-IPC módszerének fő hátránya, hogy csak azok az aberrációk detektálhatók, amelyeket specifikus próbával keresünk. Az eljárás során normál kromoszómánként két hibridizációs jelet kapunk. Ettől való eltérés mind pozitív, mind pedig negatív irányban a genomban történt változásra hívja fel a

figyelmet. Kettőnél több, pl. három hibridizációs jel esetén triszómiától, egy hibridizációs jel kiesésekor monoszómiáról beszélünk.

#### V.5.2 Számbeli kromoszóma változások gliomákban

Napjainkra a tumoros glia sejtek citogenetikai eltérései az egyik legmegbízhatóbb prognosztikus faktornak bizonyultak (6, 80, 85). A legújabb kutatások szerint gyakran találunk kromoszóma eltéréseket a gliomák különböző típusaiban, a leglényegesebb kromoszóma és genetikai változásokat az alábbiakban foglaljuk össze.

Az 1. kromoszóma monoszómiáját általában alacsony malignitású gliomákban mutatták ki. A rövid karon elhelyezkedő 1p32-36 régió mutációját találták pilocytás és diffúz astrocytomában, pleomorph xanthoastrocytomában (96). Ez a második leggyakoribb genetikai eltérés kiérett oligodendroglomában és kevert glia daganatokban (41, 74).

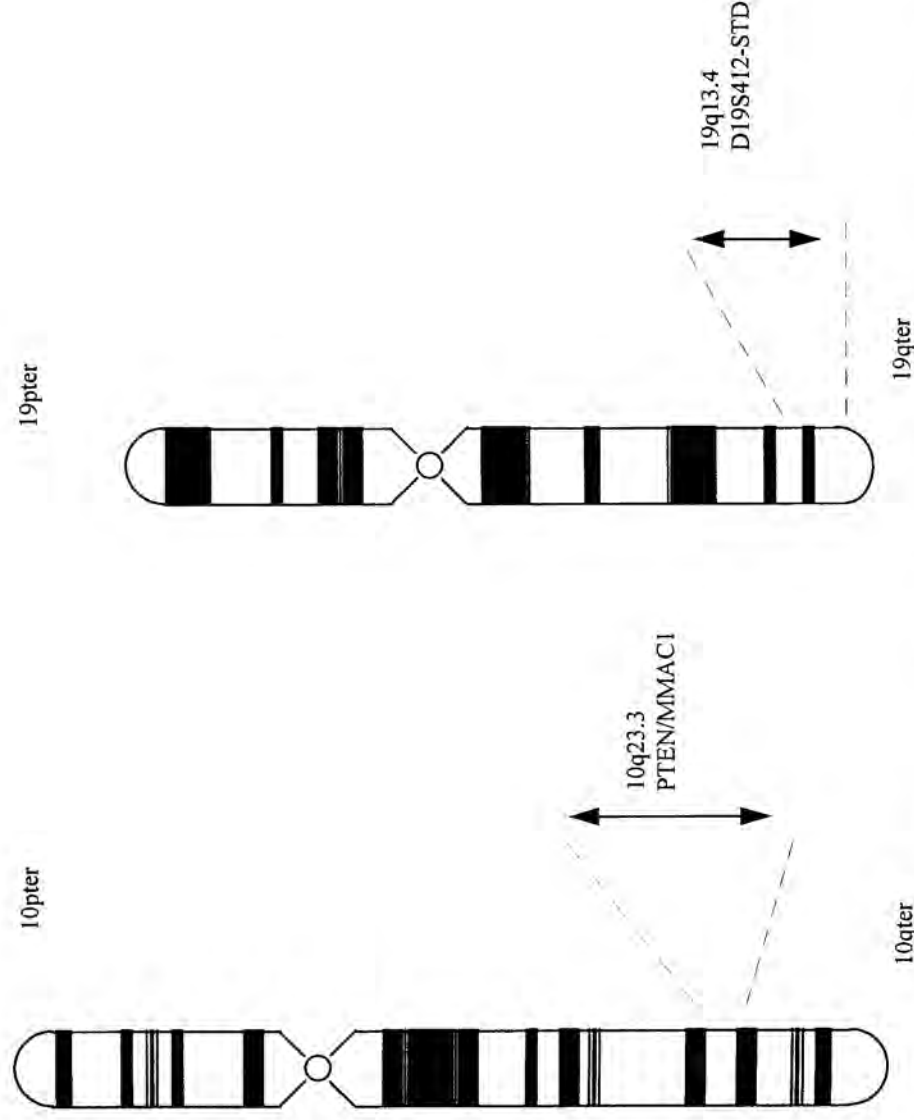
A 3. kromoszóma monoszómiája kapcsán gyakran megemlítik a rövid karon elhelyezkedő VHP (von Hippel-Lindau) tumor szuppresszor gén (3p25-26) mutációját diffúz astrocytomákban, mely hosszabb túléléssel párosult (45). A 3. kromoszóma triszómiáját pleomorph xanthoastrocytomában írták le.

A 7. kromoszóma genetikai változása gyakran függ össze a rövid karon elhelyezkedő EGFR-gén (Epitheliális Növekedési Faktor Receptor) amplifikációjával (71, 75). Különösen a glioblastomákban van ennek jelentősége, mivel a „de novo”, primer típusban jellemzően az EGFR amplifikációja jelen van, míg a szekunder típusban ez a genetikai változás hiányzik. A 7. kromoszóma triszómiájáról pleomorph xanthoastrocytomában, pilocytas astrocytomában és alacsony malignitású oligodendroglomában számol be az irodalom (96).

A 9. kromoszóma rövid karján elhelyezkedő 9p21 régió vagy p16 gén a sejt ciklus szabályozásában a gátló oldalon vesz részt a cyclin-dependens kináz 4-6 gátlásán keresztül. A kromoszóma ezen régiójának vesztese vagy a gén mutációja gyakran függ össze a magas malignitású gliomák progressziójával (6, 62, 84).

A 10. kromoszóma monoszómiáját, a hosszú kar deléciójával kapcsolatban mutatták ki magas malignitású astrocytomákban primer és sekunder glioblastomákban, különösen a daganatok progressziójával hozzászóló kapcsolatba (4, 11, 25, 26, 27, 54, 90). A 10. kromoszóma mikroszatellita változásai a PTEN/MMAC1 gén, 10q25-26 telomerikus régióban a leggyakoribbak (23. ábra).

A 13. kromoszóma számbeli eltérései viszonylag kisebb gyakorisággal fordulnak elő. Elsősorban a hosszú karra lokalizálódó Rb (retinoblastoma) gén, 13q14 régió deléciójára utalnak, a gliá daganatok progressziójában játszott szerepe miatt, különösen gyerekkori ependymomákban mutatták ki magasabb százalékos előfordulását (50, 56).



23. ábra. A 10. és 19. kromoszómák feltüntetett régiói „glióma tumor szuppresszor génként” váltak ismertté az irodalomban. A 10. kromoszóma 10q23.3 régiójának delécióját magas malignitású gliomákban, különösen azok progressziója kapcsán mutatták ki. A deléciós térképen feltüntetett, 19qter telomerikus régió oligodendrogliómában az egyik leggyakoribb genetikai változás.



A 17. kromoszóma gyakran érintett idegrendszeri daganatokban a rajta elhelyezkedő két fontos gén mutációja, deléciója miatt. Az egyik a p53 tumor szuppresszor gén, melynek mutációját különböző mértékben minden glioma típusban kimutatták már (19, 26, 35, 64, 91). A másik a hosszú kar 17q12 régiójára lokalizálódó, 60 exon hosszúságú NF1 gén, mely a neurofibromin intracitoplazmális fehérjét kódolja. A gén mutációja gyakori mind familiális neurofibromatosisban szenvedő betegeken, mind pedig sporadikusan előforduló pilocytás és diffúz astrocytomákban, különösen optikus lokalizációban (33).

A 19-es kromoszóma 19qter régióhoz közel eső D19S412-STD szakasza, glioma tumor szuppresszor gén mutációja, deléciója már alacsony malignitású oligodendrogliomákban megjelenik, telomerikus lokalizációja miatt a kromoszóma monoszómiájaként ritkán azonosítható változás (79). Legfrissebb genetikai eredmények szerint a deléciós térképen feltüntetett 19q13.2 régió D19S412-STD szakasza között, a szupresszor gén szerkezetétől eltérő másik, ugyancsak a gliomákra jellemző gén került azonosításra. Ez a „humán glia érési factor-gamma gén”, melynek fiziológias szerepe van a glia sejt differenciációjában és az idegsejtek regenerációjában valamint a tumor sejtek proliferációjának gátlásában (70).

A 22. kromoszóma deléciója, és a 22q12.2 régió mutációja megtalálható ependymomákban, meningeomákban és alacsony malignitású astrocytomákban is, bár kisebb arányban (40,77). Ezek a daganatok halmozódnak 2-es típusú neurofibromatosisban, ami az NF2 gén mutációjával függ össze, de megtalálhatók sporadikusan is. A 22 kromoszóma vesztesének hátterében ritkán a véremez-eredetű növekedési faktor (PDGF) B-lánc homodimer génjének (22q12.3-13.1) genetikai változása is állhat. Ezen kívül kimutatott az 1-es kromoszóma rövid karjának és a 22 kromoszóma hosszú karjának transzlokációja ependymomában.

## VI. Anyag és módszerek

A célkitűzésekben megfogalmazott szempontok és teendők megvalósítása érdekében, több, rendelkezésünkre álló módszer közül a legmegfelelőbbeket választottuk ki, melyek a rutin hisztopatológiában

hatékonyan alkalmazhatók, gyors, gazdaságos eljárásnak tekinthetők, a betegség követésére alkalmasak.

A problémát három módszertani szempontból közelítettük meg:

1. Jellemeztük a daganatok proliferációs aktivitását alacsony és magas malignitású gliomákban és azok recidívái során áramlásos citometriás mérésekkel.
2. Citogenetikai, kromoszóma számbeli eltéréseket kerestünk fluoreszcens in situ hibridizációs-interfázis citogenetikai (FISH-IPC) módszerrel.
3. Onkogén és tumor szuppresszor gén szerepét analizáltuk az egyik legrosszabb prognózisú agydaganatban, primer és sekunder glioblastomákban, melyhez molekuláris genetikai módszerek polimerázláncreakció - „Single-Strand-Conformation-Polymorphism” (PCR-SSCP)-szekvencia analízist végeztünk.

#### VI.1. Beteganyag

A POTE Pathológiai Intézetében 1996-1999 között összesen 1116 idegsebészeti műtéti minta került hisztológiai feldolgozásra. A hisztológiai diagnózisok megoszlását éves lebontásban a 2. táblázat mutatja be. A glió daganatok képezik az éves vizsgálati minta közel 20%-át (19,4% - 23,6%), ezen belül mintegy 7 fajta különböző természetű daganattal kell számolnunk a pilocytás astrocytomától a glioblastomáig. Az egyéb kategóriába tartoztak a ciszták, az angiómák, a teratomák, a schwannomák, a craniopharyngeomák, a plexus adenomák és a tályogok. A lymphomákhoz soroltuk a plasmocytomákat is.

Intézeti anyagunkban a közölt irodalmi statisztikai adatoktól eltérően jóval alacsonyabb arányban fordultak elő glió eredetű daganatok. Ennek oka lehet egyrészt az, hogy a közölt statisztikai adatok nagy neuropathologiai centrumokból származnak. Másrészt intézeti anyagunkban csak az operált esetek kerültek regisztrálásra, vagyis az inoperábilis és autopsia során felfedezett daganatokat statisztikai kimutatásunk nem tartalmazza.

Hisztológiai diagnózisok	1996	1997	1998	1999
Diffúz astrocytoma	9 (3.3%)	7 (2.47%)	4 (1.46%)	3 (1.04%)
Anaplasticus astrocytoma	10 (3.6%)	9 (3.18%)	10 (3.66%)	9 (3.14%)
Glioblastoma	29 (10.6%)	20 (7.06%)	30 (11%)	36 (12.5%)
Pilocytás astrocytoma	1 (0.4%)	3 (1.06%)	1 (0.36%)	3 (1.04%)
Oligodendro-glioma	1 (0.4%)	4 (1.4%)	5 (1.83%)	4 (1.4%)
Kevert glioma	5 (1.8%)	4 (1.4%)	4 (1.46%)	4 (1.4%)
Ependymoma	2 (0.73%)	8 (2.82%)	5 (1.83%)	9 (3.14%)
Medulloblastoma	4 (1.46%)	1 (0.35%)	1 (0.36%)	2 (0.7%)
Meningeoma	72 (26.3%)	63 (22.26%)	66 (24.2%)	76 (26.5%)
Hypophysis adenoma	8 (2.9%)	12 (4.24%)	15 (5.5%)	16 (5.6%)
Lymphoma	4 (1.46%)	9 (3.18%)	8 (2.9%)	9 (3.1%)
Metasztázis	45 (16.42%)	71 (25.1%)	58 (21.24%)	68 (23.7%)
Egyéb	84 (30.65%)	72 (25.44%)	76 (27.84%)	56 (19.5%)
Összesen	274	283	273	286

2. táblázat. A POTE Pathológiai Intézetében 1996-99 között vizsgált agyszöveti biopsziák előfordulási gyakorisága a hisztológiai diagnózisok szerint évenkénti megoszlásban.

### VI.2. Rutin hisztológia

A formalinban fixált, paraffinban beágyazott műtéti mintákból származó 5-6 µm vastagságú metszeteket rutinszerűen haematoxin-eosin festéssel vizsgáltuk. Szükség esetén kiegészítésül PAS reakciót és reticulín ezüstözési technikát alkalmaztunk.

### VI.3. Immunohisztokémia

Immunohisztokémiai módszer segítségével határoztuk meg a daganatok immunfenotípusát. Formol-paraffinos szövetminta felhasználásával Streptavidin-Biotin/Peroxidáz módszer szerint végezzük a vizsgálatokat. Minden esetben használtunk GFAP monoklonális antitestet, esetenként további ellenanyagok is alkalmazásra kerültek: EMA (epitheliális membrán antigén),



S100, Vimentin, Synaptophysin, Cytokeratin. A proliferáló sejtek kimutatására MIB-1 antitestet használtunk. Kóros körülmények között a sejt magban felhalmozódott p53 protein kimutatására DO7 monoklonális ellenanyagot használtunk. A MIB-1, p53 jelelt sejtek számát, 20-22 nagy nagyítású (400x) látótér számolása után 1 nagy nagyítású (400x) látótérre, míg a mitózisok számát 10 nagy nagyítású (400x) látótérre adtuk meg.

#### VI.4. Áramlásos citometria

##### VI.4.1 Beteganyag

POTE Pathológiai Intézet neuro-onkológiai anyagából paraffinos beágyazott glia daganatok kerültek vizsgálatra. A méréseket szükség esetén végeztük el, amikor a diagnózis megszületésében segítséget nyújtottak az áramlásos citometriás adatok. Összesen 72 betegnél alkalmaztuk ezt a vizsgálatot. A betegeket két csoportra osztottuk, 22 recidíváló glia daganatos beteg primer és recidív mintáit hasonlítottuk össze részben egymással, részben pedig 12 nem recidíváló beteg daganatával, melyeknél az 5 éves követés alatt recidívát nem észleltünk. Az 3. sz. táblázat tartalmazza a betegek klinikai adatait. A diagnózis felállítása az érvényben lévő WHO által meghatározott hisztológiai és immunfenotípusra vonatkozó kritériumok alapján történt.

	Grádus	Nem recidíváló tumzorok	Primer tumzorok	Recidív tumzorok
Esetszám		12	22	22
Átlagéletkor (év)		26.66	37.41	39.68
Koreloszlás (év)		5-60	14-51	15-52
Ependymoma	II.	1	1	1
	III.	0	1	1
Oligodendroglioma	II.	2	1	0
	III.	0	4	5
Astrocytoma	II.	9	8	3
	III.	0	3	5
Oligoastrocytoma	II.	0	3	0
	III.	0	1	3
Glioblastoma	IV.	0	0	4

3. táblázat. A betegek klinikai adatai és a hisztológiai típus megoszlása gyógyult és recidív glia daganatokban.



#### VI.4.2 A mérés kivitelezése

A vizsgálatokat áramlások citométerrel és ehhez kapcsolódó computeres sejtciklus analízáló programmal (Multicycle, Phoenix Flow System, San Diego, CA) végeztük el. Áramlási citometriás vizsgálathoz paraffinba ágyazott 5-6 db 50 µm vastagságú metszetekből sejtmagokat izolálunk. Xilollal történő deparaffinálás, csökkenő koncentrációjú alkoholos rehidrálás és pepszinnel történő enzimátikus emésztést követően kapott sejtmag szuszpenziót használtuk fel. A standard mag koncentráció legalább  $10^5$ /ml volt. A mag szuszpenziót DAPI (4,-6-diamino-2-phenylindole-dihydrochloride) fluoreszcens festékkel festettük meg, a méréshez UV megvilágítású Partec PAS II. áramlások citométert alkalmaztunk.

Az adatok statisztikai feldolgozását „BMPD Hotteiling” T négyzet próba segítségével végeztük el.

#### VI.5. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

##### VI.5.1 Beteganyag

POTE Pathológiai Intézet anyagából azok az esetek kerültek feldolgozásra, melyeknél natív szövetsminta rendelkezésre állt és a citogenetikai vizsgálatok elvégzése indokolt volt. 26 glioma került vizsgálatra, melyek között minden grádus (I-IV) előfordult (4. táblázat). A diagnózis felállítása az érvényben lévő WHO által meghatározott hisztológiai és immunfenotípusra vonatkozó kritériumok alapján történt. Az átlagéletkor: 33,7 év, a férfi/nő arány 14:12 volt.

	Grádus	Esetszám
Pilocytás astrocytoma	I.	2
Diffúz astrocytoma	II.	4
Oligodendroglioma	II.	4
Oligoastrocytoma	II.	2
Anaplasticus astrocytoma	III.	6
Glioblastoma	IV.	8

4. táblázat. FISH módszerrel vizsgált gliomák hisztológiai típusai és érettségi fokozatai

### VI.5.2 Próbák, a próbák jelölése

Kromoszóma specifikus peri-centromerikus próbákat alkalmaztunk, melyek jelölődési tulajdonságait és megbízhatósági határ értékeit humán kontroll sejteken határoztuk meg. Nem-rádoaktív „nick translatio”-val jelöltük a DNS próbákat biotin és digoxigenin conjugált d-UTP (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) felhasználásával. A próba plasmidba insertált -a kromoszóma centromer régiójára specifikus - DNS szakasz. A „nick translatio” során 1 µl plasmid DNS-t, 50 µl 0,05 M Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% bovin serum albuminnal (Serva Feinbiochemica GmbH Heidelberg, Germany), 0,05 mM d-ATP, 0,05 mM d-CTP, 0,05 mM d-GTP, 0,01 mM d-UTP, 0,01 mM dithiothreitol, 20 U DNS polimeráz I (Promega, Medison, WI), 25 µg DNA-áz I (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) és 0,04 mM jelölt d-UTP-vel inkubáltuk 15°C-on 2 órán keresztül. A DNS-t alkohollal kicsaptuk, szárítottuk majd 60%-os formamidot, 2xSSC és 100 ng/µl lazac sperma DNS-t tartalmazó oldatban feloldottuk úgy, hogy a végső koncentráció 2 ng/µl legyen.

### VI.5.3 A minta előkészítése

A fagyasztott műtéti preparátumok blokkjaiból 50 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd Darzyenkiewicz pufferben (Handbook of FCM 116. oldal) ultrahangos kezeléssel „kiráztuk” a sejteket. A sejteket 70%-os alkoholban fixáltuk, majd 50%-os ecetsavban posztfixáltuk és egy napig levegőn szárítottuk. A sejt preparátumokat 2xSSC-ben 5 percig mostuk, majd az RNA-ázzal kezeltük, melyhez 100mg/ml RNA-áz 2xSSC oldatot használtunk 37°C-os nedves kamrában 60 percig. Ezt követően 2xSSC-ben mostuk 3x5 percig. A posztfixálás 4% formaldehid + 1xPBS oldatban 2 percig történt. Majd proteáz kezelést végeztünk 0,01% pepszin és 10mM HCl oldatban 37°C-on 10 percig, mosást követően újabb posztfixálás következett. Végül felszálló alkoholsorban a sejteket dehidráltuk 3x5 percig. Az egyes lépések között mosás 1xPBS-ben 5 percig, a tárgylemezek szárítása levegőn történt.

### VI.5.4 Hibridizáció

A humán kromoszóma garnitúra széles spektrumát vizsgáltuk 1., 3., 5., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., X kromoszómákra specifikus próbák segítségével. A DNS próbákat párban használtuk, így egy tárgylemezen két kromoszómát vizsgálhattunk egyszerre. Kivételt képeznek a

keresztreakcióval rendelkező DNS próbák (5/19, 13/21 és a 14/22), melyek kromoszóma párok centromerikus régiói nagyfokú homológiát mutatnak, ezért ezen kromoszómákra specifikus fluoreszcens próbával négy szignált kapunk normál sejteken. Ezek számbeli eltérése (kevesebb, illetve több jel) esetén a két kromoszóma vonatkozásában a pontos azonosítást nem tudtuk elvégezni.

A jelölt centromerikus próba 10ng/ml 60% formamid+ 2xSSC oldatát tettük az előkészített tárgylemezre majd 80°C-on 2 percig együtt denaturáltuk a próbát a vizsgált mintával. Egy éjszakán át 37°C-on tartott a hibridizáció. Poszthibridizációs mosás 60% formamid 2xSSC-ben (pH 7) 37°C-on 3x5 percig történt, majd 2xSSC-ben 3x5 percig.

#### VI.5 Immuncitokémiai kimutatás

A sejtpreparátumot TNT oldatban 5 percig mostuk, majd blokkolás következtet „Blocking” reagenssel 37°-on 30 percig. Ezek után jelölés fluorokróm-izothiocianid (FITC)-avidinnel, a digoxigenin jeleket pedig anti-digoxigenin-rhodaminnal hívtuk elő TNT pufferben 37°C-on 30 percig. Mosás TNT oldatban 3x5 percig, lefedés DAPI-Vectashield oldattal történt. Az értékelés fluoreszcens mikroszkóppal történt, legalább 200 sejt került vizsgálatra minden esetben. A jelölt sejtek arányát 1-5 szignál figyelembevételével százalékos megoszlásban adtuk meg. Egy eredményt akkor tekintettünk szignifikánsnak ha a megbízhatósági határérték szintje felett volt az érintett sejtek aránya.

#### VI.6. Molekuláris genetikai technika, PCR-SSCP-szekvencia analízis

##### VI.6.1 Beteganyag

POTE Pathológiai Intézet anyagából azok az esetek kerültek feldolgozásra, melyeknél natív szövetminta rendelkezésre állt. Tizennyolc glioblastomás beteg daganatát vizsgáltuk p53 tumor szupresszor gén és a ras onkogének pontmutációi után kutatva. A glioblastomákat két csoportra osztottuk: 12 „de novo”, primer glioblastoma és 6 secundaer glioblastoma került vizsgálatra. A diagnózis felállításához az érvényes WHO hisztológiai és immunfenotípus kritériumok alapján történt.

##### VI.6.2 DNS izolálás

Friss fagyasztott szövetből telített NaCl felhasználásával, kisózasos módszerrel nyertük a genomikus DNS-t. A szövetet 3 ml mag lízis pufferben (10 mM Tris-



HCl) oldottuk fel, melyhez a továbbiakban 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 200  $\mu$ l 10%-os nátrium dodecilszulfát (NDS) és 500  $\mu$ l proteináz K oldatot (1 mg proteináz K, 1% NDS és 2 mM EDTA) adagoltunk. Ezt követően egy éjszakán át emésztettük 37 °C-os termosztátban, majd 1 ml telített NaCl oldattal ráztuk. Az oldat keverékét lecentrifugáltuk 2500 rpm fordulatszámon 20 percig, majd a felülszóhoz 2-szeres volumenű abszolút alkoholt adunk, ezt követően a DNS kicsapódott. Végül kétszer 70%-os alkoholban mostuk, TE oldatban oldottuk fel és 4 °C-on tároltuk. Az izolált DNS koncentrációját 260 nm-es hullámhosszon határoztuk meg denzitométer segítségével.

### VI.6.3 PCR (polimeráz-láncreakció) amplifikáció

Az p53 gén 5-8 exonjának és a ras gén (H-,K-,N) szakaszok amplifikációját a 5. táblázatban feltüntetett régió specifikus „sense” és „antisense primerek” segítségével végeztük. Az amplifikáló keverékbe 1  $\mu$ l genomikus DNS-t, 2.5  $\mu$ mol dNTP, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 8.8), 10 pM oligonukleotid „primereket”, 1  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] deoxicitidin trifoszfátot (specifikus aktivitás 3000 Ci/mmol) valamint 0,01% 0.5 U Taq DNS polimeráz enzimet mérünk össze úgy, hogy a végső volumen 10  $\mu$ l legyen. Az amplifikáció automata termociklóméter (Perkin Elmer, GeneAmp 2400) segítségével történ, 35 cikluson keresztül, három különböző hőfokon: denaturálás (94°C), „annealing” (58°C - 63°C a „primer”-től függően) „extension” (72°C). A PCR termék kiértékelését ethidium-bromidot tartalmazó 2%-os agar gél elektroforézis segítségével végeztük el.

### VI.6.4 „SSCP (single-strand conformation polymorphism)” analízis

Két  $\mu$ l PCR terméket 1:25 arányban feloldottunk 0,1% NDS + 10 mM EDTA oldatban, majd 1:1 arányban „sequencing stop solution”-nal hígítottunk, mely 20 mM NaOH tartalmaz. A mintát 90°C-ra melegítettük 5 percig, majd hirtelen lehűtöttük jégen és mihamarabb 6% akrilamid (0,08 M/l Tris-borát 0,089 M/l bórsav + 0,002 M/l EDTA (TBE) +10% glicerol gélbe töltöttük. Az elektroforetikus gélt 4-8 W-on 14-18 órán keresztül futtattuk szoba-hőmérsékleten. Majd a gélt 10%-os ecetsav oldatban fixáltuk, levegőn szárítottuk, autoradiográfiával -70°C-on 18-24 órán keresztül detektáltuk végül a filmet előhívtuk.



GÉNEK	A „PRIMEREK” SZEKVENCIÁI
p53	P5-5, 5'-TTCCTCTTCCCTGCAGTACTC-3'
5 EXON	P5-3, 5'-ACCCITGGGCAACCAGCCCTG-3'
P53	P6-5, 5'-ACAGGGCTGGTTGCCAGGG-3'
6 EXON	P6-3, 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAG-3'
p53	P7-5' 5'-GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC-3'
7 EXON	P7-3' 5'-GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT-3'
p53	P8-5' 5'-TATCCTGAGTAGTGGTAATC-3'
8 EXON	P8-3' 5'-AAGTGAATCTGAGGCATAAAC-3'
H-ras	5' 5'-CTGAGGAGCGATGACGGAAT-3'
12 CODON	3' 5'-AGTGGGTCGTATTCGTCCA-3'
K-ras	5' 5'-CCTGCTGAAAATGACTGAAT-3'
12 CODON	3' 5'-TGTTGGATCATAATTCGTCCA-3'
K-ras	5' 5'-GTAATTGATGGAGAAACCTG-3'
61 CODON	3' 5'-ATACACAAAAGAAAGCCCTCC-3'
N-ras	5' 5'-CTGGTGTGAAATGACTGAGT-3'
12 CODON	3' 5'-GGTGGGATCATATTCATCTA-3'
N-ras	5' 5'-GTTATAGATGGTGAAACCTG-3'
61 CODON	3' 5'-ATACACAGAGGAAGCCCTTCG-3'

5. táblázat. A p53 tumor szuppresszor gén és ras onkogének PCR amplifikációja során felhasznált primerek és szekvenciái.

#### VI.6.5 A PCR termék klónozása és szekvenálása

A PCR termék klónozása PCR 1000 vektor és „TA cloning system Kit” (Invitrogen Corp. San Diego, CA) felhasználásával történt a forgalmazó előírásainak megfelelően. X-gal és kanamycin klónszelekciót követően minden szövetminta esetében 4 klónt alkalmaztunk. A DNS szekvenálása direkt plasmid preparátummal történt az „insert” meghatározása után. „Sequenase version 2.0 (US Biochemical, Cleveland, OH)” rendszert használtuk a forgalmazó utasításainak betartásával. A kapott DNS szekvenciákat „MacVector version 4.5” (Eastern Kodak Corp, New Haven, CT) „software” és „GeneBank” adatbázis segítségével analizáltuk.

## VII. Eredmények

### VII.1. Sejtkinetikai, proliferációs vizsgálatok

#### VII.1.1 Recidiváló daganatok

Retrospektív feldolgozásunk során 22 kiújuló grade II. és III. neuroepithelialis daganatok első és recidív mintáit vizsgáltuk. A kiújuló daganatok első mintái alatt olyan radikálisan eltávolított tumorokat értünk, melyeknél tumor maradványt kimutatni nem sikerült a műtét után elvégzett korai CT és/vagy MR kontroll vizsgálatokkal. A kiújuló daganatok első és recidív mintáit hasonlítottuk össze egyrészt egymással, másrészt pedig nem recidiváló, gyógyult (5 éven túlélt) 12 gliá daganattal áramlások citometria és proliferációs paraméterek alkalmazásával. A kontroll, gyógyult csoportban az átlagéletkor 26,6 év volt, míg a recidív csoportban az első operáció alkalmával 37,4 év volt az átlagéletkor, addig a második operációkor 39,6 év. A férfi: nő arány 16:18 volt. A később recidiváló tumorok közül csupán 4 maradt kiérett (grade II), a többi anaplasziássá vált, majd glioblastomába transzformálódott. A kiérett daganatoknál a recidíváig eltelt idő 26,2 hónap volt, míg az anaplasziás tumorok recidíváig eltelt ideje 14 hónap volt. A sejtkinetikai vizsgálati eredményeket az 6. táblázatban foglaltuk össze.

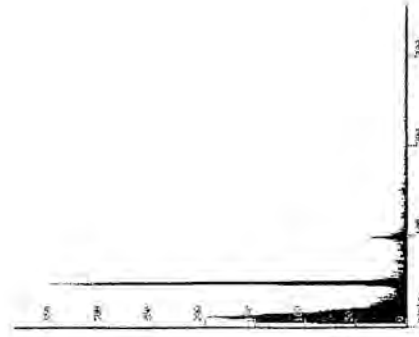
	Átlag-életkor (év)	Grádus	DNS index	S-fázis frakció %	Mitózisok száma /10HPF	MIB 1 + sejtek száma/HPF
Nem recidív tumorok	26.66 SD=20.4	2.00 SD=0.00	1.00 SD=0.00	5.81 SD=3.19	0.58 SD=0.51	2.09 SD=1.12
Primer tumorok	37.41 SD=11.2	2.32 SD=0.47	1.36 SD=0.65	19.45 SD=11.9	6.95 SD=5.54	21.71 SD=14.20
Recidív tumorok	39.68 SD=10.9	3.04 SD=0.65	1.43 SD=0.58	22.62 SD=13.8	9.54 SD=8.02	23.53 SD=16.76

HPF:High Power Field, nagy nagyítású látótér (x400), SD: Standard Deviació

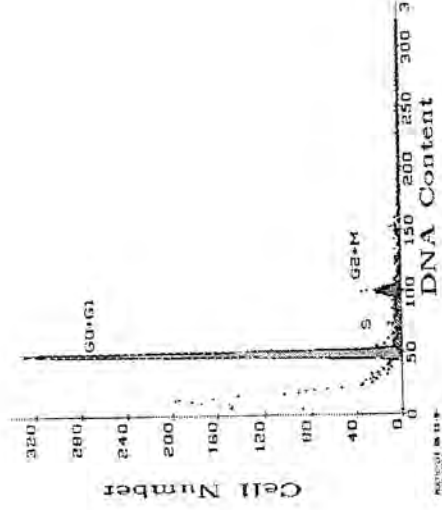
6. táblázat. Áramlások citometriás és proliferációs paraméterek átlagai és standard deviációja a prognosztikailag különböző betegcsoportokban.

### VII.1.2 A DNS index

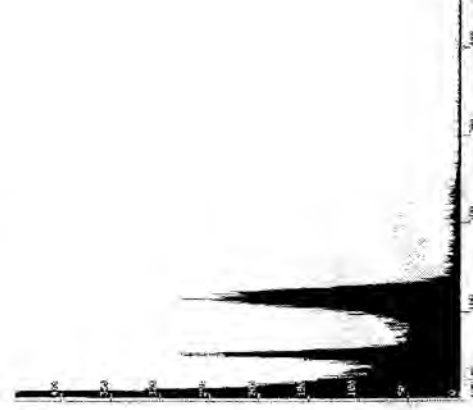
A kiújuló daganat pátkok első és recidív mintáit hasonlítottuk össze egyrészt egymással, másrészt pedig nem recidiváló, gyógyult (5 éven túlélő) gliá daganatokkal (24. ábra), követve a proliferációs paraméterek változásait. Sejtciklus analízis során megfigyeltük, hogy a diploiditás aránya jelentősen nem változott.



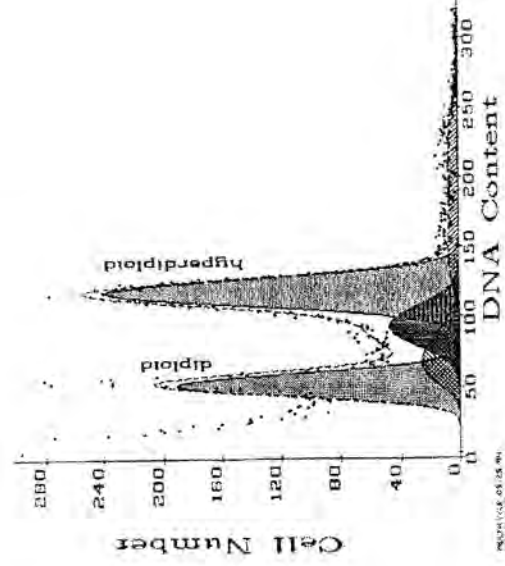
1. A.



2. A.



1. B.



2. B.

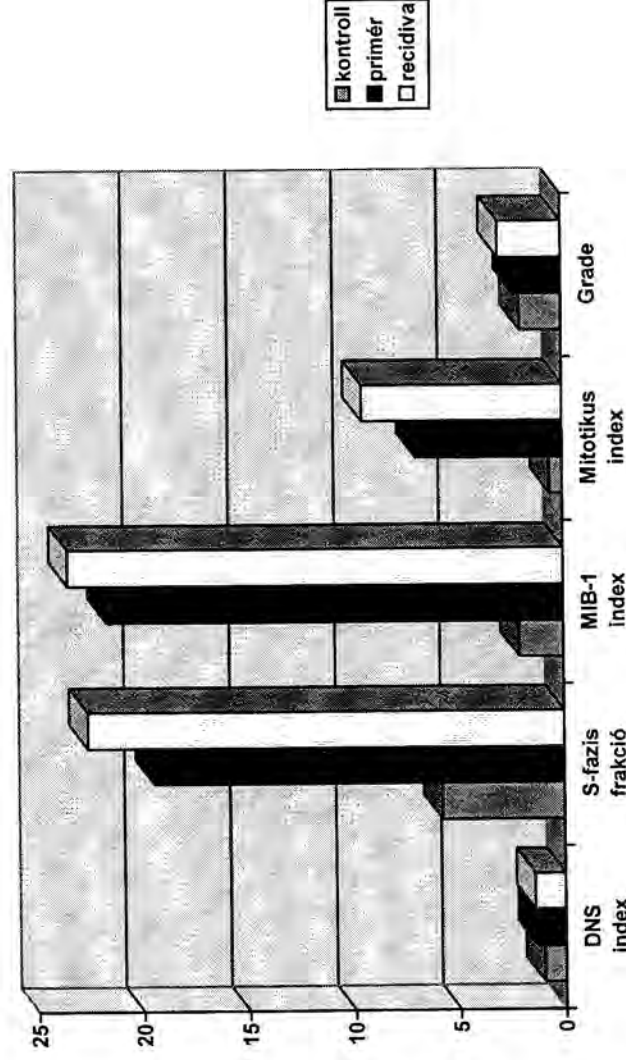
24. ábra. Áramlásos citometriás hisztogramok (1. mérési görbe, 2. komputeres sejtciklus-analizált görbe). A: Diploid, alacsony malignitású oligodendroglioma, emelkedett (12,5 %) S fázis frakcióval. B: Aneuploid, recidív, anaplasticus astrocytoma DI:2,261

Ugyancsak a recidívák során a DNS index értéke sem változott jelentősen a kiindulási első mintához képest (DI=1,36→1,46,  $p=0,74$ ), azonban szignifikánsan eltértek a gyógyult csoporttól (DI=1,0  $p=0,01$ ). Tehát primeren

aneuploid sejtklón megjelenése recidíva hajlamra hívja fel a figyelmet, mely a DNS index értékében is megnyilvánul, nevezetesen  $1 \pm 0,1$ -nél kisebb vagy nagyobb (6. táblázat).

### VII.1.3 S-fázis analízis

Megfigyeléseink alapján az S-fázisban lévő sejtek aránya szignifikánsan különbözött a két prognosztikailag jelentősen eltérő tumor csoportban. Az S-fázis értéke „primer tumor” csoportban  $19,45 \pm 11,91\%$  ( $6,7-41,1\%$ ) volt. A „recidíváló” csoportban  $22,62 \pm 13,86\%$  ( $5,4\%-42,7\%$ ) volt az S-fázis frakció értéke (6. táblázat). Ellenben a gyógyult, kontroll csoportban az érték  $5,81 \pm 3,19\%$  ( $0-8,6\%$ ) -ra csökkent. A recidíváló primer tumor ( $p=0,006$ ) és annak második mintája ( $p=0,001$ ) szignifikánsan magasabb S-fázis frakciót jelentett mint a gyógyultaké (25. ábra). Azonban nem volt szignifikáns különbség a recidíváló tumorok „primer és sekunder” mintái között ( $p=0,5646$ ).

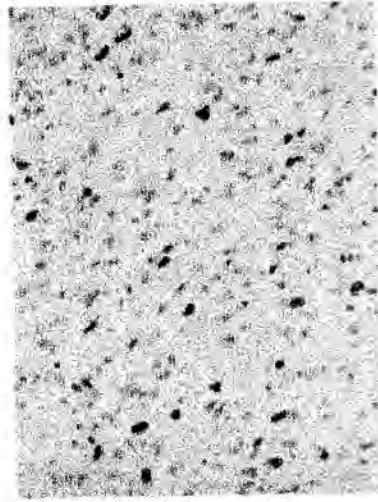


25. ábra. A DNS index, S-fázis frakció, MIB-1 jelölődési és mitotikus index valamint a tumorok hisztológiai grádusának alakulása a prognosztikailag különböző gliá tumorokban.

### VII.1.4 Proliferációs markerek - MIB-1 antitest jelölődési index

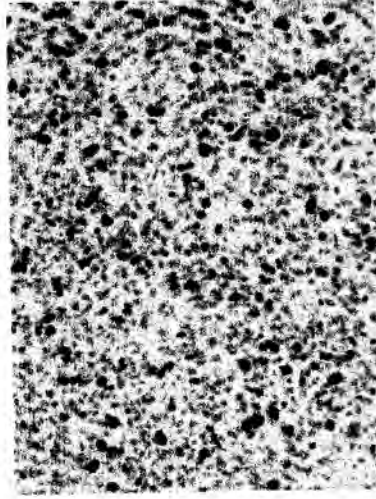
Vizsgálati eredményeink alapján a MIB-1 pozitív sejtek aránya a kiújuló gliá tumorokban szintén jellemzően magasabb értéket képviselt mind első, mind recidív mintáiban a gyógyultakhoz képest.





A.

26. ábra. MIB-1 jelölődés alacsony malignitású diffúz astrocytomában (A) és glioblastomában (B). Az astrocytomában alacsony MIB-1 index látható kevés Intranucleáris jelölődéssel, míg glioblastomában a MIB-1 index jelentősen emelkedett.



B.

A MIB-1 intranucleárisan jelölt sejtek aránya /HPF ( egy nagy nagyítású látóterre vonatkoztatva)  $21,71 \pm 14,2$  (3,2-44,3) volt a „primer tumor” csoportban és  $23,53 \pm 16,76$  (4-45) volt a „recidív” csoportban. Ellenben a gyógyult csoportban a jelölt sejtek száma jelentősen alacsonyabb,  $2,09 \pm 1,12$  (0-8) volt. (26. ábra) A gyógyult csoportban a MIB-1 jelölt sejtek száma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a „primer tumor” csoportban ( $p=0,0019$ ), hasonlóan a „recidív” csoportban ( $p=0,0049$ ) is (6. táblázat). Nem volt szignifikáns különbség a MIB-1 jelölt sejtek számában a „primer” és a „recidív” csoportok között ( $p=0,7869$ ).

#### VII.1.5 A mitotikus index:

A mitózisok száma szintén szignifikánsan különbözött a két prognosztikailag elkülönült csoportban. A mitózisok számát/10 HPF (nagy nagyítású látóterre) vonatkoztatva adtuk meg. A „primer tumor” csoportban a mitózisok száma  $6,95 \pm 5,54$  (2-15) volt, a „recidív csoportban” pedig  $9,54 \pm 8,02$  (1-17) volt. Ellenben mitózisok száma a gyógyult, kontroll csoportban  $0,58 \pm 0,51$  (0-1) volt. A „primer csoport” ( $p=0,0019$ ) és a „recidív csoport” ( $p=0,0049$ ) szignifikánsan magasabb mitotikus indexsel rendelkezett, min a gyógyult betegcsoport (25. ábra). Nem találtunk szignifikáns különbséget „primer tumor” és annak „recidív” mintája között ( $p = 0,4005$ ) ezen paraméter vonatkozásában sem.

#### VII.2. Citogenetikai eredmények

A daganatok szövettani típusa és érettsége szerint csoportosítva fluoreszcens in situ hibridizációs-interfázis citogenetikai (FISH-IPC) módszerrel a következő kromoszóma számbeli eltéréseket találtuk (7. táblázat).

### VII.2.1 Alacsony malignitású gliómák citogenetikai eltérései

A legkiérettebb daganatban, pilocytás astrocytoma mindkét esetében az 1. kromoszómán 15%-ban monoszómiát, a 17. kromoszómán 33,33%-ban monoszómiát találtunk. Az egyik esetben 10. kromoszómán 11,32%-ban észleltünk monoszómiás sejtmagokat.

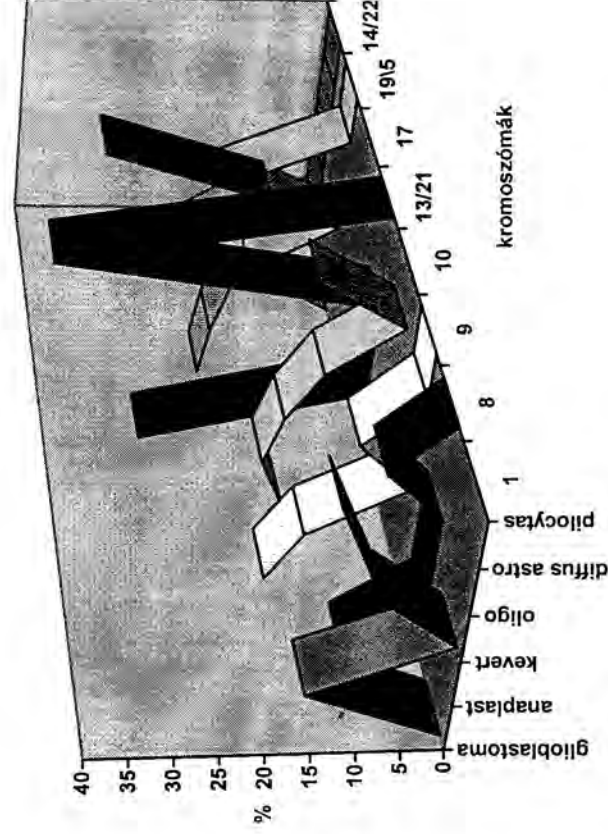
A diffúz astrocytomás esetek közül háromban az 1. kromoszómán 12,2%-ban monoszómiát, a 17. kromoszómán 12,38%-ban monoszómiás sejteket találtunk. Csupán egy esetben észleltünk a 8. kromoszómán 7,84%-ban monoszómiát és egy esetben a 13/21 próbával jelölt sejtmagokon 40%-ban csak 3 szignált találtunk.

Szintén a második éretlenségi fokozatba sorolható kevert glia daganatok (oligoastrocytoma) vizsgálatakor a 10. kromoszómán 13,76%-ban, a 17. kromoszómán 16,10%-ban monoszómiát találtunk mindkét esetben.

Kromoszóma száma	Megbízhatósági határérték %	1 hibridizációs jelet mutató sejtek %-os megoszlása							Értékelt sejtek száma
		Gliobl stoma	Anapl astroc	Kevert glioma	Oligo denrg	Diffuz astroc	Piloot astroc		
1	4.6	0	16.03	0	9.1	12.2	15	216	
2	10.1	-	-	-	-	-	-	-	
3	5.1	0	0	0	0	2.3	0	201	
4	6.5	-	-	-	-	-	-	-	
5/19	10.9	6.7	11.3	0	14.3	0	0	218	
6	7.6	-	-	-	-	-	-	-	
7	3.7	0	0	0	0	0	0	200	
8	3.5	9.34	0	0	0	7.84	0	207	
9	5.6	15.88	12.26	0	7.6	0	0	208	
10	4.9	12.26	15.6	13.76	9.2	1.2	11.3	202	
11	6.1	0	0	0	0	0	0	203	
12	4.9	0	0	0	0	0	0	216	
13/21	16.9	28	3.6	0	0	40	0	213	
14/22	20.3	22.58	9.43	0	16.1	0	0	210	
15	13.3	-	-	-	-	-	-	-	
16	9.1	0	0	0	0	0	0	214	
17	7.6	19.41	17.6	16.10	22	12.38	33.3	203	
18	8.9	0	7.3	0	0	0	0	207	
18	6.5	0	0	0	0	0	0	208	
20	3.5	0	0	-	0	0	0	200	
X	3.1	-	-	-	-	-	-	-	
Y		-	-	-	-	-	-	-	

7. táblázat. A kromoszómák megbízhatósági határértékei normál humán kontroll csoportban, a vizsgált kromoszómák jelölődési eltéréseinek százalékos megoszlása valamint az értékelt sejtek száma.

Az alacsony malignitású gliomákhoz tartozó oligodendrogliomás esetek közül kettőben az 1. kromoszómán 9,1 %-ban, 10. kromoszómán 9,2 %-ban és a 17. kromoszómán 22 %-ban monoszómiát találtunk. Három esetben találtunk 5/19. kromoszómákon 14,3%-ban monoszómiát. Csupán egyetlen esetben a 9. kromoszómán 7,6%-ban észleltünk monoszómiát.



27. ábra. Az egyes kromoszómák veszteségének alakulása a különböző típusú gliomákban

#### VII.2.2 Magas malignitású gliomák citogenetikai eltérései

A jelentősen dedifferenciált, anaplasticus astrocytomás betegek kromoszóma számbeli eltérései a következők voltak: kettő esetben 1. kromoszómán 16,03%-ban, négy esetben 10. kromoszómán 15,60%-ban és szintén négy esetben a 17. kromoszómán 17,59%-ban monoszómiát találtunk. Csupán egy esetben találtunk 5/19. kromoszómán 11,3%-ban és két esetben 9. kromoszómán 12,26%-ban monoszómiát (27. ábra).

A glioblastomás betegek FISH eredményeinek elemzésekor egy esetben a 8. kromoszómán 9,34%-ban, két esetben 9. kromoszómán 15,88%-ban észleltünk monoszómiát. A 10. kromoszómán 12,26%-ban monoszómiát figyeltünk meg öt esetben. Továbbá 13/21 a próbával jelölt sejteken 28%-ban csak 3 szignált találtunk négy esetben. Minden glioblastomás betegnél a 14/22 próbával

22,58%-ban 3 szignált számoltunk. A 17. kromoszómán 19,41%-ban monoszómiás sejteket találtunk négy esetben (28. ábra).



A.

28. ábra. FISH vizsgálatok alacsony és magas malignitású gliómákban. A: 17. kromoszóma monoszómia astrocytomában, ahol az egyik tumor sejtben jelölődési hiány látható. B: 10. kromoszóma monoszómia glioblastomában, ahol szintén jelölődési kiesés látható.

B.

A glioblastomás betegek FISH eredményeinek elemzésekor egy esetben a 8. kromoszómán 9,34%-ban, két esetben 9. kromoszómán 15,88%-ban észleltünk monoszómiát. A 10. kromoszómán 12,26%-ban monoszómiát figyeeltünk meg öt esetben. Továbbá 13/21 a próbával jelölt sejteken 28%-ban csak 3 szignált találtunk négy esetben. Minden glioblastomás betegnél a 14/22 próbával 22,58%-ban 3 szignált számoltunk. A 17. kromoszómán 19,41%-ban monoszómiás sejteket találtunk négy esetben (28. ábra).

### VII.3. p53 és ras gének vizsgálata

#### VII.3.1 Klinikai és histológiai jellemzők

A vizsgált glioblastomák közül a „de novo” típusúak histológiailag hasonlítottak egymáshoz, kis glioblastok mellett nagyobb, többmagvú tumor sejtek is megfigyelhetőek voltak, ér endothel proliferációval, paliszád nekrozisokkal, magas proliferációs aktivitással és mitózis számmal. Az anamnézisben rövid 1-2 hónapos kórelőzmény szerepelt és nem volt adat korábbi agytumor fennálltára.



Eset-Szám	Sex	Életkor	Lokalizáció	Túélés (hónap)	Szövettanis ubtípus	p53 jelölt sejt/HPF
1.	N	56	jobb frontális lebeny	1	primer	26
2.	F	57	jobb frontális lebeny	11	primer	5
3.	N	51	bal frontális lebeny	5	primer	22
4.	N	68	jobb occipitális lebeny	6	primer	32
5.	N	39	jobb temporális lebeny	10	primer	23
6.	F	71	bal frontális lebeny	6	primer	39
7.	F	43	jobb parietális lebeny	6	primer	16
8.	N	57	jobb temporális lebeny	13	primer	69
9.	F	53	bal occipitális lebeny	9	primer	144
10.	F	49	bal temporális lebeny	12	primer	76
11.	F	37	jobb frontális lebeny	4	primer	72
12.	N	38	jobb parietális lebeny	8	primer	17
13.	F	32	jobb temporális lebeny	10	transzformált	46
14.	F	68	bal temporális lebeny	9	transzformált	24
15.	F	53	jobb frontális lebeny	17	transzformált	187
16.	N	38	bal occipitális lebeny	8	transzformált	168
17.	N	68	bal frontális lebeny	5	transzformált	54
18.	F	65	bal parietális lebeny	3	transzformált	53

8. táblázat. A glioblastomás betegek klinikai adatai, a daganatok típusai és p53 jelölődési indexe.

A sekunder tumor csoportban a fenti glioblastos komponens mellett 8 esetben kiértettebb (diffúz, anaplasias) hisztológiai területeket is tartalmazott a tumor, a többi esetben korábban alacsonyabb malignitású gliómát távolítottak el. A betegek klinikai adatait, a daganatok hisztológiai típusait és a p53 immunhisztokémiai jelölt sejtek arányát az 8. táblázat mutatja. A betegek átlagéletkora 52,4 év volt, eloszlása 32-71 évig terjedt. A daganatok többsége, 7 frontális lokalizációjú, 5 temporális és 3-3 daganat helyezkedett el parietálisan illetve occipitálisan. Az átlagos túlélés 7,94 hónap volt, a primer csoportban az átlagos túlélés 7,58 hónap, míg secundaer glioblastomában a átlagos túlélés 8.66 hónap volt (8. táblázat). Nem volt szignifikáns különbség túlélésben a két glioblastoma csoport között.

VII.3.2 p53 és ras gének pontmutáció analízise

Az általunk vizsgált esetek közül kettőben találtunk nukleotid eltérést p53 génben „GeneBank” adatbázisból származó „germline” génhez képest. A vizsgált esetekben a betegek „germline” p53 gén szekvenciái nem álltak rendelkezésre

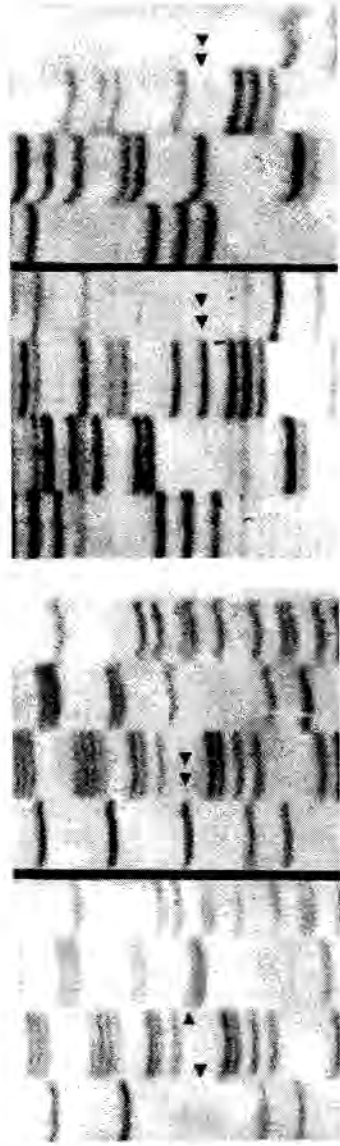
ezért felvetődik egyéni polimorfizmus lehetősége is, bár a p53 vonatkozásában minimális a szekvencia polimorfizmus előfordulása. Emiatt a nukleotid különbségeket szomatikus mutációként értékeltük. Az egyik nukleotid különbséget primer glioblastomában találtuk a p53 gén 5-ös intronján ttagtct → ttggct, mely nem okozott aminosav szekvencia változást (9. táblázat). A másik nukleotid változást transzformált glioblastomában találtuk a 8-as exon 280-as kodonjának 2. nukleotid, AGA → ACA, guanin → citidin cseréjét, mely aminosav változáshoz, Arginin → Treonin cseréjéhez vezetett.

Patológiai Diagnózis	Eset- szám	Exon Intron	Kodon	Nukleotid változás	Aminosav változás
Transzformált Glioblastoma	15.	Exon 8	280	AGA-ACA	Arg-Tr
Primer Glioblastoma	8.	Intron 5		ttagtct → ttggct	

9. táblázat. A glioblastomákban talált pontmutációk összefoglalása



17. ábra. p53 gén PCR-SSCP vizsgálata A: primer glioblastomában a 6-os exonon, B: sekunder glioblastomában a 8-as exonon, a nyilak az eltérő migrációs vonalakat jelölik.



A.

B.

18. ábra. A pozitív PCR-SSCP vizsgálat alapján elvégzett nukleotid szekvencia analízis A: primer glioblastomában az 5-os intronon a→g nukleotid csere látható, B: sekunder glioblastomában a 8-as exonon 280-anas kodonján G→C nukleotid csere látható.

A ras oncogének PCR vizsgálata során nem találtunk eltérő migrációs vonalakat, amely mutáció ellen szól.

VII.3.3 p53 protein immunhisztokémiai kimutatása

A p53 immunreakció a sejtmagban granuláris, homogén jelet adott. A p53 jelölődési index glioblastomában 59,6/HPF (SD=39,8) (5-187) volt. A jelölt sejtek átlaga 88,7/HPF (SD=59,2) (24-187) volt a transzformált csoportban, míg 45,08 /HPF (SD=30,11) ( 5-144) volt a primer csoportban. A jelölődési index nem különbözött szignifikánsan a két tumor vonatkozásában ( $p=0,0527$ ).

## VIII. Megbeszélés

Munkánk elején megfogalmazott célkitűzésekre és kérdésekre a tanulmány megbízható válaszokat adott. Diagnosztikus gyakorlatunkban előforduló glia daganatokat vizsgáltuk hisztológiai, immunfenotípus, proliferációs aktivitás és genotípus alapján abból a célból, hogy finomítsuk a daganatok diagnosztikáját, melynek következtében a gliomák biológiai viselkedését jobban tükröző hisztopatológiai állásfoglaláshoz jussunk. Meghatároztuk az objektív diagnózis felállításához nélkülözhetetlen vizsgálatok körét és feltérképeztük azokat az onkogenetikai változásokat, melyek az alacsony és magas malignitású glia daganatokhoz és azok transzformációjához társultak.

Vizsgálati eredményeink alapján az alacsony és magas malignitású gliomák proliferációs paramétereik és citogenetikai változásaik tekintetében elkülönültek egymástól. Az előnyös és előnytelen prognózist jól reprezentálják,



a transzformációt előrevetíthetik (4, 13, 14, 25, 39, 46, 48, 75, 80, 83, 85, 89). Mindezek hozzájárultak ahhoz, hogy a glia daganatok diagnosztikus kritériumai bővíthessenek, a citológiai-hisztológiai osztályozás proliferációs és citogenetikai paraméterekkel egészülhessenek ki.

A sejtciklust szabályzó fehérje-változások genetikai hátterét vizsgálva jellemző eltéréseket találtunk. A genetikai változások következtében, az általuk kódolt fehérjék szerkezeti átalakulása következett be (12, 52, 56, 73, 95). A kiújuló daganatok ennek köszönhetően felgyorsult, aktív sejtciklussal rendelkeztek, melyek egyrészt magas proliferációs értékekben nyilvánultak meg, másrészt aneuploid sejtklónok jelentek meg és eltért a tumor sejtek DNS tartalma a normál diploidtól (13, 14, 17, 60, 61, 92).

Sejtkinetikai eredményeink arra utalnak, hogy a hisztológiailag heterogén gliómák proliferációs paramétereik szerint jól elkülöníthetők egymástól és kiújuló, második tumoraiktól (31, 32). Az alacsony malignitású gliómák diploidak, DNS index értéke 1,00. A daganatok dedifferenciálódása során és magas malignitású daganatokban, aneuploid sejtklónok jelennek meg, a DNS index értéke 1,00-től eltérő, lehet hypo- vagy hyperdiploid, tetraploid esetleg polyploid.

A sejtciklus S-fázisában lévő DNS replikációs állapotú sejtek százalékos megoszlása a teljes sejtciklusra vonatkoztatva prognosztikus értékű, a túléléssel és a grádussal szoros kapcsolatban állt, bár a benignus és malignus neuroepitheliális tumorok közötti S-fázis frakció határértékeire vonatkozóan nem egységesek az irodalmi adatok (13, 14, 31, 92). Az általunk talált recidívára predisponáló érték 6% feletti S-fázis frakcióban értékben adható meg.

A MIB-1 antitest a tumor növekedést mutató területének kimutatására alkalmazható. Vizsgálati eredményeinket összevetve az irodalomban közölt adatokkal, azzal megegyezően a MIB-1 pozitív sejtek aránya a kiújuló glia tumorokban szintén jellemzően magasabb értéket képviselt (29, 43, 46, 59, 60, 65) mind első, mind recidív mintáiban a gyógyultakhoz képest. A közölt adatok általában %-os megoszlásban adták meg a jelölt sejtek arányát, mi egy nagy nagyítású látóterre vonatkoztatva adtuk meg (400x). Egy hypercelluláris nagy nagyítású látóterben (NNL) 4-45 között változott, míg a gyógyult tumorokban



0-8 MIB-1 intranucleáris jelölődést számoltunk. Általunk talált recidívára predisponáló határérték 2-3/NNL.

Hagyományosan a mitotikus index használata fontos, melyet szintén nagy nagyítású látóterre vonatkoztatva adtunk meg. A mitózisok gyakorisága vizsgálataink során megegyezett az irodalmi adatokkal (47). Nem recidíváló tumorokban elvéve vagy egyáltalán nem fordulnak elő mitózisok. Saját eredményeink alapján recidívára predisponáló értéket találtunk 1/10 NNL felett.

Saját összehasonlító elemzésünk alapján vizsgáltuk a MIB-1 intranucleáris jelölt sejtek és a mitózisok számának arányát a különböző prognosztikai csoportokban. A nem recidíváló tumorokban 10-12-szer több a MIB-1 jelölt sejtek száma a mitózisoknál, míg ez az arány a recidív tumorok esetében 40-42 szeresére emelkedik.

*Kedvezőtlen biológiai viselkedésűek és ezzel magas a recidíva hajlam azoknál a gliá tumoroknál, melyek proliferációs paraméterei a következőképpen alakulnak:*

- DNS index értéke  $1 \pm 0,1$ -nél kisebb vagy nagyobb
- és/vagy az S-fázis frakció értéke 6%-nál magasabb
- és/vagy egy nagy nagyítású látóterben 2-3-nál több a MIB-1 jelölődő sejtek száma
- és/vagy 10 nagy nagyítású látóterben 1-nél több mitózis látható.

Tanulmányunk második részében citogenetikai módszerrel kromoszóma számbeli eltéréseket találtunk alacsony és magas malignitású gliómákban. Az általunk vizsgált daganatokban a számbeli eltérés a kromoszómák egy szűk spektrumát, 8 fajta kromoszómát érintett, melyekre vonatkozó irodalmi adatokat nagy számban találtunk az elmúlt évek publikációi között (6, 25, 26, 56, 64, 77, 80, 96). A kromoszóma eltérések genetikai állomány veszítést jelentettek, a tumor sejtek jelölődési hiányt mutattak. A kromoszómák monoszómiájának előfordulása részben sporadikusnak tartható, egy-egy esetben fordultak elő csupán. Részben a daganatok egyes csoportjait tekintve a kromoszóma vesztes halmozottan jelentkezett.

Sporadikus monoszómiát találtunk az 5/19. kromoszómán anaplasticus astrocytomában, a 8. kromoszómán diffúz alacsony malignitású astrocytomában és glioblastomában, 9. kromoszómán oligodendrogliomában, a 10.

kromozómán pilocytás astrocytomában és a 13/21. kromozómán diffúz alacsony malignitású astrocytomában.

Eredményeinket összevetve az irodalmi adatokkal a 19. kromoszóma vesztese gyakoribb (11, 18, 39, 56, 58, 73, 79) az általunk talált sporadikus előfordulásnál anaplasticus astrocytomában és glioblastomában. Azonban a 19. kromoszóma monoszómia alacsony malignitású oligodendrogliomában és oligodendroglioma progressziója során jellemző citogenetikai adat, melyet tanulmányunk is reprezentál (74). Esetünkben a ritkább előfordulású 19. kromoszóma monoszómiát technikai okokkal lehetne magyarázni a kereszthibridizációs próba okozta nehézségek és a magas megbízhatósági határérték miatt. Továbbá magyarázatul szolgál, hogy a gyakran érintett glioma tumor szuppresszor gén telomerikus elhelyezkedésű, így centometrikus próbával nem mutatható ki.

A 13. kromoszóma vesztese közepes gyakorisággal fordul elő elsősorban magas malignitású gliomákban, ritkábban alacsony malignitású gliomákban, hasonlóan vizsgálati eredményeinkhez (50, 56).

A 10. kromoszóma monoszómiája ritka pilocytás astrocytomában, malignus astrocytomák jellemző citogenetikai markere, így általunk talált sporadikus előfordulásuk elfogadható eredmény (26, 54, 56, 80, 90).

A 8. kromoszóma vonatkozásában pozitív vizsgálati eredményeinket nehéz magyarázni, gliomákban ritkán látható citogenetikai változásról lévén szó. Inkább primitív neuroektodermális tumorban, medulloblastomára jellemző a 8. kromoszóma érintettsége, elsősorban a hosszú kar 8q24 locuson elhelyezkedő MYC proto-onkogén amplifikáció miatt (87).

Leggyakrabban érintett a 17. kromoszóma, monoszómiás sejtek szinte mindegyik tumor fajtában és grádusba megtalálhatók voltak, hasonlóan az irodalmi adatokhoz (19, 26, 35, 64, 91). A kromoszóma vesztesének háttérében álló p53 tumor szuppresszor gén vagy NF1 gén szerepének tisztázása érdekében további molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzése szükséges. Az érdeklében jelen munkában is bebizonyosodott, hogy a 17. kromoszóma genetikai állományának vesztese a tumorgenezis már korai szakaszaiban bekövetkezik és a daganat hisztológiai progressziója során a tumor sejtek tovább vizsgálják az elszenvedett genetikai változást.

Hasonlóan az 1. kromoszóma monoszómiája emelkedett gyakorisággal fordult elő elsősorban az alacsony malignitású astrocytomákban és oligodendroglomákban, a vizsgált glioblastomákban nem tudtuk kimutatni, a közötti adatokhoz hasonlóan (41, 74, 96). Anaplasticus astrocytomákban vizsgálataink során szintén kimutatható volt. Előfordulását azzal magyarázzuk, hogy a daganatok sekunder transzformált típusúak lehettek, amikor is alacsony malignitású astrocytoma malignus progressziója során, már egy korábban elszervenvedt és a későbbiekben is fennálló genetikai defektust mutattunk ki.

A 9. kromoszóma számbeli eltérését tekintetében különbség van az astrocyter magas malignitású daganatok és alacsony malignitású fajtáik között. A 9. kromoszóma monoszómiája irodalmi adatok szerint is és saját eredményeink alapján is anaplasticus astrocytomákban és glioblastomákban jellegzetes citogenetikai változás (6, 62, 84).

A 10. kromoszóma monoszómiája halmozottan fordult elő magas malignitású gliomákban, alacsony malignitású oligoastrocytomában, vizsgálati eredményeink az irodalmi adatokkal megegyezőnek mondható (6, 11, 80, 85, 86). A kromoszómán elhelyezkedő tumor szuppresszor gén mutációját teszik felelőssé a gliomák progressziójáért.

A 14/22. kromoszóma vesztesék kizárólag glioblastomákban voltak kimutathatók tanulmányunkban. Az irodalom a 22. kromoszóma genetikai változásáról glioblastomában is beszámol, azonban jellemzően ependymómában és meningeomákban jelentkezik halmozottan (6, 40, 77). Meg kell jegyeznünk, hogy esetünkben hibaforrásként szerepel a kromoszóma próbák hibridizációs keresztreakciója és legmagasabb megbízhatósági határértéke, emiatt pontosan nem tudunk megállapítani, mely kromoszómákat érinti a változás, azonban a közötti irodalmi adatok elsősorban a 22. kromoszóma genetikai veszteségét támogatják.

Vizsgálati eredményeinket értékelve felfigyeltünk arra a körülményre, hogy magas malignitású tumorokban vagy a glia daganatok tumoros progressziójának utolsó szakaszában jelenik meg a 9., a 10. és a 22. kromoszómák vesztese és már a jelentősen dedifferenciált, meglehetősen éretlen, blastos daganatokban, a betegség késői szakaszában vannak jelen, tehát prognosztikailag kedvezőtlenek.



Össességében az interfázis citogenetika kiegészítő módszerként bevezethető az agydaganatok diagnosztikájában egyrészt a nehezen értékelhető esetekben, másrészt a prognózis szempontjából használható adatnak tűnik. Egy daganat hisztológiai jellemzése majd immunfenotípusának meghatározása után a genotípus tisztázása jelentősen hozzájárulhat a gliá daganatok reklasszifikációjához a terápia hatásosságának fejlődéséhez és a pontosabb prognózis megadásához.

*Alacsony malignitású astrocytomákban az 1. és 17. kromoszóma monozómia már jelen van, mely a későbbiekben is kimutatható marad a daganat progressiója során. Az alacsony malignitású oligodendrogliomák citogenetikailag kissé eltérnek az astrocytomáktól az 1. kromoszómán kívül a 19. kromoszóma monozómia jelzi a genetikai defektus jelenlétét.*

*Magas malignitású gliomákban főleg a 9. 10. és 22. kromoszómák monozómiája fordul elő, mely előnytelen biológiai viselkedésre enged következtetni. Ha érettebb daganatban ezek a citogenetikai eltérések kimutathatók, gyors klinikai progresszióra és malignus transzformációra lehet következtetni.*

Tanulmányunk harmadik részében molekuláris genetikai módszert alkalmazva ras onkogének és p53 tumor szuppresszor gén pontmutációit vizsgáltuk primer és secunder glioblastomákban. Számos munkacsoport vizsgálatai alapján felmerült annak lehetősége, hogy a p53 tumor szuppresszor gén inaktivációja és a ras onkogének aktivációja szerepet játszik a gliomák patomechanizmusában és progressziójában (3, 24, 26, 35, 48, 52, 56, 58, 62, 65, 68, 73, 75, 81, 89). Arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a két génnek együttesen van-e szerepe a glioblastomák eltérő patomechanizmusában. Korábban már kimutatták a p53 gén pontmutációját változó mértékben szinte minden érettségi fokozatban lévő gliá tumorban, azonban ras onkogénnel együtt vizsgálva a két gén szerepét még nem történtek vizsgálatok. Szekvencia analízis során kimutattunk néhány nukleotid különbséget a tumor sejtek és a p53 „germline” gén szekvenciája között azonban ebben a vonatkozásban nem találtunk különbséget a két glioblastoma csoport között. p53 pontmutációt csupán 11%-ban, mindössze két esetben tudtunk azonosítani, a mutációk helyei a „hot spot”-on (egy exonon belüli kodonok, ahol a mutációk a legnagyobb gyakorisággal fordulnak elő) kívül estek. A kórlefolyás során blastos



transzformáció eredményekén kialakuló glioblastomában a gén nukleotid szekvenciájának változását Arginin→Treonin aminosav csere követte. A másik mutált esetben „de novo” glioblastomában aminosav cserét nem okozó „silent” mutációt találtunk.

Eredményeink arra utalnak, hogy p53 szomatikus mutációja önmagában nem elegendő a glioblastomák kialakulásához és a gliá daganatok késői histológiai transzformációjához és klinikai progressziójához. Noha a p53 gén vesztésének, pontmutációjának vagy inaktivációjának szerepe lehet az alacsony malignitású gliomák tumorgenezisében. Erre utalnak a citogenetikai vizsgálati eredményeink is a 17. kromoszóma monoszómiájának magas előfordulásával. Azonban eredményeinkből arra következtethetünk, hogy multifaktoriális genetikai folyamatról lehet szó, vagyis a p53 gén önmagában nem tehető felelőssé a daganatok késői progressziójáért és transzformációjáért (32, 81).

Annak ellenére, hogy a p53 gén szomatikus mutációja csak sporadikusan fordult a p53 protein immunhisztokémiaiilag szinte mindegyik esetben kimutathatónak bizonyult. A normál p53 protein rövid fél élethűvel rendelkezik, immunhisztokémiaiilag nem mutatható ki. A gén aminosav változásának következtében a mutáns protein szerkezete megváltozik, a „vad” típusú proteinnel complexet képezve stabilizálódik és a magban felhalmozódik. Általunk vizsgált mindkét, primer és secundær glioblastoma csoportban jelentősen emelkedett jelölődési indexet találtunk, hasonlóan az irodalmi adatokhoz (24, 48, 93). Azonban nem találtunk szignifikáns különbséget p53 immunoreaktivitás tekintetében a két csoport között, bár az aktuális szignificancia szint jelentősen megközelítette a határértéket. Vizsgálati eredményeinkből három dologra következtethetünk: (1) a p53 gén mutációja nélkül is felhalmozódhat a protein (2) a mutáció az általunk vizsgált génszakaszokon kívül esett (3) a fehérje strukturális és funkcionális változásaiért addicionális genetikai változások és pathológias állapotok is felelőssé tehetők. Noha a p53 gén szerepe nem igazolódott a magas malignitású gliomák patomechanizmusában és progressziójában, addig a p53 protein strukturális változásából a tumor agresszivitására következtethetünk.

Eredményeink arra utalnak, hogy a p53 protein kimutatása immunhisztokémiai módszerrel kiegészítő vizsgálat lehet a glió daganatok diagnosztikájában és prognosztikai megítélésében.

- A malignitás súlyosságával a p53 jelölődési index emelkedik, glioblastomában kifejezetten magas immunreaktivitás jellemző, 60/HPF feletti értékkel.
- A transzformált csoportban magasabb 90-100/HPF volt a jelölődési index, arányosan, bár nem szignifikánsan tér el a primer glioblastomáktól.
- Primer glioblastomákban jóval alacsonyabb 40-45/HPF intranucleáris jelölődést találtunk.

A mutáns H-,K-,N-ras gének a ras-proteinek megváltozott funkciója miatt a sejt aktivációjához vezet. A ras onkogének tumorokban játszott szerepét már számos malignus daganatban kimutatták (55). Agydaganatokban játszott szerepét illetően kis számú közlemény áll rendelkezésünkre (3, 57), melyek ezidáig megnyugtatóan nem tisztázták ras-onkogének szerepét a glió daganatok patomechanizmusában. Molekuláris genetikai módszerrel nem találtunk pontmutációt a H-,K-,N-ras onkogének 12-es és 61-es kodonjain, mely az egyik leggyakrabban érintett szakaszai a génnek. Vizsgálataink alapján úgy tűnik nincs kimutatott szerepe a glioblastomák kialakulásában és transzformációjában lehetséges, hogy a tumorigenezis korai szakasziban érintett.

Az általunk alkalmazott p53 és H-,K-,N-ras PCR-SSCP-szekvenálási módszer megfigyeléseink alapján úgy tűnik hatásosan nem alkalmazható a gliómák diagnosztikájában. Azonban elméleti és patogenetikai jelentősége jelen pillanatban is figyelemreméltó, mely hozzájárulhat a glióma kialakulás és progresszió genetikai hátterének megismeréséhez.

## IX. Következtetések

A célkitűzésekben meghatározott szempontok alapján elvégzett vizsgálatok eredményét és a tanulmány következtetéseit az alábbiakban foglaltuk össze.

- I. Áttekintve a glió daganatokat bebizonyosodott, hogy meglehetősen változatos hisztológiai megjelenésűek, érettségűek és biológiai viselkedésűek.
- II. A daganatsejtek proliferációs aktivitásának meghatározása áramlásos citometriás és immunhisztokémiai vizsgálatokkal eredményesen történt. Ezen

paraméterek kritikus határ alatti értékei alacsony malignitás, kedvező biológiai viselkedés mellett és a tumorok transzformációja ellen szólnak:

- DNS index értéke  $1 \pm 0,1$
- és/vagy az S-fázis frakció értéke 6%-nál alacsonyabb
- és/vagy 1 nagy nagyítású látótérben 3-nál kevesebb a MIB-1 jelölődési index.
- és/vagy 10 nagy nagyítású látótérben nem látható mitózis

III. Genetikai eltérések kimutatására, kiegészítő vizsgálatokként:

A. Ajánljuk FISH-IPC módszert

- Az 1. és 17. kromoszómák monoszómiája alacsony malignitású gliómában kimutatható, kedvező biológiai viselkedéssel társul.
- A 9., 10. és 22. kromoszómák monoszómiája ellenben szövettanilag anaplasias és blastos gliómákra jellemző. Alacsony malignitású gliómákban ezen kromoszómák monoszómiájának előfordulása prognosztikailag kedvezőtlen, szövettani transzformációt jelenthet.

B. A felvetett mutáns p53 tumor szuppresszor gén és ras onkogének szerepe nem igazolódott magas malignitású gliómák kialakulásában, emiatt ezen gének vizsgálata nem jelent segítséget a diagnózis alkotásában. Azonban a p53 protein felhalmozódása a tumorok dedifferenciációja során kimutatható volt:

- Általában a glioblastomákban kifejezetten magas p53 immunreaktivitás jellemző. Ezen belül:

- primer glioblastomákban 40-45/HPF intranucleáris jelölődést találtunk.
- transzformált glioblastomákban azonban jóval magasabb, 90-100/HPF volt a jelölődési index, mely a gliómák hisztológiai progressiójára utal.

IV. A hagyományos hisztológiai osztályozás kiegészíthető proliferációs és citogenetikai adatokkal, mely a gliómák között lévő biológiai különbségeket reprezentálják. Ennek következtében lehetőség nyílik a „glioma tumor -család” egyedeinek individuális megítélhetőségére. A daganatok diagnosztikája finomodott, melynek következtébe a gliómák biológiai viselkedését jobban tükröző hisztopatológiai állásfoglaláshoz jutottunk.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kelényi Gábor professzornak, kinek vezetése alatt álló intézeti szellemben sajátítottam el a patho-morphológia alapjait valamint Dr. Horváth Annának akitől az agy daganatok hisztopathológiáját tanultam. Továbbá Dr. Pajor László professzornak, akinek támogatásával indult az agydaganatok proliferációjának meghatározása, később a citogenetikai vizsgálatok. Köszönettel tartozom Dr. Matolcsy Andrásnak a molekuláris genetikai technikák elsajátításában nyújtott segítségéért valamint munkám során nyújtott szüntelen szellemi támogatásáért. Köszönet illeti Dr. Dóczi Tamás professzort a példátlan klinikai kollaborációért és támogatásért amivel munkám során töretlenül mellettem állt. Továbbá köszönöm Keresztes Gábornak a dolgozat szerkesztésében nyújtott segítségét. És végül megköszönöm családomnak a dolgozat elkészítése során tanúsított türelmét, megértését és lelki támogatását.



## X. Rövidítések

- antisense:** 3' primer
- bax gén:** apoptosist indukáló gén
- bcl-1 gén:** (más néven cyclin D1/PRAD-1): parathyreoidea adenoma gén, a 11. kromoszóma q13 locusán onkoproteint kódol
- bcl-2 gén:** antiapoptotikus gén
- BrdU:** Bromdeoxy-uridin
- CDK:** cyclin dependens kináz
- c-myc:** 8. kromoszóma q24 locusán elhelyezkedő protoonkogén
- CT:** computer tomográf
- cyclin A,B,D,E:** a sejt ciklus szabályozásában vesznek részt, cyclin dependens kinázokkal komplexet képeznek, számos fajtája ismert cyclin A-cyclin J.
- Cytokeratin:** hám eredetű sejtek intermedier filamentuma
- D19S412-STD:** 19. kromoszóma hosszú karján telomerikusan elhelyezkedő glioma tumor szuppresszor gén
- DAPI:** 4,-6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
- DI:** DNS index
- DNS:** deoxiribonukleinsav
- DN-áz:** deoxiribonukleáz
- DO7:** p53 fehérjére specifikus monoklonális ellenanyag
- dATP:** deoxiadenintrifoszfát
- dCTP:** deoxicitidintrifoszfát
- dGTP:** deoxiguanintrifoszfát
- dNTP:** deoxinukleotidtrifoszfát
- dUTP:** deoxiuraciltrifoszfát
- E2F:** transcriptionális faktor, a sejtciklust G<sub>1</sub>→S fázisba történő progressióját eredményezi
- EDTA:** etilén-diamin-tetraecetsav
- EGFR:** Epitheliális Növekedési Faktor Receptor
- EMA:** epitheliális membrán antigén
- FCM:** (flow cytometry) áramlások citometria
- FISH-IPC:** fluoreszcens in situ hibridizáció-interfázis citogenetikai
- FITC:** fluorokróm-izohio-cianid

**G<sub>0</sub>**: sejtciklus G<sub>0</sub> fázisa  
**G<sub>1</sub>**: sejtciklus G<sub>1</sub> fázisa  
**G<sub>2</sub>**: sejtciklus G<sub>2</sub> fázisa

**GFAP**: glia-fibrilláris-acid-protein, a glia sejtek citoszkéletális filamentuma

**grade**: grádus, a tumorok éretségének nemzetközi osztályozása

**kD**: kilodalton

**leu-7**: (HNK-1) monoklonális antitest. Specifikus markere naturális killer sejteknek, oligodendrocytáknak és Schwann sejteknek.

**M fázis**: a sejtciklus mitotikus fázisa

**MIB-1**: monoklonális antitest a nukleáris Ki-67 non-hiszton protein kimutatására alkalmazható paraffinos anyagon

**MMR**: mismatch repair gének, genetikai instabilitásban játszanak szerepet

**MR**: mágneses rezonancia vizsgálat

**NDS**: nátrium dodecil szulfát

**NNL**: nagy nagyítású (400-szoros) látótér

**NOR**: Nucleoláris organizációs régió

**p15**: cyclin dependens kináz gátló

**p16**: (Multiple Tumour Suppressor 1) MTS1 gén, a 9. kromoszóma rövid karjának 21-22 locusán helyezkedik el, cyclin dependens kináz gátló

**p21**: (WAF1/Cip1) cyclin dependens kináz gátló

**PBS**: (phosphate-buffered-saline) foszfáttal puffereit nátrium klorid oldat

**PCR**: polimeráz láncreakció

**PDGF**: vérlemez-eredetű növekedési faktor

**primer**: próba: a vizsgált gén egy adott szakaszával komplementer szintetizált gén szakasz

**PTEN/MMAC1 gén**: 10. kromoszóma hosszú karjának q25-26 telomerikus régióján elhelyezkedő glioma tumor szuppresszor gén

**ras(N-H-K)**: proto-onkogén csoport, mely GTP-kötő fehérjét kódol.

**Rb**: retinoblastoma fehérje

**Rb-P**: foszforilált retinoblastoma fehérje

**RNS**: ribonukleinsav

**RN-áz**: ribonukleáz

**rpm**: (revolutions per minute) fordulatszám

**S100**: 21 kD molekulásúlyú Ca-kötő fehérje, neuronokban és glia sejtekben egyaránt kimutatható.

**sense:** 5' primer

**S-fázis:** sejtciklus S fázisa

**SSC:** nátrium citrát és nátrium klorid vizes oldata

**SSCP:** single-strand-conformation-polymorphism

**Synaptophysin:** 38 kD molekulásúlyú membrán glikoprotein, amely az idegsejtek presynaptikus vezikuláiban található

**Taq:** Thermus aquaticus

**TBE:** Tris-borát és EDTA puffer

**TE:** Tris és EDTA oldata

**TNT:** Tris, nátriumklorid és Tween 20 oldata

**Tris-HCl:** tris-hidroximetil-aminometan szabad bázisának és sósav sójának keveréke

**U:** nemzetközi egység

**UV:** ultraviola sugár

**VHP:** von Hippel-Lindau tumor szuppresszor gén, 3. kromoszóma p25-26 locusán helyezkedik el

**Vimentin:** mesenchyma eredetű sejtek intermediér filamentuma

**WHO:** World Health Organization

**wt-p53:** normál (vad) típusú p53 tumor szuppresszor gén

**X-gal:** 5-bróm-4-klór-3-irdol- $\beta$ -D-galaktozid

## XI. Irodalomjegyzék

1. Ahyai A: Flow cytometric analysis of cellular DNA content in human astrocytomas and oligodendrogliomas. *Neurosurg Rev* 1988 11:177-187
2. Ali IU, Schweitzer JB, Ikejiri B, Saxena A, Robertson JT, Oldfield EH: Heterogeneity of subcellular localisation of p53 protein in human glioblastomas. *Cancer Res* 1994 54:1-5
3. Arvanitis D, Malliri A, Antoniou D, Linardopoulos S, Field JK, Spandidos SA: Ras p21 expression in brain tumours: elevated expression in malignant astrocytomas and glioblastomas multiforme. *In Vivo* 1991 5(4):317-321
4. Balesaria S, Brock C, Bower M, Clark J, Nicholson SK, Lewis P, de Sanctis S, Evans H, Peterson D, Mendoza N, Glaser MG, Newlands ES, Fisher RA: Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *Br J Cancer* 1999 Dec;81(8):1371-7
5. Barnes DM, Gillett CE: Determination of cell proliferation. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1995 48:2-5
6. Bigner SH, Schröck E: Molecular cytogenetics of brain tumours. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997 56(11): 1173-1181
7. Blin N, Muller-Brechlin R, Carstens C, Meese E, Zang KD: Enhanced expression of four cellular oncogenes in a human glioblastoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 1987 25(2):285-292
8. Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H, Figarella-Branger D: Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998 Oct;24(5):381-8
9. Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP: A variation of the structure of the protein coding region of human p53 gene. *Gene* 1988 70: 245-252
10. Carroll RS, Zhang J, Chauncey BW, Chantziara K, Frosch MP, Black PM: Apoptosis in astrocytic neoplasms. *Acta Neurochir* 1997;139(9):845-50



11. Chernova O, Cowell JK: Molecular definition of chromosome translocations involving 10q24 and 19q13 in human malignant glioma cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1998 Aug;105(1):60-8
12. Collins VP: Genetic alterations in gliomas. *J Neuro-Oncology* 1995 24: 37-38
13. Coons S, Johnson P, Pearl D: Prognostic significance of flow cytometry deoxyribonucleic acid analysis of human astrocytomas. *Neurosurgery* 1994 34:680-687.
14. Coons S, Johnson P, Pearl D, Olafsen A: Prognostic significance of flow cytometry deoxyribonucleic acid analysis of human oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 1994 34: 680-687.
15. Coons SW, Johnson PC, Shapiro JR: Cytogenetic and flow cytometry DNA analysis of regional heterogeneity in a low grade human glioma. *Cancer Res* 1995 Apr 1;55(7):1569-77
16. Costanzi-Strauss E, Strauss BE, Naviaux RK, Haas M: Restoration of growth arrest by p16INK4, p21WAF1, pRB, and p53 is dependent on the integrity of the endogenous cell-cycle control pathways in human glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 1998 Jan 10;238(1):51-62
17. Danova M, Riccardi A, Mazzini G, Ucci G, Gaetani P, Silvani V, Knerich R, Butti G, Ascari E: Ploidity and proliferative activity of human brain tumors. *Oncology* 1987 44: 102-107
18. von Deimling A, Bender B, Jahnke R, Waha A, Kraus J, Albrecht S, Wellenrauther R, Faßbender F, Nagel J, Menon AG, Louis DN, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD: Loci associated with malignant progression in astrocytomas: A candidate on chromosome 19q<sup>1</sup>. *Cancer Res* 1994 54:1397-1401
19. von Deimling A, Eibl FH, Ohgaki H, Luis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR: p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II. and grade III. astrocytoma. *Cancer Res* 1992 52: 2987-2990
20. Dirks PB, Hubbard SL, Murakami M, Rutka JT: Cyclin and cyclin-dependent kinase expression in human astrocytoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997 Mar;56(3):291-300
21. Dirks PB, Rutka JT: Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle-a review. *Neurosurgery* 1997 May;40(5):1000-13; discussion 1013-5

22. Donehower LA, Bradley A: The tumour suppressor p53. *Biochem Biophys Acta* 1993 1155: 181-205
23. Ehemann V, Hashemi B, Lange A, Otto HF: Flow cytometric DNA analysis and chromosomal aberrations in malignant glioblastomas. *Cancer Lett* 1999 Apr 26;138(1-2):101-6
24. Ellison DW, GatterKC, Steart PV, Lane DP, Weller RO : Expression of the p53 protein in a spectrum of astrocytic tumours *J Pathol* 1992 168:383-386
25. Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 1999 Aug;155(2):387-94
26. Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM: p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res* 1992 52: 674-79
27. Fults D, Pedone CA, Thomas GA, White R: Allelotype of human malignant astrocytoma. *Cancer Res* 1990 50:5784-5789
28. Giangaspero F, Chieco P, Lisignoli G, Burger P: Comparison of cytologic composition with microfluorometric DNA analysis of the glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Cancer* 1987 60: 59-65
29. Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Christensen MR, Wollan PC, Sebo TJ, Forsyth PA, Hayostek CJ: Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999 Jan;58(1):46-53
30. Gömöri É, Mészáros I, Méhes G, Dóczi T, Pajor L: Cell kinetic analysis in recurrent neuroepithelialis tumours. *Acta Neurochir* 1996 141:593-99
31. Gömöri É, Mészáros I, Méhes G, Dóczi T, Pajor L: Prognosis of neuroepithelial tumours by means of cell proliferation studies. *Clin Neurosci* 1996 49(9-10):315-320
32. Gömöri É, Dóczi T, Pajor L, Matolcsy A: Sporadic p53 mutations and absence of Ras mutations in glioblastomas. *Acta Neurochir* 1999 138:1036-1041
33. Graham DI, Lantos PL : *Greenfield's Neuropathology*, sixth edition. 1997
34. Harris CC: p53: at the cross-roads of molecular carcinogenesis and ask assessment *Science* 1993 262: 1980-81

35. Hayes VM, Dirven CM, Dam A, Verlind E, Molenaar WM, Mooij JJ, Hofstra RM, Buys CH: High frequency of TP53 mutations in juvenile pilocytic astrocytomas indicates role of TP53 in the development of these tumors. *Brain Pathol* 1999 Jul;9(3):463-7
36. Hedley D: Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry* 1989 10: 229-241
37. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutation in human cancer. *Science* 1991 253: 49-53
38. Hulsebos T, Schonk D, van Dalen I, Coenwinkel-Driessen M, Schepen J, Ropers HH, Wieringa B: Isolation and characterization of aliphoid DNA sequences specific for the pericentric regions of chromosomes 4, 5, 9, and 19. *Cytogenet Cell Genet* 1988 47: 144-148
39. Hulsebos T, Oskam NT, Troost D, Leenstra S, Bijleveld EH: Dynamics of genetic alterations associated with glioma recurrence. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 23(2): 153-158
40. Hulsebos TJ, Oskam NT, Bijleveld EH, Westerveld A, Hermsen MA, van den Ouweland AM, Hamel BC, Tijssen CC : Evidence for an ependymoma tumour suppressor gene in chromosome region 22pter-22q11.2. *Br J Cancer* 1999 Dec;81(7):1150-4
41. Husemann K, Wolter M, Buschges R, Boström J, Sabel M, Reifenberger G: Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999 Oct;58(10):1041-50
42. Ishii N, Tada M, Hamou MF, Janzer RC, Meagher-Villemure K, Wiestler OD, Tribolet N, Van Meir EG: Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor. *Oncogene* 1999 Oct 21;18(43):5870-8
43. Ito S, Chandler KL, Prados MD, Lamborn K, Wynne J, Malec MK, Wilson CB, Davis RL, Hoshino T : Proliferative potential and prognostic evaluation of low-grade astrocytomas. 1994 19:1-9
44. Jenkins GR, Rudge K, Chumakov P, Churrie GA: The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* 1985 317: 816-818

45. Kanno H, Shuin T, Kondo K, Yamamoto I, Ito S, Shinonaga M, Yoshida M, Yao M: Somatic Mutation of the Hippel-Lindau tumor suppressor gene and loss of heterozygosity on chromosome 3p in human glial tumors. *Cancer Res* 1997 57:1035-1038
46. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T: Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* 1994 87: 47-54
47. Kleinhues P, Burger PC, Scheithauer BW: Histological typing of tumours of the central nervous system, Second edition of WHO classification. 1993 Springer, Berlin Heidelberg New York
48. Koga H, Zhang S, Kumanishi T, Washiyama K, Ichikawa T, Tanaka R, Mukawa J: Analysis of p53 gene mutation in low- and high-grade astrocytomas by polymerase chain reaction-assisted single-stand conformation polymorphism and immunohistochemistry. *Acta Neuropathol* 1994 87: 225-232
49. Korkopolou P, Christodoulou P, Lekka-Katsouli I, Kouselis K, Papanikolaou A, Panayotides I, Mariatos P, Thomas-Tsagli E: Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in gliomas. *Histopathology* 1994 25: 349-355
50. Korkopolou P, Kouzelis K, Christodoulou P, Papanikolaou A, Thomas-Tsagli E: Expression of retinoblastoma gene product and p21 (WAF1/Cip 1) protein in gliomas: correlations with proliferation markers, p53 expression and survival. *Acta Neuropathol* 1998 Jun;95(6):617-24
51. Kyritsis AP, Xu R, Bondy ML, Levin VA, Bruner JM: Correlation of p53 immunoreactivity and sequencing in patient with glioma. *Mol Carcinog* 1996 15(1):1-4
52. Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb : Pathway leading to glioblastoma multiforme: molecular analysis of genetic alteration in 65 astrocytic tumours. *J Neurosurg* 1994 81(3): 427-436
53. Levine AJ, Momand J, Finlay CA : The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991 351: 453-456
54. Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB: PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. *Cancer Res* 1997 Dec 1;57(23):5254-7



55. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J: Molecular cell biology Third edition 1995 Scientific American Books, Inc. New York
56. Louis DN: Molecular genetic model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathol* 1997 7: 755-764
57. Maher J, Baker DA, Manning M, Dibb NJ, Roberts IAG: Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. *Oncogene* 1995 11: 1639-47
58. Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D, Stangl AP, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A: Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997 Oct;56(10):1098-104
59. McKeever PE, Ross DA, Strawderman MS, Brunberg JA, Greenberg HS, Junck L: A comparison of the predictive power for survival in gliomas provided by MIB-1, bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen with histopathologic and clinical parameters. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997 Jul;56(7):798-805
60. McKeever PE, Strawderman MS, Yamini B, Mikhail AA, Blaivas M: MIB-1 proliferation index predicts survival among patients with grade II astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998 Oct;57(10):931-6
61. Mork S, Laerum O: Modal DNA content of human intracranial neoplasm studied by flow cytometry. *J Neurosurg* 1980 53: 198-204
62. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC: Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* 1998 Oct;8(4):655-67
63. Nishizaki T, Orita T, Furutani Y, Ikeyama Y, Aoki H, Sasaki K: Flow-cytometric DNA analysis and immunohistochemical measurement of Ki-67 and BUdR labeling indices in human brain tumors. *J Neurosurg* 1989 70: 379-384
64. Ohgaki H, Schäuble B, Hausen A, von Ammon K, Kleihues P: Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch* 1995 427:113-118
65. Onda K, Davis RL, Wilson CB, Hoshino T: Regional differences in bromodeoxyuridine uptake, expression of Ki-67 protein, and nucleolar organizer region counts in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 1994 87(6):586-93

66. Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Akiyama K, Seki S, Ueki K, Louis DN: Accumulation of wild-type p53 in astrocytomas is associated with increased p21 expression. *Acta Neuropathol* 1997 Jul;94(1):21-7
67. Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, Kaye AH, Chow CW, Gonzales MF: Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. *Br. J. Cancer* 1992 66(1):106-112
68. Pajor L, Szuhai K, Méhes G, Kosztolányi G, Jáksó P, Lendvai G, Szanyi I, Kajtar P: Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Cytometry* 1998 34: 87-94
69. Patt S, Gries H, Giraldo M, Cervos-Navarro J, Martin H, Janisch W, Brockmüller J: p53 gene mutation in human astrocytic brain tumours including pilocytic astrocytomas. *Hum Pathol* 1996 27(6):586-589
70. Peters N, Smith JS, Tachibana I, Lee HK, Pohl U, Portier BP, Louis DN, Jenkins PB: The human glial maturation factor-gamma gene: genomic structure and mutation analysis in gliomas with chromosome 19q loss. *Neurogenetics* 1999 1,2(3):163-166
71. Prigent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, Feramisco JR, Cavenee WK, Huang HS: Enhanced tumorigenic behaviour of glioblastoma cells expressing truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* 1996 271(41):25639-45
72. Poddighe PJ, Ramaekers FCS, Hopman AHN: Interphase cytogenetics of tumours. *J Pathol* 1992 166:215-224
73. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD: Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999 May;11(3):162-7
74. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James D, Wechsler W, Collins P: Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletion on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994 145:1175-1190
75. Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G: Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996 Jul;55(7):822-31

76. Rieger L, Weller M, Bornemann A, Schabet M, Dichgans J, Meyermann R: BCL-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical-pathological correlative study. *J Neurol Sci* 1998 Feb 18;155(1):68-75
77. Rocchi M, Archidiacono N, Antonacci R, Finelli P, Aiuto LD, Carbone R, Lindsay E, Baldini A: Cloning and comparative mapping of a recently evolved human chromosome 22-specific alpha satellite DNA. *Somatic. Cell Mol Genetic* 1994 20: 43-448
78. Rose D, Maddox P, Brown D: Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol* 1994 47: 1010-1014
79. Rosenberg JE, Lisle DK, Burwick JA, Ueki K, von Deimling A, Mohrenweiser HW, Louis DN: Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval. *Oncogene* 1996 Dec 5;13(11):2483-5
80. Rosso SM, van Dekken H, Krishnadath KK, Alers JC, Kros JM: Detection of chromosomal changes by interphase cytogenetics in biopsies of recurrent astrocytomas and oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997 Oct;56(10):1125-31
81. Rushing EJ, Watson ML, Schold SC, Land KJ, Kokkinakis DM: Glial tumors in the MNU rat model: induction of pure and mixed gliomas that do not require typical missense mutations of p53. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998 Nov;57(11):1053-60
82. Russell DS, Rubinstein LJ: Pathology of tumours of the nervous system 1989 Williams&Wilkins
83. Salmon I, Dewitte O, Pasteels L, Flament-Durand J, Brotchi J, Vereerstraeten P, Kiss R: Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade, and DNA histogram type. *J Neurosurg* 1994 80: 877-883
84. Saxena A, Robertson JT, Ali IU: Abnormalities of p16, p15 and CDK4 genes in recurrent malignant astrocytomas. *Oncogene* 1996 Aug 1;13(3):661-4
85. Saxena A, Shriml LM, Dean M, Ali IU: Comparative molecular genetic profiles of anaplastic astrocytomas/glioblastomas multiforme and their subsequent recurrences. *Oncogene* 1999 Feb 11;18(6):1385-90

86. Scheck AC, Shapiro JR, Coons SW, Norman SA, Johnson PC: Biological and molecular analysis of a low-grade recurrence of a glioblastoma multiforme Clin Cancer Res 1996 2: 187-199
87. Schutz BR, Scheurlen W, Krauss J, du Manoir S, Joos S, Bentz M, Lichter P: Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumors by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer 1996 Jul;16(3):196-203
88. Shindo H, Tani E, Matsumoto T, Hashimoto T, Furuyama J: Stabilization of c-myc protein in human glioma cells. Acta Neuropathol 1993 86: 345-352
89. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavenee W, Vogelstein B: Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. Nature 1992 355: 846-847
90. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol 1998 Jul;57(7):684-9
91. Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, Li H, Diserens AC, Wojcik BE, Huang HJS, Friedmann T, Tribolet N, Cavenee WK: Analysis of The p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. Cancer Res 1994 54:649-52
92. Vavruch L, Eneström S, Carstensen J, Nordenskjöld B, Wingren S: DNA index and S-phase in primary brain tumors. J Neurosurg 1994 80: 85-89
93. Vital A, Loiseau H, Kantor G, Daucourt V, Chene G, Cohadon F, Rougier A, Rivel J, Vital C: p53 protein expression in grade II astrocytomas: immunohistochemical study of 100 cases with long-term follow-up. Pathol Res Pract 1998;194(12):831-6
94. Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Role of gemistocytes in astrocytoma progression. Lab Invest 1997 Feb;76(2):277-84
95. Weinberg RA: Tumour suppressor genes Science 1991 254:1139-54
96. Wernicke C, Thiel G, Lozanova T, Vogel S, Witkowski R: Numerical aberration of chromosomes 1, 2 and 7 in astrocytomas studied by interphase cytogenetics. Genes Chromosomes Cancer 1997 May;19(1):6-13



## XII. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények, idézhető absztraktok és előadások

*Folyóiratokban megjelent közlemények:*

1. Szirmai I., Fendler K., Gömöri É., Bártfai L.: Haemorheológiai vizsgálatok cerebrovasculáris betegségekben. Ideggyógyászati szemle 41. 129-140. (1988)
2. Szirmai I., Fendler K., Gömöri É.: A vér serum cholesterolin, HDL-cholesterin és triglicerid szintje cerebrovasculáris betegségekben Orvosi Hetilap (25)1307-11. (1988)
3. Nagy E., Krucsó É., Gömöri É.: Synovialis chondromatosis vállizületben. Magyar Radiológia 68(5)150-151. (1994)
4. Rozsos I., Vereczkei A., Kassai M., Gömöri É., Horváth Ö.P.: Intra and postoperative follow up of organs used for esophageal reconstruction. Z. gastroenterol 5: 306-8. (1995)
5. É. Gömöri, I. Mészáros, G. Méhes, T. Dóczi, L. Pajor: Cell kinetic parameters in neuroepithelial tumours Acta Neurochirurgica 138: 1036-1041. (1996)
6. É. Gömöri, I. Mészáros, G. Méhes, T. Dóczi, L. Pajor: Neuroepithelialis tumorer prognózisának vizsgálata sejtproliferációs szempontból. Clinical Neuroscience 9-10:315-320 (1996)
7. P. Than, T. deJonge, Gy. Szabó, T. Kustos, É. Gömöri : Multiple Familial occurrence of ochronotic arthropathy. Orthopedics 21/5: 590-592. (1998)
8. É. Gömöri, T. Dóczi, L. Pajor, A. Matolcsy: p53 mutations and absence of ras gene mutation in progression of glioblastomas Acta Neurochir. 141/6 :593-600. (1999)
9. Geddes, Jansen, Robinson, Gömöri, Holton, Monson, Besser, Révész: Gangliocytoma of the pituitary: a heterogeneous group of lesions with differing histogenesis Am.J. Surg.Path. Közlésre elfogadva

*Idézhető absztraktok:*

1. É. Gömöri, I. Mészáros, T. Dóczi, L. Pajor Pathological prognostic factors in glial tumors Clinical Neuroscience 48(1) 57. (1995)
2. Gömöri É, Mészáros I., Méhes G., Dóczi T., Pajor L.: Cell kinetic examinations in recurrent neuro-epithelial tumours. Magyar Oncologia Supplementum (1995)

3. **É. Gömöri**, T.Dóczi, L.Pajor, A. Matolcsy: Malignant progression of recurrent neuroepithelial tumours Neuropathology and applied neurobiology 22(1) 65. 1996
4. **É. Gömöri**, T.Dóczi, L.Pajor, A.Matolcsy: Sporadic p53 mutations and absence of ras gene mutation in glioblastomas Clinical Neuropathology 16/5: 259 (1997)
5. **É. Gömöri**, T.Dóczi, E. Balázs, D.J. Halbauer, L.Pajor,: Cytogenetic aberration in glial tumours Neuropathology and applied neurobiology 22(1) 65. 1999.
6. **É. Gömöri**, T.Dóczi, E. Balázs, L.Pajor,: Chromosomal numerical alteration in glial tumours Clinical Neuroscience 52(1) 1999.
7. I. Mészáros, **É. Gömöri**, T.Dóczi,: Intracranial Cysticercosis Clinical Neuroscience 52(1) 1999.
8. **É. Gömöri**, T.Dóczi, E. Balázs, D.J. Halbauer, L.Pajor,: Cytogenetic aberration in glial tumours Clinical Neuroscience 52(1) 1999. Acta Neuropath. 98(5) 1999.

*Kongresszusi előadások, posztterek jegyzéke:*

1. **Gömöri É:** Hodgkin kór differenciál diagnosza. Malignus Lymphoma Konferencia (Szombathely, 1992, poszter)
2. **Gömöri É:** Ag-NOR Hodgkin kóros szöveten. Magyar Pathologus Konferencia (Pécs, 1993, poszter)
3. **Gömöri É**, Mészáros I.,Méhes G.,Dóczi T.,Pajor L.: Sejt proliferációs vizsgálatok recidív gliális tumorokban Pathologus Találkozó (Székesfehérvár,1994, poster)
4. **Gömöri É**, Mészáros I.,Méhes G.,Dóczi T.,Pajor L.: Pathologiai prognosztikus faktorok neuroepitheliális tumorokban. Neuropathologiai Találkozó (Szekszárd, 1994, előadás)
5. **Gömöri É**, Dóczi T.,Pajor L.: Pathologic prognostic factors in glial tumors. 32nd National Congress of Hungarian Society of Neurologist and Psychiatrist and Joint Meeting of British and Hungarian Neurologist (Budapest, 1995, lecture)
6. **Gömöri É**, Dóczi T.,Pajor L.: Prognostic factors in neuroepithelial tumors. 2nd Conference of Hungarian Society of Neuropathologists and 1st Joint Meeting of the German and Hungarian Association of Neuropathology (Budapest, 1995, lecture)

7. **Gömöri É, Mészáros I., Méhes G., Dóczi T., Pajor L.:** Sejt kinetikai vizsgálatok recidív neuroepitheliális tumorokban. Magyar Pathologus Társaság Kongresszusa (Szeged, 1995, előadás)
8. **Gömöri É, Mészáros I., Méhes G., Dóczi T., Pajor L.:** Sejt kinetikai vizsgálatok recidív neuroepitheliális tumorokban. Magyar Oncológus Társaság Kongresszusa (Pécs, 1995, előadás)
9. **Gömöri É, Rozsos I., Vereczkei A., Nyilas P., Horváth Ö.P.:** Vékonybél Iszkémiás-reperfüziós változásainak hystológiai nyomkövetése 15. Kísérletes Sebész Kongresszus (Pécs, 1995, előadás)
10. **Gömöri É, Dóczi T., Pajor L., A. Matolcsy:** Malignant progression in neuroepithelial tumors. 5<sup>th</sup> European Congress of Neuropathology (Paris, 1996, poster)
11. **Gömöri É, Mészáros I., Dóczi T., Pajor L., A. Matolcsy.:** Malignus progressió gliális tumorokban. 2. Neuropathologus találkozó (Szekszárd, 1996, előadás)
12. **É. Gömöri, T. Dóczi, L. Pajor, A. Matolcsy:** Sporadic p53 mutations and absence of ras gene mutation in glioblastomas 42nd Annual Meeting of the Germain Neuropathology (Magdeburg, 1997 poster)
13. **Gömöri É, Dóczi T., Pajor L.:** Cytogenetic alterations in glial tumours. 3th Conference of Hungarian Society of Neuropathologists and 2nd Joint Meeting of the German and Hungarian Association of Neuropathology (Budapest, 1999, lecture)
14. **Gömöri É, Dóczi T., E. Balazs, Pajor L.:** Cytogenetic alterations in glial tumours. 6th European Congress of Neuropathology (Barcelona, 1999, poster)
15. **I. Mészáros, É Gömöri, Dóczi T.:** Intracranial cysticercosis. 3th Conference of Hungarian Society of Neuropathologists (Budapest, 1999, lecture)
16. **É. Gömöri, T. Dóczi, E. Balázs, D.J. Halbauer, L. Pajor.:** Chromosomal numerical alteration in glial tumours. Neuropathology at the Turn of the Millenium 44th Annual Meeting of German Neuropathology and Neuroanatomy. (Bonn, 1999, poster)
17. **Gömöri É :** A tumoros glia sejt genetikai változásai. Magyar Idegtudományi Társaság VII. Konferenciája (Budapest, 2000, felkért előadás)