

**A glia eredetű daganatok hisztológiai
progressziójának vizsgálata**

PhD-értekezés tézisei

Dr. Gömöri Éva

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Pathológiai Intézet

2000

I. Bevezetés

A primer intracraniális, neuroepitheliális tumorok leggyakoribb formái a glia eredetű daganatok. A gliomák kezelése máig sem megoldott, annak ellenére, hogy a sebészi intervenciós módszerek és a posztoperatív terápiás lehetőségek bővülnek. 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.

Egyrészt 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 várttól.

Másrészt 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.

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

A glia eredetű daganatok hisztológiai típusai, érettségi fokozatai az érvényben lévő WHO osztályozás alapján.

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. 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 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, beleértve a ritkább hisztológiai variánsokat is. Az eltérő biológiai viselkedésű gliomák csupán patomorfológiai alapon történő diagnózisát 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 relatíve 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, a legrosszabb prognózisú glioblastomák túlélése 0.5 és 1.5 év között várható.

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 ciklus szabályozó gének szerkezeti, funkcionális és genetikai változásaiban keresendők.

A daganat diagnosztika területén a megválaszolendő kérdések köre kibővült, ezek elsősorban a daganat progressziójára vonatkoznak. Lényeges kérdés a glia eredetű daganatok osztályozásának finomítása, a különböző érettségű tumorok új szempontok szerinti jellemzése illetve a tumor sejt transzformáció hátterének 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 diagnosztikájában. 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.

II. Célkitűzések

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, subtípusait és immunfenotípusát.

II. Meghatározzuk az alacsony és magas malignitású gliomák növekedési aktivitását és annak változását recidívák 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 kerestünk

2. az egyik legrosszabb prognózisú agy daganat különböző subtípusaiban, primer és secundaer 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.

III. 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 közelítjük 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 secundaer glioblastomákban, melyhez molekuláris genetikai módszerek polimeráz-láncreakció-, „Single-Strand-Conformation-Polymorphism” (PCR-SSCP)- szekvencia analízist végeztünk.

III.1. Beteganyag, rutin hisztológia

A POTE Patológiai Intézetében 1996-1999 között összesen 1116 idegsebészeti műtéti minta került hisztológiai feldolgozásra. A formalinban fixált, paraffinban beágyazott műtéti mintákból származó 5-6 µm vastagságú metszeteket rutinszerűen haematoxilin-eosin festéssel vizsgáltuk. Szükség esetén kiegészítésül PAS reakciót és reticulín ezüstözési technikát alkalmaztunk.

III.2. 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 jelölt 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.

III.3. Áramlásos citometria

III.3.1. Beteganyag

Összesen 72 beteg paraffinos beágyazott szövetmintáján végeztük el a vizsgálatot. A betegeket két csoportra osztottuk, 22 recidiváló glia daganatos beteg primer és recidív mintáit hasonlítottuk össze részben egymással részben pedig 12 nem recidiváló beteg daganatával, melyeknél az 5 éves követés alatt recidívát nem észleltünk. Ezen betegcsoporton kívül a későbbiekben, szükség esetén olyan tumorokon végeztük el méréseket, amikor a diagnózis megszületésében segítséget nyújtottak az áramlásos citometriás adatok.

III.3.2. A mérés kivitelezése

A vizsgálatokat áramlásos citométerrel és ehhez kapcsolódó computeres sejtciklus analízis 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 rehidráció 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. áramlásos citométert alkalmaztunk. Az adatok statisztikai feldolgozását „BMPD Hotteling” T négyzet próba segítségével végeztük el.

III.4. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

III.4.1. Beteganyag

POTE Patológiai Intézet anyagából azok az esetek kerültek feldolgozásra, melyeknél natív szövetminta rendelkezésre állt és a citogenetikai vizsgálatok elvégzése indokolt volt. 26 glioma került vizsgálatra, melyek között minden érettségi fokozat előfordult.

III.4.2. Próbák, a próbák jelölése

Kromoszóma specifikus peri-centromerikus próbákat alkalmaztunk, melyek jelölődési tulajdonságait és megbízhatósági határ értékeit humán kontroll sejteken határoztuk meg. Nem-rádíoaktív „nick translatio”-val jelöltük a DNS próbákat biotin és digoxigenin conjugált d-UTP (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) felhasználásával. A próba plazmidba insertált -a kromoszóma centromer régiójára specifikus- DNS szakasz. A „nick translatio” során 1 µl plazmid DNS-t, 50 µl 0.05 M Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 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, Madison, 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.

III.4.3. A minta előkészítése

A fagyasztott műteti 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.

III.4.4. 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 próbát 10ng/ml 60% formamid+ 2xSSC oldatát tesszük az előkészített tárgylemezre majd 80°C-on 2 percig együtt denaturáljuk a próbát a vizsgált mintával. Egy éjszakán át 37°C-on tart a hibridizáció. Poszthibridizációs mosás 60% formamid 2xSSC-ben (pH 7) 37°-on 3x5 percig történt, majd 2xSSC-ben 3x5 percig.

III.4.5. Immunitokémiai kimutatás

A sejtpreparátumot TNT oldatban 5 percig mossuk, majd blokkolás következik „Blockng” reagenssel 37°-on 30 percig. Ezek után jelölés fluorokróm-izothiocianid (FITC)-avidinnel, a digoxigenin jeleket pedig anti-digoxigenin-rhodaminnal hívjuk elő TNT pufferben 37°-on 30 percig. Mosás TNT oldatban 3x5 percig, lefedés DAPI-Vectashield oldattal. Az értékelés fluoreszcens mikroszkóppal történik, 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.

III.5. Molekuláris genetikai technika, PCR-SSCP-szekvencia analízis

III.5.1. Beteganyag

POTE Patológiai Intézet anyagából azok az esetek kerültek feldolgozásra, melyeknél natív szövetminta rendelkezésre állt. Tizennyolc glioblastomás beteg daganatát vizsgáltuk p53 tumor szuppresszor gén és a ras onkogének pontmutációi után kutatva. A glioblastomákat két csoportra osztottuk: 12 „de novo”, primer glioblastoma és 6 secundaer glioblastoma került vizsgálatra.

III.5.2. DNS izolálás

Friss fagyasztott szövetből telített NaCl felhasználásával, kisózással 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 µl 10%-os nátrium dodecilsulfát (NDS) és 500 µl 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 felülúszóhoz 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.

III.5.3. PCR (polimeráz-lánreakció) 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 µl genomikus DNS-t, 2.5 µmol dNTP, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris (pH 8.8), 10 pM oligonukleotid „primerek”, 1 µCi [α -³²P] 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 µl legyen. Az amplifikáció automata termociklómeter (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 géll elektroforézis segítségével végeztük el.

III.5.4. „SSCP (single-strand conformation polymorphism),” analízis

Két µl PCR terméket 1:25 arányban feloldunk 0.1% NDS + 10 mM EDTA oldatban, majd 1:1 arányban „sequencing stop solution”-nal hígítjuk, mely 20 mM NaOH tartalmaz. A mintát 90 °C-ra melegítjük 5 percig, majd hirtelen lehűtjük 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 töltjük. Az elektroforetikus gélt 4-8 W-on 14 - 18 órán keresztül futtatjuk szobahőmérsékleten. Majd a gélt 10%-os ecetsav oldatban fixáljuk, levegőn szárítjuk, autoradiografiával -70 °C-on 18-24 órán keresztül detektáljuk végül a filmet előhívjuk.

III.5.5. 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 klónszelektiót követően minden szövetminta esetében 4 klónt alkalmaztunk. A DNS szekvenálása direkt plazmid 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.

IV. Eredmények

IV.1. Sejtkinetikai, proliferációs vizsgálatok

IV.1.1. A DNS index:

A kiújuló daganat pátok első és recidív mintáit hasonlítottuk össze egyrészt egymással, másrészt pedig nem recidiváló, gyógyult (5 éven túlélő) gliá daganatokkal, követve a proliferációs paraméterek változásait. Sejtciklus analízis során megfigyeltük, hogy a diploiditás aránya jelentősen nem változott. 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 recidiva hajlamra hívja fel a figyelmet, mely a DNS index értékében is megnyilvánul, nevezetesen 1±0.1-nél kisebb vagy nagyobb.

IV.1.2. 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±11.91% (6.7-41.1%) volt. A „recidiváló” csoportban 22.62±13.86% (5.4%-42.7%) volt az S-fázis frakció értéke (6.Táblázat). Ellenben a gyógyult, kontroll csoportban az érték 5.81±3.19% (0-8.6%) -ra csökkent. A recidiváló primer tumor (p=0.006) és annak második mintája (p=0.001) szignifikánsan magasabb S-fázis frakciót jelent mint a gyógyultaké. Azonban nem volt szignifikáns különbség a recidiváló tumorok „primer és secundaer” mintái között (p= 0.5646).

IV.1.3. Proliferációs markerek- MIB-1 antitest jelölődési index

Vizsgálati eredményeink alapján a MIB 1 pozitív sejtek aránya a kiújuló gliá tumorokban szintén jellemzően magasabb értéket képvisel mind első „mind recidív mintáiban a gyógyultakhoz képest. A MIB 1 intranucleárisan jelölt sejtek aránya/HPF (egy nagy nagyítású látóterre vonatkoztatva) 21.71±14.2 (3.2-44.3) volt a „primer tumor” csoportban és 23.53±16.76 (4-45) volt a „recidív” csoportban. Ellenben a gyógyult csoportban a jelölt sejtek száma jelentősen alacsonyabb, 2.09±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 (7.Táblázat). Nem volt szignifikáns különbség a MIB 1 jelölt sejtek számában a „primer” és a „recidív” csoportok között (p=0.7869).

IV.1.4. 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±5.54 (2-15) volt, a „recidív csoportban” pedig 9.54±8.02 (1-17) volt. Ellenben mitózisok száma a gyógyult, kontroll csoportban 0.58±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.

IV.2. Citogenetikai eredmények

IV.2.1. Alacsony malignitású gliomák citogenetikai eltérései

A legkiértebb daganatban, pilocytás astrocytoma mindkét esetben 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. Csúpan 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) vizsgálatok a 10. kromoszómán 13.76%-ban, a 17. kromoszómán 16.10%-ban monoszómiát találtunk mindkét esetben.

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. Csúpan egyetlen esetben a 9. kromoszómán 7,6%-ban észleltünk monoszómiát.

IV.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. Csúpan egy esetben találtunk 5/19. kromoszómán 11.3%-ban és két esetben 9. kromoszómán 12.26%-ban monoszómiát.

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.

IV.3. p53 és ras gének és p53 protein vizsgálata

IV.3.1. 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 → ttggtct, mely nem okozott aminosav szekvencia változást. 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 cseréhez vezetett.

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

IV.3.2. 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).

V. Megbeszélés

Munkánk elején megfogalmazott célkitűzésekre és kérdésekre a tanulmány megbízható válaszokat adott. 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 paraméterei és citogenetikai változásai tekintetében elkülönültek egymástól. Az előnyös és előnytelen prognózist jól reprezentálják, a transzformációt előrevetíthetik. 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. A kiújuló daganatok ennek köszönhetően felgyorsult, aktív sejtciklussal rendelkeznek, melyek egyrészt magas proliferációs értékekben nyilvánultak meg, másrészt aneuploid sejtklonok jelentek meg és eltért a tumor sejtek DNS tartalma a normál diploidtól.

Sejtkinetikai eredményeink arra utalnak, hogy a hisztológiailag heterogén gliomák proliferációs paraméterei szerint jól elkülöníthetők egymástól és kiújuló, második tumoraitól. Az alacsony malignitású gliomák diploidak, DNS index értéke 1.00. A daganatok dedifferenciálódása során és magas malignitású daganatokban, aneuploid sejtklonok jelennek meg, a DNS index értéke 1.00-tól 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. 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 képvisel mind első, mind recidív mintáiban a gyógyultakhoz képest. Egy hypercelluláris nagy nagyítású látótérben (NNL) 4-45 között változott, míg a gyógyult tumorokban 0-8 MIB I intranucleáris jelölődést számoltunk. Általunk talált recidívára predisponáló határérték 2-3/ NNL.

Hagyományokat követve a mitotikus index használata fontos. A mitózisok gyakorisága vizsgálataink során megegyezett az irodalmi adatokkal. 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 I intranucleáris jelölt sejtek és a mitózisok számának arányát a különböző prognosztikai csoportokban. A nem recidíváló tumorokban 10-12- szer több a MIB I jelölt sejtek száma a mitózisoknál, míg ez az arány a recidív tumorok esetében 40-42 szerezére emelkedik.

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

- DNS index értéke 1 ± 0.1 -nél kisebb vagy nagyobb
- és/vagy az S-fázis frakció értéke 6%-nál magasabb
- és/vagy I nagy nagyítású látótérben 2-3-nál több a MIB I jelölődő sejtek száma
- és/vagy 10 nagy nagyítású látótérben 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. A kromoszóma eltérések genetikai állomány veszteséget 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 veszteség 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. kromoszómán pilocytás astrocytomában és a 13/21. kromoszómán diffúz alacsony malignitású astrocytomában.

Általában a 19. kromoszóma vesztesége gyakoribb 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. Esetünkben az alacsony arányú 19 kromoszóma monoszómia gyakoriságot technikai okokkal lehetne magyarázni a kereszthibridizációs próba okozta nehézségek és a magas megbízhatósági határérték miatt.

A 13. kromoszóma vesztesége közepes gyakorisággal fordul elő elsősorban magas malignitású gliómákban, ritkábban alacsony malignitású gliómákban, hasonlóan vizsgálati eredményeinkhez.

A 10. kromoszóma monoszómiája ritka pilocytás astrocytomában, malignus astrocytomák jellemző citogenetikai markere, így általunk talált sporadikus előfordulásuk elfogadható eredmény.

A 8. kromoszóma vonatkozásában pozitív vizsgálati eredményeinket nehéz magyarázni, gliómákban ritkán látható citogenetikai változásról lévén szó. Inkább primitív neuroektodermális tumorban, medulloblastomára jellemző a 8. kromoszóma érintettsége, elsősorban a hosszú karon 8q24 szakaszon elhelyezkedő MYC proto-onkogén amplifikáció miatt.

Leggyakrabban érintett a 17. kromoszóma, monoszómiás sejtek szinte mindegyik tumor fajtában és grádusba megtalálhatók voltak, hasonlóan az irodalmi adatokhoz. A kromoszóma veszteségének hátterében álló p53 tumor szuppresszor gén vagy NF1 gén szerepének tisztázása érdekében további molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzése szükséges. Az azonban jelen munkában is bebizonyosodott, hogy a 17. kromoszóma genetikai állományának vesztesége a tumorigenezis már korai szakaszaiban bekövetkezik és a daganat hisztológiai progressziója során a tumor sejtek továbbviszik az elszennvedett genetikai változást.

Hasonlóan az 1. kromoszóma monoszómiája emelkedett gyakorisággal fordult elő elsősorban az alacsony malignitású astrocytomákban és oligodendrogliómákban, a vizsgált glioblastomákban nem tudtuk kimutatni, a közölt adatokhoz hasonlóan. Anaplasticus astrocytomákban vizsgálataink során szintén kimutatható volt. Előfordulását azzal magyarázzuk, hogy a daganatok szekunder transzformált típusúak lehetnek, amikor is alacsony malignitású astrocytoma malignus progressziója során, már egy korábban elszennvedett 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.

A 10. kromoszóma monoszómiája halmozottan fordult elő magas malignitású gliómákban, alacsony malignitású oligoastrocytomában, vizsgálati eredményeink az irodalmi adatokkal megegyezőnek mondható. A kromoszómán elhelyezkedő tumor szuppresszor gén mutációját teszik felelőssé a gliómák progressziójáért.

A 14/22. kromoszóma veszteségek kizárólag glioblastomákban voltak kimutathatók tanulmányunkban. Az irodalom a 22. kromoszóma genetikai változásáról glioblastomában is beszámol, azonban jellemzően ependymómában és meningeomákban jelentkezik halmozottan. 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 közölt irodalmi adatok elsősorban a 22. kromoszóma genetikai veszteségét támogatják.

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

Összességében az interfázis citogenetika kiegészítő módszerként bevezethető az agydaganatok diagnosztikájában egyrészt a nehezen értékelhető esetekben, másrészt a prognózis szempontjából használható adatnak tűnik. Egy daganat hisztológiai

jellemezése majd immunfenotípusának meghatározása után a genotípus tisztázása jelentősen hozzájárulhat a glió daganatok reklassifikációjához 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 progressziója 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 elnyertelen biológiai viselkedésre enged következtetni. Ha érettebb daganatban ezeket 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 secundaer glioblastomákban. Arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a két génnek együttesen van-e szerepe a glioblastomák eltérő patomechanizmusában. 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 körlefolys 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 glió daganatok késői hisztológiai transzformációjához és klinikai progressziójához. Noha a p53 gén vesztésének, pontmutációjának vagy inaktivációjának szerepe lehet az alacsony malignitású gliomák tumorigenezisében. Erre utalnak a citogenetikai vizsgálati eredményeink is a 17 kromoszóma monozómiájának 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.

Annak ellenére, hogy a p53 gén szomatikus mutációja csak sporadikusan fordult a p53 protein immunhisztokémiailag szinte mindegyik esetben kimutathatónak bizonyult. A normál p53 protein rövid fél életidővel rendelkezik, immunhisztokémiailag nem mutatható ki. A gén aminosav változásának következtében a mutáns protein szerkezete megváltozik, a „vad” típusú proteinnel complexet képezve stabilá válik és a magban felhalmozódik. Általunk vizsgált mindkét, primer és secundaer glioblastoma csoportban jelentősen emelkedett jelölődési indexet találtunk, hasonlóan az irodalmi adatokhoz. 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 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 immunhisztokémiailag 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 ras onkogének tumorokban játszott szerepét már számos malignus daganatban kimutatták, azonban az agydaganatok illetően kis számú közlemény áll rendelkezésünkre, melyek 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 szakaszban érintett.

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

VI. Elért új eredmények, következtetések

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

I. Áttekintve a gliá daganatokat bebizonyosodott, hogy meglehetősen változatos hisztológiai megjelenésűek, érettségük és biológiai viselkedésűek.

II. A daganatsejtek proliferációs aktivitásának meghatározása áramlások citometriás és immunohisztokémiai vizsgálatokkal történik. Ezen paraméterek kritikus határ alatti értékei alacsony malignitás, kedvező biológiai viselkedés mellett és a tumorok transzformációja ellen szólnak:

- DNS index értéke 1 ± 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 tényezők kimutatására, kiegészítő vizsgálatokként:

1. 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.

2. 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 alkotásiában. 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.

VII. 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. Rozsai 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 tumorok 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* 25(1) 58. 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. 1999. *Acta Neuropath.* 98(5) 1999.
9. **É. Gömöri**, J.D. Halbauer, E. Balázs, P. Kajtar, T.Dóczi, L.Pajor : Cytogenetic profile of primary intracranial germinoma. *Acta Neuropathologica* 99/4 2000.

Kongresszusi előadások, poszterek jegyzéke:

1. **Gömöri É**: Hodgkin kór differenciál diagnózisa. 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, poszter)
4. **Gömöri É**, Mészáros I., Méhes G., Dóczi T., Pajor L.: Pathológiai prognosztikus faktorok neuroepitheliális tumorokban. Neuropathológiai 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 Onkológus Társaság Kongresszusa (Pécs, 1995, előadás)
9. **Gömöri É**, Rozsos I., Vereczkei A., Nyilas P., Horváth Ö.P.: Vékonybél Iszkémiás-reperfüziós változásainak hystológiai nyomkövetése. 15. Kisérletes Sebész Kongresszus (Pécs, 1995, előadás)
10. **Gömöri É**, Dóczi T., Pajor L. A. Matolcsy: Malignant progression in neuroepithelial tumors. 5th European Congress of Neuropathology (Paris, 1996, poster)
11. **Gömöri É**, Mészáros I., Dóczi T., Pajor L. A. Matolcsy: Malignus progresszió 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 German 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. Balázs, 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)
18. **É. Gömöri**, J.D. Halbauer, E. Balázs, P. Kajtar, T.Dóczi, L.Pajor : Cytogenetic profile of primary intracranial germinoma. International Symposium and 45rd Annual Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy (Leipzig, 2000, poster)