

## OTKA kutatási szakmai zárójelentés

OTKA nyilvántartási szám: F 049050

A kutatási támogatás címe: **Az epidermal growth factor receptorok és az integrinek tumorinvázióban betöltött szerepének vizsgálata intrakraniális daganatokban.**

Vezető kutató: Dr. Klekner Álmos Péter.

Kutatóhely: Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Idegsebészeti Klinika, Debrecen, 4012, Nagyerdei krt. 98.

### A munkatervben szereplő kitűzött feladatok:

2005: Idegsebészeti mélyfagyasztott tumorbank létrehozása. Speciális, riasztóval felszerelt fagyasztószerkelet beszerzése ( -80 Celsius fok). A folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztásos intraoperatív mintagyűjtés megszervezése és kivitelezése. Tumorminták katalógizálása szövettani besorolás alapján.

2006: Intrakraniális daganatokból fagyasztott metszetkészítés, EGFR és integrinek sejtfelszíni expressziójának és lokalizációjának vizsgálata áramlási citométerrel, fluoreszcencia korrelációs mikroszkópiával. DNS- és RNS-card-ok alkalmazása az ECM makromolekulák expressziós szintjeinek kimutatására. Tumormintákból RNS-izolálás, mélyfagyasztott tumor-RNS-bank létrehozása.

2007: Konfokális és közeli mező mikroszkópia alkalmazása a sejtfelszíni receptor-asszociátumok vizsgálatára. A létrehozott RNS minta-gyűjtemény feldolgozása az RNS-card-ok alkalmazásával. Tumormintagyűjtés folytatása a ritka szövettani típusok esetszámának növelése céljából.

2008: A különböző vizsgálómódszerek eredményeinek szintézise. A részeredmények alapján kiegészítő vizsgálatok végzése. Az eredmények nemzetközi publikálása.

### Megvalósult célkitűzések:

1. A kutatási éves ütemtervnek megfelelően 2005-ben megteremtettük az idegsebészeti tumorbank feltételeit (ultramélyhűtő, mintagyűjtő edények, folyékony nitrogén-tartály, stb.), így 2006-ban megkezdődhetett a konkrét mintagyűjtés és tudományos feldolgozásra alkalmas formában való mintatárolás. 2008. december 31-ig összesen 612 agyműtétből közel 3000 szövetmintát gyűjtöttünk, melyek 27 szövettanilag különböző csoportba sorolhatók.

Miután az egyes, általunk vizsgálni kívánt szövettani csoportokban statisztikai kiértékelésre alkalmas számú minta összegyűlt, megkezdtük a laboratóriumi feldolgozást. 2006. novemberben 43 db gondosan kiválogatott tumormintát szállítottunk át a Debreceni Egyetem OEC Genomika laborjába, ahol sikeres teszt-preparációk és mérések után megkezdődött a szövetmintákból az RNS-izolálás. 2007-ben 40 szövetmintából 96 gén mRNS expressziós szintjét határoztuk meg Taqman-Low-Density-Array alkalmazásával. Eredményeinkről országos konferenciákon számoltunk be.

2. Fentiek mellett a mélyfagyasztott mintákból szövettani preparátumokat és metszeteket készítettünk az erb-molekulák (EGFR) és integrinek sejtfelszíni expressziójának és lokalizációjának vizsgálatához két szövettani csoportban: WHO Grade II és Grade IV asztrocitómákban. Ezirányú kutatásaink Dr. Petrás Miklós PhD értekezésének alapját jelentik.

3. A hatékonyság fokozását szolgáló további, kiegészítő kutatási tevékenységeink részeként mélyfagyasztott mintákból gyógyszer-szint-kimutatást végeztünk az intenzív terápia részét képező antibiotikum kezelés effektivitásának monitorizálására. Közleményeinkben jelen OTKA támogatást azonosító számmal szerepeltettük.

4. 2007-ben megkezdtük az RNS-analízis proteinszintű verifikálását. Immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz a genetikai vizsgálatok során jelentős eltérést mutató gének által kódolt molekulák elleni antitesteket vettünk. 40 db szövetmintán 18 protein célzott vizsgálatát tervezzük. Jelenleg 15 mintán 7 féle proteint festettünk meg. Előzetes eredményeink konferenciái előadások részét képezték.

5. A rutinszerűvé vált mélyfagyasztott szövetmintagyűjtés lehetővé tette, hogy megkezdhesük betegeink szérummintáinak gyűjtését is. 2007-től 290 beteg szérumának mélyfagyasztott katalogizált tárolását végeztük el.

### **Elindult kutatási projektek:**

Az OTKA támogatás fő célkitűzése a multidiszciplináris kutatások céljait szolgáló humán szövetgyűjtemény létrehozása és a központi idegrendszer daganatos betegségeivel kapcsolatban minél többirányú kutatás elindítása. Ennek megvalósulásával kívántuk a manuális szakmánk szerény anyagi- és laborkeretéből adódó visszafogott tudományos aktivitását fellendíteni. A 2005-ben indult OTKA támogatásának köszönhetően a következő kutatási tevékenységek indultak el (kizárólag a már előrehaladott fázisban lévő kutatásokat részletezve):

#### *I. Saját kutatások*

1. A daganatos környezeti invázióban résztvevő extracelluláris mátrix komponensek mRNS expressziójának vizsgálata, kiegészítve a releváns molekulák immunhisztokémiai meghatározásával és western-blot vizsgálatával.

Kollaboráló intézetek:

- Debreceni Egyetem, OEC, Biokémiai Intézet, Genomika Labor,
- Debreceni Egyetem, OEC, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet,
- Debreceni Egyetem, OEC, Klinikai Elektrofiziológiai Tanszék
- Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet, Budapest

2. Az intracerebrális daganatok progressziójában szerepet játszó sejtfelszíni receptorok közül az EGFR, az integrin receptorcsalád, és legfontosabb ligandjaik, a kollagének, a fibronectin és a lamininek mRNS expressziójának vizsgálata QRT-PCR-ra, az EGFR amplifikáció vizsgálata FISH-el, az EGFRvIII mutáció immunhisztokémiai kimutatása, az EGFR és az integrin B1 sejtfelszíni expressziójának vizsgálata konfokális mikroszkópiával és a receptorok kolokalizációjának vizsgálata flow-cytometriával.

Kollaboráló Intézetek:

- Debreceni Egyetem, OEC, Biofizikai Intézet
- Debreceni Egyetem, OEC, Biokémiai Intézet, Genomika Labor,

- Debreceni Egyetem, OEC, Közegészségtani Intézet
- Debreceni Egyetem, OEC, Patológiai Intézet
- Debreceni Egyetem, OEC, Onkológiai Tanszék
- Kenézy Gyula Kórház Rendelőintézet Kft, Tüdőgyógyászati Osztály

## II. Kollaborációban végzett kutatások:

1. Debreceni Egyetem, OEC, Biofarmácia Tanszék: A peptid hormon receptorok szerepe a daganatok diagnosztikájában és kezelésében
2. Debreceni Egyetem, OEC, Megelőző Orvostani intézet: EGFR és PTEN analízise FISH-el
3. Debreceni Egyetem, OEC, Neurológiai Klinika: Autoantitestek kimutatása asztrocitómás és oligodendrogliómás betegek szérumában.

## Kutatási eredmények:

1. A daganatos környezeti invázióban résztvevő extracelluláris mátrix komponensek mRNS expressziójának vizsgálata, kiegészítve a releváns molekulák immunhisztokémiai (IHC) meghatározásával és western-blot vizsgálatával. Nyolc szövettanilag különböző minta csoportban összesen 93 gén mRNS expresszióját vizsgáltuk. A 93 gén 3 nagyobb, funkcionálisan összefüggő csoportból állt, melyek értékeit együtt vizsgáltuk a különböző szövettani csoportok összehasonlításakor. Összesen 28 féle összehasonlítást végeztünk el 3 különböző géncsoporton (84 statisztikai elemzés). A 93 gén által kódolt fehérjéből 16-ot IHC vagy western-blottal szintén vizsgáltunk (további kb. 36 csoportok közötti összehasonlítás). Az igen kiterjedt táblázatba foglalható eredményeket funkcionális szempontból az egymással összefüggő célmolekulák szerint csoportosítva foglaltuk össze közlemények formájába, illetve ez a folyamat még javában tart. A mérési és statisztikai adatok részletezése meghaladja a beszámoló kereteit, de az eddig megfogalmazott legfontosabb eredmények a következők:

- A. Különböző eredetű intracerebrális daganatok *extracelluláris mátrixának* összehasonlító elemzése során (glioblasztóma versus tüdő bronchialis adenokarcinóma intracerebrális áttéti daganata) nem-tumoros agyállományhoz és egymáshoz viszonyítva: összesen 22 molekula mutatott szignifikáns mRNS expresszióbeli különbséget, mely molekulák a jövőben anti-invazív terápiához célmolekulaként szolgálhatnak.
- B. Különböző grádusú gliómák hasonló szempontú vizsgálata: grade I, II és glioblasztóma normál agyállományhoz viszonyítva: összesen 11 molekula esetében detektáltunk statisztikailag igazolható eltérést. 7 molekula esetében méréseinket proteinszinten is meg tudtuk erősíteni (western-blot és IHC).

2. Az intracerebrális daganatok progressziójában szerepet játszó *sejtfelszíni receptorok* közül az EGFR, az integrin receptorcsalád, és legfontosabb ligandjaik, a kollagének, a fibronectin és a lamininek mRNS expressziójának vizsgálata QRT-PCR-rel, az EGFR amplifikáció vizsgálata FISH-sel, az EGFRvIII mutáció immunhisztokémiai kimutatása, az EGFR és az integrin B1 sejtfelszíni expressziójának vizsgálata konfokális mikroszkópiával és a receptorok kolokalizációjának vizsgálata flow-cytometriával.

- A. Különböző eredetű intracerebrális daganatok összehasonlító elemzése (glioblasztóma versus tüdő bronchialis adenokarcinóma intracerebrális áttéti daganata nem-tumoros agyállományhoz és egymáshoz viszonyítva) összesen 17 molekula mutatott szignifikáns mRNS expresszióbeli különbséget. FISH-el EGFR amplifikáció, ill. EGFRvIII mutációt tudtunk igazolni elsősorban glioblasztóma mintákon.
- B. Különböző grádusú asztricitómákat vizsgálva 14 molekula mRNS expressziójában találtunk szignifikáns különbséget. Emellett az EGFR és Integrin B 1 ko-lokalizáció igazolódott magasabb grádus esetén, és a túléléssel is összefüggést lehetett igazolni.

### 3. Eddig elkészült mérési eredmények folyamatban lévő elemzései:

A fenti molekulacsoportokat összehasonlítjuk különböző grádusú gliómákon és egyéb daganatokon kívül schwannomák eredményeivel is. Külön érdeklődésre számítnak a különböző eredetű nem-tumoros agyszövetek vizsgálati eredményeinek közlésétől. A benignus tumor – malignus tumor melletti agyszövetek nyilvánvalóan különböznek a nem-tumoros betegekből származó agymintáktól (pl. uncus gyri hippocampi-reszekcióból), és a metasztázis melletti agyszövetet glioblasztóma mellől származó mintákhoz hasonlítva további érdekes eredményekhez juthatunk.

### EREDMÉNYESSÉG:

Kutatási projektünk betegellátás során gyűjtött szövetmintákból kialakított szövetbankra épül. Intraoperative gyorsfagyasztott szövetminták katalogizált mélyfagyasztott, hosszútávú biztonságos tárolása céljából az OTKA támogatás segítségével létrehoztuk a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbankot. A megfelelő számú mintagyűjtéshez és a tényleges vizsgálatok elkezdéséhez kb. két évre volt szükség. Ennek az időtartamnak a kihasználására végeztünk – az eltett mintákon antibiotikumszint meghatározást, mely ugyan nem szerepelt az eredeti célkitűzések között, viszont több nemzetközi publikációt is eredményezett.

A 2006-2007-ben beindult saját kutatások és az ezektől függő kiegészítő kutatások eredményei 2008-ban születtek meg. A publikációk összeállítása jelenleg is folyamatban van és több cikket már közlésre továbbítottunk, de minden eredményünk megjelenéséig feltételezhetően kb. 1-2 évet még várni kell.

Az OTKA támogatásból létrehozott Szövetbank kollaborációs kutatásainak eredményei 2009-ben érkeznek meg, és remélhetően még ebben az évben közlésre is kerülnek.

Az eddigi mérések alapján azonosítottunk 47 olyan molekulát, melyeknek valamilyen módon szerepe volt a környezeti tumoros infiltrációban. Az OTKA támogatás utolsó évében tudtuk megvásárolni az e molekulákra egyedileg készített RNS-kártyát. Az erre alapozott mérések 2009-ben várhatók, eredményük publikálása 2010-re várható.

1. Az antibiotikumszintek meghatározásából PhD fokozatot szerez várhatóan 2009-ben: Dr. Bágyi Kinga, DEOEC, Stomatológia (társ-témavezető: Dr. Klekner Álmos)
2. Az EGFR-integrin meghatározások eredményeiből PhD fokozatot szerez várhatóan 2009-ben: Dr. Petrás Miklós, Miskolci Kórház, Gyermekgyógyászat (társ-témavezető: Dr. Klekner Álmos)

- 3.A glioblasztóma-metasztázis összehasonlító elemzésének eredményeiből PhD fokozatot szerez várhatóan 2010-ben: Dr. Varga Imre, Kenézy Kórház, Tüdőgyógyászati Osztály, Debrecen (témavezető: Dr. Klekner Álmos)
- 4.Levelező PhD képzésben részesülő saját kutatók: Dr. Ruzsithi Péter, DEOEC, Idegsebészeti Klinika
- 5.PhD hallgatók disszertációjához jelentős hozzájárulással szolgálnak közös eredményeink a kollaboráló intézetekkel (3 fő).

Az OTKA támogatásnak köszönhetően létrejött Neuro-onkológiai Laboratórium és Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank jelentős saját kutatási projektet és számos gyümölcsöző kollaborációt indított el. Ennek révén a DEOEC Idegsebészeti Klinika tudományos termelékenységét határozottan megemelte és a számos PhD disszertációhoz való hozzájárulásával idegsebészeti neuro-onkológia témában tudományos iskola megteremtését segítette elő. Mindezért fent sorolt kutatók és PhD aspiránsok a legnagyobb köszönettel tartozunk.

Debrecen, 2009. február 26.

Dr. Klekner Álmos Ph.D.  
egyetemi adjunktus  
vezető kutató