

A korábbi munka folytatásaként agydaganatok szövettana-, kórtana (pathophysiologia) és gyógyszeres kezelésük hatékonyságát befolyásoló tényezők vizsgálatát tűztük célul. Korábbi vizsgálatok értékelése is áthúzódott erre az időszakra, melyek között cerebrális keringészavarok is szerepeltek. A célkitűzések megvalósítása sok, előre nem látott nehézség miatt, komoly akadályokba ütközött, aminek személyi-, szervezeti- és anyagi okai voltak, elkerülhetetlen ezek jelzése. **I.** A pályázat ideje alatt a munkatársak összetételében jelentős változások történtek. Csécsi Prof. úr meghalt, Dr. Németh Tamás végleg Budapestre távozott (Bajcsy Zs. Kórház, Pathologia), Varga Éva (EM Labor, MJEMC) nyugdíjba kényszerült. Dr. Klekner Álmos átmenetileg más megbízást kapott az Idegsebészetben. Új tanszékvezető vette át a DE-OEC Idegsebészetének irányítását. Dr. Aradi János is nyugdíjasként dolgozik. **II.** A laboratóriumok fizikai helyzete változott. A MJEMC az Anatomia Intézetbe került, a Svéd-Magyar Agykutató Laboratóriumot megszüntette az Egyetem, az oda telepített LKB CryoMacroCut (CMC) az Idegklinika tulajdonává vált. NB. A laboratórium létrehozásához, az „óriás” cryostat Karolinska Institute-ból való Debrecenbe szállításához szükséges pályázat elkészítésében aktívan részt vettem, egyes fejezeteit én írtam, ez nem befolyásolta az eseményeket. A ploeditás-mérésekhez szükséges software „mrevlemez-crush” miatt elveszett, pótlása, immár többeszer, folyik, a számítógépet felújítottuk. Külföldi kollaborációim közül az evanstoni laboratóriumot bezárták. A „Mayo Foundation & Clinic”-el nehezítette az együttműködést Prof. Scheithauer súlyos betegsége. **III.** A pályázat támogatása, 2004-ben, Kormánydöntés értelmében, csökkent.

Felmerült, hogy a beszámoló elkészítésére halasztást kérjek. Nem tettem, miután már kértem a kutatás felfüggesztését, mikor a Ross University, Dept. Pathology-n (Commonwealth of Dominica) vállaltam vendégprofesszori megbízást. Ez a felsorolás felvetheti, hogy külső tényezőkben keresem a hiányok magyarázatát, de mindez így zajlott. Előnyös változások is voltak: a B.-A.-Z. Megyei Kórház Idegsebészetével kialakított kapcsolat, a PET Centrum Campusra költözése, Trón Lajos Professzorral beadott sikeres pályázatok, melyek révén most már egy új CMC [Leica, 2005.] áll rendelkezésre. Új radiológiai kollaboráció a tavaly őszi óta Debrecenben dolgozó Berényi Ervin doktorral, mely egészen új távlatokat nyitott.

**A. Tőlem függetlenül „in statu nascendi” tevékenység:** A korábbi beszámolómban felsorolt, közlendő kéziratok mindegyikét visszaküldtem az USA-ba. Önállóan nem publikálhatom őket, a kinti aktivitást és preferenciákat nem tudom befolyásolni, remélem, hogy sorra kerülnek. (L. Előző évi jelentés).

**B. Folyamatban lévő munkák:** Jelenleg is dolgozunk az ECM (extracellularis matrix) vizsgálatán. Németh Tamás telefonértesítése (03. 06.) szerint primaer és áttéti daganatok vascularisációját morphotriával méri, az adatok statisztikai feldolgozása hiányzik. Ezeket a mintákat párhuzamosan vizsgáljuk az aquaporinok expresszióját, ill. az ún. lymphogen endothelsejt-jelleg megjelenését (D2-40 monoclonalis antitest, BioMarker/Signet Inc. USA). Mindehhez az antitesteket megvettük, a blokkokat összegyűjtöttük. Az anyaggyűjtés azzal egészült ki, hogy Bognár tanár úr irányításával, Klekner dr. közvetlen segítségével frissen fagyasztott daganatmintákból tumor-bank létesül, jelentősen emelkedett a gyermekkori tumorok száma. Az evanstoni labor bezárása miatt a *BAL* (brain around lesion) vizsgálatokat itt kell megvalósítanunk: erre reményt ad az új PET Centrum, az ott megkezdett, experimentális daganatos kísérletek, az új CMC berendezés, és az időközben már mérésekre alkalmassá vált mini-PET.

### **C. Eredmények:**

*Quantitatív autoradiographiás* (QAR) megfigyeléseink szerint a daganatokba juttatható gyógyszerek mennyisége alapvetően függ a tumorok szöveti sajátosságaitól, az intratumoralis szöveti heterogenitás [cellularitás, necrosis, vascularisatio, stb.] folyamánként fennálló, széles határértékek között ingadozó interstitialis hydrostaticus nyomástól (IFP, interstitial fluid pressure). A gyógyszerek hatékonyságának megítélésakor, *in vitro* és *in vivo*, figyelembe kell venni a *gyógyszerkoncentráció – expozíciós idő szorzat* értékét is. Az **1. ábrán** két, subcutan implantált, RG-2 típusú anaplasticus astrocytoma szövettani (*felül*) és QAR képük (*alul*) látszik 2 óras, 2  $\mu\text{L}/\text{min}$   $^{14}\text{C}$ -formalin infúzió után. A bejutott tracer (toxin) koncentráció eloszlása foltos, necrosisokban és a daganat körüli térben (*BAL*) magasabb. A daganatokban sok helyen maradnak életképes sejtek, melyeket nem ért el az infundált formalin. Az intratumoralis nyomás, direkt mérések alapján, elérheti az 50 Hgmm-et, ami magyarázza a heterogén gyógyszereloszlást, de más megítélés alá rendeli az eddig meglehetősen szabadon definiált daganaton belüli *permeabilitás* kérdését is. A daganat körül zajló folyamatokban nem csak az influx, hanem a már bejutott anyag elfolyása (diffúzió + konvektív flow = efflux) is alapvető jelentőségű. Mindezek az oedema-képződés (albumin filtratio + passzív vízmozgás) mechanizmusának megértésében is alapvetők (2. ábra).

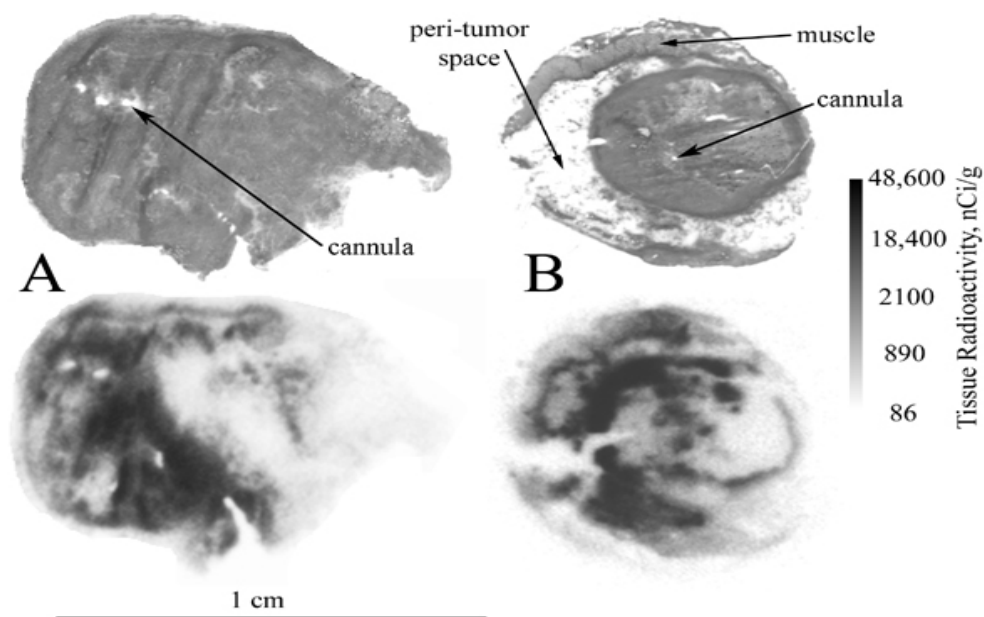
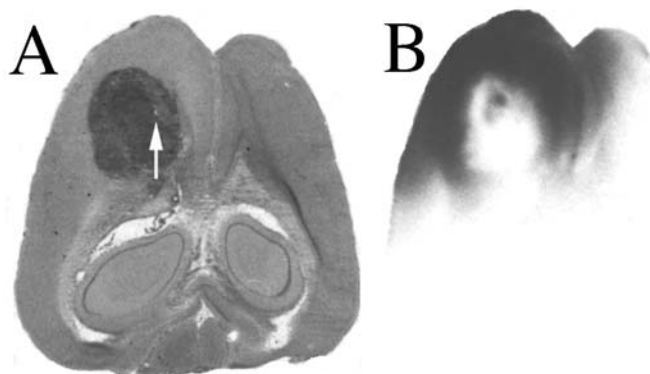


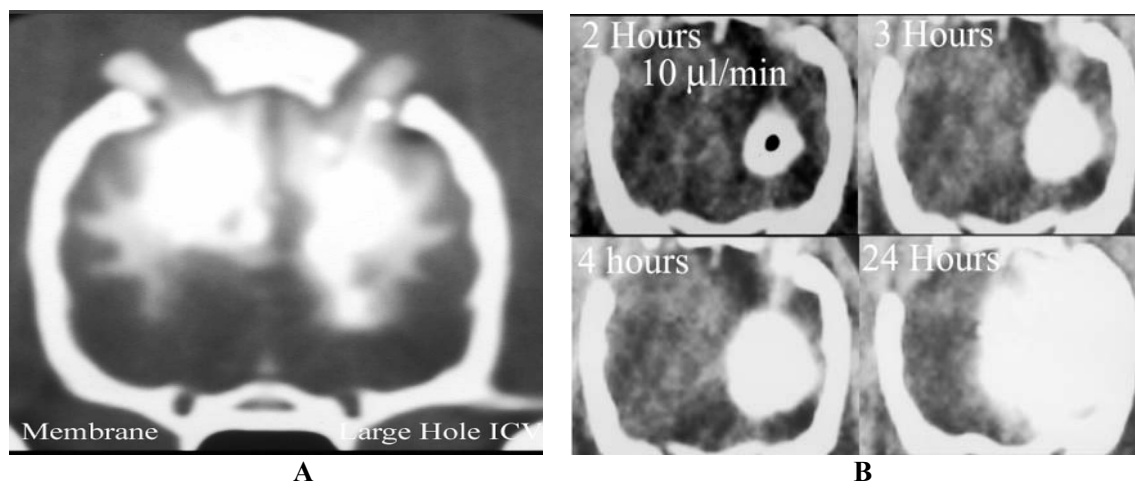
Figure 4

1. ábra



2. ábra

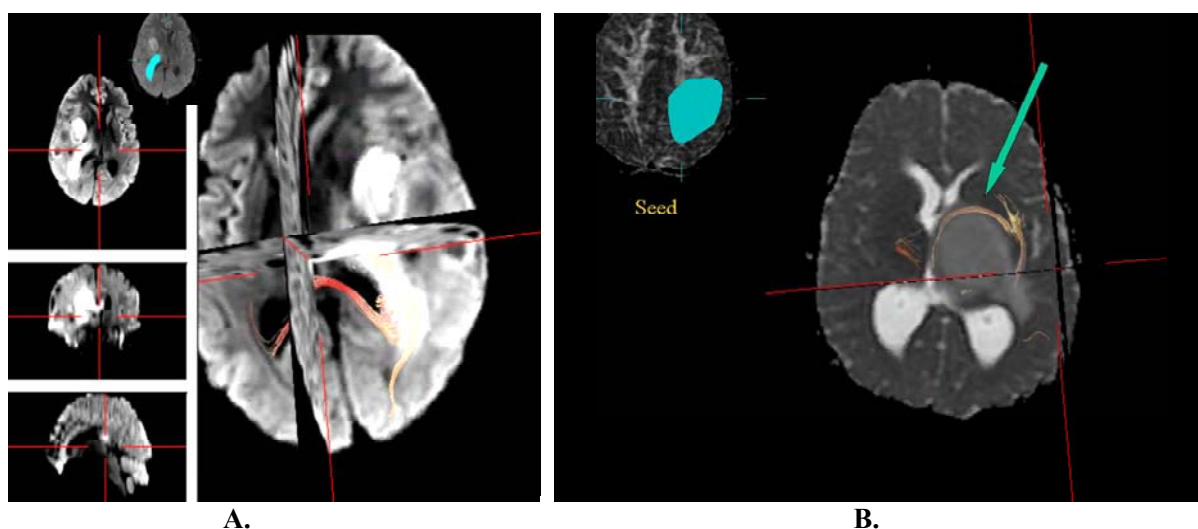
Horizontális metszetben a sötétén kirajzolódó daganat (A) nyíltól balra eső részében necrosis van, környezetében oedema. A permeabilitás ( $K_i$  transfer konstans) meghatározására alkalmas AIB ( $\alpha$ -aminoisobutyrsav) tracer eloszlása kirajzolja a vér-tumor gát (BTB) által „védett” daganatot, a necrosisban károsodott érfalakon átjut az AIB, hasonlóan a *BAL*-ban károsodott erekhez (B). Az agy egyéb területeiben nem növekedett a  $K_i$ . Kísérletes vizsgálataink igazolták (3. ábra), hogy a különböző radiographicus tracers (Conray®) kísérleti állatokban követik a fehérállomány pályarendszereit, ill. ezek mentén terjed (convective flow) az albumin és víz (oedema). Hasonlóan heterogén az eloszlás, ha változó nagyságú kanülön keresztül juttatunk radio-opaque tracert agyszövetbe. Az alábbi CT felvételen (A) kutya agy coronalis felvételét látjuk (48 h). A B képen rövidebb ideig tartó CED értékei láthatók:



3. ábra

Ezek a megfigyelések arra is felhívják a figyelmet, hogy az *in vitro* chemosensitivitas vizsgálatokban elterjedten használt 48 órás idő helyett lényegesen rövidebb időket is figyelembe kellene venni, a megfelelő *conc. x idő* szorzatok (=AUC) megválasztásakor. Lényeges megállapítás, hogy subcutan növekvő daganatok felhasználhatók a CED vizsgálatok modellezéséhez, hiszen ezek a daganatok megőrzik astrocytaer jellegüket, illetve, hasonló daganatok agyba implantálva, a gyógyszerhatás kialakulása előtt megölnék a gazdaállatot az intracranialis nyomás fokozódása miatt. (Ali et. al, Neuro-Oncology, 2006. in print). A közlésre elkészített ún. tripla jelöléssel készült vizsgálati anyagból látható volt, hogy a heterogenitás a fentiekén kívül a proliferatív aktivitásban is megnyilvánul (L. Korábbi jelentésem).

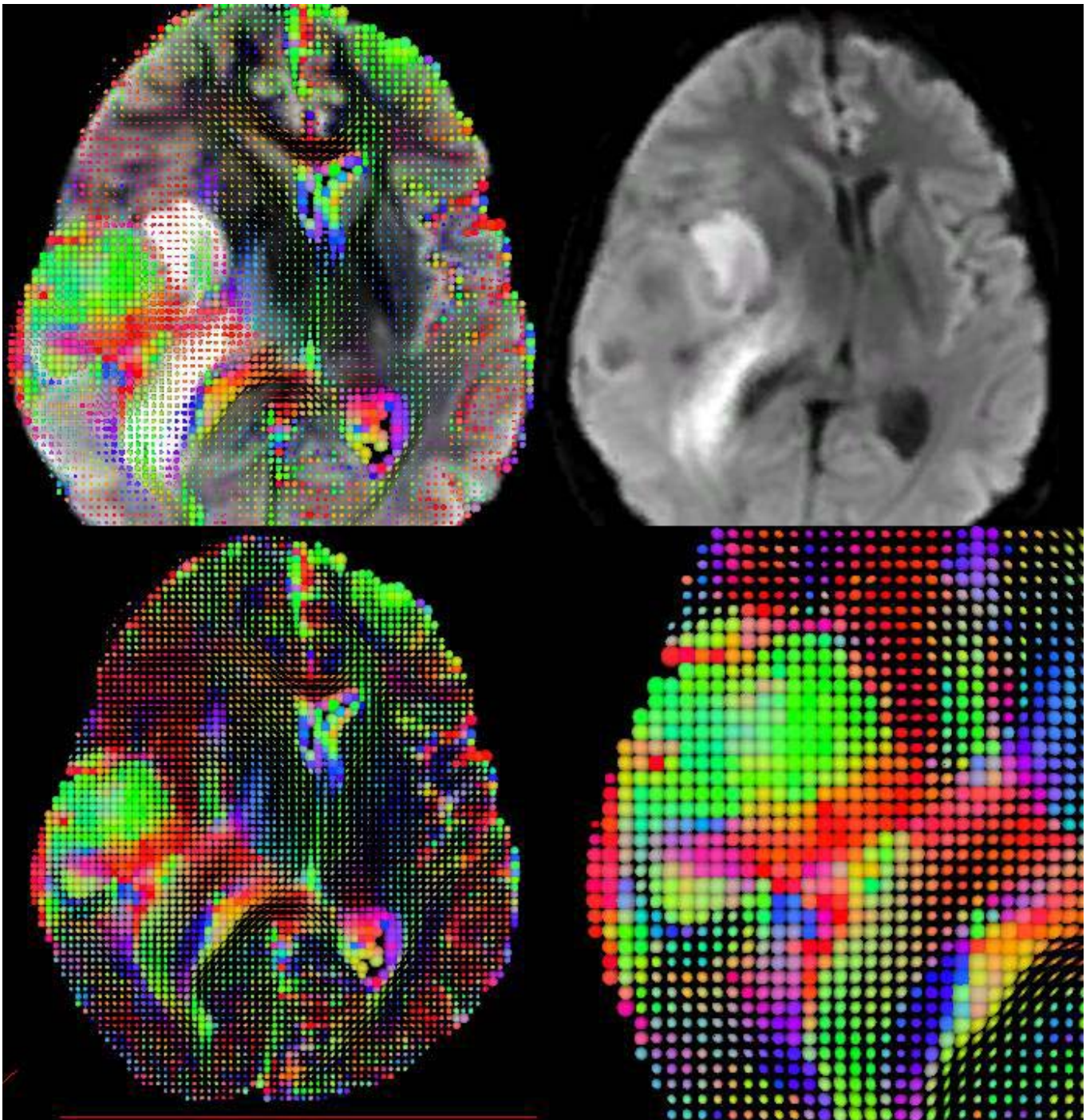
A fiber-tracking módszert két nemrég operált beteg képein demonstrálom, akiknek szövettani anyagát is feldolgoztam.



4. ábra

Az **A** kép bal oldalán látszik a 8 éve fennálló, szövetileg oligodendrogliomának bizonyult daganat, jobb oldalán, az „átfordított” képen, a daganatban futó pályarendszerek, prominensen a *radiatio optika*. A **B** kép egy 4 éves gyermek pilocytás astrocytomája, mely maga előtt tolja a *tractus corticospinalist*, ennek a képnek birtokában sikerrel operált gyermek. A részletek meghaladják a beszámoló kereteit, arra szeretnék utalni, hogy ezzel a módszerrel, ill. proton-vizsgálatokkal humán anyagban a víz mozgását, az oedema terjedését, a convective flow-t is detektálni fogjuk, daganatokban és *BAL*-ban. Itt kell említenem a diffúziós tenzor-MRI lehetőségeit (5. ábra). Szerencsére a Debrecenben elérhető MR műszerpark lehetővé teszi olyan képek felvételét (megfelelő S : N [signal:noise] arány, stb.), melyek ezzel a speciális eljárással elemezhetők. Így a magas igénnyel készült diffúziós MR képek konvertálhatók tenzor-image formátumba, ami az eddigiekhez képest egészen más jellegű információkat

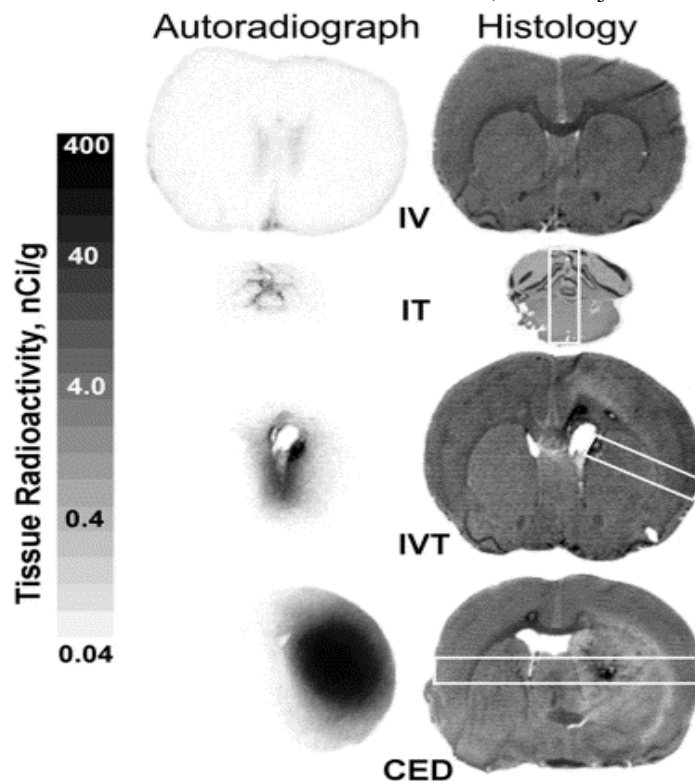
adhat a szöveti proton-mozgásról, pályák (rendezett struktúrák) elhelyezkedéséről. A következő ábrán a 4. A. képen bemutatott daganat (34. éves nő oligodendroglioma) diffúziós tenzor képe látható.



5. ábra

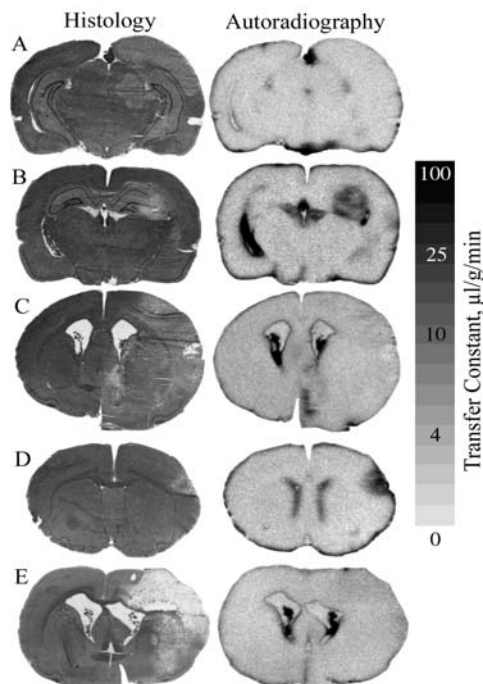
A módszer részletezése meghaladja a jelen kereteket, de előrevetíti, hogy a további daganatkutatás milyen eszköztárral gazdagodott: BAL, oedema, stb. kvantitatív, 3D analízise, PET- és CMC képekkel fúzió, stb. A színek különböző eredetű pályarendszereket (corticospinalis, temporo-ocipito-occipito-pontine, radiatio optica) jelölnek, ill. 3 dimenzióban jelenítenek meg (az ábra egy „mozzanat” a sorozatból). A zöld-, vörös- és kék színek egymásra vetülése jelzi, hogy az egyes pályák követése más-más ROI-ból (region of interest) „indítható”.

A **6. ábra** az intravénás-, intrathecalis-, intraventricularis gyógyszerinfúziót és a CED alkalmazásakor kialakuló szöveti eloszlást jellemzi. Ennek részleteire itt nem térhetek ki, korábbi jelentésemben szerepelt.



**6. ábra**

Kísérletes emboliás QAR és permeabilitás megfigyeléseinket a **6. ábra** foglalja össze. Az eredményeket korábban leírtam, ma is talány, hogy miért nem láthatók kifejezettebb BBB károsodások. Az emboliás stroke után közvetlenül az AIB-vel mérhető  $K_i$  értéke nem változott, utána minden időpontban nőtt, de ennek a mértéke mindvégig  $3\mu\text{L/g/min}$  alatt maradt.

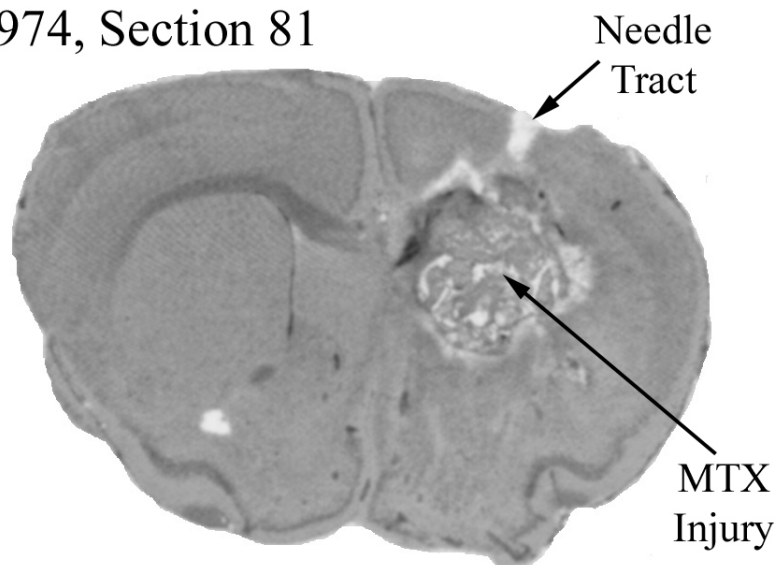


**7. ábra**

A: 0; B: 2; C: 4; D: 7; E: 14 nappal az embolisatio után kialakult változások.

Korábbi jelentésemben leírtam azokat a vizsgálatokat, melyeket a CED kapcsán fellépő neurotoxicitás vizsgálatok során tettünk (a kísérleti jegyzőkönyveket is mellékeltem, az *on line* rendszerben nem látom nyomát). Ha szükséges, újra elküldöm. Sajnos ez a sorozat is a kintiekre vár, közölhető lenne. Alább látható 1 példa:

ME974, Section 81



MTX Dose = 0.025 mg/ml x 7 Days

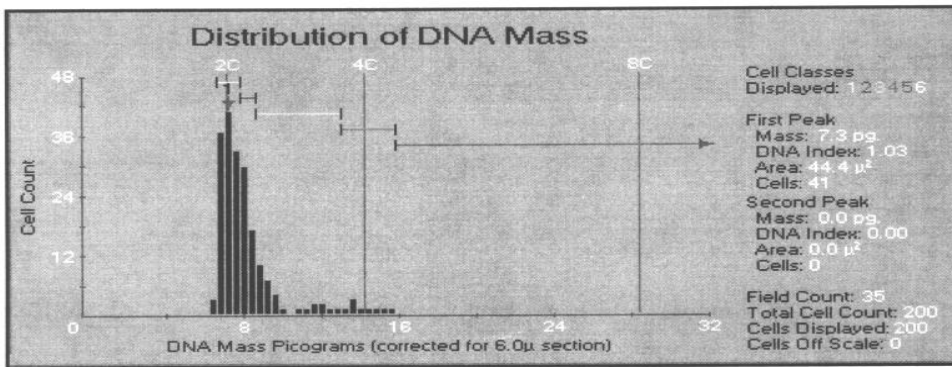
8. ábra

Szerencsésen alakultak a PET-kollaborációk (a Centrum új épületének létrehozása a Campuson, állatkísérletes laborral). A Leica legújabb CMC készülékét elnyerő pályázat írásában aktívan részt vettem. A műszert beállították, 10 nap múlva várjuk Dr. Alain Schweitzer-t Bázélből, akinek technikai segítségét reméljük ahhoz, hogy humán és kísérletes minták QAR (*phosphor imager*) és szövettani metszeteit párhuzamosan vizsgálhassuk. Májusban én utazom Bázélbe (ehhez a PET Centrum ad anyagi segítséget, amit e helyen is hálásan köszönök). Korábbi PET vizsgálatainkat előző jelentésemben összefoglaltam, a cikkeket utólag *in extenso* elküldtem. Az dogmaként kezelt elképzelés, hogy a magasabb grádus mindig magas FDG- és alacsony methionin-dúsulással jár, nem szükségszerűen igaz. Fokozott FDG felvétel nem feltétlenül jár morfológiailag is igazolható progresszióval. Alacsony grádusú daganatokban is célszerű a kettős PET vizsgálat. A methionin a daganat határának meghatározásához pontosabb információt ad, míg az FDG segíthet a heterogén PET kép értelmezéséhez és a biopsia vételének kijelöléséhez. Temporalis daganatoktól szenvedőkben az ipsilateralis occipitomedialis cortex relatíve hypometabolicusnak bizonyult. Gazdag anyagban vetettük össze a subarachnoidealis vérzésben szenvedők transcranialis Doppler eredményeit PET megfigyelésekkel. Az operált és nem operált oldalak és az egészséges kontrollok összehasonlítása szerint még az enyhe és közepesen súlyos, neurológiai góctünetektől mentes, vasospasmus esetekben is jellemző a diffúze emelkedett FDG felvétel. Feltevéseink szerint ezért részben az autoregulatio zavara felelős.

Folytattam Biokémiai és Molekularis Biológiai Intézettel korábban megkezdett munkát. A korábban daganatokon (humán biopsiás mintákon) nyert tapasztalatainkról már beszámoltam. E mellett sikeres kísérlet történt új típusú chimera oligonucleotidok szintézisére antisense szekvenenciával. A következő lépés ezeknek a telomerase-gátlóknak pozitron emittáló izotóppal jelölése (PET Centrum, Radiokémia), majd a teljes test autoradiographiás-, ill. intracerebrális, valamint subcutan kísérletes tumorokban tesztelése. Ehhez szükséges a CMC már jelzett módon történő alkalmazása. Aradi tanár úrral a munkát folytatjuk, a telomerase vizsgálatok mellett kiterjesztjük autophagia-indukció elektronmikroszkópos tanulmányozására. Ez kiegészíti a korábban Szondy Zsuzsa Professzornővel végzett apoptosis tanulmányokat, melyek eredményei cikkek formájában megjelentek.

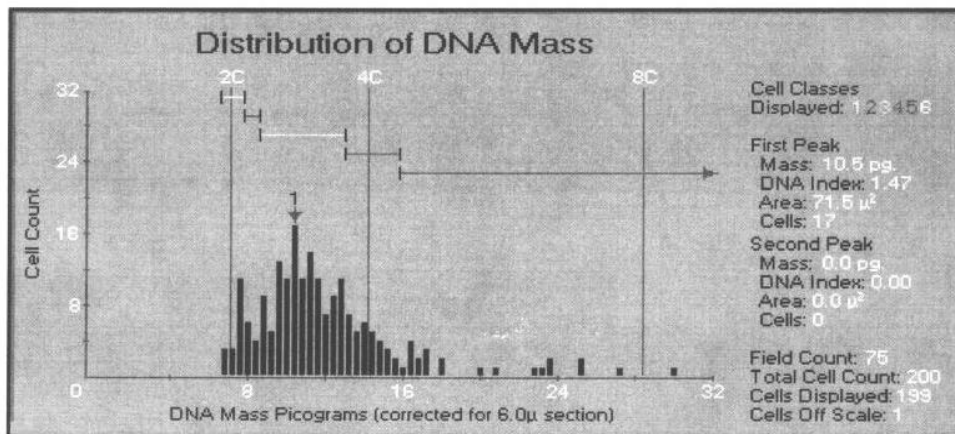
Scheithauer professzor felépülése (2005.) óta a különböző WHO gradusú meningeoma csoportok ploiditás analízisét bemutató cikket a *Clinical Neuropathology* Szerkesztőségébe nyújtottuk be. A legfontosabb eredmények demonstrálására a közleményből néhány demonstratív ábrát mellékelek:

Figure 2



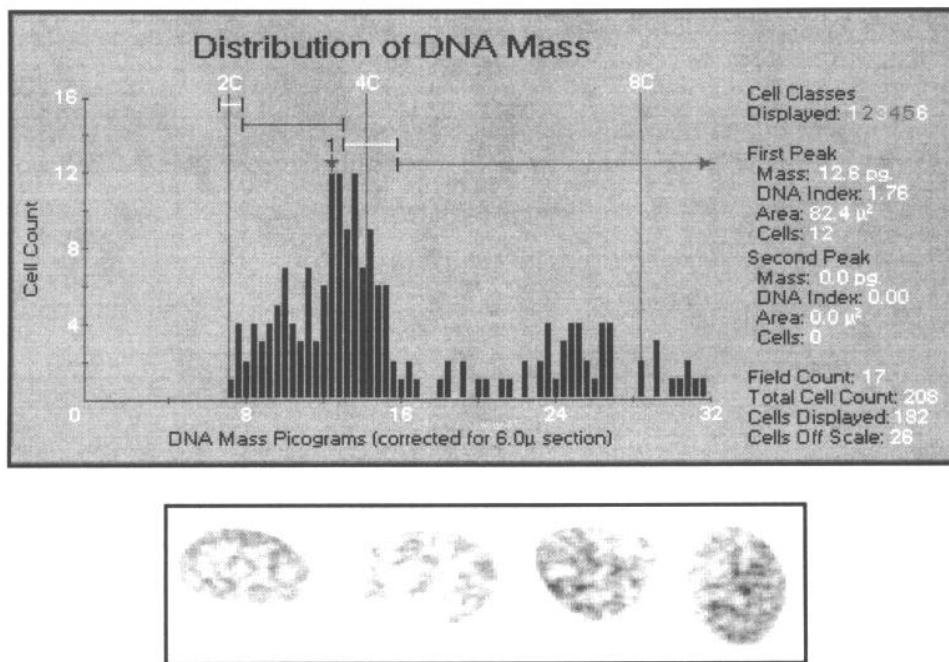
Typical meningioma histogram and Feulgen stained, diploid nuclei

Figure 3



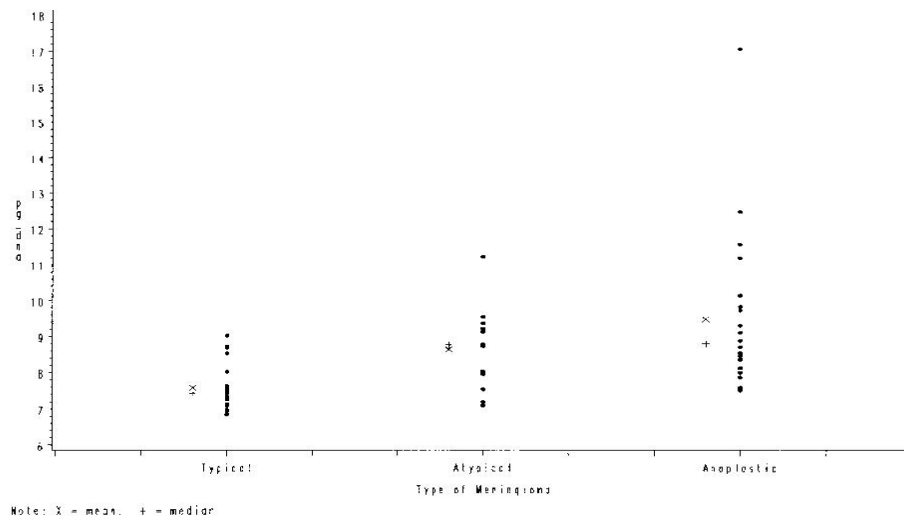
Atypical meningioma histogram and Feulgen stained, non-diploid nuclei

Figure 4



Anaplastic meningioma histogram and Feulgen stained, non-diploid nuclei

Figure 5



Comparison of DNA mass among the three meningioma subtypes



A magmorphometria kvantitatív adatait az alábbi táblázat tartalmazza:

Feature	Typical	Atypical	Anaplastic	P-value
Diploid	9 (42.9)	3 (21.4)	4 (18.2)	0.145
Tetraploid	1 (4.8)	3 (21.4)	7 (31.8)	
Aneuploid	11 (52.4)	8 (57.1)	11 (50.0)	
DNA Ploidy				
Diploid	9 (42.9)	3 (21.4)	4 (18.2)	0.162
Non-Diploid	12 (57.1)	11 (78.6)	18 (81.8)	
		<b>Mean (SD)</b>		
		<b>Range</b>		
DNA Mass	7.60 (0.64)	8.65 (1.11)	9.48 (2.16)	<0.001
	6.85 – 9.03	7.10 – 11.23	7.51 – 17.05	
Area	59.8 (12.0)	72.4 (15.5)	70.4 (22.0)	0.061
	34.3 – 84.1	41.0 – 96.8	42.0 – 130.6	
Perimeter	30.3 (3.6)	33.2 (4.0)	32.8 (5.4)	0.105
	22.6 – 37.0	24.6 – 38.6	25.9 – 46.0	
Shape	14.53 (0.55)	14.54 (0.42)	14.64 (0.61)	0.812
	13.81 – 16.08	13.77 – 15.21	13.76 – 15.89	
Density	0.14 (0.03)	0.13 (0.03)	0.15 (0.04)	0.377
	0.09 – 0.22	0.09 – 0.21	0.08 – 0.22	
Max Diameter	11.19 (1.41)	12.10 (1.45)	11.81 (1.90)	0.236
	8.47 – 13.90	9.09 – 13.79	9.45 – 15.89	
Min Diameter	7.28 (0.67)	8.12 (0.93)	8.00 (1.21)	0.020
	5.61 – 8.50	6.10 – 10.09	6.07 – 10.99	
Elongation	1.56 (0.13)	1.51 (0.11)	1.50 (0.13)	0.148
	1.35 – 1.86	1.33 – 1.73	1.34 – 1.86	

A különböző gradusú (WHO I-IV.) astrocytomák analizését jelentős késéssel, de megkezdjük, remélhetően a meningeomák egyetlen szignifikánsan különböző értékéhez képest (DNS tömeg; ábra) több, statisztikailag eltérő változót találunk. A meningeoma elemzés *eredménye negatív*: nem sikerült olyan változót találni, melynek egyszerű, fénymikroszkópos megítélése pontosíthatná az atypusos és anaplasticus daganatok elkülönítését.

A felsorolt előnytelen változások miatt a célkitűzések folyamatos adaptációjára volt szükség. Ez pozitív eredményekkel is járt. Itt elsősorban azt kell említenem, hogy megkezdjük a humán oligodendrogliomák és kevert daganatok chromosomal elemzését, az ehhez szükséges módszert beállítottuk. A FISH próbák (1p19q locus specifikus probe-ok) beszerzését a Pathológiai Intézet fedezte, de a módszer alkalmazását a megelőző adatbank összeállítás tette lehetővé, amit az OTKA pályázat segített. Ezekre a szövettani leletekre alapozva készül az Idegsebészettel és Radiológiával közös, digitalizált adatbázis. Utóbbinak a gyógyító és oktató munkában egyaránt van jelentősége. Az orvosképzésen túl (graduális- és postgraduális képzés), *az Orvosi Laboratóriumi és Képző Diagnosticszaki Analitikus Alapszak* (BSc) új szakirányának, a „Képző Diagnosticszaki Analitika” szakiránynak szervezésekor Berényi Ervin ötlete alapján, közösen terveztük a szakon belül kötelezően felveendő neurologia-, neuropathologia- és neuroradiologia komplex kurzus tantervét. Ezt benyújtottuk, hasonló átfogó szaktantárgyat az ÁOK hallgatói sem tanulnak, így szervezése példaértékű. A diagnosztikus célból készült kontrasztanyag-mentes, „kontrasztos” CT és MRI, diffúzió súlyozott MR és tenzor/fiber tracking képek, a PET sorozatok közös adattárba kerülnek az egy személy (pályázó) által makro- és mikroszkóposan részletesen leírt szövettani leletekkel. A műtét után azonnal a Pathológiára jutnak a daganatminták, ezekről digitalizált makro- és szövettani képek készülnek. Célunk az, hogy a tervezetten történt mintavétel morphologiai adatai beépüljenek a képző Diagnosticszaki Analitika által szolgáltatott bázisba. Az utóbbi bármikor, a csoportot alkotó idegsebészek, neuroradiológusok, pathologus, onkológus és sugárterápauta kollégák számára hozzáférhetők és ezek alapján zajlanak a rendszeres, közös megbeszélések. A további cél, hogy az esetleg műtétet követően elhunyt betegek agya post mortem CMC autoradiographiával feldolgozásra kerüljön.

Összefoglalva:

A célkitűzéseket nem sikerült maradéktalanul teljesíteni, de a nagyon előnytelen változások ellenére több területen hasznosítható eredmények születtek. A pályázat lezárultával a munka nem ér véget, a pályázatnak köszönhetően sikerült olyan antitesteket vásárolni, melyek felhasználása (aquaporinok, stb.) most kezdődött. Németh dr. Pesten is folytatja PhD tézisének elkészítését. A PET és Radiológiai Intézetekkel kialakított és fejlesztett együttműködéstől nagyon sok eredmény várható. Bízom benne, hogy Scheithauer Professzorral sikerül az

astrocytaer daganatok nuclearis morphometriai analizisének eredményét végre közleményként elfogadtatni, számos esetközlést befejezni. Reménykedem, hogy az evanstoni publikációk is lezárulnak. Szükség esetén, a következő munkafázis leteltével (ezt ennek az évnek végére becsülöm), kiegészítő jelentést írok.

Még azt szeretném megjegyezni, hogy a pályázati időszak alatt elkerülhetetlen volt kitérők tétele. Ezeknek eredménye sokszor valamilyen kongresszusi előadás, metszetszeminárium tartása, néha egy-egy rövid közlemény volt. A nemzetközi kongresszusok esetében nagyon sokszor nem volt lehetőség az OTKA támogatás feltüntetésére. Ezek a munkák mindig jártak olyan szakmai haszonnal, melyek hosszú távon a neuro-onkológiai tevékenységemet is gazdagították. Ugyanez igaz a Biokémiai Intézettel közös kísérletekre is. Pathologusként, a jövőben sem mondhatok le ilyen kollaborációkról.

Mindezek előrebocsátásával ezúton is szeretném megköszönni az OTKA megértését és támogatását. Tisztelettel kérem beszámolóm elfogadását.

Debrecen. 2006. február 28.

Dr. Molnár Péter  
Egyetemi tanár