

PREDIKTÍV MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI VIZSGÁLATOK MAGAS GRADUSÚ, GLIALIS EREDETŰ DAGANATOK DIAGNOSZTIKÁJÁBAN

Molnár Péter, Méhes Gábor

Debreceni Egyetem OEC Patológiai Intézete, Debrecen

A gliális eredetű daganatok hatékony kezeléséhez egyre gyakrabban szükséges a diagnosztikus célból vett daganatszövet molekuláris patológiai vizsgálata. A jelen közleményben a szerzők irodalmi adatokra támaszkodva foglalják össze a malignus gliális daganatok biológiai sajátosságait és az innen levezethető prediktív biológiai markerek jelentőségét. Napjainkra három területen történt jelentősebb előrelépés. (i) A glioblastoma kezelésében igen hatásosnak bizonyult temozolomide (Temodal) hatékonysága az O⁶-metilguanin-DNS-metiltransferáz (MGMT) gén promoterének metilációjától függ. Az MGMT metilációjának meghatározása a daganatszövetből metiláció-specifikus PCR (MSP) segítségével a kezelés sikerét vetíti előre. (ii) Az EGFR-alapú célzott terápiák hatása az EGF-receptor expressziójának ill. a gén amplifikációjának függvénye. Az EGFR-expresszió arányos a gén amplifikációjával és korrelál a tumorok gradusával. Az amplifikáció mértéke szabja meg a mutáns receptorfehérje (EGFRvIII) megjelenését is. Az EGFR genetikai hátterének tisztázására FISH-vizsgálat végzése ajánlható. (iii) Elsősorban az oligodendrogliális daganatok kezelésénél érdekes az 1p és a 19q kromoszomális régiók vizsgálata. A kombinált, ún. PCV terápia azokban a daganatokban hatásos, melyekben 1p- és 19q-deléció észlelhető; a meghatározó a rövid kar vesztese. A bizonyíthatóan hiteles prediktív markerek meghatározása – a betegek érdekében csakúgy, mint a kezelés racionális finanszírozása szempontjából – egyaránt elengedhetetlennek tűnik. A módszerek anyag- és forrásigénye miatt javasolható, hogy a prediktív neuro-onkológiai diagnosztika patológiai centrumokba összpontosítva történjék. A szerzők a rutin szövettani diagnosztika elemeinek (morfológia, fehérjeexpresszió, génszintű vizsgálatok) egymásra épülését propagálják. Magyar Onkológia 53: 33–38, 2009

Kulcsszavak: astrocytoma, oligodendroglioma, prediktív markerek, MGMT-metiláció, EGFR-genetika, 1p19q-deléció

The authors review the current literature on the major biological advances in the molecular testing of brain tumors. The incorporation of several new aspects required for proper disease management into the classical pathology service is in the focus of the review. One of the important achievements of the last years in neuro-oncology is the observation that the promoter methylation status of the MGMT (O⁶-methylguanine DNA methyltransferase) gene determines the treatment efficacy of temozolomide (Temodal) in glioblastomas. This can best be evaluated by methylation-specific PCR (MSP) using tumor tissue obtained for histological evaluation. Further to this, up-regulation of EGFR signaling through gene amplification has been recognized and targeted by anti-EGFR approaches in high-grade gliomas. The EGFRvIII mutant receptor is practically unique to glioma cells hence analysis of EGFR seems to be justifiably demanded either by oncologists or patients. Immunohistochemistry (IHC) can easily be included in routine laboratory workflow. In addition to this FISH analysis can be performed for the assessment of EGFR gene copy numbers at cellular level. Studying the EGFR status at a genetic and simultaneously at the protein expression level seems to be a valid approach for making treatment decision. Similarly complex and even less clear biological background characterizes the behavior of tumors with oligodendroglial differentiation. The deletion of the chromosomal regions 1p and 19q was found to be associated with favorable outcome and good response to the PCV treatment protocol. Therapeutic decisions are therefore also enabled on the basis of the 1p/19q status. Concurrent temozolomide/radiation therapy is often indicated on the basis of 1p/19q testing. The 1p/19q status can be assessed by FISH or, less frequently, by aCGH or LOH assay. Based on the in-depth overview of the literature the authors highly recommend the adaptation of molecular glioma testing that most efficiently could be done in centralized neuropathology laboratories. This approach would comply with the increasing need for personalized (“tailored”) therapy while best satisfying cost/benefit issues. Molnár P, Méhes G. Predictive molecular pathological testing in the diagnosis of high-grade tumors of glial origin. Hungarian Oncology 53: 33–38, 2009

Keywords: astrocytoma, GBM, oligodendroglioma, predictive, molecular markers, MGMT, EGFR, 1p19q

Közlésre érkezett:
2008. december 11.

Elfogadva:
2008. február 9.

Levelezési cím:
Dr. Molnár Péter
Debreceni Egyetem OEC
Patológiai Intézete
4032 Debrecen
Nagyterdei krt. 98.
Tel./Fax: (06-52) 417-063
E-mail: molnarp@dote.hu

BEVEZETÉS

A daganatok kialakulására vonatkozó kérdéseinket, a tumorok osztályozásának szempontjait, valamint kezelésük irányelveit egyre inkább celluláris és molekuláris szinten próbáljuk meghatározni. Ez magyarázza az onkológiai diagnosztikában tapasztalható jelentős szemléletváltozást is. A betegek szövetszövetmintáinak patológiai feldolgozásakor egyre kevésbé elegendő, hogy egy daganat jó- vagy rosszindulatú jellegét igazoló morfológiai kritériumokat keressük. A klasszikus jelek, mint pl. a differenciáció mértéke, az anaplasia foka, a lokális invázió kiterjedtsége, a szövetszöveti necrosis mértéke, ill. az oszlási gyakoriság jól tükrözik az elváltozások jellegét és dinamikáját. Ezek a hisztopatológiai jellemzők többnyire viszonylag könnyen és gyorsan meghatározhatók, a szövetszövetmintákból ugyanakkor molekuláris szintű adatok is nyerhetők. Azokat a speciális eltéréseket, melyek egyértelműen hatással bírnak a kórlefozásra és így klinikailag is relevánsak, biológiai markereknek nevezzük. Utóbbiak száma egy-egy daganattípus esetében viszonylag alacsony, bár felderítésük és jellemzőik meghatározása napjaink onkológiai kutatásainak központi, kiemelt területét jelentik. Függetlenül attól, hogy egyedi fehérjékről, antigénekről, genetikai-, epigenetikai- vagy proteomikus mintázatokról („profilok”-ról) van-e szó, fontos szerepük lehet a kórkép felismerésében (diagnosztikus markerek), ill. a várható kórlefozás megítélésében (prognosztikai markerek). Mindezen túl egyre nagyobb jelentőséget kapnak azok a paraméterek, melyek az újabb gyógyszeres és kiegészítő (ún. adjuváns) kezelések várható hatásának megítélésében segítenek (prediktív markerek).

A biológiai markereket egyelőre a hagyományos onkopathológiai eljárások kiegészítőiként vizsgálják, az adatok többnyire csak a standard feldolgozás (klasszikus kórszövettan, immunhisztokémia) segítségével felállított szövetszöveti diagnózis és osztályozás (stádium- és gradusmeghatározás) ismeretében értelmezhetők. Az egységes alapelvek hiányában a különböző helyekről származó megfigyelések (USA, Európa, Ázsia) összehasonlítása is lehetséges. Ehhez segítséget nyújt a WHO szempontrendszer is, mely a szakirodalom legújabb eredményeit folyamatosan ülteti át a szövetszöveti diagnosztikába is (ún. „Kék könyvek”). A biológiai markerek elterjedése nem képzelhető el preklinikai vizsgálatok, valamint a megfigyelések, feltevések retrospektív hitelesítése (validáció) nélkül, amit csakis az egységes és részletes szövetszöveti feldolgozás biztosíthat (9, 42). Az egyénre szabott kezelést elősegítő prediktív markerek némelyikének alkalmazására gyorsan és nagyon határozottan jelentkeztek a klinikusok, betegek, és nem utolsósorban a gyógyszergyárak által támogatott igények (11, 15, 19, 23, 28, 41, 42).

Az alábbiakban arra teszünk kísérletet, hogy irodalmi adatokra támaszkodva bemutassuk a malignus

(magas gradusú) gliomák (glioblastoma multiforme¹ [GBM], malignus oligodendroglioma [ODG] és oligoastrocytoma [OAC]) kialakulásának és biológiai progressziójának fontosabb lépéseit. Targyaljuk az ezek háttérében álló genetikai és funkcionális eseményeket, majd ezek tükrében megkíséreljük a jelenleg ismert diagnosztikus, prognosztikus és prediktív markerek kérdéseit értelmezni. Ennek tükrében egy a napi diagnosztikában alkalmazható diagnosztikus algoritmus megfogalmazására is kísérletet teszünk.

A MALIGNUS GLIOMÁK BIOLÓGIAI SAJÁTOSSÁGAI

A gliális daganatok sejtes eredete pontosan még ma sem tisztázott (22). Korábban úgy tartották, hogy az astrocytaer daganatok astrocytákból, az oligodendrogliomák oligodendrocytákból fejlődnek. Jelen ismereteink ezt a felosztást nem támogatják (21). Úgy gondoljuk, hogy a daganatok fenntartásáért felelős tumoros sejtek (tumorzósejtek, „TICs”) vagy neurális őssejtekből, vagy már részlegesen elkötelezett gliális progenitorsejtekből származnak. Ezekből astrocytaer-, oligodendrogliális- vagy kevert (OAC) fenotípusú daganatok alakulnak ki. A fenotípus a tumorigenezis során aktiválódó molekuláris patomechanizmus(ok) és a mikrokörnyezetből származó hatások függvénye. A kóros molekuláris/genetikai események ismert példája a TP53-mutáció, más esetben az 1p és/vagy 19q kromoszomális régiók delécioja (21). Az agyban előforduló normális őssejtet a legkorábbi fejlődési stádiumra utaló két fehérje, a CD133 és nestin expressziója jellemzi. Az őssejtet a körülöttük lévő differenciált alakok „bölcsője” (niche) övezi és tartja nyugalmi („tétlen = quiescent”) állapotban. A tumoros sejtek kialakulásakor megszűnik ennek a „bölcsőnek” a protektív hatása, amiben endogén és exogén noxák bonyolult együtthatása döntő szerepet játszik. Erre vezethető vissza a neuronalis/gliális differenciálódási markerek kifejeződésének gátlása (downregulation) és az őssejtmarkerek kódolásáért felelős gének túlzott aktivitása (overexpression). A daganatos transzformációra jellemző bizonyos „őszi” markerek megjelenése, így pl. a nestin fehérje re-expressziója. A nestin és GFAP egyidejű megjelenése az invazivitás növekedésével arányos (6, 17).

Egy máig vitatott, de elterjedt felosztás szerint primaer és secundaer glioblastomákról beszélhetünk (30, 42). A GBM másodlagosnak tekinthető, ha bizonyíthatóan egy alacsonyabb malignitási fokú (Gr. II vagy Gr. III) glioma progressziója eredményeként jelentkezik. Ez a biológiai progresszió elkülönítendő a klinikai progressziótól, mely a jelenlegi szóhasználatban a laesio nagyságának növekedését jelöli. A biológiai/

¹ A WHO 2007-ben megjelent „kék könyve” elhagyta a tradicionális „multiforme” jelzöt, de a GBM rövidítés megmaradt (41)

patológiai progresszió a DNS strukturális károsodásával (onkogénamplifikáció, mutációk, szuppresszor gének deléciója) vagy a génextpresszió szabályozásának felborulásával függ össze (40). Secundaer GBM-ben (38–42 év között halmozódik) az esetek 60–70%-ában a p53 gén mutációja mutatható ki. Jellemző a ras-út vonal aktiválódása, ill. a retinoblastoma gén mutációja/inaktiválódása (40–45%), a p14ARF és p16 inaktiválódása (35–60%), valamint a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF) génjének amplifikációja is. Az átlagosan 10 évvel idősebb korban, *de novo* jelentkező GBM-ben némileg eltér a biológiai/molekuláris háttér. Gyakori az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) génjének amplifikációja (40%), a PTEN daganatszuppresszor gén mutációja (32%) és más genetikai hibák (pl. 35%-ban a p16 szuppresszor gén vesztese). Az óriássejtes (monstrocellularis) GBM variáns (Zülch-tumor) 75–90%-ában létrejön a p53-mutáció, a gliosarcomákban a PT53-, PTEN- és p16-mutációk/deléciók mellett az mdm2 amplifikációját figyelték meg, míg az EGFR-amplifikáció gyakorisága feltűnően alacsony (12, 20, 25, 40, 42).

A 2007-ben megjelent WHO-meghatározás szerint (20) a grade IV astrocytoma vagy glioblastoma (GBM) kórisméjéhez a III. gradusú astrocytomákban meglévő nagyfokú cellularis anaplasia és emelkedett mitotikus ráta mellett további szövettani kritériumok (pseudopalisáddal övezett necrosis és kapillaris- és/vagy endothelproliferáció) megléte is szükséges. Továbbra is vitatott, hogy más sejtvonalból – oligodendroglia, ependyma – származhat-e GBM, ill. használható-e ez a megjelölés olyan daganatokra, melyek egyértelműen oligodendroglialisak vagy ependymalisak és hordozzák a fenti szöveti jellegzetességeket (20, 21, 29).

Az új neuro-onkológiai markerek klinikai megjelenése és elterjedése szorosan követte a fentebb felsorolt megfigyelések akkumulálódását. A genetikai és molekuláris abnormitások, a daganatok növekedési sajátosságai és a kezelés hatékonysága közötti kapcsolatra elsőként az anaplasticus oligodendroglionokban megfigyelt kromoszomális deléciók halmozódása (1p- és 19q-kodeléció) hívta fel a figyelmet (5, 10, 35). E mellett jelenleg leginkább az EGFR jelátviteli út vonalának funkcionális aktivitásával, illetve az alkiláló szerek hatékonyságát befolyásoló MGMT gén aktivitásának kimutatásával kapcsolatban számolnak be klinikailag alkalmazható prediktív jellegű megfigyelésekről gliális tumorokban (11, 26, 37).

PREDIKTÍV MOLEKULÁRIS MARKEREK A GLIALIS TUMOROK DIAGNOSZTIKÁJÁBAN

Az MGMT aktivitásának vizsgálata

Hosszú időn keresztül a nitrosoourea-származékok jelentették a GBM gyógyszeres kezelésének alapját (37). Szomorú tény, hogy Bailey és Cushing 1926-ban meg-

jelent eredeti közleménye (2) és az ezredforduló között eltelt időben az átlagosan 12 hónapos túlélés jelentősen nem változott (25). A medián túlélés 14,6 hónapra növekedett azt követően, hogy a standardnak tekintett sebészi- és sugárkezelést egy új alkiláló szer bevezetésével (temozolomide, Temodal®) egészítették ki (38). Ez a *per os* adható imidazotetrazin-származék a DNS egyik nukleotidja, a guanin molekula O⁶ pozíciójában metilációt idéz elő. A képződő metilguanin-származék tehető felelőssé a citotoxikus hatásért, mert károsítja a DNS-t javító mechanizmusokat, ill. gátolja a génátírást. Az MGMT (O⁶-metilguanin-DNS-metiltransferáz) enzim visszafordítja ezt a folyamatot, a kialakult mérgező anyagot hatástalanítja. Az O⁶ pozícióban lévő metilcsoportot az MGMT sztöchiometrikus módon és irreverzibilisen az enzim cisztein-reziduumához köti és helyreállítja a guanin nukleotid normális konfigurációját. Ha az MGMT „felhasználódik” (depléció), akkor lehetővé válik az O⁶ pozícióban módosult guanin túlsúlyba kerülése, kialakulhat a daganatsejtek károsodása. Ugyanígy, ha az MGMT inaktivációja miatt marad el a DNS javítása, hasonlóan nő a szer citotoxikus hatása, ami magyarázza a GBM kezelésében leírt kedvező hatást (31).

Az MGMT fehérje normális és daganatos szövetekben is megjelenik, a fehérjét kódoló gén (*MGMT*)² már jól ismert (10q26 lókuszt). Az is évek óta tudott, hogy az *MGMT* promoter szakaszának metilációja a gén expressziójának epigenetikus gátlását („silencing”) okozza, ami gliomákban is gyakran észlelt jelenség (5, 9). Ha a DNS-replikáció idején az *MGMT*-expresszió gátolt, az O⁶-metilguanin timidinhez kötődhet. Ennek következménye a guanin-citozin bázis „konverziója” lesz: helyette adenin-timidin pár jelenik meg. Ez a változás akadályozza a DNS-replikációt, amiben szerepet kap(hat) az O⁶-metilguanin-DNS citozinnal kialakított keresztkötése is (9). Érthető tehát, hogy a tumorok *MGMT*-aktivitása, ill. a gén metilációjának mértéke jelentősen befolyásolja a daganatos túlélést (5).

A GBM kezelését forradalmasította az a 2005-ben megjelent, multinacionális tanulmány, mely bizonyította, hogy az *MGMT*-promoter metilációjának mértéke alapján eldönthető, kik azok a betegek, akikben a Temodal adásától kedvező hatás várható (11). Az *MGMT* gén CpG-gazdag promoter szekvenciáiban fennálló „metilációs státusz” metiláció-specifikus PCR (MSP) segítségével elemezhető (7). Ez az eljárás rutin vizsgálatokra is alkalmas: az *MGMT* MSP tesztet colorectalis carcinomákban az MLH1 „mismatch repair” gén vizsgálatára ajánlják. GBM-ből származó mintákban jellemző a viszonylagos sejttségénység és a vérzéses-necroticus területek dominanciája. Ezek miatt nem ritkák a technikai problémák (7), melyek újfent hangsúlyt adnak a morfológiai validáció korábban említett jelentőségének.

Az *MGMT* promoterének hipermetilációja a fehérje mennyiségének csökkenéséhez vezet (transzkripció-

²A gént dőlt betűk, az általa kódolt fehérje nevét szokványos betűk jelölik

gátlás = silencing), aminek igazolására kézenfekvőnek tűnik az MGMT fehérje immunhisztokémiai (IHC) detektálása. Ez a módszer olcsóbb, kevésbé eszközigenyes, kisebb a komplex „know-how” igénye (36). Így sem lehet megkerülni a gliomák ismert, szinte patognomikus heterogenitását, ami az eredmények értékelését jelentősen nehezíti (27). Az eddig megjelent közlemények alapján a módszer további finomítására van szükség, ami elsősorban a metilációs státusz MSP-analízise és a fehérje IHC-vizsgálata párhuzamos végzésével történhet (3). A legfrissebb adatok (31) arra is felhívják a figyelmet, hogy a metiláció mértéke a kezelés hatására is megváltozhat. A nemzetközi tapasztalatok szerint az MGMT metilációjának vizsgálata prognosztikailag is használható információt nyújt, prediktív jelentősége a Temodal és kombinációinak hatásosságára nézve pedig tagadhatatlan (24).

Az EGF-receptor és az EGFR-jelátviteli út vizsgálata

A GBM genezisével összefüggésben megfigyelt fehérje-expressziós aberrációkat fentebb említettük. Ezek közül kiemelhető az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), melynek abnormis expresszióját a primaer GBM megközelítően 40%-ában, a secundaer GBM 8%-ában írták le (8, 30). Az *EGFR* gén a 7-es kromoszóma p12 lókuszán található és egy 170 kDa nagyságú transzmembrán fehérjét kódol. Az amplifikált *EGFR* gének legtöbbször „double-minute” extrakromoszomális elemeként jelennek meg. Az amplifikáció gyakorta „csonka” (truncated) variánsok megjelenésével jár, melyek közül a leggyakoribb az *EGFRvIII* (=de2-7*EGFR*, ill. delta *EGFR*). Az *EGFR* aktivációja (amplifikáció, mutációk) bizonyos típusú tüdőrákokban (NSCLC = non-small cell lung cancer), ill. colorectalis rákokban is ismert. Ez az általunk tárgyalt kérdések szempontjából azért lényeges, mert az *EGFR*-státusz ismeretének függvényében alkalmazott tirozinkináz-inhibitor gyógyszerek az említett szisztémás daganatok kezelésében drámai változást eredményeztek (13). A neuro-onkológiában az *EGFR* szinte kínálkozik a molekuláris gátló kezelés célpontjaként, hiszen az *EGFRvIII* receptorvariáns csaknem kizárólag gliomákban fordul elő szignifikáns mennyiségben (1). Ismert, hogy amennyiben megjelenik, akkor GBM-ben az *EGFR*-amplifikáció és -overexpresszió extrém mértéket ölt és az *EGFR* extracelluláris része (mely *in vitro* onkogén hatású) kis molekulatömegű tirozinkináz-gátlókkal szemben érzékenyíti a sejteket (16). Mindezek alapján viszonylag korán felmerült, hogy az *EGFR* genetikai vagy IHC elemzése a GBM (és egyéb daganatok) kezelésében használható (prediktív) adatokat szolgáltathat (42). Sajnos a kérdés ennél összetettebb, mert az *EGFR*-sejtmag kapcsolat több áttételen keresztül valósul meg, amiben alapvető szerepet kap a PI3K, a RAS és a mitogénaktivált protein (MAP) kináz szignalizációs rendszer. Az *EGFRvIII* az *EGFR* 2–7. exonjait érintő, nem-random, 801 bp (bázispár) in-frame

deléció eredménye (39). Ennek következménye, hogy a receptor – a ligand kötődésétől függetlenül – aktivációs jeleket továbbít és sejtproliferációt indukál, emiatt logikus terápiás célpontként kínálkozik. Az is kiderült, hogy az *EGFRvIII* és a *PTEN* koexpressziója szignifikáns szereppel bír a kinázgátlókkal (erlotinib, gefitinib) szembeni érzékenység szabályozásában (26). Számos vizsgálat sorozat eredményét összehasonlítva a következtetések még nem teljesen egyértelműek (áttekintő irodalom: 41). Gliomákban a normális *EGFR* (vad típus), ill. a mutáns *EGFRvIII* expressziója immunhisztokémiai módszerekkel rutinszerűen vizsgálható. Az expresszió mértéke nagymértékben összefügg az *EGFR* gén amplifikációjával, melynek gyakorisága a tumor szövettani gradusával arányosan emelkedik (14, 18). A mutáns *EGFRvIII* megjelenése különösen gyakori amplifikáció esetén (50% körül), míg génamplifikáció hiányában alig (8%-ban) észleltek *EGFRvIII*-expressziót. Szövetmintákban, a daganatsejtek genetikai sajátosságainak megismerésére jól használható a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH), mely a sejtmagban előforduló *EGFR*-génkópiák számáról nyújt pontos felvilágosítást.

Az 1p/19q-deléció vizsgálata és az eredmények prediktív jelentősége

Az alcímben szereplő genetikai aberráció nem *sui generis* sajátossága a glioblastomának, de vizsgálata változatos szöveti szerkezetű, hisztogenezisű és gradusú gliomákban rohamosan terjed. A malignus gliomák egy jelentős részében nem jellemző a GFAP-expresszió, vagy csak bizarr, random, változó intenzitású IHC dekoráció látható. Ezek a daganatok klaszikus perinuclearis halo megjelenésével vagy kevert, oligo- („fried egg”) és astrocytaer fenotípussal jellemezhetők. Érdekességük, hogy az *EGFR*-amplifikáció nélkül is jelentős az *EGFR* mRNS és fehérje szintézise (34). Citogenetikai módszerek viszonylag korán igazolták, hogy ezekben a sajátosságos szöveti/citológiai megjelenésű daganatokban a 19-es kromoszóma hosszú (q) karján és az 1-es kromoszóma rövid (p) karján gyakorta észlelhető deléció, melyek sokszor együtt is előfordulnak, amit kodelációknak nevezünk (10, 35). Ezt az eltérést ma már többen diagnosztikus értékűnek tekintik, bár ezzel kapcsolatban az irodalmi adatok nem egységesek (21). Ennek ellenére a kodeláció felismerése segíthet az egyébként nehezen osztályozható, feltehetően oligodendroglialis-, még inkább a kevert összetételű (OACs) gliomák besorolásában. Döntő áttörést jelentett az a megfigyelés, hogy az 1p-deléció prediktív értékkel bír: az eltérést hordozó daganatok jól reagálnak a procarbazine-citozinarabinozid-vincristine (PCV) kezelésre (5). A kombinált 1p- és 19q-vesztés fokozza a kemoszenzitivitást és hosszabb túlélést tesz lehetővé (5, 10, 41). Bár ez az eredmény jól reprodukálható, pontos magyarázata máig sem ismert: a feltételezett 1p/19q lokalizációjú tumorszuppresszor gént eddig nem sikerült

azonosítani. Úgy tűnik, hogy az 1p/19q-vesztés fordítottan viszonyul a TP53-mutáció gyakoriságához és a kodeláció csak az agy bizonyos régióiban kialakuló daganatokat jellemzi (43). Megjegyezzük, hogy korábbi beszámolók már utalnak a különböző lebenyekben, ill. infra- és supratentorialis lokalizációban kialakuló Gr IV astrocyta-eredetű daganatok (GBM) eltérő genetikai hátterére (1). Az USA több neuro-onkológiai centrumában (pl. Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital [4]) ma már tüneteket okozó, Gr II oligodendrogliomákat is kezelnek Temodallal; a tapasztalatok kedvezőek.

Az 1p/19q-analízis megoldható PCR-vizsgálattal (loss of heterozygosity [LOH] teszttel), fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) és microarray-alapú genomhibridizációval (array-based comparative genomic hybridization, aCGH). Az egyes módszerek eltérő előnyökkel ill. hátrányokkal és költségigénnyel jellemezhetők. A sejtszintű és ily módon morfológiailag leginkább kontrollálható FISH-vizsgálat lenyomatokon és szövettani metszetben is pontos eredményt biztosít. Előnye, hogy rutinszerűen alkalmazható, bár költségei magasabbak, mint a PCR-alapú módszeré (10).

A genetikai eltérések tárgyalása kapcsán érdemes kitérni az oligoastrocytomák sajátosságaira. A szerzők tapasztalata szerint ma is jelentős számban dolgoznak elismert neuro-onkológusok, akik – a WHO-kategóriák ellenére – kétségbe vonják a kevert glioma, mint önálló entitás létét. Összefoglalónk szempontjából ez az egyesek számára akadémikusnak tűnő kérdés megkerülhetővé válik, tudván, hogy ezekben a vitatott hisztogenezisű daganatokban is az 1p/19q-kodeláció a prediktív marker. A nemzetközi konszenzus jelenleg az, hogy amennyiben a daganat vizsgálata oligodendroglioma komponens jelenlétét valószínűsíti, akkor – differenciáltságtól függetlenül – az 1p/19q-státusz prediktív tényezőként szerepel és meghatározása kívánatos (41).

A NEURO-ONKOLÓGIAI SZÖVETTANI DIAGNOSZTIKÁVAL KAPCSOLATOS KÖVETKEZTETÉSEK

A fentiekben a magas gradusú gliális daganatok leggyakoribb formáira, ill. az ezekben kimutatható prediktív markerekre helyeztük a hangsúlyt. A prediktív információk jellegzetessége, hogy azok elsősorban a posztoperatív szak lezárulásával és az onkológiai teendők tisztázása kapcsán kerülnek előtérbe. Mindezek alapján a diagnosztikus munkát célszerű fázisokra bontani. Az egyes szakaszokhoz jól meghatározható funkciók rendelhetők, melyek a kezelést végző szakemberek („onko-team”) számára adekvát információt szolgáltatnak.

Az esetek kb. 80%-ában egyszerű szövettani vizsgálattal (HE-festés) gyorsan eldönthető, hogy neuroectodermális daganatról (glioma), áttétről, meningealis tumorról, vascularis elváltozásról, epilepsziát okozó dysmorfhiáról van-e szó. Ilyenkor lehetőség van a morfológiai szintű, diagnosztikus és prognosztikus értékkel rendelkező klasszikus szöveti sajátosságok (dignitás, differenciálódás, invazivitás, mitóziásszám, stb.) elemzésére. A vélemény (akár 48 órán belül) a további sebészi teendők meghatározásához, ill. az onkológiai-, neurológiai-, ill. rehabilitációs ellátásban szükséges döntések előkészítéséhez ad támpontot.

A szövettani diagnózis pontosítása és az elváltozás részletes biológiai-prognosztikai jellemzése az immunfenotípus meghatározásával történik, melynek ismerete lehetőséget teremt funkcionális jellegű következtetésekre is. Az eset klinikumának és radiológiai leletének ismeretében kiválaszthatók azok az IHC-reakciók, melyek relevánsak és a betegség jellemzésére alkalmasak (GFAP, Mib-1, CD34, p53, vimentin, EMA, NF, NSE, limfoid markerek), ill. a követés során szerepet kaphatnak. A magyarországi finanszírozási lehetőségeket figyelembe véve az esetek döntő többségében öt IHC-reakció alapján pontos kórisméhez kell jutni. Bizonyos speciális festések (diasztáz-emésztett PAS [ePAS], trichrom, ezüstimpregnáció, BK, von Kóssa, Giemsa, Gram, LFB, stb.) a szöveti eltérések megítélésénél továbbra is szükséges lehetnek.

A fentiek alapján az EGFR-expresszió, az 1p/19q-kodeláció és az MGMT-metiláció vizsgálatának prediktív klinikai értéke nem kérdéses. A dolgozatunkban ismertetett prediktív, ill. célzott terápiát támogató molekuláris diagnosztika feltételei (FISH-, PCR-technológia) Magyarországon több centrumban rendelkezésre állnak. Lehetőség van ezeknek a tényezőknek prospektív és retrospektív meghatározására is. Szerencsére a vizsgálatok legnagyobb része fixált szöveteken, paraffinba ágyazás után is elvégezhető, ebben a formában a minták egyszerűen archiválhatók, ill. eljuttathatók a speciális vizsgálat elvégzésére alkalmas központok valamelyikébe.

A daganatot jellemző, ill. a kezelés szempontjából releváns valamennyi diagnosztikai eljárás integrálása a kezelőorvos és a vizsgálatot végző patológus közös felelőssége. Ha a diagnosztikus folyamatot a kezelési lehetőségeket szem előtt tartva alakítjuk, akkor a leghatékonyabb kezelési séma gyors kiválasztásával lehetővé válik a betegek személyre szabott ellátása. Sajnos a daganatok molekuláris diagnosztikája még mindig nem került a megfelelő helyre, hazánkban egyelőre a vizsgálatok finanszírozhatósága a legfőbb szempont. A hiteles prediktív markerek alapján tervezett terápia jobb hatékonysága és az így elérhető jelentős megtakarítások egyértelműen sürgetik a vázolt diagnosztikus-terápiás gondolkodásnak mielőbbi és széleskörű elterjedését.

IRODALOM

1. Allen C, Vongpunsawad S, Nakumara T, et al. Retargeted oncolytic measles strains entering via the EGFRvIII receptor maintain significant antitumor activity against gliomas with increased tumor specificity. *Cancer Res* 66:11840–11850, 2006
2. Bailey P, Cushing H. A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histo-genetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. J.B. Lippincott, Philadelphia 1926
3. Brell M, Tortosa A, Verger E, et al. Prognostic significance of O⁶-methylmethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res* 11:5167–5174, 2005
4. Burger P (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA), Perry A (Washington Univ. St. Louis, MO, USA), személyes közlés
5. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90:1473–1479, 1998
6. Calabrese Ch, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11:69–82, 2007
7. Cankovic M, Mikkelsen T, Rosenblum ML, et al. A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Lab Invest* 87:392–397, 2007
8. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4309–4313, 1992
9. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, et al. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59:793–797, 1999
10. Griffin CA, Burger PC, Morsberger L, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:988–994, 2006
11. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Eng J Med* 352:997–1003, 2005
12. Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neuro-Oncol* 70:137–160, 2004
13. Janne PA, Johnson BE. Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 12:4416–4420, 2006
14. Jarvela S, Helin H, Haapasalo J, et al. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumors by chromogenic in situ hybridization: Association with clinicopathological features and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32:441–450, 2006
15. Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer* 97:825–833, 2003
16. Lee JC, Vivanco I, Beroukhim R, et al. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 3:e485, 2006
17. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595, 1990
18. Liu L, Backlund LM, Nilsson BR, et al. Clinical significance of EGFR amplification and aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J Mol Med* 83:917–926, 2005
19. Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification. A molecular reappraisal. *Am J Pathol* 159:779–786, 2001
20. Louis ND, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. WHO Press, Geneva 2007
21. Love S, Louis DN, Ellison DW. Greenfield's Neuropathology. 8th ed. Hodder Arnold, London 2008, pp. 1834–1835
22. Maher E, Furnari, FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15:1311–1333, 2001
23. Marillo A, Orfao A, Sayagues M, et al. New classification scheme for the prognostic stratification of meningioma on the basis of chromosome 14 abnormalities, patient age and tumor histopathology. *J Clin Oncol* 21:3285–3295, 2003
24. Martinez R, Schackert G, Yaya-Tur R, et al. Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neuro-Oncol* 83:91–93, 2007
25. McLendon RE, Rosenblum MK, Bigner DD. Russel & Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System. 7th ed. Hodder Arnold, London 2006
26. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353:2012–2024, 2005
27. Morrison CD, Prayson RA. Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system. *Semin Diagn Pathol* 17:204–215, 2000
28. Nelson NJ. Experts wrestle with problems developing biomarkers, search for new tests. *J Natl Cancer Inst* 98:578–579, 2006
29. O'Neill B, Scheithauer B (Neuro-Oncology Discussion Group and Decision Panel, Mayo Clinic and Foundation, Rochester, MN, USA), személyes közlés
30. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64:6892–6899, 2004
31. Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, et al. Variation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neuro-Oncol* 87:71–78, 2008
32. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early development of cancer. *J Natl Cancer Inst* 93:1054–1061, 2001
33. Pilkington GJ (Univ. Portsmouth, Anglia), személyes közlés
34. Reifenberger J, Reinfenberger G, Ichimura K, et al. Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol* 149:29–35, 1996
35. Reifenberger J, Reinfenberger G, Liu L, et al. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 145:1175–1190, 1994
36. Ross JS. Financial determinants of outcomes in molecular testing. *Arch Path Lab Med* 123:1071–1075, 1999
37. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomized trials. *Lancet* 359:1011–1018, 2002
38. Stupp R, Mason WP, van Den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Eng J Med* 352:987–996, 2005
39. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8602–8606, 1990
40. von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 15:128–138, 1995
41. Yip S, Iafrate J, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: A practical update on predictive markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:1–15, 2008
42. Zhang W, Fuller GN. Genomic and Molecular Neuro-Oncology. Jones and Bartlett Publ. Inc., Sudbury 2004
43. Zlatescu MC, Tehrani YA, Sasaki H, et al. Tumor location and growth pattern correlate with genetic signature in oligodendroglial neoplasms. *Cancer Res* 61:6713–6715, 2001