

Doktori (Ph.D.) értekezés

Molekuláris háttérvizsgálatok differenciáldiagnosztikai és prediktív biomarkerek azonosítására nem-kissejtes tüdőrákban

Dr. Török Zsófia Laura



Pécsi Tudományegyetem

I. sz. Belgyógyászati Klinika, Pulmonológiai Tanszék, Pécsi Tudományegyetem, Klinikai
Központ

Gyógyszerészi Biotechnológiai Tanszék, Gyógyszerészeti Kar, Pécsi Tudományegyetem

2025

Molekuláris háttérvizsgálatok differenciáldiagnosztikai és prediktív biomarkerek azonosítására nem-kissejtes tüdőrákban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Török Zsófia Laura

I. sz. Belgyógyászati Klinika, Pulmonológiai Tanszék, Pécsi Tudományegyetem, Klinikai
Központ

Gyógyszerészi Biotechnológiai Tanszék, Gyógyszerészeti Kar, Pécsi Tudományegyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Projektvezető: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, Ph.D., DSc.

Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika, MD, PhD, DSc.

Pécsi Tudományegyetem

Pécs

2025

1. Bevezetés

1.1 A tüdőrák epidemiológiája és diagnosztikája

A tüdőrák napjainkban továbbra is a vezető halálok mind a férfiak, mind a nők körében.⁽¹⁾ Az egyes országok gazdasági fejlettségi szintje alapján nincs jelentős eltérés az összmortalitásban, azonban a fejlett országokban a nők körében magasabb a tüdőrák okozta halálozás, mint a fejlődő országokban.⁽²⁾ A tüdőrák előfordulása és mortalitása és a dohányzás között szoros összefüggés van. Az elmúlt évtizedekben Magyarországon folyamatosan nőtt mind a megbetegedések száma, mind a halálozási arány, így mára Magyarországon a világon az egyik legmagasabb a tüdőrák morbiditása és mortalitása. A 2016-ban végzett HeLP3 tanulmány eredményei szerint Magyarországon 6996 új tüdőrákos esetet diagnosztizáltak 2016-ban, az esetek 59,7%-a férfiakat érintett és az átlagos életkor 65,88 év volt ($SD \pm 9,84$).⁽⁸⁾ Ezzel párhuzamosan 6465 beteg halt meg (63,2%-uk férfi), átlagos életkoruk 67,95 évnél bizonyult ($SD \pm 9,68$).⁽⁸⁾

A tüdőrák diagnózisának felállítása komplex folyamat. A megbetegedés radiológiai stádiumának meghatározásához különböző képalkotó eljárások szükségesek, úgymint CT-vizsgálat, mágneses rezonancia képalkotás, pozitronemissziós tomográfia (PET)-CT vizsgálat, csontszcintigráfia és ultrahang. Az FDG-PET egyre gyakrabban használatos a CT képalkotás mellett az tüdőrák stádiumának meghatározásához. Az FDG-PET és a CT kombinációja a két módszer önmagában való alkalmazásához képest kiválóan alkalmas az érintett mediasztinális nyirokcsomók kimutatására, 58–94% érzékenységgel és 76–96% specifitással.⁽¹⁰⁾ A tüdőrák diagnózisának felállításához a tumor patomorfológiai vizsgálata szükséges. A mintavétel leggyakrabban bronchoszkópiával történik, melynek során a tumorból való mintavétel mellett lehetőség van hagyományos vagy endobronchiális ultrahang-vezérelt transbronchiális tűbiopszia elvégzésére a mediasztinális nyirokcsomók érintettségének igazolására és ezáltal a pontos stádium meghatározására. Ritkábban alkalmazott invazív diagnosztikai eljárások a CT-vezérelt transthorakalis tűbiopszia, a mediastinoszkópia és a videó-asszisztált thoracalis sebészet (VATS) során történő mintavétel is. A tüdőrák pontos stádiumának meghatározása elengedhetetlenül szükséges a későbbi terápiás lehetőségek meghatározásához. A tüdőrák (TNM) stádiumrendszere (tumor, nyirokcsomó, metasztázis) egy nemzetközileg elfogadott rendszer, amelyet a betegség kiterjedésének leírására használnak.⁽¹¹⁾ A TNM rendszer alapján

meghatározott stádiumok és a daganat szövettani típusa alapján határozzák meg a nemzetközi irányelvek a kezelési stratégiáját az egyes betegcsoportokban.

1.2 A tüdőrák szövettani jellemzői és molekuláris genetikája

A tüdő daganatos megbetegedéseit szövettanilag két fő típusba sorolják: a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC), amely a diagnózisok 85%-át teszi ki, és a kissejtes tüdőrák (SCLC), amely 15%-ot képvisel. Az NSCLC két altípusa az adenokarcinóma (LUAD), mely a gyakoribb forma, és a laphámsejtes karcinóma (LUSC). Az elmúlt évtizedben a LUSC előfordulása, amely egykor a leggyakoribb szövettani típus volt, jelentősen csökkent, elsősorban a gazdaságilag fejlett országokban a dohányzás visszaszorulása és a cigaretta összetételének változása miatt.⁽¹⁰⁾ A tüődaganatok molekuláris háttere összetett és heterogén. A genetikai, epigenetikai és fehérjeexpressziós szinten bekövetkező molekuláris változások egyre nagyobb mértékű megismerése és megértése jelentősen befolyásolja napjainkban a tüdőrák diagnosztizálását, kezelését és prognózisát. A tüdőrák kialakulása többlépcsős folyamat, amelynek során növekedést elősegítő útvonalak aktiválódnak, miközben a tumor szuppresszor útvonalak gátlódnak, és amelyet több genetikai és epigenetikai változás jellemez. A tüődaganat molekuláris patogenezisében részt vevő sokrétű biokémiai útvonalak átfogó megértése elengedhetetlen a molekuláris rendellenességeket és azok downstream útvonalait célzó kezelési stratégiák kidolgozásához.⁽⁵⁾ A tumor növekedését elősegítő és a terápia lehetséges célpontjait jelentő molekuláris változásokat jelenleg adenokarcinómában ismerjük legrészletesebben.⁽⁵⁾ Ugyanakkor egyre nagyobb az érdeklődés a LUSC molekuláris háttere iránt, amelyben a pathogenezis szorosabb összefüggést mutat a dohányzással, ezáltal rendkívül változatos mutációs háttérrel jár. Jellemzőek a különböző génekben létrejövő génamplifikációk, génfüziók, tumor szuppresszor mutációk és pontmutációk kombinációi.⁽¹⁵⁾ Mindezek következtében laphámkarcinómában jelenleg mutációkon alapuló célzott terápia nem áll rendelkezésre. A tüdőrák esetében, hasonlóan más rosszindulatú daganatokhoz, a tumorgenezis folyamata növekedést elősegítő fehérjék (pl. KRAS, EGFR, BRAF, MEK-1, HER2, MET, ALK, RET) aktiválódásával, valamint tumor szuppresszor gének inaktiválódásával jár.⁽⁵⁾ A növekedést elősegítő onkogének aktiválódásának folyamata génamplifikáció vagy más genetikai változások, például pontmutációk és szerkezeti átrendeződések révén történhet, amelyek onkogén útvonalakon keresztül kontrollálatlan jelátvitelhez vezetnek. Az „onkogén függőség” jelensége akkor jelentkezik, amikor a sejtek túlélése a rendellenes jelátviteli útvonalak tartós aktiválódásától függ. Ezek a rendellenes jelátviteli útvonalak ideális célpontnak számítanak a célzott terápiás beavatkozások számára. Onkogén driver mutációkat

azonosítottak a LUAD esetek több mint 50%-ában, és ezek általában kizárják más driver mutációk jelenlétét.⁽⁵⁾ A nagy felbontású szekvenálási technikák (NGS) megjelenése lehetővé tette a tüdődaganatok átfogó molekuláris profiljának azonosítását. A Cancer Genome Atlas (TCGA) kutatási hálózat azonosította a genomikus és egyéb molekuláris változásokat különböző típusú rákok, köztük a tüdődaganatok esetében is.

1.2.1 WNT jelátvitel tüdőrákban

Egyre több kutatási eredmény támasztja alá, hogy a WNT jelátviteli út, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a tüdő homeosztázisának fenntartásában, számos tüdőbetegség patogenezisében is szerepet játszik.⁽²³⁾, hasonlóan más típusú daganatos megbetegedésekhez. A WNT fehérjék szekretált glikolipoprotein morfogének, amelyek a tüdő fejlődése során szükségesek a sejtek differenciálódásához, a sejtek szaporodásához és az aszimmetrikus sejtosztódás szabályozásához. Az emberi tüdőben 19 WNT ligandumot és 10 fő receptorukat, az úgynevezett Frizzledeket (FZD) azonosítottak, amelyeket emlős sejtekben is kimutattak. Két fő WNT-jelátviteli útvonal ismert: i) a β -katenin-függő vagy másnéven kanonikus útvonal, és ii) a β -katenin-független vagy úgynevezett non-kanonikus útvonal, amely magába foglalja a PCP (planar cell polarity) és a WNT/ Ca^{2+} útvonalakat. A Ca^{2+} -függő WNT jelátvitel legismertebb aktivátora a WNT5A. A WNT jelátviteli útvonalak nyilvánvaló különbségei ellenére a WNT fehérjék kötetlenséget mutatnak, képesek receptorokat megosztani és a WNT jelátviteli molekulák expresszióját szabályozni, valamint modulálni a WNT jelátviteli útvonal aktivitását.^(23,24) A WNT/ β -katenin útvonalban bekövetkező változások a különböző daganatos megbetegedésekre jellemzőek. Nem-kissejtes tüdőrákban a β -katenin és az APC mutációi ritkák, azonban a WNT jelátvitel jelentős szerepet játszik, mivel gátlása a sejtproliferáció csökkenéséhez vezet.⁽³²⁾ A WNT-1, -2, -3 és -5a expressziója, más WNT jelátviteli komponensekkel, például Frizzled-8, DVL, PORCN és TCF-4 együtt, gyakori a reszekált NSCLC-ben, és rosszabb prognózissal társul.^(32,33) Ezzel szemben a WNT-7a gátló hatást fejt ki a NSCLC kialakulására, és gyakran alulregulált a reszekált tumoros szövetekben. Bár a β -katenin gyakran expresszálódik a NSCLC-ben, jelenlétét egyes tanulmányok jobb prognózissal társítják, valószínűleg az E-kadherinnel való interakciók miatt.⁽²³⁾ A WNT-gátlók expressziójának csökkenése, amely gyakran hipermetilációra vezethető vissza, számos NSCLC tumorsejt-vonalban és reszekált szövetekben megfigyelhető.⁽³²⁾ Az expresszió csökkenése összefüggésbe hozható az előrehaladott stádiummal, a dedifferenciálódással és a kedvezőtlen prognózissal. Előzetes vizsgálatok szerint a WNT-gátló funkció helyreállítása a WNT-jelátvitel

csökkenéséhez, a proliferáció gátlásához és az apoptózis elősegítéséhez vezet.⁽³²⁾ A WNT jelátvitel hozzájárulhat a kemoterápiás szerekkel, például a ciszplatinnal és a docetaxellel szembeni rezisztenciához, míg a WNT-gátlók fokozhatják a kemoszenzitivitást.⁽³⁴⁾ A WNT-útvonallal antagonistáinak klinikai célzása, beleértve a specifikus β -katenin kölcsönhatásokat gátló vagy a WNT-gátló expressziót fokozó szereket, további vizsgálatot érdemel.

1.2.2 Az ABC drug-transzporter expressziójának szerepe tüdőrákban

A gyógyszer-transzporterek integráns membránfehérjék, amelyek elősegítik a gyógyszerek és a xenobiotikumok sejtekbe való bejutását és onnan való kiválasztását minden szervben, beleértve a tüdőt is. Mivel az előrehaladott stádiumú tüdőrák kezelése a kemoterápiát is magába foglalja, nem meglepő, hogy a tumorsejtek fokozzák a drug-transzporter expresszióját a gyógyszerek aktív eltávolítása érdekében.⁽³⁵⁾ Ez a folyamat hozzájárul a gyógyszerrezisztencia kialakulásához és növeli a sejtek túlélési esélyét. A legjobban kutatott gyógyszer-transzporterek az ATP-kötő kazetta (ABC) szupercsaládba tartoznak.⁽³⁶⁾ Az ABC transzporter családot a genomikus szekvenciák és a transzmembrán domének (TMD-k) szerkezete alapján hét alcsaládba sorolják. Ezek döntő szerepet játszanak különböző kemoterápiás szerek kiválasztásában, ami gyakran ezeknek a gyógyszereknek a hatékonyságának csökkenéséhez vezet. Az ABC transzporterek amiatt is jelentősen befolyásolhatják a terápiát, mivel expressziós szintjük változása hatással lehet a gyógyszerek kiválasztásának mértékére és időtartamára. Ez pedig hatással van a betegség kimenetelére.⁽³⁷⁾

1.2.3 A fehérje-transzláció szabályozása – mikroRNS-ek tüdőrákban

A mikroRNS-ek kis (21–25 nukleotid), nem kódoló RNS-ek családja, amelyek képesek gátolni a hírvivő RNS (mRNS) fehérjévé történő transzlációját azáltal, hogy bázispárosodással elősegítik a cél mRNS-ek komplementer helyeinek lebontását. Ezen mechanizmus révén a mikroRNS-ek transzkripció után módosítják a génexpressziót. Az első nem kódoló RNS, amelyet a miRNA család tagjaként azonosítottak, a lin-4 volt, amelyet 1993-ban fedeztek fel a *Caenorhabditis elegans*-ban.⁽⁴⁴⁾ Csak a 2000-es évek elején határozták meg a miRNS-eket önálló szabályozó molekulák csoportjaként. Azóta a miRNS-ekkel kapcsolatos kutatások száma gyorsan növekedett, és a miRBase adatbázis ma már több mint 2500 érett mikroRNS-t tartalmaz (1188 prekursor molekulából).⁽⁴⁴⁾ A mikroRNS-ek döntő szerepet játszanak a karcinogenezisben, mivel a tüdőrákkal kapcsolatos gének mutációi fehérje expresszióváltozásokhoz vezethetnek. E fehérjék transzlációs szabályozása jelentősen befolyásolhatja a betegség progresszióját, a terápiára adott választ és az általános túlélést

1.2.4 Extracelluláris vezikulák (EV)

Az exoszómák olyan extracelluláris vezikulák, amelyek kettős lipidréteggel rendelkeznek, és a az intracelluláris kommunikációban betöltött kulcsfontosságú szerepük miatt az utóbbi időben intenzív kutatások tárgyát képezik. Ezek a vezikulák képesek elősegíteni bioaktív molekulák, többek között a fehérjék, a DNS, az mRNS és a nem kódoló RNS-ek átjutását egyik sejtől a másikba. Ez a folyamat genetikai információcseréhez és a befogadó sejt átprogramozásához vezethet.⁽⁴⁹⁾ Kutatási eredmények bizonyítják, hogy a tumorsejtek jelentős mennyiségű exoszómát bocsájtanak ki, amelyek befolyásolhatják a tumor növekedését, disszeminációját és gyógyszerrezisztenciáját.⁽⁵⁰⁾ Kimutatták, hogy ezek a részecskék lehetővé teszik a tumorsejtek és különböző más sejtípusok, többek között az immunsejtek és a stromasejtek közötti kommunikációt. Ez az interakció hozzájárul a tumor kialakulásához, progressziójához és az immunrendszer megkerüléséhez.⁽⁵⁰⁾

1.3 Az előrehaladott stádiumú tüdőrák szisztémás terápiája

Az előrehaladott stádiumú tüdődaganatok szisztémás kezelése számos terápiás módszert magában foglal, beleértve a kemoterápiát, a célzott molekuláris terápiákat és az immunterápiát is.⁽⁵⁴⁾ A megfelelő szisztémás kezelés kiválasztása a beteg általános állapotától, a betegség stádiumától, valamint a tumor szövettani és molekulárispatológiai jellemzőitől függ. A hagyományos kemoterápiás szerek, köztük a ciszplatin, a karboplatin és a harmadik generációs citotoxikus szerek, mint a taxánok (paclitaxel, docetaxel) vagy a gemcitabin, a nem kissejtes tüdőrák klinikai gyakorlatának standard elemei. Ezenkívül a pemetrexed és a bevacizumab is gyakran alkalmazott szerek az előrehaladott stádiumú nem-kissejtes tüdőrák kezelésében.⁽⁵⁴⁾ Az elmúlt években a terápiás lehetőségek jelentősen bővültek a célzott terápia és az immunterápia megjelenésével.

1.3.1 Célzott terápia NSCLC-ben

A molekuláris célzott terápia a tumor molekuláris profiljához igazodik.⁽⁵⁵⁾ A LUAD különálló molekuláris altípusokba sorolható, amelyeket az onkogén driverekben bekövetkező specifikus genetikai változások jellemeznek.⁽⁵⁾ A nem-kissejtes tüdődaganatokban molekuláris driverként leggyakrabban az alábbi génekben előforduló széles spektrumú genomikus változások szerepelnek : EGFR (gyakori és ritka mutációk), ALK, ROS1, BRAF, KRAS, MET, RET, NTRK és HER2. Ezen mutációk többsége azonban viszonylag ritka – a betegek kevesebb mint 2–5%-ánál fordul elő – és a standard diagnosztikai módszerekkel, mint a polimeráz láncreakció

(PCR) vagy az immunhisztokémia (IHC) nehezen azonosíthatóak, többek között a eljárás költségei, a feldolgozási idő hossza és a rendelkezésre álló tumor szövetminták kis mérete miatt is.⁽⁵⁾ A next generation sequences (NGS) technológiák megjelenése megoldotta ezeket a kihívásokat, mivel lehetővé tette több genetikai változás egyidejű, nagyobb érzékenységgel, pontossággal és költséghatékonysággal történő kimutatását. Az NGS alkalmazható formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) tumor szöveteken, valamint a perifériás vérből liquidbiopszia útján nyert keringő szabad DNS-en vagy messenger RNS-en is.⁽⁵⁶⁾

1.3.2 Immunterápia NSCLC-ben

Az immunoterápia – amelynek célja az immunrendszer a daganatos sejtek felismerésére és elpusztítására irányuló képességének fokozása – az utóbbi években jelentős figyelmet kapott. A tumorok elleni immunválasz hatékonyságát nagyban meghatározza a daganatos sejtek és az immunsejtek közötti interakció a tumor mikrokörnyezetben.⁽⁵⁹⁾ Újabb kutatások rámutatnak az immunsejtek kettős szerepére a tüdőrák progressziójában: támogathatják a tumorelles immunitást, vagy elősegíthetik az immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakulását.⁽⁶⁰⁾ A tumor mikrokörnyezet egy dinamikus és komplex hálózat, amely endotheliális sejtekből, fibroblasztokból, mesenchimális sejtekből, adipocitákból, immunsejtekből és az extracelluláris mátrixból áll. Az elmúlt évtizedben nagy figyelmet fordítottak a tumor immunmikrokörnyezet (TIME) összetételének és működésének megértésére, amelynek döntő hatása lehet az immunválasz alakulására és az immunterápiák hatékonyságára. Az immunterápia áttörését az immunellenőrző pontok (ICP-k) felfedezése jelentette, amelyek az immun- és daganatos sejtekben expresszáldó szabályozó fehérjék. Normális fiziológiai körülmények között ezek az ellenőrző pontok fenntartják az immunhomeosztázist és megakadályozzák az autoimmunitást azáltal, hogy gátló jeleket továbbítanak, amelyek a ligandum kötődése után lecsökkentik a T-sejtek aktivitását. A tumorsejtek azonban kihasználják ezeket az útvonalakat, hogy elkerüljék az immunmediált pusztulást azáltal, hogy túltermelik az ICP-ligandumokat és elnyomják a T-sejtek működését.⁽⁵⁹⁾

Az immunellenőrző pontokat blokkoló immunellenőrzőpont-gátló szerek (CKIs) forradalmasították a rákkezelést azáltal, hogy helyreállították a tumorelles T-sejtek aktivitását. Az elsőként felfedezett és legszélesebb körben tanulmányozott immunellenőrzőpontok a citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén-4 (CTLA-4) és a programozott halál-1 (PD-1). Az immunellenőrzőpont-gátlók az előrehaladott stádiumú nem-kissejtes tüdődaganat kezelésének sarokköveivé váltak. 2015-ben az amerikai Élelmiszer- és

Gyógyszerügyi Hivatal (FDA) jóváhagyta a nivolumab (egy anti-PD-1 antitest) alkalmazását platina-alapú kemoterápia után előrehaladott LUSC esetén, majd ezt követően minden NSCLC altípusra kiterjesztette a jóváhagyást. A PD-1 egy receptor, amely normális esetben az aktivált T-sejteken expresszálódik, és ligandumával, a PD-L1-gyel kölcsönhatásba lépve megakadályozza az immunválasz túlstimulálását. A tumorok a PD-L1 expresszióját fokozzák, hogy elkerüljék az immunrendszer észlelését, de a PD-1/PD-L1 útvonal monoklonális antitest gátlókkal történő blokkolása helyreállítja a T-sejtek működését, és az előrehaladott stádiumú tüdődaganatos betegeknél következetesen jelentős tumorelles hatást mutat. Jelenleg a klasszikus kemoterápiás szerek, az új immunellenőrzőpont blokkolók és ezek kombinációs terápiái a tüdőrák kezelésének gold standardjai.⁽⁶⁰⁾ A pembrolizumabot hasonlóképpen 2015-ben engedélyezték PD-L1-pozitív NSCLC-ben másodvonalis kezelésként, majd 2016-ban pedig első vonalban is törzskönyvezték magas PD-L1-expresszióval ($\geq 50\%$) bíró NSCLC-s betegek számára, csakúgy, mint az atezolizumabot, egy másik anti-PD-L1 antitestet.⁽⁶¹⁾ A daganatimmunológia kutatásának előrehaladtával az immunterápia a checkpoint inhibitorokon túl is fejlődik. Ígéretes alternatívák közé tartoznak a rákvakcinák, más monoklonális antitestek és az adoptív sejterápiák, amelyek a jövőben további kezelési lehetőségeket kínálnak majd az előrehaladott tüdőrák terápiában.

2. Célkitűzések

Korábbi kutatások már igazolták, hogy a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) két elsődleges altípusa -a laphámsejteskarcinóma (LUSC) és az adenokarcinóma (LUAD) - a különböző terápiákra eltérő reakciókat mutatnak.⁽⁶⁶⁾ Az altípusok molekuláris különbségeiről rendelkezésre álló adatok áttekintése és a betegstatisztikák elemzése alapján több új lehetséges kutatási terület is felmerült. Megkérdőjeleztük a jelenlegi trendeket, miszerint a legtöbb kutatás a tumor szövetekben található markereket vizsgálja, figyelmen kívül hagyva a betegek jellemzőivel és a terápiára adott válasszal való összefüggést a keringésben, ahol számos lipid-vezikula, köztük a heparán-szulfát proteoglikánok (HSPG-k), a citonémák és az EV-k legszélesebb körben vizsgált tagjai, az exoszómák, hatalmas molekulakészletet hordoznak, beleértve a nukleinsavakat, fehérjéket stb. Ezenkívül bizonyos terápiákkal kapcsolatban néhány aggasztó tendencia is felmerült. A laphámsejtes karcinómával diagnosztizált betegeknél jelentősen megnőtt a vérzés szövődmény előfordulása, amennyiben vascularizációt gátló kezelésben részesültek.^(66,67) Ez a felfedezés azt eredményezte a klinikai gyakorlatban, hogy a laphámsejtes karcinómás betegek antiangiogén terápiát nem kaphatnak, beleértve a

bevacizumabot is. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy vérzéses szövődmény, például gyomor-bélrendszeri vérzés vagy perforáció az érképződés-gátló kezelésben részesülő adenokarcinómás betegek esetén is előfordul. A fentiek alapján felmerül a kérdés, hogy milyen alapvető molekuláris mechanizmusok járulnak hozzá ezekhez a reakciókhoz. Míg a célzott terápiák javították a LUAD túlélési arányát, a LUSC hatékony kezelési lehetőségei még mindig korlátozottak. A fenti terápiás válaszok fényében felvetődött a hipotézis, hogy létezhetnek olyan specifikus molekuláris mikrokörnyezeti elemek, amelyek elősegítik a specifikus kezelési sémákra adott eltérő válaszokat. A terápiás válaszok közötti különbségek összefüggésben állhatnak az extracelluláris vezikulákban szállított molekulákkal vagy a gyógyszer-transzporterekben megfigyelhető eltérő expresszióval. E potenciálisan befolyásoló tényezők azonosításával és mérésével célunk az volt, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a terápiás válasz és az általános túlélés biológiai alapjaiba.

A kutatás céljai a következők voltak:

1. A LUAD és a LUSC differenciált molekuláris jellemzőinek azonosítása a betegek szérumban és a szérumból származó exoszómákban, különös tekintettel bizonyos fehérjékre és a mikroRNS-ek széles spektrumára.
2. A betegek klinikai követése kezelés alatt és után, valamint a betegek terápiára adott válaszanak és az általános túlélésnek elemzése a kezelés előtt azonosított molekuláris jellemzőkkel való összefüggésben.
3. A gyógyszer-transzporterek és azok KRAS- és EGFR-mutációkkal való összefüggésének vizsgálata az NSCLC egyik altípusában, LUAD-sejtvonalak felhasználásával.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Betegek és mintavétel keringő EV-vizsgálatokhoz

2018 februárjától decemberéig hatvan, többségében III/b-IV stádiumú nem-kissejtes tüdődaganatos betegről vettünk szérummintát, a PTE I.sz. Belgyógyászati Klinika Pulmonológiai Tanszékén. A kutatást etikai bizottsági engedéllyel (PTE_KK_RIKEB_6444/2016) és a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük. Minden beteg írásbeli beleegyező nyilatkozatot írt alá a részvétel előtt. A betegek adatait Excel táblázatban tároltuk, amelyben minden betegről a következő információkat rögzítettük: nem, életkor, szövettani diagnózis, a tumor TNM stádiuma, a daganat molekuláris profilja (KRAS,

EGFR, ALK), a szövettani mintavételhez használt diagnosztikai eljárás, a tumor elhelyezkedése (központi vagy perifériás), a mintavétel dátuma, a kezelés típusa (gyógyító vagy palliatív), a kezelés kezdete és vége, a kezelési ciklusok száma, a terápiára adott válasz RECIST 1.1 szerint, a beteg további onkológiai kezelése, progresszió mentes és teljes túlélése, a kezelés során esetlegesen felépett vérzéses vagy egyéb komplikációk, a beteg dohányzási előzménye, valamint hogy a betegnek volt-e ismert krónikus obstruktív tüdőbetegsége (COPD). A kemoterápiás kezelés első ciklusának első napján minden betegből 5 ml vért vettünk perifériás vénából natív csőbe. A csöveket a mintavétel után két órán belül 3000 g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A centrifugálás után a szérumot Eppendorf csövekbe töltöttük és további felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A betegeket a kezelés során mindvégig követtük, a klinikai vizitek során a fenti adatokat gondosan rögzítettük. A kutatás beválasztási kritériumai a következők voltak: szövettani vizsgálattal igazolt I–IV. stádiumú (az American Joint Committee on Cancer (AJCC, 8. verzió) alapján) nem kissejtes tüdőrákban (LUAD vagy LUSC) szenvedő betegek, akik a diagnózis felállítását megelőzően nem részesültek sugár-, immun-, vagy kemoterápiában, vagy egyéb kezeléseket. Csak olyan betegek kerültek beválasztásra, akiknél követési adatok hiánytalanul álltak a rendelkezésre, beleértve a legjobb általános választ (BOR) és az általános túlélést (OS). Végül, a vizsgálatba olyan betegeket vettünk fel, akiknél elegendő mennyiségű és minőségű szérumminták álltak rendelkezésre. A kizárási kritériumok a következők voltak: (i) patológiailag az NSCLC-től eltérő diagnózis; (ii) egyéb malignus daganatos megbetegedés előfordulása a kórtörténetben; és (iii) a nem megfelelő szérumminták vagy bármely más ok, amely a vizsgálat bármely szakaszában a minőségellenőrzés meghiúsulását eredményezhette volna. A legjobb általános választ (BOR) a RECIST 1.1 verziója szerint határoztuk meg. A kezelés megkezdésétől a kezelés bármely okból bekövetkezett végéig vagy az utolsó követési dátumig eltelt időt teljes túlélésnek (OS) tekintettük. Kontrollként a vizsgálati populációhoz hasonló koreloszlású, egészséges vérdonoroktól (HC) származó szérumot használtunk. A vizsgálatot három évvel később, 2021-ben zártuk le.

3.2 Sejtkultúrák

A kísérletekben humán NSCLC adenokarcinóma sejtvonalakat (A549 (KRAS mutáns) és PC9 (EGFR mutáns: DelE746A750) (American Type Cell Culture Collection, Rockville, MD, USA)) használtunk. Az A549 sejteket teljes Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalajban (DMEM) (Lonza, Walkersville, MD, USA) tenyésztettük, 10% borjú szérummal (FCS), 3%

penicillin/streptomocinnal, 2% L-glutaminnal, 1% nem esszenciális aminosavval, 1% 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etán-szulfonsav (HEPES) pufferrel és 1% β -merkaptotetanollal kiegészítve. A PC9 sejteket Rosewall Park Memorial Institute 1640 táptalajon (RPMI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) tenyésztettük, 10% FCS, 3% penicillin/streptomycin, 2% L-glutamin kiegészítéssel. Az elsődleges kis légúti hámsejteket (SAEC) a Lonza (Lonza, Walkersville, MD, USA) szállította, és Small Airway Growth Medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) táptalajon tenyésztettük. A normál emberi tüdőfibroblasztsejteket (NHLF) Fibroblast Growth Medium (FGM-2) táptalajon tenyésztettük, az elsődleges umbilikális véna endoteliális sejteket pedig Normál, humán (HUVEC) (American Type Cell Culture Collection, Rockville, MD, USA, ATCC® PCS-100-010™) F-12K táptalajban (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) (ATCC® 30-2004™) tartottuk. Minden sejtípust 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú párásított légkörben tenyésztettünk. A sejtek viabilitás ellenőrzését tripán kék festék kiválasztásos teszttel végeztük.⁽⁶⁸⁾

3.3 Háromdimenziós (3D) aggregátum tenyészetek

A 3D aggregátumok NHLF, HUVEC és A549 vagy PC9 sejtekből álltak 4:3:3 arányban. Az aggregátumokat kereskedelmi forgalomban kapható mágneses sejtlevitációs technikával állítottuk elő a Greiner Bio-One Ltd. (Kremsmünster, Ausztria) által gyártott 96 Well Bioprinting Kit és 96 Well BiOAssay™ Kit segítségével. A sejteket NanoShuttle(™) -PL-lel 4 °C-on 4 órán át inkubáltuk (A549, A549-CR, PC9, PC9-CR, NHLF, HUVEC). A mágnesezett sejteket leválasztottuk, megszámoztuk és sejt-taszító lemezre adagoltuk. A sejt-taszító lemezt a tartóra helyeztük a sejtek aggregálása érdekében, majd 37 °C-on 15 percig inkubáltuk. Az aggregátumok alkalmasak voltak génkifejeződés vizsgálatára és gyógyszer-transzporterek immunhisztokémiai festésére.⁽⁶⁸⁾

3.4 Immunhisztokémia

3.4.1 WNT5A kimutatása

Az immunhisztokémiai vizsgálatot 4 μ m vastag FFPE szövetblokkokból kivett szövetmetszeteken végeztük. Az antigén visszanyeréséhez 20 percig pH 9,0-es Tris/EDTA puffert használtunk. A reakciókat BOND polymer refine detection (Leica DS9800) (Leica Biosystems, Deer Park, IL, Egyesült Államok) segítségével vizualizáltuk. WNT5A (klón 3D10)

(MA5-15511, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) monoklonális antitestet használtunk.

3.4.2 Gyógyszer-transzporterek kimutatása

A 3D-aggregátumokat Leica CM1950 kriosztáttal (Leica, Wetzlar, Németország) metszettük, majd fixáltuk és rutin IHC festési eljárással festettük Vision Biosystems bond™ automatizált immunfestőben (Leica, Wetzlar, Németország). Elsődleges antitestként anti-humán ABCG2 egér monoklonális antitestet (CD338, klón 5D3, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) és anti-humán ABCB1 nyúl monoklonális antitestet (klón D3H1Q, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) használtunk, mindkettőt 1:50 hígításban. EpCAM (CD326, 323/A3, MA5-12436, ThermoFisher Scientific, MA, USA), egy jelöletlen egér monoklonális antitest 1:50 hígításban, és Cytokeratin 5 poliklonális nyúl (SC-66856, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 1:100 hígításban. A másodlagos antitest kecske anti-nyúl IgG antitest (Alexa Fluor® 647) (ab150087) (1:2000) (Abcam Plc, Cambridge, Egyesült Királyság) volt, az anti-egér antitest pedig Alexa Fluor® 488 konjugált IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (1:200 hígításban). A magokat Dapiprazole hydrochloride (DAPI) (ab142859) (1:1000) (Abcam Plc, Cambridge, Egyesült Királyság) ellenanyaggal festettük. A képeket Nikon Eclipse Ti-U mikroszkóppal (Nikon GmbH CEE, Bécs, Ausztria) és CCD kamerával (AndorZyla 5.5) készítettük, a denzitometriához ImageJ (Java) szoftvert használtunk. A gyógyszer-transzporter fehérjék intenzitásának kvantifikálását a megfelelő epiteliális marker intenzitásához viszonyítva normalizáltuk.⁽⁶⁸⁾

3.5 WNT jelátviteli rendszerek gyógyszer-transzporter vizsgálatokban

A WNT jelátviteli útvonal gének relatív mRNS expresszióját ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) A549, A549-CR és PC9, PC9-CR 3D aggregátumokban Applied Biosystems™ TaqMan™ Array, Human WNT Pathway, Fast 96-well (Thermo Fisher Scientific Inc. TMO, Waltham, MA, USA) segítségével értékeltük.

3.6 Exoszómák kivonása a szérumból

Általánosságban a vérmintákat a levételt követően 37 °C-on 20 percig alvadni hagytuk, majd 1500×g-vel 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A szérumot ezután -80 °C-on tároltuk a további feldolgozásig. A gyártó utasításai szerint az exoszómákat 400 µl szérummintából

izoláltuk Total Exosome Isolation Reagent (TEI) (szérumból) (4478360, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) segítségével. Röviden: a szérummintákat 2000×g-vel 30 percig centrifugáltuk a sejtek és a törmelék eltávolítása érdekében. Ezután 0,2 térfogatnyi TEI reagens hozzáadása után a mintákat 30 percig 4 °C-on inkubáltuk. A kicsapódott exoszómákat 10 000×g-vel 10 percig szobahőmérsékleten centrifugálással izoláltuk. Az exoszómapelleteket ezután pH 7,4-es PBS-ben, szobahőmérsékleten reszuszpendáltuk.

3.7 Nanorészecske tracking analízis

A valós idejű követéshez és elemzéshez egy 488 nm-es kék lézerrel felszerelt NanoSight NS300 műszert (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Egyesült Királyság) használtunk. Az összes elemzett mintát Ca- és Mg-mentes PBS-ben hígítottuk 1 ml végtérfogatra. Az exoszóma izolátumokat ezután a mérések előtt az optimális NTA detektálási tartományra hígítottuk (10–50 részecske/képkocka). Minden méréshez öt 1 perces videót rögzítettünk a következő feltételek mellett: sejt hőmérséklet: 25 °C; fecskendő sebessége: 50 µl/s. A videókat a beépített NTA v3.2 szoftverrel elemeztük.

3.8 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A TEM-et az exoszómák vizualizálására használtuk. Minden mintából 2,5 µl-t helyeztünk egyenként egy 300-mesh-es rácstra. A rácst egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 5% uranil-acetátot és 3% nátrium-citrátot adtunk hozzá. 5 perces inkubálás után a rácst levegőn szárítottuk. Huszonnégy órával később a rácst JEOL TEM (JEOL Ltd., Tokió, Japán) 1200 EX készülékkel elemeztük.

3.9 EV antitest-array

Az EV-specifikus marker elemzést Exo-Check antitest-array (EXORAY210B-8, System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) segítségével végeztük el. 60 µg EV-készítményt adtunk a membránalapú blot array-hez, és a gyártó utasításait követtük. A kemilumineszcencia intenzitását G:BOX Chemi XRQ (Syngene, Cambridge, UK) segítségével mértük.

3.10 WNT5A ELISA

A szérum, az exoszómamentes szérum és az exoszómák WNT5A-tartalmának kvantitatív meghatározásához humán WNT5A (Wnt-5a fehérje) ELISA készletet (EH1164, FineTest, Wuhan, Kína) használtunk. A kiindulási térfogat minden esetben 400 µl szérum volt. Továbbá, a WNT5A és az exoszómák közötti összefüggés és eloszlás vizsgálatához az izolált pelletet 395 µl PBS-ben reszuszpendáltuk, hogy meghatározzuk a WNT5A tartalmat az exoszómák felületén. Az exoszómák teljes WNT5A-tartalmának meghatározásához a mintákat 95 µl jéghideg RIPA-pufferrel (89900, Pierce RIPA buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) kezeltük az exoszómák membránjainak megzavarása érdekében. Az összes mintát 5 µl 100x Halt-Protease inhibitor koktéllal (87786, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) inkubáltuk. A mintákat a megfelelő pufferekkel kevertük össze, és 15 percig jégen inkubáltuk. A fehérje koncentrációját BCA-teszttel határoztuk meg a Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. Minden reagens, standard és minta a gyártó utasításai szerint került előkészítésre. A minták abszorpcióját 450 nm-en Perkin Elmer Enspire Multiplate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) segítségével rögzítettük. A célkoncentrációkat előre meghatározott koncentrációjú standardokból létrehozott standard görbéből interpoláltuk. Minden mintát kétszer mértünk. A részecskénkénti WNT5A fehérje mennyiségét az ELISA-val meghatározott WNT5A koncentráció és az NTA-val detektált részecskekoncentráció hányadosaként számítottuk.

3.11 RNS izolálás és további vizsgálatok EV-ben és gyógyszer transzporter vizsgálatokban

3.11.1 Teljes RNS izolálás EV-ből és Nanostring analízis

A teljes RNS-t az exoszómákból a Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, a gyártó utasításai szerint izoláltuk. Az izolált RNS-t 50 µl RNáz-mentes vízzel eluáltuk. Az eluens (50 µl) mennyiségét vákuumkoncentrátorral 5 µl-re koncentráltuk. A miRNA profilalkotáshoz a NanoString nCounter® microRNA platformot (3. verzió) (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) használtuk a gyártó utasításai szerint. A minőség-ellenőrzés megerősítette a futtatás megbízhatóságát, valamint a miRNA szűrési protokoll érvényességét és reprodukálhatóságát. Az adatok elemzéséhez és normalizálásához nSolver szoftvert használtunk. A normalizálást a

plazma- és szérummintákban végzett nCounter miRNA expresszióelemzés technikai utasításainak megfelelően, „Housekeeping” módszerrel végeztük.

3.11.2 RNS izolálás, cDNS szintézis és qRT-PCR gyógyszer-transzporter vizsgálatokban

A sejt kultúrákat RA1 pufferoldatban gyűjtöttük, majd a gyártó utasításai szerint (Macherey-Nagel, Düren, Németország) NucleospinII RNA izolációs készlettel izoláltuk az RNS-t. Az RNS koncentrációját Nanodrop technológiával (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mértük. A cDNS szintézist a nagy kapacitású RNS-cDNS készlet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) véletlenszerű hexamer primerekkel végeztük a gyártó protokollja szerint. A szekvensspecifikus primerekkel végzett SYBRGreen (Roche, Bazel, Svájc) valós idejű qRT-PCR reakciót Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével állítottuk be. A különböző gyógyszer-transzporterek relatív mennyiségét a $2^{-(ddCt)}$ módszerrel számítottuk. A belső kontroll minden mintában β -aktin volt.

3.12 Az ABC gyógyszer-transzporterek funkcionalitásának vizsgálata

A vad típusú és a ciszplatin-rezisztens (CR) A549 és PC9 sejteket PBS-sel mostuk, majd tripszinizáltuk. A sejteket megszámoltuk, FACS csövekbe soroltuk, 100 000 sejt/cső, három párhuzamos mintában. Az ABCB1 és ABCG2 transzporterek funkcionális aktivitásának mérésére MultiDrugQuant™ Kit (SOLVO Biotechnology, Szeged, Magyarország) és áramlási citometriát használtunk. Az áramlási citometriához BD FACScanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) és BD FACSDiva V5.1 szoftvert (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) használtunk. Az eredményeket a gyártó utasításai szerint multidrug resistance (MDR) aktivitási tényező értékeként (MAF) számítottuk. A számításokat a három példány mediánja alapján végeztük. A 20 feletti MAF értékeket funkcionálisan aktív gyógyszer transzporter fehérjéknek tekintjük.⁽⁶⁸⁾

3.13 Gyógyszerek és reagensek

A gyógyszereket, beleértve a ciszplatint, a karboplatint és a paclitaxelt, a Selleckchem (Houston, TX, USA) szállította. A CR NSCLC sejtvonalak előállításához a ciszplatin kiindulási koncentrációja az A549 sejt kultúrákban 1 μ M volt, míg a végső koncentráció 3 héten belül

elérte a 12 μM -t. A PC9 sejtkultúrákban a ciszplatin kiindulási koncentrációja 0,67 μM volt, amelyet 3 héten belül 4,67 μM -re emeltek. A karboplatin és a paklitaxel kezelést 24 órán át, 100 μM , illetve 0,002 μM koncentrációban alkalmaztuk.

3.14 Statisztikai elemzés

3.14.1 Az exoszómák vizsgálatának statisztikai elemzése

Az adatok átlag $\pm$ SD-ként vannak kifejezve. A normál eloszlást Shapiro-Wilk-próbával teszteltük. Két specifikáció összehasonlításához Mann–Whitney U-próbát vagy párosítatlan t-próbát, három vagy több specifikáció összehasonlításához Kruskal-Wallis-próbát vagy egyutas ANOVA-t használtunk. A szérum, az exoszómamentes szérum és az exoszóm WNT5A küszöbértékeit ROC görbe elemzésével vagy a legjobb küszöbérték-módszerrel, ami egy orvosi kutatásokra szabott webes túlélési elemző eszköz. Röviden: az alsó és felső kvartilisek közötti összes lehetséges küszöbértéket kiszámítottuk, és a legjobban teljesítő küszöbértéket használjuk küszöbértéknek. A Kaplan–Meier-módszert alkalmaztuk a túlélési görbék előállításához az első kezelés és a halál közötti időtartam alapján. A log-rank tesztet (Mantel–Cox) alkalmaztuk a túlélési eloszlások összehasonlítására. Minden elemzésnél kétoldalas $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 9.0.0 szoftver (GraphPad, Palo Alto, USA) segítségével végeztük.

A differenciális expresszióelemzést t-próbákkal végeztük, és kiszámítottuk a szorzóváltozásokat. Benjamini- és Hochberg-korrigált p-értékeket is számítottunk. Az adatok előfeldolgozását és a differenciális expresszióelemzést az R statisztikai csomaggal ⁽⁶⁹⁾ végeztük. A hő térképek vizualizálásához a heatmap csomagot (R) használtuk ⁽⁷⁰⁾.

3.14.2 Gyógyszer-transzporter vizsgálatok statisztikai elemzése

A statisztikai elemzést az SPSS 26.0 csomaggal végeztük Windows rendszerre (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA). A normál eloszlást Kolmogorov–Smirnov-próbával teszteltük. A két független csoport közötti különbségeket nem paraméteres számításként Mann–Whitney-U-próbával számítottuk ki. A normál eloszláshoz független minták t-próbáját és Kruskal–Wallis-próbát végeztünk. Az eredményeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha $p < 0,05$.

3.15 IPA-elemzés

A funkcionális elemzéshez az Ingenuity programot (Ingenuity Systems, USA; <http://analysis.ingenuity.com>) használtuk. A differenciálisan expresszáldó miRNA-kat miRNA célszűrőknek vetettük alá, és daganatos betegség, VEGF, VEGF család ligand-receptor interakciók, epitheliális adhéziós kapcsolatok, tight junction jelátvitel és NSCLC jelátvitel szűrők alkalmazásával hoztuk létre az mRNA célszűrő listákat. Ezután Molecule Activity Predictor (MAP) elemzést alkalmaztunk a molekuláris aktiváció vagy gátlás előrejelzésére.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1 A WNT5A mint biomarker

Korábbi kutatások már igazolták, hogy a WNT5A következetesen társul különböző daganat fajtákhoz^(33,76), de biomarkerként való potenciálja még nagyrészt nem igazolt. Kutatásunkban azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a szérumban vezikulamentes és vezikulához kötött frakcióinak elkülönítése megbízhatóan eltérő WNT5A-szinteket eredményezhet, és prediktív, prognosztikai vagy diagnosztikai értéket adhat NSCLC-s betegek esetében. Kezdetben azt figyeltük meg, hogy a reszekált tumoros szövetekben megemelkedett WNT5A-szintek nem álltak összefüggésben a csökkent teljes túléléssel, és nem különböztették meg a NSCLC altípusait, a LUAD-ot és a LUSC-t, megerősítve a szakirodalomban szereplő adatokat. A szérumban exoszómamentes és exoszómás frakcióinak elkülönítésével azonban szignifikáns különbségek mutatkoztak a WNT5A-szintekben a LUAD és a LUSC altípusok között. A LUSC-betegeknél alacsonyabb volt a keringő exoszómák szintje, mint a LUAD-os betegeknél vagy az egészséges kontrolloknál. Ezenkívül a LUSC-exoszómák szignifikánsan több WNT5A-t tartalmaztak mind a felületükön, mind a belsejükben, mint a LUAD-os betegeké. Ezenkívül a LUAD-betegek exoszómamentes szérumban szignifikánsan magasabb WNT5A-szintek voltak, mint a LUSC-betegeknél, ami arra utal, hogy a NSCLC két altípusa eltérő extracelluláris WNT5A-profilokkal rendelkezik. A WNT5A-tartalom különbsége az exoszómákban és az exoszómamentes szérumban arra utal, hogy a WNT5A elhelyezkedése jelentős szerepet játszhat a LUAD és a LUSC klinikai kimenetelében. A WNT5A vezikulákban nem található és vezikulához kötött formáinak szerepét vizsgáló korábbi kutatások kimutatták, hogy a szekretált és a vezikulához kötött WNT5A aránya a sejttípustól és a sejtkontextustól függ. Míg a szekretált WNT5A agresszívebb daganat fenotípust tűnik elősegíteni, az extracelluláris vezikulákban található WNT5A kontextusfüggő hatásokat mutathat, potenciálisan gátolva vagy elősegítve a daganat progresszióját.^(77,78) Vizsgálatunkban az exoszómákhoz kötött WNT5A magas szintje laphámkarinómával és rövidebb túléléssel társult, míg az exoszómamentes szérumban magasabb WNT5A-szint jobb túlélésre utalt adenokarcinómában, ami arra utal, hogy a WNT5A megjelenésének kontextusa és szekréciónak módja döntő fontosságú a rákban betöltött funkciója szempontjából. További vizsgálatokra van szükség a WNT5A extracelluláris térbe és vezikulákba való szelekciójának és szortírozásának molekuláris mechanizmusainak tisztázására NSCLC altípusokban, hogy megértsük a túlélésre gyakorolt eltérő hatásokat. Ezen különbségek megértése új terápiás célpontok azonosításához is vezethet, ami különösen fontos, mivel az exoszómákhoz kötődő magas WNT5A-szintek

sokkal agresszívebb betegségekre utalnak, amely magasabb metasztatikus potenciállal és rövidebb túléléssel jár.^(77,78) Szintén jelentős, hogy egy egyszerű vérmintából és a szérumban és az exoszómákban mért WNT5A-szintből a diagnózis idején meghatározható lehet a betegség előrehaladott stádiuma, a nyirokcsomó-áttét, a távoli áttét, és előre jelezhető a terápia hatástalansága. Talán kevésbé meglepő, hogy mindezek a jellemzők összefüggésbe hozhatók a laphámsejteskarcinómás betegekkel és azok alacsony túlélésével. LUAD-ban az exoszómákhoz kapcsolódó WNT5A-szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak és szignifikánsan hosszabb össz-túléléssel társultak. A szérumban WNT5A előfordulásának különbsége új diagnosztikai biomarkerként is szolgálhat a LUSC és a LUAD megkülönböztetésére. Míg más tanulmányok is megállapították, hogy a magas WNT5A expresszió valamilyen módon összefügg a rossz prognózissal NSCLC-betegeknél, különösen a LUSC alcsoportban,⁽⁷⁹⁾ jelen kutatás az első, amely meghatározta a szérumban és a szérumból származó exoszómákhoz kapcsolódó WNT5A pontos helyét, valamint diagnosztikai és prognosztikai értékét meghatározott küszöbértékekkel. Összefoglalva, a WNT5A specifikus extracelluláris formáinak mérése folyadékbiopszia segítségével fontos klinikai információkat szolgáltat, amelyek kiegészítik a szöveti biomarkereket és támogatják a NSCLC kezelési döntéseit.

4.2 A szérumban exoszómákból származó mikroRNS-ek mint potenciálisan prediktív markerek NSCLC-ben

Az elmúlt néhány évben több kutatás alapján feltételezték, hogy a keringő mikroRNS-ek biomarkerként funkcionálhatnak NSCLC-ben.^(48,47) Ezen tanulmányok elsődleges célja a betegség korai felismerésének elősegítése és a gyors és hatékony terápiaválasztás, emellett új terápiás célpontok azonosítása révén a hosszú távú túlélés esélyének növelése volt.⁽⁴⁷⁾ A korábbi tanulmányokkal ellentétben, kutatásunk az első, amely képes volt összefüggésbe hozni a szérumban exoszómákból származó mikroRNS profilokat a differenciáldiagnózissal és további kutatás folyik annak érdekében, hogy a szérumban exoszómákból származó mikroRNS-eket potenciális prediktív biomarkerként azonosítsuk a NSCLC terápiás válaszára vonatkozóan.

4.3 LUAD sejtvonalak gyógyszer-transzporter elemzése a terápiarezisztencia vizsgálatára

Kutatásunkban a ciszplatin hatását vizsgáltuk különböző, KRAS és EGFR onkogén mutációs háttér esetében. Két LUAD sejtvonal molekuláris mikrokörnyezetét elemeztük, és összehasonlítottuk normál tüdőepithel sejtekkel. Mindkét LUAD sejtvonalban a normál kontrollhoz képest emelkedett ABCB1 és ABCG2 ABC-transzporter expressziót figyeeltünk

meg. A KRAS-mutáns A549 sejtekben mind az ABCB1, mind az ABCG2 expressziója magasabb volt, mint az EGFR-mutáns PC9 sejtekben, ami arra utal, hogy a mutációs háttér befolyásolja a gyógyszer-transzporter expresszióját. Ezenkívül adataink azt mutatják, hogy a krónikus ciszplatin-expozíció modulálja ezeknek a transzportereknek az expresszióját. Az ABCB1 és ABCG2 expressziója és funkcionális aktivitása eltérően változott attól függően, hogy a sejtek KRAS- vagy EGFR-mutációt hordoztak-e, ami alátámasztja az MDR-mechanizmusok mutációfüggő természetét tüdőrákban. Az emberi tüdőtumor mikro környezetének jobb utánzása érdekében KRAS-mutáns (A549), EGFR-mutáns (PC9) és azok ciszplatin-rezisztens megfelelői (A549-CR, PC9-CR) sejteket 3D aggregátumokból álló co-kultúrában tenyésztettük a klinikailag relevánsabb kísérletekhez. Bár a ciszplatin továbbra is az egyik legrégebbi kemoterápiás szer, kombinált kezelésekben még mindig széles körben használják. Toxikus hatása és gyakran korlátozott tolerálhatósága miatt a ciszplatint helyettesíthetik más platina-alapú szerekkel, például karboplatinval. A karboplatint általában olyan gyógyszerekkel kombinálják, mint a paclitaxel, a vinorelbin vagy a gemcitabin, a választást a beteg mutációs háttere befolyásolja. A 3D-s co-kultúra modellel megállapítottuk, hogy a karboplatinra vagy kombinációs terápiákra való áttérés előtt alkalmazott ciszplatin-kezelés, különösen magas hatékonysága miatt, jelentősen emelte az ABCB1 (P-gp) mRNS-szinteket, amelyek a multirezisztencia kulcsfontosságú mediátorai.⁽⁸³⁾ Az ABCB1-ről ismert, hogy kipumpálja a különböző kemoterápiás szereket, többek között a vinka-alkaloidokat, az antraciklineket, a taxánokat és különösen a paclitaxelt. Mivel a paclitaxel az előrehaladott stádiumú LUAD kezelésének egyik alapvető gyógyszere,^(84,85) az ABCB1 expressziója a terápiás választ előrejelző markereként szolgálhat.⁽⁸⁶⁾ A ciszplatin-rezisztens A549-CR sejtekben az ABCB1 szintje tovább emelkedett karboplatin és paclitaxel kezelés után, akár önmagában, akár kombinációban. Ezzel szemben az ABCG2 expressziója csökkent, ami rámutat a transzporter expressziójának érzékenységeire mind a mutációs háttér, mind a kezelés tekintetében. Ezek az eredmények alátámasztják a 3D-s co-kultúrák hasznosságát a gyógyszerre adott válaszok modellezésében. Elvileg az ABCB1 gátlása javíthatja a kezelés hatékonyságát. Ennek megfelelően a gyógyszeripar is vizsgálta az ABC transzporter gátlásának lehetőségét. Például a Tariquidart, egy hatékony ABCB1 gátlót, karboplatin/paclitaxel kombinációban tesztelték III. fázisú klinikai vizsgálatokban nem kissejtes tüdőrákban, mivel várhatóan fokozza a kemoterápia hatékonyságát. Ezeket a vizsgálatokat azonban a Tariquidar-csoportban megnövekedett kemoterápiával kapcsolatos toxicitás miatt abbahagyták.⁽⁸⁶⁾ Ennek ellenére a Tariquidar, paclitaxel, docetaxel, karboplatin és ciszplatin alkalmazásával folyamatban lévő és befejezett vizsgálatok arra utalnak, hogy az ABC transzporter aktivitásának szelektív

modulálása ígéretes lehet, feltéve, hogy javítható a daganatos sejtek iránti specifitása.^(87,86) Bár a cisplatin önmagában nem az ABCB1 vagy az ABCG2 szubsztrátja, a cisplatin iránti rezisztencia megváltoztatja ezeknek a transzportereknek az expresszióját. Következésképpen, ha egy beteg már nem tolerálja a cisplatin, a korábbi expozíció a transzporterek upregulációja miatt csökkentheti a másodvonalbeli terápiák hatékonyságát. A WNT jelátviteli út kulcsfontosságú szerepet játszik az ABC transzporter expressziójának szabályozásában. Konkrétan, a TCF/LEF által közvetített β -katenin-függő WNT jelátvitel aktiválja az ABCB1 promótert, növelve annak transzkripcióját.^(88,89) Így a WNT útvonal modulációja közvetlenül befolyásolja a kemoterápiás rezisztenciát.^(89,90) Ez a komplex, evolúciósan konzervált útvonal számos fejlődési és homeosztatikus folyamatot szabályoz,^(24,33) és bár ritkán mutálódik tüdőrákban, szabályozása az egyes tüdőrák altípusok között eltérő. Tanulmányunk mutáció-specifikus különbségeket tárt fel a WNT útvonal génjeinek expressziójában, amelyek modulálják a cisplatinra adott választ. A RHO, a Rho GTPáz család tagja, amely részt vesz a citoskeletális szerveződésben és a metasztázis szabályozásában,⁽⁹¹⁾ körülbelül 10 000-szer nagyobb expressziót mutatott a KRAS-mutáns A549 sejtekben, mint az EGFR-mutáns PC9 sejtekben. Ezzel szemben a PC9 sejtek több WNT ligandumot (WNT1, WNT7A, WNT7B, WNT9A) expresszáltak túlzottan, amelyek szerepet játszanak a LUAD-ban.⁽²⁴⁾ A WNT9A különösen figyelemre méltó a kanonikus WNT/ β -katenin jelátvitel aktiválásában FZD receptorokon keresztül. Hosszan tartó cisplatin-kezelés PC9 sejtekben több β -katenin jelátviteli szabályozót is felülszabályozott, köztük a DACT1-et, a JNK és WNT jelátvitel Dishevelled-kötő antagonistáját.^(92,93) A DACT1 expressziója általában alacsony NSCLC-ben, de más daganat típusokban emelkedett lehet,⁽⁹³⁾ és szabályozásának zavara rossz prognózissal korrelál. A DACT1-et jelenleg terápiás célpontként vizsgálják.⁽⁹³⁾ Ezenkívül a WNT16, amely az apoptózis megakadályozásával támogatja a malignitást, szintén upregulálódott. Legújabb tanulmányok szerint a WNT16-semlegesítő antitestek kemoterápiával kombinálva javíthatják a túlélést.⁽⁹⁴⁾ Más WNT-hez kapcsolódó gének is hasonlóan modulálódtak. A RHO expressziója PC9-CR sejtekben emelkedett,⁽⁹¹⁾ és a tüdő- és vastagbélrákban ismert onkogén TLE4 cisplatin hatására indukálódott.^(95–97) A WISP1, amelyet korábban platina-indukált toxicitással hoztak összefüggésbe tüdőrákban, szintén upregulálódott.⁽⁹⁸⁾ Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a cisplatin átalakíthatja a WNT mikrokörnyezetet az EGFR-mutáns sejtekben, ami potenciálisan befolyásolhatja a kezelés eredményeit. Az A549-CR sejtekben a cisplatin drámai módon felülszabályozta a LEF1-et, a β -katenin útvonal transzkripciós faktorát, valamint az NKD1-et, a WNT jelátvitel negatív visszacsatoló szabályozóját.⁽⁹⁹⁾ Míg az A549-CR sejtek több oldható WNT-gátlót (pl. frizzled-rokon fehérjéket) expresszáltak, a PC9-CR

sejtekben magasabb szintű WNT-ligandok, DACT1, WISP1 és a ko-receptor KREMEN2 voltak kimutathatók. E molekuláris különbségek ellenére a végső válasz – azaz az ABCB1 felülszabályozása – mindkét sejttípusban közös volt. Fontos megjegyezni, hogy az EGFR-mutáns PC9 sejtekben megfigyelt WNT útvonal aktivációja olyan molekulákat is magában foglal, mint a DACT1 és a WNT16, amelyeket már terápiás célpontként vizsgálnak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az EGFR-mutáns LUAD-ban szenvedő betegek számára előnyösebb lehet a WNT jelátviteli komponenseket célzó terápiák alkalmazása, mint az ABCB1 közvetlen gátlása, ami potenciálisan pontosabb és kevésbé toxikus kezelési stratégiát jelenthet. Összefoglalva, a háromdimenziós képképzéssel igazolt kemoterápiás szerek szöveti környezetre gyakorolt hatása még tisztázásra szorul. A tanulmányban használt gyógyszerek mind 2D, mind 3D formában megegyeznek a betegeknek adott gyógyszerekkel. Ezt követően összehasonlítást végeztünk, hogy megállapítsuk, mely transzporterek expresszálódtak. A LUAD KRAS vagy LUAD EGFR összehasonlító vizsgálata azt mutatja, hogy ugyanazon kemoterápiás kezelésre eltérő válaszokat adnak. Ezenkívül a gyógyszer-transzporterek fokozott expressziója a gyógyszerek tumorba való kiáramlásához vezet, ami gátolja a tumorsejtek elhalását. Eredményeink azt mutatják, hogy a LUAD-ban a ciszplatín-rezisztencia szorosan összefügg a WNT-jelátvitel mutáció-specifikus változásaival és az ABC-transzporter expressziójával. Figyelemre méltó, hogy az EGFR-mutáns sejtek fokozott expressziót mutattak a WNT-útvonal komponenseinek, beleértve a DACT1 és a WNT16, valamint az ABCB1 szintjének emelkedését. Ezek a változások hozzájárulhatnak a multirezisztenciához és befolyásolhatják a kezelés hatékonyságát. Fontos megjegyezni, hogy az EGFR-mutáns sejtekben megfigyelt WNT-vel kapcsolatos változások további, potenciálisan célba vehető útvonalakra utalnak, amelyek felhasználhatók a kezelés hatékonyságának növelésére és a toxicitás csökkentésére. Így a WNT-útvonal gátlóinak integrálása a hagyományos kemoterápiába mutáció-specifikus, hatékonyabb terápiás stratégiát jelenthet az EGFR-mutáns LUAD-ban szenvedő betegek számára.

5. Az új eredmények összefoglalása

1. Kutatásunk a WNT5A-t ígéretes, nem invazív biomarkerként azonosította a nem kissejtes tüdőrák diagnosztizálásában és prognózisában, amelynek klinikai jelentősége erősen függ a szekréció módjától.

2. Az exoszómamentes szérumban és az exoszómához kötött WNT5A elemzésével különböző extracelluláris profilokat találtunk a LUAD- és LUSC-betegek esetén. A magas exoszómához kötött WNT5A szint LUSC-hez, előrehaladott betegséghez és rosszabb általános túléléshez kapcsolódott, míg az exoszómamentes szérumban megemelkedett WNT5A jobb kimenetelt jósolt LUAD-betegeknél. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a WNT5A kompartmentalizációja, és nem csupán teljes expressziója, értékes eszköz lehet a NSCLC altípusok megkülönböztetésében, a prognózis rétegzésében és potenciálisan a terápia kiválasztásában.
3. A WNT5A specifikus extracelluláris formáinak mérése folyékony biopszia segítségével fontos klinikai információkat szolgáltat, amelyek kiegészítik a szöveti biomarkereket és támogatják a NSCLC kezelési döntéseit.
4. Kutatásunk az első, amely kimutatta, hogy a szérumban exoszómákból származó mikroRNS-ek képesek megkülönböztetni az egészséges és a NSCLC mikroRNS-profilokat.
5. Kutatásaink alátámasztják a tüdőadenokarcinóma multirezisztenciájának (MDR) mutáció-specifikus mechanizmusait, különös tekintettel arra, hogy az EGFR- és KRAS-mutációk hogyan befolyásolják eltérő módon az ABC-transzporter expresszióját és a WNT-jelátvitelt a ciszplatin-kezelésre adott válaszként. A ciszplatin-rezisztens sejtek, különösen az EGFR-mutációval rendelkező sejtek, az ABCB1 és a WNT-jelátviteli út kulcsfontosságú komponenseinek, például a DACT1 és a WNT16, a kemoterápiás rezisztenciával és rossz prognózissal összefüggő faktorok jelentős upregulációját mutatták. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a WNT jelátvitel célzása, az ABCB1 közvetlen célzása helyett, hatékonyabb és kevésbé toxikus stratégiát jelenthet az EGFR-mutációval rendelkező tüdőadenokarcinóma MDR-ének leküzdésére, lehetővé téve a személyre szabottabb és a mutációhoz igazodó kezelési módszerek alkalmazását.

6. Hivatkozások

1. Chaitanya Thandra, K., Barsouk, A., Saginala, K., Sukumar Aluru, J. & Barsouk, A. Epidemiology of lung cancer. *Współczesna Onkologia* **25**, 45–52 (2021).
2. de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W. & Munden, R. F. A tüdőrák epidemiológiája. *Transl Lung Cancer Res* **7**, 220–233 (2018).
3. Barta, J. A., Powell, C. A. és Wisnivesky, J. P. A tüdőrák globális epidemiológiája. *Ann Glob Health* **85**, (2019).
4. SEER rákstatisztikai áttekintés, 1975–2014 .
5. Cooper, W. A., Lam, D. C. L., O'Toole, S. A. és Minna, J. D. A tüdőrák molekuláris biológiája. *J Thorac Dis* **5 Suppl 5**, S479-90 (2013).
6. Francisci, S. *et al.* Túlélési minták tüdő- és pleura rákban Európában 1999–2007: Az EUROCORE-5 tanulmány eredményei. *Eur J Cancer* **51**, 2242–2253 (2015).
7. De Angelis, R. *et al.* Rák túlélés Európában 1999–2007 országok és életkor szerint: az EUROCORE-5 eredményei – egy populációalapú tanulmány. *Lancet Oncol* **15**, 23–34 (2014).
8. Tüdőrák Magyarországon.
9. Bray, F. *et al.* Globális rákstatisztikák 2018: GLOBOCAN becslések 36 rákos megbetegedés előfordulási gyakoriságáról és halálozási arányáról 185 országban. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
10. Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F. & Heist, R. S. Tüdőrák. *The Lancet* **398**, 535–554 (2021).
11. Detterbeck, F. C. *et al.* Az IASLC tüdőrák stádiumbeosztási projekt: Összefoglalás a több tüdőterületet érintő tüdőrákok osztályozásának felülvizsgálatára vonatkozó javaslatokról a TNM osztályozás hamarosan megjelenő nyolcadik kiadásában. *Journal of Thoracic Oncology* **11**, 639–650 (2016).
12. Raso, M. G., Bota-Rabasedas, N. és Wistuba, I. I. A SCLC patológiája és osztályozása. *Cancers (Basel)* **13**, 820 (2021).
13. J. Saller, J. és Boyle, T. A. A tüdőrák molekuláris patológiája. *Cold Spring Harb Perspect Med* **12**, a037812 (2022).
14. Gurda, G. T. *et al.* Öt gyakran használt immunhisztokémiai marker (TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 és P63) hasznossága primer és metasztatikus adenokarcinómában és laphámsejtes karcinómában a tüdőben: retrospektív tanulmány 246 finom tű aspirációs esetről. *Clin Transl Med* **4**, (2015).
15. A laphámsejtes tüdőrákok átfogó genomikus jellemzése. *Nature* **489**, 519–525 (2012).
16. A tüdő adenokarcinóma átfogó molekuláris profilozása. *Nature* **511**, 543–550 (2014).
17. Altorki, N. K. *et al.* A tüdő mikrokörnyezete: a tumor növekedésének és metasztázisának fontos szabályozója. *Nat Rev Cancer* **19**, 9–31 (2019).
18. López-Camarillo, C., Ruiz-García, E., Starling, N. & Marchat, L. A. Szerkesztői cikk: Neovaszkularizáció, angiogenezis és vaszkulogén mimikri a rákban. *Front Oncol* **10**, (2020).

19. Zhao, Y. *et al.* VEGF/VEGFR-célzott terápia és immunterápia nem kissejtes tüdőrákban: a tumor mikroenvironmentjének célzása. *Int J Biol Sci* **18**, 3845–3858 (2022).
20. Frezzetti, D. *et al.* A VEGF mint potenciális célpont a tüdőrákban. *Expert Opin Ther Targets* **21**, 959–966 (2017).
21. Assoun, S., Brosseau, S., Steinmetz, C., Gounant, V. & Zalcman, G. Bevacizumab előrehaladott tüdőrákban: a legújabb eredmények. *Future Oncology* **13**, 2515–2535 (2017).
22. Hendrixson, M., Gladkiy, Y., Thyagarajan, A. és Sahu, R. P. A sorafenib-alapú terápiák hatékonysága nem kissejtes tüdőrákban. *Medical Sciences* **12**, 20 (2024).
23. Stewart, D. J. A Wnt jelátviteli út nem kissejtes tüdőrákban. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **106**, djt356–djt356 (2014).
24. Rapp, J., Jaromi, L., Kvell, K., Miskei, G. és Pongracz, J. E. WNT jelátvitel – a tüdőrák sem kivétel. *Respir Res* **18**, 167 (2017).
25. De Langhe, S. P. és Reynolds, S. D. A Wnt jelátvitel a tüdő organogenezisében. *Organogenesis* **4**, 100–108 (2008).
26. Mucenski, M. L. *et al.* A β -katenin szükséges a proximális/distális sejtek sorsának meghatározásához a tüdő morfogenezisében. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 40231–40238 (2003).
27. Li, C., Xiao, J., Hormi, K., Borok, Z. & Minoo, P. A Wnt5a részt vesz a tüdő distális morfogenezisében. *Dev Biol* **248**, 68–81 (2002).
28. Li, C. *et al.* A Wnt5a szabályozza a Shh és Fgf10 jelátvitelt a tüdő fejlődése során. *Dev Biol* **287**, 86–97 (2005).
29. Qin, L. *et al.* A WNT5A elősegíti a nasopharyngealis carcinoma sejtek összejtjellegét, ami metasztázishoz és tumorogenezishez vezet. *Oncotarget* **6**, 10239–10252 (2015).
30. Okubo, T. és Hogan, B. L. A hiperaktív Wnt jelátvitel megváltoztatja az embrionális tüdő endodermájának fejlődési potenciálját. *J Biol* **3**, 11 (2004).
31. Sunaga, N. *et al.* A Wnt jelátviteli út konstitutív aktiválása CTNNB1 (béta-katenin) mutációk által egy emberi tüdőadenokarcinóma alcsoportjában. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 316–21 (2001).
32. Stewart, D. J. A Wnt jelátviteli út nem kissejtes tüdőrákban. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **106**, djt356–djt356 (2014).
33. Pongracz, J. E. és Stockley, R. A. A Wnt jelátvitel a tüdő fejlődésében és betegségeiben. *Respir Res* **7**, 15 (2006).
34. Yang, J. *et al.* A Wnt jelátvitel mint potenciális terápiás célpont a tüdőrákban. *Expert Opin Ther Targets* **20**, 999–1015 (2016).
35. Linton, K. J. Az ABC transzporterek szerkezete és funkciója. *Physiology* **22**, 122–130 (2007).
36. Sharma, P., Singh, N. & Sharma, S. Az ABCB1, ABCC1, ABCC2 és ABCG2 variánsok hatása az észak-indiai tüdőrákos betegek prognózisának és klinikai eredményeinek előrejelzésében, akik platina-alapú kettős kemoterápiában részesülnek. *J Gene Med* **25**, (2023).
37. Li, C. *et al.* Az exoszomális miRNA-k szerepe a rákban. *J Transl Med* **20**, 6 (2022).

38. Iwakawa, H. és Tomari, Y. A RISC élete: az RNS-indukált csendesítő komplex kialakulása, működése és lebomlása. *Mol Cell* **82**, 30–43 (2022).
39. Fang, H. és DeClerck, Y. A. A tumor mikro környezetének célzása: az útvonalképzés megértésétől a hatékony klinikai vizsgálatokig. *Cancer Res* **73**, 4965–4977 (2013).
40. Duan, X. *et al.* A szérumban keringő mikroRNS-ek biomarkerek a nem kisesejtes tüdőrák korai diagnosztizálásában. *Front Genet* **12**, (2021).
41. Florczuk, M., Szpechcinski, A. & Chorostowska-Wynimko, J. miRNA-k biomarkerként és terápiás célpontként nem kisesejtes tüdőrákban: jelenlegi perspektívák. *Target Oncol* **12**, 179–200 (2017).
42. Tenchov, R. *et al.* Exoszómák – a természet lipid nanorészecskéi, a gyógyszeradagolás és diagnosztika feltörekvő csillagai. *ACS Nano* **16**, 17802–17846 (2022).
43. Zhu, L. *et al.* Exoszómák izolálása és jellemzése rákkutatás céljára. *J Hematol Oncol* **13**, 152 (2020).
44. Brunelli, A. *et al.* Morbiditás és mortalitás lobektómia vagy pneumonektómia után neoadjuváns kezelés után: elemzés az ESTS adatbázisból. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **57**, 740–746 (2020).
45. Zhu, Z. *et al.* Nemzetközi konszenzus a metasztatikus nem kisesejtes tüdőrák sugárterápiájáról. *Transl Lung Cancer Res* **11**, 1763–1795 (2022).
46. Levy, A. *et al.* Sztereotaktikus test sugárterápia központi elhelyezkedésű, operálhatatlan korai stádiumú NSCLC esetén: EORTC 22113–08113 LungTech II. fázisú vizsgálat eredményei. *Journal of Thoracic Oncology* **19**, 1297–1309 (2024).
47. Arbour, K. C. és Riely, G. J. Szisztémás terápia lokálisan előrehaladott és áttétes nem kisesejtes tüdőrák esetén. *JAMA* **322**, 764 (2019).
48. Chaft, J. E. *et al.* A szisztémás terápia fejlődése az I–III. stádiumú nem áttétet képező nem kisesejtes tüdőrákban. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 547–557 (2021).
49. Herrera-Juárez, M., Serrano-Gómez, C., Bote-de-Cabo, H. & Paz-Ares, L. Célzott terápia tüdőrák esetén: az EGFR és az ALK túlmutatva. *Cancer* **129**, 1803–1820 (2023).
50. Imyanitov, E. N., Iyevleva, A. G. & Levchenko, E. V. Molekuláris vizsgálatok és célzott terápia nem kisesejtes tüdőrák esetén: Jelenlegi helyzet és kilátások. *Crit Rev Oncol Hematol* **157**, 103194 (2021).
51. Herrera-Juárez, M., Serrano-Gómez, C., Bote-de-Cabo, H. és Paz-Ares, L. Célzott terápia tüdőrák esetén: az EGFR és az ALK után. *Cancer* **129**, 1803–1820 (2023).
52. Lahiri, A. *et al.* Tüdőrák immunterápia: előrelépések, buktatók és ígéretes eredmények. *Mol Cancer* **22**, 40 (2023).
53. Rosellini, P. *et al.* Az STK11 mutáció klinikai hatása előrehaladott nem kisesejtes tüdőrákban. *Eur J Cancer* **172**, 85–95 (2022).
54. Xu, K., Lu, W., Yu, A., Wu, H. & He, J. Az STK11 mutáció hatása a nem kisesejtes tüdőrákos betegek terápiás hatékonyságára és prognózisára: meta-elemzések és bioinformatikai elemzések alapján készült átfogó tanulmány. *BMC Cancer* **24**, 491 (2024).
55. Tume, P. C. *et al.* A PD-1 blokádt adaptív immunrezisztencia gátlásával indukál válaszokat. *Nature* **515**, 568–571 (2014).

56. Reck, M. *et al.* Pembrolizumab versus kemoterápia PD-L1-pozitív nem kisesejtes tüdőrákban. *New England Journal of Medicine* **375**, 1823–1833 (2016).
57. Russo, A. E. *et al.* Bevacizumab NSCLC kezelésében: betegválasztás és perspektívák. *Lung Cancer: Targets and Therapy* **Volume 8**, 259–269 (2017).
58. Reck, M. *et al.* A pulmonalis vérzés kockázatának előrejelzése és kezelése bevacizumabbal kezelt NSCLC-betegeknél: szakértői panel konszenzusos jelentése. *Annals of Oncology* **23**, 1111–1120 (2012).
59. Jaromi, L. *et al.* A KRAS és EGFR mutációk eltérő módon módosítják az ABC gyógyszer-transzporter expresszióját cisplatin-rezisztens nem kisesejtes tüdőrákban. *Int J Mol Sci* **22**, 5384 (2021).
60. R Core Team. R: Nyelv és környezet statisztikai számításokhoz. Bécs: R Foundation for Statistical Computing. (2021).
61. Raivo Kolde. pheatmap: Szép hő térképek. R csomag 1.0.12 verzió. (2019).
62. Bovari-Biri, J., Garai, K., Banfai, K., Csongei, V. & Pongracz, J. E. miRNA-k mint a barrier integritásának előrejelzői. *Biosensors (Basel)* **13**, 422 (2023).
63. Ma, T. Y., Boivin, M. A., Ye, D., Pedram, A. & Said, H. M. A TNF- α modulációjának mechanizmusa a Caco-2 bélhám szoros kötési gátjában: a miozin könnyű lánc kináz fehérje expressziójának szerepe. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **288**, G422–G430 (2005).
64. Vesel, M. *et al.* Az ABCB1 és ABCG2 gyógyszer-transzporterek eltérő módon expresszálódnak a nem kisesejtes tüdőrákban (NSCLC), és expressziójukat a ciszplatin kezelés megváltoztatja a Wnt jelátvitel megváltozása révén. *Respir Res* **18**, 52 (2017).
65. Asem, M., Buechler, S., Wates, R., Miller, D. & Stack, M. A Wnt5a jelátvitel a rákban. *Cancers (Basel)* **8**, 79 (2016).
66. Housman, G. *et al.* Gyógyszerrezisztencia a rákban: áttekintés. *Cancers (Basel)* **6**, 1769–1792 (2014).
67. Zawadzka, I. *et al.* Az ABCB1 gén polimorfizmusának és expressziójának hatása a nem kisesejtes tüdőrák kialakulására, progressziójára és terápiájára – előzetes jelentés. *Sci Rep* **10**, 6188 (2020).
68. Gao, B. *et al.* A paklitaxel érzékenysége az ABCB1 expresszió, efflux és egy nukleotid polimorfizmusok összefüggésében petefészekrákban. *Sci Rep* **4**, 4669 (2014).
69. Vaidyanathan, A. *et al.* Az ABCB1 (MDR1) indukciója meghatározza a paklitaxel- és olaparib-rezisztens petefészekrákos sejtekben előforduló közös rezisztenciamechanizmust. *Br J Cancer* **115**, 431–441 (2016).
70. Fox, E. & Bates, S. E. Tariquidar (XR9576): a P-glikoprotein gyógyszer efflux pumpa inhibitor. *Expert Rev Anticancer Ther* **7**, 447–459 (2007).
71. Kelly, R. J. *et al.* A docetaxel és a P-glikoprotein antagonistá tariquidar (XR9576) kombinációjának farmakodinamikai vizsgálata tüdő-, petefészek- és méhnyakrákos betegekben. *Clinical Cancer Research* **17**, 569–580 (2011).
72. Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E. & Oun, R. A platina-alapú rákgyógyszerek helyzete a klinikai gyakorlatban és a klinikai vizsgálatokban. *Dalton Transactions* **39**, 8113 (2010).
73. Chen, J., Emara, N., Solomides, C., Parekh, H. és Simpkins, H. Platina-alapú kemoterápiával szembeni rezisztencia tüdőrákos sejtvonalakban. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**, 1103–1111 (2010).

74. Tsvetkova, E. és Goss, G. D. Gyógyszerrezisztencia és annak jelentősége a nem kisesejtes tüdőrák kezelési döntéseiben. *Current Oncology* **19**, 45–51 (2012).
75. Cardama, G. A., Gonzalez, N., Maggio, J., Menna, P. L. & Gomez, D. E. Rho GTPázok terápiás célpontként a rákban (áttekintés). *Int J Oncol* **51**, 1025–1034 (2017).
76. Cheyette, B. N. R. *et al.* A Dapper, a β -katenin és a JNK jelátvitel disheveled-hez kapcsolódó antagonista, szükséges a notochord kialakulásához. *Dev Cell* **2**, 449–461 (2002).
77. Yin, X. *et al.* A DACT1, a Wnt/ β -katenin jelátvitel antagonista, gátolja a tumorsejtek növekedését és gyakran elnémul a mellrákban. *Breast Cancer Research* **15**, R23 (2013).
78. Sun, Y. *et al.* VISSZAVONT CIKK: Az SFRP2 fokozza a WNT16B jelátvitelt, elősegítve a terápiás rezisztenciát a károsodott tumor mikroenvironmentben. *Oncogene* **35**, 4321–4334 (2016).
79. Yao, X. *et al.* A TLE1 az E-kadherin gátlásán keresztül elősegíti az EMT-t A549 tüdőrákos sejtekben. *Biochem Biophys Res Commun* **455**, 277–284 (2014).
80. Wang, S.-Y. *et al.* A TLE4 elősegíti a kolorektális rák progresszióját a JNK/c-Jun jelátviteli út aktiválása révén. *Oncotarget* **7**, 2878–2888 (2016).
81. Yang, R.-W. *et al.* VISSZAVONOTT CIKK: A TLE3 gátolja a vastagbélrák proliferációját a MAPK és AKT jelátviteli útvonalak gátlásával. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **35**, 152 (2016).
82. Chen, J. *et al.* A WISP1 polimorfizmusok hozzájárulnak a platina-alapú kemoterápia toxicitásához tüdőrákos betegeknél. *Int J Mol Sci* **15**, 21011–21027 (2014).
83. Larraguibel, J. *et al.* A negatív visszacsatolás szabályozója, az Nkd1 Wnt-ligand-függő aktiválása. *Mol Biol Cell* **26**, 2375–2384 (2015).

7. Publikáció

A disszertáció az alábbi publikációkon alapul:

Torok, Z; Garai, K; Miskei, JA; Bóvári-Biri, J; Adam, ZM; Kajtar, B; Sarosi, V; Pongracz, JE:
A szérum és a szérum exoszómák WNT5A szintjei biomarkerként nem kissejtes tüdőrákban
2025. Respiratory Research 2025 26:141 <https://doi.org/10.1186/s12931-025-03216-7> (IF: 4,700; Q1)

Jaromi L, Csongei V, Vesel M, Abdelwahab EMM, Soltani A, **Torok Z**, Smuk G, Sarosi V, Pongracz JE. A KRAS és EGFR mutációk eltérő módon módosítják az ABC gyógyszer transzporter expresszióját ciszplatin-rezisztens nem kissejtes tüdőrákban.

2021. Int J Mol Sci. 2021. május 20.; 22(10):5384. [https://doi: 10.3390/ijms22105384](https://doi.org/10.3390/ijms22105384) (IF: 6,208; Q1, D1)

Összefoglalt IF: 10,908

Készülő/benyújtott kéziratok:

Garai, K; Bóvári-Biri, J; Torok, Z; Herczeg, R; Kajtar, B; Pongracz, JE: Szérum exoszómából származó mikroRNS-ek mint prediktív markerek a bevacizumab által kiváltott mellékhatásokra nem kissejtes tüdőrákban. **2025. Cancer**

További kutatási cikkek:

Kiss, E; Abdelwahab, EMM; Steib, A; Papp, E; **Torok, Z**; Jakab, L; Smuk, G; Sarosi, V; Pongracz, JE: A ciszplatin kezelés által kiváltott interleukin 6 és 8 termelés onkogén mutációtól függő módon megváltoztatja a tüdőadenokarcinoma sejtek migrációját.

2020. Respiratory Research, 21:120; doi: 10.1186/s12931-020-01389-x; (IF: 5,631; Q1)

Török, Zsófia Laura; Sárosi, Veronika; Szabó, Zoltán; Szentkirályi, Éva; Bátai, István; Kerényi, Mónika: Helyi érzéstelenítők hatása a bronchoszkóppal vett bakteriológiai eredményekre

Medicina Thoracalis (Budapest) 74: 3 pp. 157-160., 4 p. (2021)

Török, Zsófia Laura; Ruzsics, István; Gódi, Szilárd; Cseke, László; Mühl, Diána; Szigeti, Nóra; Sárosi, Veronika: Hidropneumothorax és ami mögötte volt

Medicina Thoracalis (Budapest) 68: 5. o. 332-335., 4 o. (2015)

Török, Zsófia Laura; Paraicz, Gábor; Ruzsics, István; Vékony, Ildikó; Viski, Anna; Grmela, Gábor; Hüttl, Kálmán; Sárosi, Veronika: Krónikus nekrotizáló aspergillosis végső diagnózis?: Az intervenció szerepe a pulmonológiában.

Medicina Thoracalis (Budapest) 66: 5. o. 297-300., 4 o. (2013)

Teljes IF: 16,539

Hirsch-index: 2

Összes hivatkozás: 36

Szabadalmi bejelentés: 2

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik nélkül nem tudtam volna megírni doktori értekezésemet. Hálával tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Pongrácz Juditnak, aki tudományos munkám kezdetétől hasznos gyakorlati és szakmai tanácsokkal látott el, és lehetővé tette ezeknek az eredményeknek a megszületését. Köszönöm neki szakmai támogatását munkám során, valamint azt, hogy lehetővé tette számomra, hogy kutatásomat az intézetében kezdhessem meg. Különösen hálás vagyok a Gyógyszerbiotechnológiai Intézet összes munkatársának, különösen Dr. Garai Kitti egyetemi adjunktusnak, aki segített a kísérletek elvégzésében és folyamatosan támogatott. Köszönöm az I. sz. Belgyógyászati Klinika és azon belül is a Pulmonológiai Tanszék azon munkatársainak segítségét, akik segítettek a minták gyűjtésében, és a betegek nyomon követésében. Hálás vagyok Dr. Sárosi Veronikának és Dr. Balikó Zoltánnak, akik elindítottak a klinikusi pályán, rámutattak a pulmonológiai szakma, azon belül a tüdőonkológia komplexitására és szépségére, és szakmai előmenetelem során végig támogattak. Végül szeretném megköszönni családomnak, akik az évek során mindig mellettem álltak és támogató környezetet biztosítottak számomra.

