

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Molekuláris patológiai eltérések vizsgálata liquid biopszia segítségével szolid tumorokban

Csoma Szilvia Lilla

Témavezető: Dr. Mokánszki Attila



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI
ISKOLA

DEBRECEN, 2025

Molekuláris patológiai eltérések vizsgálata liquid biopszia segítségével szolid tumorokban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a klinikai orvostudományok tudományágában

Írta: Csoma Szilvia Lilla, okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája (Konzervatív orvostudományok és klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Mokánszki Attila, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Nagy Béla, az MTA doktora
Dr. Kajtár Béla, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Nagy Béla, az MTA doktora
Dr. Kajtár Béla, PhD
Dr. Ujfalusi Anikó, PhD
Dr. Vörös András, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, 2025. november. 24. 13:00,
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

1. Bevezetés

A daganatos betegek molekuláris diagnosztikája elsősorban szövettani mintákból izolált nukleinsavak elemzésén alapul, hiszen ezen mintatípus megfelelő vizsgálata elengedhetetlen a genetikai háttér teljes tisztázásához. A tűbiopsziával nyert kis mennyiségű minták nem feltétlenül alkalmasak a nagy érzékenységű molekuláris vizsgálatok kivitelezésére, ráadásul a daganatok anatómiai elhelyezkedése is gyakran határt szab a mintavételi eljárásnak. Egyre nagyobb a törekvés a liquid biopszia (LB) klinikai döntéshozatalba való alkalmazásának bevezetésére, hiszen a betegek perifériás vére a tumorból származó szabad keringő nukleinsavakat tartalmazza. A daganatos betegek testfolyadékai változó mennyiségű, a tumorból származó apoptózissal, nekrozissal, aktív szekrécióval felszabaduló keringő tumorsejteket (CTC), szabad sejtmentes nukleinsavakat (cell-free DNS-cfDNS, cell-free RNS-cfRNS) valamint exoszómákat tartalmaznak, melyek vizsgálatára a LB lehet a legalkalmasabb módszer.

Munkánk célja két a rutin diagnosztikában megfelelő gyakorisággal előforduló daganattípus vizsgálata volt, ahol teszteltük a szöveti (FFPE) és a LB-t mint különböző mintatípust, valamint az újgenerációs szekvenálást (NGS) és a digitális PCR-t (dPCR), mint nagy áteresztőképességű érzékeny technológiát.

Az epeúti daganatok ritka (BTC) és rossz prognózissal járó malignitások, melyek kezelési lehetősége, most sem tisztázott teljes mértékben. Az anatómiai lokalizáció alapján elkülönülő csoportokat ugyanolyan módon kezelik, pedig igazoltan eltérő molekuláris mintázattal rendelkeznek. Bizonyítottan a betegek közel 40%-ában kimutatható valamilyen eltérés amelyek tipikusan együtt fordulnak elő, míg mások kölcsönösen kizárják egymás jelenlétét. A leggyakrabban detektált eltérések közé tartozik a *TP53* (44%), *KRAS* (17%), *IDH1* (8,7%) gének mutációja. A *KRAS* mutációk aránya 9%-54% között mozoghat, gyakrabban fordul elő extrahepatikus cholangiocarcinomában (EHCC), illetve az epehólyagot is érintő epehólyagtumorban (GBC). Az intrahepaticus cholangiocarcinomában (IHCC) való megjelenése egy korai biomarkere lehet a progresszióknak.

A GBC-ben a mutációk általában ritkábbak, az esetlegesen előforduló genetikai eltérés leggyakrabban az *ERBB2* gént érintheti (3%-38%). Jelentős arányban kimutatható a *PIK3CA* jelátviteli útvonal mutációja is arányuk akár a 33%-ot is elérheti. Alapvetően IHCC-re típusos az *IDH1* és *IDH2* gének szomatikus mutációi, valamint az *FGFR2* gén fúziója, melyek jelenléte feltehetően kizárja a *KRAS* valamint *BRAF* gének érintettségét. A jövőben ezek az eltérések válhatnak terápiás célpontokká, valamint diagnosztikai és prognosztikai biomarkerei lehetnek a betegségnek.

Tekintettel arra, hogy az elmúlt évtizedben a magas mortalitás mellett, a betegség prevalenciája növekvő tendenciát mutatott, valamint, hogy a kései felismerés miatt, a betegek többségénél már áttét is jelentkezik mire felismerése kerül, így a tumor reszekálhatósága az esetek kevesebb, mint 15%-ában jöhet szóba, tehát mindenképpen szükségesnek érezzük a kezelési protokoll személyre szabott, genetikai eltéréseken alapuló kidolgozását. Éppen ezért az utóbbi időben számos erőfeszítés történt az epeúti daganatok kialakulásának hátterében álló mechanizmusok

megismerésére. Azonban elmondható, hogy a folyamatos fejlődés ellenére a cholangiocarcinoma diagnosztizálása, kezelése, követése továbbra is kihívást jelent a klinikusok számára. A hosszútávú megoldás mindenképpen egy olyan biomarker azonosítása, amelyek megkönnyítik a minél korábbi diagnózis felállítását, szubtypusokba való besorolást, valamint az onkológiai terápia kiválasztását.

A primer cutan melanoma (PCM) a bőr daganatos elváltozásainak csaknem 1 %-át teszi ki, azonban kis mérete és sokszor tünetmentes időszaka miatt a felismerés igen sokára eredményez pontos diagnózist, így a kései beazonosítás és ebből adódóan a kezelés hiánya miatt számos távoli áttétet adhat, ezekből kifolyólag a bőrdaganatok legveszélyesebb formájának tekinthető. Osztályozásuk, T kategóriába való besorolásuk alapja a tumor vastagsága, az úgynevezett Breslow-mélység (BD) mértéke szerint történik. Emellett a PCM szövettani besorolásakor figyelembe vesszük a Clark szintet is, melynek öt csoportja van. Alapját ennek is a daganat mélysége adja.

A leggyakoribb genetikai eltérés a melanomás betegek körében a *BRAF* gént érintik (44%). A mutációk

többsége a 11-es és 15-ös exonban fordul elő. A genetikai eltérések 90%-át szomatikus pontmutáció okozza, méghozzá az 1799. nukleotid pozícióban lévő timin adeninné való transzverziója amely a 600. kodonon lévő valin glutaminsavvá alakulását okozza (*BRAF* c.1799T>A; p.Val600Glu). Ez egy patogén eltérés, amely fokozza a mitogén által aktivált protein kináz útvonal aktiválódását, így lehetővé teszi a jelátviteli kaszkád aktiválását még az extracelluláris jel hiányában is. A mutáció következményeként a BRAF fehérje RAS-tól függetlenül aktív állapotba kerül és így stabilizálódik. Ezen típusú aberrációk nagyobb eséllyel reagálnak BRAF-inhibitorokra.

Nagymértékű progresszió jellemzi, emiatt mindenképpen szükséges egy olyan biomarker, mely lehetővé teszi a magas kockázatú melanomák felismerését méghozzá a betegség minél korábbi fázisában.

Szükségessé válik tehát ezeknél a daganat típusoknál a személyre szabott kezelés megválasztása. A lehető leghamarabbi és pontosabb diagnózis megállapításához vagy a kezeléssel szembeni rezisztencia esetleges monitorozásához megbízhatóbb módszerekre

van szükség. Eddigi tanulmányok során bizonyított, hogy a szöveti és plazma *BRAF* státusz közötti hasonlóság közel 80%-os, így a LB elemzése során kapott *BRAF* státusz megfelelő biomarkere lehet a betegségnek.

2. Célkitűzések

Munkánk során két érzékeny, nagy áteresztőképességű technikát alkalmazunk két szolid tumor típusban. Az epeúti tumorok nagyrésze inoperábilis, éppen ezért a minimálisan nyerhető szöveti biopszia mellett, valamint helyett a LB egy alkalmas megoldás lehet a rutin diagnosztikában. A melanomák mivel a testfelszínen helyezkednek el, korlátozott vérellátással rendelkeznek, ennek ellenére a LB használata ezen típusban nemcsak a diagnózis felállítását segítheti, hanem arra is választ adhat, hogy ilyen tulajdonsággal rendelkező daganattípus esetén mekkora mértékben kerül cfDNS a perifériás keringésbe.

Az NGS kitűnően alkalmas lehet a LB vizsgálatára. Jelenleg már a rutin diagnosztika részét képezi tüdő, valamint colon adenocarcinomák esetében. Ezen elven tovább haladva tesztelni szeretnénk epeúti tumorok diagnosztikájában is. A dPCR a hagyományos PCR technikákhoz képest egy sokkal érzékenyebb technológia, valamint az NGS-hez képest is számos előnnyel rendelkezik. Sokkal rövidebb idő alatt nyerhető

által eredmény, illetve nagyobb költséghatékonysággal és nagyobb pontossággal tudja kimutatni azon mutációkat is, melyek a mintákban esetleg rendkívül alacsony variáns allélfrekvenciával fordulnak elő.

Célunk mindkét daganat típusból származó LB cfDNS-ének mennyiségi meghatározása, majd ezt követően molekuláris elemzése. Epeúti daganatok esetében becsült tumortérfogatot (ETV) határoztuk meg, majd pedig a cfDNS hozama közötti összefüggését vizsgáltuk. Mindezek mellett azonosítottuk NGS vizsgálat segítségével a szomatikus mutációkat, valamint számszerűsítettük a tumorvariáns-terhelést (TVB).

Vizsgáltuk továbbá a három epeúti tumor altípusban előforduló mutációk megoszlását, illetve az egy betegből származó FFPE és LB során nyert DNS-minták közötti genetikai eltéréseket.

Melanomás betegek esetében retrospektív módon 100 beteg *BRAF*-státuszát határoztuk meg reverz hibridizáción alapuló StripAssay módszerrel, majd ezen státuszt dPCR technikával visszaigazolva a módszer diagnosztikai hasznosságát vizsgáltuk. Prospektív tanulmány keretein belül a FFPE mintákhoz párosított LB

minták *BRAF* státuszát is meghatároztuk, valamint mindkét vizsgálat során összefüggést kerestünk a BD, a tumorból származó DNS (tdDNS), a cfDNS és a LB-ből származó *BRAF* p.Val600Glu genetikai elváltozás vairáns allél frekvencia értéke (cfVAF) között, illetve a kapott eredményeket figyelembe véve szignifikáns különbségeket kerestünk a Clark-féle klasszifikáció alapján kialakított csoportok között is.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Minták

Összesen 38 epeúti tumorra diagnosztizált beteg FFPE mintájához sikerült párosítottan LB mintát gyűjteni és NGS vizsgálatot végezni.

Emellett retrospektív módon *BRAF* státuszoktól függően 100 melanomával diagnosztizált beteg *BRAF* mutációs státuszának meghatározása történt a dPCR protokolljának beállítására és hatékonyságának igazolására. A prospektív kohorszot pedig 34 melanomával diagnosztizált egyén alkotta, akiktől mind FFPE minta, mind pedig LB rendelkezésünkre állt.

Az FFPE mintából készült hematoxinin-eosinnal festett metszeteken a tumorsejtarányt, valamint a melanoma daganatok esetében a szövettani besorolást egy patológus szakorvos ellenőrizte. A cut-off érték 5%-os tumor sejt arány volt. A diagnózisok megerősítésének céljából a szükséges immunhisztokémiai vizsgálatokat a szövettani mintákon minden esetben elvégeztük.

A szükséges etikai engedélyekkel rendelkezünk (60355-2/2016/EKU, 4648-6/2018/EÜ és IV/8465-3/2021/EKU).

3.2. Tumor méret meghatározás

A daganatok méretének meghatározása a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Nukleáris Medicina Intézet kollaborációjával valósult meg. Epeúti tumorok esetében egy radiológus segítségével a diagnózis felállításakor készült MRI és/vagy CT képek alapján hosszúság (l) és szélesség (w) értékeket mértünk, melyekből ETV-t számoltunk.

3.3. DNS izolálás

A LB kinyerése perifériás vérvétellel történt. A vérmintákat EDTA-t tartalmazó antikoagulált vérvételi csövekbe vettük. A feldolgozásnál egységesen a plazma szeparálása 3000 x g-n, 10 perc centrifugálással történt, majd ezt követően a cfDNS izolálására alkalmas felülúszó kinyeréséhez az így kapott plazmát 16 000 x g-n 10 percig ismét centrifugáltuk. Az FFPE minták DNS izolálásához

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-et (Qiagen, Németország, Hilden) használtunk, az elúció 50 μ l AE pufferrel történt. A cfDNS izolálása QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Németország, Hilden) alkalmazásával valósult meg 30 μ l AVE pufferben. A DNS koncentrációkat Qubit dsDNA HS Assay Kittel mértük Qubit 4.0 fluorométeren (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A LB esetén kapott DNS koncentrációból DNS-hozamot kalkuláltunk.

3.4. StipAssay

A reverz hibridizáción alapuló *BRAF* 600/601 StripAssay (ViennaLab Diagnostics GmbH, Bécs, Ausztria) humán *in vitro* diagnosztikai (IVD) minősítéssel rendelkező módszer a *BRAF* gén kilenc klinikailag releváns mutációját fedi le 1 %-os érzékenységgel. A próbához biotinnal kapcsolt adapter szekvencia van kötve, ehhez a reakció során a sztreptavidinnel kapcsolt alkalikus foszfatáz kötődik, melynek szubsztrátja eredményezi a színreakciót.

3.5. Újgenerációs szekvenálás (NGS)

Az NGS egy érzékeny, nagy áteresztő képességű technológia, amely lehetővé teszi több gén egyidejű vizsgálatát. A személyre szabott orvoslásban az NGS fontos szerepet játszhat a mutációk azonosításában, a megfelelő terápia kiválasztásában, valamint nyomonkövetésében. Epeúti daganatos betegek esetében a két mintatípus összehasonlítására egy 67 génes Archer VariantPlex Solid Tumor Kitet (ArcherDX, Boulder, CO, USA) alkalmaztunk. A szekvenálást Illumina MiSeq készüléken kivitelezttük (MiSeq Reagent Kit v3 600 ciklus, Illumina, San Diego, CA, USA). A FASTQ-fájlokat az Archer Local Virtual Machine alkalmazásának segítségével elemeztük (7.0-es verzió, ArcherDX). A szekvenciák minőségét figyelembe véve a variáns allélfrekvenciákat (VAF) mind a két mintatípus esetén 2%-ra állítottuk. Az azonosított mutációk klinikai jelentőségének meghatározásához a ClinVar, COSMIC és a VarSome Premium, míg a terápiás lehetőségek megítélésére az OncoKB adatbázist használtuk.

3.6. Digitális PCR

A hagyományos PCR technikán alapuló dPCR egy szekvencia-specifikus nagy áteresztőképességű technika, amely lehetővé teszi a nukleinsavak kimutatását és mennyiségi meghatározását fluoreszcencia mérésel, még hozzá nagy pontossággal és érzékenységgel. A módszer előnye, hogy abszolút kvantifikációt tesz lehetővé. Érzékenységének köszönhetően alkalmas kis mennyiségű DNS kimutatására is. A célszekvencia abszolút mennyiségét ismerve a kópiaszám változások meghatározhatók, így melanomás betegek LB mintáinak vizsgálatára is alkalmas.

A *BRAF* státuszok meghatározását dPCR LNA Mutation Assay (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével végeztük a QIAcuity One dPCR készüléken. Az adatok elemzéséhez a QIAcuity Software Suite-ot használtunk.

3.7. Statisztikai módszerek

A statisztikai analízist minden esetben a GraphPad Prism 9 programmal (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) végeztük. A $<0,005$ alatti p-értéknet tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az epeúti betegek három csoportjában az ETV-k, a cfDNS-hozamok és a TVB összehasonlításához Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, ANOVA és kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Az ETV és a cfDNS-hozam, az ETV és a TVB közötti összefüggés vizsgálatára Spearman, míg a plazma-cfDNS-mennyiség és a plazma-TVB összehasonlítására Pearson-féle korrelációs analízist alkalmaztunk.

Spearman korrelációs elemzéseket végeztünk külön-külön melanomák esetében a retro-, valamint prospektív kohorszon a BD, a tdDNS, a tumorból származó genetikai eltérés variáns allél frekvencia (tdVAF), a cfDNS, a cfVAF értékek között. Továbbá az említett paramétereket statisztikailag Kruskal-Wallis teszttel elemeztük a Clark osztályozás alapján kialakuló csoportokban is.

4. Eredmények

4.1. Epeúti tumorról diagnosztizált betegek NGS alapú elemzése

A tumor anatómiai elhelyezkedése alapján 21 IHCC, kilenc EHCC és nyolc GBC csoportba sorolható esetet tudtunk elkülöníteni. Az átlagos ETV érték a vizsgált betegpopulációban 201606,79 mm³ volt. A tumortömeg méreteket figyelembe véve nem találtunk szignifikáns összefüggést a három csoport értékei között ($p=0,53$), valamint külön-külön az IHCC és EHCC ($p=0,6346$), az IHCC és GBC ($p=0,28,3$), és az EHCC és GBC ($p=0,25$) csoportok között sem.

Az átlagos DNS hozam 34,34 ng/ml plazma volt. Statisztikailag nem találtunk eltérést az izolált DNS mennyisége között a három csoportban ($p=0,2177$), illetve külön-külön az IHCC és EHCC ($p=0,63$), az IHCC és GBC ($p=0,09$) valamint az EHCC és GBC ($p=0,18$) csoportok között sem. Azonban szignifikáns kapcsolatot figyelhattunk meg az ETV és a cfDNS-hozam között, melyet Spearman korrelációval igazoltunk ($r=0,8486$,

$p < 0,0001$ és $r = 0,9059$, $p < 0,0001$). A legtöbb általunk detektált génvariánst a 2., 24., 33., 35. és 37. eseteknél figyelhettük meg, míg az 1., 5., 16., 20., 21., 23., 25. betegeknél nukleotid eltérést nem azonosítottunk. Öt esetben csak a LB bizonyult informatívnak a vizsgálatok során (12., 18., 26., 27., 36.). A két mintatípus TVB értékeinek összehasonlítása során nem figyelhettünk meg szignifikáns összefüggést a három altípus között (IHCC: $p = 0,9933$; EHCC: $p = 0,7109$, GBC: $p = 0,5102$), valamint a cfDNS és a liquid típusú minták TVB értékei között sem találtunk szignifikáns eltérést ($r = 0,03061$; $p = 0,8553$). Statisztikailag nem volt összefüggés az ETV és TVB értékek között egyik mintatípus esetén sem ($r_{\text{szövet}} = -0,2914$, $p_{\text{szövet}} = 0,0759$; $r_{\text{LB}} = 0,08095$, $p_{\text{LB}} = 0,6290$). A betegek 81,6%-ában (31/38) azonosítottunk valamilyen genetikai aberrációt. Az analízis során hét esetben (1., 12., 20., 23., 25., 26. és 27.) a szöveti biopszia nem megfelelőse miatt csak a LB elemzése valósult meg, ebből három esetben sikerült valamilyen genetikai eltérést igazolnunk (12., 26., 27.). A bioinformatikai elemzéseket követően a kimutatott eltérések klinikai jellemzőit is ellenőriztük. A detektált aberrációk 58%-ában (43/74)

valamilyen patogén mutáció került leírásra. A legtöbbjüket a FFPE mintákhoz párosított LB mintából is sikerült azonosítanunk. A vizsgálatunk során 34 gén volt érintett, melyek közül a *FOXL2*, *PIK3CA*, *KRAS* és *TP53* mindhárom anatómiai lokalizáció alapján elkülönülő csoportban azonosítható volt. A *CDHI*, *CDKN2A*, *H3F3A*, *FBXW7*, *MLH1*, *PTEN* és *STK11* gének eltéréseit mind IHCC, mint pedig GBC csoportban is azonosítottunk. A *MET* gén aberrációja intra-, valamint extrahepatikus csoportban került azonosításra. Két génben azonosítottunk EHCC-ra specifikus eltérést, ezek a *HRAS* c.182A>G; p.Gln61Arg valamint *MAP2K1* c.308delT; p.Ile103Thrfs variánsok.

4.2. A melanomás betegek dPCR alapú elemzése

A retro- valamint prospektív kohorszba bevont betegek esetében is a daganatból származó FFPE mintákat minden esetben az onkológiai kezelés megkezdése előtt sebészeti úton távolították el. A LB szintén az onkológiai kezelés megkezdése előtt történt.

A retrospektív tanulmányban az átlagos BD értéke: 4,27 mm, a tdDNS koncentráció átlaga 17,39 ng/μl és a tdVAF átlagos értéke pedig 15,33% volt. A prospektív vizsgálatunkban a BD átlaga 4,83 mm, az átlagos tdDNS koncentráció 18,75 ng/μl, míg az átlagos tdVAF 20,2%, a cfDNS átlagos értéke 3,33 ng/μl és az átlag cfVAF pedig 36,55% volt. A prospektív és retrospektív tanulmányba beválogatott eseteket csoportosítottuk a nemzetközileg is elfogadott Clark osztályozás alapján. Mindkét kohorszból a Clark I csoport kizárásra került, a kevés mintaszám miatt.

A dPCR hatékonyságának megállapításához retrospektív vizsgálatot végeztünk. A rutin diagnosztika során StripAssay-vel meghatározott 50 db mutáns (p.Val600Glu mutációval rendelkező pozitív eset) és 50 db negatív (p.Val600Glu mutációval nem rendelkező, vad eset) mintát választottunk ki. Ezeket a *BRAF* státuszokat tekintettük valós eredményeknek és az így kiválasztott betegek FFPE blokkjaiból izolált DNS-ekkel végeztük el újra a *BRAF* státusz meghatározását dPCR segítségével. Az 1%-os mutáns frakciót tekintettük cut-off értéknek. A dPCR FAM szenzora a fluoreszcens intenzitás (RFU)

alapján érzékeli a *BRAF* c.1799T>A; p.Val600Glu (mutáns partíciók) amplifikált termékeket. A valid partíciók és a nem valid partíciók elkülönítésére a szoftver egy beállított határértéket alkalmaz, ezt FAM (mutáns frakciók) esetén 85 RFU, míg HEX (vad) esetén 100 RFU-ként adtuk meg. A retrospektívként kiválasztott minták esetében diagnosztikai szenzitivitás 99% míg a diagnosztikai specificitás 98,5% volt.

A kutatásunk prospektív felében a betegek szintén FFPE mintájából készült StripAssay eredményeket tekintettük valósnak és az így kapott mutáns, illetve vad csoporthoz párosítottuk a LB mintákat. Összesen 34 db LB mintát gyűjtöttünk, melyek közül 20 mutánsnak és 14 vad típusúnak bizonyult. A LB mintákból izolált cfDNS-ből StripAssay és dPCR vizsgálatokat is végeztünk, majd az így kapott eredményeket összehasonlítottuk, valamint összevetettük a betegek FFPE mintáinak eredményeivel is. Nem találtunk eltérést a két módszer között, így ebben az esetben a szenzitivitás és specificitás értékünk is 100%-nak adódott.

Az összes esetet figyelembe véve a dPCR tényleges diagnosztikai hatékonyságának

megállapításakor a szenzitivitás 98,6%, a specificitás pedig 97% lett. Mindezen eredmények figyelembevételével megállapítható, hogy az általunk használt dPCR módszer alkalmas a melanomas betegek *BRAF* státuszának vizsgálatára.

A retrospektív kohorszban kapott értékek alapján pozitív korrelációt kaptunk a BD és a tdDNS koncentrációja között ($r=0,36$, $p=0,002$), míg a BD és a tdVAF ($r=-0,04$, $p=0,7$), valamint a tdDNS koncentráció és tdVAF ($r=-0,06$ $p=0,52$) közötti értékek nem mutattak szignifikáns korrelációt. Ha csak a mutáns eseteket vesszük figyelembe ($n=50$) akkor az összes érték között pozitív korrelációt sikerült azonosítanunk (BD és tdDNS koncentráció $r=0,31$, $p=0,02$; BD és tdVAF $r=0,37$, $p=0,009$; tdDNS koncentráció és tdVAF $r=0,33$, $p=0,018$). Ha pedig csak a negatív eseteket vizsgáljuk, akkor csak a BD és tdDNS koncentráció között sikerült a szignifikánsan pozitív korreláció kimutatása ($r=0,33$, $p=0,02$). A BD és a tdVAF ($r=0,02$, $p=0,87$), valamint a tdDNS koncentráció és tdVAF ($r=0,01$, $p=0,93$) között nem találtunk pozitív összefüggést. A prospektív kohorsz során kapott eredményekből a teljes 34 esetből álló

populációt figyelembe véve pozitív korrelációt figyelhattunk meg a BD és a tdDNS koncentráció ($r=0,54$, $p=0,001$), a BD és a cfDNS koncentráció ($r=0,86$, $p<0,0001$), a tdDNS koncentráció és a p.Val600Glu-hoz tartozó tdVAF ($r=0,76$, $p<0,0001$) a tdDNS koncentráció és cfVAF ($r=0,59$, $p<0,0001$), illetve a tdVAF és a cfVAF ($r=0,65$, $p<0,0001$) értékei között, míg nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a BD és a tdVAF ($r=-0,12$, $p=0,5$), a BD és a cfVAF ($r=0,006$, $p=0,97$), a tdDNS és a cfDNS koncentráció ($r=0,07$, $p=0,7$), a tdVAF és a cfDNS koncentráció ($r=0,008$, $p=0,96$), valamint a cfDNS koncentráció és a cfVAF ($r=0,13$, $p=0,47$) értékek között.

Ha csak a *BRAF* c.1799T>A; p.Val600Glu pozitív eseteket néztük ($n=20$) akkor szignifikáns kapcsolatot találtunk a BD és a tdDNS koncentráció ($r=0,57$, $p=0,008$), a BD és a tdVAF ($r=0,47$, $p=0,03$), a BD és a cfDNS koncentráció ($r=0,76$, $p<0,0001$), a BD és a cfVAF ($r=0,47$, $p=0,03$), a tdVAF és a cfVAF ($r=0,51$, $p=0,02$), illetve a cfDNS koncentráció és a cfVAF ($r=0,73$, $p=0,0003$) értékek között, míg nincs szignifikáns kapcsolat a tdDNS koncentráció és a tdVAF ($r=0,41$, $p=0,02$), a tdDNS és a cfDNS koncentráció ($r=0,15$,

$p=0,53$), a tdDNS koncentráció és a cfVAF ($r=0,07$, $p=0,77$), illetve a tdVAF és a cfDNS koncentráció ($r=0,35$, $p=0,12$) értékei között.

Ha pedig csak a vad típusú mintákat elemezzük ($n=14$) szignifikánsan pozitív korreláció kizárólag a BD és a cfDNS koncentráció ($r=0,77$, $p=0,002$) értékei között figyelhető meg. Az összes többi vizsgált paraméter között pozitív összefüggést nem sikerült kimutatnunk. A BD és tdDNS koncentráció ($r=0,15$, $p=0,6$), a BD és a tdVAF ($r=-0,09$, $p=0,75$), a BD és a cfVAF ($r=0,01$, $p=0,97$), tdDNS koncentráció és tdVAF ($r=-0,11$, $p=0,7$), a tdDNS és a cfDNS koncentráció ($r=0,41$, $p=0,15$), a tdDNS koncentráció és a cfVAF ($r=-0,27$, $p=0,35$), a tdVAF és a cfDNS koncentráció ($r=-0,29$, $p=0,3$), a tdVAF és a cfVAF ($r=-0,29$, $p=0,31$), valamint a cfDNS koncentráció és a cfVAF ($r=-0,33$, $p=0,24$) értékei között, ugyanis nem találtunk szignifikáns kapcsolatot. Megfigyeléseink alapján a legerősebb korrelációkat ($r>0,6$) a prospektív kohorszban tapasztaltunk.

A Clark osztályozás alapján kialakult csoportok közötti összefüggések elemzésére Mann-Whitney statisztikai tesztet használtunk.

A retrospektív kohorszban az összes esetet vizsgálva szignifikáns különbség figyelhető meg a BD értékek között a Clark II és III ($p=0,0022$), a Clark IV és V ($p=0,0168$), valamint a Clark II és IV, Clark II és V, Clark III és IV, illetve a Clark III és V csoportok között is ($p<0,0001$). Ha a *BRAF* p.Val600Glu mutációval rendelkező betegek csoportjait vizsgáljuk, akkor szignifikáns különbséget találtunk a BD tekintetében a Clark II és III ($p=0,001$), a II és V ($p=0,0079$), a IV és V ($p=0,0039$), a II és IV, valamint a III és V betegek között is ($p<0,0001$). A tdVAF értékeket figyelve pedig a Clark II és III ($p=0,127$), a II és IV ($p=0,0019$) csoportok között található szignifikáns eltérés. A negatív eseteket figyelembe véve a Clark II és IV ($p=0,0069$), a II és V ($p=0,0485$), a III és IV ($p<0,0001$), illetve a III és V ($p=0,0018$) csoportok BD értékei között figyeltünk meg szignifikáns eltérést. A prospektív eseteket ($n=34$) együttesen nézve szignifikáns kapcsolatot figyeltünk meg a BD tekintetében a Clark II és III ($p=0,0131$), a Clark II és IV ($p=0,0303$), valamint a Clark III és V ($p=0,0063$) betegeket között. Ugyancsak szignifikáns eltérés igazolódott a tdVAF értékek között a Clark II és V

($p=0,0357$), a Clark III és V ($p=0,0048$) csoportokban, valamint a cfDNS hozamot vizsgálva a Clark III és V ($p=0,0170$) csoportok között. A mutáns esetek tekintetében ($n=20$) a BD értékek szignifikanciát mutattak a Clark II és III ($p=0,0256$) csoportok között, ezen két csoportban a cfDNS hozam értékek esetében is szignifikáns különbség volt megfigyelhető ($p=0,0256$). Szintén a cfDNS hozamot figyelembe véve hasonló eltérést tapasztaltunk a Clark III és Clark IV csoportok közötti is ($p=0,0002$). A *BRAF* negatív betegek mintáiban csak egy szignifikáns kapcsolatot tudtunk kimutatni a BD tekintetében a Clark III és V. csoportok között ($p=0,0238$).

5. Főbb eredmények és következtetés

Röviden összefoglalva, jelen Ph.D munka főbb megállapításai a következők:

- A hagyományos szöveti biopsziához képest a liquid biopszia nem invazív, megismételhető eljárás, mely tulajdonságai alapján egy sokkal kedvezőbb mintavételi módszernek tekinthető.
- Sikeresen kivitelezhető epeúti tumorok és melanomák esetében is a liquid biopszia kvalitatív és kvantitatív analízise.
- Epeúti tumoroknál az anatómiai szempontból elkülönülő alcsoportok TVB-jei között nem találtunk szignifikáns összefüggést, sem a szöveti sem pedig a liquid minták esetében.
- Összesen 74 genetikai aberrációt azonosítottunk, melynek 44,6%-át mindkét mintatípusból sikerült kimutatni (n=33).
- A 38 beteg közül 20-nál (52,6%) észleltünk patogén vagy feltehetően patogén klinikai jelentőségű eltérést.

- Opcionálisan terápiás szert konkrét epeúti tumorokra specifikusan két esetben találtunk az OncoKB adatbázis alapján. Mindkét esetről az *IDHI* p.Arg132 aberráció megléte miatt alkalmazható egy az FDA által jóváhagyott terápiás szer, az Ivosidenb.
- A vizsgálataink igazolták, hogy a dPCR pontos *BRAF* c.1799T>A; p.Val600Glu mutációs státusz meghatározást tesz lehetővé mindkét mintatípusból melanomával diagnosztizált betegeknél.
- Diagnosztikai szenzitivitás és specificitás számítását követően kijelenthető, hogy csaknem 100% annak az értéke, hogy egy mutáció meglétét a dPCR kimutatja, valamint 98,5%-os valószínűséggel azonosítja pontosan a negatív eseteket.
- Pozitív korrelációt figyeltünk meg a BD és a tdDNS koncentráció, a BD és a cfDNS koncentráció, a tdDNS koncentráció és tdVAF, a tdDNS koncentráció és a cfVAF, valamint a tdVAF és a cfVAF között.
- Statisztikailag igazoltuk, hogy a Clark V stádiumú betegekből szignifikánsabb nagyobb cfDNS mennyiség izolálható a többi esethez képest.

6. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/41/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csoma Szilvia Lilla
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10081710

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Csoma, S. L.,** Madarász, K., Chang Chien, Y. C., Emri, G., Bedekovics, J., Méhes, G., Mokánszki, A.: Correlation Analyses between Histological Staging and Molecular Alterations in Tumor-Derived and Cell-Free DNA of Early-Stage Primary Cutaneous Melanoma. *Cancers (Basel)*. 15 (21), 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers15215141>
IF: 4.5
- Csoma, S. L.,** Bedekovics, J., Veres, G., Árokszállási, A., András, C., Méhes, G., Mokánszki, A.: Circulating Cell-Free DNA-Based Comprehensive Molecular Analysis of Biliary Tract Cancers Using Next-Generation Sequencing. *Cancers (Basel)*. 14 (1), 1-13, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14010233>
IF: 5.2

További közlemények

- Chang Chien, Y. C., Madarász, K., **Csoma, S. L.,** Mótyán, J. A., Huang, H. Y., Méhes, G., Mokánszki, A.: Molecular Identification and In Silico Protein Analysis of a Novel BCOR-CLGN Gene Fusion in Intrathoracic BCOR-Rearranged Sarcoma. *Cancers (Basel)*. 15 (3), 1-17, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers15030898>
IF: 4.5
- Csoma, S. L.,** Bedekovics, J., Veres, G., Árokszállási, A., András, C., Méhes, G., Mokánszki, A.: A perifériás vérben keringő szabad DNS molekuláris vizsgálata epéuti malignitásokban. *Orv. hetil.* 163 (50), 1982-1991, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2022.32651>
IF: 0.6





5. Méhes, G., Mokánszki, A., Tóth, L., **Csoma, S. L.**, Lieber, A., Bittner, N.: Malignant pleural effusions for cancer genotyping: a matter of trans-pleural traffic of cell-free tumor DNA. *Mol. Cell. Probes.* 61, 1-7, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2022.101793>
IF: 3.3
6. Mokánszki, A., Méhes, G., **Csoma, S. L.**, Kollár, S., Chang Chien, Y. C.: Molecular Profiling of Merkel Cell Polyomavirus-Associated Merkel Cell Carcinoma and Cutaneous Melanoma. *Diagnostics.* 11 (2), 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11020212>
IF: 3.992
7. Rezes, R., **Csoma, S. L.**, Németh, E., Józsa, I.: Fast liquid chromatographic determination of radiochemical and chemical purity of [¹¹C]methionine by UPLC technique. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 324 (3), 1237-1244, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-020-07179-5>
IF: 1.371

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,463

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 9,7

A DEENK a Jeliőt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.07.



Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazoknak, akik munkám során segítséget és támogatást nyújtottak.

Kiemelt köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Mokánszki Attilának, aki mindvégig segítette szakmai fejlődésemet iránymutatásaival, tanácsaival. Szaktudása által mély betekintést nyerhettem a molekuláris daganatpatológia diagnosztikai hátterébe, mind elméleti, mind gyakorlati szinten.

Köszönettel tartozom továbbá a Debreceni Egyetem Patológia Intézet minden munkatársainak, azon belül is kiemelten a Molekuláris Daganatpatológiai Labor munkatársainak, akik nemcsak szakmai, hanem emberi fejlődésemhez is nagymértékben hozzájárultak, folyamatosan támaszt nyújtottak számomra, ezáltal segítették munkám sikeres kimenetelét.

Különös köszönettel tartozom Prof. Dr. Méhes Gábornak, a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológia Intézet vezetőjének a PhD tanulmányaim

kivitelezésének lehetőségéért, támogatásáért és a munkám megvalósításához szükséges háttér biztosításáért.

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. András Csillának és Dr. Emri Gabriellának a minták gyűjtésében nyújtott segítségükért, illetve munkám támogatásáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném kifejezni hálámat támogató családomnak és barátaimnak, akik folyamatos bátorításukkal, támogatásukkal segítették utamat doktori tanulmányaim során.