

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Csoma Szilvia Lilla

**Molekuláris patológiai eltérések vizsgálata liquid
biopszia segítségével szolid tumorokban**

DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Molekuláris patológiai eltérések vizsgálata liquid biopszia segítségével szolid tumorokban

Csoma Szilvia Lilla

Témavezető: Dr. Mokánszki Attila



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. A liquid biopszia.....	8
2.2. Az epeúti daganatok.....	11
2.2.1. Epidemiológia és kórszövettan	11
2.2.2. Az epeúti daganatok háttérében álló molekuláris eltérések.....	12
2.2.3. Az epeúti daganatok kezelési lehetőségei.....	13
2.3. A primer cutan melanoma.....	14
2.3.1. Epidemiológia és kórszövettan	14
2.3.2. A melanómák háttérében álló molekuláris eltérések.....	16
2.3.3. A melanómák kezelési lehetőségei.....	19
3. Célkitűzés	22
3.1. Az epeúti daganatokkal kapcsolatos célkitűzéseink.....	22
3.2. A primer cutan melanomával kapcsolatos célkitűzéseink.....	23
4. Anyagok és módszerek.....	24
4.1. Minták.....	24
4.1.1. Az epeúti daganatok vizsgálata	24
4.1.1.1. Tumor méret meghatározás.....	24
4.1.2. A melanómák vizsgálata.....	25
4.2. DNS izolálás	25
4.3. StripAssay	26
4.4. Újgenerációs szekvenálás.....	26
4.5. Digitális PCR	27
4.6. Statisztikai módszerek	28
5. Eredmények	30
5.1. Az epeúti tumorokkal diagnosztizált betegek NGS alapú elemzése	30
5.2. A melanomás betegek dPCR alapú elemzése.....	41
6. Megbeszélés	50
6.1. Az epeúti daganatok vizsgálata során szerzett megállapítások.....	50
6.2. A melanómák vizsgálata során szerzett megállapítások.....	53
7. Következtetés	55
8. Összefoglalás	57
9. Summary	58

10.	Irodalomjegyzék.....	59
11.	Publikációs lista (A Kenézy Élettudományi Könyvtár Jóváhagyása által).....	67
12.	Tárgyszavak.....	71
13.	Köszönetnyilvánítás	72
14.	Függelék	Hiba! A könyvjelző nem létezik.

Rövidítések jegyzéke

ARAF: Serine/threonine-protein kinase A-Raf, szerin/treonin protein kináz A-Raf

BD: Breslow depth, Breslow mélység

BRAF: V-raf (viral rapidly accelerated fibrosarcoma) murine sarcoma viral oncogene homolog B1, V-raf rágszáló szarkóma virális onkogén homológ B1

BTC: Biliary tract cancers, epeúti daganatok

cdPCR: chip-based digital PCR, mikrofluid chip alapú digitális PCR

cfDNS: cell-free DNS, szabad, sejten kívüli DNS

cfRNS: cell-free RNS, szabad, sejten kívüli RNS

cfVAF: szabadon keringő DNS-ből származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke

COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, Daganatok szomatikus mutációinak katalógusa

CRAF: RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, RAF proto-onkogén szerin/treonin protein kináz

CT: computed tomography, számítógépes tomográfia

CTC: circulating tumor cells, keringő tumorsejtek

CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte protein 4, citotoxikus T-limfocita fehérje 4

ctDNS: circulating tumor DNA, keringő tumor DNS

dPCR: digital PCR, digitális PCR

ddPCR: droplet digital PCR, csepp (droplet) alapú digitális PCR

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, etilén-diamin-tetraecetsav

EHCC: extrahepatikus cholangiocarcinoma

ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, erb-b2 receptor tirozin kináz 2

ERK: extracellular signal pathway regulated kinase, extracelluláris szignál útvonal szabályozta kináz

ETV: estimated tumor volume, becsült tumor térfogat

FDA: Food and Drug Administration, Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Ügynökség

FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded, formalin-fixált paraffinba ágyazott

FGFR2: fibroblast growth factor receptor 2, fibroblaszt növekedési faktor receptor 2

GBC: gallbladder carcinoma, epehólyagtumor

HRAS: harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, harvey parkány szarkóma vírus onkogén homológ

ICI: immune checkpoint inhibitors, immunellenőrzőpont-gátló

IDH1: isocitrate dehydrogenase 1, izocitrát-dehidrogenáz 1

IDH2: isocitrate dehydrogenase 2, izocitrát-dehidrogenáz 2

IHCC: intrahepatikus cholangiocarcinoma

KIT: KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase, KIT proto-onkogén, receptor tirozin-kináz

KRAS: kirsten rat sarcoma oncogene homolog, kirsten patkány szarkóma onkogén homológ

LB: liquid biopszia, folyadékbiopszia

MAPK: mitogen-activated protein kinase, mitogén aktivált protein kináz

MEK: mitogen-activated protein kinase kinase, mitogén aktivált protein kináz-kináz

MET: receptor of hepatocyte growth factor (HGF), HGF receptor

MRI: magnetic Resonance Imaging, mágneses rezonancia alapú képalkotás

NGS: next-generation sequencing, újgenerációs szekvenálás

NRAS: neuroblastoma v-ras (viral rat sarcoma) oncogene homolog, neuroblasztóma v-ras onkogén homológ

PCM: primer cutan melanoma, primer bőrmelanóma

PCR: polymerase chain reaction, polimeráz-lánreakció

PD-1: programmed cell death protein 1, programozott sejthalál fehérje 1

PD-L1: programmed death-ligand 1, programozott halálligandum 1

PIK3: phosphoinositide 3-kinase, foszfatidilinozitol-3-kináz

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha, foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát-3-kináz alfa katalitikus alegység

PTEN: phosphatase and tensin homolog, foszfatáz és tenzin homológ

RAF1: proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase, proto-onkogén, szerint/treonin kináz

RAS: rat sarcoma protein, ras-protein

tdDNS: tumor-derived DNS, tumorból származó DNS

tdVAF: tumor-derived VAF, tumorból származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke

TERT: telomerase reverse transcriptase, telomeráz reverz transzkriptáz

TMB: Tumor mutational burden, tumor mutációs teher

TP53: tumor protein 53, tumor protein 53

TVB: tumor variant burden, tumor variáns terhelés

VAF: variant allele frequency, variáns allél frekvencia

1. Bevezetés

A precíziós onkológia korszakában nagyon fontossá vált a beteg daganatára egyedileg jellemző specifikus eltérések azonosítása, mely igen érzékeny technikákat, nagy áteresztőképességű módszereket igényel. A daganatok patológiájának megismeréséhez elengedhetetlen a szöveti biopsziák megfelelő vizsgálata, amely azonban sok esetben nehézségekbe ütközik. Egyre nagyobb a törekvés a liquid biopszia klinikai döntéshozatalba való alkalmazásának bevezetésére, hiszen a betegek perifériás vére a tumorból származó szabad keringő nukleinsavakat tartalmazza.

Éppen ezért munkánk célja két a rutin diagnosztikában megfelelő gyakorisággal előforduló daganattípus vizsgálata volt, ahol teszteltük a szöveti és liquid biopsziát mint különböző mintatípust, valamint az újgenerációs szekvenálást és a digitális PCR-t, mint nagy áteresztőképességű érzékeny technológiát. Az epeúti daganatok ritka és rossz prognózissal járó malignitások, melyek kezelési lehetősége, most sem tisztázott teljes mértékben. Az anatómiai lokalizáció alapján elkülönülő csoportokat ugyanolyan módon kezelik, pedig bizonyított, hogy eltérő molekuláris mintázattal rendelkeznek. A primer cutan melanoma pedig a bőr daganatos elváltozásainak csaknem 1 %-át teszi ki, azonban számos távoli áttétet képezhet, illetve nagyon magas mortalitás jellemzi. A melanomás betegek nagy számban *BRAF* mutációt hordoznak, ezen belül is leggyakrabban a *BRAF* c.1799T>A; p.Val600Glu aminosavcserével járó eltérést melyre specifikus onkoterápiás szerek állnak rendelkezésünkre. Ezen ismeretek tudatában mindkét daganattípus hátterének minél korábbi tisztázása létfontosságú.

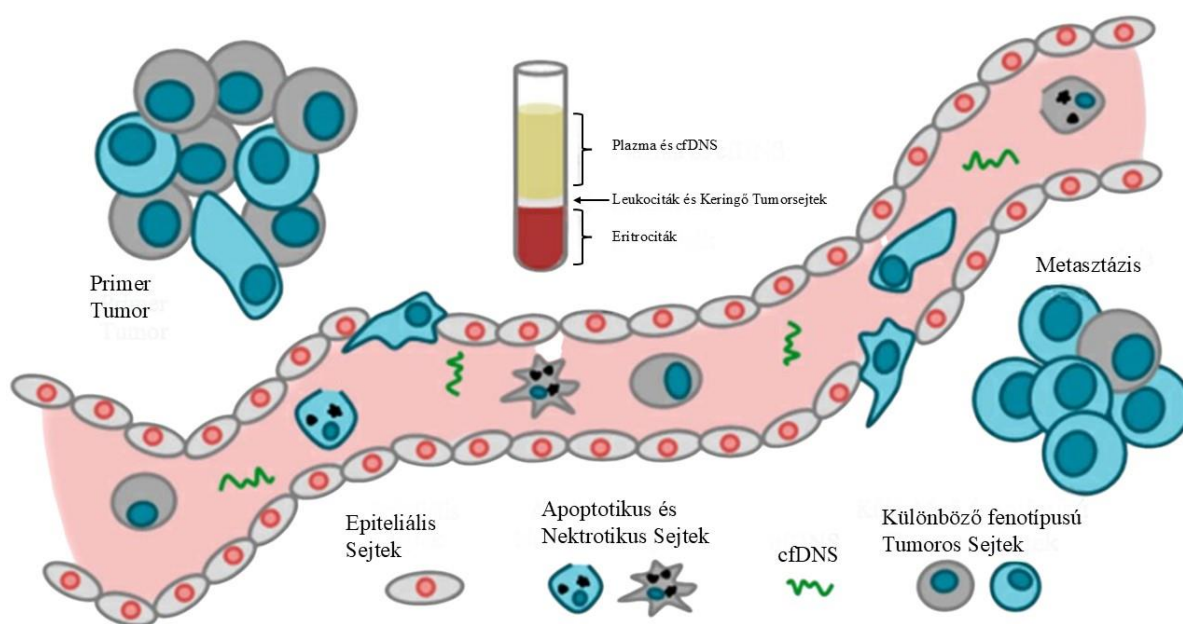
Célunk igazolni a liquid biopszia használhatóságát cholangiocarcinomás minták esetén a becsült tumorméret és a szabad nukleinsav koncentrációja közötti összefüggés vizsgálatának segítségével. Mindezek mellett a szomatikus mutációkat újgenerációs szekvenálás alkalmazásával mutatjuk ki, a kapott eltérések alapján megtörténik a variáns tumorterhelés számszerűsítése és összehasonlítása az egyes epeúti daganattípusok között. A digitális PCR használatával nagyon alacsony allélgyakoriságú eltérések azonosítása is megvalósítható, viszont egyszerre csak egy genetikai eltérés vizsgálható. A cutan melanomás betegeknél, így a leggyakoribb genetikai eltérésre alkalmaztunk próbát. Elsőként retrospektív módon igazoltuk a módszer hatékonyságát a mutáció kimutatására, száz korábban reverz hibridizáción alapuló módszerrel kimutatott ismert *BRAF* státuszú kórszöveti mintát (FFPE blokk) választottunk ki, akiknél ugyanazon szövetből digitális PCR-al is elvégeztük a *BRAF* státuszának meghatározását. A két módszer összehasonlítása

diagnosztikai szenzitivitás és specificitás meghatározása alapján történt. Ezen túlmenően prospektív módon 34 beteg esetében mindkét mintatípusnál (kórszöveti és liquid biopszia) mind StripAssay-t, mind pedig digitális PCR vizsgálatot is végeztünk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A liquid biopszia

A daganatos betegek molekuláris diagnosztikája elsősorban szövettani mintákból izolált nukleinsavak elemzésén alapul, ennek a mintavételi módnak azonban számos korlátját ismerjük. 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. Éppen ezért egy új diagnosztikai lehetőség kerül egyre inkább előtérbe a molekuláris diagnosztika fejlődése során. Számos tanulmányt ismerhetünk ahol a betegek liquid biopsziás (LB) mintáinak vizsgálatával történik a diagnózis felállítása, megerősítése [1–4]. A mutációs profilalkotás a közelmúltban került előtérbe és vált technikailag is elérhetővé [5]. Ismeretes, hogy 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 fehérje, lipid és nukleinsav komponensekből állnak. Ezek vizsgálatára az LB a legalkalmasabb módszer. Az LB elve az **1. ábrán** látható, előnyeit és hátrányait pedig az **1. táblázatban** ismertettük [6–8].

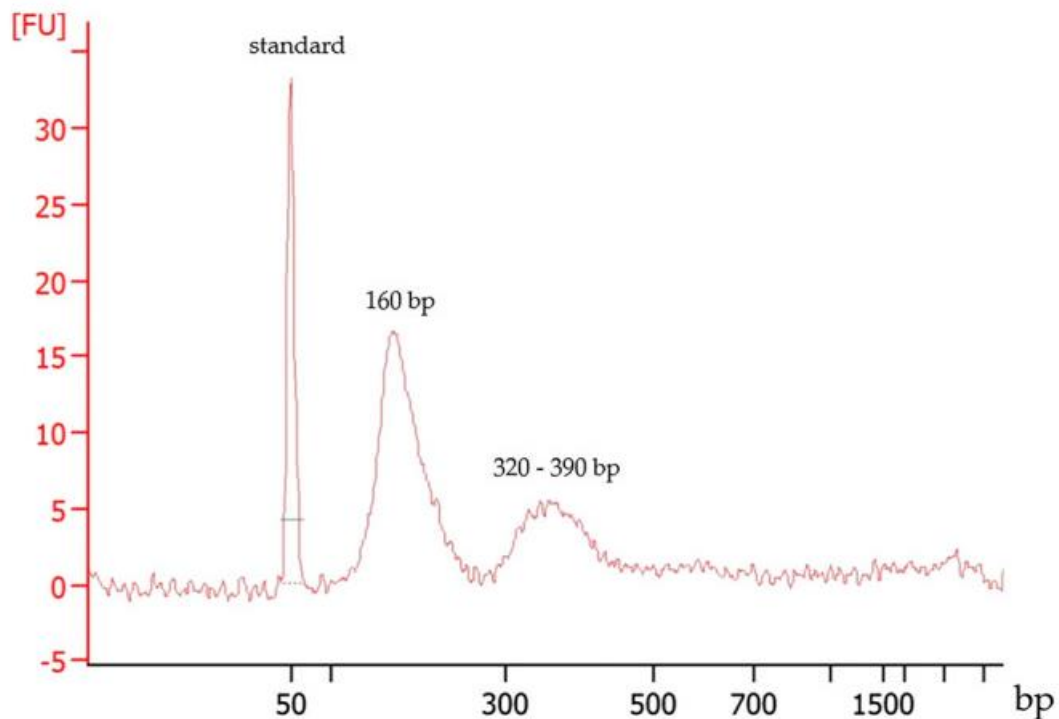


1. ábra. A liquid biopszia elve (cfDNS: szabad, sejten kívüli DNS)

1. táblázat. A liquid biopszia alkalmazásának előnyei és hátrányai

Előnyei	Hátrányai
Genetikai információ nyerhető a daganatról	Érzékeny technológia szükséges a vizsgálatához (újgenerációs szekvenálás, digitális PCR)
Nem invazív	
Megismételhető	
Bármely testfolyadékból kivitelezhető	A keringő tumor DNS csak töredéke a szöveti tumor DNS-nek
Jellemezheti a tumor tömegét	
Longitudinális követésre alkalmas	

Ezzel a minimálisan invazív technikával nyerhető tumor DNS azonban nagymértékben fragmentált (**2. ábra**). A keringő tumor DNS (ctDNS) a cfDNS azon részét jelöli, mely a primer daganatból vagy annak metasztatikus helyeiből származik, illetve a tumorra jellemző specifikus és epigenetikai változásokat hordozza, körülbelül 140-160 nukleotid hosszú és felezési ideje 1,5 órára tehető [7,9].



2. ábra. A cell-free DNS mérettartománya (Bioanalyzer High Sensitivity DNA Assay) 160 bp: tipikus plazmából izolált cfDNS fragmentméret, 320-390 bp: pleurális folyadékból izolált cfDNS esetén megjelenő további mérettartomány (cfDNS: szabad,sejten kívüli DNS)

Az LB, mint kifejezés különböző módszertanok csoportját jelenti, melynek célja a tumor biomarkereinek folyadékmintából történő kimutatása. A vér, vizelet, plazma és

egyéb testfolyadékok nem invazív megközelítéssel nyerhetőek a betegtől, melynek használata a betegség genetikai hátterének tisztázására szolgálhat [10].

Az LB vizsgálata tehát bármely testfolyadékból kivitelezhető, melyből megfelelő mennyiségű és minőségű nukleinsav izolálása lehetséges, így az onkológia területén számos tesztfolyadék kerül az analízisek középpontjába. A leggyakrabban alkalmazott mintavételi mód a perifériás vérvétel, de pleurális folyadékból, vizeletből és ascitesből is gyakorinak számít a mintavétel [11–13]. Tekintettel a minimális beavatkozást igénylő tulajdonságára a perifériás vér, bekerült a daganatpatológia rutinyakorlatába, hiszen egy sokkal egyszerűbb és kedvezőbb mintavételi eljárásról beszélhetünk, mint a szöveti biopszia vétele. Használatával növelhető az esélye az esetleges betegséget okozó mutációk azonosításának [2,3].

Az LB-ből nyerhető cell-free nukleinsavak mennyiségét és összetételét számos tényező befolyásolhatja, mint például a tumor anatómiai lokalizációja, mérete, stádiuma. Mindezek mellett hatást gyakorol a cfDNA mennyiségére a daganatos szubklónok relatív tömege, a gyulladáshoz kapcsolódó komponensek jelenléte, az apoptózis és a nekrozis mértéke is [5]. A cfDNA a daganatos betegek perifériás vérében nagyobb mennyiségben fordulhat elő, mint az egészséges, tumorról nem rendelkezők vérében (6,58 vs. 0,33 ng/ml vér) és a tumor stádiumának növekedésével is emelkedhet [14].

Kedvező tulajdonságai mellett figyelembe kell venni, hogy a tumorból felszabaduló nukleinsavak mennyisége a szöveti nukleinsavak töredékei, éppen ezért egy sokkal érzékenyebb és egy nagyobb áteresztőképességű módszer szükséges a vizsgálatukhoz, mint például az újgenerációs szekvenálás (NGS) vagy a digitális PCR (dPCR) [1,5]. Az LB egy minimálisan invazív vizsgálati módszer, melynek vizsgálatával információt nyerhetünk az adott daganat genetikai hátteréről, mennyisége utalhat akár a daganat méretére is és a kedvező mintavétel miatt akár longitudinális követésre is alkalmazhatjuk. Éppen ezért úgy gondoljuk, hogy óriási előrelépést jelenthet olyan esetekben ahol a kórszöveti mintavétel a daganat helyzete és/vagy mérete miatt nem megvalósítható, esetleg a beteg állapota nem teszi lehetővé ezen mintavétel kivitelezését.

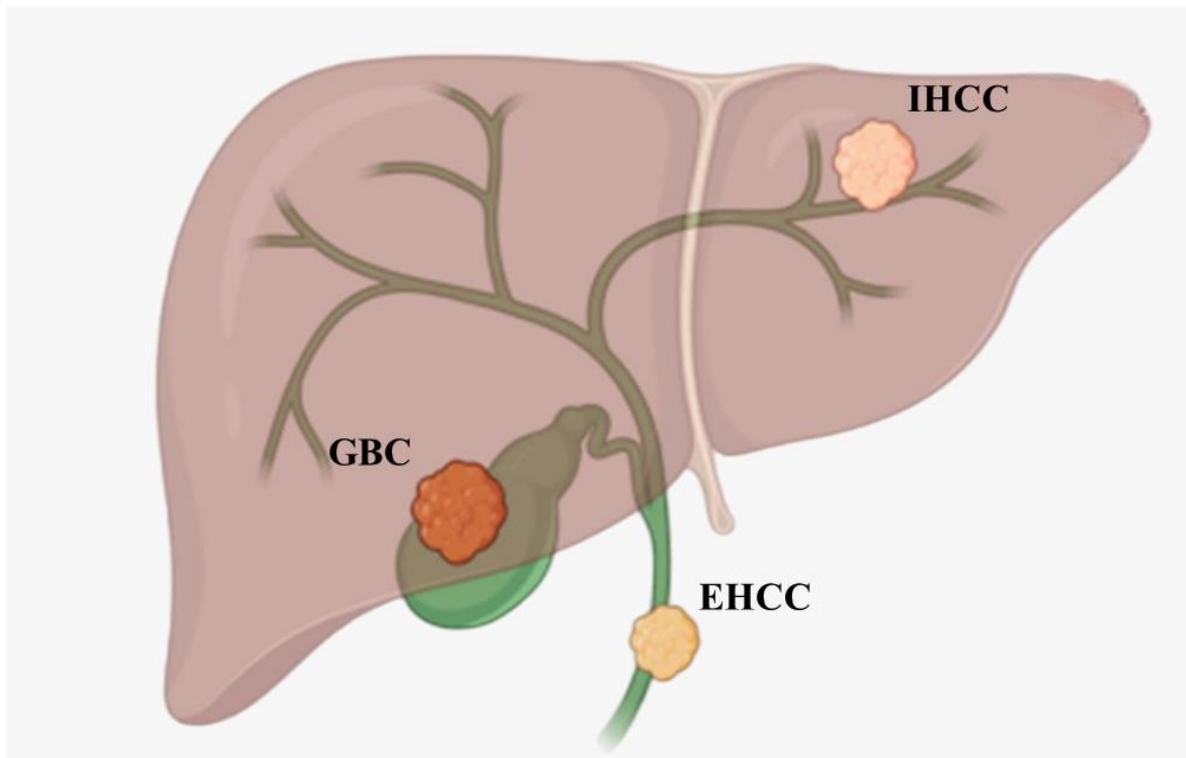
Általánosan a ctDNA vizsgálata öt nagyobb csoportra oszthatóan alkalmazható: a diagnózis felállításához, a daganat mutáció terhelésének kimutatására, a prognózis megállapítására, a megfelelő kezelés kiválasztására valamint a kezelés hatékonyságának és a relapsus mértékének monitorozására [7]. A precíziós onkológia korszakában, ahol a személyre szabott genetikai eltéréseken alapuló kezelések jelenthetik a jövőt pedig egy új megközelítést jelenthet.

2.2. Az epeúti daganatok

2.2.1. Epidemiológia és kórszövettan

A cholangiocarcinoma a második leggyakoribb májat érintő daganattípus, az összes daganatos elváltozás 1%-át teszi ki világszerte, azonban Magyarországon jelenleg nem számít gyakori daganattípusnak, 100 000 lakosra vonatkoztatva, a populáció kevesebb, mint 1%-át érinti [15,16]. Az epeúti daganatok (biliary tract cancers, BTC) egy rossz prognózisú betegség, melynek incidenciája világszerte nagymértékben növekszik. Egy nagyon heterogén típusú daganatcsoport, mely lokalizációja, patológiai altípusai illetve különböző genetikai eltérései miatt korlátozottak az onkológiai terápia lehetőségei, valamint kihívást jelent a hatékony kezelés kiválasztása [17]. A kezelés alapját a tumor teljes rezekciója jelentené, viszont elhelyezkedése, valamint mérete miatt ez a legtöbb esetben nem megvalósítható, a betegek körülbelül csak 20%-ánál végezhető sebészi reszekció [18]. Nagy a mortalitása, amely specifikus és érzékeny biomarker hiányában a késői felismerésének is betudható [17,19,20]. Európában az egy éves túlélés aránya 26%, míg az öt éves túlélés csak 12% körül mozog [21].

Anatómiai elhelyezkedése alapján három csoportra különíthetjük ezen daganatokat. A májon belüli kis epeutakból eredő intrahepaticus cholangiocarcinomára (IHCC), az extrahepatikus epevezeték ducalis hámjából eredő extrahepaticus cholangiocarcinomára (EHCC), valamint az epehólyagot is érintő epehólyagtumorra (GBC) **(3.ábra)** [22,23].



3. ábra. Az epeúti daganatok kategorizálásának sematikus ábrája (IHCC: intrahepatikus cholangiocarcinoma, EHCC: extrahepatikus cholangiocarcinoma, GBC: epehólyag carcinoma)

Számos kockázati tényező befolyásolhatja a betegség kialakulását, mint például a nagyméretű, tünetet okozó epekövek, az elhízás, illetve a Salmonella typhi fertőzés és az epekő kombinációja is, ezeken felül rizikó tényezőnek tekinthető még az epevezeték adenoma, a többszöri parazitákkal való fertőződés, valamint az epehólyag papillomatózis is. Az epehólyagot érintő cholangiocarcinoma hajlamosító tényezője továbbá a primer szklerotizáló cholangitis [19]. Ezen daganatok előfordulása azonban rendkívül sporadikus [22]. A betegek kb. 70%-át a jobb túlélési aránnyal rendelkező (30%) extrahepatikus cholangiocarcinomával diagnosztizálják [17], míg az intrahepatikus típus öt éves túlélési aránya csak 12% körül mozog [22].

2.2.2. Az epeúti daganatok háttérében álló molekuláris eltérések

Annak ellenére, hogy a különböző típusba sorolható daganatok bizonyítottan eltérő molekuláris mintázatot hordoznak, a betegek hasonló kezelésben részesülnek [17,20,22,24]. Korábban már számos tanulmány több különböző genetikai elváltozást detektált, beleértve gén mutációkat, amplifikációkat, deléciókat és fúziókat, amelyek mind különböző sejtfolyamatokat érintenek. Bizonyítottan a betegek közel 40%-ában

kimutatható valamilyen eltérés amelyek tipikusan együtt fordulnak elő, míg mások kölcsönösen kizárják egymás jelenlétét [17,25]. A leggyakrabban detektált eltérések közé tartozik a *TP53* (44%), *PIK3CA* (33%), *KRAS* (17%) és *IDH1* (8,7%) gének mutációja [20,26]. A *KRAS* mutációk aránya 9%-54% között mozoghat, gyakrabban fordul elő EHCC, illetve GBC altípusban. IHCC-ben való megjelenése egy korai biomarkere lehet a progresszióknak [17]. Az epehólyag karcinómában a mutációk általában ritkábbak, egyes tanulmányok szerint az itt előforduló leggyakoribb genetikai eltérés az *ERBB2* gént érinti (3%-38%) [7]. Jelentős arányban kimutatható a *PIK3CA* jelátviteli útvonal mutációja is a BTC-vel diagnosztizált betegekben, arányuk akár a 33%-ot is elérheti. Alapvetően intrahepatikus cholangiocarcinómára típusos az *IDH1* és *IDH2* gének (izocitrát-dehidrogenáz 1 és az izocitrát-dehidrogenáz 2 gének) szomatikus mutációi, valamint az *FGFR2* (fibroblaszt növekedési faktor receptor 2) gén fúziója, melyek feltehetően deregulálják a jelátvitelt a dimerizációs motívumokkal rendelkező 3' fúziós partnerek eltérítése révén, és ezzel egyidejűleg kizárják a *KRAS* valamint *BRAF* gének érintettségét [7,25,27]. Az IDH molekulák niklotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-függő enzimek, amelyek katalizálják az izocitrát oxidatív dekarboxilációját alfa-ketoglutaráttá. Mutáció jelenléte az enzimaktivitás megzavarását okozza, mely következtében az alfa-ketoglutarát 2-hidroxi—glutaráttá alakul, amely a karcinogenezist segíti elő, azáltal, hogy gátolja azokat az enzimeket melyek az alfa-ketoglutarátot használnák kofaktorként [19]. Ezen gén mutációja 99%-ban az R132 kodonnal található [22].

2.2.3. Az epeúti daganatok kezelési lehetőségei

A terápia a tumor reszekálhatóságán felül, az előrehaladott és nem reszekálható esetekben első vonalbeli kemoterápiaként gemcitabin és ciszplatin vagy egyes tanulmányok szerint gemcitabin és kapecitabin kombinációja [18,28,29]. Hasonlóan ezt az adjuváns terápiát alkalmazzák a reszekciót követő kiújulás, illetve távoli áttétek megjelenésekor is, azonban átlagosan 11,7 hónapos túlélés érhető csak el, ezen standard eljárással [16,18,19,22,30–32]. A progrediáló betegség kezelésére jelenleg nincs egy egyértelműen meghatározott másodvonalbeli kezelési protokoll. Egyes tanulmányok alapján a legkedvezőbb másodvonalbeli kezelést a FOLFOX (folinsav, fluorouracil és oxaliplatin) alapú kemoterápia jelentheti [20,33].

A személyre szabott kezelés kialakításának lehetősége miatt, több tanulmány foglalkozott az *IDH1* és *IDH2* pontmutációk illetve az *FGFR2* fúziók vizsgálatával. Mára már célzott terápia alkalmazható jelen abberációk meglétekor, azaz FGFR2 és IDH1 gátlók

[33]. *IDH1* abberáció fennálltakor az FDA által engedélyezett ivosidenib alkalmazása javasolt, mely a mutált *IDH1* kis molekulájú inhibitora, alkalmazása szignifikánsan növelte a progressziómentes túlélés arányát [34]. Valamint számos további vizsgálat elvégzését követően akár az immunterápia is szóba jöhet, abban az esetben, ha az immunellenőrzőpont-gátlók (ICI), mint például a programozott halál ligand-1 (*PD-L1*) és a programozott sejthalál fehérje 1 (*PDI*) gének expressziója megfelelő mértékű. Az FDA jóváhagyta az anti-PD-1 pembrolizumab antitestet, olyan szolid tumorok kezelésére, melyek nem reszekálhatóak vagy progrediáltak és nem áll rendelkezésre más alternatív kezelési mód [35]. A PD-L1 pozitív daganatokban általánosságban magasabb a tumor mutációs terhelés (TMB) és nagyobb valószínűséggel jelenik meg *BRAF*, *BRCA2*, *RNF43* valamint *TP53* mutáció [26,29,36–38].

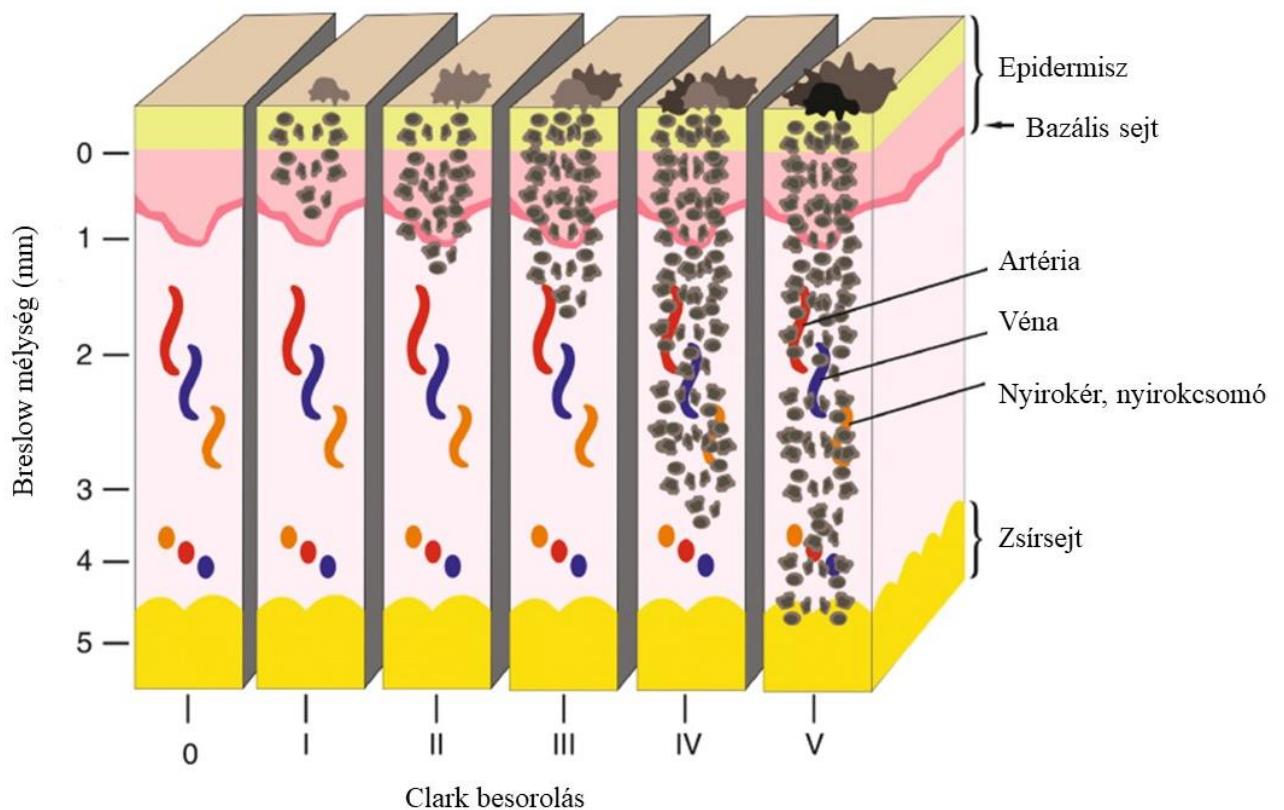
Tekintettel arra, hogy az elmúlt évtizedben a magas mortalitás mellett, a betegség prevalenciája növekvő tendenciát mutatott, valamint, hogy a kései felismerés miatt, a betegek többségénél már áttét is jelentkezik mire felismerése kerül, így a tumor reszekálhatósága az esetek kevesebb, mint 15%-ában jöhet szóba, tehát mindenképpen szükségesnek érezzük a kezelési protokoll személyre szabott, genetikai eltéréseken alapuló kidolgozását [19,20,22,24]. Többféle mutációt hordozó gént és epigenetikai elváltozást észleltek már cholangiocarcinomában, a jövőben ezek az eltérések válhatnak terápiás célpontokká, valamint diagnosztikai és prognosztikai biomarkerei lehetnek a betegségnek [10]. Az előbbiekre tekintettel számos erőfeszítés történt az epeúti daganatok kialakulásának hátterében álló mechanizmusok megismerésére [17]. Összességében elmondható, hogy a folyamatos fejlődés ellenére a cholangiocarcionoma diagnosztizálása, kezelése, követése továbbra is kihívást jelent a klinikusok számára. A hosszútávú megoldás mindenképpen olyan biomarker azonosítása, amelyek megkönnyítik a minél korábbi diagnózis felállítását, szubtypusokba való besorolást, valamint az onkológiai terápia kiválasztását.

2.3. A primer cutan melanoma

2.3.1. Epidemiológia és kórszövettan

A primer cutan melanoma (PCM) a bőrdaganatok egy rendkívül agresszív formája, mely a melanocitákból, a felhámiban, az agyhártyában, a belső fülben és a szemben található speciális pigmentsejtekből alakulhat ki. Rizikófaktorai közé sorolható a hosszan tartó ultraibolya B sugárzásnak való kitettség, melanocitás vagy diszpláziás

naevuszok jelenléte, a genetikai hajlam, az immunszuppresszió, illetve olyan fenotípusok megléte, melyek például a világos hajért, a szeplőkért és a világos bőrszínért felelősek. Attól függetlenül, hogy genetikai vagy szerzett a rizikó faktor ugyanolyan mértékben képes hozzájárulni a melanoma kialakulásához. Osztályozásuk a tumor vastagsága és a fekélyesedés mértéke szerint történik. A T kategóriába való besorolás (T1-T4) alapja a tumor vastagsága, az úgynevezett Breslow-mélység (BD), mely a bőrfelszíntől a daganat legmélyebb pontjáig terjedő méret mm-ben megadva. Emellett a PCM szövettani besorolásakor figyelembe vesszük a Clark szintet is, melynek öt csoportja van. Alapját ennek is a daganat mélysége adja, ez azonban kevésbé reprodukálható besorolásnak számít (4. ábra).



4. ábra. A melanoma besorolásakor figyelembe vett Breslow mélység és Clark osztályozás

A melanoma előfordulási aránya az utóbbi időben világszerte hatalmas növekedésnek indult [39–45]. Az Egyesült Államokban a rosszindulatú melanoma az ötödik leggyakoribb daganat a férfiak körében a nőknél pedig a hetedik, évente körülbelül 50.000 új esetet diagnosztizálnak, melyek közül csaknem 15% halálhoz vezet. Magyarországon 2019-es adatok alapján a kilencedik leggyakoribb daganattípus, az utóbbi

évek új esetszámai pedig évente akár a háromezret is elérhetik. Gyakorisága hazai viszonylatban a nők körében jelentősebb [46].

A diagnózis felállításakor megközelítőleg a daganat 80%-a lokalizált, 15%-a regionális és 5%-a távoli áttét [47]. 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. Ennek ellenére az összes a bőrt érintő daganatos megbetegedések csak 1%-át teszik ki, halálozási rátája azonban mégis a legmagasabb [48]. Számottevően metasztázis leggyakrabban az agyban és a tüdőben fordul elő. A nagymértékű progresszió megjelenése miatt mindenképpen szükséges egy olyan biomarker, mely lehetővé teszi a magas kockázatú melanomák felismerését méghozzá a betegség minél korábbi fázisában [40,47].

A melanoma kimenetelét befolyásolhatja a daganat stádiuma, esetleges fekélyek megléte, a BD mértéke, illetve a magasabb mitotikus arány is. Ezeken kívül a prognosztikai tényező független faktora a betegek életkora is, valószínűleg az életkori sajátságokból adódó szociodemográfiai különbségek miatt. Szerepet játszik a rosszabb kimenetelben az öregedés miatti immunrendszer lecsökkent működése, a szervi diszfunkció és egyéb társbetegségek is [49]. A daganat ezen formájának korai felismerése, tehát elengedhetetlen a hatékony kezelés kialakításához, valamint a betegek kedvezőbb élet kimeneteléhez.

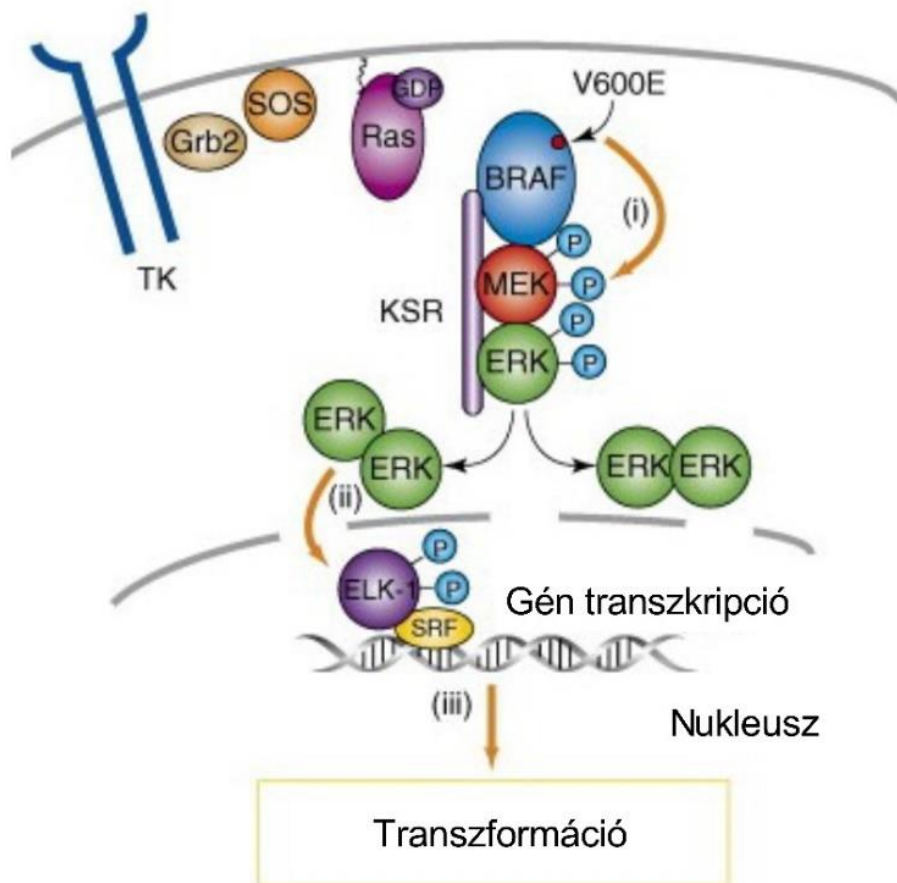
2.3.2. A melanomák háttérben álló molekuláris eltérések

Bizonyított, hogy a melanomás betegek körében a RAS/RAF/MEK/ERK útvonal többsége hiperaktivált, ezáltal nagy szerepe van a melanomasejtek proliferációjában, túlélésének szabályozásában, így számos terápiás célpontot vizsgáltak ezen útvonalon a megfelelő terápia kialakításának reményében [50]. Molekuláris osztályozása alapján négy csoportot tudunk elkülöníteni a melanomák diagnosztikája során: *BRAF*-, *NRAS*-, és *KIT*-mutánst és a negyedik, egy úgynevezett tripla vad típusú csoportot.

A leggyakoribb genetikai eltérés a melanomás betegek körében a B-raf proto-onkogén *BRAF* gént érintik (az esetek kb. 44%-a ezen gén valamilyen mutációját hordozza) [50–52]. Ez a gén a 7. kromoszómán található, 6459 bázispárból és 18 exonból áll. Összesen 766 aminosav kódolja, és rendelkezik egy RAS kötő, ciszteinben gazdag

doménnel, egy kinázdoménnel (savas N-terminállal és regulációs C-terminállal), valamint egy szerin/treonin szakasszal [51,53,54]. A molekula tehát egy szerin/treonin kináz, ami a RAS szerin/treonin protein kináz család tagja, és a MAP kináz/ERK jelátviteli útvonalat aktiválja, mely útvonal humán daganatok esetében gyakran érintett [55].

A mutációk többsége a kináz domént kódoló régióban, a 11-es és 15-ös exonban fordul elő [56]. Ez három kinázt foglalhat magában, az ARAF-ot, a BRAF-ot és a CRAF/RAF1-et. Ezek közül a *BRAF* rendelkezik a legnagyobb kináz aktivitással, ezáltal számos transzkripciós faktor sorozatos aktivizálásához vezethet, így több biológiai folyamatban is szerepet játszhat, mint pl. a sejt differenciálódás, a sejtproliferáció, a sejt növekedés és az apoptózis [53,56–59]. A genetikai eltérések 90%-át szomatikus pontmutáció okozza, méghozzá az 1799. nukleotid pozícióban lévő timin adeninné való transzverziója. Ez a misses mutáció a 15. exonban fordul elő, ami 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, akár 500-700 szorosára is, 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 (**5. ábra**). Ezen típusú aberációk nagyobb eséllyel reagálnak BRAF-inhibitorokra [60–62].



5. ábra. A *BRAF* p.V600E mutáció hatása a MAPK-ERK jelátviteli kaszkádra

A második leggyakoribb mutáció a p.Val600Lys, melynél valin lizinnel helyettesítődik, ez az esetek kb. 5-6%-át teszi ki. Ezek a két RAS-független monomerként aktivált *BRAF* mutációk a leggyakoribbak [53,62–65]. Jellemző eltérések lehetnek még a RAS-független dimerként aktiválódó pontmutációk, melyek magas vagy közepes kinázaktivitással rendelkeznek, ide tartoznak pl. a K601 E/N/T aberációk. Ezekről általánosságban elmondható, hogy reagálnak a MEK inhibitorokra. A harmadik csoportot képviseli még a teljes kináz aktivitást károsító vagy alacsony kinázaktivitással rendelkező, de RAS-kötést és ezt követően a CRAF-aktiváció révén a MAPK-útvonalon keresztül szignáltranszdukciót okozó eltérések (594/596 kodonon lévő mutációk), ennél a típusnál jellemző a hosszabb túlélés, és eddig nem találtak szignifikáns összefüggést pl. a korrallal, a nemmel és a mikrosatellita instabilitással [64].

2.3.3. A melanómák kezelési lehetőségei

A terápiás lehetőségek igen sokrétűek lehetnek. Az elmúlt időszakban számos terápia jelent meg a melanoma és a metasztatikus melanoma kezelésére, beleértve az immunterápiát is, valamint a specifikus mutációkat célzó terápiákat is [2]. Primer kezelésként a daganatos terület sebészi eltávolítása történet, majd radio-, kemo-, immun-, és célzott terápia jöhet szóba [49,66,67]. A sebészi kimetszés számos esetben elegendő, azonban a progresszió kialakulása szignifikáns összefüggésben van a daganat Breslow-mélységével. Az olyan vastagabb melanómák esetében, ahol a Breslow-mélység >4 mm a 10 éven belüli halálozási arány akár az 50%-ot is elérheti [41]. Következésképpen ezen daganat esetén is megbízható módszerekre van szükség mind a betegség progressziójának elkerüléséhez, mind a kezelés kiválasztásához, valamint a kezelésekkal szembeni rezisztencia esetleges monitorozásához [2].

A *BRAF* gátló szerek (vemurafenib és dabrafenib) reverzibilis ATP kompetitív szerek, melyek a kinázt aktív állapotában stabilizálják, így az ATP kötő helyet elfoglalják. Nagyon ígéretesek lehetnek a p.Val600Glu mutáns betegek kezelését illetően, jelentős javulás figyelhető meg alkalmazásuk során az előrehaladott betegek prognózisában a rezisztencia kialakulásáig (kb. 5 hónap), azonban hatástalannak bizonyultak *BRAF* nonVal600Glu típusú daganatok esetén [40,52,68–73]. Bizonyítottan terápiás konzekvenciája van a MEK-gátlóknak is (trametinib, cobimetinib és binimetinib). A MEK1 és MEK2 kiváló gátlószerei a RAF mutáns melanómáknak. Azonban nyilvánvaló, hogy a melanoma kialakulását több genetikai elváltozás okozza, mely több útvonalon is megzavarja a jelátviteli folyamatokat, így a megfelelő kezelést mindenképpen több útvonal egyidőben történő megcélzásával érhetjük el [50]. Így indult el egyidőben a *BRAF*/MEK inhibitorok használata mellett a PIK3 útvonal inhibitorok alkalmazása is. A PIK3 útvonal a RAS után aktiválódik, de *BRAF* mutáns melanómák nagy részében is megfigyelhető az aktiválódása. Egy tanulmány pedig kimutatta, hogy a két inhibitor egyidejű használata önmagában is gátolja a melanomasejtek növekedését. Metasztatikus melanómák kezelésére például a dabrafenib+trametinib [74,75], a vemurafenib+cobimetinib [76,77], valamint a encorafenib+binimetinib [70] kombinációkat alkalmazzák hatékonyan, csökkentve ezzel a rezisztencia kialakulásának esélyét, de monoterápia esetén a másodlagos daganatok kialakulásának lehetőségét is. Kijelenthető tehát, hogy célterápia csak a *BRAF*-mutáns melanómák esetében érhető jelenleg el. *KIT*-mutáns melanoma esetén a legfontosabb a *KIT*-inhibitorra való érzékenység meghatározása. *NRAS* mutáció fennállta esetén jelenleg

nem áll rendelkezésre alkalmazható terápia, míg tripla vad típus esetén csak az immunterápia (anti-PD-1 és/vagy anti-CTLA-4 antitest) jöhet szóba. A tumorsejtek és a tumorba infiltráló immunsejtek PD-L1 expressziója számos daganattípus esetén előfeltétele az immunterápiának, melanomák esetében azonban ez nem elvárás, bár az expresszió megléte, általában itt is összefüggésbe hozható a terápia hatásosságával, de az expresszió nélküli esetekben is megfigyelhető terápiás válasz [51]. Lehetséges, hogy a *BRAF* mutált daganatok kezelésére a kombinált terápia a megoldás, hiszen számos BRAF-inhibitor csupán citosztatikus hatást fejt ki, miközben a daganatokban gyakran alakul ki szerzett rezisztencia ezen szerekekkel szemben [55]. Az immunterápia azonban önmagában egyelőre nem hozott olyan mértékű előrelépést, mely nagymértékben növelte volna a túlélési arányt. Több irodalmi adat található mely, a sugárterápiával való közös alkalmazásának hatékonyságát bizonyítja. Műtéttel vagy kemoterápiával való kombinációja standard eljárásnak számít.

Önmagában a radioterápia DNS károsodást okoz, mellyel megszakítja a sejtciklust és sejthalálhoz vezet. Ennek egyik módja, hogy a sugárzási energiát elnyelik a sejtek, mely a molekula károsodását eredményezi. Ha víz nyeli el a sugárzási energiát, akkor a víz radiolízise játszódik le, aminek következtében reaktív oxigén (ROS) és hidroxil (OH) gyökök keletkeznek, melyek okozzák lényegében ténylegesen a DNS károsodást. Míg másik módja, hogy a sugárzás által keletkezett vaszkuláris fibrózis és elzáródás tápanyaghiányt okoz a daganatban [67].

A melanomákat az egyik legimmunogénebb és legnagyobb TMB-t mutató tumortípusnak tekintik. Ennek következtében megnő a betegekben keletkezett neoantigénként funkcionáló mutáns fehérjék termelődésének az esélye, ami a fokozott immunogenitáshoz járul hozzá. Éppen ezért ezzel magyarázzák a daganatellenes terápiák, köztük az ICI nagyfokú hatékonyságát ezen betegeknél [51].

A betegség pontos osztályozása és stádumbesorolása kritikus fontosságú, ahhoz, hogy a betegeknek a megfelelő terápiás lehetőségeket biztosítsák, így tehát a klinikai döntéshozatal, illetve a prognosztika alapját a mai napig a Breslow, illetve Clark szintek képezik, hiszen a BD bizonyult a szövettani értékelés szempontjából a legreprodukálhatóbb tényezőnek [44].

A legtöbb melanoma sporadikus módon alakul ki, tehát örökletes komponens nem tartalmaz, így mindenképpen szükséges személyre szabottan minden daganat genetikai hátterének megismerése. Mára már rutinszerűvé vált a melanomás betegek molekuláris vizsgálata, az esetleges tumor heterogenitásának a tisztázása végett [52].

Kifejezetten hasznosnak gondoljuk az LB vizsgálatát, különösképpen a mutáció alapú kezelések megválasztásánál. Tanulmányok támasztják alá, az NGS technika vérmintákon való alkalmazhatóságát *BRAF* mutáció kimutatására is. Azonban a klinikai gyakorlatban minimális információ áll rendelkezésünkre az LB és a melanoma kapcsolatáról. A korábban is említett hajlamosító tényezőket figyelembe véve, mindenképpen úgy gondoljuk, hogy a melanoma kezelésének diagnosztikájában is hatalmas előrelépést jelentene a minél előbbi diagnózis megismerése, így ezen daganattípusnál is célszerű lehet az LB alkalmazása, mind a diagnózis felállításához, mind pedig a kezelés követésére [8]. A PCM-ek mérete kicsi és anatómiai elhelyezkedése miatt, értelemszerűen kevesebb mennyiségű cfDNA származik belőlük, ebből kifolyólag indokolt egy ultraérzékeny módszer alkalmazása ezen mintatípus elemzéséhez. A dPCR már több daganatos megbetegedés esetén hatásos technikának bizonyult, sikeresen felhasználták a daganatokra jellemző specifikus mutációk azonosítására húgyhólyag daganatokban [78], papilláris pajzsmirigy daganatban [79], petefészek daganatban [80], fej és nyak laphám carcinomákban [81], hasnyálmirigy daganatokban [82], de alkalmazzák már emlő, colorectális és nem kissejtes tüdődaganatok diagnosztikájában is [83–85]. Bizonyított, hogy a dPCR az egyik legalkalmasabb technika a *BRAF* p.Val600Glu kimutatására valamint monitorozására, így az esetlegesen kis allélfrekvenciával rendelkező aberációk azonosítására is [2,86–88].

A személyre szabott kezelés megválasztása miatt a kezelőorvosok új kihívásokkal találták magukat szembe, mely alapján mindenképpen minél pontosabb és megbízhatóbb módszerekre van szükség a lehető leghamarabbi és pontosabb diagnózis megállapításához vagy a kezeléssel szembeni rezisztencia monitorozásához. Eddigi tanulmányok során bizonyított, hogy a szöveti és plazma *BRAF* státusz közötti hasonlóság közel 80%-os, így a liquid biopszia elemzése során kapott *BRAF* státusz megfelelő biomarkere lehet a betegségnek [89].

3. Célkitűzés

Munkánk során két érzékeny, nagy áteresztőképességű technikát alkalmazunk két szolid tumor típusban. Epeúti tumorok nagyrésze inoperábilis, éppen ezért a minimálisan nyerhető szöveti biopszia mellett, a liquid biopszia egy alkalmas megoldás lehet a rutin diagnosztikában. A melanomák mivel a testfelszínen helyezkednek el, korlátozott vérellátással rendelkeznek, ennek ellenére az 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 újgenerációs szekvenálás kitűnően alkalmas lehet akár a liquid biopsziák vizsgálatára is. Jelenleg már a rutin diagnosztika részét képezi tüdő, valamint colon adenocarcinomák esetében. Ezen elven továbbhaladva tesztelni szeretnénk epeúti tumorok diagnosztikájában is. A digitális PCR a hagyományos PCR technikákhoz képest egy sokkal érzékenyebb technológia, valamint az NGS-hez képest is számos előnnyel rendelkezik. Sokkal rövidebb idő alatt nyerhető általa eredmény, illetve nagyobb költséghatékonysággal és nagyobb pontossággal tudja kimutatni azon mutációkat is, melyek a mintákban esetleg rendkívül alacsony variáns allélfrekvenciával fordulnak elő. Akár 0,01% alsó kimutatási határértéket is elérhetünk a módszerrel.

3.1. Az epeúti daganatokkal kapcsolatos célkitűzéseink

- A daganatból származó liquid biopszia cfDNS-ének mennyiségi és minőségi meghatározása, molekuláris elemzése
- Az általunk meghatározott becsült tumortérfogat (ETV), és a cfDNS hozama közötti összefüggés vizsgálata
- NGS vizsgálat segítségével a szomatikus mutációk azonosítása, valamint a tumorvariáns-terhelés (TVB) számszerűsítése
- A három epeúti tumor altípusában előforduló mutációk megoszlásának vizsgálata
- Egy betegből származó szövettani és liquid biopszia során nyert DNS-minták közötti genetikai eltéréseknek a vizsgálata

3.2. A primer cutan melanomával kapcsolatos célkitűzéseink

- Retrospektív módon 100 ismert *BRAF*-státuszú beteg dPCR technikával való ellenőrzése, ezáltal a módszer diagnosztikai hasznosságának meghatározása
- Prospektív tanulmány keretein belül a szövettani mintához párosított LB minták *BRAF* státuszának vizsgálata
- A Breslow-mélység (BD), a tumorból származó DNS (tdDNS) koncentrációja és genetikai eltéréseinek allél frekvencia értéke (tdVAF), a cfDNS koncentráció és a szabadon keringő DNS-ből származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke (cfVAF) közötti összefüggések keresése

4. Anyagok és módszerek

4.1. Minták

4.1.1. Az epeúti daganatok vizsgálata

Összesen 67 epeúti daganattal diagnosztizált beteg formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) szövettani mintája érkezett vizsgálatra a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathologia Intézetébe 2020-2022 között. Ebből 38 beteg FFPE mintájához sikerült párosítottan liquid biopsziás mintát gyűjteni a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Onkológiai Klinika segítségével és ezekből NGS vizsgálatot végezni. Mivel ezen betegek nagy része hasonló kezelésben részesült, így az összes LB mintavétele a szövettani mintavételtől átlagosan 24 hónapra történt (tartomány: 5-36, medián: 9,5 hónap). 16 beteg esetében hat hónap telt el a két típusú mintavétel között, míg három esetben 30 hónapnál hosszabb idő, mivel a betegek jól reagáltak a kezelésre és hosszabb tünetmentes időszak után mutattak metasztázis képződést. A cholangiocarcinoma diagnózis igazolására az alábbi immunhisztokémiai festéseket végeztük: CK7 (OV-TL 12/30 klón, 1:100 hígítás, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), CK8/18 (5D3 klón, 1:100 hígítás, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), CK19 (Ks19.1 klón, 1:200 hígítás, Biocare Medical, Pacheco, CA, USA), CK20 (Ks20.8 klón, 1:200 hígítás, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), CA19-9 (C241:5:1:4 klón, 1:200 hígítás, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), HSA (OCH1E5, 1:700 hígítás, Dako, Agilent Technologies Company, Santa Clara, CA, USA), argináz (poliklonális, 1:20 000 hígítás, Merck, Darmstadt, Németország) és glikán-3 (1G12 klón, 1:50 hígítás, Biocare Medical, Pacheco, CA, USA), illetve PD-L1 IHC (SP142 klón, 1:100 hígítás, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) vizsgálat készült az immunterápia lehetőségének mérlegelése miatt.

4.1.1.1. Tumor méret meghatározás

A daganatok méretének meghatározása a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Nukleáris Medicina Intézet kollaborációjával valósult meg. Az epeúti tumorok esetén összefüggést kerestünk a tumor méret és a cfDNS mennyisége között. Becsült tumor térfogat (ETV) meghatározásához radiológus segítségével a diagnózis felállításakor készült MRI és/vagy CT képek alapján hosszúság (l) és szélesség (w) értékeket mértünk, hiszen *in*

vivo a daganat ezen két átmérője mérhető, melyekből az alábbi képlet segítségével számítottuk az ETV-t [89]:

$$ETV = w^2 x \frac{l}{2}$$

4.1.2. A melanomák vizsgálata

A Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathologia Intézetébe 267 melanomával diagnosztizált beteg *BRAF* mutációs státuszának meghatározása történt 2021-2023 között. Retrospektív módon ebből összesen 100 esetet választottunk ki, *BRAF* státuszoktól függően a digitális PCR protokolljának beállítására és hatékonyságának igazolására. A prospektív kohorszot pedig 34 melanomával diagnosztizált egyén alkotta, akiktől mind FFPE minta, mind pedig LB rendelkezésünkre állt, melyek levételét a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Bőrgyógyászati Klinika végezte. Az esetek további szövettani csoportosítása a Breslow-mélység és Clark osztályozás szerint történt. Melanomák esetén a diagnózis alátámasztására S100 fehérje (poliklonális, 1:1000 hígítás, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), vimentin (V9 klón, 1:200 hígítás, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), HMB45 (human melanoma black, HMB-45 klón, 1:200 hígítás, Dako, Agilent Technologies Company, Santa Clara, CA, USA) és melan-A (A103 klón, 1:200 hígítás, Dako, Agilent Technologies Company, Santa Clara, CA, USA) ellenanyagokat használtunk. További Ki-67 festést alkalmaztunk (MIB1 klón, 1:200 hígítás, Dako, Agilent Technologies Company, Santa Clara, CA, USA) a sejtproliferációs index meghatározásához.

Minden esetben a szövettani blokkból készült hematoxilin-eosinnal festett metszeteken a tumorsejtarányt, valamint a melanoma daganatok esetében a szövettani besorolást egy patológus szakorvos ellenőrizte. A cut-off érték 5%-os tumorsejt arány volt.

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

4.2. DNS izolálás

A LB mintatípusunk minden esetben 5 ml perifériás vérplazma volt, ebből történt a cfDNS kinyerése. 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. A

perifériás vérből származó plazma cfDNS izolálása QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Németország, Hilden) alkalmazásával valósult meg 30 µl AVE pufferben. A kórszövettani FFPE minták DNS izolálásához pedig QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-et (Qiagen, Németország, Hilden) használtunk, az elúció 50 µl AE pufferrel történt. A DNS koncentrációkat Qubit dsDNA HS Assay Kittel mértük Qubit 4.0 fluorométeren (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Az LB esetén kapott DNS koncentrációból DNS-hozamot kalkuláltunk az alábbi képlet segítségével:

$$DNS - hozam \left(\frac{ng}{ml} \text{ plazma} \right) = \frac{DNS \text{ koncentráció} \left(\frac{ng}{\mu l} \right) \times \text{eluálási térfogat} (35\mu l)}{\text{plazmatérfogat} (ml)}$$

4.3. StripAssay

A reverz hibridizáción alapuló *BRAF* 600/601 StripAssay (ViennaLab Diagnostics GmbH, Bécs, Ausztia) 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. A szükséges DNS mennyiség 10 ng. A PCR reakció egy minta esetén 15µl amplifikációs mixet, 5 µl hígított DNS polimerázt és 5 µl DNS-t tartalmaz. A PCR reakció hőmérsékleti ciklusait az **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. A StripAssay során alkalmazott PCR reakció hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
94°C	2 perc	1x
94°C	1 perc	35x
70 °C	50 másodperc	
56 °C	50 másodperc	
60 °C	1 perc	
60 °C	3 perc	1 x

4.4. Újgenerációs szekvenálás

Az újgenerációs szekvenálás egy érzékeny, nagy áteresztőképességű 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 [22]. Epeúti daganatos betegek esetében a két mintatípus (FFPE és LB) összehasonlítására egy 67 génes Archer VariantPlex Solid Tumor Kitet (ArcherDX, Boulder, CO, USA) alkalmaztunk. A könyvtárak koncentrációját KAPA Universal Library Quantification Kit (Hoffmann-La Roche, Bazel, Svájc) segítségével mértük. A szekvenálást Illumina MiSeq készüléken kiviteleztük (MiSeq Reagent Kit v3 600 ciklus, Illumina, San Diego, CA, USA). A végső futási koncentráció minden esetben 8 pM könyvtár és 1% Phix volt. A könyvtárakat bidiekciónálisan szekvenáltuk, hogy 2x150 bázispáros leolvasást kapjunk, legalább 250-szeres lefedettséggel. A FASTQ-fájlokat az Archer Local Virtual Machine alkalmazásának segítségével elemeztük (7.0-es verzió, ArcherDX). Referenciagenomnak a GRCh38 humán genomot alkalmaztuk. A szekvenciák minőségét figyelembe véve a variáns allélfrekvenciákat (VAF) 2%-ra állítottuk. Az azonosított mutációk klinikai jelentőségének meghatározásához a ClinVar a COSMIC és a VarSome Premium, míg a terápiás lehetőségek megítélésére az OncoKB adatbázist használtuk.

4.5. Digitális PCR

A hagyományos PCR technikán alapuló digitális PCR egy szekvencia-specifikus nagy áteresztőképességű technika, amely lehetővé teszi a nukleinsavak kimutatását és mennyiségi meghatározását fluoreszcencia méréssel, méghozzá nagy pontossággal és érzékenységgel. A dPCR során a kiindulási nukleinsav molekulákat külön reakcióterekben amplifikáljuk, és minden reakcióterben csak egy vagy néhány DNS-molekula található.

A reakcióelegy szétválasztásától függően megkülönböztethetünk mikrofluid chip alapú (cdPCR) és droplet alapú (ddPCR) dPCR típust. A ddPCR többnyire automata droplet képzést követően a kiindulási DNS templát molekulák amplifikálását olaj-víz emulzió keresztül hajtja végre, így hatékonyabb és sokkal szenzitívebb, mint a cdPCR. Ezt követően kétszínű optikai érzékelőrendszerrel történik a keletkezett jelek leolvasása. A mennyiségi meghatározás ennél a technikánál azon az elven alapul, hogy a molekulák véletlenszerű eloszlása több partícióban a Poisson-eloszlást követi.

A módszer előnye, a valós idejű PCR-al szemben, hogy abszolút kvantifikációt tesz lehetővé. A célmolekula nélküli reakció 0 lesz, míg a célmolekulával rendelkező 1, ezáltal számszerűsítve az eredményeket lehetővé teszi a technika az abszolút kvantifikálást. Az így kapott részek PCR mikroreaktorként működnek és az amplifikált célszekvenciákat tartalmazó szakaszokból fluoreszcencia elvén végpontméréssel, a PCR termékek minden egyes ciklus után megduplázódhatnak, ha a hatékonyság 100%. A

módszer a pozitív partíciók számát használja fel a célkoncentráció kiszámításához [86,90,91]. Érzékenységének köszönhetően (mely átlagosan 0,1%, esetenként akár a 0,001%-ot is elérheti) alkalmas kis mennyiségű DNS kimutatására is. A célszekvencia abszolút mennyiségét ismerve a kópiaszám változások meghatározhatók, így melanómás betegek LB mintáinak vizsgálatára is alkalmas [85,91,92].

Munkánk során dPCR LNA Mutation Assay (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével végeztük a *BRAF* státuszok meghatározását a QIAcuity One dPCR készüléken. A reakcióhoz Probe PCR Master Mixre, dPCR LNA Mutation Assayre, a vizsgálni kívánt DNS templátokra, RNáz mentes vízre volt szükség. A vizsgálatához 24 mintára elegendő 26K felbontású QIAcuity nanoplatet használtunk. A PCR reakcióhoz szükséges DNS mennyiség 20 ng volt, melyhez 10 µl PCR master mix-et és 1,3 µl primer-próba mix-et pipettáztunk. A 40 µl végtérfogathoz szükséges mennyiséget pedig RNáz mentes vízzel pótoltuk. Az így kapott reakció elegyet vortexeltük, centrifugáltuk és a gyártó által javasolt dPCR hőmérsékleti profilját alkalmazva végeztük el a reakciót (**3. táblázat**). Az adatok elemzéséhez a QIAcuity Software Suite-ot használtuk. A FAM esetében 85, HEX esetében pedig 100 RFU fluoreszcencia küszöbértéket alkalmaztunk.

3. táblázat. A digitális PCR hőmérsékleti profilja

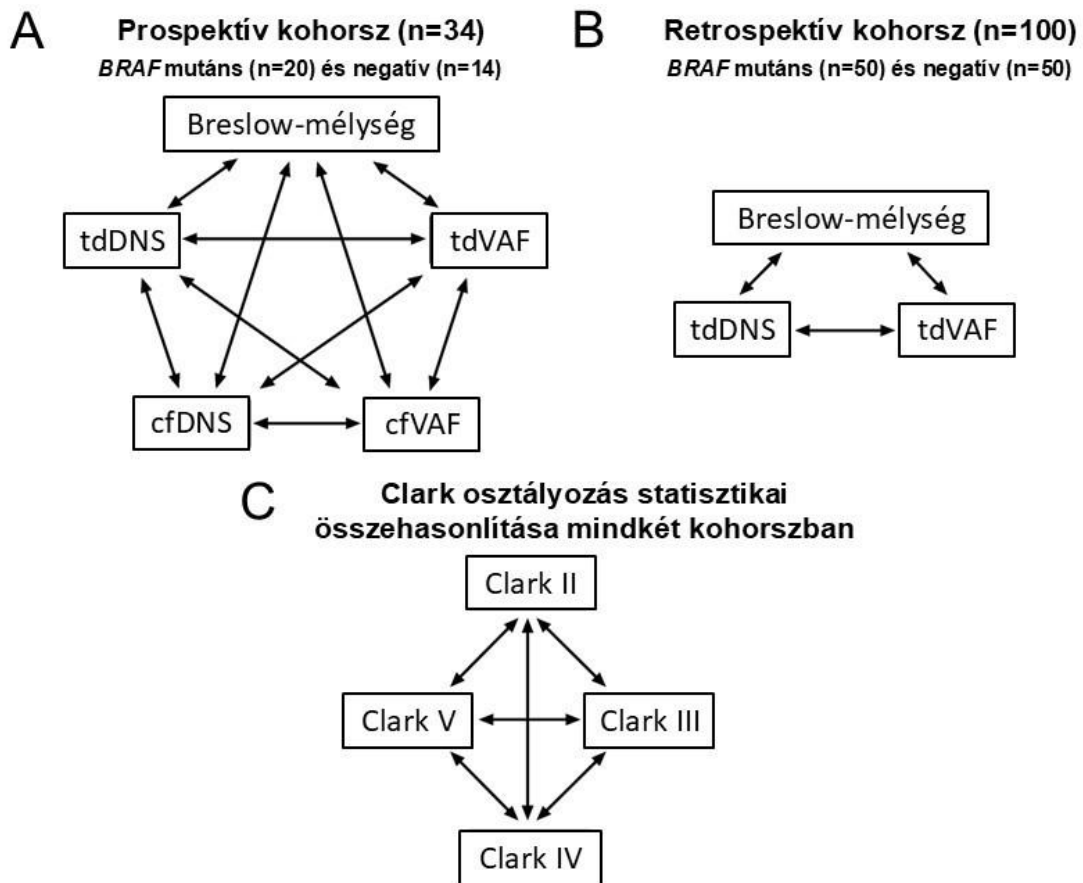
Ciklusszám	Időtartam	Hőmérséklet
1x	2 perc	95°C
40x	15 másodperc	95°C
	30 másodperc	60 °C

4.6. Statisztikai módszerek

A statisztikai analízist minden esetben a GraphPad Prism 9 programmal (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) végeztük. A <0,005 alatti p-értéket 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 kohorszban a Breslow-mélység, a tdDNS, a tdVAF, a cfDNS, a cfVAF értékek között. Vizsgáltuk külön a mutáns, illetve vad típusú eseteket is. Továbbá az említett paramétereket statisztikailag Kruskal-Wallis teszttel elemeztük a Clark osztályozás alapján kialakuló csoportokban is. A vizsgálatok logikai elvét a **6. ábra** mutatja be.



6. ábra. A melanomával diagnosztizált betegek vizsgálatának elve **A:** korrelációs elemzések a prospektív kohorsz Breslow-mélység, tdDNS, tdVAF, cfDNS és cfVAF értékei között. **B:** korrelációs elemzés a retrospektív kohorszban a Breslow-mélység, tdDNS és tdVAF értékek között. **C:** Kruskal Wallis statisztikai próba alkalmazása mindkét kohorszban a korábban említett értékek között a Clark féle osztályozás alapján kialakított csoportok között. A statisztikai számításokat minden esetben külön-külön végeztük el a p.Val600Glu mutációval rendelkező és ezen mutációval nem rendelkező vad típusú eseteknél. (tdDNS: tumorból származó DNS koncentráció, tdVAF: tumorból származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke, cfDNS: cell-free DNS koncentráció, cfVAF: szabadon keringő DNS-ből származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke)

5. Eredmények

5.1. Az epeúti tumorokkal diagnosztizált betegek NGS alapú elemzése

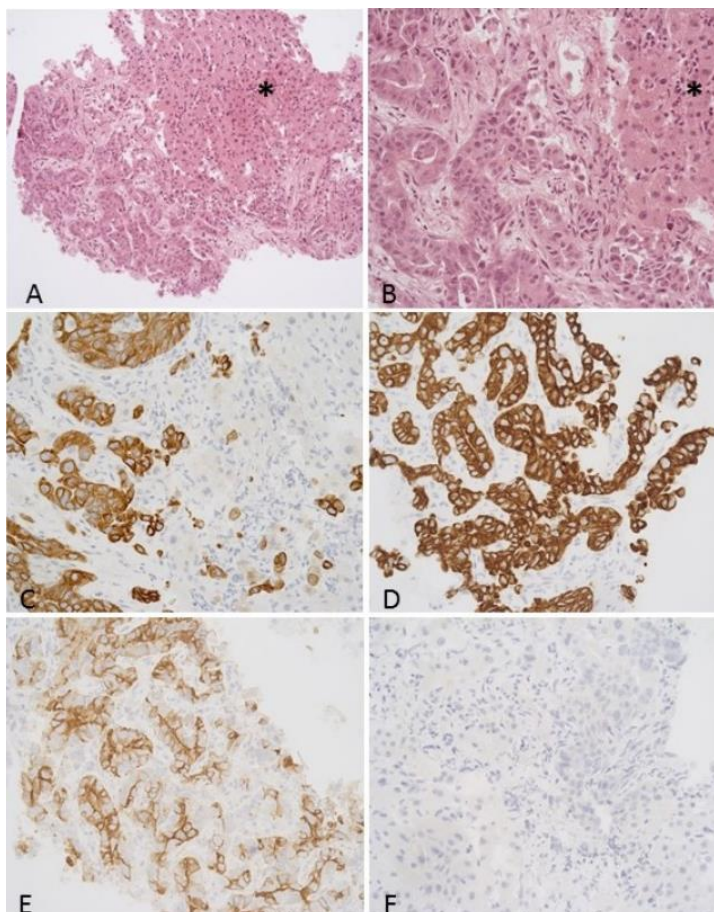
Vizsgálatunk során a beválogatott betegek átlag életkora 67 év volt (tartomány: 42-87), a nemek férfi/nő eloszlása pedig 20/18. A tumor anatómiai elhelyezkedése alapján 21 intrahepatikus, kilenc extrahepatikus és nyolc epehólyagtumorral rendelkező esetet tudtunk elkülöníteni. A betegek diagnózis felállításához szükséges CT és/vagy MRI képek segítségével hosszúság (l) és szélesség (w) értékeket mértünk, melyekből becsült tumortérfogatot számítottunk, ennek átlagos értéke a vizsgált betegpopulációban 201606,79 mm³ volt. Nyolc esetben (1., 2., 3., 13., 14., 28., 36. és 38. esetek) metasztázis alakult ki, ezért ezen daganat méreteit hozzáadtuk a primer tumor becsült tumortérfogatához. A tumortömeg méreteket figyelembe véve nem találtunk szignifikáns összefüggést a három csoport ETV értékei között (p=0,53), valamint külön-külön az IHCC és EHCC (p=0,6346), az IHCC és GBC (p=0,283), és az EHCC és GBC (p=0,25) csoportok között sem.

Az anatómiai elhelyezkedés miatt ezen daganattípusok nagy része inoperábilis, ezért az intra- valamint extrahepatikus cholangiocarcinomák esetében csak túbiopszia míg az epehólyagtumorral rendelkező betegeknél műtéti úton eltávolított reszekált minta állt rendelkezésünkre a vizsgálatok kivitelezéséhez. A legtöbb esetben a standard kezelési protokoll szerint gemcitabin alapú ciszplatinnal kombinált kemoterápiát kaptak a betegek, figyelmen kívül hagyva az esetleges eltérő molekuláris mintázatot. A 38 esetből 30 beteg 21 napos ciklusban az 1. és 8. napon először 1000 mg/m² gemcitabint kapott intravénásan 30 percen keresztül, majd pedig 25 mg/m² ciszplatint 60 percen keresztül. A betegek klinikopatológiai adatait a **4. táblázatban** összegeztük.

4. táblázat. Az epeúti tumorokkal diagnosztizált betegek klinikopatológiai adatai (BTC típus: epeúti daganatok típusai, ETV: becült tumortérfogat, cfDNS hozam: szabad, sejten kívüli DNS hozama)

Esetek	Nem	Kor (év)	BTC típus	ETV (mm ³)	cfDNS hozam (ng/ml)	Kemoterápia típusa
1.	N	87	IHCC	83349	35,6	ciszplatin és gemcitabin, kapecitabin, irinotekán
2.	N	82	IHCC	88200	22,5	gemcitabin, bevacizumab
3.	F	82	IHCC	56784	36,5	kapecitabin, ciszplatin és gemcitabin
4.	F	59	IHCC	37044	25,8	ciszplatin és gemcitabin
5.	F	73	IHCC	168000	25,39	ciszplatin és gemcitabin, irinotekán, kapecitabin
6.	F	73	IHCC	37462	35,2	ciszplatin és gemcitabin, kapecitabin
7.	F	65	IHCC	259200	52,5	ciszplatin és gemcitabin, trametinib, everolimusz
8.	F	73	IHCC	62500	32,6	ciszplatin és gemcitabin
9.	N	66	IHCC	1230187	98,9	ciszplatin és gemcitabin
10.	F	56	IHCC	263250	48,21	ciszplatin és gemcitabin, irinotekán
11.	F	74	IHCC	12800	7,35	ciszplatin és gemcitabin, irinotekán, kapecitabin
12.	N	62	IHCC	283500	43,52	ciszplatin és gemcitabin, kapecitabin
13.	F	79	IHCC	9126	17,71	kapecitabin, gemcitabin
14.	N	52	IHCC	140625	39,5	ciszplatin és gemcitabin
15.	N	69	IHCC	670372	75,61	gemcitabin
16.	F	71	IHCC	112472	32,48	gemcitabin
17.	N	69	IHCC	138627	52,6	ciszplatin és gemcitabin
18.	N	65	IHCC	1126744	95,46	ciszplatin és gemcitabin
19.	N	59	IHCC	51783	24,67	ciszplatin és gemcitabin
20.	F	75	IHCC	85472	10,43	ciszplatin és gemcitabin
21.	F	62	IHCC	3594	5,544	kapecitabin, ciszplatin és gemcitabin
22.	N	70	EHCC	36162	24,3	ciszplatin és gemcitabin, kapecitabin
23.	F	49	EHCC	952544	78,5	ciszplatin és gemcitabin, irinotekán
24.	F	56	EHCC	6664	15,856	ciszplatin és gemcitabin, nivolumab
25.	N	74	EHCC	98606	25,6	ciszplatin és gemcitabin
26.	N	74	EHCC	32000	24,57	ciszplatin és gemcitabin
27.	N	54	EHCC	259400	52,78	ciszplatin és gemcitabin
28.	N	65	EHCC	10236	16,59	ciszplatin és gemcitabin
29.	F	75	EHCC	526345	48,21	ciszplatin és gemcitabin
30.	F	66	EHCC	102689	21,94	kapecitabin, ciszplatin és gemcitabin
31.	N	69	GBC	6750	6,181	ciszplatin és gemcitabin, irinotekán
32.	F	75	GBC	126000	35,3	ciszplatin és gemcitabin
33.	F	74	GBC	3179	11,08	ciszplatin és gemcitabin
34.	N	75	GBC	137312	36,9	ciszplatin és gemcitabin
35.	N	63	GBC	98000	17,7	kapecitabin, ciszplatin és gemcitabin
36.	N	62	GBC	75324	30,59	ciszplatin és gemcitabin
37.	F	60	GBC	16000	9,66	ciszplatin és gemcitabin
38.	F	42	GBC	252756	31,22	ciszplatin és gemcitabin

A daganatsejtek pleomorfak, magas nukleáris/citoplazma aránnyal, valamint kifejezett sejtmagatípiával rendelkeznek. Az esetek többsége, több mint 60%-a grade 2 típusú, több, mint 20%-a pedig grade 3-as besorolást kapott. A diagnózis megerősítésének céljából epeúti tumorokra jellemző alapvető immunhisztokémiai reakciókat végeztünk a betegek szövettani mintáiból. Az alábbi immuneszteken pozitivitást találtunk CK7 – (36/38 95%), CK8/18 – (31/38 81,5%), CK19 – (38/38 100%) és CA19.9 – (36/38 95%), míg immunnegativitást figyelhattunk meg a CK20 – (32/38 84%), HSA – (38/38 100%), argináz – (33/38 87%) és glikipán (36/38 95%) immunreakciókon. A **7. ábrán** látható a daganatra jellemző szövettani és immunhisztokémiai festések mikroszkopikus képe, míg az összes eset immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei a **5. táblázatban** kerülnek szemléltetésre.



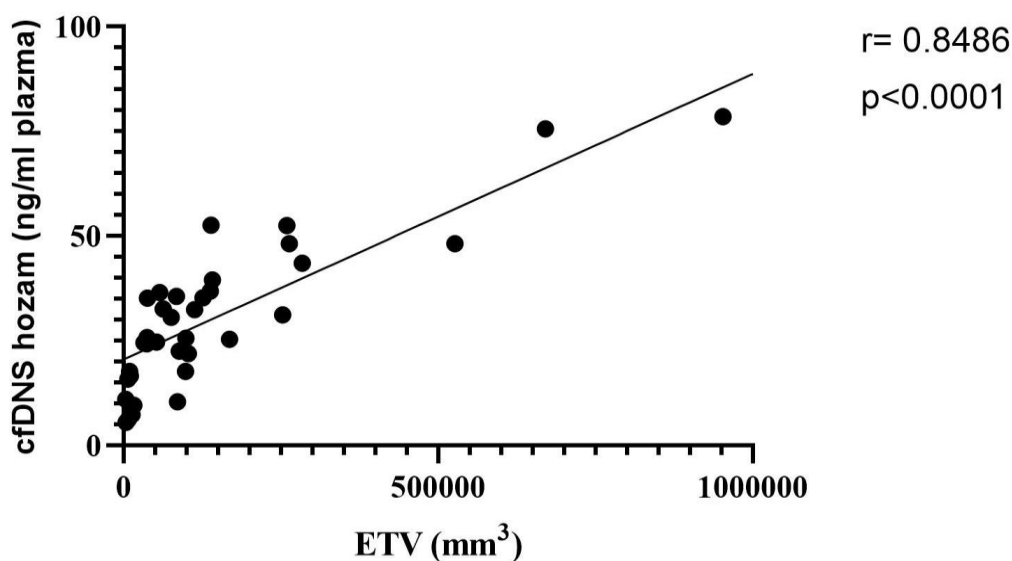
7. ábra. Intrahepatikus cholangiocarcinomára jellemző szövettani és immunhisztokémiai festések (A, B): H&E festés egy olyan májbiopsziából, mely intrahepatikus cholangiocarcinomának felel meg (200×, 400× nagyításban). Szabálytalan, atípusos mirigyek figyelhetők meg, melyek infiltratíván növekednek. A neoplasztikus mirigyeket desmoplasztikus stroma veszi körül. A jobb oldalon nem neoplasztikus hepatociták láthatóak (*). (C, D, E): A neoplasztikus sejtek CK7, CA19 és CA19-9 pozitivitást mutatnak. (F): A CK20 immunfestés pedig negatív eredményt adott (400× nagyítás)

5. táblázat. A betegek immnhisztokémiai eredményei (CK7: citokeratin 7, CK8/18: citokeratin 8/citokeratin 18, CK19: citokeratin 19, CK20: citokeratin 20, CA19.9: Cancer antigén 19-9 (szialilált Lewis (a) antigén), HSA: human szérumalbumin, PD-L1: programozott halál ligandum 1. *: fokális pozitívítás)

Esetek	Grádus	CK7	CK8/18	CK19	CK20	CA19.9	HSA	Argináz	Glipikán	PD-L1
1	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
2	G2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	G3	+	+	+	-	+	-	-	-	-
4	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
5	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
6	G2	+	-	+	-	+	-	-	-	-
7	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
8	G2	+	+	+	-	+	-	-	+	-
9	G2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
11	G2	+	+	+	-	+	-	+	-	-
12	G3	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13	G2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
14	G3	+	+	+	-	+	-	-	+	-
15	G2	+	-	+	-	+	-	-	-	-
16	G3	+	-	+	-	+	-	-	-	-
17	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
18	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
19	G2	+	-	+	-	+	-	-	-	-
20	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
21	G3	+	+	+	-	+	-	-	-	-
22	G1	+	+	+	-	+	-	-	-	-
23	G3	+	+	+	-	+	-	-	-	-
24	G2	-	+	+	-	+	-	-	-	-
25	G2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
26	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
27	G2	-	-	+	+	+	-	+	-	-
28	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
29	G3	+	-	+	-	+	-	-	-	-
30	G1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
31	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
32	G2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
33	G3	+	+	+	-	+	-	+	-	-
34	G3	+	+	+	-	+	-	+	-	-
35	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
36	G2	+	+	+	-	+	-	+	-	-
37	G2	+	-	+	-	+	-	-	-	-
38	G2	+	+	+	-	+	-	-	-	-

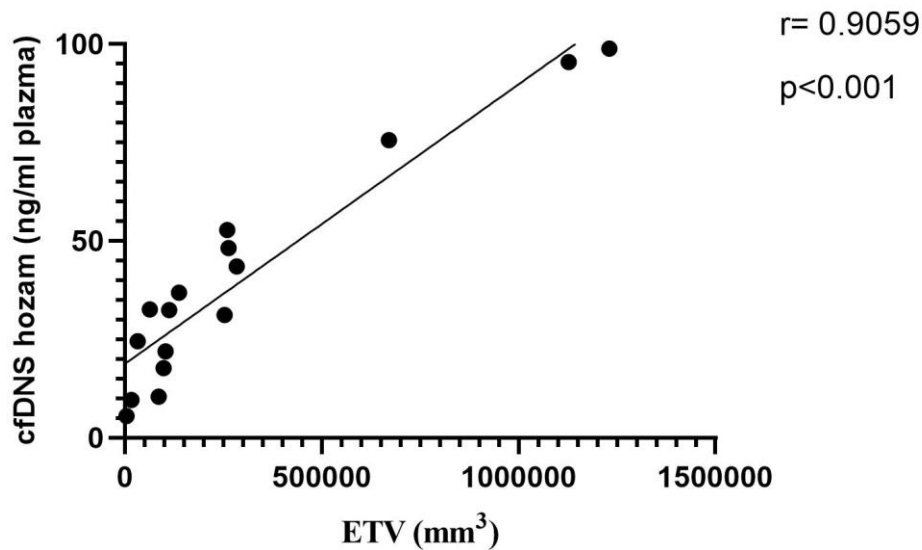
Az LB izolálását követően a DNS koncentrációkból DNS hozamot számítottunk. Az átlagos DNS hozam 34,34 ng/ml plazma volt (tartomány:5,5-98,9). Statisztikailag nem találtunk eltérést az izolált DNS mennyisége között a három csoportban ($p=0,2177$), illetve külön-külön az IHCC és EHCC ($p=0,63$), az IHCC és GBC ($p=0,09$) valamint az EHCC és GBC ($p=0,18$) csoportok között sem. Mindezek mellett szignifikáns kapcsolatot figyelhettünk meg az ETV és a cfDNS-hozam között, melyet Spearman korrelációval igazoltunk ($r=0,8486$, $p<0,0001$) (**8. ábra**). Mivel 16 beteg esetében a LB mintavétel a szövettani mintavételtől számítva fél éven belül történt a becsült tumortérfogat illetve cfDNS mennyiségek közötti szignifikáns korreláció igazolására külön ebben a betegpopulációban is korrelációs elemzést végeztünk (**9. ábra**). Statisztikailag nem volt összefüggés azonban a becsült tumortérfogat és a variáns tumorterhelés között egyik mintatípus esetén sem ($r_{szövet}=-0,2582$, $p_{szövet}=0,1175$; $r_{LB}=-0,01076$, $p_{LB}=0,9489$).

Becsült tumortérfogat (ETV) és cfDNS hozam közötti korreláció



8. ábra. A becsült tumortérfogat és a cfDNS hozam közötti szignifikáns összefüggés igazolása Spearman korrelációval. $r=0,8486$ (cfDNS hozam: szabad, sejten kívüli DNS hozam, ETV: becsült tumortérfogat, r :Spearman féle korrelációs együttható, p : statisztikai szignifikancia értéke)

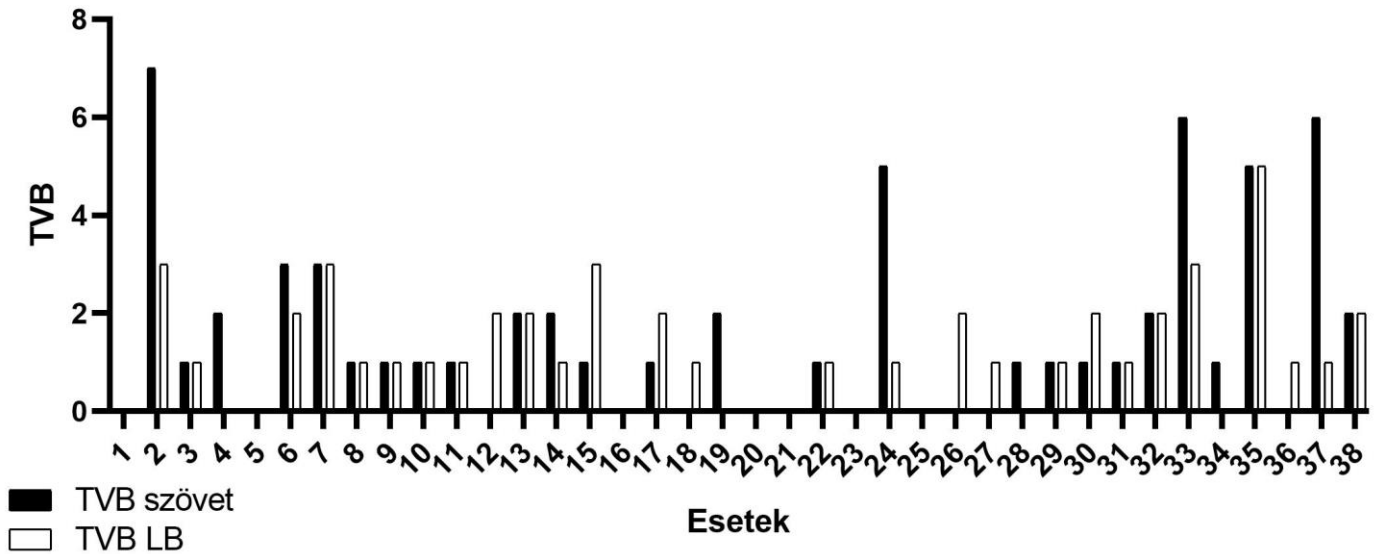
Becsült tumortérfogat (ETV) és cfDNShozam közötti korreláció (n=16)



9. **ábra.** Spearman korreláció eredménye a két mintatípus közötti 6 hónapnál nem hosszabb idejű eseteknél (n=16). Szignifikánsan pozitív korreláció igazolódott (cfDNS hozam: szabad, sejten kívüli DNS hozam, ETV: becsült tumortérfogat, r:Spearman féle korrelációs együttható, p: statisztikai szignifikancia érték, n: darabszám)

A TVB az általunk detektált génvariánsok számát adja meg, külön-külön mindhárom csoportban, illetve mindkét mintatípusban is. Az analízis során a 2%-ot meghaladó variáns allélfrekvenciával rendelkező eltéréseket tekintettük ténylegesen detektálható aberrációknak (**10. ábra**). A legnagyobb tumorterhelést a 2., 33., 35. és 37. eseteknél figyelhettük meg, míg az 1., 5., 16., 20., 21., 23. és 25. betegeknél nukleotid eltérést nem detektáltunk. Hét esetben a szöveti minta kis mérete miatt, csak a liquid biopszia bizonyult alkalmasnak (1., 12., 20., 23., 25., 26. és 27.). A két mintatípus TVB értékeinek összehasonlítása során nem figyelhettünk meg szignifikáns összefüggést a három altípus között (intrahepatikus csoportban $p=0,9933$; extrahepatikus eseteknél $p=0,7109$, míg epehólyag carcinomáknál a p értéke $0,5102$), valamint a liquid biopsziából izolált DNS mennyiség és a liquid típusú minták TVB értékei között sem találtunk szignifikáns összefüggést ($r=0,03061$; $p=0,8553$). 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 liquid biopszia elemzése valósult meg, ebből három esetben sikerült valamilyen genetikai eltérést igazolnunk (12., 26., 27.), illetve két esetben a szöveti biopszia negativitása mellett, az LB-ben detektálható variánst sikerült azonosítanunk (18., 36.).

A variáns tumorterhelés mértéke az egyes betegek esetében



10. ábra. A variáns tumorterhelés mértéke epeúti tumoros betegekben. A cut-off érték a szöveti minták esetén 5%, míg liquid biopszia esetén 2% VAF. Hét eset negatívnak bizonyult (1., 5., 16., 20., 21., 23. és 25. esetek) (TVB szövet: tumor variánsterhelés szöveti mintákban, TVB LB: tumor variánsterhelés liquid biopsziás mintákban)

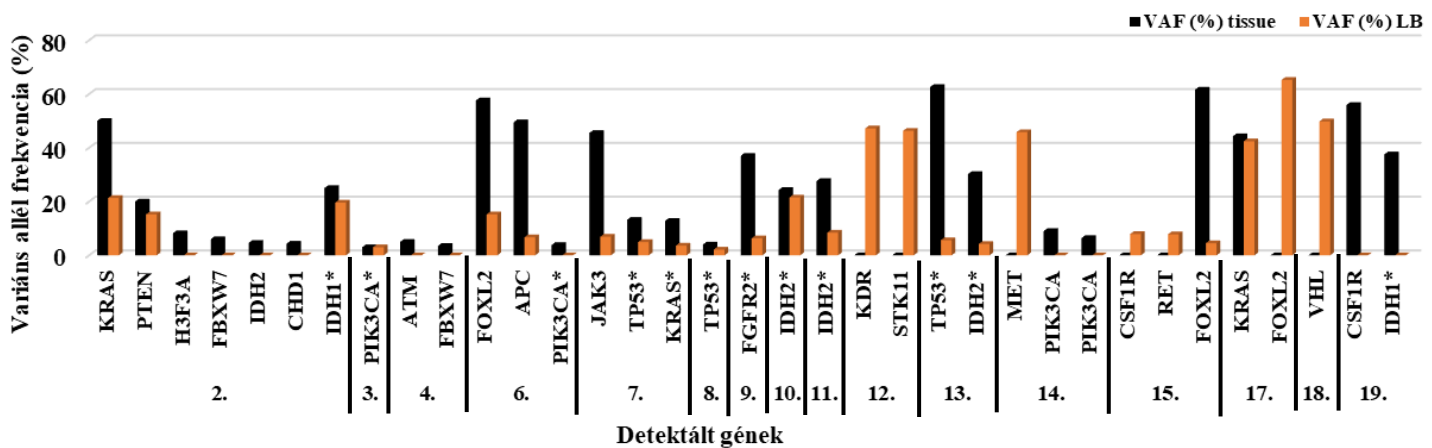
A bioinformatikai elemzéseket követően a kimutatott eltérések klinikai jellemzőit is ellenőriztük. A detektált aberrációk 58%-ában (43/74) leginkább az epeúti tumorokra jellemző géneknél, mint például *FGFR1*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS* és *TP53*, valamilyen patogén mutáció került leírásra (6. táblázat). A legtöbbjükét a szöveti biopsziához párosított LB mintából is sikerült azonosítanunk (11. ábra).

6. táblázat. A detektált nukleotid eltérések és azok klinikai jelentőségeinek összegzése. A vizsgálatokat NGS technológiával kiviteleztek a betegek szöveti és liquid biopsziás mintáin. *-al jelölve a patogén és a feltehetően patogén klinikai jelentőségű variánsokat. **-al jelölve a megváltozott klinikai jelentőségű eltérések (VarSome Premium, 2025). (NGS: újgenerációs szekvenálás, VAF szövet: szöveti mintákban előforduló genetikai eltérések variáns allél frekvencia értéke, VAF LB: liquid biopsziás mintákban előforduló genetikai eltérések variáns allél frekvencia értéke)

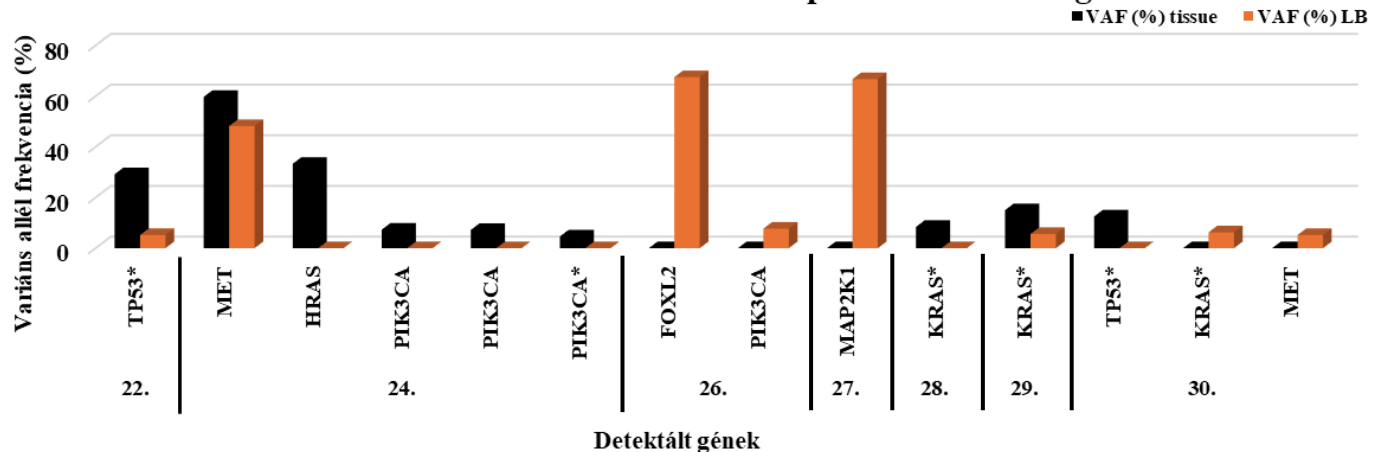
Eset	Gén	Nukleotid eltérés	Aminosav eltérés	VAF szövet (%)	VAF LB (%)	Klinikai jelentőség
2.	<i>KRAS</i>	c.407G>A	p.Ser136Asn	50	21,3	benignus**
	<i>PTEN</i>	c.925G>A	p.Ala309Thr	20	15,2	ismeretlen**
	<i>H3F3A</i>	c.89C>T	p.Ala30Val	8,2	0	ismeretlen
	<i>FBXW7</i>	c.239C>T	p.Thr80Ile	6	0	ismeretlen**
	<i>IDH2</i>	c.332G>A	p.Gly111Asp	4,6	0	ismeretlen**
	<i>CHD1</i>	c.596C>T	p.Thr199Ile	4,3	0	benignus
	<i>IDH1*</i>	c.395G>T	p.Arg132Leu	25	19,6	patogén
3.	<i>PIK3CA*</i>	c.1634A>C	p.Glu545Ala	3	3	patogén
4.	<i>ATM</i>	c.1080T>A	p.Asp360Glu	5	0	benignus
	<i>FBXW7</i>	c.732T>G	p.Asp244Glu	3,5	0	benignus**
6.	<i>FOXL2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	57,6	15,2	benignus
	<i>APC</i>	c.7504G>A	p.Gly2502Ser	49,5	6,7	benignus**
	<i>PIK3CA*</i>	c.1634A>C	p.Glu545Ala	3,8	0	patogén
7.	<i>JAK3</i>	c.2164G>A	p.Val722Ile	45,5	6,9	benignus
	<i>TP53*</i>	c.518T>C	p.Val173Ala	13,2	4,9	patogén
	<i>KRAS*</i>	c.35G>T	p.Gly12Val	12,8	3,6	patogén
8.	<i>TP53*</i>	c.460G>A	p.Gly154Ser	4	2,1	feltehetően patogén
9.	<i>FGFR2*</i>	c.827T>G	p.Phe276Cys	37	6,3	feltehetően patogén
10.	<i>IDH2*</i>	c.515G>T	p.Arg172Met	24,3	21,5	patogén
11.	<i>IDH2*</i>	c.359G>A	p.Arg120Lys	27,6	8,4	patogén
12.	<i>KDR</i>	c.1444T>C	p.Cys482Arg	alacsony tumorsejt arány	47,2	benignus**
	<i>STK11</i>	c.1189G>A	p.Ala397Thr		46,3	benignus
13.	<i>TP53*</i>	c.536A>G	p.His179Arg	62,6	5,6	patogén
	<i>IDH2*</i>	c.359G>A	p.Arg120Lys	30,2	4,2	patogén
14.	<i>MET</i>	c.2975C>T	p.Thr992Ile	0	45,8	ismeretlen**
	<i>PIK3CA</i>	c.887A>G	p.Gln296Arg	9	0	ismeretlen**
	<i>PIK3CA</i>	c.934T>C	p.Ser312Pro	6,4	0	ismeretlen**
15.	<i>CSF1R</i>	c.2916C>G	p.Cys972Trp	0	7,9	ismeretlen**
	<i>RET</i>	c.1946C>T	p.Ser649Leu	0	7,8	feltehetően benignus**
	<i>FOXL2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	61,6	4,5	benignus
17.	<i>KRAS</i>	c.531_533del	p.Lys180del	44,29	42,38	benignus**
	<i>FOXL2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	0	65,23	benignus
18.	<i>VHL</i>	c.74C>T	p.Pro25Leu	0	49,8	benignus
19.	<i>CSF1R</i>	c.2840C>T	p.Ser947Phe	55,9	0	feltehetően benignus**
	<i>IDH1*</i>	c.394C>G	p.Arg132Gly	37,5	0	patogén
22.	<i>TP53*</i>	c.796G>T	p.Gly266Ter	29,2	5,2	patogén
24.	<i>MET</i>	c.1124A>G	p.Asn375Ser	59,7	48,21	benignus**
	<i>HRAS</i>	c.182A>G	p.Gln61Arg	33,3	0	ismeretlen**
	<i>PIK3CA</i>	c.44T>G	p.Leu15Trp	7,3	0	ismeretlen**
	<i>PIK3CA</i>	c.40C>A	p.His14Asn	7,2	0	ismeretlen**
	<i>PIK3CA*</i>	c.1634A>C	p.Glu545Ala	4,6	0	patogén

26.	<i>FOXL2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	alacsony tumorsejt arány	67,5	benignus
	<i>PIK3CA</i>	c.1571G>A	p.Arg524Lys		7,7	ismeretlen**
27.	<i>MAP2K1</i>	c.308delT	p.I103Tfs	alacsony tumorsejt arány	66,7	ismeretlen
28.	<i>KRAS*</i>	c.35G>A	p.G12D	8,4	0	patogén
29.	<i>KRAS*</i>	c.35G>A	p.G12D	15	5,6	patogén
30.	<i>TP53*</i>	c.818G>T	p.Arg273Leu	12,5	0	patogén
	<i>KRAS*</i>	c.34G>T	p.G12C	0	6,25	patogén
	<i>MET</i>	c.3962A>G	p.H1321R	0	5,2	ismeretlen
31.	<i>NRAS*</i>	c.104C>T	p.Thr35Ile	8,3	2,6	feltehetően patogén **
32.	<i>CDKN2A</i>	c.442G>A	p.Ala148Thr	57,8	52	benignus
	<i>EGFR</i>	c.2543C>T	p.Pro848Leu	41	39	ismeretlen**
33.	<i>CDKN2A</i>	c.442G>A	p.Ala148Thr	49	52,8	benignus
	<i>CDHI</i>	c.2474C>T	p.Pro825Leu	46	50,7	feltehetően benignus**
	<i>MLH1</i>	c.1044G>T	p.Leu348Phe	24,8	0	benignus
	<i>HNF1A*</i>	c.862delG	p.Pro291GlnfsTer51	5,2	5,14	feltehetően patogén
	<i>TP53*</i>	c.325T>G	p.Phe109Val	4,9	0	patogén
	<i>PTEN*</i>	c.802G>T	p.Asp268Tyr	4,6	0	patogén
34.	<i>STK11*</i>	c.842del	p.Pro281ArgfsTer6	6,3	0	patogén
35.	<i>MLH1</i>	c.1321G>A	p.Ala441Thr	46,2	49,1	benignus**
	<i>TP53*</i>	c.707_711del	p.Tyr236LeufsTer2	12,1	3,4	feltehetően patogén
	<i>PIK3CA</i>	c.1571G>A	p.Arg524Lys	11,3	5,3	ismeretlen**
	<i>CTNNB1*</i>	c.133T>C	p.Ser45Pro	11,2	2,4	patogén
	<i>KRAS*</i>	c.34G>T	p.Gly12Cys	6,6	0	patogén
	<i>FOXL2</i>	c.743T>C	p.Leu248Pro	0	3,1	ismeretlen**
36.	<i>DDR2</i>	c.278C>T	p.T93I	0	5,8	feltehetően benignus**
37.	<i>EGFR</i>	c.2518G>A	p.Ala840Thr	49,52	48,1	ismeretlen**
	<i>TP53*</i>	c.817C>T	p.Arg273Cys	36,49	0	patogén
	<i>CDKN2A</i>	c.247C>T	p.His83Tyr	25,61	0	ismeretlen**
	<i>SRC</i>	c.1571C>T	p.Thr524Met	25,26	0	ismeretlen**
	<i>PIK3CA*</i>	c.3140A>G	p.His1047Arg	11,22	0	patogén
	<i>FBXW7*</i>	c.1153C>T	p.Arg385Cys	5,37	0	feltehetően patogén**
38.	<i>FGFR4</i>	c.407C>T	p.P136L	90	90	benignus**
	<i>MYC</i>	c.217A>C	p.T73P	23,4	25,4	feltehetően benignus**

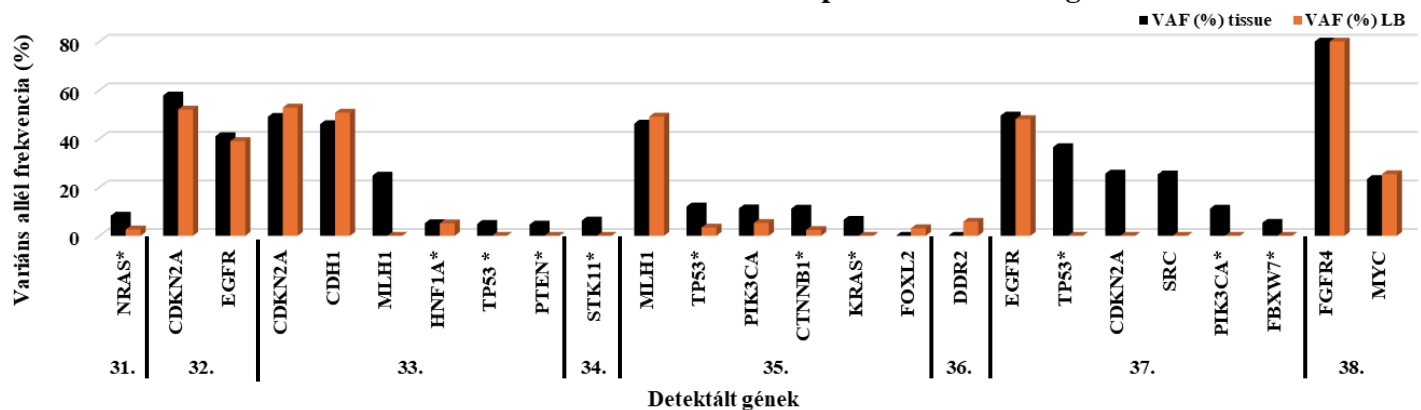
A variáns allél frekvencia eloszlása az IHCC csoportban detektált gének esetében



A variáns allél frekvencia eloszlása az EHCC csoportban detektált gének esetében

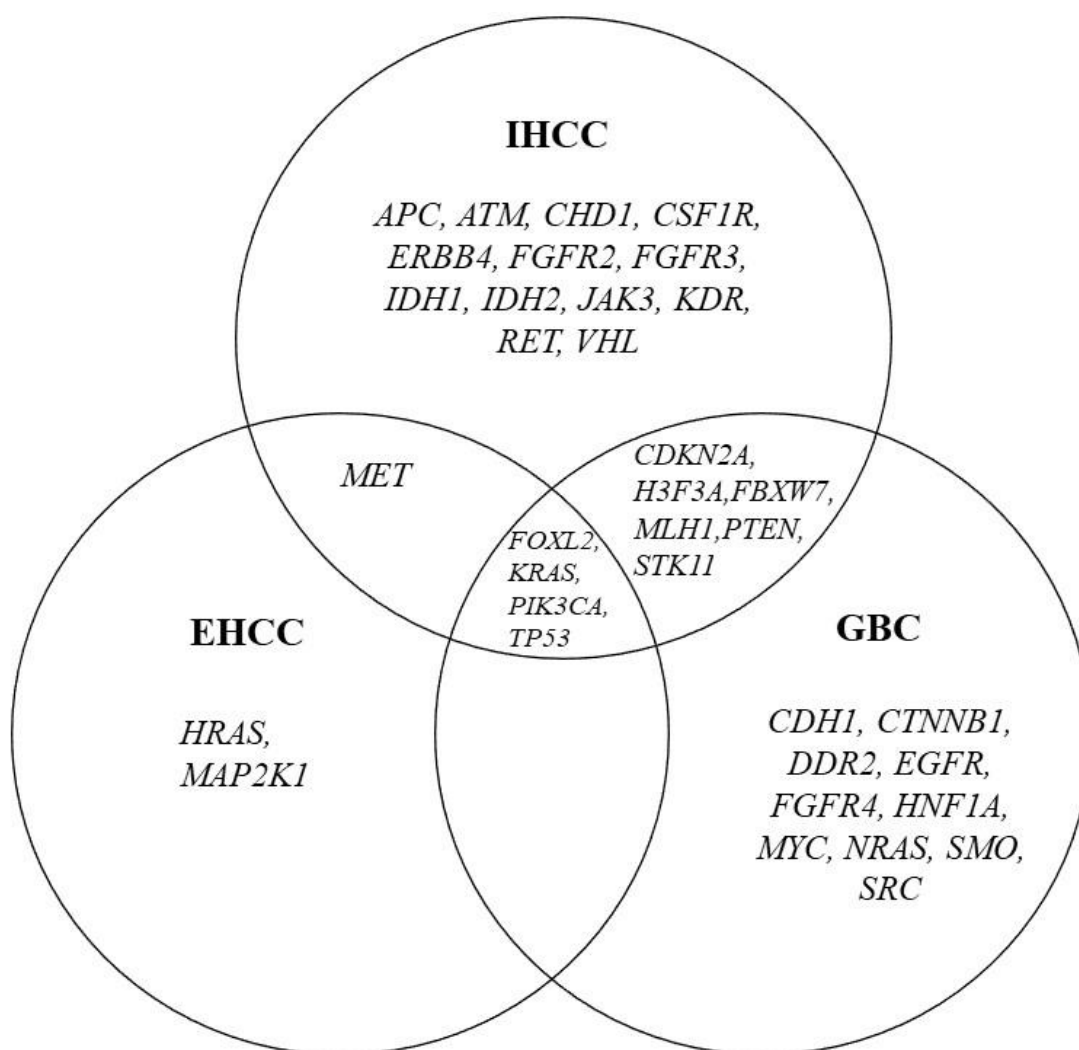


A variáns allél frekvencia eloszlása az GBC csoportban detektált gének esetében



11. ábra. Az új generációs szekvenálási vizsgálat során detektált 2% VAF feletti genetikai aberrációk ábrázolása a variáns allél frekvencia függvényében (VAF: variáns allél frekvencia, IHCC: intrahepatikus cholangiocarcinoma, EHCC: extrahepatikus cholangiocarcinoma, GBC: epehólyag carcinoma) (*-al jelölve a patogén klinikai jelentőségű eltérések)

A vizsgálatunk során 34 gén volt érintett, melyek közül a *FOXL2*, *KRAS*, *PIK3CA* és *TP53* mindhárom anatómiai lokalizáció alapján elkülönülő csoportban azonosítható volt. A *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 extrahepatikus cholangiocarcinómára specifikus eltérést, ezek a *HRAS* c.182A>G; p.Gln61Arg valamint *MAP2K1* c.308delT; p.Ile103Thrfs variánsok (12. ábra).



12. ábra. Az anatómiai lokalizáció alapján elkülönített csoportokban detektált genetikai eltéréseket hordozó gének kategorizálása (IHCC: intrahepatikus cholangiocarcinoma, EHCC: extrahepatikus cholangiocarcinoma, GBC: epehólyag carcinoma)

5.2. A melanomás betegek dPCR alapú elemzése

A retrospektív tanulmányba bevont betegek átlagéletkora 64 év volt (tartomány: 28-88). A nemek szerinti eloszlás a következőt követte 45/55 nő/férfi, melyekben a nőknél az átlagéletkor 65 év volt, férfiaknál pedig 63. A prospektív tanulmány esetén az átlagéletkor 61 év (tartomány: 36-100) volt. A nemek szerinti eloszlás pedig 18/16 nő/férfi volt. A prospektív tanulmányba a nők átlag életkora 62 év, míg a férfiaké 61 év volt.

A daganatból származó FFPE mintákat minden esetben az onkológiai kezelés megkezdése előtt sebészeti úton távolították el. Az LB vétele szintén az onkológiai kezelés megkezdése előtt történt. Az összes daganat besorolását (Clark osztályozás, Breslow mélység meghatározás) patológus szakorvos újra elemezte a standardizálás miatt.

A retrospektív tanulmányban az átlagos Breslow mélység értéke: 4,27 mm (tartomány: 0-35), a tdDNS koncentráció átlaga 17,39 ng/μl (tartomány: 0,2-53) és a tdVAF átlagos értéke pedig 15,33% (tartomány: 0-82,74) volt. A prospektív vizsgálatunkban a BD átlaga 4,83 mm (tartomány: 0,09-14,41), az átlagos tdDNS koncentráció 18,75 ng/μl (tartomány: 0,48-59,43), míg az átlagos tdVAF 20,2% (tartomány: 0-88,25), a cfDNS átlagos értéke 3,33 ng/μl (tartomány: 0,05-11,43) és az átlag cfVAF pedig 36,55% (tartomány: 0-99,8) volt. A prospektív és retrospektív tanulmányba beválogatott eseteket tovább csoportosítottuk a nemzetközileg is elfogadott Clark osztályozás alapján. Az így elkülönülő csoportok átlagos értékeit pedig a **7. táblázat** szemlélteti. Mindkét kohorszból a Clark I csoport kizárásra került, a kevés mintaszám miatt. A prospektív mutáns eseteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a Clark V-ös csoportban a cfDNS koncentráció 6,51 ng/μl, míg a cfVAF %-os értéke átlagosan 98,34 volt. A szöveti minták átlag értékei alapján nem kifejezetten látjuk ezt a típusú növekedést a súlyosabb kategóriák irányába, kivéve természetesen a BD arányait. Ezt a szöveti minta sajátosságának tulajdonítjuk. Elképzelhető, hogy a daganat egy olyan részletét sikerült izolálnunk, ahol kisebb gyakorisággal fordul elő a mutáció. Azonban a cfDNS-ből kapott eredmények alapján arra következtethetünk, hogy melanomák esetében is bizonyítható, hogy a nagyobb tumormérethez magasabb cfDNS mennyiség társul. Tehát a nagyobb tumorból több szabad, keringő nukleinsav szabadul fel a perifériás keringésbe.

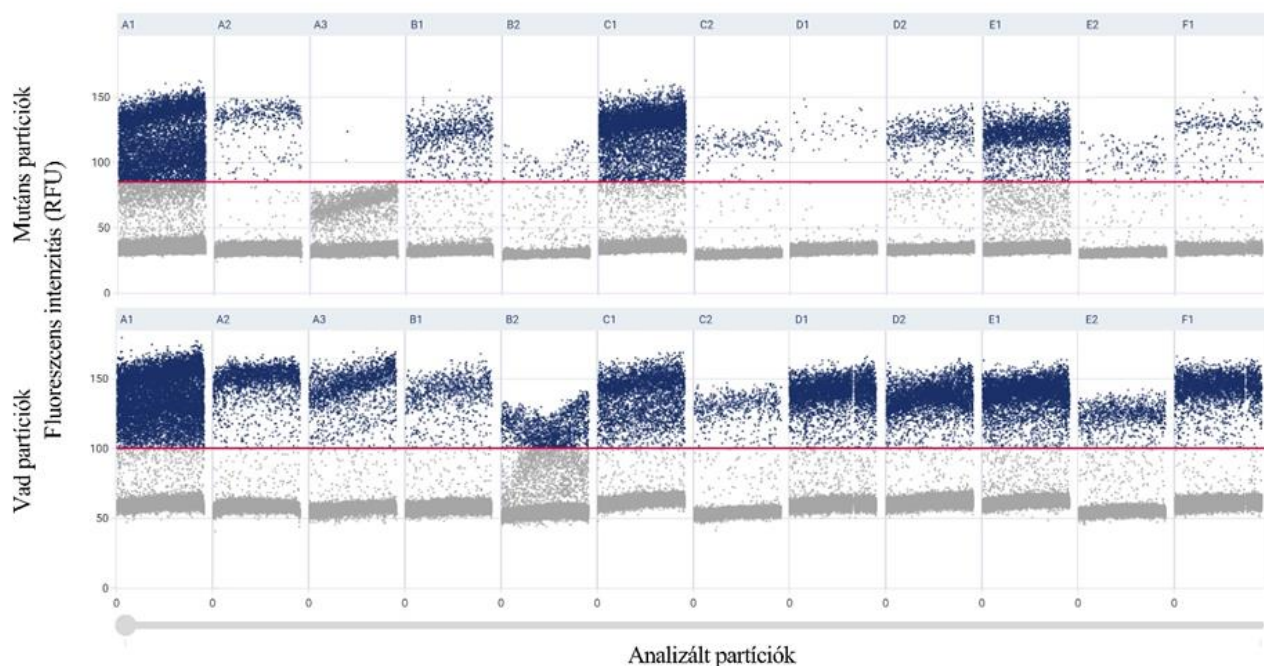
7. táblázat. A Clark osztályozás alapján elkülönített csoportok paramétereinek átlagos értékei (n: esetszám, tdDNS koncentráció: tumorból származó DNS koncentráció, tdVAF: tumorból származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke, cfDNS koncentráció: szabad, sejten kívüli DNS koncentráció, cfVAF: szabadon keringő DNS-ből származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke)

	Prospektív tanulmány				Retrospektív tanulmány			
	Clark II (n=4)	Clark III (n=14)	Clark IV (n=10)	Clark V (n=6)	Clark II (n=8)	Clark III (n=41)	Clark IV (n=37)	Clark V (n=13)
Év (kor)	54	59	59	72	62	62	66	66
Breslow mélység (mm)	0,15	3,5	5,44	9,1	1,11	2,67	5,05	9,42
tdDNS koncentráció (ng/μL)	8,98	14,43	15	6,18	11,1	19,46	17,68	19,76
mutáns tdDNS koncentráció (ng/μL)	8,98	20,27	24,07	21,4	8,642	17,07	14,45	15,21
tdVAF (%)	26,95	24,58	22,7	2,13	4,54	18,45	15,65	12,32
mutáns tdVAF (%)	26,95	35,64	37,79	12,62	7,24	31,47	34,1	31,78
cfDNS koncentráció (ng/μL)	0,33	2,28	3,72	6,51	-			
mutáns cfDNS koncentráció (ng/μL)	0,325	2,6	3,65	6,51	-			
cfVAF (%)	36,95	44,14	36,4	98,34	-			
mutáns cfVAF (%)	36,95	64,2	60,42	98,34	-			

A dPCR hatékonyságának megállapításához elsőként retrospektív vizsgálatot végeztünk ahol a módszer szenzitivitását és specificitását vizsgáltuk. A szenzitivitást a valós pozitív esetek és a valós pozitív illetve álnegatív esetek összegének hányadosa adja. A specificitás pedig a valódi negatív esetek és a valódi negatív, illetve a fals pozitív esetek összegének hányadosaként kapható százalékos arány. A kapott hányados 0 és 1 között mozog, ahol az ideális arány az 1, tehát 100%.

Korábban 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. A kapott mutáció státuszt a vad és a mutáns kópiák (kópiaszám/μl) aránya adja meg. Az 1%-os mutáns frakciót tekintettük cut-off értéknek. A dPCR analitikai elvét a **13. ábrán** személtetjük. 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.



13. ábra. A melanomával diagnosztizált betegek dPCR analizisének elve. A mutációs státuszt a vad és mutáns kópiák (kópiaszám/ μ l) aránya adja meg. Az ábrán a 3. minta tekinthető vad genotípusúnak, míg az összes többi minta a *BRAF* gén p.Val600Glu genetikai aberráció jelenlétét mutatja. A valid partíciókat (kék pontok) az invalid partícióktól (szürke pontok) egy piros vonal (a beállított határérték) választja el. Ez a FAM esetén, mely a mutáns frakciók kimutatására szolgál 85 RFU, míg HEX esetén, mellyel a vad típusú partíciók azonosítása történik 100 RFU. (RFU: fluoreszcens intenzitás)

A kutatásunk prospektív felében a 34 beteg szintén FFPE mintájából készült StripAssay eredményeket tekintettük valósnak, így 20 eset bizonyult mutánsnak, míg 14 vad típusúnak, majd ezen DNS-eket dPCR-al is vizsgáltuk. A párosított 34 LB mintából izolált cfDNS-ből is végeztünk StripAssay és dPCR vizsgálatokat és 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 ($r=0,36$, $p=0,0002$), míg a BD és a tdVAF ($r=-0,04$,

$p=0,69$), 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 a negatív eseteket vizsgáljuk, akkor csak a BD és tdDNS koncentráció között sikerült a szignifikánsan pozitív korreláció kimutatása ($r=0,33$, $p=0,019$). 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.

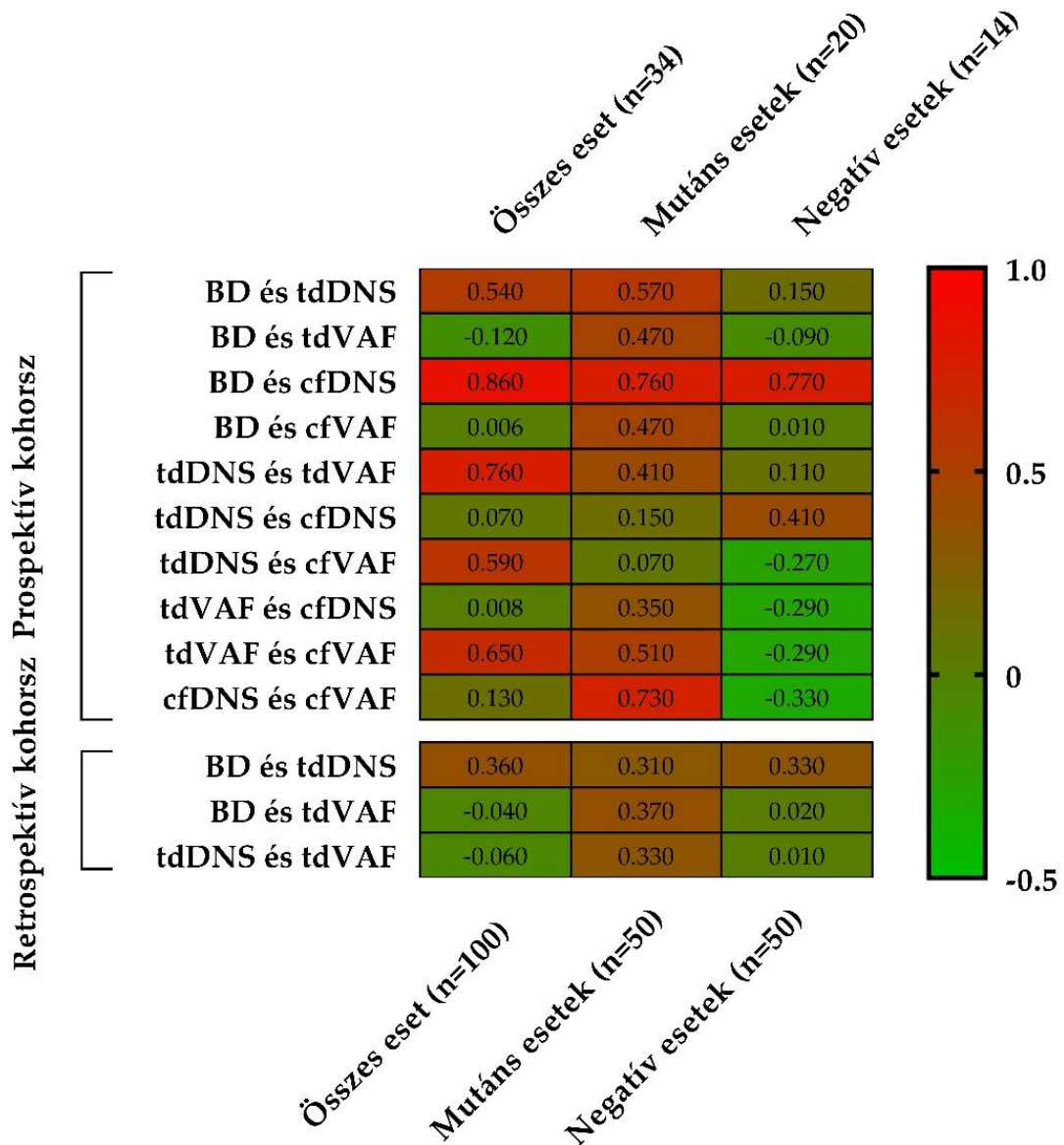
A prospektív kohorsz során kapott eredményekből a teljes 34 esetből álló populációt figyelembe véve pozitív korrelációt figyelhetünk meg a BD és a tdDNS koncentráció ($r=0,54$, $p=0,001$), a BD és a cfDNS koncentráció ($r=0,86$, $p<0,0001$), a tdDNS koncentráció és tdVAF ($r=0,76$, $p<0,0001$), a tdDNS koncentráció és cfVAF ($r=0,59$, $p<0,0002$), 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 ($r=0,41$, $p=0,07$), 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.

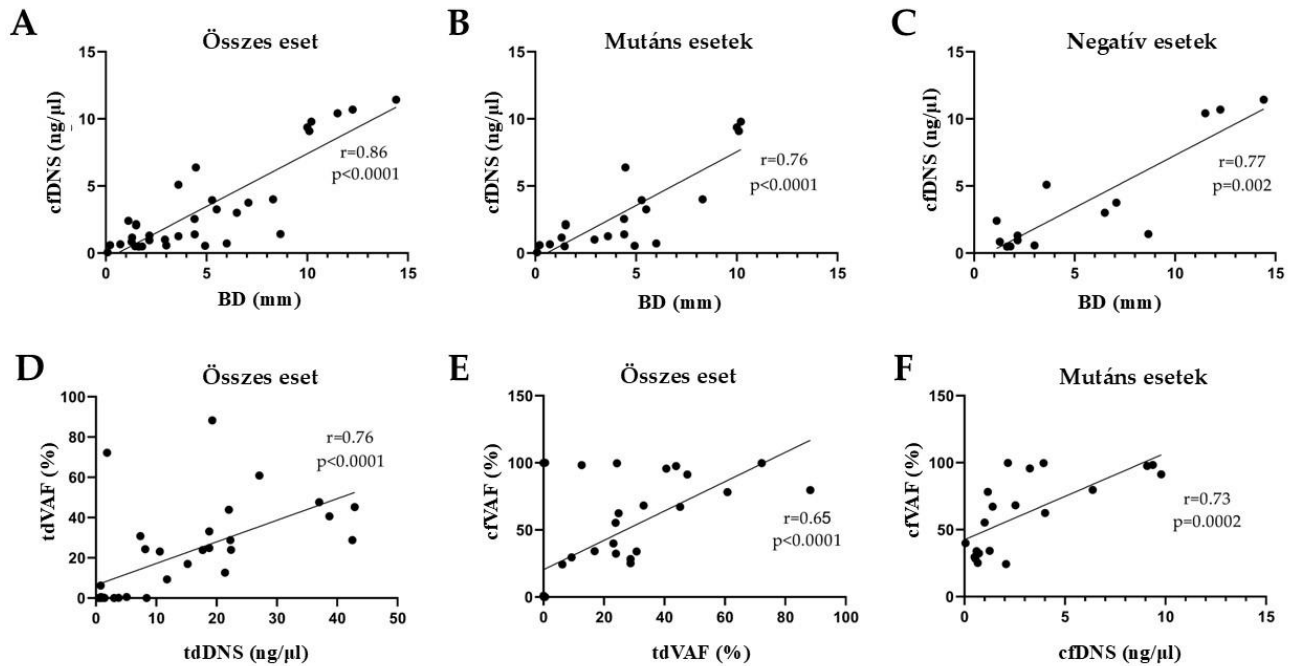
Ha pedig csak a vad típusú mintákat elemezzük ($n=14$) szignifikánsan pozitív korreláció kizárólag a BD és a cfDNS koncentráció ($p=0,0017$) értékei között figyelhető meg. Az összes többi vizsgált paraméter között pozitív összefüggést nem sikerült kimutatnunk. A BD és tdDNS koncentráció ($r=0,15$, $p=0,6$), a BD és a tdVAF ($r=-0,09$, $p=0,75$), a BD és a cfVAF ($r=0,013$, $p=0,97$), 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 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. A korrelációs elemzések eredményeit a **14. ábrán** szemléltetjük.

Összességében elmondható, hogy $p < 0,05$ értéknél tekintettük a korrelációt szignifikánsan pozitív eredménynek. A legerősebb korrelációkat ($r > 0,6$) a prospektív kohorszban tapasztaltuk. Az összes esetet figyelembe véve pozitív összefüggést a BD és a cfDNS koncentrációja között tapasztaltuk. A mutáns és negatív eseteket külön-külön vizsgálva pedig erős korrelációt figyelhettünk meg az esetek tdDNS koncentrációja és a tdVAF értékek között, illetve az összes esetben tdVAF és cfVAF értékek között is. A mutáns eseteknél pedig szintén szignifikáns korreláció igazolódott a cfDNS koncentráció és a cfVAF értékei között (**15. ábra**).



14. ábra. A korelációs elemzések eredményei A Spearman-féle együttható (r) zöldről pirosra történő színátmenete az együttható -0,5-1 közötti értékeit mutatja. (BD: Breslow-mélység, tdDNS: tumorból származó DNS koncentráció, tdVAF: tumorból származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke, cfDNS: szabad, sejten kívüli DNS koncentráció, cfVAF: szabadon keringő DNS-ből származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke)



15. ábra. A melanoma szöveti kiterjedése és egyes molekuláris változók közötti korreláció a prospektív kohorszban ($r > 0,6$). Erős korreláció figyelhető meg a BD és a cfDNA koncentrációja között az összes esetet ($n=34$) figyelembe véve (A), csak a mutáns eseteket tekintve ($n=20$) (B), valamint a negatív eseteket figyelembe véve ($n=14$) is (C). Továbbá szintén magas korrelációs együtthatóval rendelkeznek a tdDNS és a tdVAF (D), és a tdVAF és a cfVAF (E) értékek, ha az összes esetet vizsgáljuk, illetve ha csak a mutánsokat nézzük, akkor erős pozitív kapcsolat áll fenn a cfDNA koncentráció és a cfVAF értékek között is (F) (BD: Breslow-mélység, cfDNA: szabadon keringő DNS koncentráció, tdDNS: tumorból származó DNS koncentráció, tdVAF: tumorból származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke, cfVAF: szabadon keringő DNS-ből származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke)

A Clark osztályozás alapján kialakult csoportok közötti összefüggések elemzésére Mann-Whitney statisztikai tesztet használtunk. Mindkét típusú kohorszban a Clark I osztályt kizártuk a kevesebb, mint öt esetszám miatt. A kapott szignifikancia értékeket a **8. táblázat** mutatja be.

A retrospektív kohorszban az összes esetet vizsgálva szignifikáns különbség csak a BD értékek között figyelhető meg. 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 ($p < 0,0001$) megfigyelhető a jelentős eltérés. 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 ($p=0,0127$), 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-t 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 ($p=0,0238$).

8. táblázat. A Clark osztályozás szerinti csoportok közötti szignifikáns értékek (p) a vizsgált paraméterekben (BD: Breslow-mélység, tdDNS: tumorból származó DNS koncentráció, tdVAF: tumorból származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke, cfDNS: szabad, sejten kívüli DNS koncentráció, cfVAF: szabadon keringő DNS-ből származó genetikai variánsok allél frekvencia értéke, n.sz. nincs szignifikancia)

		Prospektív kohorsz (n=34)					Retrospektív kohorsz (n=100)		
		BD	tdDNS	tdVAF	cfDNS	cfVAF	BD	tdDNS	tdVAF
Összes eset	Clark II vs. III	0,0131	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,0022	n.sz.	n.sz.
	Clark II vs. IV	0,0303	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	<0,0001	n.sz.	n.sz.
	Clark II vs. V	n.sz.	n.sz.	0,0357	n.sz.	n.sz.	<0,001	n.sz.	n.sz.
	Clark III vs. IV	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	<0,0001	n.sz.	n.sz.
	Clark III vs. Clark V	0,0063	n.sz.	0,0048	0,017	n.sz.	<0,0001	n.sz.	n.sz.
	Clark IV vs. Clark V	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,0168	n.sz.	n.sz.
Mutáns esetek	Clark II vs. III	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,0256	n.sz.	0,001	n.sz.	0,0127
	Clark II vs. IV	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	<0,0001	n.sz.	0,0019
	Clark II vs. V	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,0079	n.sz.	n.sz.
	Clark III vs. IV	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,0002	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
	Clark III vs. Clark V	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	<0,0001	n.sz.	n.sz.
	Clark IV vs. Clark V	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,0039	n.sz.	n.sz.
Negatív esetek	Clark II vs. III	-	-	-	-	-	n.s.	n.sz.	n.sz.
	Clark II vs. IV	-	-	-	-	-	0,0069	n.sz.	n.sz.
	Clark II vs. V	-	-	-	-	-	0,0485	n.sz.	n.sz.
	Clark III vs. IV	n.s.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	<0,0001	n.sz.	n.sz.
	Clark III vs. Clark V	0,0238	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,0018	n.sz.	n.sz.
	Clark IV vs. Clark V	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.

6. Megbeszélés

6.1. Az epeúti daganatok vizsgálata során szerzett megállapítások

Az epeúti daganatok ritka, rossz prognózisú és kevés terápiás konzekvenciával rendelkező malignitások. A betegek prognózisának javítása érdekében szükségesnek érezzük a minél korábbi diagnózis felállítását, a betegség időbeni felismerését, a hatékony terápia kiválasztását, valamint a terápiák esetleges nyomonkövetésének lehetőségét, melyhez elengedhetetlen a molekuláris háttér kellő mértékű megismerése. A precíziós onkológia korszakában ezen folyamatok biztosítása mind a betegek, mind a klinikusok számára nagyon fontos, éppen ezért tanulmányunk célja a daganatra jellemző és kialakulásának hátterében álló genetikai tényezők feltárása volt, hiszen ezek ismerete nélkülözhetetlen a célzott terápia kiválasztásához.

A gyakorlatban standardként alkalmazott szöveti biopszia a molekuláris vizsgálatok kivitelezéséhez, sok esetben nem megfelelő minőségű, mennyiségű. Önmagában a szöveti mintavétel is nehezen valósítható meg ezen daganattípus esetén, illetve gyakran a kockázatos beavatkozások ellenére a szöveti biopszia mérete miatt mégsem alkalmas a vizsgálat kivitelezésére. A hagyományos szöveti biopsziához képest a liquid biopszia nem invazív, megismételhető eljárás, mely tulajdonságai alapján egy sokkal kedvezőbb mintavételi módszernek tekinthető. A perifériás vért, mint liquid biopszia ma már számos onkológiai beteg molekuláris diagnosztikájában alkalmazzák, mint például tüdő-, vastagbél adenocarcinomák esetében [1–3,5,93]. Ezen kívül kutatócsoportunk agresszív lymphomák genotipizálása kapcsán is foglalkozott a szöveti és liquid biopszia összehasonlításával [4].

Mindezek mellett azonban viszonylag kevés információval rendelkezünk az LB használatáról epeúti betegek diagnosztikájában [10], ezért célunk elsősorban a betegség típusban a liquid biopszia cfDNS-ének mennyiségi és minőségi elemzése. Nem állnak rendelkezésre adatok a tumor tömeg és a cfDNS kapcsolatát illetően sem, így erre vonatkozóan elemzéseket végeztünk, amely során statisztikailag szignifikáns korrelációt igazoltunk a becsült tumortérfogat és a cfDNS hozama között (**8. ábra**). A betegek nagy részénél (79%) nem történt sebészeti reszekció, ezért a tumor mennyiség időben nem változott, leszámítva a metasztázist. Nyolc esetben a betegek beválogatása a tanulmányba a metasztázis kialakulásának pillanatában történt, így tulajdonképpen az ezt követő LB

mennyisége, és az ebből detektálható genetikai eltérések csak közvetetten utalhatnak a primer tumorra illetve annak nagyságára. A becsült tumortérfogat illetve cfDNS mennyiségek közötti szignifikáns korreláció igazolására a hat hónapon belüli LB mintavételi eseteknél (n=16) külön korrelációs elemzést végeztünk (**9. ábra**).

Látható, hogy erősebb szignifikáns kapcsolatot tudtunk igazolni, így összességében arra következtetünk, hogy az összes esetet során elvégzett Sperman korreláció ($r=0,8486$) gyengesége azzal magyarázható, hogy időben nagyobb eltérések voltak jelen a két mintatípus vétele között. A CT/MRI felvételek alapján számított nagyobb tumortömeg magasabb cfDNS mennyiséget eredményezett az általunk vizsgált populációban. Az IHCC és EHCC csoportok között a tumorméret tekintetében nem tapasztaltunk szignifikáns összefüggést, és mivel ezen csoportokban nem kivitelezhető a tumor reszekciója így átlagosan magasabb cfDNS mennyiséget is kaptunk. GBC esetében, ahol a diagnózis felállítását követően megtörtént a tumor műtéti úton való eltávolítása szignifikánsan alacsonyabb DNS mennyiséget sikerült izolálnunk a perifériás vérből.

Munkánk során mind a szöveti, mind a liquid biopsziák esetében TVB-t számítottunk, a 2% feletti variáns allélfrekvenciával rendelkező mutációk számszerűsítésével. Az anatómiai szempontból elkülönülő alcsoportok TVB-jei között azonban szintén 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). 27 eltérést csak szövetből (36,5%), míg 14-et pedig csak liquid biopsziából (18,4%) sikerült detektálnunk. Az összes mutáció 81,1%-a (n=60) található meg szövetmintákban, míg 63,5%-a pedig plazmákban (n=47). A szövetben megtalálható eltérések 44,6%-át sikerült liquidból is azonosítanunk. A vizsgálatok során 34 génben valamilyen nukleotid variánst azonosítottunk. Hét olyan aberrációt találtunk, amelyek többször is előfordultak a betegekben. Leggyakoribb eltérés az általunk vizsgálat populációban a *FOXL2* gén c.536C>G pozíciójában lévő nukleotid eltérés, amely az alábbi, klinikai jelentőségét nézve benignus aminosav változást okozza p.Ala179Gly. Hét esetenél egyáltalán nem találtunk semmilyen genetikai eltérést, 13 mutációt kizárólag liquid biopsziából sikerült azonosítanunk, míg öt olyan esetünk volt ahol kizárólag csak a liquid biopszia volt informatív, ebből három a szöveti biopszia alacsony tumorsejtaránya miatt nem adhatott értékelhető eredményt.

A 38 betegből 31 esetben találtunk eltéréseket, melyek nagyrészt a szakirodalommal megegyezően fordultak elő a meghatározott alcsoportokban (**12. ábra**)

[25,28,94]. A legtöbb érintett gént (n=24) intrahepatikus cholangiocarcinómában azonosítottuk, viszont ezek közül 13 előfordult extrahepatikus cholangiocarcinómában és/vagy epehólyagtumorban is. Az extrahepatikus csoportban összesen hét mutáció került leírásra, melyek közül öt közös volt egyéb altípussal is, két gén tekinthető specifikusnak erre a kategóriára. Ezek a *HRAS* és a *MAP2K1* gének különböző eltérései. Az epehólyagtumorkban detektált 20 aberráció közül 10-et egyéb csoportban is megfigyelhettünk. A *FOXL2*, *PIK3CA*, *KRAS* és *TP53* gének eltérései mind a három altípusban azonosíthatóak voltak. Irodalmi adatok alapján ezen gének inkább extrahepatikus cholangiocarcinómában fordulnak elő, intrahepatikus érintettség esetén kedvezőtlenebb prognózissal járnak [16,17,94]. Epeúti tumorok esetén a leggyakoribb genetikai eltérés az intrahepatikus altípusban megjelenő *IDH1/IDH2* géneket érinti. Hasonló eredményt kaptunk mi is, csak intrahepatikus csoportban azonosítottuk ezen gének eltéréseit, a 21 esetből öt betegnél fordult elő (23,8%) [19,22,94]. Ezen kívül az *FGFR2* gének érintettsége is gyakori a cholangiocarcinómás esetekben, szintén inkább IHCC csoportra jellemzően, ezt azonban egy esetben sikerült csak azonosítanunk (9. eset) [27,35,95].

A genetikai elváltozásokat a COSMIC illetve VarSome Premium adatbázisok által meghatározott klinikai jelentőségük alapján is kategorizáltuk. A 38 beteg közül 20-nál (52,6%) észleltünk patogén vagy feltehetően patogén klinikai jelentőségű el térést. Az irodalmi adatok alapján epeúti tumorokra jellemző gyakori gének az *FGFR2*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS* és *TP53* a mi beteganyagunkban is előfordultak és nagy részüket a párosított liquid biopsziából is sikerült azonosítanunk. A *KRAS* és *BRAF* mutációk, az *EGFR* overexpressziója, a *HER2* onkogén jelátviteli utak aktiválása, a DNS-amplifikáció és a deléciók rossz prognózissal járnak [96,97].

Opcionálisan terápiás szert konkrét epeúti tumorokra specifikusan két esetben találtunk az OncoKB adatbázis alapján. Mindkét esetben (2. és 19. esetek) az *IDH1* p.Arg132 aberráció megléte miatt alkalmazható egy az FDA által jóváhagyott terápiás szer, az Ivosidenib [34,98]. Továbbá több olyan genetikai eltérést sikerült igazolnunk, amelyek meglétekor szolid tumorokban javasolhatóak az alábbi szerek: az erdafitinib, a fexagratinib és a lirafugratinib az összes patogén *FGFR2*-mutációnál, a tipifarnib a *HRAS* eltéréseknél, az RMC-6236 a *KRAS* p.Gly12Val és p.Gly12Asp aminosav cserével járó eltéréseknél, továbbá a *KRAS* p.Gly12Asp aminosav változásnál az ASP3082 és az MRTX-1133 szerek is szóba jöhetnek. A *PIK3CA* p.His1047Arg genetikai aberráció meglétekor a LOXO-783 és a RLY-2608 szerek bizonyulhatnak hatékonyak.

6.2. A melanomák vizsgálata során szerzett megállapítások

A melanoma malignummal diagnosztizált betegek esetében is a hatékony terápia megválasztásához, valamint a jobb életminőség biztosításához elengedhetetlenek bizonyult a molekuláris jellemzők minél korábbi felismerése. Bár ez a daganattípus a bőr megbetegedéseinek csupán 1%-át teszi ki, a mutációs státusz meghatározása ebben az esetben is kulcsfontosságú. A legnagyobb mortalitással rendelkező tulajdonsága valószínűleg a számos és korai áttétet adó képessége miatt alakulhatott ki. Az esetek nagy részénél a *BRAF* mutáció, azon belül is 90%-ban c.1799T>A; p.Val600Glu eltérés a jellemző.

Retrospektív módon vizsgáltuk a digitális PCR diagnosztikai hatékonyságát, igazolva egy új módszert a betegség háttérben álló genetikai aberráció kimutatására. Összesen 100 általunk reverz hibridizáción alapuló StripAssay-vel kimutatott ismert *BRAF* státuszú beteg FFPE mintáin végeztünk ismételt DNS izolálást, majd pedig dPCR vizsgálatot. A diagnosztikai hatékonyság megállapításához szenzitivitás és specificitás értékeket számoltunk, ahol a valós pozitívnak (n=50) a korábbi StripAssay-en pozitív, a valós negatívnak (n=50) pedig a StripAssay-en negatív eredményt adó eseteket tekintettük.

Munkánk során vizsgáltuk, hogy az általunk használt nanoplate alapú dPCR technika (*BRAF* c.1799T>A; p.Val600Glu LNA Mutation Assay) érzékenysége hogyan viszonyul a reverz hibridizáción alapuló StripAssay-hez képest. A StripAssay-t jelenleg is használjuk a rutin diagnosztika részeként. A módszer IVD-minősítéssel rendelkezik, ezáltal gold standard vizsgálatnak tekintettük. Ezek alapján a dPCR szenzitivitása 99%, specificitása pedig 98,5 % volt. Kijelenthető, tehát, hogy csaknem 100% annak az értéke, hogy egy mutáció meglétét a dPCR kimutatja, valamint 98,5%-os valószínűséggel azonosítja pontosan a negatív eseteket.

A hagyományos szövettani mintavételhez képest az LB vétele ezen betegek esetében is kedvezőbb mintavételi módnak tekinthető. Az LB tüdő és colon rutin adenocarcinoma molekuláris rutin diagnosztikájának részét képezi, ezért melanoma esetén is kísérleteket végeztünk a kedvezőbb mintatípus alkalmazásának vizsgálatára. A szakirodalomban korlátozott mennyiségű adatot találtunk az LB alkalmazására melanomák esetében [2,8,87].

A prospektív tanulmány során 34 melanomával diagnosztizált betegről gyűjtöttünk össze mind szöveti, mind pedig LB mintát (n=68). A szöveti mintákat

ugyanolyan módon izoláltuk és vizsgáltuk, mint a retrospektív vizsgálatban, elsőként StripAssay-vel meghatároztuk a mutációs státuszukat, mely alapján mutáns (n=20) vagy vad (n=14) kategóriába csoportosítottuk őket. Az LB mintából cfDNS-t izoláltunk, majd szintén a két módszerrel meghatároztuk a *BRAF* státuszát az izolált DNS-nek. A rendkívül alacsony allélfrekvenciájú aberrációkat, főleg LB használatakor a nagyobb átteresztőképességű dPCR alkalmazásával tudjuk a leghatékonyabb módon kimutatni.

A vizsgálatok alapját a Breslow-mélység és Clark csoportosítás adta, amelyek között a szövetekre és liquid biopsziára jellemző koncentráció, illetve variáns allél frekvencia értékeket korreláltattuk egymással. Tudomásunk szerint ilyen módon ezt a két paramétert még nem vizsgálták. A vizsgálatok kivitelezése során számos összehasonlításban találtunk korrelációt, a legerősebb szignifikáns kapcsolatokat a prospektív kohorszban kaptuk. Az összes beteget vizsgálva 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. A p.Val600Glu mutációval rendelkező egyének között a BD és tdDNS koncentráció, a BD és a tdVAF, a BD és a cfDNS koncentráció, a BD és a cfVAF, a tdVAF és a cfVAF, valamint a cfDNS koncentráció és a cfVAF értékek között találtunk szignifikáns kapcsolatot. A vad, mutációval nem rendelkező egyéneknél pedig csak a BD és a cfDNS koncentráció között figyeltünk meg pozitív kapcsolatot. A BD és a cfDNS közötti erős kapcsolatot a minél mélyebbre terjedt tumorról magyarázzuk. A kiterjedt tumor mérete miatt több cfDNS kerülhet a perifériás keringésbe és nagyobb mennyiségben tudjuk kimutatni a cfDNS mennyiségét a liquid biopsziából.

A Clark csoportosítás alapján végzett korrelációs elemzéseknél pedig a Clark II és attól súlyosabb esetekben találtunk jelentős eltérést a BD tekintetében. Ez a tumor terjedését tekintve nem meglepő, hiszen a legrosszabb stádiumú betegek kerülnek a Clark V-ös csoportba. Itt is külön elvégeztük a stasztikai teszteket a mutációval rendelkező és a mutációval nem rendelkezők csoportjaiban is. A *BRAF* mutáns eseteknél szignifikáns pozitív korreláció igazolódott a BD értékek között a Clark II és III, a II és IV, II és V, III és V valamint a IV és V csoportoknál. A cfDNS koncentráció, valamint a cfVAF értékek is a Clark V-ös csoportban voltak a legmagasabbak. A tdVAF értékeknél is figyeltünk meg pozitív korrelációt, méghozzá a Clark II és III, illetve a II és IV csoportok között, a cfDNS koncentrációknál pedig szignifikáns különbséget találtunk a Clark II és III, valamint a III és IV csoportok között, amit azzal tudunk magyarázni, hogy a súlyosabb stádiumú betegek tumorszövege markánsabb mennyiségű cfDNS-t bocsát a perifériás keringésbe.

7. Következtetés

Az LB egy jóval kedvezőbb mintavételi eljárásnak bizonyult, mint a szövettani mintavétel nem invazív és megismételhető tulajdonsága miatt. A betegek számára biztosítható egy kevésbé megterhelő mintavételi mód, mellyel molekuláris vizsgálatokra megfelelő típusú mintát tudunk nyerni. Az így könnyebben hozzáférhető LB alkalmas lehet egy-egy betegség genetikai hátterének megismerésére, terápiás lehetőségek vizsgálatára, a betegek longitudinális követésére és akár a progresszió kialakulásának minél előbbi felismerésére is. Igazoltuk, hogy sikeresen kivitelezhető epeúti tumorok esetében is a liquid biopszia kvalitatív és kvantitatív analízise. Tekintettel a ritka, rossz prognózisú kórképre, melynél gyakran nehezen kivitelezhető a szövettani mintavétel az anatómiai lokalizáció miatt, megoldást jelenthet az LB alapú, nagy áteresztőképességű újgenerációs szekvenálási vizsgálat kivitelezése. Munkánk során 67 gén egyidejű vizsgálatát kiviteleztük NGS alapú technikával mely mindkét mintatípusban hatékonyan bizonyult, ugyanakkor nem fedte le a teljes epeúti tumorokra jellemző gének listáját. A módszer további korlátja, hogy nem képes vizsgálni a kópiaszám-variációkat (*ERBB2*) és génfúziókat (*FGFR2*, *NTRK*).

Mindazonáltal nem szabad elfelejteni, hogy az LB vizsgálata még jelenleg is számos kérdést tartogat, mivel a szöveti DNS csak egy töredékét tartalmazza. Így például egy negatív eredménynél nehezen tudjuk eldönteni, hogy az egy valós negatív eredményt tükröz-e, vagy éppen a minta tumor DNS hiányát, vagy esetleg a ténylegesen alacsony tumor DNS felszabadulását.

A vizsgálataink igazolták, hogy a digitális PCR pontos *BRAF* c.1799T>A; p.Val600Glu mutációs státusz meghatározást tesz lehetővé mindkét mintatípusból melanomával diagnosztizált betegeknél, valamint abszolút kvantifikációra is képes. Ezen disszertációban bemutatjuk a tumortömeg, a tumorból származó DNS koncentráció és a mutációk variáns allél frekvenciája közötti, valamint az LB-ből származó DNS koncentráció és a mutációk variáns allél frekvenciája közötti összefüggéseket.

Statisztikailag igazoltuk, hogy a Clark V stádiumú esetekből szignifikánsabb nagyobb cfDNS mennyiség izolálható a többi esethez képest. A dPCR nagyfokú érzékenysége miatt már nagyon kis mennyiségű DNS-ből is képes a detektálásra, valamint az abszolút kvantifikáció révén lehetővé teszi a kópiaszámok meghatározását is. A kapott eredmények megbízhatóságát mindenképpen növelni kell, ezt nagyobb mintaszámmal

tehetnének biztosabbá. A módszer egy gyorsabb átfutási idővel képes a mutációk meghatározására, mint az NGS, ami igen fontos lehet a tumorok diagnosztikájában.

A precíziós onkológia korszakában egyre nagyobb teret nyer a liquid biopszia, mivel ez egy nem invazív eljárás, alacsony kockázattal jár és akár többször is megismételhető a mintavétel. Így lehetővé teszi a betegek longitudinális követését, információt adhat mind a primer tumor, mind pedig a metasztázis jellemzőiről, valamint hozzájárulhat a minél korábbi diagnosztizáláshoz [6]. A cfDNA alkalmazása daganatos betegeknél, PCR alapú technikákkal alkalmazva (NGS, dPCR) jól dokumentált. Így felhasználható, mint prediktív biomarker, hiszen lehetővé teszi a tumor heterogenitásának meghatározását, a célzott terápiákra kialakuló rezisztencia mutációk kimutatását és akár a terápiás válasz korai kimutatására is alkalmas lehet [52].

8. Összefoglalás

A cholangiocarcinomás esetek nagy része inoperábilis, nehezen hozzáférhető daganatnak tekinthető, éppen ezért a szövettani minták megfelelése igencsak vitatott a molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez.

A cután melanómák esetében pedig a testfelszínen elhelyezkedő, sokszor igen kis méretű elváltozásokról beszélünk. Ezen daganat típusnál kérdés volt, hogy a csekély dagant mérete miatt képes-e a perifériás keringésbe megfelelő mennyiségű keringő tumorsejteket bocsátani a liquid biopszia kivitelezéséhez.

Munkánk során az LB minőségi és mennyiségi analízise mindkét daganattípus esetén sikeresnek bizonyult.

Cholangiocarcinomás esetekben az LB használatával pozitív korrelációt találtunk a becsült tumortérfogat és a cfDNS-hozam között. Mutációkat 31/38 betegnél (81,6%) azonosítottunk, öt esetben csak a LB minta volt informatív. A patogén mutációk, mint például az *FGFR2*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS* és *TP53* azonosíthatók voltak mindkét mintatípusban.

Cutan melanómák esetében pozitív korrelációt találtunk az összes esetben a Breslow mélység és a cell-free DNS mennyisége között (cfDNS), valamint a szöveti mutációk VAF-ja (tdVAF) és a LB-ből kimutatott mutációk VAF-ja (cfVAF) között. Hasonló párhuzamot figyeltünk meg a mutáns csoportban a szöveti DNS mennyiség (tdDNS) és a tdVAF között, továbbá a cfDNS és a cfVAF értékek is korreláltak egymással. Megfigyeltük továbbá, hogy a Clark V-ös kategóriába tartozó daganatok esetében magasabb volt mind a cfDNS koncentrációja, mind a cfDNS VAF-ja és tdVAF-ja is. Igazoltuk, hogy az előrehaladottabb stádiumú betegek perifériás vére nagyobb mennyiségű tumorból származó DNS-t tartalmaz.

Tanulmányaink során klinikailag releváns pontmutációkat mutattunk ki epeúti tumorok mind szövettani, mind liquid biopsziás mintáiból, illetve sikeresen igazoltuk a liquid biopszia alkalmazhatóságát primer cutan melanomával diagnosztizált betegek esetében is. A szabad DNS diagnosztikai alkalmazása, mivel ezen eljárás a tumorok térbeli heterogenitását tükrözi, egy új megközelítés a precíziós onkológiai kezelések indikációjában.

9. Summary

The majority of cases of cholangiocarcinoma are considered inoperable and difficult-to-access tumors, so the adequacy of histological samples for molecular testing is highly controversial.

Cutaneous melanomas are lesions on the body's surface, often very small. The question was whether the small size of the tumor could release enough circulating tumor cells into the peripheral circulation to allow a liquid biopsy (LB).

We were able to perform a qualitative and quantitative analysis of LB which was successful in both tumor types.

We found a positive correlation between estimated tumor volume and cfDNA yield in cholangiocarcinoma cases using LB. An SNV was identified in 31/38 patients (81.6%), in five cases, only the LB sample was informative. Pathogenic mutations such as *FGFR2*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS*, and *TP53* were identified in both sample types.

For cutaneous melanomas, we found a positive correlation between Breslow depth and cell-free DNA (cfDNA) in all cases, as well as between VAF of tissue mutations (tdVAF) and VAF of mutations detected in LB (cfVAF). A similar parallel was observed between tissue-free DNA (tdDNA) and tdVAF in the mutant group, and cfDNA and cfVAF values were also correlated. We also observed that tumors in the Clark V category had higher levels of cfDNA concentration, cfDNA VAF, and tdVAF. We confirmed that the peripheral blood of patients with more advanced diseases contains higher levels of tumor-derived DNA.

Our studies have identified clinically relevant point mutations in histological and liquid biopsy samples from biliary tract tumors and have successfully demonstrated the applicability of liquid biopsy in patients diagnosed with primary cutaneous melanoma. The diagnostic use of free DNA, as this technique reflects the spatial heterogeneity of tumors, is a new approach in the indication of precision oncology treatments.

10. Irodalomjegyzék

1. Rachiglio, A.M.; Esposito Abate, R.; Sacco, A.; Pasquale, R.; Fenizia, F.; Lambiase, M.; Morabito, A.; Montanino, A.; Rocco, G.; Romano, C.; et al. Limits and Potential of Targeted Sequencing Analysis of Liquid Biopsy in Patients with Lung and Colon Carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 66595–66605, doi:10.18632/oncotarget.10704.
2. Gaiser, M.R.; von Bubnoff, N.; Gebhardt, C.; Utikal, J.S. Liquid Biopsy to Monitor Melanoma Patients. *J Dtsch Dermatol Ges* **2018**, *16*, 405–414, doi:10.1111/ddg.13461.
3. Mack, P.C.; Banks, K.C.; Espenschied, C.R.; Burich, R.A.; Zill, O.A.; Lee, C.E.; Riess, J.W.; Mortimer, S.A.; Talasz, A.; Lanman, R.B.; et al. Spectrum of Driver Mutations and Clinical Impact of Circulating Tumor DNA Analysis in Non-Small Cell Lung Cancer: Analysis of over 8000 Cases. *Cancer* **2020**, *126*, 3219–3228, doi:10.1002/cncr.32876.
4. Mokánszki, A.; Bicskó, R.; Gergely, L.; Méhes, G. Cell-Free Total Nucleic Acid-Based Genotyping of Aggressive Lymphoma: Comprehensive Analysis of Gene Fusions and Nucleotide Variants by Next-Generation Sequencing. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 3032, doi:10.3390/cancers13123032.
5. Méhes, G. Liquid Biopsy for Predictive Mutational Profiling of Solid Cancer: The Pathologist's Perspective. *J Biotechnol* **2019**, *297*, 66–70, doi:10.1016/j.jbiotec.2019.04.002.
6. Wan, J.C.M.; Massie, C.; Garcia-Corbacho, J.; Mouliere, F.; Brenton, J.D.; Caldas, C.; Pacey, S.; Baird, R.; Rosenfeld, N. Liquid Biopsies Come of Age: Towards Implementation of Circulating Tumour DNA. *Nat Rev Cancer* **2017**, *17*, 223–238, doi:10.1038/nrc.2017.7.
7. Rizzo, A.; Ricci, A.D.; Tavolari, S.; Brandi, G. Circulating Tumor DNA in Biliary Tract Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Cancer Genomics Proteomics* **2020**, *17*, 441–452, doi:10.21873/cgp.20203.
8. Ricciardi, E.; Giordani, E.; Ziccheddu, G.; Falcone, I.; Giacomini, P.; Fanciulli, M.; Russillo, M.; Cerro, M.; Ciliberto, G.; Morrone, A.; et al. Metastatic Melanoma: Liquid Biopsy as a New Precision Medicine Approach. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 4014, doi:10.3390/ijms24044014.
9. Han, J.-Y.; Ahn, K.S.; Kim, T.-S.; Kim, Y.H.; Cho, K.B.; Shin, D.W.; Baek, W.-K.; Suh, S.-I.; Jang, B.-C.; Kang, K.J. Liquid Biopsy from Bile-Circulating Tumor DNA in Patients with Biliary Tract Cancer. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 4581, doi:10.3390/cancers13184581.
10. Rompianesi, G.; Di Martino, M.; Gordon-Weeks, A.; Montalti, R.; Troisi, R. Liquid Biopsy in Cholangiocarcinoma: Current Status and Future Perspectives. *World J Gastrointest Oncol* **2021**, *13*, 332–350, doi:10.4251/wjgo.v13.i5.332.
11. Siravegna, G.; Marsoni, S.; Siena, S.; Bardelli, A. Integrating Liquid Biopsies into the Management of Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**, *14*, 531–548, doi:10.1038/nrclinonc.2017.14.
12. Mokánszki, A.; Bádon, E.S.; Mónus, A.; Tóth, L.; Bittner, N.; Méhes, G. Cell-Free DNA From Pleural Effusion Samples: Is It Right for Molecular Testing in Lung Adenocarcinoma? *Pathol Oncol Res* **2021**, *27*, 613071, doi:10.3389/pore.2021.613071.
13. 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* **2022**, *61*, 101793, doi:10.1016/j.mcp.2022.101793.

14. Lapin, M.; Oltedal, S.; Tjensvoll, K.; Buhl, T.; Smaaland, R.; Garresori, H.; Javle, M.; Glenjen, N.I.; Abelseh, B.K.; Gilje, B.; et al. Fragment Size and Level of Cell-Free DNA Provide Prognostic Information in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *J Transl Med* **2018**, *16*, 300, doi:10.1186/s12967-018-1677-2.
15. Rubovszky, G.; Láng, I.; Ganofszy, E.; Horváth, Z.; Juhos, É.; Nagy, T.; Szabó, E.; Szentirmay, Z.; Budai, B.; Hitre, E. Cetuximab, Gemcitabine and Capecitabine in Patients with Inoperable Biliary Tract Cancer: A Phase 2 Study. *European Journal of Cancer* **2013**, *49*, 3806–3812, doi:10.1016/j.ejca.2013.07.143.
16. Montal, R.; Sia, D.; Montironi, C.; Leow, W.Q.; Esteban-Fabrá, R.; Pinyol, R.; Torres-Martin, M.; Bassaganyas, L.; Moeini, A.; Peix, J.; et al. Molecular Classification and Therapeutic Targets in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Hepatol* **2020**, *73*, 315–327, doi:10.1016/j.jhep.2020.03.008.
17. Lendvai, G.; Szekerczés, T.; Illyés, I.; Dóra, R.; Kontsek, E.; Gógl, A.; Kiss, A.; Werling, K.; Kovalszky, I.; Schaff, Z.; et al. Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res* **2020**, *26*, 3–15, doi:10.1007/s12253-018-0491-8.
18. Primrose, J.N.; Fox, R.P.; Palmer, D.H.; Malik, H.Z.; Prasad, R.; Mirza, D.; Anthony, A.; Corrie, P.; Falk, S.; Finch-Jones, M.; et al. Capecitabine Compared with Observation in Resected Biliary Tract Cancer (BILCAP): A Randomised, Controlled, Multicentre, Phase 3 Study. *Lancet Oncol* **2019**, *20*, 663–673, doi:10.1016/S1470-2045(18)30915-X.
19. Noel, M.S.; Hezel, A.F. New and Emerging Treatment Options for Biliary Tract Cancer. *Onco Targets Ther* **2013**, *6*, 1545–1552, doi:10.2147/OTT.S32545.
20. Weinberg, B.A.; Xiu, J.; Lindberg, M.R.; Shields, A.F.; Hwang, J.J.; Poorman, K.; Salem, M.E.; Pishvaian, M.J.; Holcombe, R.F.; Marshall, J.L.; et al. Molecular Profiling of Biliary Cancers Reveals Distinct Molecular Alterations and Potential Therapeutic Targets. *J Gastrointest Oncol* **2019**, *10*, 652–662, doi:10.21037/jgo.2018.08.18.
21. Faivre, J.; Forman, D.; Estève, J.; Obradovic, M.; Sant, M. Survival of Patients with Primary Liver Cancer, Pancreatic Cancer and Biliary Tract Cancer in Europe. *European Journal of Cancer* **1998**, *34*, 2184–2190, doi:10.1016/S0959-8049(98)00330-X.
22. Putra, J.; de Abreu, F.B.; Peterson, J.D.; Pipas, J.M.; Mody, K.; Amos, C.I.; Tsongalis, G.J.; Suriawinata, A.A. Molecular Profiling of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinoma Using next Generation Sequencing. *Exp Mol Pathol* **2015**, *99*, 240–244, doi:10.1016/j.yexmp.2015.07.005.
23. Rizzo, A.; Tavolari, S.; Ricci, A.D.; Frega, G.; Palloni, A.; Relli, V.; Salati, M.; Fenocchio, E.; Massa, A.; Aglietta, M.; et al. Molecular Features and Targeted Therapies in Extrahepatic Cholangiocarcinoma: Promises and Failures. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 3256, doi:10.3390/cancers12113256.
24. Horgan, A.M.; Amir, E.; Walter, T.; Knox, J.J. Adjuvant Therapy in the Treatment of Biliary Tract Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 1934–1940, doi:10.1200/JCO.2011.40.5381.
25. Nakamura, H.; Arai, Y.; Totoki, Y.; Shirota, T.; Elzawahry, A.; Kato, M.; Hama, N.; Hosoda, F.; Urushidate, T.; Ohashi, S.; et al. Genomic Spectra of Biliary Tract Cancer. *Nat Genet* **2015**, *47*, 1003–1010, doi:10.1038/ng.3375.
26. Mody, K.; Starr, J.; Saul, M.; Poorman, K.; Weinberg, B.A.; Salem, M.E.; VanderWalde, A.; Shields, A.F. Patterns and Genomic Correlates of PD-L1 Expression in Patients with Biliary Tract Cancers. *J Gastrointest Oncol* **2019**, *10*, 1099–1109, doi:10.21037/jgo.2019.08.08.

27. Jusakul, A.; Cutcutache, I.; Yong, C.H.; Lim, J.Q.; Huang, M.N.; Padmanabhan, N.; Nellore, V.; Kongpetch, S.; Ng, A.W.T.; Ng, L.M.; et al. Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* **2017**, *7*, 1116–1135, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0368.
28. Brandi, G.; Farioli, A.; Astolfi, A.; Biasco, G.; Tavolari, S. Genetic Heterogeneity in Cholangiocarcinoma: A Major Challenge for Targeted Therapies. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14744–14753, doi:10.18632/oncotarget.4539.
29. Chen, X.; Wu, X.; Wu, H.; Gu, Y.; Shao, Y.; Shao, Q.; Zhu, F.; Li, X.; Qian, X.; Hu, J.; et al. Camrelizumab plus Gemcitabine and Oxaliplatin (GEMOX) in Patients with Advanced Biliary Tract Cancer: A Single-Arm, Open-Label, Phase II Trial. *J Immunother Cancer* **2020**, *8*, e001240, doi:10.1136/jitc-2020-001240.
30. Lamarca, A.; Hubner, R.A.; David Ryder, W.; Valle, J.W. Second-Line Chemotherapy in Advanced Biliary Cancer: A Systematic Review. *Ann Oncol* **2014**, *25*, 2328–2338, doi:10.1093/annonc/mdu162.
31. Ben-Josef, E.; Guthrie, K.A.; El-Khoueiry, A.B.; Corless, C.L.; Zalupski, M.M.; Lowy, A.M.; Thomas, C.R.; Alberts, S.R.; Dawson, L.A.; Micetich, K.C.; et al. SWOG S0809: A Phase II Intergroup Trial of Adjuvant Capecitabine and Gemcitabine Followed by Radiotherapy and Concurrent Capecitabine in Extrahepatic Cholangiocarcinoma and Gallbladder Carcinoma. *J Clin Oncol* **2015**, *33*, 2617–2622, doi:10.1200/JCO.2014.60.2219.
32. Ma, N.; Cheng, H.; Qin, B.; Zhong, R.; Wang, B. Adjuvant Therapy in the Treatment of Gallbladder Cancer: A Meta-Analysis. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 615, doi:10.1186/s12885-015-1617-y.
33. Lamarca, A.; Palmer, D.H.; Wasan, H.S.; Ross, P.J.; Ma, Y.T.; Arora, A.; Falk, S.; Gillmore, R.; Wadsley, J.; Patel, K.; et al. Second-Line FOLFOX Chemotherapy versus Active Symptom Control for Advanced Biliary Tract Cancer (ABC-06): A Phase 3, Open-Label, Randomised, Controlled Trial. *Lancet Oncol* **2021**, *22*, 690–701, doi:10.1016/S1470-2045(21)00027-9.
34. Abou-Alfa, G.K.; Macarulla, T.; Javle, M.M.; Kelley, R.K.; Lubner, S.J.; Adeva, J.; Cleary, J.M.; Catenacci, D.V.; Borad, M.J.; Bridgewater, J.; et al. Ivosidenib in IDH1-Mutant, Chemotherapy-Refractory Cholangiocarcinoma (ClarIDHy): A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Study. *Lancet Oncol* **2020**, *21*, 796–807, doi:10.1016/S1470-2045(20)30157-1.
35. Rizvi, S.; Khan, S.A.; Hallemeier, C.L.; Kelley, R.K.; Gores, G.J. Cholangiocarcinoma - Evolving Concepts and Therapeutic Strategies. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*, 95–111, doi:10.1038/nrclinonc.2017.157.
36. Tamai, K.; Nakamura, M.; Mizuma, M.; Mochizuki, M.; Yokoyama, M.; Endo, H.; Yamaguchi, K.; Nakagawa, T.; Shiina, M.; Unno, M.; et al. Suppressive Expression of CD274 Increases Tumorigenesis and Cancer Stem Cell Phenotypes in Cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* **2014**, *105*, 667–674, doi:10.1111/cas.12406.
37. Fontugne, J.; Augustin, J.; Pujals, A.; Compagnon, P.; Rousseau, B.; Luciani, A.; Tournigand, C.; Cherqui, D.; Azoulay, D.; Pawlotsky, J.-M.; et al. PD-L1 Expression in Perihilar and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 24644–24651, doi:10.18632/oncotarget.15602.
38. Samstein, R.M.; Lee, C.-H.; Shoushtari, A.N.; Hellmann, M.D.; Shen, R.; Janjigian, Y.Y.; Barron, D.A.; Zehir, A.; Jordan, E.J.; Omuro, A.; et al. Tumor Mutational Load Predicts Survival after Immunotherapy across Multiple Cancer Types. *Nat Genet* **2019**, *51*, 202–206, doi:10.1038/s41588-018-0312-8.
39. Clark, W.H.; Elder, D.E.; Guerry, D.; Epstein, M.N.; Greene, M.H.; Van Horn, M. A Study of Tumor Progression: The Precursor Lesions of Superficial Spreading and

- Nodular Melanoma. *Human Pathology* **1984**, *15*, 1147–1165, doi:10.1016/S0046-8177(84)80310-X.
40. Abbas, O.; Miller, D.D.; Bhawan, J. Cutaneous Malignant Melanoma: Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Am J Dermatopathol* **2014**, *36*, 363–379, doi:10.1097/DAD.0b013e31828a2ec5.
 41. Schadendorf, D.; Fisher, D.E.; Garbe, C.; Gershenwald, J.E.; Grob, J.-J.; Halpern, A.; Herlyn, M.; Marchetti, M.A.; McArthur, G.; Ribas, A.; et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, 15003, doi:10.1038/nrdp.2015.3.
 42. Leonardi, G.C.; Falzone, L.; Salemi, R.; Zanghi, A.; Spandidos, D.A.; McCubrey, J.A.; Candido, S.; Libra, M. Cutaneous Melanoma: From Pathogenesis to Therapy (Review). *Int J Oncol* **2018**, *52*, 1071–1080, doi:10.3892/ijo.2018.4287.
 43. Ding, L.; Gosh, A.; Lee, D.J.; Emri, G.; Huss, W.J.; Bogner, P.N.; Paragh, G. Prognostic Biomarkers of Cutaneous Melanoma. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **2022**, *38*, 418–434, doi:10.1111/phpp.12770.
 44. Classification and Staging of Melanoma in the Head and Neck - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35491079/> (accessed on 16 July 2024).
 45. Malignant Melanoma - PMC Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4934490/> (accessed on 25 September 2024).
 46. Parrag, P.; Wéber, A.; Liskay, G.; Nagy, P.; Kásler, M.; Polgár, C.; Kenessey, I. [Hungarian situation of melanoma incidence and mortality in the first two decades of 21st century]. *Magy Onkol* **2022**, *66*, 94–99.
 47. Puckett, Y.; Wilson, A.M.; Farci, F.; Thevenin, C. Melanoma Pathology. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
 48. Thanh, D.N.H.; Prasath, V.B.S.; Hieu, L.M.; Hien, N.N. Melanoma Skin Cancer Detection Method Based on Adaptive Principal Curvature, Colour Normalisation and Feature Extraction with the ABCD Rule. *J Digit Imaging* **2020**, *33*, 574–585, doi:10.1007/s10278-019-00316-x.
 49. Treatment of Metastatic Melanoma in the Elderly - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35316844/> (accessed on 16 July 2024).
 50. Dhomen, N.; Marais, R. BRAF Signaling and Targeted Therapies in Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **2009**, *23*, 529–545, ix, doi:10.1016/j.hoc.2009.04.001.
 51. IJMS | Free Full-Text | Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction Available online: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/10/5384> (accessed on 16 July 2024).
 52. Siroy, A.E.; Boland, G.M.; Milton, D.R.; Roszik, J.; Frankian, S.; Malke, J.; Haydu, L.; Prieto, V.G.; Tetzlaff, M.; Ivan, D.; et al. Beyond BRAF(V600): Clinical Mutation Panel Testing by next-Generation Sequencing in Advanced Melanoma. *J Invest Dermatol* **2015**, *135*, 508–515, doi:10.1038/jid.2014.366.
 53. Ascierto, P.A.; Kirkwood, J.M.; Grob, J.-J.; Simeone, E.; Grimaldi, A.M.; Maio, M.; Palmieri, G.; Testori, A.; Marincola, F.M.; Mozzillo, N. The Role of BRAF V600 Mutation in Melanoma. *J Transl Med* **2012**, *10*, 85, doi:10.1186/1479-5876-10-85.
 54. A BRAF New World - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32485528/> (accessed on 16 July 2024).
 55. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy | Molecular Cancer Therapeutics | American Association for Cancer Research Available online: <https://aacrjournals.org/mct/article/10/3/385/91032/BRAFV600E-Implications-for-Carcinogenesis-and> (accessed on 16 July 2024).

56. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954, doi:10.1038/nature00766.
57. Daum, G.; Eisenmann-Tappe, I.; Fries, H.W.; Troppmair, J.; Rapp, U.R. The Ins and Outs of Raf Kinases. *Trends Biochem Sci* **1994**, *19*, 474–480, doi:10.1016/0968-0004(94)90133-3.
58. Cutler, R.E.; Stephens, R.M.; Saracino, M.R.; Morrison, D.K. Autoregulation of the Raf-1 Serine/Threonine Kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 9214–9219, doi:10.1073/pnas.95.16.9214.
59. Garnett, M.J.; Marais, R. Guilty as Charged: B-RAF Is a Human Oncogene. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 313–319, doi:10.1016/j.ccr.2004.09.022.
60. Wan, P.T.C.; Garnett, M.J.; Roe, S.M.; Lee, S.; Niculescu-Duvaz, D.; Good, V.M.; Jones, C.M.; Marshall, C.J.; Springer, C.J.; Barford, D.; et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* **2004**, *116*, 855–867, doi:10.1016/s0092-8674(04)00215-6.
61. Lavoie, H.; Therrien, M. Regulation of RAF Protein Kinases in ERK Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2015**, *16*, 281–298, doi:10.1038/nrm3979.
62. Dankner, M.; Rose, A.A.N.; Rajkumar, S.; Siegel, P.M.; Watson, I.R. Classifying BRAF Alterations in Cancer: New Rational Therapeutic Strategies for Actionable Mutations. *Oncogene* **2018**, *37*, 3183–3199, doi:10.1038/s41388-018-0171-x.
63. Śmiech, M.; Leszczyński, P.; Kono, H.; Wardell, C.; Taniguchi, H. Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. *Genes (Basel)* **2020**, *11*, 1342, doi:10.3390/genes11111342.
64. Class 1, 2, and 3 BRAF-Mutated Metastatic Colorectal Cancer: A Detailed Clinical, Pathologic, and Molecular Characterization | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research Available online: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/25/13/3954/81843/Class-1-2-and-3-BRAF-Mutated-Metastatic-Colorectal> (accessed on 3 June 2024).
65. Bracht, J.W.P.; Karachaliou, N.; Bivona, T.; Lanman, R.B.; Faull, I.; Nagy, R.J.; Drozdowskyj, A.; Berenguer, J.; Fernandez-Bruno, M.; Molina-Vila, M.A.; et al. BRAF Mutations Classes I, II, and III in NSCLC Patients Included in the SLLIP Trial: The Need for a New Pre-Clinical Treatment Rationale. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 1381, doi:10.3390/cancers11091381.
66. Pavri, S.N.; Clune, J.; Ariyan, S.; Narayan, D. Malignant Melanoma: Beyond the Basics. *Plastic and Reconstructive Surgery* **2016**, *138*, 330e, doi:10.1097/PRS.0000000000002367.
67. Takahashi, J.; Nagasawa, S. Immunostimulatory Effects of Radiotherapy for Local and Systemic Control of Melanoma: A Review. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 9324, doi:10.3390/ijms21239324.
68. Targeted Therapy for Patients with BRAF-Mutant Lung Cancer Results from the European EURAF Cohort - Journal of Thoracic Oncology Available online: [https://www.jto.org/article/S1556-0864\(15\)33520-6/fulltext](https://www.jto.org/article/S1556-0864(15)33520-6/fulltext) (accessed on 25 September 2024).
69. Hyman, D.M.; Puzanov, I.; Subbiah, V.; Faris, J.E.; Chau, I.; Blay, J.-Y.; Wolf, J.; Raje, N.S.; Diamond, E.L.; Hollebecque, A.; et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 726–736, doi:10.1056/NEJMoa1502309.
70. Encorafenib plus Binimetinib versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients with BRAF-Mutant Melanoma (COLUMBUS): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial - The Lancet Oncology Available online:

- [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(18\)30142-6/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(18)30142-6/abstract) (accessed on 25 September 2024).
71. Garbe, C.; Eigentler, T.K. Vemurafenib. *Recent Results Cancer Res* **2018**, *211*, 77–89, doi:10.1007/978-3-319-91442-8_6.
 72. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dabrafenib | Clinical Pharmacokinetics Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40262-018-0703-0> (accessed on 25 September 2024).
 73. Savoia, P.; Fava, P.; Casoni, F.; Cremona, O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 1483, doi:10.3390/ijms20061483.
 74. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma | New England Journal of Medicine Available online: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1406037?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov (accessed on 25 September 2024).
 75. Dabrafenib plus Trametinib versus Dabrafenib Monotherapy in Patients with Metastatic BRAF V600E/K-Mutant Melanoma: Long-Term Survival and Safety Analysis of a Phase 3 Study - PMC Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5834102/> (accessed on 25 September 2024).
 76. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma | New England Journal of Medicine Available online: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1408868?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov (accessed on 25 September 2024).
 77. Ascierto, P.A.; McArthur, G.A.; Dréno, B.; Atkinson, V.; Liskay, G.; Giacomo, A.M.D.; Mandalà, M.; Demidov, L.; Stroyakovskiy, D.; Thomas, L.; et al. Cobimetinib Combined with Vemurafenib in Advanced BRAFV600-Mutant Melanoma (coBRIM): Updated Efficacy Results from a Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology* **2016**, *17*, 1248–1260, doi:10.1016/S1470-2045(16)30122-X.
 78. Hosen, M.I.; Forey, N.; Durand, G.; Voegelé, C.; Bilici, S.; Avogbe, P.H.; Delhomme, T.M.; Foll, M.; Manel, A.; Vian, E.; et al. Development of Sensitive Droplet Digital PCR Assays for Detecting Urinary TERT Promoter Mutations as Non-Invasive Biomarkers for Detection of Urothelial Cancer. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 3541, doi:10.3390/cancers12123541.
 79. Ylli, D.; Patel, A.; Jensen, K.; Li, Z.-Z.; Mendonca-Torres, M.C.; Costello, J.; Gomes-Lima, C.J.; Wartofsky, L.; Burman, K.D.; Vasko, V.V. Microfluidic Droplet Digital PCR Is a Powerful Tool for Detection of BRAF and TERT Mutations in Papillary Thyroid Carcinomas. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 1916, doi:10.3390/cancers11121916.
 80. Park, Y.R.; Kim, Y.-M.; Lee, S.W.; Lee, H.Y.; Lee, G.E.; Lee, J.-E.; Kim, Y.-T. Optimization to Detect TP53 Mutations in Circulating Cell-Free Tumor DNA from Patients with Serous Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol Sci* **2018**, *61*, 328–336, doi:10.5468/ogs.2018.61.3.328.
 81. Ginkel, J.H. van; Huibers, M.M.H.; Es, R.J.J. van; Bree, R. de; Willems, S.M. Droplet Digital PCR for Detection and Quantification of Circulating Tumor DNA in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *BMC Cancer* **2017**, *17*, doi:10.1186/s12885-017-3424-0.
 82. Detection of KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer | Clinical Chemistry | Oxford Academic Available online: <https://academic.oup.com/clinchem/article/62/11/1482/5611982?login=true> (accessed on 4 June 2024).

83. Yung, T.K.F.; Chan, K.C.A.; Mok, T.S.K.; Tong, J.; To, K.-F.; Lo, Y.M.D. Single-Molecule Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Plasma by Microfluidics Digital PCR in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 2076–2084, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2622.
84. Oshiro, C.; Kagara, N.; Naoi, Y.; Shimoda, M.; Shimomura, A.; Maruyama, N.; Shimazu, K.; Kim, S.J.; Noguchi, S. PIK3CA Mutations in Serum DNA Are Predictive of Recurrence in Primary Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res Treat* **2015**, *150*, 299–307, doi:10.1007/s10549-015-3322-6.
85. Sefrioui, D.; Sarafan-Vasseur, N.; Beaussire, L.; Barette, M.; Gangloff, A.; Blanchard, F.; Clatot, F.; Sabourin, J.-C.; Sesboué, R.; Frebourg, T.; et al. Clinical Value of Chip-Based Digital-PCR Platform for the Detection of Circulating DNA in Metastatic Colorectal Cancer. *Digestive and Liver Disease* **2015**, *47*, 884–890, doi:10.1016/j.dld.2015.05.023.
86. Dube, S.; Qin, J.; Ramakrishnan, R. Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLoS One* **2008**, *3*, e2876, doi:10.1371/journal.pone.0002876.
87. Diefenbach, R.J.; Lee, J.H.; Rizos, H. Monitoring Melanoma Using Circulating Free DNA. *Am J Clin Dermatol* **2019**, *20*, 1–12, doi:10.1007/s40257-018-0398-x.
88. Váraljai, R.; Elouali, S.; Lueong, S.S.; Wistuba-Hamprecht, K.; Seremet, T.; Siveke, J.T.; Becker, J.C.; Sucker, A.; Paschen, A.; Horn, P.A.; et al. The Predictive and Prognostic Significance of Cell-Free DNA Concentration in Melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2021**, *35*, 387–395, doi:10.1111/jdv.16766.
89. Sápi, J.; Kovács, L.; Drexler, D.A.; Kocsis, P.; Gajári, D.; Sápi, Z. Tumor Volume Estimation and Quasi-Continuous Administration for Most Effective Bevacizumab Therapy. *PLoS One* **2015**, *10*, e0142190, doi:10.1371/journal.pone.0142190.
90. Quan, P.-L.; Sauzade, M.; Brouzes, E. dPCR: A Technology Review. *Sensors* **2018**, *18*, 1271, doi:10.3390/s18041271.
91. Mao, X.; Liu, C.; Tong, H.; Chen, Y.; Liu, K. Principles of Digital PCR and Its Applications in Current Obstetrical and Gynecological Diseases. *Am J Transl Res* **2019**, *11*, 7209–7222.
92. Whale, A.S.; Cowen, S.; Foy, C.A.; Huggett, J.F. Methods for Applying Accurate Digital PCR Analysis on Low Copy DNA Samples. *PLoS One* **2013**, *8*, e58177, doi:10.1371/journal.pone.0058177.
93. Prospective Multicenter Real-World RAS Mutation Comparison between OncoBEAM-Based Liquid Biopsy and Tissue Analysis in Metastatic Colorectal Cancer - PMC Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6288144/> (accessed on 25 September 2024).
94. Churi, C.R.; Shroff, R.; Wang, Y.; Rashid, A.; Kang, H.C.; Weatherly, J.; Zuo, M.; Zinner, R.; Hong, D.; Meric-Bernstam, F.; et al. Mutation Profiling in Cholangiocarcinoma: Prognostic and Therapeutic Implications. *PLoS One* **2014**, *9*, e115383, doi:10.1371/journal.pone.0115383.
95. Mertens, J.C.; Rizvi, S.; Gores, G.J. Targeting Cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2018**, *1864*, 1454–1460, doi:10.1016/j.bbadis.2017.08.027.
96. Andersen, J.B.; Spee, B.; Blechacz, B.R.; Avital, I.; Komuta, M.; Barbour, A.; Conner, E.A.; Gillen, M.C.; Roskams, T.; Roberts, L.R.; et al. Genomic and Genetic Characterization of Cholangiocarcinoma Identifies Therapeutic Targets for Tyrosine Kinase Inhibitors. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 1021–1031.e15, doi:10.1053/j.gastro.2011.12.005.

97. Sia, D.; Hoshida, Y.; Villanueva, A.; Roayaie, S.; Ferrer, J.; Tabak, B.; Peix, J.; Sole, M.; Tovar, V.; Alsinet, C.; et al. Integrative Molecular Analysis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals 2 Classes That Have Different Outcomes. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 829–840, doi:10.1053/j.gastro.2013.01.001.
98. Zhu, A.X.; Macarulla, T.; Javle, M.M.; Kelley, R.K.; Lubner, S.J.; Adeva, J.; Cleary, J.M.; Catenacci, D.V.T.; Borad, M.J.; Bridgewater, J.A.; et al. Final Overall Survival Efficacy Results of Ivosidenib for Patients With Advanced Cholangiocarcinoma With IDH1 Mutation: The Phase 3 Randomized Clinical ClarIDHy Trial. *JAMA Oncol* **2021**, *7*, 1669–1677, doi:10.1001/jamaoncol.2021.3836.

11. Publikációs lista (A Kenézy Élettudományi Könyvtár Jávahagyása által)



**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

1. **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
2. **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

3. Chang Chien, Y. C., Madarász, K., **Csoma, S. L.**, Mótján, 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
4. **Csoma, S. L.**, Bedekovics, J., Veres, G., Árokszállási, A., András, C., Méhes, G., Mokánszki, A.: A perifériás vérben keringő szabad DNS molekuláris vizsgálata epeúti 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., Jószai, 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 alapjául szolgáló közleményekre):
9,7**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.07.





Registry number: DEENK/41/2025.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Szilvia Lilla Csoma
Doctoral School: Doctoral School of Clinical Medicine
MTMT ID: 10081710

List of publications related to the dissertation

1. **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
2. **Csoma, S. L.**, Bedekovics, J., Veres, G., Árokszálási, 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

List of other publications

3. Chang Chien, Y. C., Madarász, K., **Csoma, S. L.**, Mótán, 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
4. **Csoma, S. L.**, Bedekovics, J., Veres, G., Árokszálási, A., András, C., Méhes, G., Mokánszki, A.: A perifériás vérben keringő szabad DNS molekuláris vizsgálata epeúti 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., Józszai, 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

Total IF of journals (all publications): 23,463

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 9,7

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

07 February, 2025



12. Tárgyszavak

újgenerációs szekvenálás, digitális PCR, folyadékbiopszia, tumorból származó szabad keringő DNS, epeúti daganatok, primer cutan melanoma

next-generation sequencing, digital PCR, liquid biopsy, tumor-derived cell-free DNA, biliary tract cancers, primer cutan melanoma

13. 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.

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.

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 is segítve munkám sikeres kimenetelét.

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. András Csillának, Dr. Árokszállási Anitának 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 tanulmányaim során.