

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Várvolgyi Tünde**

**Perifériás vér biomarkerek melanoma malignumban**

**DEBRECENI EGYETEM**

**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2026**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Perifériás vér biomarkerek melanoma malignumban**

**Dr. Várvolgyi Tünde**

**Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit**



**DEBRECENI EGYETEM**

**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2026**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés .....	9
3. Célkitűzések.....	18
4. Anyagok és Módszerek.....	19
4.1. Perifériás vér alapú biomarkerek - S100B, LDH, OPN - melanomás betegpopulációkban.....	19
4.1.1. Vizsgálati populáció .....	19
4.1.2. Enzimhez kötött immunszorbens (ELISA) vizsgálatok .....	20
4.1.3. Statisztikai elemzés.....	20
4.2. Az S100B és az LDH diagnosztikus és prognosztikus hatását vizsgáló meta-analízis .....	21
4.2.1. Eltérés a regisztrált protokolltól .....	21
4.2.2. A támogathatósági kritériumok.....	22
4.2.3. Keresési stratégia és a tanulmányok kiválasztása .....	23
4.2.4. Adatkivonatolás .....	23
4.2.5. Az alkalmazhatóság és az elfogultsági kockázat (ROB) értékelése.....	23
4.2.6. Statisztikai elemzés.....	24
4.3. Melanomás betegpopuláció plazma lipidom eltéréseinek elemzése .....	24
4.3.1. Perifériás vérminták .....	26
4.3.2. Standardok és a lipidek extrakciója .....	27
4.3.3. Lipidomikai elemzés .....	28
4.3.4. A lipidek nómenklatúrája .....	30
4.3.5. Statisztikai elemzés.....	30
5. Eredmények.....	32
5.1. Perifériás vérplazma biomarkerek - S100B, LDH, OPN – vizsgálatának eredményei melanomás betegpopulációkban.....	32
5.1.1. Egyváltozós és többváltozós logisztikus regresszió .....	36
5.1.2. Tréning csoport és validációs csoport .....	37
5.1.3. A biomarkerek és a kombinációik diagnosztikus hatása .....	37
5.2. Az S100B és az LDH diagnosztikus és prognosztikus hatásának vizsgálata .....	41
5.2.1. A tanulmányok kiválasztása és a vizsgálatba bevont tanulmányok jellemzői.....	41
5.2.2. A vizsgálatba bevont tanulmányok minőségi értékelése .....	49
5.2.3. Diagnosztikai hatás meta-analízise.....	49
5.2.4. Prognosztikai hatás meta-analízise .....	51
5.3 Melanomás betegpopuláció plazma lipidom eltéréseinek elemzése .....	53

5.3.1. A lipidosztályok eloszlása a metasztázis nélküli és a metasztázissal rendelkező betegek között.....	53
5.3.2. A lipidek és a metasztázisok jelenléte közötti összefüggés melanomás betegeknél .....	55
5.3.3. A melanoma metasztázis limfogén és hematogén útvonalához kapcsolódó lipidek.....	58
5.3.4. A melanomás betegek exitusával összefüggésbe hozott lipidek .....	60
6. Megbeszélés .....	63
6.1. Kutatómunkánk első részében megvizsgáltuk a három perifériás vér biomarker, az LDH, az S100B és az OPN diagnosztikus hatékonyságát a metasztázis, a relapszus detektálásában és ezen eredményeket a meglévő irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze. ....	63
6.2. Az eddigi irodalmi adatokat áttekintve meta-analízissel összehasonlítottuk a szérumban S100B és a szérumban LDH prognosztikai (túlélés predikciója) és diagnosztikai (relapszus predikciója) képességét melanomás betegeknél. ....	69
6.3. További biomarkereket keresve megvizsgáltuk melanomás betegpopulációnk plazma lipidomját 13 lipidosztályra és több mint 1100 lipidre kiterjedő kvantitatív lipidomikai profilalkotó analízissel „state of the art” Lipidyzer™ -t használva. ....	71
Összefoglalás .....	76
Summary .....	78
Irodalmi hivatkozások.....	80
Publikációk.....	89
Kulcsszavak .....	93
Keywords .....	93
Köszönetnyilvánítás.....	94
Appendix.....	95

## Rövidítések jegyzéke

BRAF	szerin/threonin-protein kináz B-Raf proteint kódoló gén
MEK	MAP2K mitogén-aktivált protein 2 kináz gén
LDH	laktát-dehidrogenáz
TNM	tumorméret/nyirokcsomó-áttét/távoli metasztázis
OPN	osteopontin
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
CTCs	circulating tumor cells/cirkuláló tumorsejtek
CTM	circulating tumor microemboli/cirkuláló tumor mikroembólusok
ctDNA	circulating cell-free tumor DNA/cirkuláló sejtmentes tumor DNS
EVs	extracelluláris vezikulák
TEPs	tumor educated platelets/tumorban képződött vérlemezkék
SPP1	szekretált phosphoprotein 1
ETA-1	Early T-lymphocyte Activation 1 protein
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
mRNS	messenger/hírvivő ribonukleinsav
FASN	zsírsav-szintáz
FA	zsírsav
ELISA	enzimhez kötött immunszorbens assay
AJCC	American Joint Committee on Cancer
RT	szobahőmérséklet
EH	esélyhányadosokat
MT	megbízhatósági tartomány
ROC	Receiver Operating Characteristic
AUC	Area Under the Curve/görbe alatti területet
PPV	pozitív prediktív érték
NPV	negatív prediktív érték
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
CHARMS	CHecklist for critical Appraisal and data extraction for systematic Reviews of prediction Modelling Studies

ROB	torzítási kockázat
QUADAS-2	Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies
QUIPS	Quality In Prognosis Studies
HR	hazard risk/veszélyességi kockázat
NM	noduláris melanoma
SSM	felszínesen terjedő melanoma
TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Etikai Bizottság
PET-CT	pozitron emissziós tomográfia
CT	computer tomográfia
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
CE	koleszterinészter
CER	ceramid
DAG	diacilglicerin
DCER	dihidroceramid
FFA	szabad zsírsav
HCER	hexozilceramid
LCER	laktozilceramid
LPC	lizofoszfátidilkolin
LPE	lizofoszfátidiletanolamin
PC	foszfátidilkolin
PE	foszfátidiletanolamin
SM	szfingomielin
TAG	triacilglicerin
ISTD	belső standard módszer
SD	standard deviáció
DMSS	differenciális mobilitási spektrometriai elválasztás
COV	kompenzációs feszültséget
MAPK	mitogén-aktivált proteinkináz
NF- $\kappa$ B	nucleáris faktor kapa B
ERK	extracelluláris szignál által regulált kináz
Chol	koleszterin

ACAT	acilCoA-koleszteril-aciltranszferáz
CRC	colorectal cancer/vastagbélrák
LAL	lizosomális savas lipáz
IHC	immunhisztokémia
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-reductáz
ABCA1	ATP-kötő kazetta A-1
IL-1	interleukin-1
IL-2	interleukin-2

## 1. Bevezetés

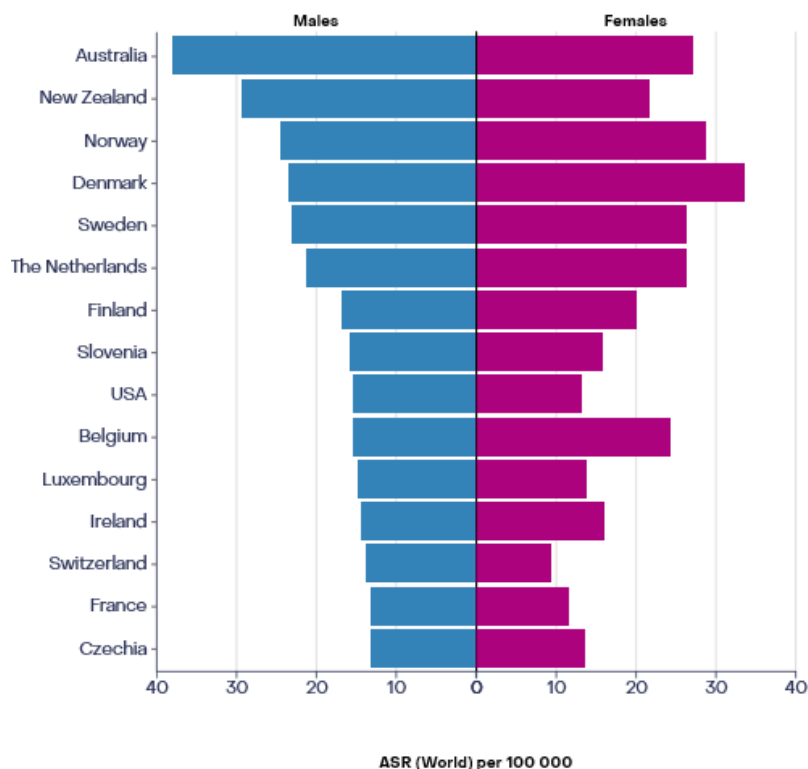
A melanoma malignum az egyik legagresszívabb bőrdaganat, mely világszerte meghatározó népegészségügyi problémát jelent. Előfordulása más cutan malignomákhoz képest viszonylag ritkább, azonban a legtöbb halálozásért felelős típusnak tekinthető. Ennek oka rendkívül gyors áttétképzési hajlama, mutációs rátája és a gyógyszerekkel szembeni fokozott rezisztenciája.

Az áttétes melanoma 5 éves túlélési rátája az elmúlt 15 évben lényegesen javult, ami a target specifikus inhibitor terápiáknak (BRAF és MEK inhibitorok, valamint ezek kombinált alkalmazása) és az immunellenőrzőpont-gátló terápiáknak köszönhető. Napjaink új kezelési eljárásainak és az adjuváns terápiák bevezetésének ellenére az előrehaladott stádiumú és metasztatikus betegek 6.5 éves túlélési rátája alig haladja meg 50 %-ot. A primer daganat korai diagnosztizálása mellett a melanoma relapszus időben történő felismerése jelentősen növeli a betegek túlélését. A mortalitási mutatók javítása érdekében egyre nagyobb az igény könnyen és gyorsan hozzáférhető, a perifériás vérből nyerhető, a relapszus korai detektálására alkalmas biomarkerekre. Klinikai szempontból a perifériás vér alapú vizsgálatok a hagyományos biopsziához képest kevésbé invazív módszerek, melyek alkalmasak nem csak cirkuláló tumor DNS, hanem tumor teherrel, vagy tumor biológiával kapcsolt biomarkerek kimutatására. Ezek a diagnosztikus, illetve prognosztikus célú szérum, vagy plazma biomarkerek optimális esetben hasznosak a terápia hatékonyságának követésére, és prediktívek lehetnek a betegek túlélésére is, továbbá könnyebben és gyorsabban hozzáférhetőek, mint egyes képalkotó technikák. Jelenleg azonban még nincs érvényes konszenzus a perifériás vérvétel szükségességére vonatkozóan melanomás betegek követése során. Az egyetlen 2008-ban végzett meta-analízis szerint az emelkedett szérum S100B szint szignifikánsan rosszabb túléléssel társul melanomás betegeknél. A szérum laktát-dehidrogenáz (LDH) meghatározó prognosztikai marker előrehaladott stádiumú betegeknél, a melanoma TNM (tumorméret/nyirokcsomó áttét/távoli metasztázis) stádium beosztásában is szerepel. A szérum LDH, valamint a szérum S100B

mellett egyre több irodalmi adat utal arra, hogy a plazma osteopontin (OPN) koncentrációja összefüggést mutat a melanoma progressziójával. Jelentős figyelem irányul napjainkban a daganatsejtek megváltozott lipid anyagcseréjének vizsgálatára is, amelynek háttérében az a megfigyelés áll, hogy a tumorsejtek aktívan szintetizálnak és vesznek fel lipideket. Így ezek a vizsgálatok olyan új lipid biomarkerek felismeréséhez vezethetnek, melyek a betegség stádiumáról, a metasztázis predikciójáról nyújthatnak adatokat.

## 2. Irodalmi áttekintés

A melanoma malignum a melanociták rosszindulatú daganata, túlnyomórészt a bőrben alakul ki, az esetek 4-5%-ában más szöveti lokalizációban is megjelenhet, így az uveában, nyálkahártyákon, vagy leptomeningeálisan. Prevalenciája a kaukázusi rasszban az elmúlt 4 évtizedben világszerte jelentősen emelkedett [1]. A GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) 2022-es adatai alapján a melanoma incidenciája a legmagasabb Ausztráliában és Új-Zélandon mind a két nem esetén, ezeket az országokat az észak-európai országok közül Norvégia, Dánia és Svédország követi [2] (1. Ábra).

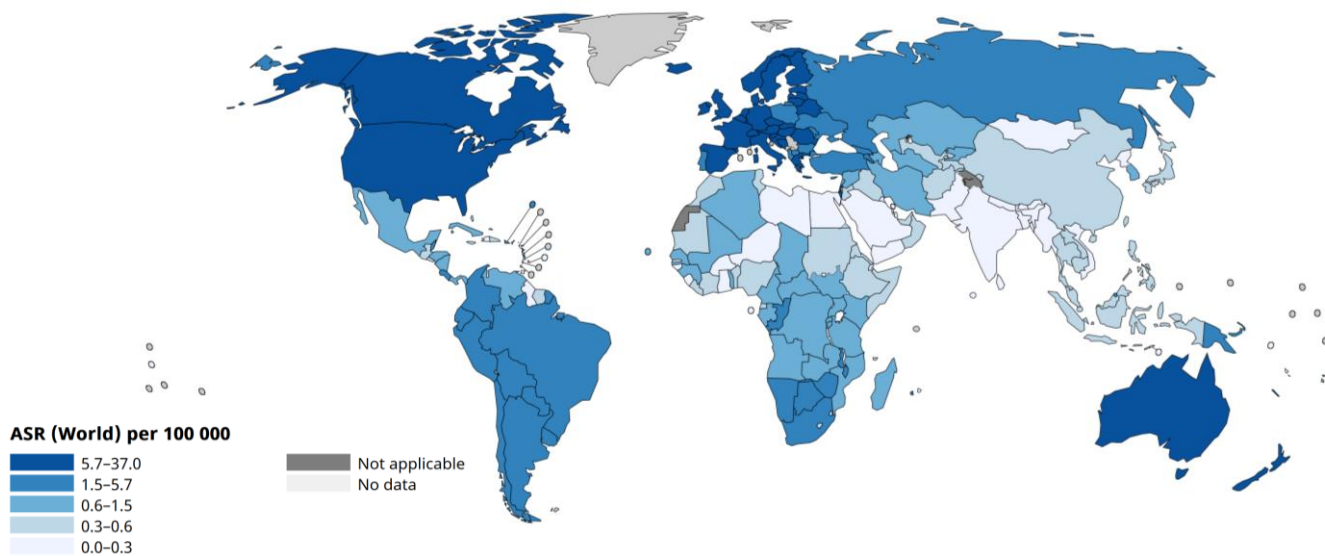


1. Ábra: A malignus melanoma életkorra standardizált incidenciája mindkét nemre

(forrás: <http://gco.iarc.fr/>)

A melanoma életkorra standardizált incidenciája és mortalitása (esetek/100 000/lakos) régióként változik. A 2. és a 3. Ábra az incidenciája és a mortalitása globális eloszlását mutatja be a legújabb GLOBOCAN adatok alapján.

**Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022**  
**Melanoma of skin**

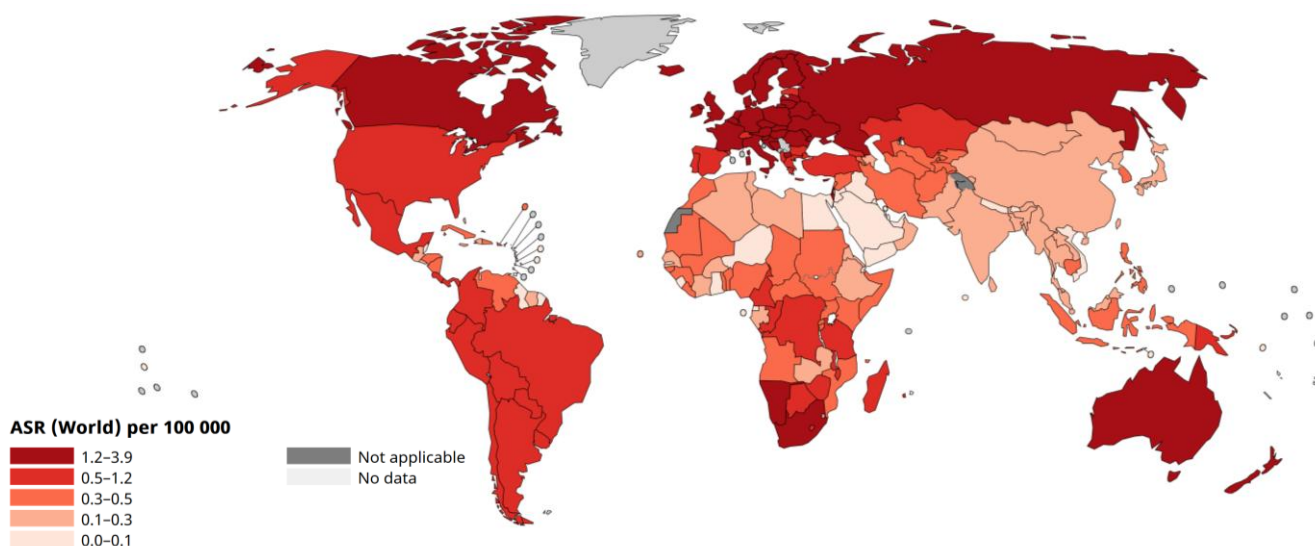


**2. Ábra: A melanoma incidenciája globális eloszlása**

(életkorra standardizált ráta/100,000 lakos, mindkét nemre 2022-ben)

(forrás: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=16>)

**Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Mortality, Both sexes, in 2022**  
**Melanoma of skin**



**3. Ábra: A melanoma halálozás globális eloszlása**

(életkorra standardizált ráta/100,000 lakos, mindkét nemre 2022-ben)

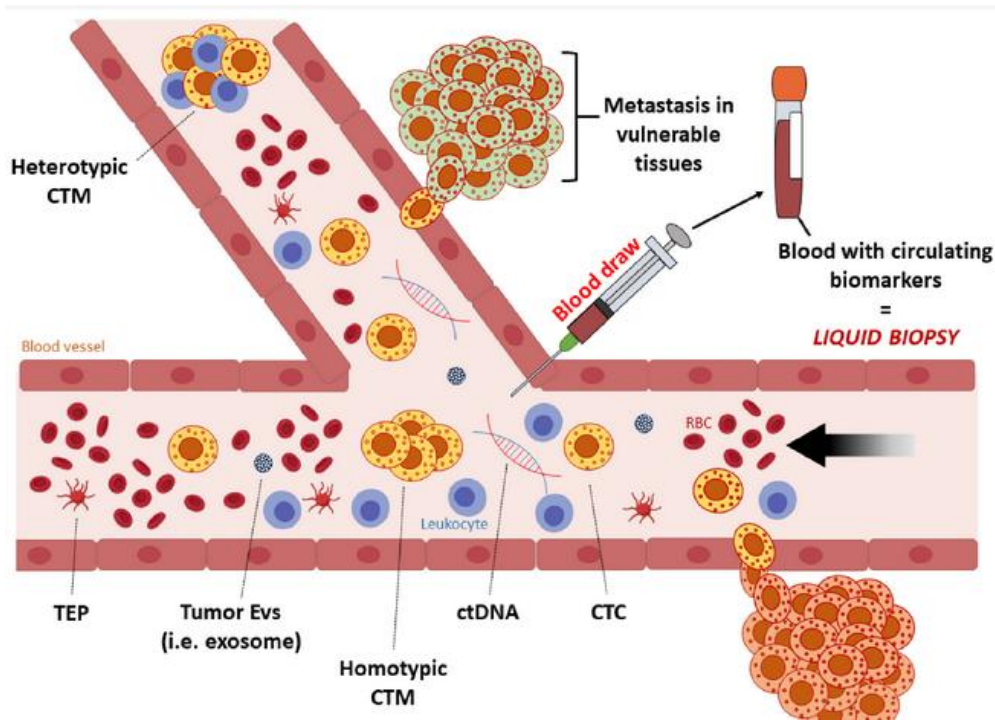
(forrás: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=16>)

Bár az összes rosszindulatú bőrdaganat kevesebb, mint 5%-át teszi ki, a bőrrákkal kapcsolatos halálozások közel 73%-a melanoma miatt következik be [3, 4]. A melanoma malignumról ismert, hogy nagy a nyirokcsomó-, és a hematogén metasztázisok kialakulásának kockázata. A korai áttétek azok, amelyek a diagnózist követő 3 éven belül alakulnak ki, de késői áttétek is előfordulhatnak, akár 10, vagy több év tünetmentesség után is [5]. A primer tumor vastagsága (Breslow-érték) és az ulceráció jelenléte, vagy hiánya a két legfontosabb szövettani prognosztikai paraméter [6].

Bár a figyelemfelkeltő kampányok és a metasztatikus melanoma terápiájának intenzív fejlődése javította a melanoma túlélési esélyeit [7], egyre nagyobb szükség lenne a perifériás vérből könnyen hozzáférhető biomarkerekre, amelyek megkönnyítik a relapszus korai felismerését, így javíthatják a mortalitási mutatókat. A szérumban, vagy plazmában biomarkerek fontos szerepet játszhatnak az áttétes betegség kezelésének tervezésében is, valamint a prognózis előrejelzésében és a terápia hatékonyságának nyomon követésében. A 4. Ábra a perifériás vérben keringő biomarkerek mintavételének és a folyadék biopsziájának a szemantikusan ábrázolását mutatja daganatos betegeknél. Perifériás vérből tehát nem csak keringő tumor DNS, hanem tumor teherrel, vagy tumor biológiával kapcsolatos biomarkerek is nyerhetők [8].

A melanomás betegeknél alkalmazott egyik jól ismert biomarker a szérumban laktát-dehidrogenáz (LDH), amely a melanoma TNM stádium beosztásában is szerepel [5]. Az LDH a legmegbízhatóbb prognosztikai faktornak bizonyult IV. stádiumú melanomák esetében. 2015-ben és 2019-ben Petrelli és munkatársai által végzett két meta-analízisben az emelkedett szérumban LDH prognosztikus hatása szignifikáns volt melanomában [9, 10]. Az LDH koncentrációja szoros korrelációt mutat a tumor méretével és a nekrosis mértékével, ugyanakkor nem specifikus melanomára, mivel más malignus daganatokban is emelkedett lehet a szintje, továbbá malignitástól függetlenül szöveti károsodásban, hemolízist követően, szívinfarktuson átesett,

vagy hepatitises betegekben is [9, 11]. Az LDH szenzitivitása és specificitása nem éri el az S100B fehérjéét.



#### 4. Ábra: A perifériás vér alapú vizsgálatok és a folyadék biopszia sematikus ábrázolása metasztatikus betegeknél

A perifériás vérben keringő biomarkerek lehetnek vérben keringő tumorsejtek, sejtműködés nélküli DNS-ek, különböző szekretált molekulák, extracelluláris vezikulák (exosomák), fehérjék, stb.

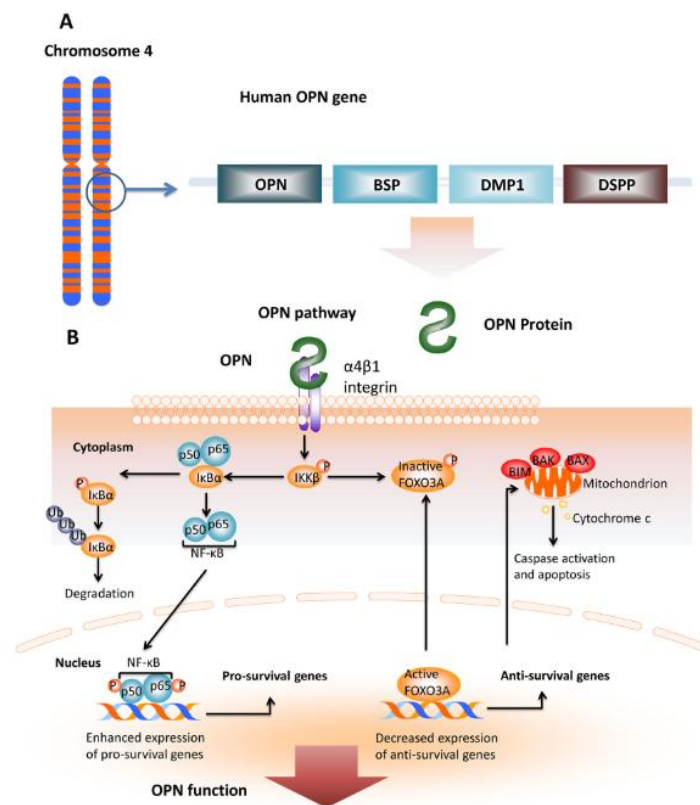
CTCs: circulating tumor cells, CTM: circulating tumor microemboli, ctDNA: circulating cell-free tumor DNA, EVs: extracellular vesicles, TEPs: tumor educated platelets

(forrás: *IJMS* 22; 18;10.3390/ijms22189714)

Az S100B, amely egy kalciumkötő savas citoplazmatikus fehérje, a malignus melanoma szövetben szignifikánsan nagyobb mértékben expresszálódik és szekretálódik, mint az egészséges szövetekben. Az S100B emelkedett szérumszintje az LDH-hoz képest nagyobb specificitással rendelkezik a betegség progressziójára vonatkozóan [12], tükrözi a tumor terhet metasztatizáló betegekben, azonban a szérumszintje számos más betegségben is emelkedett lehet, mint például szív-, és érrendszeri betegségek, májcirrózis, migrén, krónikus

vesebetegség, stroke, vitiligo, emlőrák és SARS-CoV-2 fertőzés esetén [13-15]. Az egyetlen meta-analízisben, amelyben a szérumban S100B szint és a melanoma kapcsolatát vizsgálták, kimutatták, hogy az emelkedett szérumban S100B szint szignifikánsan rosszabb túléléssel járt a melanomás betegeknél [16].

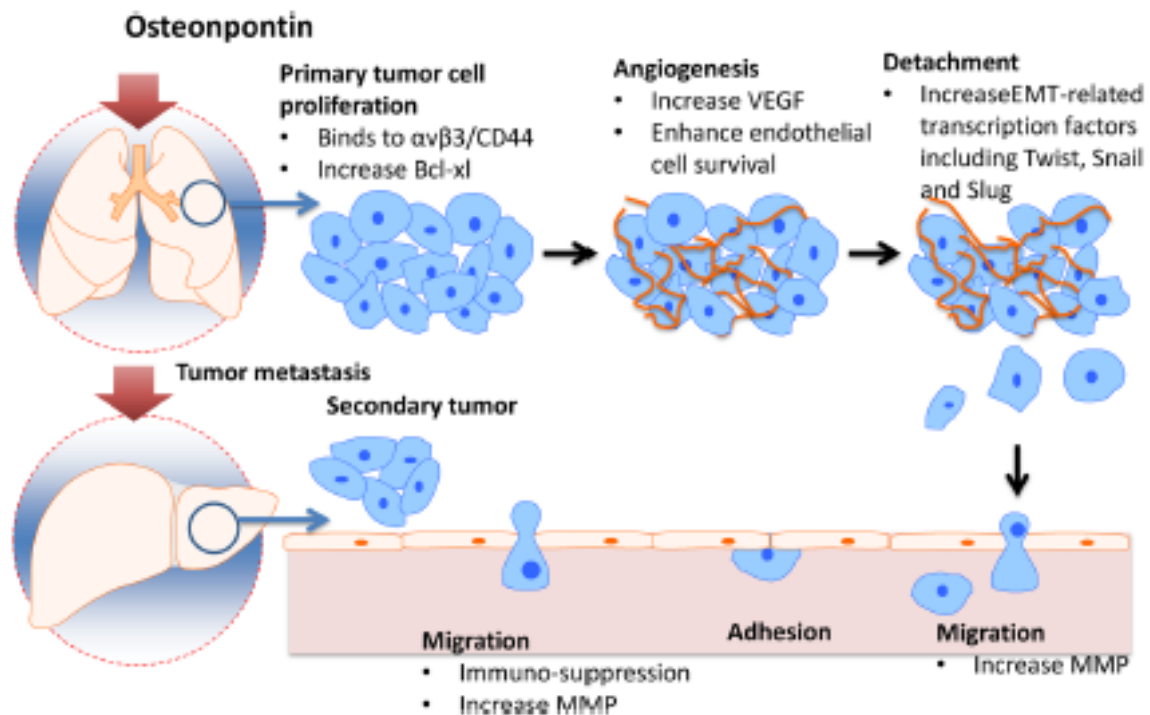
Újabb vizsgálatok szerint az osteopontin (OPN) emelkedett plazma szintje számos daganatnál szoros összefüggést mutat a metasztázisok jelenlétével, ezért ígéretes biomarkernek tartják [17]. Az OPN egy olyan több funkciós extracelluláris mátrixfehérje, mely megközelítőleg 314 aminosavból áll, a kódoló génje 4-es kromoszómán lokalizálódik (más elnevezése secreted phosphoprotein 1 SPP1; Early T-lymphocyte Activation 1 protein: ETA-1) [18] (5. Ábra).



### 5. Ábra: Az OPN gén, fehérje, jelátviteli útvonal és funkció a normál szövetekben

(A) Az OPN kódoló génje a humán 4-es kromoszómán (4q22.1) lokalizálódik. (B) Az OPN jelátviteli útvonala. Az OPN az  $\alpha 4\beta 1$  integrinhez kötődik, az integrinhez való kötődését követően jelátviteli útvonalak aktiválódnak, melyek különféle sejtfunciókat szabályoznak, beleértve a sejtek túlélését/proliferációját, a sejtciklus szabályozását, a sejtek migrációját, az endoteliális-mezenchimális átmenetet, a T-sejtek aktivációját, a citokinek termelését, az angiogenezist, a csont kalcifikációját és mineralizációját.

(forrás: Zhao et al. *Cell Death and Disease* (2018) 9:356).



## 6. Ábra: Az osteopontin szerepe a metasztázisképzés többlépcsős folyamatában

Az OPN túlzott expressziója különböző fehérje mediátorok aktiválásán keresztül a neoplasztikus sejtek metasztázis képzését idézi elő. Az elsődleges tumor vaszkularizációját követően növekedési faktorok, mint például VEGF (vascular endothelial growth factor) szekretálódnak. Ezután a neoplasztikus sejt leválik, majd intravazáció következik be, a tumorsejt belép és kering az érrendszerben. Végül a sejt hozzátapad a vérerek falához, majd extravazációval kilép a vérerekből. A tumorsejt ezután másodlagos tumorként növekszik, metasztázist okozva.

(forrás: Zhao et al. *Cell Death and Disease* (2018) 9:356)

Az OPN fehérjét különböző sejttípusok termelik és számos daganatos megbetegedésben igen magas expresszióját mutatták ki. Emelkedett fehérje-, vagy génexpressziót írtak le emlő-, gyomor-, vastagbél-, hasnyálmirigy-, máj-, tüdődaganatokban és melanómában is. Részletes microarray-analízisek szerint az OPN-nak jelentős szerepe van a melanoma progresszió folyamatában. Az irodalmi adatok alapján az OPN túlzott kifejeződése fokozott tumorinvázióval és metasztázis képzéssel társul [17, 18] (6. Ábra).

Balázs Margit és munkatársai egy korábbi tanulmányukban kimutatták, hogy az OPN-expresszió mRNS és fehérje szinten is megnövekedett vastag melanomákban és az emelkedett expresszió összefüggésbe hozható a tumor felszínének kifekélyesedésével is [19]. Egy újabb közleményükben arról számoltak be, hogy az OPN génexpressziója jelentősen emelkedett a melanoma metasztázisokból származó sejtvonalakban, összehasonlítva a primer melanomákból származó sejtvonalakkal [20]. Egy klinikai vizsgálatban szignifikánsan emelkedett OPN plazma koncentrációt találtak metasztatikus melanomás betegeknél a nem metasztatikus betegekéhez képest [21].

A szérumban tumormarkerek általában különböző mértékben rendelkeznek prognosztikai (túlélés predikciója) és diagnosztikai (relapszus predikciója) tulajdonsággal [22, 23]. Diagnosztikai szempontból a szérumban S100B-szintet számos dermatoonkológiai centrumban használják a betegség relapszusának kimutatására. A szérumban S100B szenzitivitására és specificitására vonatkozó becslések azonban igen eltérőek (32-94%, illetve 76-97%) [24]. Jelenleg nincs érvényes konszenzus a vérvizsgálatok alkalmazására vonatkozóan melanomás betegek követése során a metasztázis, vagy relapszus nyomon követésére [12, 25, 26].

A jelenlegi ismereteink szerint a melanomának van a legnagyobb mutációs rátája az összes malignus daganat közül [27], ami a melanomasejtek és a normál sejtek közötti markáns metabolikus különbségekhez vezet. Ezek a mutációk a metabolikus útvonalak megváltozását eredményezik, amelyek lehetővé teszik a tumorsejtek túlélését a folyamatosan változó környezetben [28].

A neoplasztikus sejtek megváltozott lipidanyagcseréjének kutatása az 1960-as évekre nyúlik vissza, amikor megfigyelték, hogy a tumorsejtek aktívan szintetizálnak és vesznek fel lipideket [29, 30]. Ezt követően felfedezték, hogy az emlőrákban magasan expresszálandó gén a zsírsav-szintáz (FASN) kódolja, amely a lipidanyagcsere egyik kulcsenzime [31]. Azóta számos tanulmány megerősítette, hogy a lipidanyagcsere változásai jelentős folyamatok a tumorok

progressziójában, amelyek nemcsak a tumorsejteket, hanem a tumor mikrokozonyezetének más sejtípusait is, mint például a stroma-, és endotélsejteket is érintik [32-36].

A normál és a tumorsejtek között az egyik fő különbség, hogy a tumorsejtek nagymértékben függnnek a zsírsavak (FA-k) és a koleszterin folyamatos ellátottságától, mivel a folyamatos növekedéshez, proliferációhoz és a metasztázis kialakulásához nagy mennyiségű membránszintézisre van szükségük [37]. Emellett a tumorsejtek, bár megtartják azt a képességüket, hogy a keringésből és a szomszédos zsírszövetből szerezzenek be lipideket, lipidjeik nagy részét de novo is szintetizálják, amit a szükséges enzimek túlréprezentációja is bizonyít [32]. A lipidanyagcsere és a lipidösszetétel változásai értékes biomarkerekként szolgálhatnak különböző malignus megbetegedésekben, így melanomában is [38]. A neoplasztikus és a nem neoplasztikus sejtek lipidprofiljának különbségeit és a lipidanyagcserével kapcsolatos enzimek expressziójának eltéréseit potenciális malignus biomarkerekként azonosították [39]. Emellett a legújabb kutatások a betegség stádiumával, a prognózissal vagy a kezelésre adott válasszal összefüggő specifikus lipidmintázatokat detektáltak [40, 41]. A technológiai fejlődés ma már lehetővé teszi több ezer lipid egyidejű mennyiségi és minőségi jellemzését, ami nagyban megkönnyíti a megváltozott lipidanyagcsere és a kóros folyamatok közötti kapcsolat vizsgálatát [42].

Vizsgálataink során elsődleges célunk volt, hogy új biomarkereket keressünk metasztatikus melanomában. Kísérleteink során a rutin diagnosztikában használt markerek (S100B és LDH) mellett ELISA módszerrel meghatároztuk az új biomarkernek tekinthető OPN plazma koncentrációját melanomás beteg populációnkban. Tekintettel arra, hogy jelenleg sincs konszenzus a vér biomarkerek alkalmazására vonatkozóan melanomás betegekben, ezért a jól ismert két melanoma marker, az S100B és az LDH diagnosztikus és prognosztikus tulajdonságát meta-analízissel hasonlítottuk össze átnézve az ezzel kapcsolatos irodalmat.

A lipidanyagcsere változásai és a lipogén fenotípus kialakulása a neoplasztikus sejtek egyik legkorábbi biokémiai jellemzőjeként jelenik meg, valamint a melanoma metabolikus viselkedését vizsgáló tanulmányok kimutatták, hogy az ilyen fenotípusos plaszticitás adaptív előnyöket biztosít a daganat sejtek proliferációjának és a túlélésnek kedvezve. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a melanomás betegeknél a metasztázis jelenléte milyen összefüggést mutat a lipidprofil változásával. Kísérleteink ezen szakaszában „state of the art” Lipidyzer™ platform segítségével elemeztük metasztázisos és metasztázis-mentes melanomás betegek vérplazmájából nyert lipid összetételt.

### 3. Célkitűzések

Célunk volt perifériás vér alapú vizsgálatok kivitelezése melanomában szenvedő betegek vérplazmájának felhasználásával. Ezen kívül hagyományos, a klinikumban már alkalmazott biomarkerek és új biomarkerek diagnosztikus hatékonyságának összehasonlítása.

Vizsgálataink az alábbi 3 területre irányultak:

- **Kutatómunkánk egyik célja az volt, hogy megvizsgáljuk a három perifériás vér biomarker, az LDH, az S100B és az OPN diagnosztikus hatékonyságát melanomás beteg populációnkban, összehasonlítva a meglévő irodalmi adatokkal a metasztatikus betegség azonosítására vonatkozóan.**
- **Az eddigi irodalmi adatokat áttekintve meta-analízissel összehasonlítsuk a szérum S100B és a szérum LDH prognosztikai (túlélés predikciója) és diagnosztikai (relapszus predikciója) képességét melanomás betegekben.**
- **Továbbá célunk volt, hogy melanomás beteg populációnkot vizsgálva egy korszerű, 13 lipidosztályra és több, mint 1100 lipidre kiterjedő kvantitatív lipidomikai profilalkotó Lipidyzer™ platformon kapott eredményeinket felhasználva a melanoma plazma lipidom és a betegek klinikai paraméterei között keressünk összefüggéseket.**

## **4. Anyagok és Módszerek**

### **4.1. Perifériás vér alapú biomarkerek - S100B, LDH, OPN - melanomás betegpopulációkban**

#### *4.1.1. Vizsgálati populáció*

Kutatómunkánk egyik részében a retrospektív vizsgálatba 2019. április 4. és 2022. szeptember 22. között összesen 206 melanomás beteget vontunk be. A vizsgálathoz az adatokat a Debreceni Egyetem klinikai adatbázisából (MedSolution és UDMED) nyertük. A vizsgálatot az Orvosi Kutatói Tanács Etikai Bizottsága hagyta jóvá (igazolás száma: IV/1711-4/2021/EKU). A betegek adatait, beleértve az életkort és a nemet, a primer melanoma szövettani altípusát, a Breslow-féle tumorvastagságot, az ulcerációra vonatkozó adatot, a primer tumor lokalizációját, a Clark-féle invazió szintjét, a 8. kiadású American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM-osztályozása [6] szerinti primer tumor (T) stádiumát (pT-stádium), valamint szérumszintű S100B- és LDH-szinteket rögzítettük. A perifériás vérmintákat 206 melanomás betegtől gyűjtöttük (metasztázis nélküli N=120 – metastázissal rendelkező N=86). Az S100B (kemilumineszcens immunoassay LIAISON® S100) és az LDH (automatizált kolorimetriás próba) szérumszintjét rutinszerűen rögzítettük a betegek követése során. A metastatikus csoportba tartozó betegeknél a vérvétel időpontját megelőző egy hónapon belül PET-CT-vel, vagy három régiós CT-vel, és/vagy lágyrész ultrahanggal diagnosztizáltuk a betegséget. A metastatikus melanoma csoportba tartoztak: 1. olyan betegek, akik még nem kaptak metastatikus melanoma elleni gyógyszert, de igazolt áttétük volt, 2. BRAF plusz MEK-gátló, vagy immunellenőrzőpont-gátló terápiában részesülő metastatikus betegek. Az áttét nélküli csoportba tartoztak: 1. a primer melanoma eltávolítását követően áttéktől mentes betegek, vagy 2. gyógyszeres kezelést követően teljes remisszióval rendelkező betegek, vagy 3. a nyirokcsomó blokkdisszekciót követően áttéktől mentes betegek.

#### *4.1.2. Enzimhez kötött immunszorbens (ELISA) vizsgálatok*

A plazma osteopontin fehérjeszintjét ELISA-technikával határoztuk meg a kereskedelmi forgalomban kapható humán OPN Quantikine ELISA Kit (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA, Catalog#: DOST00) segítségével. A kit vizsgálati tartománya 0,3 - 20 ng/ml, érzékenysége 0,024 ng/ml. A vizsgálatot a gyártó protokolljának megfelelően végeztük el. A plazmamintákat 25x-ére hígítottuk kalibrátor hígítóval. Először 100 µl Assay Diluent-et adtunk minden egyes „mikrolemez” lyukba, minden mintához 50 µl osteopontin standardot vagy mintát adtunk és 2 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten (RT). A mikrolemez mosását (4X) követően 200 µL humán OPN-konjugátumot adtunk minden egyes mélyedésbe és 2 órán át inkubáltuk RT-n. Ezután a mosási lépéseket megismételtük (4X), és 200 µL szubsztrátoldatot adtunk minden egyes mintához. A mintákat 30 percig inkubáltuk RT-en sötétben, majd 50 µL Stop Solution-t adtunk minden egyes mintához. Végül a minták abszorpcióját 540 nm-en határoztuk meg Epoch™ mikrolemez spektrofotométerrel (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

#### *4.1.3. Statisztikai elemzés*

Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszt segítségével határoztuk meg. A kategorikus változók elemzésére  $\chi^2$ -tesztet vagy Fisher exact tesztet alkalmaztunk. Normál eloszlás esetén a folytonos változók összehasonlítására független t-próbát (kétmintás t-próba), míg nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk a két csoport összehasonlítására.

A diagnosztikai hatást vizsgáló modell létrehozásához egyváltozós és többváltozós logisztikus regressziós elemzést végeztünk. Az esélyhányadosokat (EH) a hozzá tartozó 95%-os alsó és felső megbízhatósági tartománnyal tüntettük fel (95% MT). A melanomás betegek random módon lettek elosztva 2:1 arányban tréning és validációs csoportra a diagnosztikai modell ellenőrzése céljából. A tréning és validációs csoportok esetében az áttét jelenlétének vagy

hiányának megkülönböztetésére szolgáló optimális határértékeket a vizsgált változóink esetében, illetve a változók kombinációban való alkalmazásakor a Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe elemzésével számítottuk ki. Az optimális határértéket a maximális Youden-index segítségével határoztuk meg. A ROC-görbéből származtatott görbe alatti területet (AUC) 95%-os megbízhatósági tartománnyal (95% MT) számoltuk ki. Az alkalmazott változónk vagy azok kombinációinak a pontosságát az AUC méri, mely a következőképpen kategorizálható: 0,5-0,6- elégtelennek mondható, a 0,7-0,8-as érték elfogadhatónak, a 0,8-0,9-es érték kiválónak, a 0,9-nél nagyobb érték pedig kiemelkedőnek minősül. Továbbá kiszámításra került a szenzitivitás, a specificitás, a pozitív prediktív érték (PPV), a negatív prediktív érték (NPV) és a diagnosztikai pontosság is a hozzá tartozó 95%-os konfidencia intervallumokkal együtt.

A szignifikancia szint minden esetben  $p < 0,05$  volt. A statisztikailag szignifikáns különbségeket \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  és \*\*\*  $p < 0,001$  jelöli. A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS Statistics for Windows 25.0 verziójával (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA) és az R szoftverrel (3.6.4 verzió; R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) végeztük.

#### **4.2. Az S100B és az LDH diagnosztikus és prognosztikus hatását vizsgáló meta-analízis**

Kutatómunkák meta-analízis részében a szisztematikus áttekintést és meta-analízist a Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) nyilatkozatnak [43-45] megfelelően jelentettük. A vizsgálati protokollt regisztráltuk a PROSPERO nyilvántartásban (PROSPERO; CRD42019137138).

##### *4.2.1. Eltérés a regisztrált protokolltól*

Nem terveztünk alcsoport-elemzést. Azonban az egyik bevonásra alkalmas elsődleges diagnosztikai hatásvizsgálatban uvealis melanómás betegek szerepeltek, az összes többi beteg cutan melanómás volt. Mivel az uvealis és a cutan melanoma patogenezise különbözik, a

kvantitatív elemzést azokkal a tanulmányokkal végeztük el, amelyekben cutan melanomás betegek szerepeltek. Ezen kívül diagnosztikai hatás meta-analízist is végeztünk, amelybe az uvealis melanomás betegeket tartalmazó tanulmányt is bevontuk.

#### *4.2.2. A beválaszthatósági kritériumok*

A felülvizsgálati kérdéseket a PICOTS-rendszer segítségével fogalmaztuk meg a CHARMS (CHECKlist for critical Appraisal and data extraction for systematic Reviews of prediction Modelling Studies) alapján, amelyet a diagnosztikai hatásvizsgálatok és a prognosztikai faktoros vizsgálatok felülvizsgálatára adaptáltunk [45]. A kérdéseket úgy fogalmaztuk meg, hogy meghatározzuk, hogy az emelkedett szérumszintű S100B megbízhatóbb marker-e a melanoma relapszus előrejelzésében, mint az emelkedett szérumszintű LDH a melanoma különböző stádiumaiban szenvedő betegeknél, és, hogy az emelkedett szérumszintű S100B megbízhatóbb marker-e a halálozási kockázat és a túlélési arány előrejelzésében metasztatikus melanomában, mint az emelkedett szérumszintű LDH. A vizsgálatba olyan tanulmányokat vontunk be, amelyek képalkotó és/vagy szövettani vizsgálattal megerősített relapszus esetén S100B és LDH szintekről adtak információt, illetve az S100B, és LDH tekintetében 1 és 2 éves túlélési adatok, valamint a halálozási kockázatra vonatkozó adatok rendelkezésre álltak. A kiválasztott prediktoroknak (S100B és LDH) a ROC görbék és a Cox-féle többváltozós proporcionális veszélyességi modell alapján meghatározó tanulmányokat vontunk be. A korrekciós tényezők készlete különbözött az egyes elsődleges prognosztikai tanulmányokban. Előzetes specifikációinknak megfelelően az elemzésbe bevont tanulmányok e tényezők minimális készletét használták: LDH és S100B, valamint legalább egy további bevett prognosztikai marker, pl. az áttétek helye vagy az agyi áttétek jelenléte. Amennyiben a vizsgálatba bevont betegek terápiában részesültek, akkor a kezeléssel is korigált Cox-modell eredményeit választottuk.

#### *4.2.3. Keresési stratégia és a tanulmányok kiválasztása*

A MEDLINE, az Embase és a Cochrane Central Register of Controlled Trials adatbázisában szisztematikusan kerestünk a kezdettől egészen 2021. január 15-ig. A keresés csak angol nyelvű tanulmányokat tartalmazott. A kereséshez csak a kérdéses prediktív tényezőket és a célzott betegséget használtuk kulcsszóként és kifejezéseként, beleértve az S100B vagy S100 és laktát-dehidrogenáz vagy LDH és melanoma a MEDLINE-ban (a PubMed-en keresztül), valamint a melanoma és S100B és laktát-dehidrogenáz az Embase-ban és a Cochrane Central Register of Controlled Trials-ban.

#### *4.2.4. Adatkivonatolás*

Az adatkivonatolás során a CHARMS ajánlásait követtük [45]. A meta-analízishez, az alkalmazhatóság értékeléséhez és a torzítás kockázathoz szükséges tételeket Excel-táblázatokba gyűjtöttük a szokásos módon. Kivontuk az első szerzőt és a tanulmány felépítését, a tanulmányt végző országot és a publikálás évét, a populáció méretét (metasztázissal és anélkül, ha volt ilyen), a betegek bevonási- és kizárási kritériumait, a demográfiai adatokat (életkor, nem), az S100B és LDH mérés módszerére és határértékére, valamint a referenciatesztre vonatkozó információkat, a Cox-modellekben használt kiindulási prognosztikai tényezőket és a kimeneti adatokat. A keresés, a tanulmányok kiválasztása és az adatok kinyerése a vizsgálók között egymástól függetlenül történt, amelyet megbeszélés és konszenzus követett.

#### *4.2.5. Az alkalmazhatóság és a torzítás kockázat (ROB) értékelése*

A tanulmányok minőségének értékelése a vizsgálók részéről egymástól függetlenül zajlott, a konszenzust a primer tanulmányok áramlási diagramjai segítették elő. A ROB és a diagnosztikai pontossági vizsgálatok alkalmazhatóságával kapcsolatos aggályok értékelésére a QUADAS-2 (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies) eszközt használtuk [46]. A

prognosztikai tényezőkkel kapcsolatos tanulmányok ROB-ját a Quality In Prognosis Studies (QUIPS) eszközzel [47] értékeltük.

#### 4.2.6. Statisztikai elemzés

A vizsgálatok közötti heterogenitást az  $I^2$  statisztika segítségével értékeltük, ahol az  $I^2 = 100\% \times (Q - df)/Q$ , és a heterogenitás nagyságát jelzi (mérsékelt: 30-60%; jelentős: 50-90%; jelentős: 75-100%) [48]. Az összesített becsléseket (AUROC 95%-os megbízhatósági tartománnyal, szenzitivitás, specificitás, korrigált HR (hazard risk – veszélyességi kockázat) 95%-os megbízhatósági tartománnyal, túlélési arányok (1 év, 2 év) 95%-os megbízhatósági tartománnyal) DerSimonian-Laird véletlenszerű hatású modell segítségével számítottuk ki [49]. A publikációs torzítás jelenlétének megállapítására tölcsérdiagramokat és Egger-teszteket alkalmaztunk. A statisztikai elemzéseket a Stata 16.1 adatelemző és statisztikai szoftverrel (Stata Corp LLC, College Station, TX, USA) és az R csomag 4.0.3 verziójával végeztük (R Foundation for Statistical Computing).

### 4.3. Melanomás betegpopuláció plazma lipidom eltéréseinek elemzése

Kutatómunkánk harmadik részében a melanomás betegek plazma lipidom vizsgálatába 151 beteget vontunk be. 83 beteg áttétmentesnek minősült, mivel a vérvétel előtt egy hónapon belül készült CT, vagy PET-CT vizsgálat áttétmentességet igazolt. Ezen kívül 68 betegnek metasztatikus melanómája volt a vérvétel időpontjában. A betegek között 84 férfi (56%) és 67 (44%) nő volt, a medián életkoruk 61,91 év (29-84 év). A 84 férfi beteg (55,6%) közül 45-nél (53,5%) diagnosztizáltunk metasztatikus melanomát (11 betegnél regionális nyirokcsomó metasztázist, 34 betegnél távoli áttétet), a női betegek között pedig (n = 23) 34,3%-nak volt metasztázisa a vérvétel pillanatában (8 betegnek regionális nyirokcsomó metasztázis, 15 betegnek távoli áttét) (1. Táblázat). A metasztatikus csoportba tartozó betegeknél a vérvétel időpontját megelőző egy hónapon belül PET-CT-vel, vagy három régiós CT-vel, és/vagy

lágyrész ultrahanggal diagnosztizáltuk a betegséget. A metasztatikus melanoma csoportba tartoztak: 1. olyan betegek, akik még nem kaptak metasztatikus melanoma elleni gyógyszert, de igazolt áttétük volt, 2. BRAF plusz MEK-gátló, vagy immunellenőrzőpont-gátló terápiában részesülő metasztatikus betegek. Az áttét nélküli csoportba tartoztak: 1. a primer melanoma eltávolítását követően áttéktől mentes betegek, vagy 2. gyógyszeres kezelést követően teljes remisszióval rendelkező betegek, vagy 3. a nyirokcsomó blokkdisszekciót követően áttéktől mentes betegek. A távoli áttétek főként a tüdőt, az agyat, a májat vagy a vesét érintették. A metasztatikus melanomás betegeket két csoportba soroltuk az áttétképződés útvonala szerint: limfogén és hematogén. Regionális nyirokcsomó metasztázis 19 betegnél volt jelen, távoli metasztázisokat 49 betegnél észleltünk a vérvétel időpontjában. A vérvétel időpontjában tumormentesnek tekintett betegek primer melanomájának típusai cutan (98,7%), 2 primer tumor pedig choroidális melanoma volt. Fontos megjegyezni, hogy az előrehaladott áttétes betegek szinte mindig regionális nyirokcsomó érintettséget is mutattak, ami kihívást jelentett a két csoport teljes elkülönítése szempontjából. A primer tumor Breslow-féle vastagsága 40 tumorban  $\leq 2$  mm, 74 tumorban pedig 2 mm-nél nagyobb volt. A melanomás betegek klinikai paramétereit az 1. Táblázat tartalmazza.

## 1. Táblázat: Melanomás betegek klinikai paraméterei

	Betegek száma (%)	Metasztázis jelen van (%)	A vérvétel pillanatában a kezelés		
			Nem volt kezelés (%)	Immunterápia <sup>a</sup> (%)	Célzott terápia <sup>b</sup> (%)
Összes beteg	151 (100)	68 (45,0)	64 (43,4)	64 (43,4)	23 (15,2)
<b>Nem</b>					
Nő	67 (44,4)	23 (34,3)	31 (46,2)	27 (40,3)	9 (13,4)
Férfi	84 (55,6)	45 (53,6)	33 (33,3)	37 (44,0)	14 (16,7)
<b>Kor (évek) (átlag életkor: 61,91)</b>					
20–50	28 (18,5)	8 (28,6)	14 (50,0)	9 (32,1)	5 (17,9)
≥50	123 (81,5)	60 (48,8)	50 (40,7)	55(44,7)	18 (14,6)
<b>Metasztázis</b>					
Nincs jelen	83 (55,0)	83 (55,0)	53 (63,9)	22 (26,5)	8 (9,6)
Jelen van	68 (45,0)	68 (45,0)	11 (16,2)	42 (61,8)	15 (22,1)
<b>Metasztázis útvonala</b>					
Limfogén (csak regionális nyirokcsomó áttét)	19 (12,6)				
Hematogén (távoli áttét)	49 (32,5)				
<b>Betegek túlélése (3 éves követés)</b>					
Élő	129 (85,4)				
Elhunyt	22 (14,6)				

<sup>a</sup>Immunterápia: OPDIVO® (nivolumab); OPDIVO® (nivolumab) + YERVOY® (ipilimumab); Keytruda (pembrolizumab)

<sup>b</sup>Célzott terápia: TAFINLAR® (dabrafenib)+MEKINIST® (trametinib); Zelboraf (vemurafenib) + COTELLIC® (cobimetinib)

### 4.3.1. Perifériás vérminták

A vérmintákat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Bőrgyógyászati Klinikáján vettük. A vérvételre legalább egy hónappal a daganat sebészi eltávolítása után került sor. Minden vérmintát a vérvétel után egy órán belül feldolgoztunk. A vért EDTA-t tartalmazó BD Vacutainer® vénás vérvételi csövekbe (kat. sz. 367525) gyűjtöttük, és 15 ml-es falcon csövekbe öntöttük át, majd 4°C-on, 3000 rpm-en, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót ezután óvatosan 2 ml-es Eppendorf-csövekbe pipettáztuk, és 4°C-on (16 000 fordulat/perc) 10 percig centrifugáltuk. A mintákat száraz jégen szállítottuk a Népegészség- és Járványtani Intézetbe, és későbbi felhasználásig -80°C-on tároltuk. Valamennyi vérmintát a Debreceni Egyetem szabályai és előírásai szerint kezeltünk, az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és

Kutatás-étiikai Bizottságának jóváhagyásával (TUKEB 17876-2018/EKU és BMEÜ/715-1/2022/EKU).

#### 4.3.2. Standardok és a lipidek extrakciója

A metanolt, 2-propanolt, diklórmétánt, HPLC minőségű H<sub>2</sub>O-t, ammónium-acetátot a VWR International, LLC-től (Radnor, Radnor, PA, USA) vásároltuk. Mindegyik HPLC minőségű volt. A humán minták kvantitatív lipidomikai elemzéséhez szükséges belső standard (ISTD) kiteket az AB Sciex Germany GmbH-től (Darmstadt, Németország) szereztük be. A kitek 13 lipidosztályhoz tartalmaznak belső standardokat, beleértve koleszterinésztereket (CE), ceramidokat (CER), diacilglicerineket (DAG), dihidroceramidokat (DCER), szabad zsírsavakat (free fatty acid - FFA), hexozilceramidokat (HCER), laktozilceramidokat (LCER), lizofoszfátidilkolinokat (LPC), lizofoszfátidiletanolaminokat (LPE), foszfátidilkolinokat (PC), foszfátidiletanolaminokat (PE), szfingomielineket (SM), triacilglicerineket (TAG).

Az izotóp-jelölt lipidmolekulákat tartalmazó ISTD standard keverékek összetételét egy tanulmányban részletesen összefoglalták [50] [30227635]. A minőségellenőrző plazmakészletekkel ellátott ún. „spike”-standardokat, SelexION tuning-készleteket és rendszeralkalmassági teszt-készleteket szintén az AB Sciex Germany GmbH-től szereztük be.

A lipideket melanómás betegek plazmájából módosított Blich-Dyer-módszerrel [42, 51] vontuk ki. Röviden, 100 µl plazmát 900 µl HPLC minőségű H<sub>2</sub>O -val, 2000 µl metanollal és 900 µl diklórmétánnal kevertük össze üveg centrifugacsövekben, majd 5 másodpercig kevertettük. A minőségi kontroll mintát a következőképpen készítettük el: 100 µL plazmát (QC) 900 µL HPLC minőségű H<sub>2</sub>O-val, 2000 µL metanollal és 900 µL diklórmétánnal kevertünk össze egy üvegcentrifugacsöben, majd 5 másodpercig vortexeltük. Belső standard minta előkészítése: 50 µL minőség-ellenőrzési belső standardot (QC belső) 100 µL QC-vel, 900 µL HPLC minőségű H<sub>2</sub>O-val, 2000 µL metanollal és 900 µL diklórmétánnal kevertünk egy külön

üvegcentrifugacsőben és 5 másodpercig vortexeltük. A háttér FA-szennyeződés kompenzálására egy vakmintát is készítettünk úgy, hogy 1000 µl HPLC minőségű vizet, 2000 µl metanolt és 900 µl diklórometánt kevertünk össze egy üvegcentrifugacsőben, és 5 másodpercig vortexeltük. Ezután 100 µL ISTD-keveréket adtunk minden egyes mintához (plazmaminták, QC minta, QC belső standard minta és vakminta), 5 másodpercig kevertettük, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. Az inkubációt követően 1000 µL HPLC minőségű H<sub>2</sub>O-t és 900 µL diklórometánt adtunk a mintákhoz. A mintákat 5 másodpercig vortexeltük, majd 20 °C-on 10 percig centrifugáltuk (1000 g). A centrifugálást követően a mintákat szerves (alsó fázis) és vizes fázisra (felső fázis) választottuk szét. A lipid extraktumokat tartalmazó szerves fázisokat külön üvegcsővekbe pipettáztuk. A maradék lipidek extrakciójához az extrakciót megismételtük úgy, hogy 1800 µl diklórometánt adtunk az egyes minták vizes fázisához. Ezután a mintákat 5 másodpercig vortexeltük, majd 1000 g-nél, 20 °C-on 10 percig centrifugáltuk, hogy ismét szerves és vizes fázisra váljanak szét. A szerves fázisokat ismét összegyűjtöttük és egyesítettük az előző extraktumokkal. Ezt követően az extraktumokat nitrogénáram alatt teljesen megszáritottuk, majd a Sciex szakértői által kidolgozott standard protokollban [51] leírtak szerint 250 µl diklórometán és metanol oldat 1:1 arányú, 10 mM ammónium-acetátot tartalmazó keverékében állítottuk vissza. Végül a mintákat a lipidomikai elemzéshez kis üvegekbe pipettáztuk át.

#### *4.3.3. Lipidomikai elemzés*

A lipidminták elemzését elektropray ionizációs tandem tömegspektrométerhez (HPLC ESI-MS-MS) kapcsolt HPLC-vel végeztük el, ahogyan az korábban közlésre került [42, 50]. A Lipidizer a Debreceni Egyetem ÁOK Népegészség- és Járványtani Intézetében állt rendelkezésre, a méréseket Dr. Szász István, Dr. Szűcs Sándor és Dr. Pál László végezte el. A lipidomikai elemzéshez a Nexera X2 HPLC-ből (Shimadzu Germany GmbH, Duisburg, Németország) és egy SelexION technológiával felszerelt Sciex QTRAP 5500 rendszerből (AB

Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Németország) álló Lipidyzer platformot használtuk. A  $750 \times 0,05$  mm-es és  $350 \times 0,05$  mm-es nanoViper kapilláriscsöveket (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) használtunk a HPLC automatikus mintavevő szelep és az ESI ionizációs forrás földelőcsatlakozása, illetve a földelőcsatlakozás és az ESI elektróda ( $65 \mu\text{m}$  belső átmérőjű) összekapcsolására. Az  $50 \mu\text{l}$  extrahált lipidminta bevitele áramlásos injektálással történt  $7 \mu\text{l}/\text{perc}$  áramlási sebességgel. A mintafuttató oldat diklórmetán és metanol 1:1 arányú keveréke volt, amely  $10 \text{ mM}$  ammónium-acetátot tartalmazott. A minta átvitelét minimálisra csökkentettük a nanoViper kapilláriscsövek nulla holt térfogatának használatával, és a kapillárisokat minden egyes injektálás után 2 percig  $30 \mu\text{l}/\text{perc}$  áramlási sebességgel diklórmetán és metanol 1:1 arányú keverékével mostuk át. Minden mintát kétszer mértünk, először SelexION differenciális mobilitási spektrometriai elválasztással (DMSS), majd anélkül. A teljes futási idő 21 perc volt, beleértve az injektor minden futás előtti mosásának, az  $50 \mu\text{l}$  minta injektálásának és az elektródra pumpálásának, a pozitív/negatív ion módban történő mérésnek, valamint a kapilláriscső mosásának időtartamát minden futás után. A DMSS elve az, hogy minden lipidosztály sajátos fejcsoport-dipólusmomentummal rendelkezik, ami a különböző lipidmolekulákból származó ionok mobilitásában különbségeket eredményez, amikor egy adott kompenzációs feszültséget (COV) alkalmazunk. A lipidosztályok szekvenciális elemzése a Lipidyzer platform differenciális mobilitási egységében a COV megváltoztatásával érhető el. A DMSS javítása érdekében a függönygázhoz kémiai módosítónaként 1-propanolt adtunk. A lipidomikai elemzéseket a következő DMSS-beállításokkal végeztük: hőmérséklet: alacsony, elválasztó feszültség:  $3,5 \text{ kV}$ , és differenciális mobilitás spektrometriai felbontás: alacsony. A lipidek kimutatására és mennyiségi meghatározására többszörös reakciómonitorozást és a pozitív és negatív ionizáció közötti váltást alkalmaztunk. A negatív ionizációt DMSS-szel együtt használtuk a PC-k, PE-k és LPC-k mérésére, és DMSS nélkül az FA-k meghatározására. Pozitív ionizációt alkalmaztunk DMSS-

szel az SM-ek elemzéséhez és DMSS nélkül a TG-ek, DG-ek, CE-ek és Cers-ek méréséhez. A következő tömegspektrométer (MS) beállításokat használtuk: függőgáz: 17, ütközéssel aktivált disszociációs gáz: közepes, ionpermetezési feszültség: 4,1 kV pozitív ionizációs módban és -2,5 kV negatív ionizációs módban, hőmérséklet: 200 °C, porlasztógáz: 17 és fűtőgáz: 25. Minden egyes, 8 plazmamintát tartalmazó tételben QC és QC spike minták szerepeltek. A rendszer vezérlése, az adatgyűjtés és az elemzés automatikusan történt a Lipid Workflow Manager szoftverrel (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Németország). A lipidek koncentrációját nmol/gramm plazmaértékben kaptuk meg automatikusan. Az adatok minőségének biztosítása érdekében a differenciális mobilitási egységet, a nyíláslemezt és a QJet Ion Guide-ot hetente kézzel tisztítottuk diklórmetán és metanol 1:1 arányú keverékével. A tisztítást követően a differenciálmobilitási egységet egy SelexION kit segítségével hangoltuk, és elvégeztük a rendszer alkalmassági tesztjét.

#### *4.3.4. A lipidek nómenklatúrája*

Ebben a vizsgálatban a Lipid Maps Consortium által javasolt lipid-nómenklatúrát használtuk [52]. A három zsírsavláncot tartalmazó TG fajokat az egyik zsírsavláncban lévő szénatomok és kettős kötések számával és a fennmaradó két zsírsavláncban lévő szénatomok és kettős kötések számának összegével jelöltük, például TG 20:4\_33:1. Az egy vagy két zsírsavláncot tartalmazó egyéb lipideket az egyes zsírsavláncokban lévő szénatomok és kettős kötések számaként mutattuk be, például CE 14:0 (egy zsírsavláncot tartalmaz kettős kötés nélkül) és PC 18:1\_18:1 (két zsírsavláncot tartalmaz, mindkettő egy kettős kötéssel).

#### *4.3.5. Statisztikai elemzés*

Az adatok normalitásának értékelésére a Shapiro-Wilk-tesztet alkalmaztuk. Az adatok elemzéséhez nemparametrikus módszereket és logisztikus regressziós modelleket alkalmaztunk.

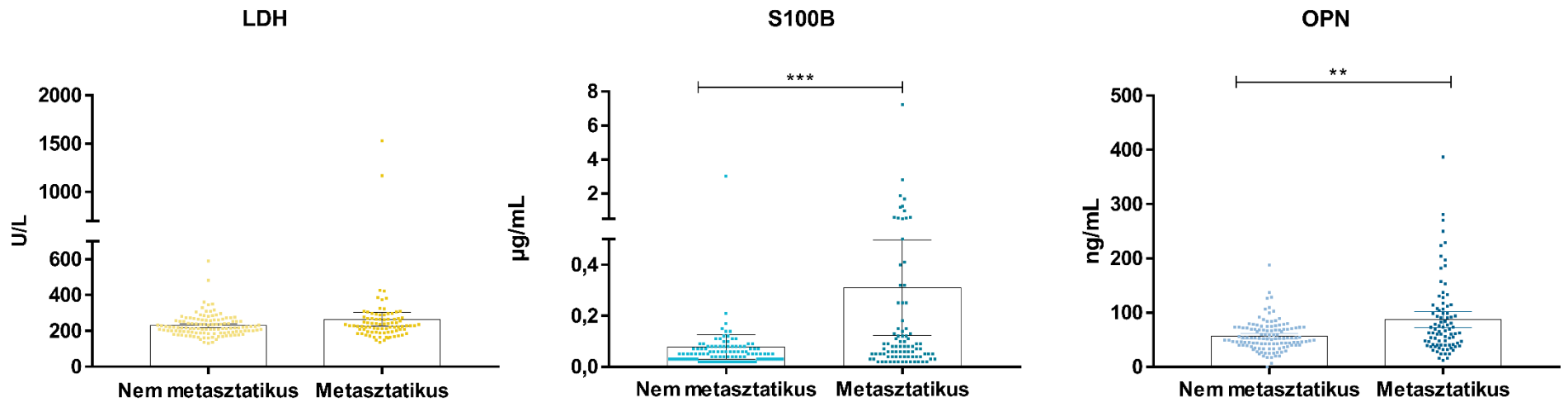
Bináris logisztikus regressziós modellezést alkalmaztunk a lipidfajok szintjei és a prognosztikai tényezők (áttét jelenléte/hiánya, exitus, áttét lokalizációja) mint dichotóm kovariánsok közötti kapcsolat elemzésére, az életkor és a nem figyelembevételével. Az esélyhányados 95%-os megbízhatósági tartománnyal együtt került kiszámításra. Logisztikus regressziós elemzést végeztünk annak érdekében, hogy azonosítsuk azokat a lipidpaneleket, amelyek szignifikáns összefüggést mutatnak a prognosztikai tényezőkkel, a nem és az életkor figyelembevételével korrigálva. A logisztikus regressziós modellből ROC diagrammokat készítettünk, és a görbe alatti területet használtuk a modell értékelésére. Az optimális határértékek megtalálásához a ROC görbéket használtuk. Az egyes értékek érzékenysége és specificitásának optimalizálásához Youden J-statisztikát alkalmaztuk [53]. Az optimális határértékek meghatározásához a lipidfajok koncentrációinak összegére vonatkozó Youden-indexek maximumát választottuk ki. A lipidszintek összehasonlítását a Mann-Whitney-Wilcoxon-teszttel és a Kruskal-Wallis-teszttel, majd a Dunn-teszt post hoc módszerével számoltuk.

A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS Statistics 26.0 szoftver (IBM cég, Palo Alto, Kalifornia, USA) vagy az R 3.6.1 szoftver (R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) segítségével végeztük. A  $p < 0,05$  értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

## 5. Eredmények

### 5.1. Perifériás vér biomarkerek - S100B, LDH, OPN – vizsgálatának eredményei melanomás betegpopulációkban

Összesen 206 melanomás beteg, 120 nem metasztatikus és 86 metasztatikus melanomás beteg plazmamintája került be a vizsgálatunkba. A két csoport között nem volt szignifikáns különbség a nemek arányában ( $p=0,317$ ). A nem metasztatikus betegek átlagéletkora  $61,00\pm 12,28$  év volt, míg a metasztatikus csoportban  $64,14\pm 11,68$  év ( $p=0,092$ ). A primer tumor jellemzői azt mutatták, hogy a leggyakoribb altípus mindkét csoportban a noduláris melanoma volt. Továbbá az invazívabb (Clark V. szint) és 4 mm-nél vastagabb ulcerált primer tumor (pT4b) szignifikánsan gyakrabban fordult elő az áttétes csoportban ( $p=0,012$ , illetve  $p<0,001$ ). A BRAF-mutáció jelenléte nem különbözött szignifikánsan a csoportok között ( $p=0,375$ ) (2. Táblázat). A szérumban S100B és OPN szintje szignifikánsan magasabb volt a metasztatikus csoportban,  $p<0,001$ , illetve  $p=0,002$ , azonban a szérumban LDH szintje nem mutatott szignifikáns különbséget ( $p=0,107$ ) a nem metasztatikus és a metasztatikus melanomás betegcsoportok között (2. Táblázat, 7. Ábra).



**7. Ábra: A biomarkerek összehasonlítása a nem metasztatikus és metasztatikus melanoma csoportban**

(A) A szérumban LDH szint a nem metasztatikus és a metasztatikus melanoma csoportban. (B) Szérumban S100B szint a nem metasztatikus és metasztatikus melanoma csoportban. (C) Plazma OPN szint a nem metasztatikus és metasztatikus melanoma csoportban. A pontok az értékeket, míg a szürke doboz az átlagot mutatja a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartománnyal. LDH: laktát-dehidrogenáz, OPN: osteopontin, \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 2. Táblázat: A melanomás populáció karakterisztikája

Változók	Betegek N=206			Tréning csoport N=138			Validációs csoport N=68		
	Nem metasztatikus N=120	Metasztatikus N=86	p-érték	Nem metasztatikus N=80	Metasztatikus N=58	p-érték	Nem metasztatikus N=40	Metasztatikus N=28	p-érték
<b>Melanomás betegek</b>									
Kor (évek) (átlag±SD)	61,00±12,28	64,14±11,68	0,092	60,86±12,15	64,67±12,56	0,076	61,15±12,73	63,96±9,53	0,754
Nem, N (%)			0,317			0,493			0,444
Férfi	67 (55,8)	54 (62,8)		45 (56,3)	36 (62,1)		22 (55,0)	18 (64,3)	
Nő	53 (44,2)	32 (37,2)		35 (43,7)	22 (37,9)		18 (45,0)	10 (35,7)	
<b>Primer melanoma</b>									
Lokalizáció, N (%)			0,108			<b>0,007</b>			0,395
Fej-nyak	16 (13,3)	11 (12,8)		14 (17,5)	6 (10,3)		2 (5,0)	5 (17,9)	
Felső végtag	33 (27,5)	28 (32,6)		19 (23,7)	20 (34,5)		14 (35,0)	8 (28,6)	
Alsó végtag	21 (17,5)	24 (27,9)		13 (16,3)	20 (34,5)		8 (20,0)	4 (14,3)	
Törzs	50 (41,7)	23 (26,7)		34 (42,5)	12 (20,7)		16 (40,0)	11 (39,2)	
Szöveti típus, N (%)			<b>0,019</b>			0,098			0,130
SSM	44 (22,5)	16 (30,2)		28 (35,0)	11 (19,0)		16 (40,0)	5 (17,9)	
NM	49 (40,8)	44 (51,2)		33 (41,3)	27 (46,6)		16 (40,0)	17 (60,7)	
MM	27 (36,7)	26 (18,6)		19 (23,7)	20 (34,4)		8 (20,0)	6 (21,4)	
Clark-szint, N (%)			<b>0,012</b>			<b>0,024</b>			0,344
II	10 (8,3)	2 (2,3)		7 (8,8)	2 (3,4)		3 (7,5)	0 (0,0)	
III	50 (41,7)	27 (31,4)		31 (38,7)	18 (31,0)		19 (47,5)	9 (32,1)	
IV	42 (35,0)	23 (26,8)		31 (38,7)	15 (25,9)		11 (27,5)	8 (28,6)	
V	10 (8,3)	18 (20,9)		4 (5,0)	11 (19,0)		6 (15,0)	7 (25,0)	
nem ismert	8 (6,7)	16 (18,6)		7 (8,8)	12 (20,7)		1 (2,5)	4 (14,3)	
AJCC 8. kiadás pT kategória, N (%)			<b>&lt;0,001</b>			<b>0,001</b>			0,061
pT1a-T2a	43 (35,8)	8 (9,3)		30 (37,5)	6 (10,3)		13 (32,5)	2 (7,1)	
pT2b-T3a	18 (15,0)	14 (16,3)		11 (13,7)	10 (17,2)		7 (17,5)	4 (14,3)	
pT3b-T4a	25 (20,8)	18 (20,9)		18 (22,5)	12 (20,7)		7 (17,5)	6 (21,4)	

pT4b	34 (28,4)	46 (53,5)		21 (26,3)	30 (51,7)		13 (32,5)	16 (57,1)	
<b>BRAF mutáció</b>									
<i>BRAF</i>			0,375			0,141			0,578
vad típus	33 (27,5)	53 (61,6)		21 (26,2)	39 (67,2)		12 (30,0)	14 (50,0)	
V600E/K	27 (22,5)	32 (37,2)		19 (23,8)	19 (32,8)		8 (20,0)	13 (46,4)	
nem ismert	60 (50,0)	1 (1,1)		40 (50,0)	0		20 (50,0)	1 (3,6)	
<b>Biomarkerek</b>									
LDH (U/L) (átlag±SD)	229,10±61,55	264,63±180,55	0,107	228,45±55,28	279,52±215,51	0,132	230,70±73,25	233,79±55,78	0,380
S100B (átlag±SD)	(µg/mL) 0,08±0,27	0,31±0,87	<0,001	0,09±0,33	0,34±1,01	<0,001	0,05±0,03	0,25±0,48	0,010
OPN (átlag±SD)	(ng/mL) 56,63±27,09	87,33±67,64	0,002	55,65±28,30	86,89±73,67	0,019	58,59±24,70	88,26±54,27	0,046

A szignifikáns eredmények félkövérrel kiemelve. N: esetszám, SD: standard deviáció, SSM: szuperficialisan terjedő melanoma, NM: noduláris melanoma, MM: nem klasszifikált melanoma malignum, vagy SSM-től és NM-től eltérő szövettani altípus, AJCC: American Joint Committee on Cancer; LDH: laktát-dehidrogenáz; OPN:osteopontin

### 5.1.1. Egyváltozós és többváltozós logisztikus regresszió

Logisztikus regressziós modelleket használtunk a melanómás betegeknél az áttét diagnózisát befolyásoló tényezők értékelésére. Először is, az egyváltozós logisztikus regressziókban a primer tumor lokalizációja, az American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8. kiadásának pT kategóriája, valamint a szérum S100B, LDH és plazma OPN szintje szignifikáns hatást mutatott az áttétképződés valószínűségére (3. Táblázat). A szignifikáns tényezőket bevezettük a többváltozós logisztikus regressziós modellbe.

**3. Táblázat: Egyváltozós és többváltozós logisztikus regressziós modellek metasztatikus melanomáknál**

Változók	Kategóriák	Egyváltozós logisztikus regresszió		Többváltozós logisztikus regresszió	
		EH [95% MT]	p-érték	EH [95% MT]	p-érték
Kor	≥60 év/<60 év	1,22 [0,69; 2,17]	0,487	-	
Nem	férfi/nő	1,34 [0,76; 2,35]	0,318	-	
Primer tumor lokalizációja	fej és nyak/törzs	1,50 [0,60; 3,72]	0,388	2,14 [0,73; 6,26]	0,166
	felső végtag/törzs	1,85 [0,91; 3,73]	0,089	2,30 [0,99; 5,34]	0,052
	also végtag/törzs	<b>2,48 [1,16; 5,35]</b>	<b>0,020</b>	<b>2,80 [1,14; 6,90]</b>	<b>0,025</b>
Szöveti altípus	SSM/MM	0,38 [0,17; 1,10]	0,065	-	
	NM/MM	0,93 [0,48; 1,83]	0,839		
Clark-szint	III/II	2,70 [0,55; 13,22]	0,220		
	IV/II	2,74 [0,55; 13,58]	0,218	-	
	V/II	9,00 [0,86; 49,47]	0,110		
AJCC 8. kiadás pT kategória	pT2b-T3a/pT1a-T2a	<b>4,18 [1,50; 11,69]</b>	<b>0,006</b>	<b>4,18 [1,25; 14,02]</b>	<b>0,020</b>
	pT3b-T4a/pT1a-T2a	<b>3,87 [1,47; 10,19]</b>	<b>0,006</b>	<b>4,09 [1,32; 12,70]</b>	<b>0,015</b>
	pT4b/pT1a-T2a	<b>7,27 [3,03; 17,45]</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>9,86 [3,51; 27,67]</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>BRAF</i>	V600E/K/vad típus	0,74 [0,38; 1,45]	0,375	-	
S100B		<b>3,29 [1,81; 5,98]</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,30 [1,14; 4,63]</b>	<b>0,020</b>
LDH		<b>2,55 [1,17; 5,59]</b>	<b>0,019</b>	1,91 [0,72; 5,06]	0,193
OPN		<b>4,95 [2,45; 10,02]</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>5,13 [2,21; 11,91]</b>	<b>&lt;0,001</b>

A szignifikáns eredményeket félkövérrel kiemeltük. EH: esélyhányados; 95% MT: 95% megbízhatósági tartomány, SSM: szuperficiálisan terjedő melanoma, NM: noduláris melanoma, MM: nem klasszifikált melanoma malignum, vagy SSM-től és NM-től eltérő szövettani altípus, AJCC: American Joint Committee on Cancer; LDH: laktát-dehidrogenáz; OPN: osteopontin

A többváltozós logisztikus regressziós modellben a primer tumor lokalizációja, pontosabban a primer tumor alsó végtagi lokalizációja, valamint az AJCC 8. kiadásának pT2b-pT3a, pT3b-pT4a és pT4b kategóriái, továbbá az S100B és az OPN szintek összefüggést mutattak az áttét diagnózisával (3. Táblázat).

#### *5.1.2. Tréning csoport és validációs csoport*

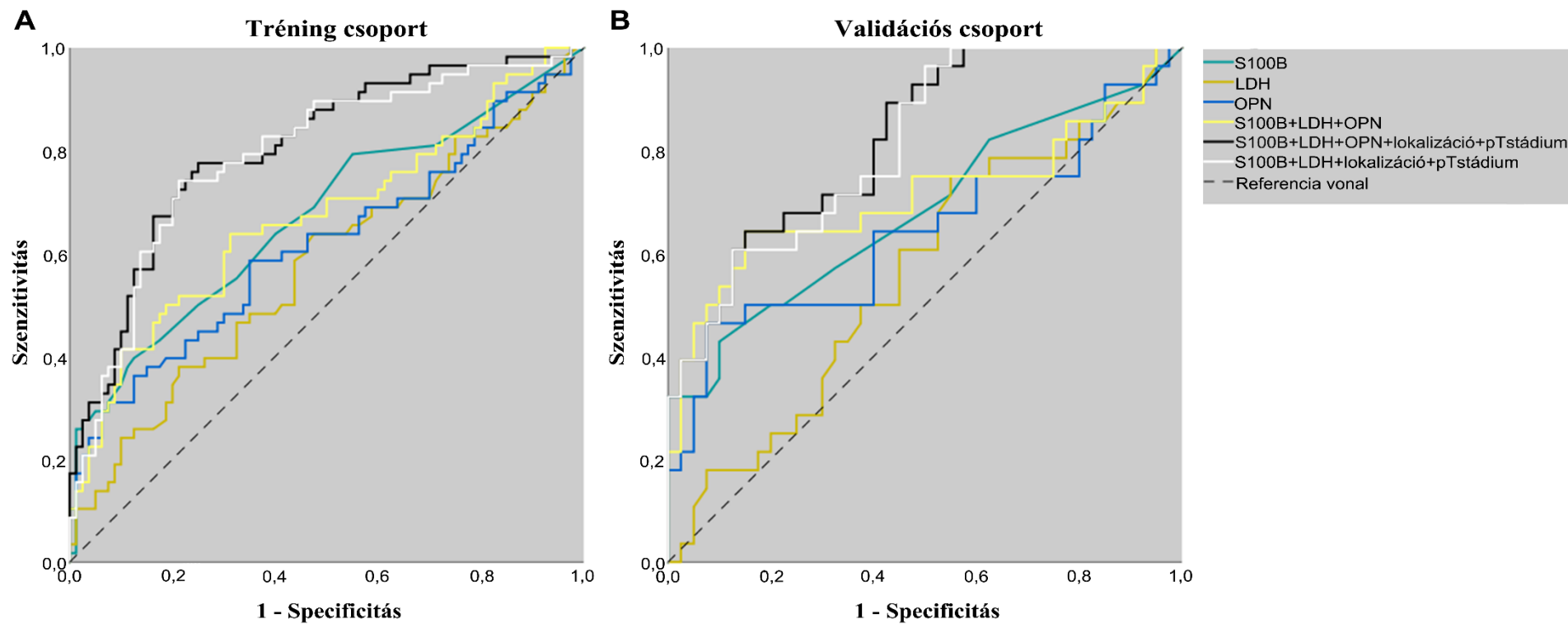
A 206 melanómás beteg véletlenszerűen lett elosztva 2:1 arányban tréning csoportra és validációs csoportra a diagnosztikai modell ellenőrzése céljából. A tréning (N=138) és a validációs (N=68) csoport betegjellemzőit a 2. Táblázat tartalmazza. Sem a tréning csoportban, sem a validációs csoportban nem mutatkozott szignifikáns különbség az életkor, a nem, a szövettani altípusok és a BRAF mutációs státusz között a nem metasztatikus és a metasztatikus melanoma csoportok között. A primer tumor lokalizációja, a Clark-féle inváziós szint és a pT-stádium szignifikánsan különbözött a metasztatikus és a nem metasztatikus melanómás betegek között a tréning csoportban, de a validációs csoportban nem. Mind a tréning-, mind a validációs csoportban szignifikáns különbséget észleltünk a metasztatikus és a nem metasztatikus csoportok között a szérumban S100B és a plazma OPN esetében, de nem volt szignifikáns különbség a szérumban LDH esetében (2. Táblázat).

#### *5.1.3. A biomarkerek és a kombinációik diagnosztikus hatása*

A biomarkerek optimális határértékének megállapítására és az AUC meghatározására ROC-analízist alkalmaztunk. A szérumban S100B optimális cut-off értéke 0,085 µg/L volt, az AUROC pedig 0,671 [0,598; 0,752] a tréning csoportban és 0,682 [0,547; 0,817] a validációs csoportban (4. Táblázat, 8. Ábra). A szérumban LDH esetében az optimális határérték 220,5 U/L volt, és az AUC csak 0,575 [0,477; 0,674] volt a tréning csoportban és 0,563 [0,424; 0,703] a validációs csoportban. Az OPN esetében a 80,09 ng/ml optimális cut-off értéket a Youden-index alapján határoztuk meg, az AUROC 0,616 [0,518; 0,715] volt a tréning csoportban és 0,643 [0,500;

0,786] a validációs csoportban (4. Táblázat, 8. Ábra). A biomarkerek kombinációja hasonló AUC-értékeket eredményezett (1. Kiegészítő Táblázat).

A három biomarker (LDH, S100B és OPN) és a primer tumor lokalizációjának, valamint az AJCC 8. kiadásának pT kategóriájának a kombinációja eredményezte a legmagasabb AUC-értékeket (0,803 [0,729; 0,878]) mind a tréning, mind a validációs csoportban (0,822 [0,726; 0,919]). Az OPN szint elhagyása ebből a kombinált modellből még mindig erős AUC-értékeket eredményezett mind a tréning, mind a validációs csoportban: 0,791 [0,713; 0,869] és 0,812 [0,712; 0,911] (4. Táblázat, 8. Ábra).



**8. Ábra: A biomarkerek és a különböző kombinációik ROC-görbéi**

(A) Az önállóan, valamint a kombinációban alkalmazott biomarkerek és a kombinált modellek ROC-görbéi a tréning csoportban. (B) Az önállóan, valamint a kombinációban alkalmazott biomarkerek és a kombinált modellek ROC-görbéi a validációs csoportban.

ROC: receiver operating characteristic, LDH: laktát-dehidrogenáz; OPN: osteopontin, pT stádium: American Joint Committee on Cancer 8. kiadása alapján a T kategória

#### 4. Táblázat: A biomarkerek és kombinációik diagnosztikus hatása

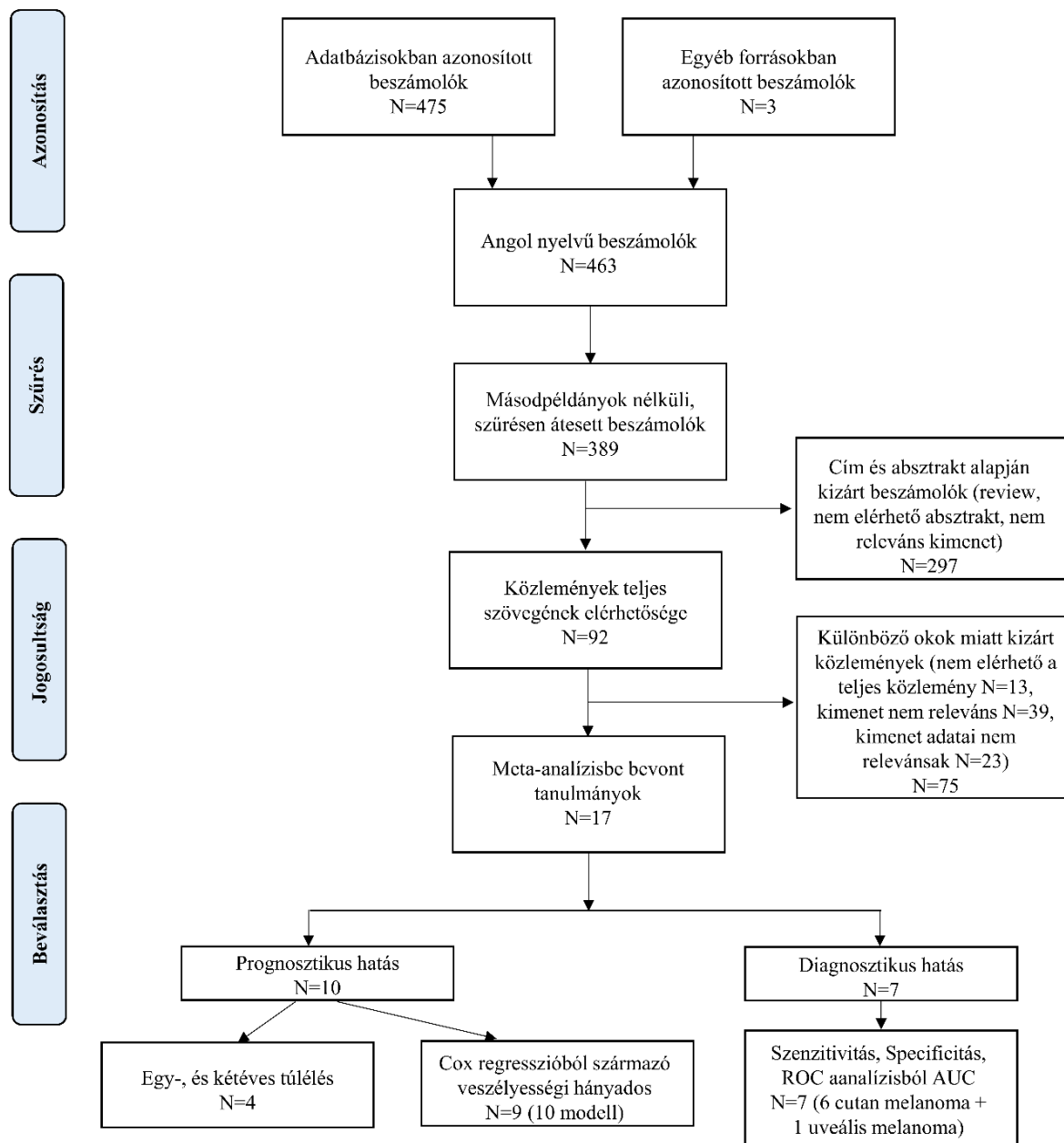
Változók	Cut-off	Tréning csoport						Validációs csoport					
		AUROC [95% MT] p-érték	Szenzitivitás [95% MT]	Specificitás [95% MT]	PPÉ [95% MT]	NPÉ [95% CI]	Diagnosztikus pontosság [95% MT]	AUROC [95% MT] p-érték	Szenzitivitás [95% MT]	Specificitás [95% MT]	PPÉ [95% MT]	NPÉ [95% MT]	Diagnosztikus pontosság [95% MT]
S100B	0,085	0,671 [0,598; 0,752], <b>p=0,001</b>	0,43 [0,30; 0,57]	0,83 [0,72; 0,90]	0,64 [0,51; 0,76]	0,67 [0,61; 0,72]	0,66 [0,57; 0,74]	0,682 [0,547; 0,817] <b>p=0,011</b>	0,43 [0,25; 0,63]	0,90 [0,76; 0,97]	0,75 [0,52; 0,89]	0,69 [0,62; 0,76]	0,71 [0,58; 0,81]
LDH	220,5	0,575 [0,477; 0,674] p=0,131	0,64 [0,50; 0,76]	0,53 [0,41; 0,64]	0,67 [0,57; 0,75]	0,43 [0,42; 0,57]	0,57 [0,49; 0,66]	0,563 [0,424; 0,703] p=0,376	0,54 [0,34; 0,73]	0,55 [0,39; 0,71]	0,46 [0,34; 0,58]	0,63 [0,51; 0,73]	0,54 [0,42; 0,67]
OPN	80,09	0,616 [0,518; 0,715] <b>p=0,020</b>	0,36 [0,24; 0,50]	0,88 [0,78; 0,94]	0,65 [0,61; 0,70]	0,68 [0,52; 0,81]	0,66 [0,57; 0,74]	0,643 [0,500; 0,786] <b>p=0,046</b>	0,46 [0,28; 0,66]	0,90 [0,76; 0,97]	0,77 [0,54; 0,90]	0,71 [0,63; 0,78]	0,72 [0,60; 0,82]
S100B+lokali záció +pT stádium	0,435	0,788 [0,709; 0,867] <b>p&lt;0,001</b>	0,76 [0,63; 0,86]	0,76 [0,65; 0,85]	0,70 [0,60; 0,78]	0,81 [0,73; 0,87]	0,76 [0,68; 0,83]	0,802 [0,699; 0,904] <b>p&lt;0,001</b>	0,61 [0,41; 0,79]	0,80 [0,64; 0,91]	0,68 [0,52; 0,81]	0,74 [0,64; 0,83]	0,72 [0,60; 0,82]
LDH+lokalizá ció +pT stádium	0,458	0,785 [0,706; 0,864] <b>p&lt;0,001</b>	0,72 [0,59; 0,83]	0,79 [0,68; 0,87]	0,71 [0,61; 0,80]	0,80 [0,72; 0,86]	0,76 [0,68; 0,83]	0,744 [0,624; 0,864] <b>p=0,001</b>	0,71 [0,51; 0,87]	0,75 [0,59; 0,87]	0,67 [0,53; 0,78]	0,79 [0,67; 0,87]	0,74 [0,61; 0,84]
OPN+lokalizá ció +pT stádium	0,460	0,791 [0,714; 0,868] <b>p&lt;0,001</b>	0,67 [0,54; 0,79]	0,80 [0,70; 0,88]	0,71 [0,60; 0,80]	0,77 [0,70; 0,83]	0,75 [0,67; 0,82]	0,798 [0,694; 0,902] <b>p&lt;0,001</b>	0,64 [0,44; 0,81]	0,80 [0,64; 0,91]	0,69 [0,53; 0,82]	0,76 [0,66; 0,84]	0,74 [0,61; 0,84]
S100B+LDH +OPN +lokalizáció +pT stádium	0,413	0,803 [0,729; 0,878] <b>p&lt;0,001</b>	0,78 [0,65; 0,88]	0,75 [0,64; 0,84]	0,69 [0,60; 0,77]	0,82 [0,74; 0,88]	0,76 [0,68; 0,83]	0,822 [0,726; 0,919] <b>p&lt;0,001</b>	0,68 [0,48; 0,84]	0,78 [0,62; 0,89]	0,68 [0,53; 0,80]	0,78 [0,66; 0,86]	0,74 [0,61; 0,84]
S100B+LDH +lokalizáció +pT stádium	0,459	0,791 [0,713; 0,869] <b>p&lt;0,001</b>	0,74 [0,61; 0,85]	0,79 [0,68; 0,87]	0,72 [0,62; 0,80]	0,81 [0,73; 0,87]	0,77 [0,69; 0,84]	0,812 [0,712; 0,911] <b>p&lt;0,001</b>	0,61 [0,41; 0,79]	0,85 [0,70; 0,94]	0,74 [0,56; 0,86]	0,76 [0,66; 0,83]	0,75 [0,63; 0,85]

A szignifikáns eredményeket félkövérrel kiemeltük. AUROC: area under the receiver operating characteristics, PPÉ: pozitív prediktív érték, NPÉ: negatív prediktív érték, 95% MT: 95% megbízhatósági tartomány, LDH: laktát.dehidrogenáz, OPN: osteopontin, pT stadium: American Joint Committee on Cancer 8. kiadása alapján a T kategória

## 5.2. Az S100B és az LDH diagnosztikus és prognosztikus hatásának vizsgálata

### 5.2.1. A tanulmányok kiválasztása és a vizsgálatba bevont tanulmányok jellemzői

Az irodalmi adatok között a keresés 478 rekordot eredményezett (9. Ábra).



9. Ábra: PRISMA folyamatábra

AUC: görbe alatti terület, ROC: receiver operating characteristic, N: vizsgálatok szám

A nem angol nyelvű tanulmányok és a duplikációk eltávolítása után 389 közlemény maradt az analízisben. A címek vagy összefoglalók alapján 92 közleményt választottunk ki a teljes szövegű átvizsgálásra. Tizenhárom közlemény teljes szövege nem állt rendelkezésre, 62 pedig nem felelt meg a kiválasztási kritériumoknak. Végül 7 elsődleges diagnosztikai hatásvizsgálatot (6 bőr melanoma, 1 uvealis melanoma) (26-32) és 10 elsődleges prognosztikai tényezőt vizsgáló tanulmányt (33-42) választottunk ki a minőségi és mennyiségi szintézishez. A vizsgálatba bevont tanulmányok jellemzőit az 5., 6., 7. Táblázat és a 10., valamint a 11. Ábra foglalja össze.

## 5. Táblázat: A beválasztott diagnosztikus hatású tanulmányok karakterisztikája a meta-analízisben

*AUC (ROC analízis), Szenzitivitás, Specifititás*

Első szerző (Publikáció éve)	Ország	Vizsgálati elrendezés	Jellemző	Populáció	Nő %	S100B cutoff (µg/L)	S100B metódus	LDH cutoff (IU/L)	LDH metódus	Teljes betegszám	Regionális, vagy távoli áttétes betegek száma	Regionális, vagy távoli áttét nélküli betegek száma
Henry et al., 2012 [54]	Franciao.	prospektív	egyközpontú	I-IV stádiumú melanoma (ismeretlen SLN státusz, I-II stádiumú a befogadásánál 44%)	41,3	0,15	LIAISON ® Sangtec® 100	ULN (240)	automata kolorimetriás assay	121	43	78
Díaz-Lagares et al., 2011 [55]	Spanyolo.	retrospektív	egyközpontú	I-IV stádiumú melanoma	54	0,1	Elecsys® S100	ULN (292)	automata kolorimetriás assay	176	110	66
Garbe et al., 2003 [56]	Németo.	prospektív	egyközpontú	II-III stádiumú melanoma (ismeretlen SLN státusz, II stádiumú a befogadásánál 56%)	56,8	0,12	LIA-mat® Sangtec® 100	ULN (240)	automata kolorimetriás assay	296	41	255
Garnier et al., 2007 [57]	Franciao.	prospektív	egyközpontú	I-IV stádiumú melanoma (I-II stádiumú a befogadásánál 34%)	46,5	0,12	LIA-mat® Sangtec® 100	ULN (439)	automata kolorimetriás assay	170	113	57
Mohammed et al., 2001 [58]	Egyesült Királyság	prospektív	egyközpontú	I-IV stádiumú melanoma (I-II stádiumú a befogadásánál 12%)	50,6	0,15	LIA-mat® Sangtec® 100	ULN (500)	automata kolorimetriás assay	164	85	79
Maier et al., 2012 [21]	Németo.	retrospektív	egyközpontú	I-IV stádiumú melanoma	43,4	0,11	Elecsys® S100	ULN (250)	automata kolorimetriás assay	106	24	82
Missotten et al., 2007 [59]	Hollandia	retrospektív	egyközpontú	Nem metasztatikus és metasztatikus uvealis melanoma	N.R.	0,16	LIAISON ® Sangtec® 100	ULN (450)	automata kolorimetriás assay	134	30	104

SLN: sentinel lymph node, ULN: upper limit normal, N.R.: not reported. szérumban S100B határértékét a gyártó által meghatározott kontrollcsoport 95. percentiliseként választották (26, 29, 30) vagy egy korábbi tanulmányban (31), illetve egészséges személyek vizsgálatba történő bevonásával határozták meg (27, 28, 32). ROC-optimalizált

határértékeket csak néhány tanulmányban jelentettek (26, 29). A szérum LDH meghatározására valamennyi kiválasztott vizsgálatban kolorimetriás vizsgálatokat alkalmaztak. A határérték általában a helyi laboratórium által meghatározott normálérték felső határa (ULN) volt.

## 6. Táblázat: A beválasztott prognosztikus (Cox regresszió) hatású tanulmányok karakterisztikája a meta-analízisben

<i>Veszélyességi kockázat (Cox regresszió)</i>										
<b>Első szerző (Publikáció éve)</b>	<b>Ország</b>	<b>Vizsgálati elrendezés</b>	<b>Jellemző</b>	<b>Populáció</b>	<b>Nő %</b>	<b>S100B cutoff (µg/L)</b>	<b>S100B metódus</b>	<b>LDH cutoff (IU/L)</b>	<b>LDH metódus</b>	<b>Össz betegszám</b>
Weide et al., 2012 [60]	Németo.	prospektív	multicenterikus	Rezekábilis és nem rezekábilis IV stádium	43,6	0,15; 0,10	Sangtec® 100 ELISA, Elecsys® S100	ULN	automata kolorimetriás assay	586
Weide et al., 2013 [61]	Németo.	prospektív	multicentrikus	Nem rezekábilis IV stádium elsővonalbeli szisztémás terápiával	41,5	0,15; 0,10	Sangtec® 100 ELISA, Elecsys® S100	ULN	automata kolorimetriás assay	372
Wagner cohort 1, 2018 [62]	Németo.	retrospektív	egy központú	Nem rezekábilis III stádium/IV stádium anti-PD1 terápiával	42,1	0,3	N.R.	1.5xUL N	automata kolorimetriás assay	152
Wagner cohort 2, 2018 [62]	Németo.	retrospektív	egy központú	Nem rezekábilis III stádium/IV stádium anti-PD1 + anti- CTLA4 terápiával	41,9	0,3	N.R.	1.5xUL N	automata kolorimetriás assay	86
Amaral, Kiecker et. al., 2020 [63]	Németo.	retrospektív	multicentrikus	Nem rezekábilis IV stádium (agy met) kombinált immunterápiával	36,8	0,11	Elecsys® S100	250	automata kolorimetriás assay	265/322
Amaral, Schulze et. al., 2020 [64]	Németo.	prospektív	egy központú	Nem rezekábilis IV stádium kombinált immunterápiával	39	0,15	LIA-mat® Sangtec® 100	ULN	automata kolorimetriás assay	55/59
Damuzzo et al., 2016 [65]	Olaszo.	prospektív	egy központú	Nem rezekábilis IV stádium anti-CTLA4 terápiával	34,1	0,16	LIAISON® Sangtec® 100	450	automata kolorimetriás assay	44
Eigentler et al., 2011 [66]	Németo.	retrospektív	multicentrikus	Nem rezekábilis IV stádium (agy met)	44	ULN	N.R.	ULN	automata kolorimetriás assay	270/464
Wevers et al., 2013 [67]	Hollandia	prospektív	egy központú	Rezekábilis III stádium	47,1	0,15, 0,20	Nichols Advantage,	250	automata kolorimetriás assay	75

Schmidt et al., 2005 [68]	Dánia	retrospektív	egy központú	Nem rezekábilis IV stádium IL2-alapú immunterápiával	44	0,15	Sangtec® 100 ELISA LIAISON® Sangtec® 100	500	automata kolorimetriás assay	82
------------------------------	-------	--------------	--------------	--	----	------	---	-----	---------------------------------	----

SLN: sentinel lymph node/őrszem nyirokcsomó, ULN: upper limit normal/normál érték felső határa, N.R.: not reported/nem közölt

**7. Táblázat: A beválasztott prognosztikus (túlélési arány) hatású tanulmányok karakterisztikája a meta-analízisben**

*Túlélési arány (egy és két éves)*

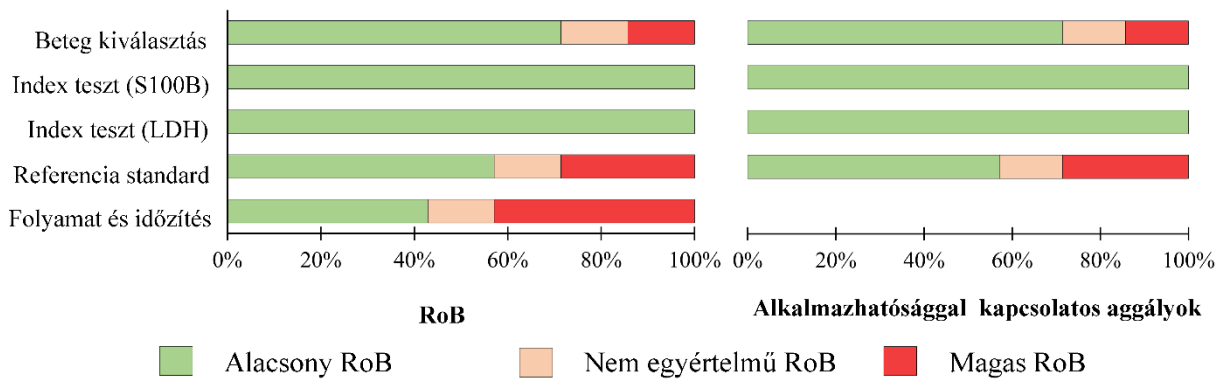
Első szerző (Publikáció éve)	Ország	Vizsgálati elrendezés	Jellemző	Populáció	Nő %	S100B cutoff (µg/L)	S100B módszer	LDH cutoff (IU/L)	LDH módszer	Össz betegszám
Weide et al., 2012 [60]	Németo.	prospektív	multicentrikus	Rezekábilis és nem rezekábilis IV stádium	43,6	0,15; 0,10	Sangtec® 100 ELISA, Elecsys® S100	ULN	automata kolorimetriás assay	855
Weide et al., 2013 [61]	Németo.	prospektív	multicentrikus	Nem rezekábilis IV stádium elsővonalbeli szisztémás terápiával	41,5	0,15; 0,10	Sangtec® 100 ELISA, Elecsys® S100	ULN	automata kolorimetriás assay	499
Weide et al., 2016 [69]	Németo.	prospektív	multicentrikus	Nem rezekábilis IV stádium	41,3	0,10	Elecsys® S100	250	automata kolorimetriás assay	206
Amaral, Kiecker et. al., 2020 [63]	Németo.	prospektív	multicentrikus	Nem rezekábilis IV stádium (agyí met) kombinált immunterápiával	36,8	0,11	Elecsys® S100	250	automata kolorimetriás assay	380

SLN: sentinel lymph node/őrszem nyirokcsomó, ULN: upper limit normal/normál érték felső határa, N.R.: not reported/nem közölt

## QUADAS-2

	RoB					Alkalmazhatósággal kapcsolatos aggályok			
	Beteg kiválasztás	Index teszt (S100B)	Index teszt (LDH)	Referencia standard	Folyamat és időzítés	Beteg kiválasztás	Index teszt (S100B)	Index teszt (LDH)	Referencia standard
Henry és mtsai., 2013	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Díaz-Lagares és mtsai., 2011	+	+	+	?	?	+	+	+	?
Garbe és mtsai., 2003	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Garnier és mtsai., 2007	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mohammed és mtsai., 2001	?	+	+	+	+	?	+	+	+
Maier és mtsai., 2012	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Missotten és mtsai., 2007	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Alacsony RoB     
  Nem egyértelmű RoB     
  Magas RoB



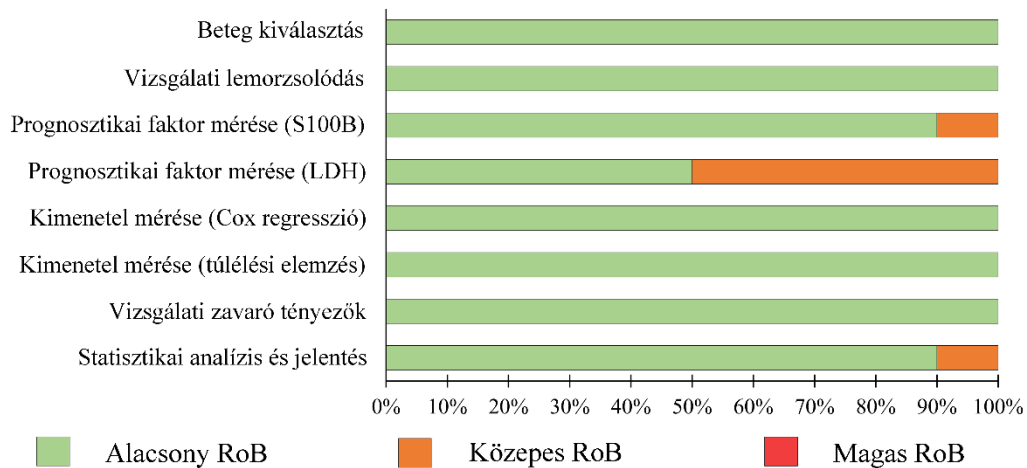
**10. Ábra: A minőségértékelés eredményei a Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS-2) eszköz szerint**

RoB: risk of bias

## QUIPS

	Beteg kiválasztás	Vizsgálati lemorzsolódás	Prognosztikai faktor mérése (S100B)	Prognosztikai faktor mérése (LDH)	Kimenetel mérése (Cox regresszió)	Kimenetel mérése (túlélési elemzés)	Vizsgálati zavaró tényezők	Statistikai analízis és jelentés
Weide és mtsai., 2013	●	●	●	●	●	●	●	●
Weide és mtsai., 2012	●	●	●	●	●	●	●	●
Weide és mtsai., 2016	●	●	●	●	●	●	●	●
Amaral, Kiecker és mtsai., 2020	●	●	●	●	●	●	●	●
Wagner és mtsai., 2018	●	●	●	●	●	●	●	●
Amaral, Schulze és mtsai., 2020	●	●	●	●	●	●	●	●
Damuzzo és mtsai., 2016	●	●	●	●	●	●	●	●
Eigentler és mtsai., 2011	●	●	●	●	●	●	●	●
Schmidt és mtsai., 2005	●	●	●	●	●	●	●	●
Wevers és mtsai., 2013	●	●	●	●	●	●	●	●

Alacsony RoB     
  Közepes RoB     
  Magas RoB



**11. Ábra: A minőségértékelés eredményei a Quality In Prognosis Studies (QUIPS) eszköz szerint**

RoB: risk of bias

### 5.2.2. A vizsgálatba bevont tanulmányok minőségi értékelése

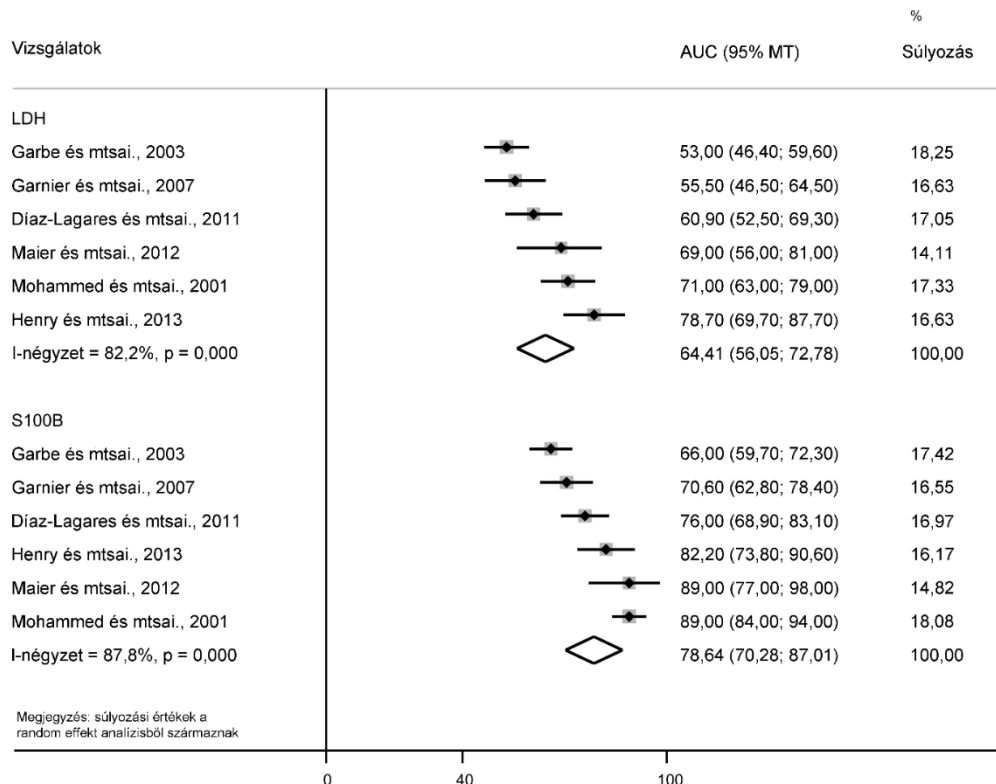
A kvalitatív értékelés azt mutatta, hogy számos tanulmányt torzítással végeztek, a legnagyobb torzítási kockázatot a tanulmányok referencia-standardjaiban találták. A betegség relapszusának kimutatására szolgáló referencia-standardként különböző érzékenységgű és specificitású képalkotó technikák a diagnosztikai pontosságot vizsgáló tanulmányokban a stádiumtól függően eltérőek voltak. Mivel nem minden területet lehetett alacsony ROB-nak minősíteni, az általános megítélés elkerülhető volt. A publikációs torzítás az AUROC-ra vonatkozó Funnel plot szerint valószínűtlen volt (1. Kiegészítő Ábra, 2. Kiegészítő Ábra). A Funnel plot és az Egger-teszt nem igazolta a publikációs torzítást a Cox-kockázati arányok esetében ( $p=0,245$  az S100B esetében;  $p=0,344$  az LDH esetében) (3. Kiegészítő Ábra).

### 5.2.3. Diagnosztikai hatás meta-analízise

A meta-analízisbe hat alkalmasnak ítélt tanulmányt vontunk be 1033 bőr melanomás beteggel. A kvantitatív értékelés azt mutatta, hogy az S100B diszkriminatív képessége a melanoma relapszusával rendelkező vagy nem rendelkező betegek helyes azonosítására (AUROC 78,64 [70,28; 87,01]) szignifikánsan ( $p=0,013$ ) nagyobb volt, mint az LDH diszkriminatív képessége (AUROC 64,41 [56,05; 72,78]) (12. Ábra). Ezen kívül a szenzitivitást és a specificitást ezekben a tanulmányokban a szérumban S100B és az LDH dichotomizált folytonos értékeire előre meghatározott határértékek (5. Táblázat) alkalmazásával elemeztük. Az S100B összevont szenzitivitása (61,35% [95% CI 48,90; 73,80]) szignifikánsan magasabb volt ( $p=0,017$ ), mint az LDH összevont szenzitivitása (33,93% [95% CI 17,21; 50,65]) (4. Kiegészítő Ábra). Az S100B összevont specificitása (87,30% [95% CI 81,10; 93,49]) hasonló volt ( $p=0,557$ ), mint az LDH összevont specificitása (90,70% [95% CI 84,89; 96,51]) (5. Kiegészítő Ábra). A szérumban S100B ROC-optimalizált határértéke magasabb volt, mint a gyártó által előre

meghatározott határérték, és magasabb specificitással, de alacsonyabb szenzitivitással járt együtt [54, 57].

A 7 alkalmasnak ítélt tanulmány adatainak kvantitatív elemzése 1167 résztvevőt (n=1033 bőr melanoma, n=134 uvealis melanoma) foglalt magába. A szérums100B diszkriminatív képessége a betegség relapszusával vagy anélkül járó betegek helyes azonosítására (AUROC 79,75 [95% CI 72,28; 87,21]) nem különbözött szignifikánsan (p=0,061) a szérums100B diszkriminatív képességétől (AUROC 68,18 [95% CI 57,65; 78,69]) (6. Kiegészítő Ábra). A szérums100B összevont szenzitivitása (61,37% [95% CI 50,21; 72,54]) szignifikánsan magasabb volt (p=0,024), mint az LDH szenzitivitása (37,47% [95% CI 21,20; 53,73]) (7. Kiegészítő Ábra). Az S100B összevont specificitása (89,22% [95% CI 84,00; 94,43]) hasonló volt (p=0,643), mint az LDH összevont specificitása (91,25% [95% CI 86,40; 96,10]) (8. Kiegészítő Ábra).



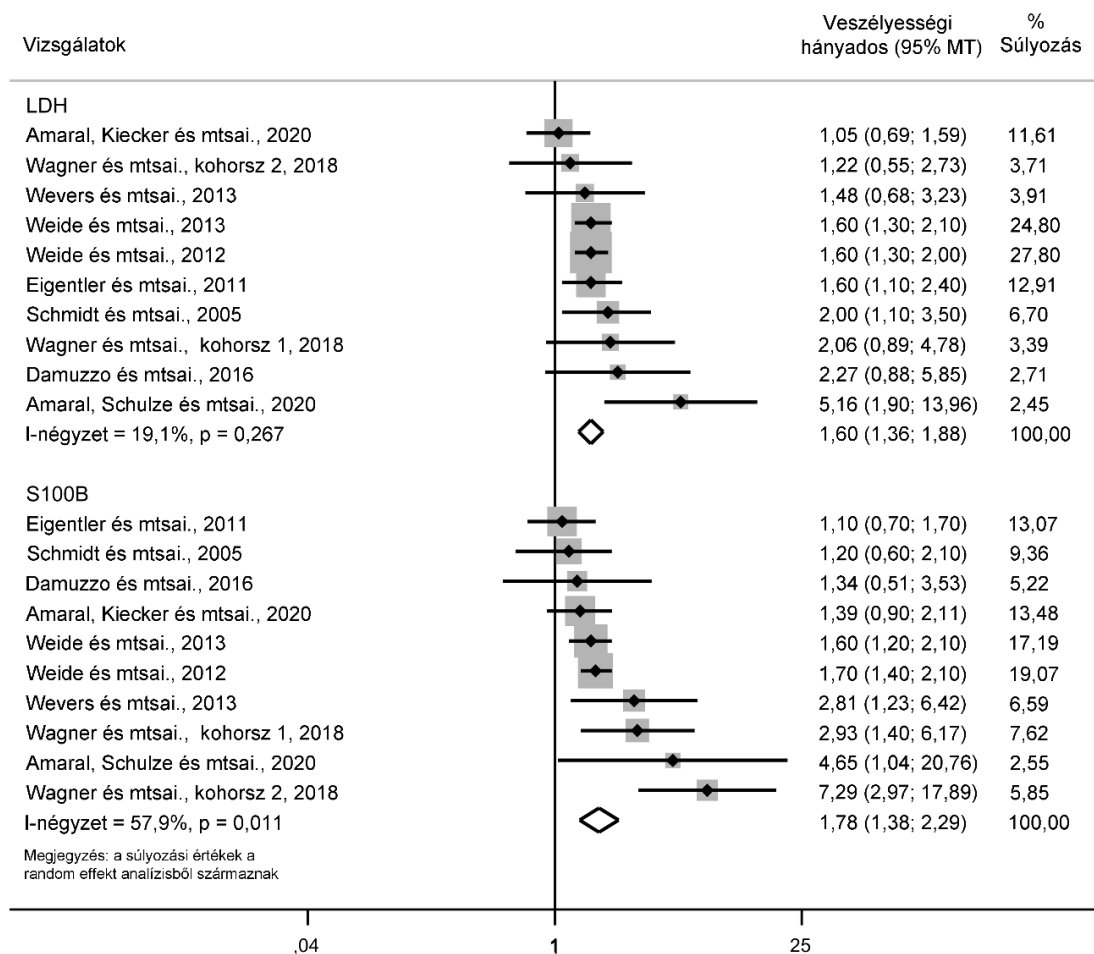
**12. Ábra: Az S100B és az LDH esetében a ROC analízisből származó AUC értéket és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt bemutató forest plot**

AUC: görbe alatti terület, 95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz

#### 5.2.4. Prognosztikai hatás meta-analízise

A teljes túlélésre vonatkozó Cox-féle többváltozós arányos-kockázati modellek segítségével végzett korrigált kockázati arányok elemzésébe tíz, 1987 résztvevőt tartalmazó tanulmányt vontunk be (6. Táblázat) (13. Ábra). Nem volt szignifikáns különbség az emelkedett szérumszintű S100B szinthez (1,78 [1,38; 2,29]) és az emelkedett LDH szinthez (1,60 [1,36; 1,88]) kapcsolódó kockázati arányok között ( $p=0,389$ ). Mind az emelkedett szérumszintű S100B szintek, mind az emelkedett LDH szintek magasabb halálozási kockázatot jeleztek előre az áttétes melanomás betegeknél.

Az egy-, illetve kétéves túlélési arányok elemzésébe négy, 1940 résztvevőt tartalmazó tanulmányt vontunk be (7. Táblázat). A normális szérumszintű betegek egyéves túlélési aránya szignifikánsan magasabb volt (55,92% [39,91%; 71,92%]), mint az emelkedett szérumszintű betegek egyéves túlélési aránya (28,08% [10,83%; 45,34%]) ( $p=0,033$ ) (9. Kiegészítő Ábra). Hasonló tendencia volt megfigyelhető a kétéves túlélési arányban (normális szérumszintű: 32,51% [24,36%; 40,67%]; emelkedett szérumszintű: 14,68% [5,77%; 23,58%]), de a különbség nem volt szignifikáns ( $p=0,082$ ) (10. Kiegészítő Ábra). A normális szérumszintű LDH szinttel rendelkező betegek egyéves túlélési aránya magasabb volt (46,16% [29,25%; 63,06%]), mint az emelkedett szérumszintű LDH szinttel rendelkező betegek egyéves túlélési aránya (25,94 [8,15%; 43,72%]), de a különbség nem volt szignifikáns ( $p=0,152$ ) (11. Kiegészítő Ábra). A kétéves túlélési arányra vonatkozó eredmények hasonlóak voltak (normális szérumszintű LDH szint: 26,94% [17,96%; 35,93%]; emelkedett szérumszintű LDH szint: 13,39% [5,04%; 21,74%]) ( $p=0,207$ ) (12. Kiegészítő Ábra). Nem találtunk szignifikáns különbséget a szérumszintű S100B és a szérumszintű LDH prognosztikai hatása között az egyéves ( $p=0,886$ ) (13. Kiegészítő Ábra) vagy a kétéves ( $p=0,921$ ) túlélési arány előrejelzésében (14. Kiegészítő Ábra).



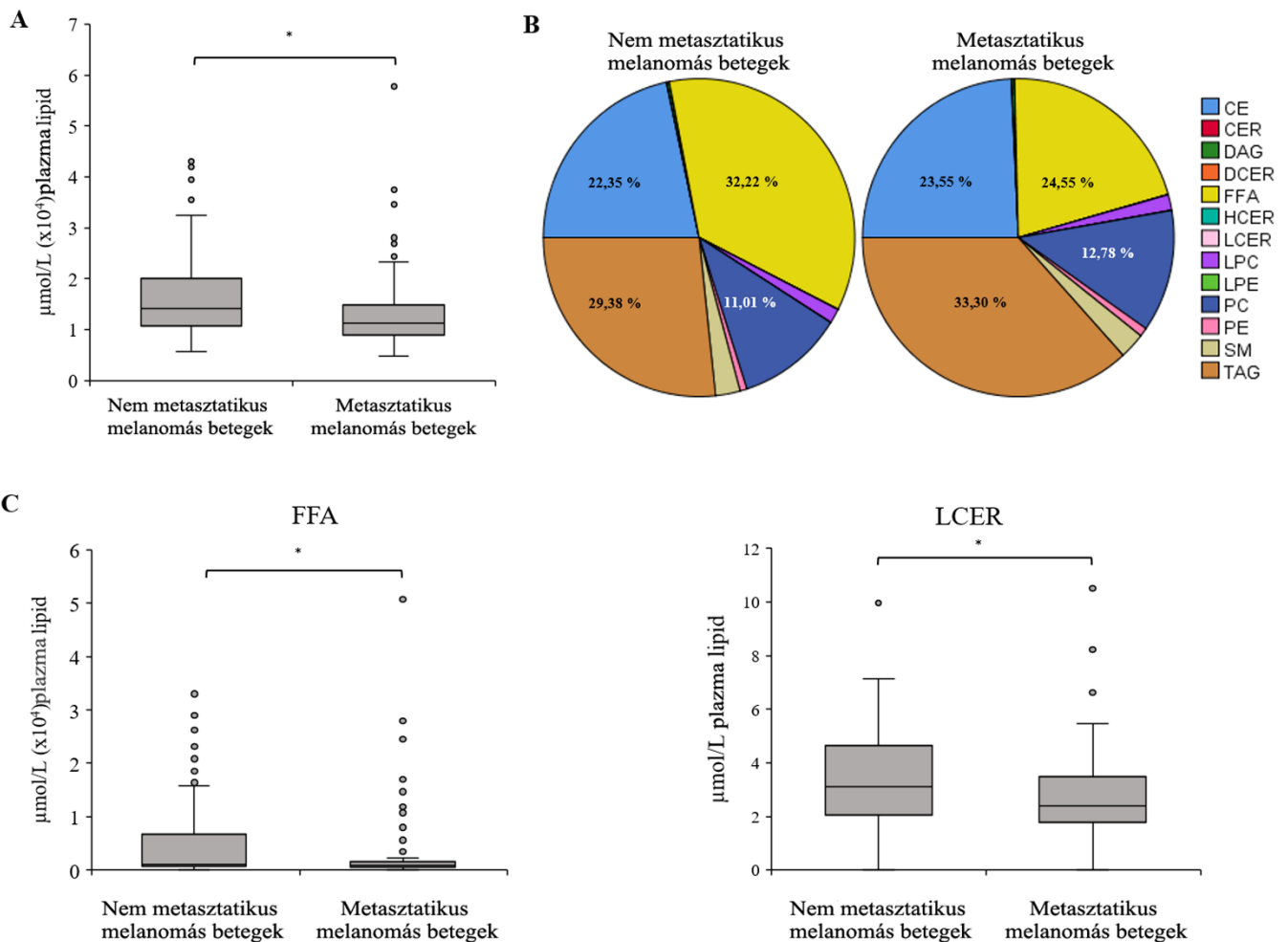
**13. Ábra: Többváltozós Cox modellekből származó, a teljes túlélésre vonatkozó korrigált kockázati arányokat a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartománnyal együtt bemutató forest plot**

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz

### 5.3 Melanomás betegpopuláció plazma lipidom eltéréseinek elemzése

#### 5.3.1. A lipidosztályok eloszlása a metasztázis nélküli és a metasztázissal rendelkező betegek között

A Sciex Lipidyzer™ platform segítségével összesen 151 beteg perifériás plazmamintáját elemeztük. 83 betegnek a vérvétel előtt legalább egy hónappal eltávolították a primer melanomát és tumormentesnek tekintettük őket, valamint staging vizsgálat (CT, vagy PET-CT) során metasztázis mentesek voltak. 68 betegnél melanoma-metasztázist diagnosztizáltunk a vérvétel időpontjában. A betegek és a tumorminták klinikai paramétereit az Anyagok és Módszerek fejezetben foglaltuk össze. A plazmamintákban a minőségellenőrző szűrők alkalmazását követően a 13 lipidosztályból összesen 802 különböző lipidet mutattunk ki, a további elemzéseket ezekkel a lipidekkel végeztük el. Az első megfigyelésünk szerint a metasztázisos betegek mintáinak lipidtartalma (a 802 lipiden belül) szignifikáns csökkenést mutatott az áttét nélküli betegek plazmamintájához képest ( $p \leq 0,05$ ) (14. Ábra A). A 13 lipidosztály eloszlása is eltérő volt a két betegcsoport között, a legszembetűnőbb változás a szabad zsírsavak lipidjeinek csökkenése volt az áttétes betegek mintáiban az áttét nélküli betegekhez képest (14. Ábra B). Figyelembe véve azonban, hogy az áttétes betegek plazmájában alacsonyabb a lipidek mennyisége, a százalékos csökkenés nem feltétlenül jelenti a teljes lipidszint csökkenését. Ezért összehasonlítottuk a lipidosztályok teljes mennyiségét az áttét nélküli és az áttétes betegek között, és eredményeink szerint két lipidosztályban (FFA, LCER) a lipidek jelentős csökkenését találtuk az áttétes betegek plazma mintáiban (14. Ábra C).



**14. Ábra: Melanomás betegek plazma lipidom elemzése, lipidok eloszlása a metasztázis mentes és a melanoma metasztázisban szenvedő betegek között**

(A) A melanomás betegek plazmájának teljes lipidtartalmának kvantitatív összehasonlítása 802 lipidet mutatott ki 13 lipidosztályban, amelyeket mind a metasztázis mentes, mind a metasztatikus melanomás betegeknekél azonosítottunk ( $p < 0,002$ ).

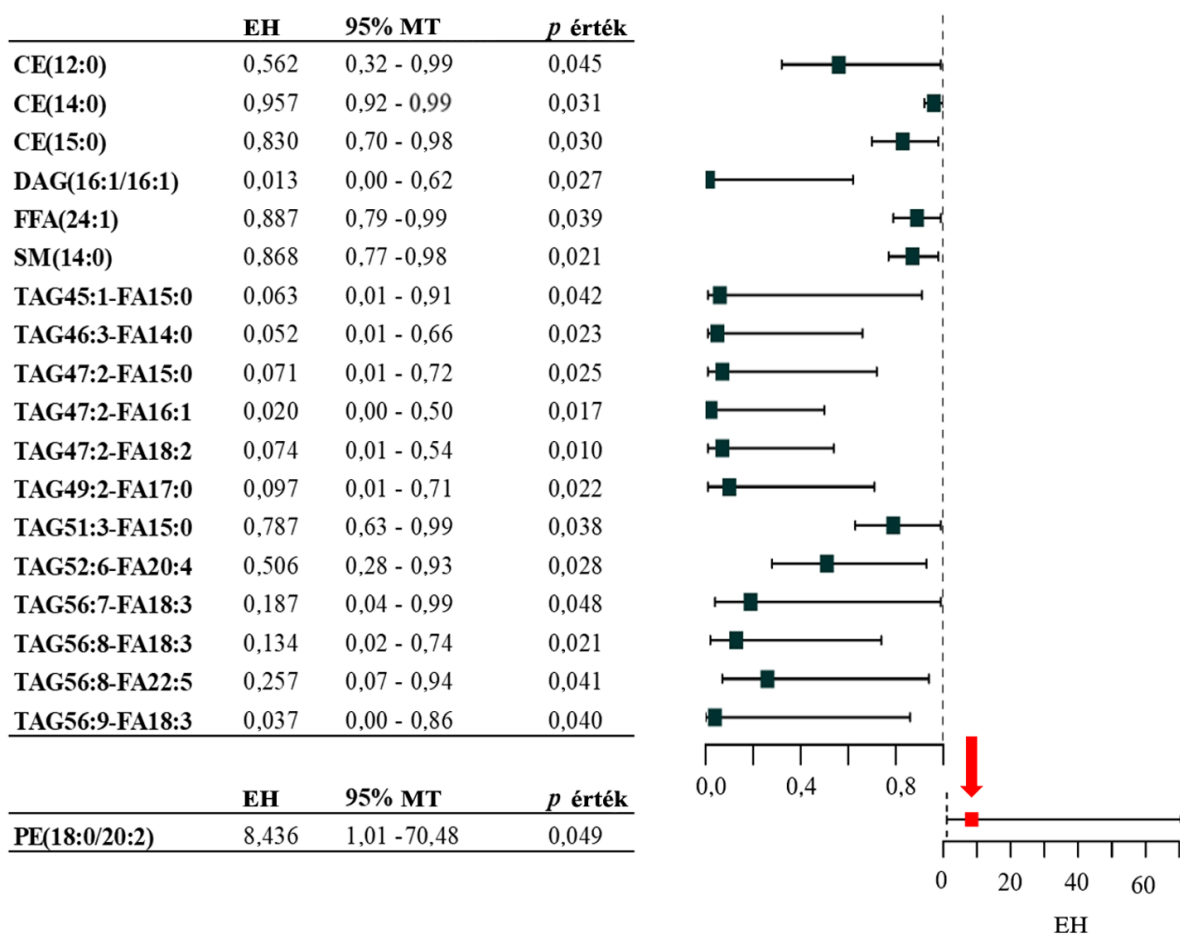
(B) A kördiagram a lipidosztályok eloszlását szemlélteti a metasztázismentes és a melanoma-metasztázisos betegek között.

(C) Jelentősen megváltozott lipidosztályokat (FFA és LCER) figyeltünk meg az áttétes betegeknekél a metasztázismentes csoporthoz képest ( $p < 0,03$ ). \* szignifikáns p-érték ( $p < 0,05$ ).

CE: koleszterilészterek, CER: ceramidok, DAG: diacilglicerinek, DCER: dihidroceramidok, FFA: szabad zsírsavak, HCER: hexozilceramidok, LCER: laktoszilceramidok, LPC: lizofoszfátidilkolinok, LPE: lizofoszfátidiletanolaminok, PC: foszfátidilkolinok, PE: foszfátidiletanolaminok, SM: szfingomielinek, TAG: triacilglicerinek

### 5.3.2. A lipidek és a metasztázisok jelenléte közötti összefüggés melanomás betegeknél

A lipidek és az áttét jelenléte/hiánya közötti összefüggés vizsgálatára a nem és az életkor szerint korrigált logisztikus regressziós modellt végeztünk. Ez az elemzés 19 olyan lipidet azonosított, amelyek szignifikáns diagnosztikai értékkel bírtak (15. Ábra). Azt találtuk, hogy a 18 különböző lipid alacsonyabb szintjével és a PE(18:0/20:2) lipid magasabb szintjével rendelkező betegeknél nagyobb valószínűséggel fordult elő melanoma metasztázis (EH-ok, 95%-os MT-ok és p-értékek a 15. Ábrán láthatóak).

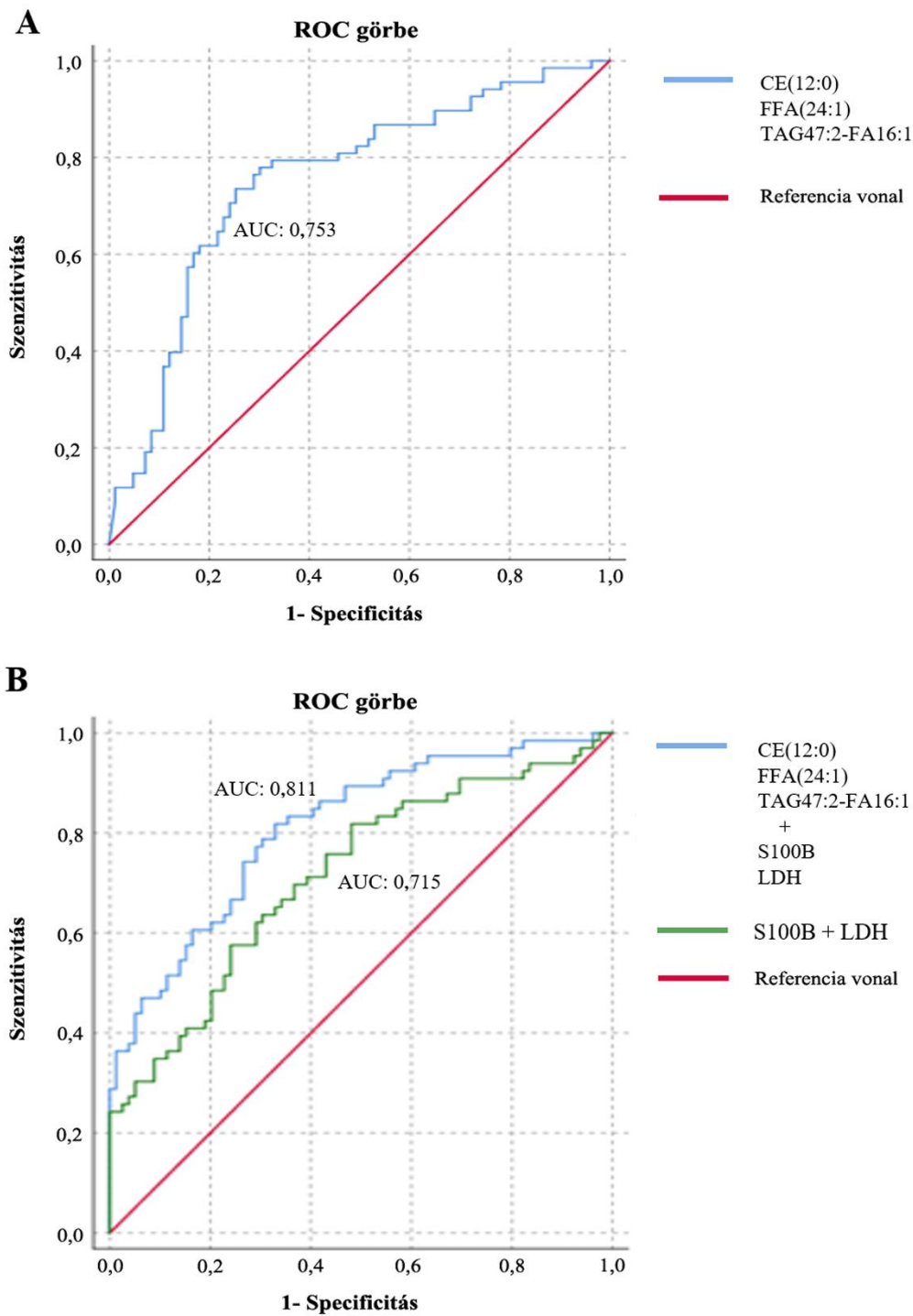


**15. Ábra: A lipidek és a melanoma metasztázisok jelenléte közötti összefüggés**

Bináris logisztikus regressziós analízis eredményei: az esélyhányadosok és a megbízhatósági tartományok forest plot diagramon ábrázolva. A fekete négyzetként jelölt lipidek negatív, a piros négyzet pozitív asszociációt mutat az áttétképződéssel (piros nyíl).

EH: esélyhányados, MT: megbízhatósági tartomány, \*nem, életkor és terápia szerint igazítva, CE: koleszterilészterek, DAG: diacilglicerinek, FFA: szabad zsírsavak, SM: szfingomielinek, TAG: triacilglicerinek

Bináris logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk annak meghatározására, hogy a 19 szignifikáns lipid közül melyik mutat a legerősebb összefüggést az áttét jelenlétével. Az elemzés 3 lipidből (CE(12:0), FFA(24:1), TAG47:2-FA16:1) álló panelt eredményezett, amelyek kapcsolata független volt az életkortól és a nemtől. Ez a lipidpanel alkalmas lehet a metasztázis valószínűségének előrejelzésére. ROC elemzést követően megállapítottuk, hogy AUC értéke 0,753 volt (16. Ábra A). Elemeztük e lipidpanel lehetséges szerepét az áttétképződés előrejelzésében a szérum LDH szintjével és az S100B szinttel kombinálva. A kombinált markerek az elemzés során 0,811-es AUC-értéket eredményeztek, míg a hagyományos S100B és LDH modell 0,715-ös AUC-értéket mutatott (16. Ábra B).



**16. Ábra: A lipidpanelek és a melanoma metasztázisok jelenléte közötti összefüggés**

(A) Az áttétképződéshez társuló lipid panel ROC-görbe elemzése. (B) Az S100B és LDH melanoma markerekkel kombinált, áttétképződéssel összefüggő lipid panel ROC-görbe elemzése. A kék vonal az S100B és LDH melanoma markerekkel kombinált három, metasztázishoz társított lipidet, a zöld vonal az S100B és LDH melanoma markereket, a piros vonal pedig a referencia vonalat jelöli.

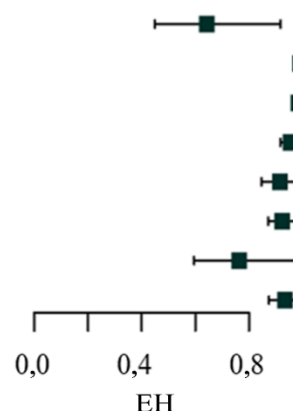
CE: koleszterilészterek, FFA: szabad zsírsavak, TAG: triacilglicerinek

### 5.3.3. A melanoma metasztázis limfogén és hematogén útvonalához kapcsolódó lipidek

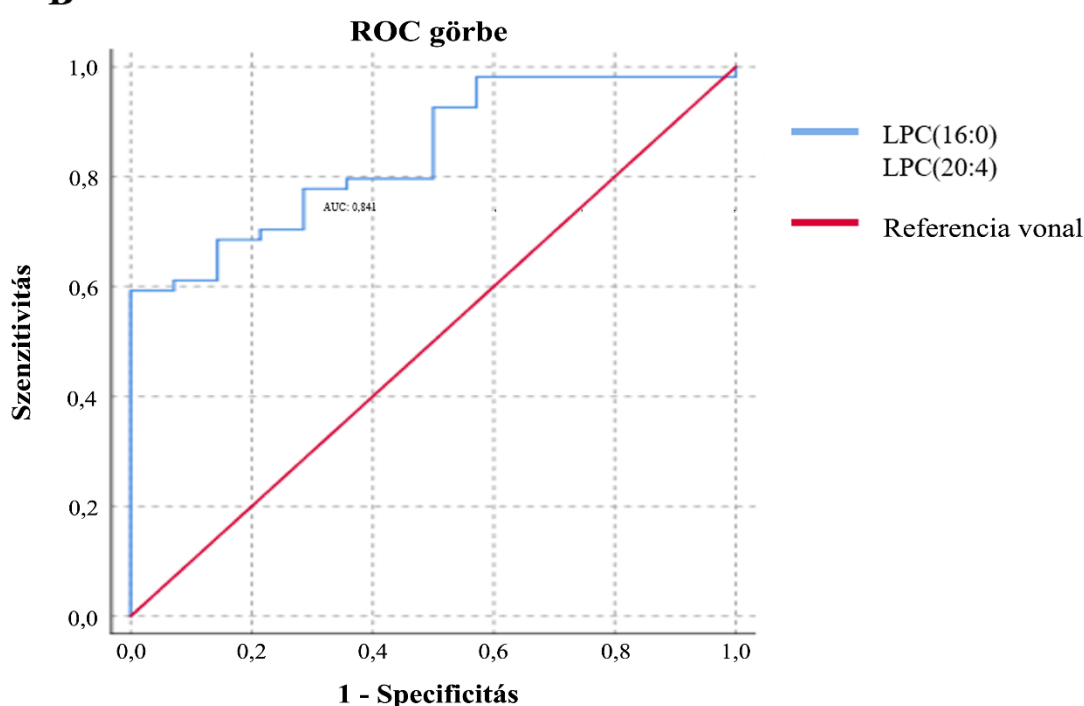
A melanoma metasztázis limfogén és hematogén útvonala közötti összefüggés vizsgálatához az áttétes betegektől származó plazmamintákat két csoportra osztottuk. Az első csoportba regionális nyirokcsomó metasztázisban szenvedő betegek (N = 19), míg a második csoportba távoli metasztázisban szenvedő betegek (N=49) tartoztak. A limfogén és hematogén útvonalhoz kapcsolódó lipideket az áttétes melanomás betegeknél a 17. ábra A és B része mutatja. Az LPC teljes mennyisége és hét különböző lipid (köztük öt LPC: (LPC(16:0), LPC(18:0), LPC(18:1), LPC(18:2) és LPC(20:4)) negatív összefüggést mutatott a hematogén útvonallal, ami azt jelzi, hogy e lipidek csökkent szintje távoli áttétekkel társult (17. Ábra A). Annak érdekében, hogy kvantitatív eszközt biztosítsunk a limfogén áttét kockázatának egyéni valószínűségének előrejelzésére, más megközelítést alkalmaztunk az öt LPC-lipidfaj ((LPC(16:0), LPC(18:0), LPC(18:1), LPC(18:2) és LPC(20:4)) felhasználásával, amelyek az áttétképző útvonallal voltak kapcsolatban (17. ábra A). Az öt lipid kombinált értékeit ROC-analízissel vizsgáltuk, amely 202,46  $\mu\text{mol/l}$  plazma koncentráció határértéket mutatott ki, ami 0,895-ös szenzitivitást és 0,510-es specificitást eredményezett. A mintákat a határérték alapján rétegeztük, és a logisztikus regressziós elemzés azt mutatta, hogy azoknál a betegeknél, akiknél az öt lipid összesített plazma koncentrációja  $>202,46 \mu\text{mol/L}$ , 90,7%-kal nagyobb volt a limfogén metasztázis valószínűsége a hematogén metasztázishoz képest ( $p=0,004$ ; esélyhányados: 0,093; 95%-os megbízhatósági tartomány: 0,018-0,477). A logisztikus regressziós elemzés két lipid, az LPC(16:0) és az LPC(20:4) panelt eredményezett, amelyek figyelemre méltó prediktív képességet mutattak az áttétképződési útvonal típusára vonatkozóan, és a ROC-analízis alapján 0,841-es AUC-pontszámot értek el. E két lipid prediktív értéke nem nőtt, amikor az LPC osztályba tartozó további lipidekkel kombináltuk őket (17. Ábra B).

**A**

	<b>EH</b>	<b>95% MT</b>	<b>p érték</b>
<b>CER(24:0)</b>	0,642	0,449 - 0,917	0,015
<b>LPC</b>	0,989	0,981 - 0,998	0,012
<b>LPC(16:0)</b>	0,983	0,970 - 0,997	0,018
<b>LPC(18:0)</b>	0,955	0,917 - 0,917	0,026
<b>LPC(18:1)</b>	0,915	0,846 - 0,989	0,025
<b>LPC(18:2)</b>	0,924	0,871 - 0,980	0,008
<b>LPC(20:4)</b>	0,763	0,595 - 0,978	0,033
<b>SM(24:0)</b>	0,933	0,874 - 0,996	0,037



**B**

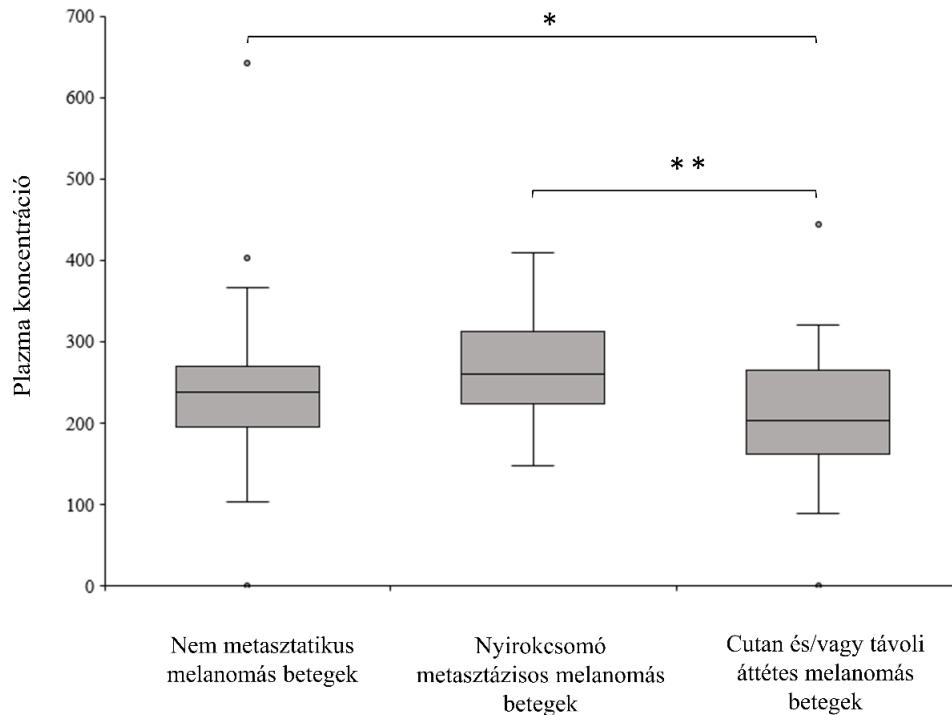


**17. Ábra: A limfogén és hematogén útvonalhoz kapcsolódó lipidek áttétes melanomás betegeknél**

(A) A lipidfajok és a melanoma metasztázis limfogén és hematogén útvonalai közötti összefüggés bináris logisztikus regressziós elemzése. Az esélyhányadosok és a megbízhatósági tartományok forest plot diagramon láthatóak. A fekete négyzettel jelölt lipidek negatív asszociációt mutatnak az áttétképződés hematogén útvonalával. (B) A hét lipid logisztikus regresszióval végzett ROC-görbeelemzése két olyan lipidet (LPC(16:0) és LPC(20:4)) eredményezett, amelyek erősen társultak a melanoma metasztázis hematogén útvonalával.

EH: esélyhányados, MT: megbízhatósági tartomány, \*Nemmel, életkorral korrigálva. A kék vonal a lizofoszfatidilkolinokat (LPC), a piros vonal a referencia vonalat jelöli. FFA: szabad zsírsavak, LPC: lizofoszfatidilkolinok, PC: foszfatidilkolinok, PE: foszfatidiletanolaminok, TAG: triacilglicerinek

Ezen kívül megvizsgáltuk az öt LPC szintjének eltéréseit az áttét nélküli, a regionális nyirokcsomó-metasztázisos és a távoli metasztázisos betegek között. E lipidek szintje emelkedett a regionális nyirokcsomó-metasztázisos betegeknél, és csökkent a távoli metasztázisos betegeknél. Az eredményeket az 5. Ábra foglalja össze.



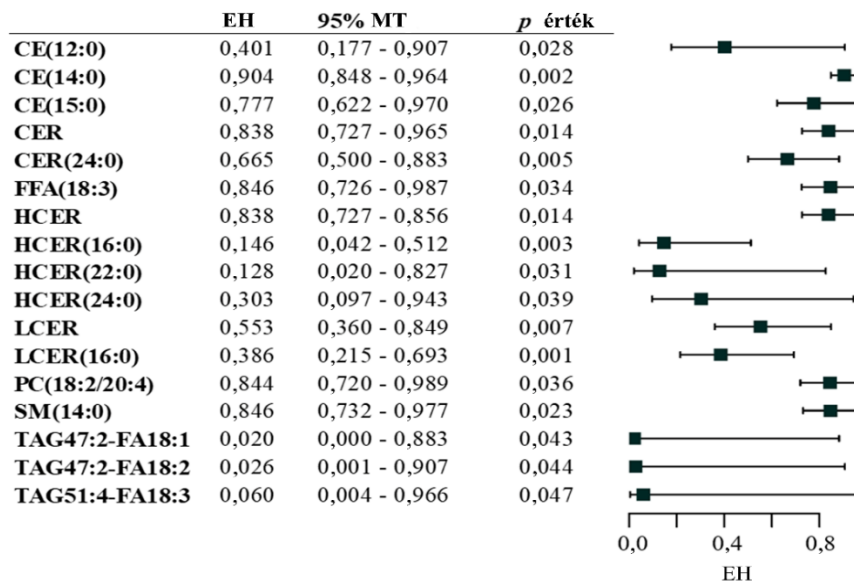
**18. Ábra: A plazma lipidkoncentrációi a melanomás betegek három különböző csoportjában**

Az öt LPC (LPC(16:0), LPC(18:0), LPC(18:1), LPC(18:2) és LPC(20:4)) mennyiségi különbsége a különböző típusú melanoma áttétekhez társítva. Az eredményeket a Kruskal-Wallis teszttel kaptuk. A Dunn-féle post hoc teszt eredményeit a sáv felett mutatjuk be, a szignifikancia szinteket jelezve (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

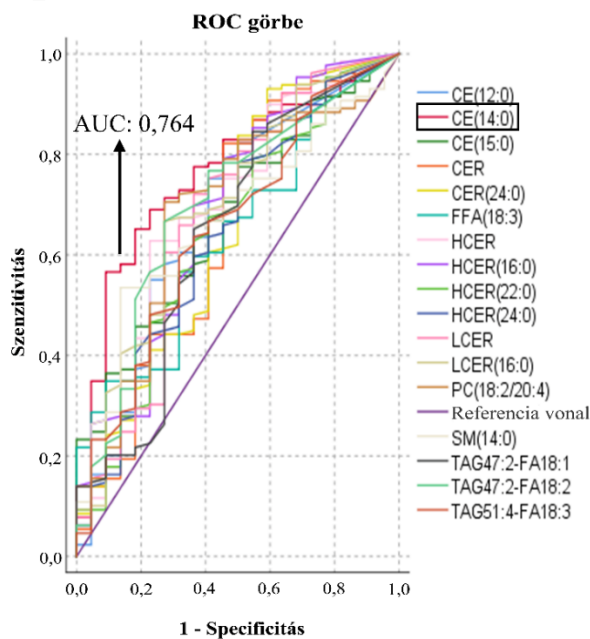
*5.3.4. A melanomás betegek exitusával összefüggésbe hozott lipidek*

Annak ellenére, hogy vizsgálati csoportunkban kevés az elhunyt betegek száma (22 exitus a 129 élő beteghez képest), a két csoport lipid „ujjlenyomatát” is megvizsgáltuk. Tizenhét lipidmolekula csökkent szintje társult a betegek exitusával (19. Ábra A).

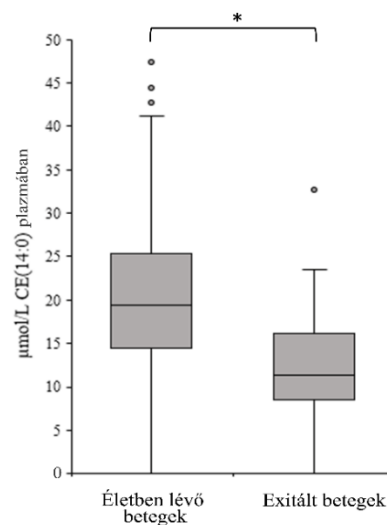
A



B



C



**19. Ábra: Bináris logisztikus regressziós elemzés a lipidek és a melanomás betegek exitusa között**

(A) Az esélyhányadosok és a megbízhatósági tartományok forest plot diagramon láthatóak. A fekete négyzetnek megfelelő lipidek negatív összefüggést mutatnak a betegek exitusával. (B) A betegek exitusával összefüggő lipidpanel ROC-görbe elemzése. A legmagasabb AUC (0,764) a CE(14:0) lipid esetében volt kimutatható. (C) A CE(14:0) lipidszint mennyiségi változásai az exitált (N=22) és az élő (N=129) betegek esetében. Mann-Whitney-Wilcoxon teszt;  $p < 0,05$

EH: esélyhányados, MT: megbízhatósági tartomány, \*Nemmel, életkorral korrigálva

A logisztikus regressziós elemzés eredményeként egyetlen lipid (CE(14:0)) mutatta a legmagasabb AUC-t az összes lipid közül (19. Ábra B, piros vonal), még akkor is, ha más lipidekkel kombinálva használtuk. Az exitált és az élő betegek közötti átlagos CE(14:0) plazma lipidszinteket a 19. Ábra C része mutatja. A CE(14:0) lipid koncentrációja alapján a melanomás betegek plazmájában 18,03  $\mu\text{mol/l}$ -es határértéket számoltunk, az elemzés szerint tehát az e küszöbérték feletti betegek tizenegyszer nagyobb valószínűséggel éltek túl (Mann-Whitney teszt  $p < 0,002$ ; EH: 11,487; MT: 2,501- 52,761).

Összességében a lipidomikai elemzések során a legjelentősebb megállapítás, a 3 lipidből (CE(12:0), FFA(24:1), TAG47:2-FA16:1) álló panel csökkent plazma szintje kombinálva az emelkedett szérum S100B és LDH szintekkel alkalmas lehet a metasztázis valószínűségének előrejelzésére.

## 6. Megbeszélés

Napjainkban a metasztatikus melanoma 5 éves túlélési rátája célzott BRAF-MEK-inhibitor terápia esetén 31-34%, anti-PD1-gátló kezeléssel 42-43%, kombinált anti-CTLA-4 és anti-PD-1 terápia esetén 46-57% [70-72]. Egyre nagyobb szükség lenne olyan perifériás vér biomarkerekre, amelyek a magas kockázatú vagy áttétes melanomás betegek monitorizálására alkalmasak lennének a túlélés javítása érdekében. Mindemellett a melanoma II.B stádiumától kezdve indokolt a kezdeti és a rendszeres utánkövetés képalkotó vizsgálatok, lehetőleg komputertomográfiás vizsgálatok formájában [73].

### **6.1. Kutatómunkánk első részében megvizsgáltuk a három perifériás vér biomarker, az LDH, az S100B és az OPN diagnosztikus hatékonyságát a metasztázis, a relapszus detektálásában és ezen eredményeket a meglévő irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze.**

A glikolízistől függő tumorsejtekben a laktáttermelés jelentősen megnő a piruvátot laktáttá alakító LDH fokozott expressziója és aktivitása miatt. A tumorsejtek által exportált laktát elősegítheti az angiogenezist, az áttétképzést, a terápiás rezisztenciát és az immunszuppressziót [74]. A malignus sejtekben az oxigéndúsabb tumorperiférián a laktátot energiaforrásként hasznosítják, ehhez a laktátot az LDH-n keresztül piruváttá kell átalakítani [74, 75]. Az előrehaladott melanomában szenvedő betegeknél az emelkedett szérums LDH szint elsősorban a glikolitikus tumorsejtekből (LDH 3 és 4) történő felszabadulásnak köszönhető [75]. Az LDH egy nem szekretált citoplazmatikus enzim. Ezért a megnövekedett szérums koncentráció előrehaladott stádiumú melanomás betegeknél a tumor nekrozisához társul. Az emelkedett LDH szintet kedvezőtlen prognózissal hozták összefüggésbe [11]. Egy 121 beteg bevonásával végzett vizsgálatban az LDH specificitása a regionális vagy távoli áttétek jelenlétének megerősítésére (III-IV. stádiumú betegek) 92,2%, szenzitivitása pedig 41,9% volt [54]. Bánfalvi és munkatársai vizsgálatában az LDH 41,6%-os szenzitivitást, 80%-os specificitást, 95,9%-os pozitív prediktív értéket és 10,9%-os negatív prediktív értéket mutatott III-IV.

stádiumú melanomás betegeknél [76]. Mivel az LDH szint a melanomától eltérő betegségekben is emelkedhet, a fals pozitív esetek gyakoribbak. Továbbá azt is kimutatták, hogy korai stádiumban kevésbé érzékeny, mint előrehaladott betegségben [77]. Vizsgálatunkban a szérumszintek LDH szintek szignifikáns hatást ( $p=0,019$ ) mutattak az áttétképződés valószínűségére az egyváltozós logisztikus regressziós elemzésben, ez a hatás azonban nem érvényesült a többváltozós logisztikus regressziós modellben. A szérumszintek LDH diszkriminatív ereje, ahogyan azt az AUC jelzi, csak 0,575 volt.

Az intracelluláris S100 fehérjék  $Ca^{2+}$ - és  $Zn^{2+}$ -szenzorok, amelyek számos fehérjeinterakcióban vesznek részt, és számos sejtfolyamatot szabályoznak, beleértve a transzkripciót, a fehérjefoszforilációt, a motilitást, az energiaanyagcserét, amelyek befolyásolhatják a tumor növekedését [78]. Ezenkívül az extracelluláris S100B egy károsodással kapcsolt fehérje, amely elősegítheti a tumor progresszióját azáltal, hogy hozzájárul a malignus folyamathoz kapcsolódó gyulladáshoz, vagy a fejlett glikációs végtermékek receptorain keresztül jelátviteli útvonalakat aktivál a melanómasejtekben [78]. A melanómában az emelkedett szérumszintek S100B szintek fő forrása a károsodott/necrotikus sejtekből történő passzív felszabadulás, azonban ugyanez a tumorterhelés nem feltétlenül felelős az S100B szérumszint emelkedésért [78]. Melanomás betegeknél a szérumszintek S100B szintjének emelkedése az apoptózis vagy nekrozis okozta sejthalál és fehérjebontás következménye. Ezek a szintek korrelálnak a melanoma stádiumával: az I. és II. stádiumban jellemzően alacsonyabb szinteket mérnek, míg a szérumszintek előrehaladottabb esetekben emelkednek [79]. Továbbá szignifikáns korrelációt figyeltek meg a Breslow-féle tumorvastagság és a szérumszintek S100B-szintek között a III. stádiumú melanomás betegeknél. A mélyebb szöveti rétegeket érintő, invazívabb tumorról rendelkező betegeknél magasabb S100B koncentrációt mértek [77, 80], a legmagasabb értékeket a IV. stádiumban észlelték. Így a szérumszintek S100B nem biztos, hogy megbízható markerként szolgál a melanoma korai diagnózisában. Ugyanakkor értékesnek

bizonyult a betegek követése során a progresszió kimutatásában a tünetmentes betegeknél. Érdeemes megjegyezni, hogy bár az S100B az LDH-hoz képest nagyobb specificitással bír a melanoma esetében, emelkedett S100B szintek számos más betegségben is jellemzőek, többek között szív-, és érrendszeri betegségekben, májcirrózisban, migrénben, emlőrák, vitiligo, SARS-CoV-2 fertőzés, agy-, máj- vagy vesekárosodás esetén [13-15, 77]. Emellett a szérumban S100B szintje általában emelkedett a központi idegrendszerrel kapcsolatos kóros állapotokban, neurodegeneratív betegségekben, bizonyos pszichiátriai rendellenességekben, valamint agydaganatok, agyi áttétek, beleértve a melanoma agyi metasztatizisokat is [79]. A relapszus és a progresszió korai detektálása kiemelkedő jelentőséggel bír a prognózis szempontjából, mivel a megkésett felismerés gyakran rosszabb túlélési esélyekhez vezet. A szérumban S100B szintjének mérése hasznos lehet a relapszus korai felismerésében. A melanoma relapszus előrejelzésére az S100B és a különböző képalkotó technikákat összehasonlító első tanulmányt 2006-ban végezték el 192 melanomás beteg bevonásával [12]. Ezeknek a betegeknek közös jellemzője volt, hogy egy tumormentes időszakot követően relapszust észleltek. Közülük 127 betegnél a képalkotással párhuzamosan S100B mérést is végeztek. Figyelemre méltó, hogy e betegek 37%-ának emelkedett volt az S100B szintje a relapszus idején. A III. stádiumú betegek 32%-ának volt magasabb a szérumszintje, a IV. stádiumba való progresszió során pedig ez az érték 48%-ra emelkedett. Fontos, hogy a betegek 5,5%-ánál az emelkedett S100B szint volt a progresszió kezdeti jele. Ezzel szemben a képalkotó technikák csak az esetek 26,8%-ában mutatták ki a melanoma kiújulását. Ezek az eredmények határozottan arra utalnak, hogy az S100B specifikus és érzékeny markerként szolgál a melanoma progressziójának kimutatására [12]. 2011-ben jelent meg egy tanulmány, amelyben összehasonlították az S100B és a PET-CT jelentőségét metasztatikus melanomás betegeknél [81]. E megfigyelések alapján a szérumban S100B mérése a melanomás betegek követése során értékes eszköz a betegség progressziójának kimutatására tünetmentes egyéneknél. Diagnosztikai értéke tovább fokozódik, ha ezeket a

méréseket PET-CT-vizsgálatok követik [81]. Egy másik tanulmány kimutatta, hogy az S100B 54,1%-os szenzitivitással, 93,3%-os specificitással, 98,9%-os pozitív prediktív értékkel és 15,3%-os negatív prediktív értékkel rendelkezik a III-IV. stádiumú melanomák esetében [76]. Az emelkedett S100B szintek melanomás betegeknél szignifikánsan rosszabb túléléssel járnak együtt [16, 77]. Mindazonáltal továbbra is nyitott kérdés, hogy a szérumban S100B szint mérése mennyire alkalmas a melanoma relapszusának kimutatására [79], és továbbra sincs konszenzus a perifériás vérvétel szükségességére vonatkozóan melanomás betegek követése során [12, 25, 26, 82].

Vizsgálatunkban a szérumban S100B szint mind az egyváltozós ( $p < 0,001$ ), mind a többváltozós ( $p = 0,020$ ) logisztikus regressziós elemzésben szignifikáns hatást mutatott az áttétképződés valószínűségére. Sőt, a szérumban S100B diszkriminatív ereje az áttétes betegség azonosításában erősebb volt, mint a szérumban LDH-é, bár az AUC még a szérumban S100B esetében sem érte el a 0,7-et. Figyelemre méltó, hogy a ROC-optimalizált cut-off érték a szérumban S100B esetében alacsonyabb volt, mint a gyártó által megadott „cut-off” érték. Ez azért fontos, mert a „cut-off” érték befolyásolja a diagnosztikai tesztre megállapított érzékenységet és specificitást. Ezzel szemben a szérumban LDH ROC-optimalizált határértéke megegyezett a helyi laboratórium által meghatározott felső normális határértékkel (ULN).

Eredményeink megerősítik további, kiegészítő perifériás biomarkerek azonosításának szükségességét a melanomás betegek metasztázisainak, relapszusának megbízhatóbb diagnosztizálására érdekében.

Az OPN egy 314 aminosavból álló glikofoszfoprotein. Számos magasan konzervált kötőhelyet tartalmaz, amelyek lehetővé teszik a sejtfelszíni és más molekulákhoz való kötődését [18, 83]. Ezekben a kölcsönhatásokon keresztül döntő szerepet játszik a tumorigenezis és a progresszió, valamint a különböző jelátviteli útvonalak, köztük a MAPK (mitogén-aktivált proteinkináz), az

NF- $\kappa$ B (nucleáris faktor kapa B) útvonal és az ERK (extracelluláris szignál által regulált kináz) jelátvitel szabályozásában. Fokozott expressziót mutat osteoblastokban, osteoclastokban, vázizomsejtekben, endothelsejtekben és bizonyos carcinoma sejtekben [18, 83]. A tumorok kialakulásában és progressziójában kifejtett hatásának pontos mechanizmusa még mindig nem tisztázott. Azonban döntő szerepet játszik különböző folyamatokban, beleértve a sejtadhéziót és sejt migrációt, az immunválasz szabályozását, az extracelluláris mátrix (ECM) interakciót, és a tumorsejtek motilitásának, az angiogenezisnek, a tumor növekedésének, az apoptózis gátlásának, az invázióknak és a metasztázisnak a meghatározójaként szolgál [18, 83]. Vizsgálatok kimutatták, hogy az OPN expressziója mind mRNS-, mind fehérjeszinten emelkedett a vastag melanomákban, és ulcerált melanomákban [19, 84]. Balázs Margit és munkatársai által nemrégiben végzett tanulmány során szignifikánsan megnövekedett OPN (mRNS) expressziót figyeltek meg a melanoma metasztázisokból származó sejtvonalakban a primer melanomákból származó sejtvonalakhoz képest. Emellett szignifikánsan emelkedett OPN génextpressziót találtak a BRAFV600E mutációt hordozó melanoma sejtvonalakban [20]. Egy másik vizsgálatban az OPN plazmakoncentrációja szignifikánsan magasabb volt metasztatikus melanomás betegeknél, mint a nem metasztatikus betegeknél [21]. Egy 2018-as vizsgálat eredményei pedig arra utalnak, hogy az OPN immunellenőrző pontként is működik, és célpontként szolgálhat az immunellenőrzőpont-gátló terápia hatékonyságának növelése céljából [85].

Hasonló eredményeket kaptunk az általunk vizsgált betegpopulációban is, a metasztatikus csoportban szignifikánsan magasabb volt az OPN szintje ( $p=0,002$ ) a nem metasztatikus csoporthoz képest. Emellett a plazma OPN szintje mind az egyváltozós ( $p<0,001$ ), mind a többváltozós ( $p<0,001$ ) logisztikus regressziós elemzésben szignifikáns hatást mutatott az áttétképződés esélyére. A plazma OPN diszkriminatív ereje az áttétes betegség azonosításában

nem volt erősebb, mint a szérum S100B-é, és az AUC-értékek hasonlóak voltak a szérum S100B és a szérum OPN esetében.

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a primer tumor alsó végtagi lokalizációja és az AJCC 8. kiadásának pT2b-pT3a, pT3b-pT4a és T4b kategóriái független meghatározói az áttétképződés fokozott valószínűségének. Korábbi megfigyelések szerint a primer melanoma fej-nyaki és törzsi lokalizációja kedvezőtlenebb kimenetellel jár, mint a végtagi lokalizáció [86]. Ezzel ellentétben egy 2023-as tanulmány eredményeinek megfelelően a fej-nyaki vagy az alsó végtagi lokalizáció magasabb rizikójú melanomának tekinthető [87]. Egy másik 2023-as vizsgálatban pedig különbséget tettek az alsó végtagi elhelyezkedésen belül a proximálisabb és a distálisabb melanomák között, eredményeik szerint az utóbbiak szignifikánsan rosszabb prognózissal járnak [88]. Munkacsoportunk által 2024-ben közölt vizsgálati eredmények szerint melanomás betegpopulációnkban a végtagi lokalizációjú melanomák progressziójának rizikója szignifikánsan magasabb volt, mint törzsi lokalizáció esetén [89]. Ezen a területen az irodalom tehát nem egységes, korábbi megfigyelések a végtagi lokalizációt kedvezőbb prognosztikai faktornak vélték, újabban azonban az alsó végtagi lokalizációt kedvezőtlenebb paraméternek tartják, a mi vizsgálataink is erre engedtek következtetni. Vizsgálataink során az olyan tényezők, mint az életkor, a nem, a szövettani altípusok és a BRAF-mutációs státusz nem voltak szignifikáns hatással az áttétképződés esélyére. A diagnosztikai hatás (az áttét predikciója) fokozása érdekében megvizsgáltuk a három perifériás biomarker kombinációját a primer tumor lokalizációjával és az AJCC 8. kiadásának pT kategóriájával. Eredményeink azt mutatták, hogy a primer tumor lokalizációjának és a pT-kategóriának a bevonása jelentősen javította az összes biomarker diszkriminatív erejét az áttétes betegség azonosításában (AUC~0,8). Az AUC a szérum S100B-t, LDH-t, OPN-t, tumorlokalizációt és T kategóriát kombináló modellben volt a legerősebb. Míg azonban a szérum S100B mérése a legtöbb kórházban rutinszerűen elérhető, a

plazma OPN mérése nem. Az AUC hasonlóan erős volt, amikor az OPN-szintet kihagytuk a kombinált modellből.

## **6.2. Az eddigi irodalmi adatokat áttekintve meta-analízissel összehasonlítottuk a szérumban S100B és a szérumban LDH prognosztikai (túlélés predikciója) és diagnosztikai (relapszus predikciója) képességét melanomás betegekben.**

A meta-analízisben a betegség kiújulásának helyes azonosítására vonatkozó összevont AUROC szignifikánsan magasabbnak bizonyult a szérumban S100B esetében, mint a szérumban LDH esetében, ami azt jelzi, hogy a szérumban S100B alkalmasabb marker a tumor kiújulásának detektálására a melanomás betegek követése során. Megjegyzendő, hogy az S100B az egyetlen olyan szérumban biomarker, amelynek jelentőségét elegendő adat támasztja alá, és amely a legtöbb kórházban rutinszerűen rendelkezésre áll. A szérumban S100B emelkedett szintje azonban számos betegségben előfordul [20]; ezért az S100B monitorozása elsősorban a magas relapszus rizikójú melanomás esetekben ajánlott. Mindazonáltal, amikor egy előre meghatározott határértéket (a normálérték felső határát vagy a ROC-optimalizált értéket) használták, a két marker hasonlóan és magas specificitással rendelkezett és mérsékelten szenzitívnek bizonyult, a szérumban S100B szenzitivitása azonban szignifikánsan magasabb volt a szérumban LDH-hoz képest. Ez az eredmény arra utal, hogy a szérumban S100B monitorozása hatékonyabban jelezheti a képződő vizsgálat szükségességét a betegség relapszusának korábbi felismerése érdekében, mint a szérumban LDH monitorozás. További vizsgálatokra van szükség mind klinikai vizsgálatokban, mind valós populációban annak tisztázására, hogy a mérési módszer, a határérték, a referencia vizsgálat és a betegpopuláció hogyan befolyásolja a szérumban S100B pontosságát a betegség kiújulásának kimutatásában. Ezek a vizsgálatok feltárhatják a meta-analízisünkben megfigyelt jelentős heterogenitás forrásait is [80]. Mindazonáltal a melanoma biológiai viselkedését tekintve heterogén, ezért egyetlen, széles körben használható biomarker azonosítása nehéz [90]. További vizsgálatokra és további biomarkerek azonosítására van szükség, amelyek a szérumban

S100B-vel kombinálva használhatók, hogy növeljék a relapszus korai felismerésének az esélyét [18].

Az áttétes melanomás betegek egy alcsoportjában a szérumban S100B szintje nem volt emelkedett, és a szérumban S100B prognosztikai hatásáról számos tanulmány jelent már meg [12, 91-95]. A szérumban S100B áttétes betegség azonosításában mutatott erős diszkriminatív képessége miatt csak olyan vizsgálatokat választottunk ki a prognosztikai hatás elemzéséhez, amelyekben áttétes betegek szerepeltek. Meglepő módon nagyon kevés alkalmas tanulmányt azonosítottunk, mivel ebben a témában a többváltozós elemzések ritkák, a betegek kiválasztása torzított, és a prognosztikai tanulmányokban a kimeneteket illetően jelentős jelentési torzítás tapasztalható. Eredményeink szerint az emelkedett S100B szint hasonlóan magasabb halálozási kockázattal rendelkezett, mint az emelkedett LDH szint, azaz a szérumban S100B-nek hasonló prognosztikai értéke van, mint a szérumban LDH-nak metasztatikus melanomás betegeknél. Fontos, hogy a szérumban LDH és S100B emelkedett szintjével párosuló eltérő biológiával összhangban a meta-analízisbe bevont tanulmányok azt jelezték, hogy a két marker prognosztikai képessége független.

A 6 tanulmány adatainak kvantitatív elemzése 1033 cutan melanomás beteget foglalt magába. A szérumban S100B diszkriminatív képessége a betegség relapszusának azonosítására (összevont ROC alatti terület (AUROC) 78,64 [95% CI 70,28; 87,01]) szignifikánsan nagyobb volt, mint a szérumban LDH diszkriminatív képessége (AUROC 64,41 [95% CI 56,05; 72,78]) ( $p=0,013$ ). A halálozási kockázat elemzésébe tíz, 1987 beteget tartalmazó tanulmányt vontunk be. A szérumban S100B prognosztikus hatása (összevont kockázati arány (HR) 1,78 [95% CI 1,38; 2,29]) független volt, és hasonló, mint a szérumban LDH-é (HR 1,60 [95% CI 1,36; 2,29]).

A meta-analízis újdonsága az összehasonlító megközelítés, a több kimenetel elemzése és a logisztikus regressziós modellek bevonása volt. Továbbá az eredmények olyan

betegpopulációk adatainak elemzéséből származtak, amelyekben minden vizsgált kimenetel esetében több mint 1000 beteg adatai szerepeltek.

**6.3. További biomarkereket keresve megvizsgáltuk melanomás betegpopulációnk plazma lipidomját 13 lipidosztályra és több mint 1100 lipidre kiterjedő kvantitatív lipidomikai profilalkotó analízissel „state of the art” Lipidyzer™ -t használva.**

A diszregulált lipidanyagcsere gyakran megfigyelhető a tumorok különböző típusaiban [96]. Ezt a jelenséget kétféleképpen lehet kihasználni. Az egyik megközelítés a rezisztens tumorok célba vétele, amelyek leggyakrabban a megváltozott lipidútvonalakon keresztül nehezítik a terápia hatékonyságát. Ez mind a célzott, mind az immunterápiában alkalmazható [97-99]. A másik megközelítés az, hogy potenciális biomarkerekként tekintünk rájuk a diagnózis megerősítése, a betegség progressziójának nyomon követése és a kimenetel előrejelzése céljából [100, 101]. Kutatómunkánk ezen részében a melanoma áttétképződéssel összefüggő lipidmarkerek azonosítását tűztük ki célul, ezen kívül megvizsgáltuk az áttétképződési folyamat típusát (limfogén vagy hematogén) és a betegség mortalitását a lipidom eltérésekkel összefüggésben.

A daganatos betegek plazmalipidjeinek a változásainak leírásakor jellemzően csak a koleszterin változásáról számolnak be. Figyelemre méltó, hogy a tumoros betegek plazmája gyakran csökkent HDL-szintet mutat, és az emelkedett LDL-szinthez fokozott áttétképződési kockázat társul [53, 102-104]. Lipidomikai adataink a teljes plazmalipidek jelentős csökkenését jelzik a melanoma-metasztázisos betegeknél, amit a 13 lipidosztályon belüli százalékos megoszlás változásai kísérnek. A lipidosztályok közül az FFA és az LCER jelentős csökkenését észleltük az áttétes melanomás betegeknél. Az FFA-szintek csökkenése meglepőnek tűnhet, mivel számos tanulmány számolt be emelkedett FFA-szintekről különböző daganatos betegségben, többek között prosztatákban, tüdőrákban, gyomorrákban, pajzsmirigyrákban,

vastagbélrákban, petefészekrákban, B-sejtes limfómában és emlőrákban [105-107]. A laktozilceramidok szintjének szintén jelentős csökkenését figyeltük meg az áttétes melanomás betegek plazmájában. A szfingolipidek ezen osztálya arról ismert, hogy a sejtek fokozott túlélésével, proliferációjával, adhéziójával és inváziójával állnak kapcsolatban, ezáltal elősegítve a tumor progresszióját [108, 109].

Funkcionálisan a lipidek a metasztatikus kaszkád több szakaszában is szerepet játszanak. Különböző típusú malignus betegségekben a zsírsavfelvételhez, a lipidfelhalmozódáshoz és más zsírsav-metabolizmus folyamatokhoz kapcsolódó gének túlzott expresszióját összefüggésbe hozták a fokozott invazivitással, migrációs tulajdonságokkal és a tumorsejtek távoli szervekben történő metasztatizáló képességével [110-112]. Ezek a változások különböző daganatos betegeknél metasztatikus progresszióval és rossz prognózissal járnak együtt [111]. Számos esetben a plazma lipidszintjei fordítottan arányosak voltak az áttétképződés jelenlétével és a rosszabb prognózissal, csak néhány kivételtől eltekintve. A legvalószínűbb magyarázat erre a jelenségre az, hogy a tumorsejtek intracellulárisan halmozzák fel ezeket a lipideket, hogy támogassák túlélésüket és proliferációjukat, és ezáltal korlátozzák a véráramba való felszabadulásukat. A koleszterinszintetizáló 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-reduktáz (HMGCR) enzim által szabályozott felesleges celluláris koleszterinszintet az acetil-koenzim-A-koleszterin-acetiltranszferáz 1 (ACAT1) enzim koleszteril-észterekké alakítja, és olyan transzporterekkel keresztül, mint az ATP-kötő kazetta A-1 (ABCA1), eltávolítja az intracelluláris terekből [113-115].

Hartmann és munkatársai tüdődaganatokban az intracelluláris koleszterinészterek felhalmozódásáért felelős enzimek (HMGCR és ACAT1) túlzott reprezentációját találták, a felszabadulásukért felelős transzporter (ABCA1) downregulációjával együtt [116]. Ez megerősíti a mi eredményeinket, ahol a különböző koleszterinészterek, például a CE(12:0), CE(14:0) és a CE(15:0) csökkent plazmaszintje az áttétképződés és - nem meglepő módon - a

betegség mortalitásának fokozott kockázatával járt együtt. Ez a jelenség összhangban van más lipidekkel kapcsolatos megfigyeléseinkkel. Figyelemre méltó, hogy metasztatikus melanomás betegek plazmamintáiban több TAG-lipid jelentős csökkenését is észleltük, hasonlóan a hepatocelluláris carcinoma esetén tapasztalt csökkent szérumszintekhez [117, 118]. Ez a csökkenés a tumor által termelt pro-inflammatorikus citokinek, például az interleukin-1 (IL-1) következménye lehet, amely késlelteti a bélrendszeri felszívódást és csökkenti a szöveti lipidfelvételt. Az interleukin-2 (IL-2) viszont a lecitin-koleszteril-aciltranszferáz (LCAT) aktivitásának gátlása révén hipokoleszterinémiát idézhet elő [119, 120].

Tekintettel arra, hogy a daganatok a vénás kapillárisokba (hematogén útvonal) vagy a nyirokrendszerbe (limfogén útvonal) történő intravazáció révén adhatnak áttétet, az intravazációs folyamatot befolyásoló markerek azonosítása jelentős klinikai jelentőséggel bír a prognózis és a kezelés szempontjából. A LPC a PC-kből a foszfolipáz A2 segítségével származik, és glicerofoszfolinná és FFA-vá bomlik le, amit az extracelluláris lizofoszfolipáz A1 és A2 katalizál [121]. Az LPC képes modulálni az ionkoncentrációt, beleértve a  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -t, a G-protein-csatolt és Toll-like receptorokhoz való kötődés révén. Fontos, hogy az LPC indukálhatja a limfociták és makrofágok migrációját, növelheti a pro-inflammatorikus citokinek termelését, oxidatív stresszt idézhet elő, valamint elősegítheti az apoptózist, a gyulladást és a betegségek kialakulását [122]. Ismert, hogy különböző malignus betegségekben, például prosztatata carcinoma, akut leukémia és tüdő carcinoma esetében a plazma foszfolipid és LPC szintje csökken, és ez a csökkenés korrelál a tumor progressziójával, ami ígéretes biomarkerré teszi [53, 123-127]. Vizsgálatunkban megfigyeltük, hogy a nyirokcsomó metasztázisos betegeknél az LPC-k teljes mennyisége magasabb volt, mint a metasztázis nélküli betegeknél, de a legalacsonyabb szintet a távoli metasztázisos betegek plazmájában mutattuk ki. Ezek a kiemelkedő LPC-fajok, mint a palmitoil, oleoil, linoleoil és arachidonoil-lizofoszfátidilkolin (LPC 16:0, 18:1, 18:2 és 20:4), inkább a regionális nyirokcsomó-

metasztázis, mint a hematogén metastázis prediktív markereként szolgálnak. Ezek az LPC-k a humán plazmában a legnagyobb mennyiségben előforduló anyagok közé tartoznak [128], és mindegyikük képes a COX-2 expressziójának indukálására [129], amelyről ismert, hogy számos malignus betegség esetén a nyirokcsomó-metasztázishoz kapcsolódik [130, 131]. A nyirokcsomók ilyen jellegű érintettsége azzal magyarázható, hogy míg a COX-1 állandó expressziót tart fenn, addig a COX-2 gyorsan indukálható, szigorúan szabályozott és gyulladás során jelentősen megnő a kifejeződése [132]. Korábbi tanulmányok kiemelték a COX2 gátlásával járó invazivitás csökkenését, ami ígéretes célpontot jelent [133-135]. Kutatásaink arra utalnak, hogy a nyirokcsomó-metasztázis kialakulása a zsírsavak szintjén is kezdődhet és összefügghet az általunk leírt LPC-kkel.

Tanulmányunkban több lipidosztályt azonosítottunk az exitált és a túlélő betegek közötti lipid különbségekben. A csökkent CE(14:0)-szint szignifikánsan magasabb halálozási kockázattal járt együtt, hasonlóan más koleszteril-észterekhez, beleértve a CE(12:0)-t és a CE(15:0)-t, amelyeket szintén kimutattunk, amikor az áttét nélküli és az áttétes betegeket hasonlítottuk össze. A plazmában a koleszterin két formában, szabad koleszterin (Chol) és CE formájában van jelen. A Chol CE-vé történő észteresítése mind a bél-, mind a májsejtek endoplazmatikus retikulumában történik, és egy acilCoA-koleszteril-aciltranszferáz (ACAT) katalizálja [136]. A CE szintjének változása a CE metabolizmusában részt vevő gének expressziójának megváltozására vezethető vissza. Például vastagbélrák (CRC) esetén Liu és munkatársai a tumoros betegeknél a CE hidrolíziséért felelős lizoszomális savas lipáz (LAL) szignifikánsan magasabb szintjéről számoltak be. Ezzel szemben a CE szintéziséért felelős acil-CoA:koleszterin aciltranszferáz 1 (ACAT1) csökkent szintje negatívan korrelált a CRC progressziójával, mivel az alacsonyabb ACAT1 immunhisztokémiai (IHC) pontszámok a CRC előrehaladottabb klinikai stádiumaival álltak összefüggésben [137].

Összefoglalva, a melanomák különböző prognosztikai paramétereinek összehasonlításakor a lipidek közötti átfedéseket vizsgáltuk. A tumorigenezissel összefüggő lipidomikai változások átfogó megértéséhez elengedhetetlen a normál szövet, a tumorszövet és a plazma/szérum lipidmintázatainak egyidejű vizsgálata, mivel ezek a változások nem mindig ugyanabba az irányba mennek végbe [138].

Vizsgálataink során korlátként említjük a kis esetszámot és az egycentrikus minta elemzést.

## Összefoglalás

Kutatómunkák első részében melanomás betegpopulációnkban kapott eredményeink arra utaltak, hogy a primer tumor lokalizációjának, az AJCC 8. kiadás pT kategóriájának, valamint a szérumban S100B- és az LDH-szinteknek a kombinált értékelése megbízható markerként szolgálhat az áttétek előrejelzésében. A plazma osteopontin szintje szignifikáns és független hatást mutatott a metasztázis valószínűségére vonatkozóan, hasonlóan a szérumban S100B szinthez. Vizsgálataink során a primer tumor alsó végtagi lokalizációja szignifikáns független befolyásoló tényező volt az áttét valószínűségére vonatkozóan. Fontos, hogy a három perifériás vér biomarker, valamint a primer tumor lokalizációja és az AJCC pT-kategória kombinációja kiváló diszkriminatív képességet eredményezett (AUC tréning csoport: 0,803; validációs csoport: 0,822). A plazma OPN melanoma biomarkernek minősíthető, továbbá a klinikopatológiai prognosztikai változók kombinálásával a perifériás vér biomarkerek diagnosztikus hatása javítható a metasztázis előrejelzésére vonatkozóan.

Meta-analízisünkben a szérumban S100B és a szérumban LDH alkalmazhatóságát vizsgáltuk a melanoma progressziójának előrejelzésére mind diagnosztikai, mind prognosztikai szempontból. Azt találtuk, hogy a szérumban S100B diszkriminatív képessége a betegség relapszusának azonosításában nagyobb volt, mint a szérumban LDH-é. Mivel a melanoma relapszusa csak a betegek egy részében fordul elő, ezért a szérumban S100B-t további szérumban biomarkerekkel kombinálva kell figyelembe venni egy többváltozós diagnosztikus előrejelző modellben. Továbbá a szérumban S100B hasonló és független prognosztikai erővel rendelkező metasztázis melanomában, ahogy a szérumban LDH is, ami arra utal, hogy mindkét marker alkalmazása előnyös lenne egy többváltozós prognosztikai előrejelző modell kidolgozásában.

Kutatómunkánk harmadik részében melanomás betegpopulációnk plazma mintáiból lipid eltéréseket elemeztünk. Célunk volt további biomarkerek azonosítása, amelyeket

kombinációban, vagy önmagukban alkalmazva növelhetik a betegség relapszus korai felismerésének az esélyét. Eredményeink során a metasztatikus betegek mintáinak lipiddtartalma szignifikánsan alacsonyabb volt az áttét nélküli betegek plazma mintájához képest. Ezen belül két lipidosztályban (FFA, LCER) a lipidek szignifikánsan alacsonyabb szintjét találtuk az áttétes betegek plazma mintáiban. Továbbá egy 3 lipidből (CE(12:0), FFA(24:1), TAG47:2-FA16:1) álló panel, a szérum S100B és a szérum LDH szintek kombinációja kiváló diszkriminatív képességet eredményezett a metasztázis valószínűségének előrejelzésére.

## Summary

In the first part of our research in our melanoma patient population, our results suggested that the combined assessment of primary tumor location, AJCC 8th edition pT category, and serum S100B and LDH levels may serve as reliable markers for predicting metastases. Plasma osteopontin (OPN) levels showed a significant and independent effect on the probability of metastasis, similar to serum S100B levels. Additionally, lower limb localization of the primary tumor was associated with an increased likelihood of metastasis. Importantly, combining the three peripheral blood biomarkers with primary tumor localization and AJCC pT category resulted in excellent discriminative ability (AUC: training set 0.803; validation set 0.822). While plasma OPN can be considered a melanoma biomarker, incorporating clinicopathological prognostic variables can further improve the diagnostic impact of peripheral blood biomarkers for predicting metastasis.

In our meta-analysis, we investigated the applicability of serum S100B and serum LDH for predicting melanoma progression from both diagnostic and prognostic perspectives. We found that the discriminative ability of serum S100B to identify disease relapse was greater than that of serum LDH. Because melanoma relapse is associated with elevated serum S100B levels in only a subset of patients, S100B should be considered in combination with additional serum biomarkers within a multivariate diagnostic predictive model. Furthermore, serum S100B demonstrated prognostic power similar to and independent of serum LDH in metastatic melanoma, suggesting that using both markers would be beneficial in developing a multivariate prognostic predictive model.

In the third part of our research, we analysed lipid abnormalities in plasma samples from our melanoma patient population. Our aim was to identify additional biomarkers that, alone or in combination, may improve early detection of disease relapse. The lipid content of samples from metastatic patients was significantly lower than that of plasma samples from patients without

metastases. We found significantly lower levels of lipids in two lipid classes (FFA, LCER) in plasma samples from metastatic patients. Specifically, a lipid panel consisting of three lipids (CE(12:0), FFA(24:1), TAG47:2-FA16:1), when combined with elevated S100B and LDH levels, may be useful for predicting the probability of metastasis.

## Irodalmi hivatkozások

1. Che G, Huang B, Xie Z, Zhao J, Yan Y, Wu J, Sun H, Ma H. Trends in incidence and survival in patients with melanoma, 1974-2013. *American journal of cancer research*. **2019**;9(7):1396-414.
2. IARC. International Agency for Research on Cancer, 2017 Lyon. <http://www.iarc.fr/>; (last accessed 15 Jan 2018); 2017 [
3. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *The British journal of dermatology*. **2014**;170(1):11-9. doi:10.1111/bjd.12492.
4. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *The Surgical clinics of North America*. **2020**;100(1):1-12. doi:10.1016/j.suc.2019.09.005.
5. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. **2017**;67(6):472-92. doi:10.3322/caac.21409.
6. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. **2009**;27(36):6199-206. doi:10.1200/jco.2009.23.4799.
7. Liskay G, Benedek A, Polgár C, Oláh J, Holló P, Emri G, Csejtei A, Kenessey I, Polányi Z, Knollmayer K, et al. Significant improvement in melanoma survival over the last decade: A Hungarian nationwide study between 2011 and 2019. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. **2023**;37(5):932-40. doi:10.1111/jdv.18960.
8. Kamińska P, Buszka K, Zabel M, Nowicki M, Alix-Panabières C, Budna-Tukan J. Liquid Biopsy in Melanoma: Significance in Diagnostics, Prediction and Treatment Monitoring. *Int J Mol Sci*. **2021**;22(18). doi:10.3390/ijms22189714.
9. Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, Lonati V, Barni S. Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta Oncol*. **2015**;54(7):961-70. doi:10.3109/0284186x.2015.1043026.
10. Petrelli F, Ardito R, Merelli B, Lonati V, Cabiddu M, Seghezzi S, Barni S, Ghidini A. Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma research*. **2019**;29(1):1-12. doi:10.1097/cmr.0000000000000520.
11. Perrotta R, Bevelacqua Y, Malaguarnera G, Paladina I, Giordano M, Malaguarnera M. Serum markers of cutaneous melanoma. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. **2010**;2(3):1115-22. doi:10.2741/e170.
12. Beyeler M, Waldispühl S, Strobel K, Joller-Jemelka HI, Burg G, Dummer R. Detection of melanoma relapse: first comparative analysis on imaging techniques versus S100 protein. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. **2006**;213(3):187-91. doi:10.1159/000095034.
13. Heizmann CW. S100 proteins: Diagnostic and prognostic biomarkers in laboratory medicine. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. **2019**;1866(7):1197-206. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.10.015.
14. Gebhardt C, Lichtenberger R, Utikal J. Biomarker value and pitfalls of serum S100B in the follow-up of high-risk melanoma patients. *J Dtsch Dermatol Ges*. **2016**;14(2):158-64. doi:10.1111/ddg.12727.
15. Aceti A, Margarucci LM, Scaramucci E, Orsini M, Salerno G, Di Sante G, Gianfranceschi G, Di Liddo R, Valeriani F, Ria F, et al. Serum S100B protein as a marker of severity in Covid-19 patients. *Scientific reports*. **2020**;10(1):18665. doi:10.1038/s41598-020-75618-0.
16. Mocellin S, Zavagno G, Nitti D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *International journal of cancer*. **2008**;123(10):2370-6. doi:10.1002/ijc.23794.
17. Bruha R, Vitek L, Smid V. Osteopontin - A potential biomarker of advanced liver disease. *Annals of hepatology*. **2020**;19(4):344-52. doi:10.1016/j.aohep.2020.01.001.

18. Zhao H, Chen Q, Alam A, Cui J, Suen KC, Soo AP, Eguchi S, Gu J, Ma D. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell death & disease*. **2018**;9(3):356. doi:10.1038/s41419-018-0391-6.
19. Kiss T, Ecsedi S, Vizkeleti L, Koroknai V, Emri G, Kovács N, Adany R, Balazs M. The role of osteopontin expression in melanoma progression. *Tumour Biol*. **2015**;36(10):7841-7. doi:10.1007/s13277-015-3495-y.
20. Kiss T, Jámbor K, Koroknai V, Szász I, Bárdos H, Mokánszki A, Ádány R, Balázs M. Silencing Osteopontin Expression Inhibits Proliferation, Invasion and Induce Altered Protein Expression in Melanoma Cells. *Pathology oncology research : POR*. **2021**;27:581395. doi:10.3389/pore.2021.581395.
21. Maier T, Laubender RP, Sturm RA, Klingenstein A, Korting HC, Ruzicka T, Berking C. Osteopontin expression in plasma of melanoma patients and in melanocytic tumours. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. **2012**;26(9):1084-91. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04210.x.
22. Vereecken P, Cornelis F, Van Baren N, Vandersleyen V, Baurain JF. A synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol Res Pract*. **2012**;2012:260643. doi:10.1155/2012/260643.
23. Wakamatsu K, Fukushima S, Minagawa A, Omodaka T, Hida T, Hatta N, Takata M, Uhara H, Okuyama R, Ihn H. Significance of 5-S-Cysteinyldopa as a Marker for Melanoma. *Int J Mol Sci*. **2020**;21(2). doi:10.3390/ijms21020432.
24. Ertekin SS, Podlipnik S, Ribero S, Molina R, Rios J, Carrera C, Malveyh J, Puig S. Monthly changes in serum levels of S100B protein as a predictor of metastasis development in high-risk melanoma patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. **2020**;34(7):1482-8. doi:10.1111/jdv.16212.
25. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. **2015**;26 Suppl 5:v126-32. doi:10.1093/annonc/mdv297.
26. Coit DG, Thompson JA, Albertini MR, Barker C, Carson WE, Contreras C, Daniels GA, DiMaio D, Fields RC, Fleming MD, et al. Cutaneous Melanoma, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. **2019**;17(4):367-402. doi:10.6004/jnccn.2019.0018.
27. Ning B, Liu Y, Wang M, Li Y, Xu T, Wei Y. The Predictive Value of Tumor Mutation Burden on Clinical Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. **2022**;13:748674. doi:10.3389/fphar.2022.748674.
28. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **2011**;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
29. Spector AA, Steinberg D. Relationship between fatty acid and glucose utilization in Ehrlich ascites tumor cells. *Journal of lipid research*. **1966**;7(5):657-63.
30. Tator CH, Evans JR, Olszewski J. Tracers for the detection of brain tumors. Evaluation of radioiodinated human serum albumin and radioiodinated fatty acid. *Neurology*. **1966**;16(7):650-61. doi:10.1212/wnl.16.7.650.
31. Jensen V, Ladekarl M, Holm-Nielsen P, Melsen F, Soerensen FB. The prognostic value of oncogenic antigen 519 (OA-519) expression and proliferative activity detected by antibody MIB-1 in node-negative breast cancer. *The Journal of pathology*. **1995**;176(4):343-52. doi:10.1002/path.1711760405.
32. Butler LM, Perone Y, Dehairs J, Lupien LE, de Laat V, Talebi A, Loda M, Kinlaw WB, Swinnen JV. Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews*. **2020**;159:245-93. doi:10.1016/j.addr.2020.07.013.
33. Hao Y, Li D, Xu Y, Ouyang J, Wang Y, Zhang Y, Li B, Xie L, Qin G. Investigation of lipid metabolism dysregulation and the effects on immune microenvironments in pan-cancer using multiple omics data. *BMC bioinformatics*. **2019**;20(Suppl 7):195. doi:10.1186/s12859-019-2734-4.
34. Peck B, Schulze A. Lipid Metabolism at the Nexus of Diet and Tumor Microenvironment. *Trends in cancer*. **2019**;5(11):693-703. doi:10.1016/j.trecan.2019.09.007.

35. Nagarajan SR, Butler LM, Hoy AJ. The diversity and breadth of cancer cell fatty acid metabolism. *Cancer & metabolism*. **2021**;9(1):2. doi:10.1186/s40170-020-00237-2.
36. Riscal R, Skuli N, Simon MC. Even Cancer Cells Watch Their Cholesterol! *Molecular cell*. **2019**;76(2):220-31. doi:10.1016/j.molcel.2019.09.008.
37. Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *Journal of lipid research*. **2020**;61(5):611-35. doi:10.1194/jlr.TR119000439.
38. Kim HY, Lee H, Kim SH, Jin H, Bae J, Choi HK. Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling. *Scientific reports*. **2017**;7(1):8864. doi:10.1038/s41598-017-08433-9.
39. Guo Y, Wang X, Qiu L, Qin X, Liu H, Wang Y, Li F, Wang X, Chen G, Song G, et al. Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. **2012**;414:135-41. doi:10.1016/j.cca.2012.08.010.
40. Yu Z, Chen H, Ai J, Zhu Y, Li Y, Borgia JA, Yang JS, Zhang J, Jiang B, Gu W, et al. Global lipidomics identified plasma lipids as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Oncotarget*. **2017**;8(64):107899-906. doi:10.18632/oncotarget.22391.
41. Patel N, Vogel R, Chandra-Kuntal K, Glasgow W, Kelavkar U. A novel three serum phospholipid panel differentiates normal individuals from those with prostate cancer. *PLoS one*. **2014**;9(3):e88841. doi:10.1371/journal.pone.0088841.
42. Pikó P, Pál L, Szűcs S, Kósa Z, Sándor J, Ádány R. Obesity-Related Changes in Human Plasma Lipidome Determined by the Lipidyzer Platform. *Biomolecules*. **2021**;11(2). doi:10.3390/biom11020326.
43. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine*. **2009**;6(7):e1000097. doi:10.1371/journal.pmed.1000097.
44. Salameh JP, Bossuyt PM, McGrath TA, Thombs BD, Hyde CJ, Macaskill P, Deeks JJ, Leeflang M, Korevaar DA, Whiting P, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies (PRISMA-DTA): explanation, elaboration, and checklist. *BMJ (Clinical research ed)*. **2020**;370:m2632. doi:10.1136/bmj.m2632.
45. Riley RD, Moons KGM, Snell KIE, Ensor J, Hooft L, Altman DG, Hayden J, Collins GS, Debray TPA. A guide to systematic review and meta-analysis of prognostic factor studies. *BMJ (Clinical research ed)*. **2019**;364:k4597. doi:10.1136/bmj.k4597.
46. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, Leeflang MM, Sterne JA, Bossuyt PM, Group Q-. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Annals of internal medicine*. **2011**;155(8):529-36. doi:10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009.
47. Hayden JA, van der Windt DA, Cartwright JL, Cote P, Bombardier C. Assessing bias in studies of prognostic factors. *Annals of internal medicine*. **2013**;158(4):280-6. doi:10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00009.
48. Higgins JPT GSe. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from <http://handbook.cochrane.org>.
49. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials*. **1986**;7(3):177-88.
50. Franko A, Merkel D, Kovarova M, Hoene M, Jaghutriz BA, Heni M, Königsrainer A, Papan C, Lehr S, Häring HU, et al. Dissociation of Fatty Liver and Insulin Resistance in I148M PNPLA3 Carriers: Differences in Diacylglycerol (DAG) FA18:1 Lipid Species as a Possible Explanation. *Nutrients*. **2018**;10(9). doi:10.3390/nu10091314.
51. Ubhi BK. Direct Infusion-Tandem Mass Spectrometry (DI-MS/MS) Analysis of Complex Lipids in Human Plasma and Serum Using the Lipidyzer™ Platform. *Methods Mol Biol*. **2018**;1730:227-36. doi:10.1007/978-1-4939-7592-1\_15.

52. Liebisch G, Fahy E, Aoki J, Dennis EA, Durand T, Ejsing CS, Fedorova M, Feussner I, Griffiths WJ, Köfeler H, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *Journal of lipid research*. **2020**;61(12):1539-55. doi:10.1194/jlr.S120001025.
53. Cvetkovic Z, Cvetkovic B, Petrovic M, Ranic M, Debeljak-Martarcic J, Vucic V, Glibetic M. Lipid profile as a prognostic factor in cancer patients. *J buon*. **2009**;14(3):501-6.
54. Henry L, Fabre C, Guiraud I, Bastide S, Fabbro-Peray P, Martinez J, Lavabre-Bertrand T, Meunier L, Stoebner PE. Clinical use of p-proteasome in discriminating metastatic melanoma patients: comparative study with LDH, MIA and S100B protein. *International journal of cancer*. **2013**;133(1):142-8. doi:10.1002/ijc.27991.
55. Diaz-Lagares A, Alegre E, Arroyo A, Gonzalez-Cao M, Zudaire ME, Viteri S, Martin-Algarra S, Gonzalez A. Evaluation of multiple serum markers in advanced melanoma. *Tumour Biol*. **2011**;32(6):1155-61. doi:10.1007/s13277-011-0218-x.
56. Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G, Schittek B. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100beta, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer*. **2003**;97(7):1737-45. doi:10.1002/cncr.11250.
57. Garnier JP, Letellier S, Cassinat B, Lebbe C, Kerob D, Baccard M, Morel P, Basset-Seguín N, Dubertret L, Bousquet B, et al. Clinical value of combined determination of plasma L-DOPA/tyrosine ratio, S100B, MIA and LDH in melanoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. **2007**;43(4):816-21. doi:10.1016/j.ejca.2006.11.022.
58. Mohammed MQ, Abraha HD, Sherwood RA, MacRae K, Retsas S. Serum S100beta protein as a marker of disease activity in patients with malignant melanoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. **2001**;18(2):109-20. doi:10.1385/mo:18:2:109.
59. Missotten GS, Korse CM, van Dehn C, Linders TC, Keunen JE, Jager MJ, Bonfrer JM. S-100B protein and melanoma inhibitory activity protein in uveal melanoma screening. A comparison with liver function tests. *Tumour Biol*. **2007**;28(2):63-9. doi:10.1159/000099151.
60. Weide B, Elsasser M, Buttner P, Pflugfelder A, Leiter U, Eigentler TK, Bauer J, Witte M, Meier F, Garbe C. Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis. *Br J Cancer*. **2012**;107(3):422-8. doi:10.1038/bjc.2012.306.
61. Weide B, Richter S, Buttner P, Leiter U, Forschner A, Bauer J, Held L, Eigentler TK, Meier F, Garbe C. Serum S100B, lactate dehydrogenase and brain metastasis are prognostic factors in patients with distant melanoma metastasis and systemic therapy. *PloS one*. **2013**;8(11):e81624. doi:10.1371/journal.pone.0081624.
62. Wagner NB, Forschner A, Leiter U, Garbe C, Eigentler TK. S100B and LDH as early prognostic markers for response and overall survival in melanoma patients treated with anti-PD-1 or combined anti-PD-1 plus anti-CTLA-4 antibodies. *Br J Cancer*. **2018**;119(3):339-46. doi:10.1038/s41416-018-0167-x.
63. Amaral T, Kiecker F, Schaefer S, Stege H, Kaehler K, Terheyden P, Gesierich A, Gutzmer R, Haferkamp S, Uttikal J, et al. Combined immunotherapy with nivolumab and ipilimumab with and without local therapy in patients with melanoma brain metastasis: a DeCOG\* study in 380 patients. *Journal for immunotherapy of cancer*. **2020**;8(1). doi:10.1136/jitc-2019-000333.
64. Amaral T, Schulze M, Sinnberg T, Nieser M, Martus P, Battke F, Garbe C, Biskup S, Forschner A. Are Pathogenic Germline Variants in Metastatic Melanoma Associated with Resistance to Combined Immunotherapy? *Cancers*. **2020**;12(5). doi:10.3390/cancers12051101.
65. Damuzzo V, Solito S, Pinton L, Carrozzo E, Valpione S, Pigozzo J, Arboretti Giancristofaro R, Chiarion-Sileni V, Mandruzzato S. Clinical implication of tumor-associated and immunological parameters in melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology*. **2016**;5(12):e1249559. doi:10.1080/2162402x.2016.1249559.
66. Eigentler TK, Figl A, Krex D, Mohr P, Mauch C, Rass K, Bostroem A, Heese O, Koelbl O, Garbe C, et al. Number of metastases, serum lactate dehydrogenase level, and type of treatment are prognostic

factors in patients with brain metastases of malignant melanoma. *Cancer*. **2011**;117(8):1697-703. doi:10.1002/cncr.25631.

67. Wevers KP, Kruijff S, Speijers MJ, Bastiaannet E, Muller Kobold AC, Hoekstra HJ. S-100B: a stronger prognostic biomarker than LDH in stage IIIB-C melanoma. *Annals of surgical oncology*. **2013**;20(8):2772-9. doi:10.1245/s10434-013-2949-y.

68. Schmidt H, Sorensen BS, Fode K, Nexø E, von der Maase H. Tyrosinase messenger RNA in peripheral blood is related to poor survival in patients with metastatic melanoma following interleukin-2-based immunotherapy. *Melanoma research*. **2005**;15(5):409-16. doi:10.1097/00008390-200510000-00009.

69. Weide B, Schafer T, Martens A, Kuzkina A, Uder L, Noor S, Garbe C, Harter PN, Mittelbronn M, Wischhusen J. High GDF-15 Serum Levels Independently Correlate with Poorer Overall Survival of Patients with Tumor-Free Stage III and Unresectable Stage IV Melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. **2016**;136(12):2444-52. doi:10.1016/j.jid.2016.07.016.

70. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I, et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *The New England journal of medicine*. **2019**;381(7):626-36. doi:10.1056/NEJMoa1904059.

71. Ascierto PA, Dreno B, Larkin J, Ribas A, Liszka G, Maio M, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, et al. 5-Year Outcomes with Cobimetinib plus Vemurafenib in BRAFV600 Mutation-Positive Advanced Melanoma: Extended Follow-up of the coBRIM Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **2021**;27(19):5225-35. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0809.

72. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, et al. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. **2022**;40(2):127-37. doi:10.1200/jco.21.02229.

73. Pozsgai M, Németh K, Oláh P, Gyulai R, Lengyel Z. The significance of imaging examinations during follow-up for malignant melanoma. *European journal of dermatology : EJD*. **2021**;31(3):357-63. doi:10.1684/ejd.2021.4054.

74. Perez-Tomas R, Perez-Guillen I. Lactate in the Tumor Microenvironment: An Essential Molecule in Cancer Progression and Treatment. *Cancers*. **2020**;12(11). doi:10.3390/cancers12113244.

75. Ho J, de Moura MB, Lin Y, Vincent G, Thorne S, Duncan LM, Hui-Min L, Kirkwood JM, Becker D, Van Houten B, et al. Importance of glycolysis and oxidative phosphorylation in advanced melanoma. *Mol Cancer*. **2012**;11:76. doi:10.1186/1476-4598-11-76.

76. Bánfalvi T, Edesné MB, Gergye M, Udvarhelyi N, Orosz Z, Gilde K, Kremmer T, Ottó S, Tímár J. [Laboratory markers of melanoma progression]. *Magyar onkologia*. **2003**;47(1):89-104.

77. Karagiannis P, Fittall M, Karagiannis SN. Evaluating biomarkers in melanoma. *Front Oncol*. **2014**;4:383. doi:10.3389/fonc.2014.00383.

78. Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Tubaro C, Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem*. **2013**;4(1):1-12. doi:10.4331/wjbc.v4.i1.1.

79. Tandler N, Mosch B, Pietzsch J. Protein and non-protein biomarkers in melanoma: a critical update. *Amino Acids*. **2012**;43(6):2203-30. doi:10.1007/s00726-012-1409-5.

80. Neuss H, Koplín G, Raue W, Reetz C, Mall JW. Analysing the serum levels of tumour markers and primary tumour data in stage III melanoma patients in correlation to the extent of lymph node metastases--a prospective study in 231 patients. *Acta chirurgica Belgica*. **2011**;111(4):214-8.

81. Peric B, Zagar I, Novakovic S, Zgajnar J, Hocevar M. Role of serum S100B and PET-CT in follow-up of patients with cutaneous melanoma. *BMC cancer*. **2011**;11:328. doi:10.1186/1471-2407-11-328.

82. Revythis A, Shah S, Kutka M, Moschetta M, Ozturk MA, Pappas-Gogos G, Ioannidou E, Sherif M, Rassy E, Boussios S. Unraveling the Wide Spectrum of Melanoma Biomarkers. *Diagnostics (Basel)*. **2021**;11(8). doi:10.3390/diagnostics11081341.

83. Bandopadhyay M, Bulbule A, Butti R, Chakraborty G, Ghorpade P, Ghosh P, Gorain M, Kale S, Kumar D, Kumar S, et al. Osteopontin as a therapeutic target for cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. **2014**;18(8):883-95. doi:10.1517/14728222.2014.925447.
84. Fila A, Elliott F, Wind T, Field S, Davies J, Kukalicz K, Randerson-Moor J, Harland M, Bishop DT, Banks RE, et al. Plasma osteopontin concentrations in patients with cutaneous melanoma. *Oncology reports*. **2013**;30(4):1575-80. doi:10.3892/or.2013.2666.
85. Shurin MR. Osteopontin controls immunosuppression in the tumor microenvironment. *The Journal of clinical investigation*. **2018**;128(12):5209-12. doi:10.1172/jci124918.
86. Mervic L. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*. **2012**;21(2):27-31.
87. Gazivoda VP, Koshenkov VP, Kangas-Dick AW, Greenbaum A, Davis C, Smith FO, Hilden PD, Berger AC. Factors Associated With Upstaging of Melanoma Thickness on Final Excision. *The Journal of surgical research*. **2023**;289:253-60. doi:10.1016/j.jss.2023.04.001.
88. Piñero-Madrona A, Cerezuela-Fuentes P, Ruiz-Merino G, Martínez-Barba E, Ortiz-Reina S, Martínez-Ortiz MJ, López-Ávila A, Frías-Iniesta JF, Viney A, Cabezas-Herrera J. Lower limb cutaneous melanoma surgery: location matters. *Archives of dermatological research*. **2023**;315(7):1971-8. doi:10.1007/s00403-023-02571-z.
89. Janka EA, Szabó IL, Kollár S, Toka-Farkas T, Ványai B, Várvolgyi T, Kapitány A, Shabu H, Szegedi A, Emri G. Prognostic Role of Clinicopathological Characteristics and Serum Markers in Metastatic Melanoma Patients Treated with BRAF and MEK Inhibitors. *Cancers*. **2024**;16(17). doi:10.3390/cancers16172981.
90. Emri G, Paragh G, Tószaki Á, Janka E, Kollár S, Hegedűs C, Gellén E, Horkay I, Koncz G, Remenyik É. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. *J Photochem Photobiol B*. **2018**;185:169-75. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005.
91. Kruijff S, Hoekstra HJ. The current status of S-100B as a biomarker in melanoma. *Eur J Surg Oncol*. **2012**;38(4):281-5. doi:10.1016/j.ejso.2011.12.005.
92. Harpio R, Einarsson R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem*. **2004**;37(7):512-8. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.012.
93. Frauchiger AL, Dummer R, Mangana J. Serum S100B Levels in Melanoma. *Methods Mol Biol*. **2019**;1929:691-700. doi:10.1007/978-1-4939-9030-6\_43.
94. Felix J, Cassinat B, Porcher R, Schlageter MH, Maubec E, Pages C, Baroudjian B, Homyrda L, Boukouaci W, Tamouza R, et al. Relevance of serum biomarkers associated with melanoma during follow-up of anti-CTLA-4 immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. **2016**;40:466-73. doi:10.1016/j.intimp.2016.09.030.
95. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Lozano MD, Echeveste JI, Pérez Gracia JL, Alegre E, Carranza O, Zubiri L, Martín-Algarra S, et al. Relevance of MIA and S100 serum tumor markers to monitor BRAF inhibitor therapy in metastatic melanoma patients. *Clin Chim Acta*. **2014**;429:168-74. doi:10.1016/j.cca.2013.11.034.
96. Fu Y, Zou T, Shen X, Nelson PJ, Li J, Wu C, Yang J, Zheng Y, Bruns C, Zhao Y, et al. Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm*. **2021**;2(1):27-59. doi:10.1002/mco2.27.
97. Aloia A, Müllhaupt D, Chabbert CD, Eberhart T, Flückiger-Mangual S, Vukolic A, Eichhoff O, Irmisch A, Alexander LT, Scibona E, et al. A Fatty Acid Oxidation-dependent Metabolic Shift Regulates the Adaptation of BRAF-mutated Melanoma to MAPK Inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **2019**;25(22):6852-67. doi:10.1158/1078-0432.ccr-19-0253.
98. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, Van Veldhoven PP, Waltregny D, Daniëls VW, Machiels J, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer research*. **2010**;70(20):8117-26. doi:10.1158/0008-5472.can-09-3871.

99. Wang H, Franco F, Tsui YC, Xie X, Trefny MP, Zappasodi R, Mohmood SR, Fernández-García J, Tsai CH, Schulze I, et al. CD36-mediated metabolic adaptation supports regulatory T cell survival and function in tumors. *Nature immunology*. **2020**;21(3):298-308. doi:10.1038/s41590-019-0589-5.
100. Stephenson DJ, Hoferlin LA, Chalfant CE. Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. **2017**;189:13-29. doi:10.1016/j.trsl.2017.06.006.
101. Perrotti F, Rosa C, Cicalini I, Sacchetta P, Del Boccio P, Genovesi D, Pieragostino D. Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery. *Int J Mol Sci*. **2016**;17(12). doi:10.3390/ijms17121992.
102. Muntoni S, Atzori L, Mereu R, Satta G, Macis MD, Congia M, Tedde A, Desogus A, Muntoni S. Serum lipoproteins and cancer. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. **2009**;19(3):218-25. doi:10.1016/j.numecd.2008.06.002.
103. Ghahremanfard F, Mirmohammadkhani M, Shahnazari B, Gholami G, Mehdizadeh J. The Valuable Role of Measuring Serum Lipid Profile in Cancer Progression. *Oman medical journal*. **2015**;30(5):353-7. doi:10.5001/omj.2015.71.
104. Li R, Liu B, Liu Y, Liu Y, He Y, Wang D, Sun Y, Xu Y, Yu Q. Elevated serum lipid level can serve as early signal for metastasis for Non-Small Cell Lung Cancer patients: A retrospective nested case-control study. *Journal of Cancer*. **2020**;11(23):7023-31. doi:10.7150/jca.48322.
105. Zhang L, Han L, He J, Lv J, Pan R, Lv T. A high serum-free fatty acid level is associated with cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. **2020**;146(3):705-10. doi:10.1007/s00432-019-03095-8.
106. Fan L, Lin Q, Huang X, Fu D, Huang H. Prognostic significance of pretreatment serum free fatty acid in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a retrospective analysis. *BMC cancer*. **2021**;21(1):1255. doi:10.1186/s12885-021-08963-6.
107. Kleinfeld AM, Okada C. Free fatty acid release from human breast cancer tissue inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated killing. *Journal of lipid research*. **2005**;46(9):1983-90. doi:10.1194/jlr.M500151-JLR200.
108. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. **2018**;19(3):175-91. doi:10.1038/nrm.2017.107.
109. Faedo RR, da Silva G, da Silva RM, Ushida TR, da Silva RR, Lacchini R, Matos LL, Kowalski LP, Lopes NP, Leopoldino AM. Sphingolipids signature in plasma and tissue as diagnostic and prognostic tools in oral squamous cell carcinoma. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. **2022**;1867(1):159057. doi:10.1016/j.bbali.2021.159057.
110. Nath A, Li I, Roberts LR, Chan C. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*. **2015**;5:14752. doi:10.1038/srep14752.
111. Nath A, Chan C. Genetic alterations in fatty acid transport and metabolism genes are associated with metastatic progression and poor prognosis of human cancers. *Scientific reports*. **2016**;6:18669. doi:10.1038/srep18669.
112. Pandey V, Vijayakumar MV, Ajay AK, Malvi P, Bhat MK. Diet-induced obesity increases melanoma progression: involvement of Cav-1 and FASN. *International journal of cancer*. **2012**;130(3):497-508. doi:10.1002/ijc.26048.
113. Ueno G, Iwagami Y, Kobayashi S, Mitsufuji S, Yamada D, Tomimaru Y, Akita H, Asaoka T, Noda T, Gotoh K, et al. ACAT-1-Regulated Cholesteryl Ester Accumulation Modulates Gemcitabine Resistance in Biliary Tract Cancer. *Annals of surgical oncology*. **2022**;29(5):2899-909. doi:10.1245/s10434-021-11152-1.
114. Chang TY, Chang CC, Cheng D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annual review of biochemistry*. **1997**;66:613-38. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.613.
115. Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *The Journal of biological chemistry*. **2014**;289(35):24020-9. doi:10.1074/jbc.R114.583658.
116. Hartmann P, Trufa DI, Hohenberger K, Tausche P, Trump S, Mittler S, Geppert CI, Rieker RJ, Schieweck O, Sirbu H, et al. Contribution of serum lipids and cholesterol cellular metabolism in lung

- cancer development and progression. *Scientific reports*. **2023**;13(1):5662. doi:10.1038/s41598-023-31575-y.
117. Jiang J, Nilsson-Ehle P, Xu N. Influence of liver cancer on lipid and lipoprotein metabolism. *Lipids in health and disease*. **2006**;5:4. doi:10.1186/1476-511x-5-4.
  118. Motta M, Giugno I, Ruello P, Pistone G, Di Fazio I, Malaguarnera M. Lipoprotein (a) behaviour in patients with hepatocellular carcinoma. *Minerva medica*. **2001**;92(5):301-5.
  119. Argilés JM, Lopez-Soriano FJ, Evans RD, Williamson DH. Interleukin-1 and lipid metabolism in the rat. *The Biochemical journal*. **1989**;259(3):673-8. doi:10.1042/bj2590673.
  120. Kwong LK, Ridinger DN, Bandhauer M, Ward JH, Samlowski WE, Iverius PH, Pritchard H, Wilson DE. Acute dyslipoproteinemia induced by interleukin-2: lecithin:cholesterol acyltransferase, lipoprotein lipase, and hepatic lipase deficiencies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **1997**;82(5):1572-81. doi:10.1210/jcem.82.5.3937.
  121. Zimmerman WF, Keys S. Lysophospholipase and the metabolism of lysophosphatidylcholine in isolated bovine rod outer segments. *Experimental eye research*. **1989**;48(1):69-76. doi:10.1016/0014-4835(89)90020-1.
  122. Liu P, Zhu W, Chen C, Yan B, Zhu L, Chen X, Peng C. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. *Life sciences*. **2020**;247:117443. doi:10.1016/j.lfs.2020.117443.
  123. Kuliszkievicz-Janus M, Tuz MA, Baczyński S. Application of 31P MRS to the analysis of phospholipid changes in plasma of patients with acute leukemia. *Biochimica et biophysica acta*. **2005**;1737(1):11-5. doi:10.1016/j.bbali.2005.08.019.
  124. Murphy RA, Wilke MS, Perrine M, Pawlowicz M, Mourtzakis M, Lieffers JR, Maneshgar M, Bruera E, Clandinin MT, Baracos VE, et al. Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. **2010**;29(4):482-7. doi:10.1016/j.clnu.2009.11.006.
  125. Sülentrop F, Moka D, Neubauer S, Haupt G, Engelmann U, Hahn J, Schicha H. 31P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. *NMR in biomedicine*. **2002**;15(1):60-8. doi:10.1002/nbm.758.
  126. Murphy RA, Bureyko TF, Mourtzakis M, Chu QS, Clandinin MT, Reiman T, Mazurak VC. Aberrations in plasma phospholipid fatty acids in lung cancer patients. *Lipids*. **2012**;47(4):363-9. doi:10.1007/s11745-011-3641-2.
  127. Zhao Z, Xiao Y, Elson P, Tan H, Plummer SJ, Berk M, Aung PP, Lavery IC, Achkar JP, Li L, et al. Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. **2007**;25(19):2696-701. doi:10.1200/jco.2006.08.5571.
  128. Ojala PJ, Hirvonen TE, Hermansson M, Somerharju P, Parkkinen J. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *Journal of leukocyte biology*. **2007**;82(6):1501-9. doi:10.1189/jlb.0507292.
  129. Brkić L, Riederer M, Graier WF, Malli R, Frank S. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on cyclooxygenase (COX)-2 expression in endothelial cells. *Atherosclerosis*. **2012**;224(2):348-54. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.038.
  130. Kang S, Kim MH, Park IA, Kim JW, Park NH, Kang D, Yoo KY, Kang SB, Lee HP, Song YS. Elevation of cyclooxygenase-2 is related to lymph node metastasis in adenocarcinoma of uterine cervix. *Cancer letters*. **2006**;237(2):305-11. doi:10.1016/j.canlet.2005.06.027.
  131. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* **2005**;18(1):153-60. doi:10.1038/modpathol.3800244.
  132. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of rheumatology Supplement*. **1997**;49:15-9.
  133. Denkert C, Köbel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer research*. **2001**;61(1):303-8.

134. Zhou P, Qin J, Li Y, Li G, Wang Y, Zhang N, Chen P, Li C. Combination therapy of PKC $\zeta$  and COX-2 inhibitors synergistically suppress melanoma metastasis. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. **2017**;36(1):115. doi:10.1186/s13046-017-0585-2.
135. Tudor DV, Bâldea I, Lupu M, Kacso T, Kutasi E, Hopârtean A, Strettea R, Gabriela Filip A. COX-2 as a potential biomarker and therapeutic target in melanoma. *Cancer biology & medicine*. **2020**;17(1):20-31. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0339.
136. Gerl MJ, Vaz WLC, Domingues N, Klose C, Surma MA, Sampaio JL, Almeida MS, Rodrigues G, Araújo-Gonçalves P, Ferreira J, et al. Cholesterol is Inefficiently Converted to Cholesteryl Esters in the Blood of Cardiovascular Disease Patients. *Scientific reports*. **2018**;8(1):14764. doi:10.1038/s41598-018-33116-4.
137. Zwickl H, Hackner K, Köfeler H, Krzizek EC, Muqaku B, Pils D, Scharnagl H, Solheim TS, Zwickl-Traxler E, Pecherstorfer M. Reduced LDL-Cholesterol and Reduced Total Cholesterol as Potential Indicators of Early Cancer in Male Treatment-Naïve Cancer Patients With Pre-cachexia and Cachexia. *Front Oncol*. **2020**;10:1262. doi:10.3389/fonc.2020.01262.
138. Zhang X, Zhao XW, Liu DB, Han CZ, Du LL, Jing JX, Wang Y. Lipid levels in serum and cancerous tissues of colorectal cancer patients. *World journal of gastroenterology*. **2014**;20(26):8646-52. doi:10.3748/wjg.v20.i26.8646.



Nyilvántartási szám: DEENK/34/2026.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Várvölgyi Tünde

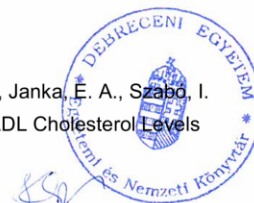
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Várvölgyi, T.**, Janka, E. A., Szász, I., Koroknai, V., Toka-Farkas, T., Szabó, I. L., Ványai, B., Szegedi, A., Emri, G., Balázs, M.: Combining Biomarkers for the Diagnosis of Metastatic Melanoma.  
*J Clin Med.* 13 (1), 1-13, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm13010174>  
IF: 2.9
2. Szász, I., Koroknai, V., **Várvölgyi, T.**, Pál, L., Szűcs, S., Pikó, P., Emri, G., Janka, E. A., Szabó, I. L., Ádány, R., Balázs, M.: Identification of Plasma Lipid Alterations Associated with Melanoma Metastasis.  
*Int. J. Mol. Sci.* 25 (8), 1-15, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25084251>  
IF: 4.9
3. Janka, E. A., **Várvölgyi, T.**, Sipos, Z., Soós, A., Hegyi, P. J., Kiss, S., Dembrovsky, F., Csupor, D., Kéring, P., Pécsi, D., Solymár, M., Emri, G.: Predictive Performance of Serum S100B Versus LDH in Melanoma Patients: a Systematic Review and Meta-Analysis.  
*Front Oncol.* 11, 1-11, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.772165>  
IF: 5.738

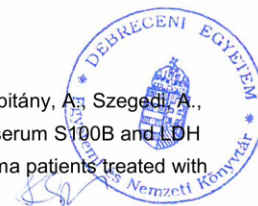
### További közlemények

4. Szász, I., Koroknai, V., **Várvölgyi, T.**, Pál, L., Szűcs, S., Pikó, P., Emri, G., Janka, E. A., Szabó, I. L., Ádány, R., Balázs, M.: Association of Plasma Lipid Patterns and LDL Cholesterol Levels with Breslow Thickness and Ulceration in Melanoma Patients.  
*Int. J. Mol. Sci.* 26 (4), 1-11, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26041716>  
IF: 4.9 (2024)





5. Szász, I., Koroknai, V., **Várvölgyi, T.**, Emri, G., Szabó, I. L., Balázs, M.: Circulating Calprotectin Distinguishes Metastatic Melanoma and Predicts Liver Metastasis.  
*Int. J. Mol. Sci.* 26 (16), 1-9, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26168028>  
IF: 4.9 (2024)
6. Koroknai, V., Szász, I., **Várvölgyi, T.**, Emri, G., Fodor, Á., Balázs, M.: Cytokine and Chemokine-Associated Signatures Underlying Dermal Invasion and Skin Metastasis in Melanoma.  
*Int. J. Mol. Sci.* 26 (19), 1-14, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26199334>  
IF: 4.9 (2024)
7. Janka, E. A., Szabó, I. L., Toka-Farkas, T., Soltész, L., Szentkereszt-Kovács, Z., Ványai, B., **Várvölgyi, T.**, Kapitány, A., Szegedi, A., Emri, G.: Development of Nomograms to Predict the Probability of Recurrence at Specific Sites in Patients with Cutaneous Melanoma.  
*Cancers.* 17 (18), 1-21, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers17183080>  
IF: 4.4 (2024)
8. **Várvölgyi, T.**, Szegedi, A., Töröcsik, D.: JAK gátlás alopecia areataban.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 101 (2), 98-105, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2025.101.2.6>
9. Tósaki, Á., Remenyik, É., Veres, I., Szegedi, A., **Várvölgyi, T.**: Mucin a dermisben.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 100 (6), 293-298, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2024.100.6.2>
10. Janka, E. A., Szabó, I. L., Kollár, S., Toka-Farkas, T., Ványai, B., **Várvölgyi, T.**, Kapitány, A., Shabu, H., Szegedi, A., Emri, G.: Prognostic Role of Clinicopathological Characteristics and Serum Markers in Metastatic Melanoma Patients Treated with BRAF and MEK Inhibitors.  
*Cancers (Basel).* 16, 1-18, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers16172981>  
IF: 4.4
11. Ványai, B., Szabó, I. L., Veres, I., Soltész, L., **Várvölgyi, T.**, Emri, G.: Lentigo maligna melanoma.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 99 (4), 293-297, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2023.99.4.7>
12. Janka, E. A., Ványai, B., Szabó, I. L., Toka-Farkas, T., **Várvölgyi, T.**, Kapitány, A., Szegedi, A., Emri, G.: Primary tumour category, site of metastasis, and baseline serum S100B and LDH are independent prognostic factors for survival in metastatic melanoma patients treated with anti-PD-1.  
*Front Oncol.* 13, 1-11, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2023.1237643>  
IF: 3.5





13. Ványai, B., Chien, Y. C. C., Beke, L., Szabó, I. L., Péter, Z., Steuer-Hajdu, K., **Várvölgyi, T.**, Méhes, G., Emri, G.: Cutaneous metastases at the sites of pembrolizumab-induced bullous pemphigoid lesions in a patient with melanoma.  
*Immunotherapy*. 14 (17), 1377-1382, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2217/imt-2022-0113>  
IF: 2.8
14. Emri, G., Ványai, B., Soltész, L., Szabó, I. L., **Várvölgyi, T.**, Janka, E. A., Oláh, J.: Melanoma kezelés: merre tovább?  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 98 (5), 256-262, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2022.98.5.3>
15. Janka, E. A., Ványai, B., Dajnoki, Z., Szabó, I. L., Reibl, D., Komka, I., Blasszauer, C., **Várvölgyi, T.**, Szegedi, A., Emri, G.: Regional variability of melanoma incidence and prevalence in Hungary. Epidemiological impact of ambient UV radiation and socioeconomic factors.  
*Eur. J. Cancer Prev.* 31 (4), 377-384, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000716>  
IF: 2.4
16. Soltész, L., Urbán, P., **Várvölgyi, T.**, Lajszné Tóth, B., Szegedi, A.: Skin lesions of primary immunodeficiency diseases.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 98 (2), 56-63, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2022.98.2.2>
17. Steuer-Hajdu, K., **Várvölgyi, T.**, Szegedi, A.: Új típusú terápiák gyulladásoos bőrbetegségekben.  
*Immunol. Szle.* 4, 51-62, 2021.
18. **Várvölgyi, T.**: Vírusos eredetű bőrbetegségek gyermekkorban.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 97 (2), 100-106, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2021.97.2.5>
19. **Várvölgyi, T.**, Szegedi, A.: Vitiligo.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 97 (3), 158-166, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2021.97.3.5>
20. **Várvölgyi, T.**: Vitiligo.  
*Orvostovábbk. szle.* 28 (6), 14-17, 2021.
21. **Várvölgyi, T.**, Szegedi, A.: Csecsemőkori gyakoribb, nem fertőző bőrbetegségek.  
*Gyermekorv. Továbbképz.* 19 (3), 124-130, 2020.
22. Janka, E. A., Kékedi, K., **Várvölgyi, T.**, Gellén, E., Kiss, B. K., Remenyik, É., Emri, G.: Increasing melanoma incidence in the elderly in North-East Hungary: is this a more serious problem than we thought?  
*Eur. J. Cancer Prev.* 28 (6), 544-550, 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000489>  
IF: 2.413





23. Juhász, I., **Várvölgyi, T.**: Diagnosztikai lehetőségek és jelentőségük a sebkezelésben.  
*Sebkezelés-Sebgyógyulás. 21* (1), 5-11, 2018.
24. Nagy, E., Erdei, I., Farkas, M., Péter, Z., **Várvölgyi, T.**, Király, G., Juhász, I.: A sejterápia lehetőségei az égés kezelésében: debreceni tapasztalatok.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 93* (3), 114-118, 2017.
25. Szabó, I. L., Ócsai, H., Kiss, B. K., Kékedi, K., Kósa, P., **Várvölgyi, T.**, Kun, E., Kenyeres, A., Szöllősi, A. G., Remenyik, É., Emri, G.: BRAF-mutáció pozitív áttétes melanoma célzott gyógyszeres kezelése.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 93* (4), 160-167, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.4.4>
26. Emri, E., Egervári, K., **Várvölgyi, T.**, Rózsa, D., Mikó, E., Dezső, B., Veres, I., Méhes, G., Emri, G., Remenyik, É.: Correlation among metallothionein expression, intratumoural macrophage infiltration and the risk of metastasis in human cutaneous malignant melanoma.  
*J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 27* (3), e320-e327, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04653.x>  
IF: 3.105

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 51,256**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
13,538**

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

Debrecen, 2026.01.29.



## **Kulcsszavak**

melanoma malignum, metasztázis, relapszus, perifériás vér biomarker, diagnosztikus hatás, prognosztikus hatás, LDH, S100B, osteopontin, lipid biomarker, primer tumor lokalizációja, AJCC 8. kiadás pT kategória

## **Keywords**

malignant melanoma, metastasis, relapse, peripheral blood biomarker, diagnostic effect, prognostic effect, LDH, S100B, osteopontin, lipid biomarker, primary tumour localisation, AJCC 8th edition pT category

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Balázs Margit professzor asszonynak szakmai vezetését, támogatását, és a lehetőséget, hogy a kutatócsoportjában dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Emri Gabriella tanárnőnek a tanácsait, hálás vagyok, hogy odaadóan tanított és tanulhatok tőle a mai napig.

Köszönöm Dr. Janka Eszter Annának a munka meghatározó részét alkotó átfogó statisztikai elemzést és segítségét.

Köszönöm Dr. Szegedi Andrea professzor asszonynak a tanácsait és támogatását.

Köszönöm Dr. Remenyik Éva professzor asszonynak a biztatását és bátorítását.

Köszönöm Dr. Ádány Róza professzor asszonynak a munkám során nyújtott támogatását.

Köszönöm Dr. Koroknai Viktóriának, Dr. Szász Istvánnak, Dr. Szűcs Sándor tanár úrnak és Dr. Pál Lászlónak a lipidomikai méréseket és analízist.

Köszönöm Toka-Farkas Tündének, Tóthné Molnár Szilviának és Váradi Annamáriának a perifériás vérminták gyűjtését.

Köszönöm kollégáimnak, barátaimnak az ösztönzését.

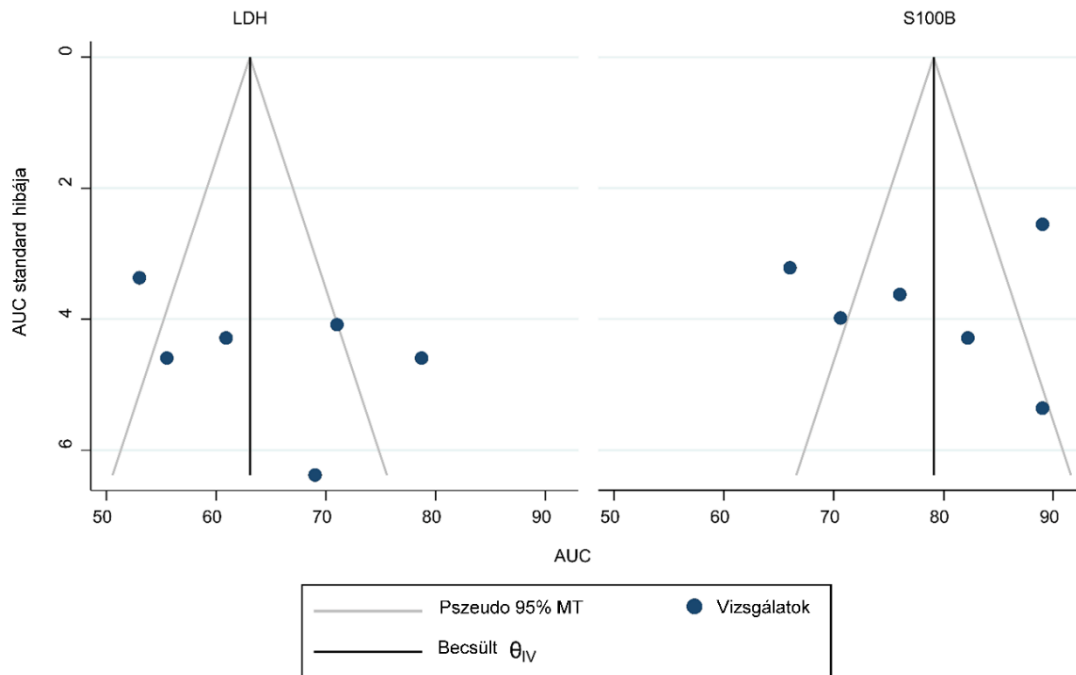
Köszönöm családomnak a biztatást és támogatást.

## Appendix

### 1. Kiegészítő Táblázat: A biomarkerek és kombinációik diagnosztikus hatása

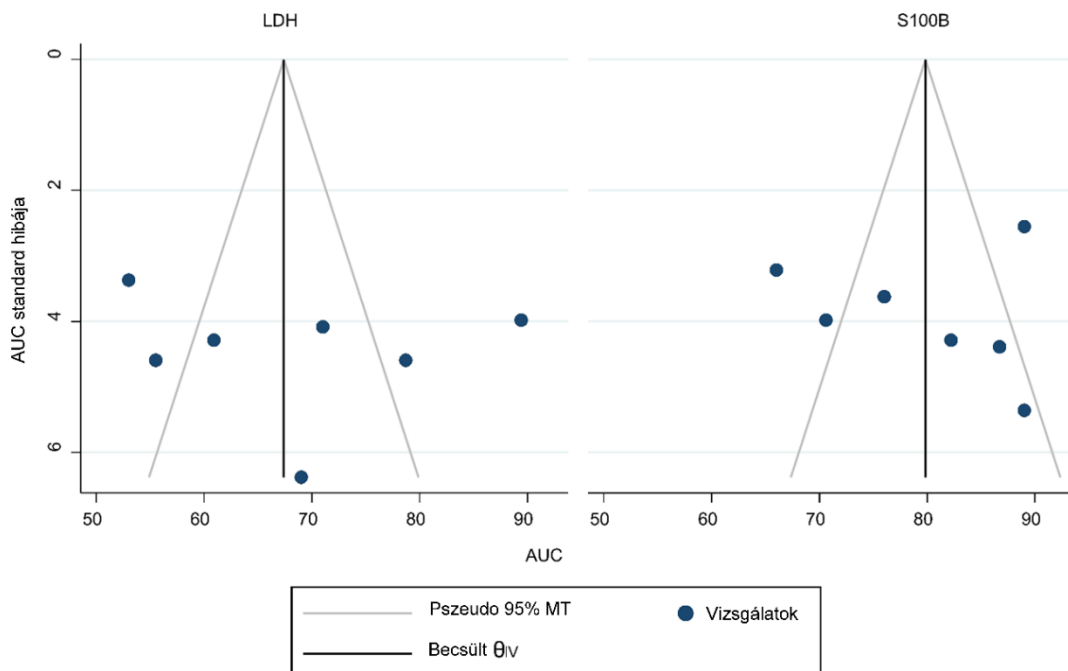
Változók	“cut-off”	Tréning csoport						Validációs csoport					
		AUROC [95% MT] p-érték	Szenzi- tivitás [95% MT]	Specifi- citás [95% MT]	PPÉ [95% MT]	NPÉ [95% MT]	Diag- nosztikus hatás [95% CI]	AUROC [95% MT] p-érték	Szenzi- tivitás [95% MT]	Specifi- citás [95% MT]	PPV [95% MT]	NPV [95% MT]	Diagnosztikus potosság [95% MT]
S100B+ LDH	0.443	0.650 [0.555; 0.746] <b>p=0.003</b>	0.38 [0.26; 0.52]	0.90 [0.81; 0.96]	0.73 [0.57; 0.85]	0.67 [0.62; 0.71]	0.68 [0.60; 0.76]	0.687 [0.547; 0.828] <b>p=0.009</b>	0.50 [0.31; 0.69]	0.85 [0.70; 0.94]	0.70 [0.51; 0.84]	0.71 [0.62; 0.78]	0.71 [0.58; 0.81]
S100B+ OPN	0.465	0.658 [0.560; 0.755] <b>p=0.002</b>	0.41 [0.29; 0.55]	0.90 [0.81; 0.96]	0.75 [0.59; 0.86]	0.68 [0.63; 0.73]	0.70 [0.61; 0.77]	0.709 [0.575; 0.843] <b>p=0.004</b>	0.54 [0.34; 0.73]	0.83 [0.67; 0.93]	0.68 [0.50; 0.82]	0.72 [0.63; 0.80]	0.71 [0.58; 0.81]
LDH+O PN	0.437	0.643 [0.549; 0.738] <b>p=0.004</b>	0.45 [0.32; 0.59]	0.80 [0.70; 0.88]	0.62 [0.49; 0.73]	0.67 [0.61; 0.72]	0.65 [0.57; 0.73]	0.643 [0.500; 0.785] <b>p=0.046</b>	0.46 [0.28; 0.66]	0.83 [0.67; 0.93]	0.65 [0.46; 0.80]	0.69 [0.60; 0.76]	0.68 [0.55; 0.79]
S100B+ LDH +OPN	0.391	0.669 [0.575; 0.763] <b>p=0.001</b>	0.64 [0.50; 0.76]	0.69 [0.57; 0.79]	0.58 [0.50; 0.68]	0.72 [0.64; 0.79]	0.67 [0.58; 0.75]	0.712 [0.573; 0.850] <b>p=0.003</b>	0.64 [0.44; 0.81]	0.78 [0.62; 0.89]	0.67 [0.51; 0.79]	0.76 [0.65; 0.84]	0.72 [0.60; 0.82]

A szignifikáns eredményeket félkövérrel kiemeltük. AUROC: area under the receiver operating characteristics, PPÉ: pozitív prediktív érték. NPÉ: negatív prediktív érték, 95% MT: 95% megbízhatósági tartomány, LDH: laktát.dehidrogenáz; OPN: osteopontin



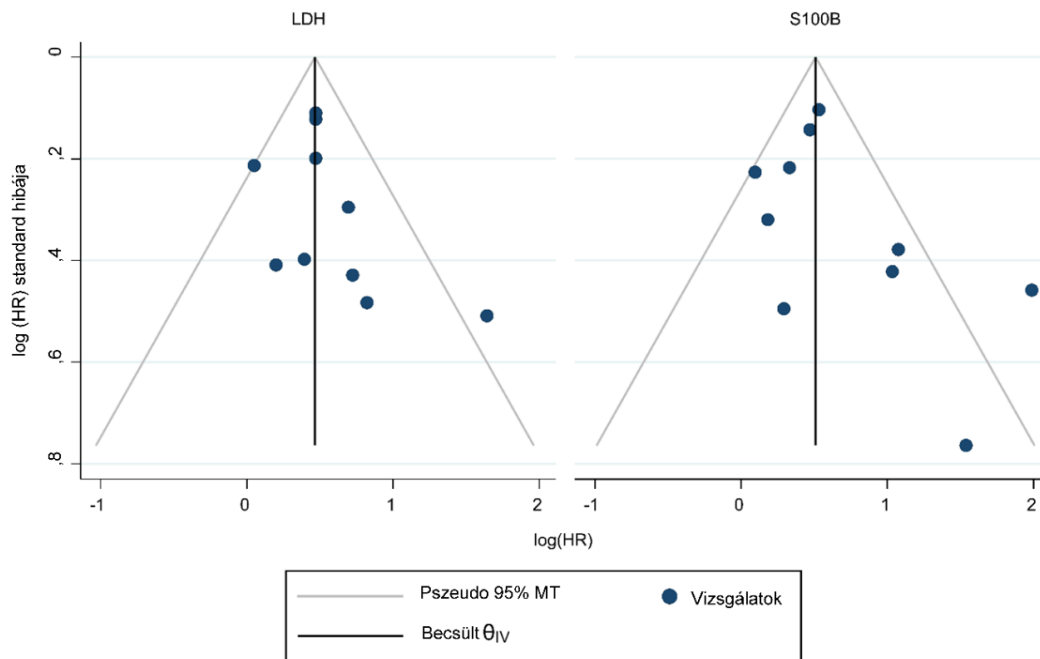
**1. Kiegészítő Ábra: A görbe alatti terület tölcserdiagramja a bevont 6 cutan melanoma vizsgálat esetében**

AUC: görbe alatti terület, 95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



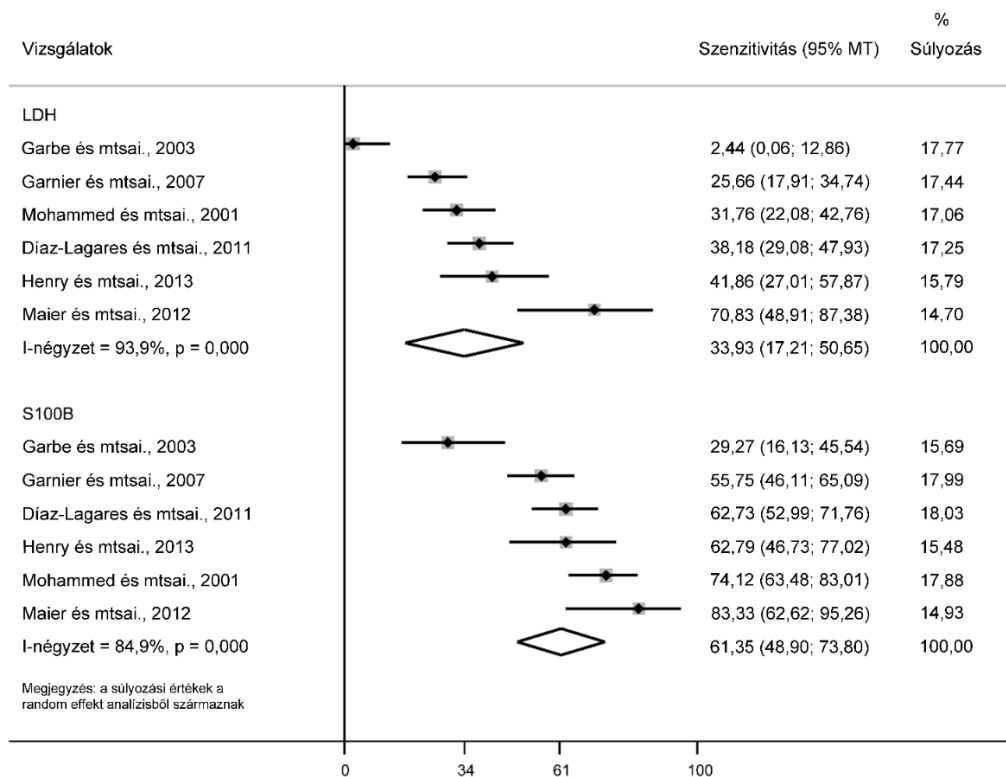
**2. Kiegészítő Ábra: A görbe alatti terület tölcserdiagramja a bevont 7 melanoma vizsgálat esetében**

AUC: görbe alatti terület, 95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



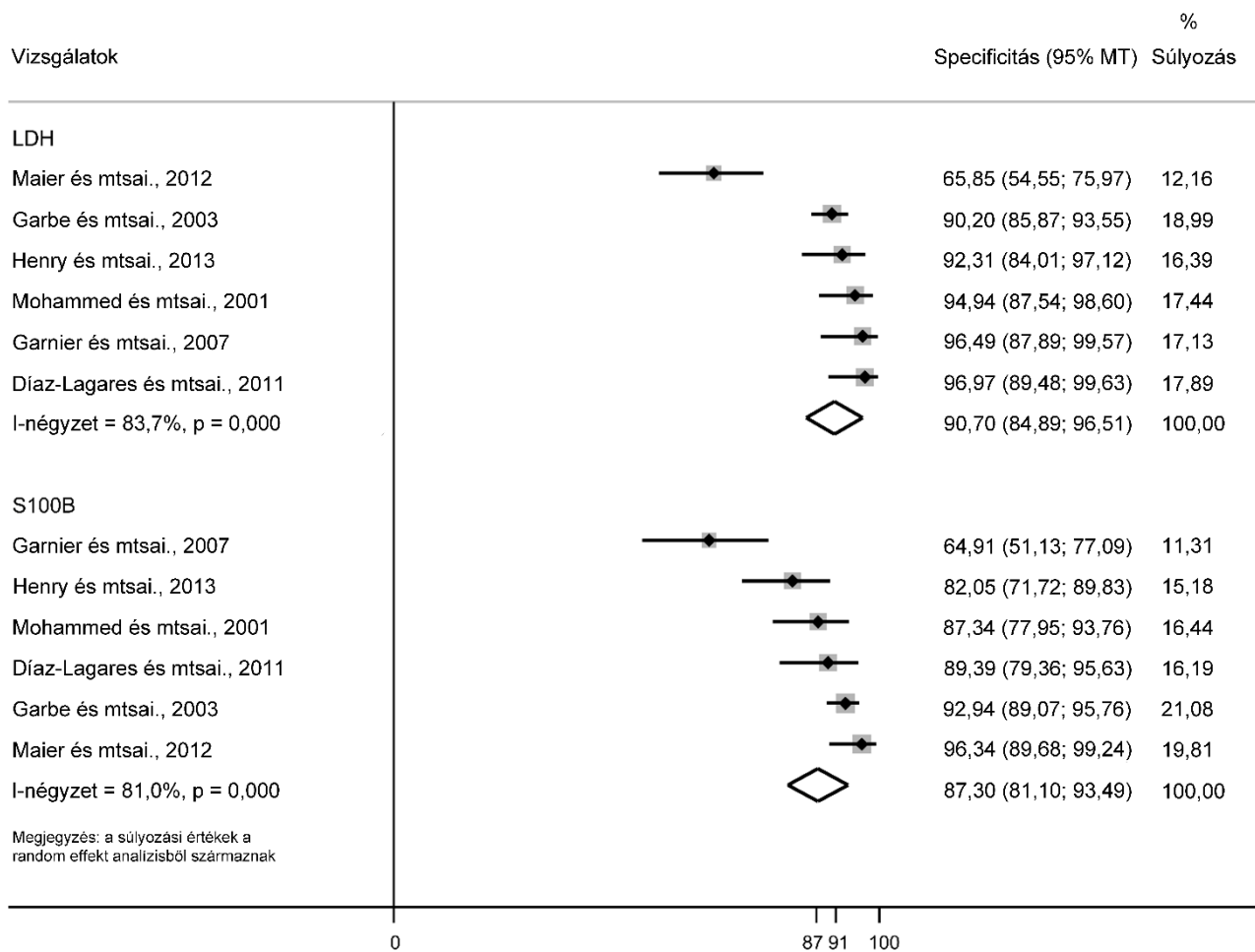
### 3. Kiegészítő Ábra: Cox regresszió tölcserdiagramja

HR: Hazard risk (veszélyességi kockázat), 95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



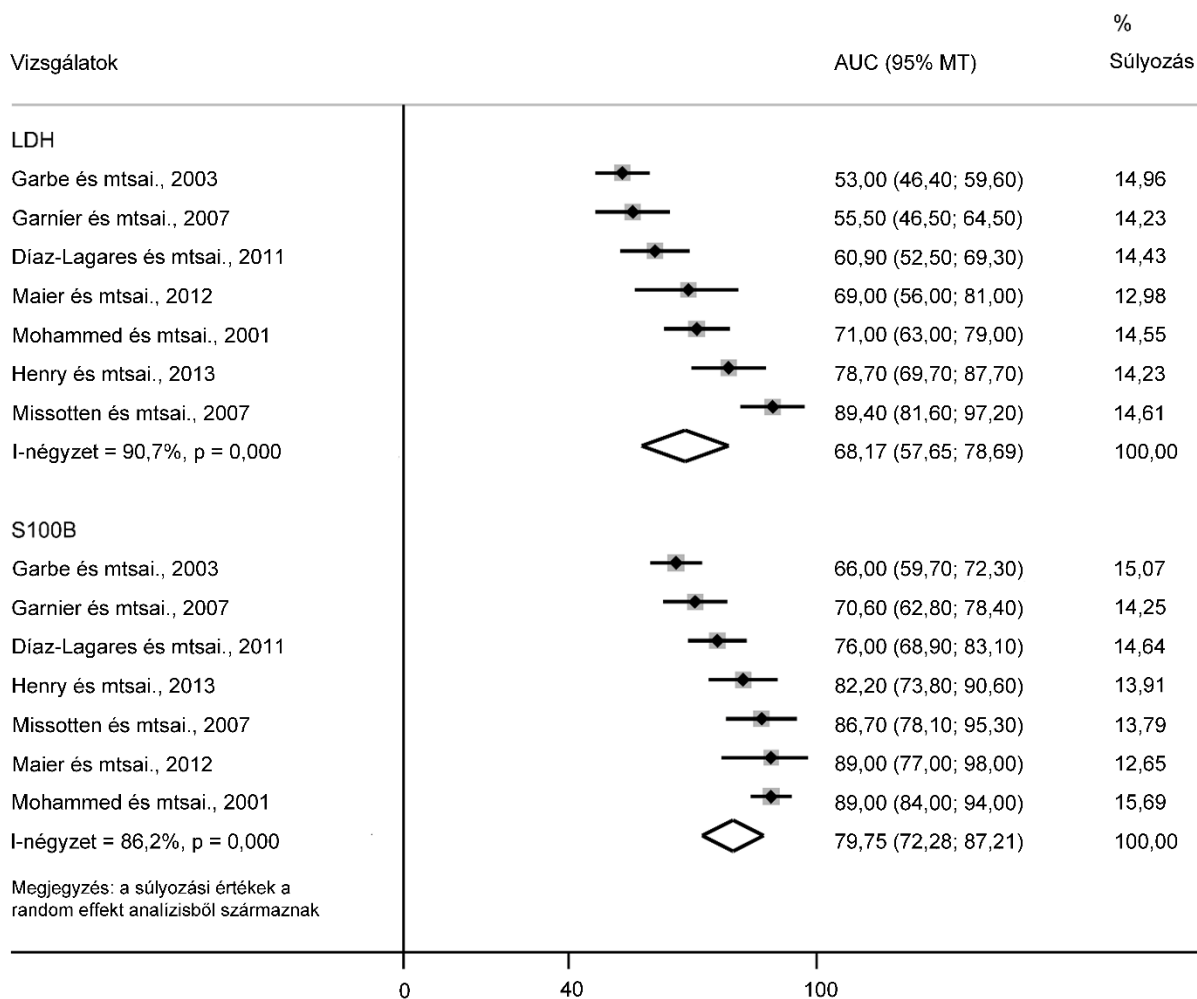
### 4. Kiegészítő Ábra: Forest plot a szenzitivásra vonatkozóan a 6 cutan melanoma vizsgálat esetében

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



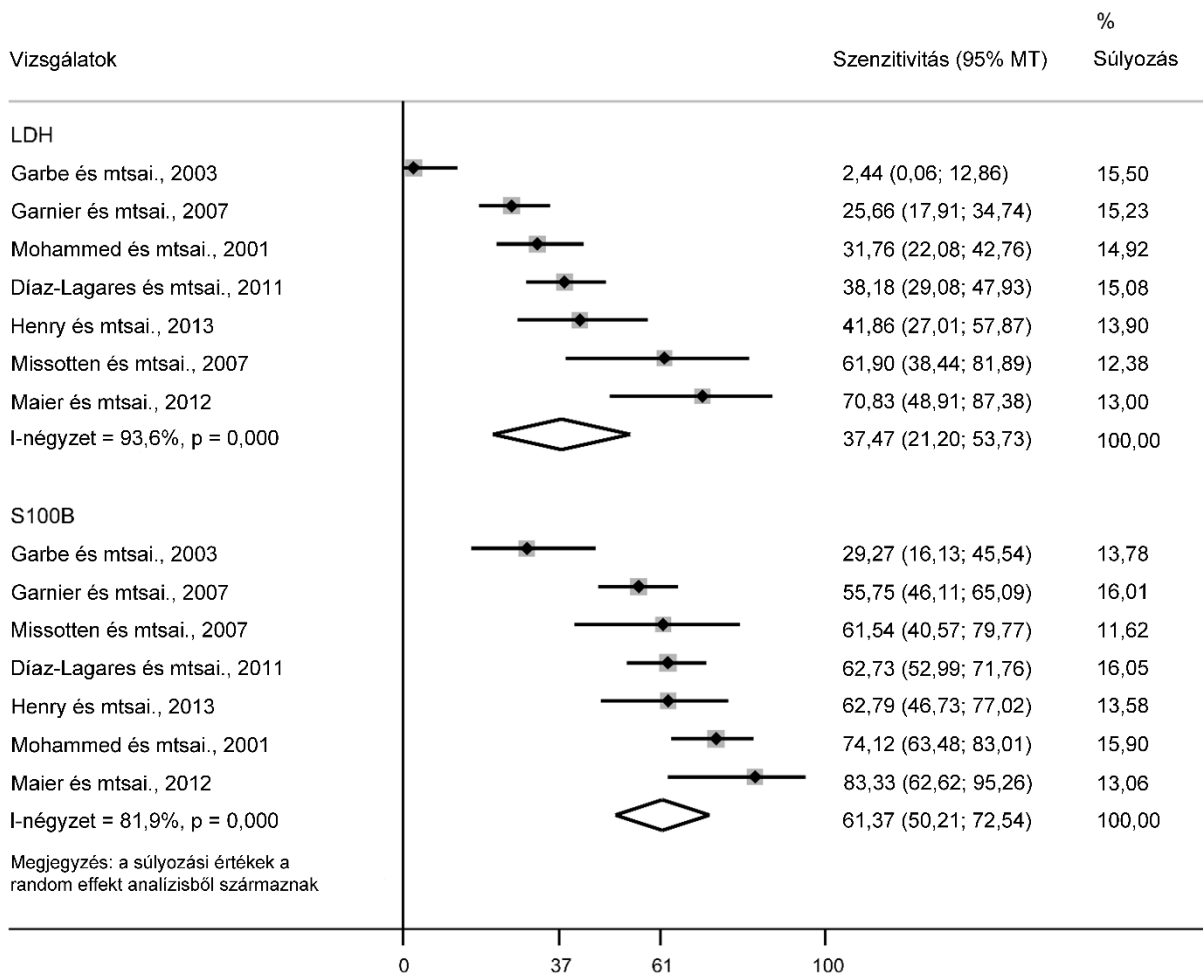
### 5. Kiegészítő Ábra: Forest plot a specificitásra vonatkozóan a 6 cutan melanoma vizsgálat esetében

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



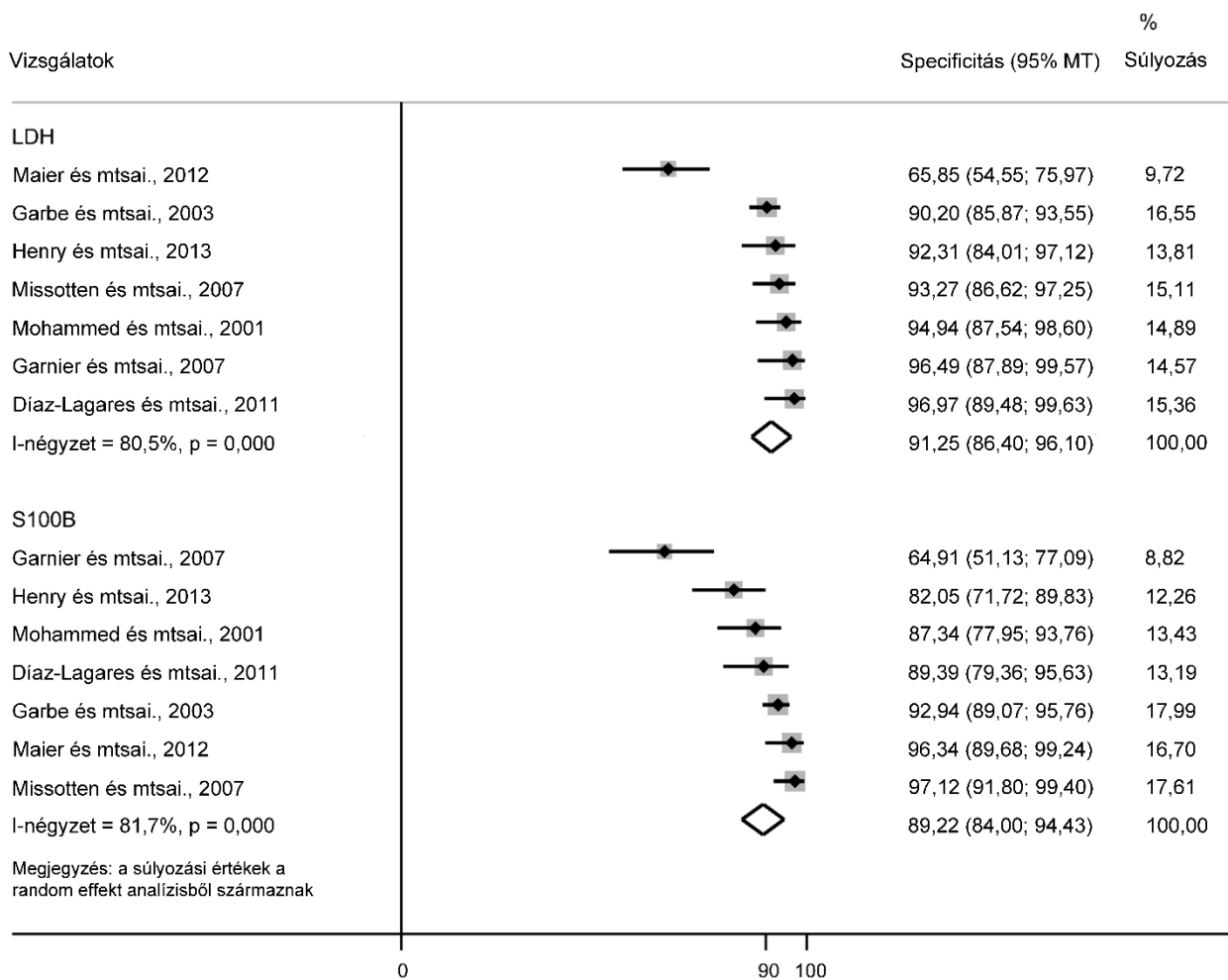
**6. Kiegészítő Ábra: Az S100B és az LDH esetében a ROC analízisből származó AUC értéket a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartománnyal együtt bemutató forest plot a 7 melanoma vizsgálat esetében**

AUC: görbe alatti terület, 95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



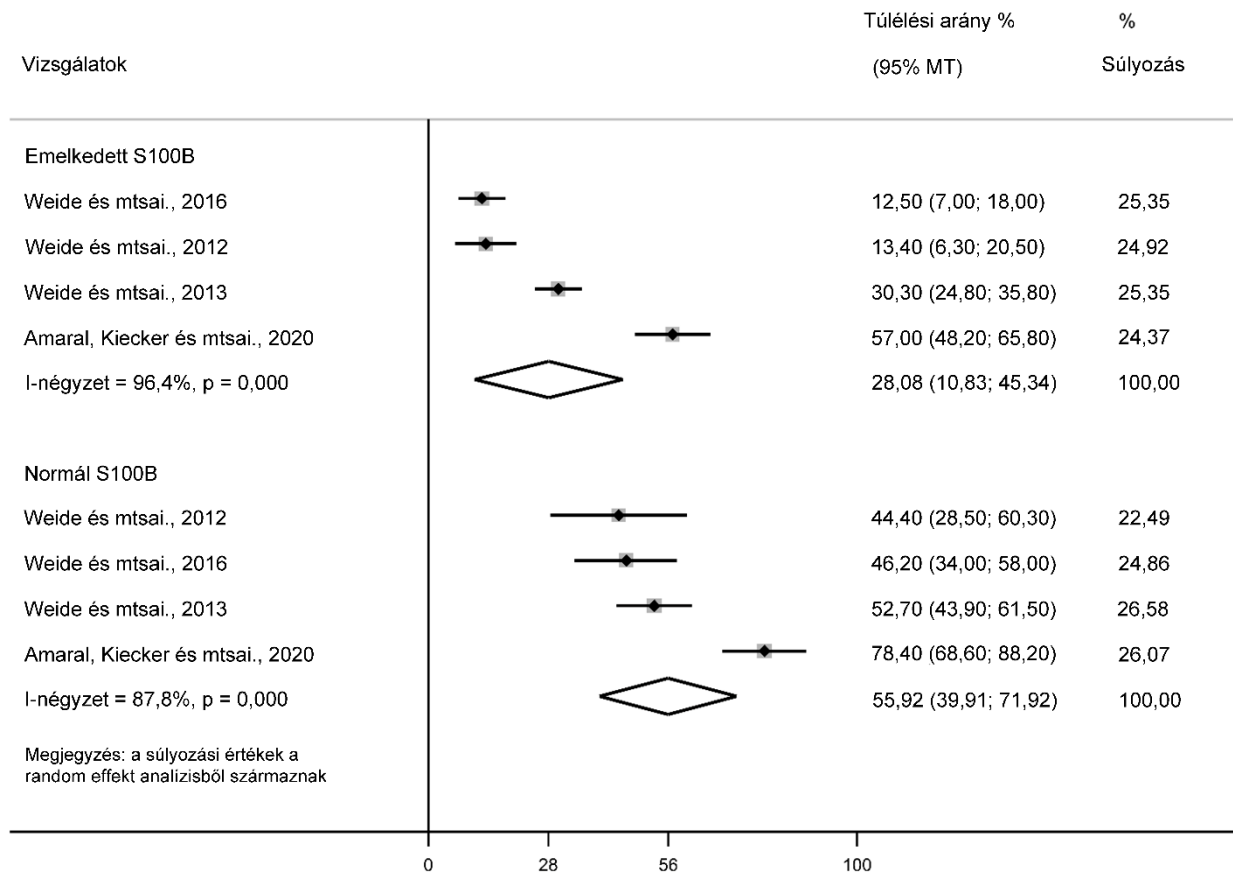
## 7. Kiegészítő Ábra: Forest plot a szenzitivitásra vonatkozóan a 7 melanoma vizsgálat esetében

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



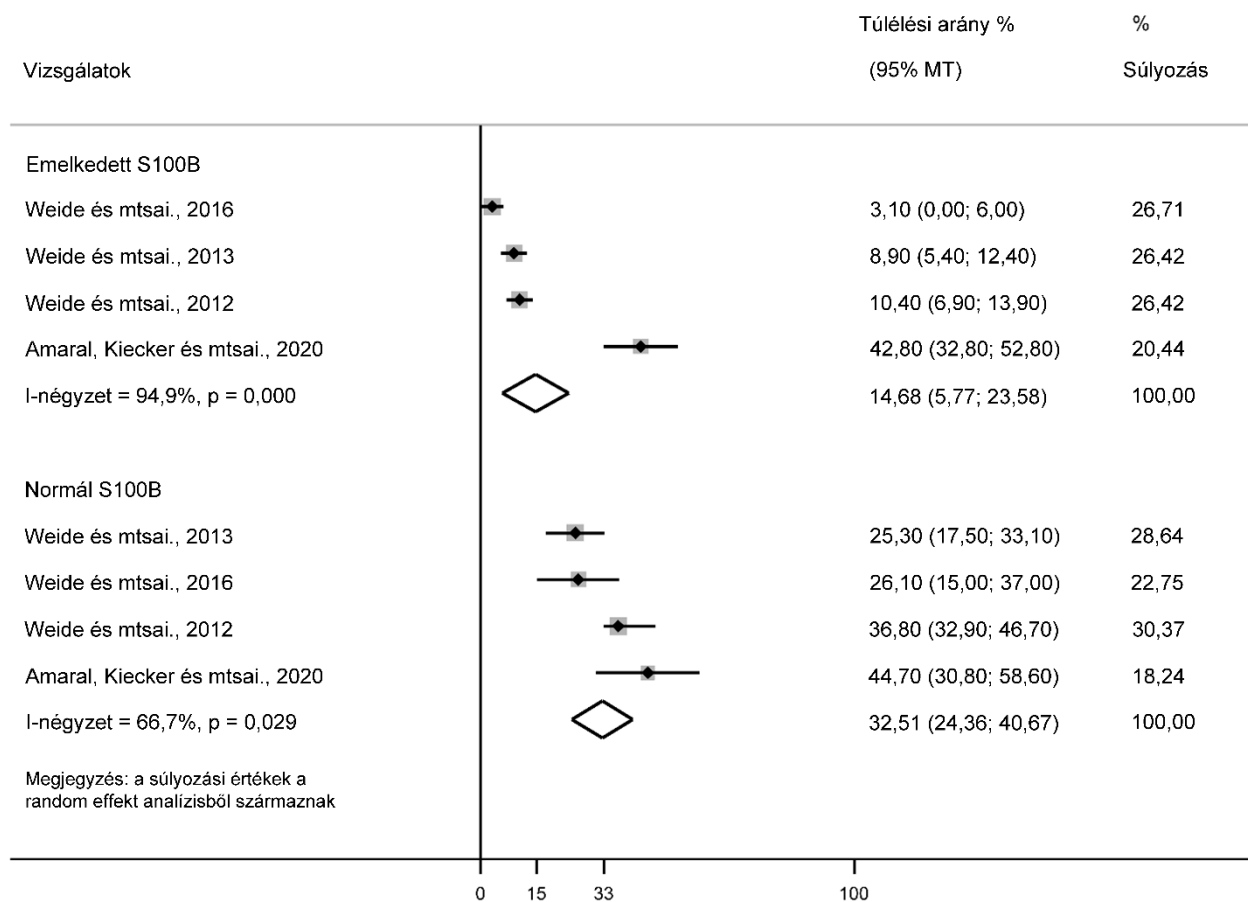
## 8. Kiegészítő Ábra: Forest plot a specificitásra vonatkozóan a 7 melanoma vizsgálat esetében

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



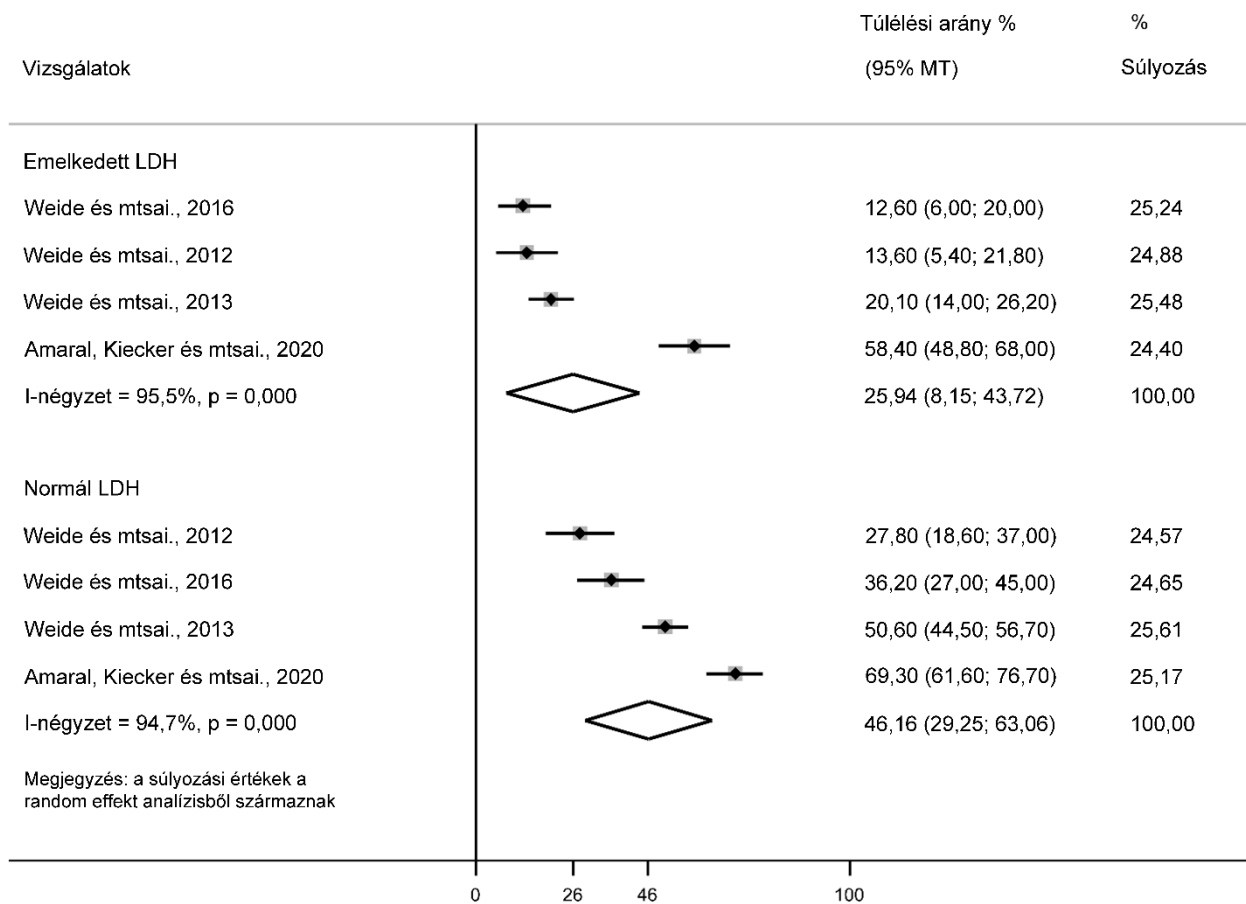
**9. Kiegészítő Ábra: Normál és emelkedett S100B szérumszintek esetén az 1 éves túlélési arányt és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt bemutató forest plot**

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány



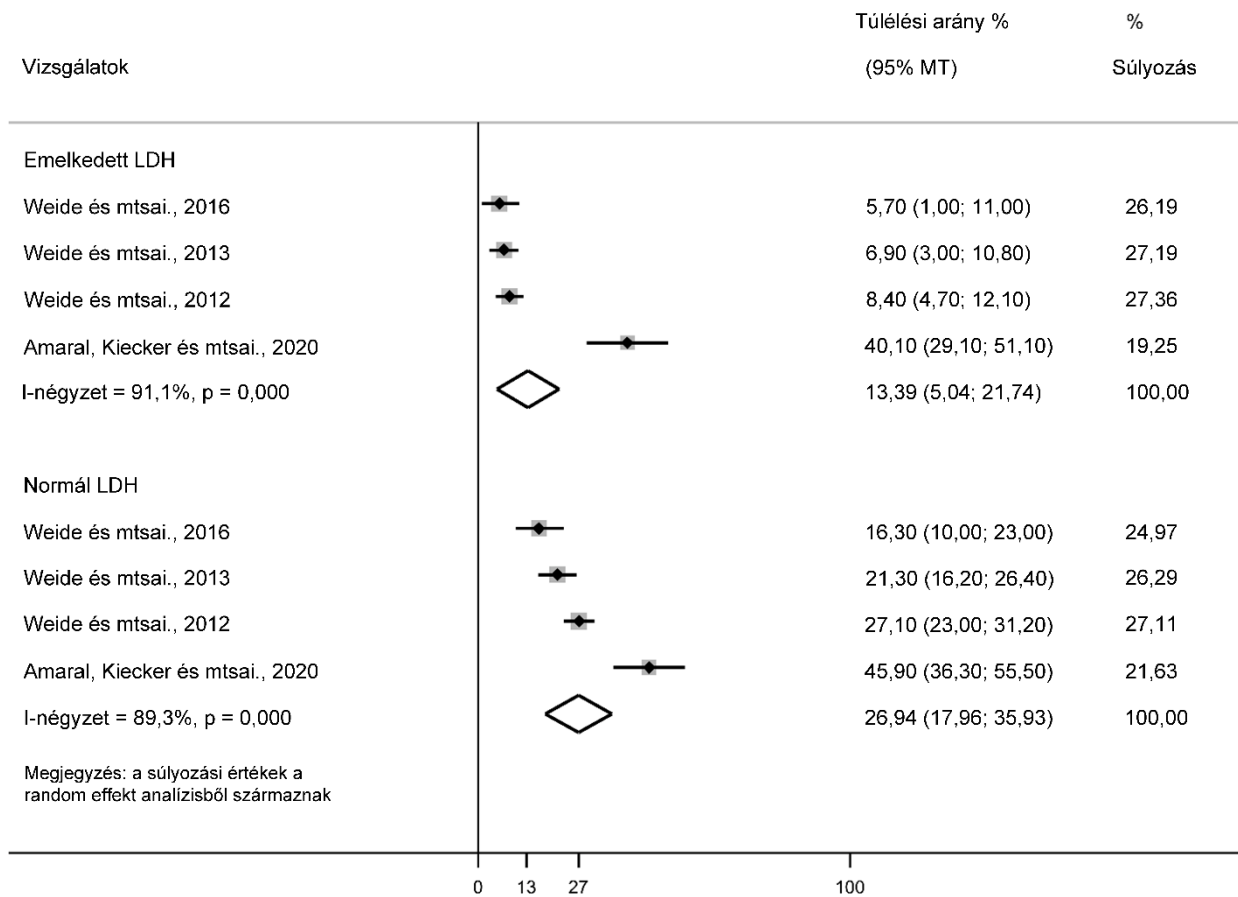
**10. Kiegészítő Ábra: Normál és emelkedett S100B szérumszintek esetén a 2 éves túlélési arányt és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt bemutató forest plot**

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány



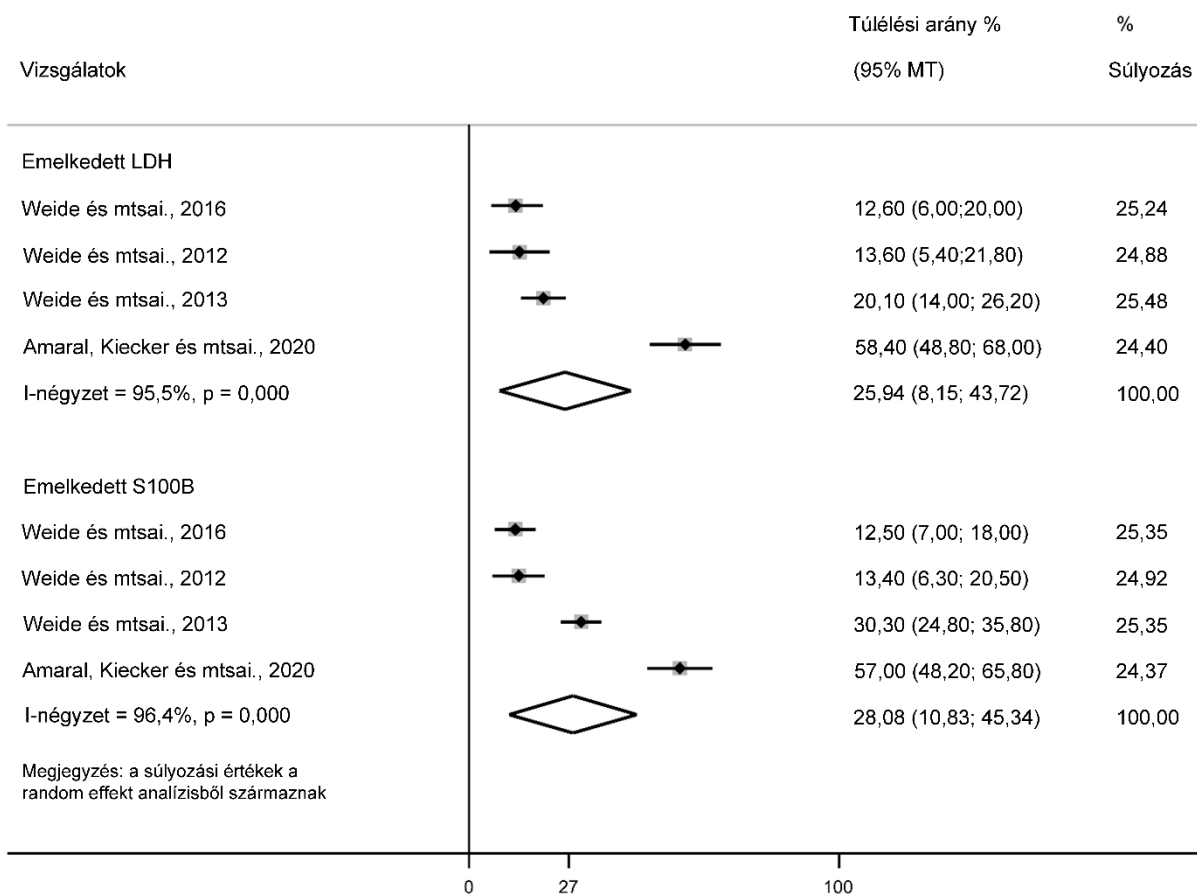
**11. Kiegészítő Ábra: Normál és emelkedett LDH szérumszintek esetén az 1 éves túlélési arányt és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt bemutató forest plot**

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



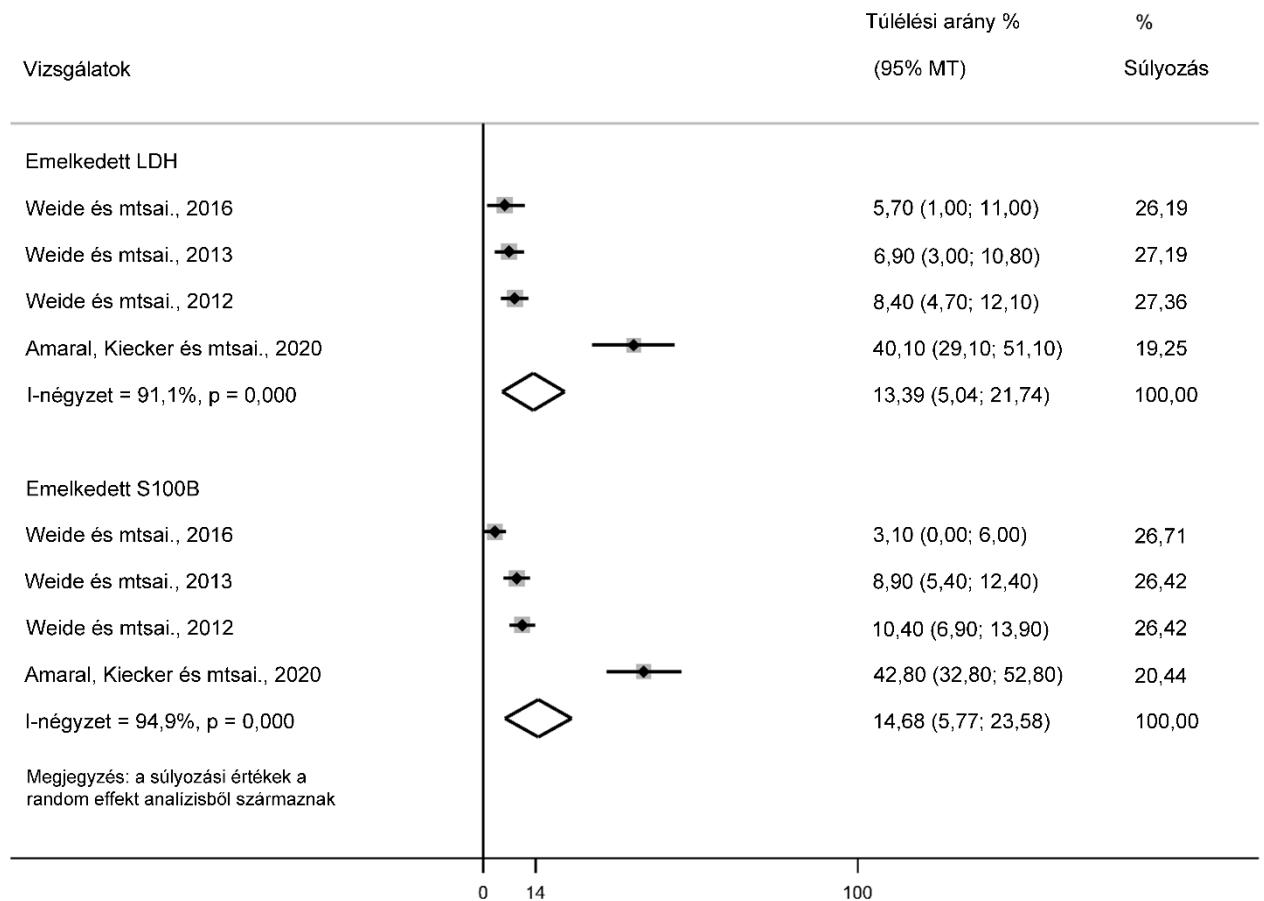
**12. Kiegészítő Ábra: Normál és emelkedett LDH szérumszintek esetén a 2 éves túlélési arányt és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt bemutató forest plot**

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



**13. Kiegészítő Ábra: Emelkedett S100B és emelkedett LDH szérumszintek esetén az 1 éves túlélési arányt és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt bemutató forest plot**

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz



**14. Kiegészítő Ábra: Emelkedett S100B és emelkedett LDH szérumszintek esetén a 2 éves túlélési arányt és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt bemutató forest plot**

95% MT: 95%-os megbízhatósági tartomány, LDH: laktát-dehidrogenáz