

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Bakos-Mészáros Brigitta

Új tüdőrák glikobiomarkerek átfogó megközelítésű kutatása

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Új tüdőrák glikobiomarkerek átfogó megközelítésű kutatása

Bakos-Mészáros Brigitta

Témavezető: Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1 Tüdőrák.....	8
2.2 A tüdőrák kezelése.....	10
2.3 Krónikus obstruktív tüdőbetegség	11
2.4 Szérum	12
2.5 Glikoziláció - Glikobiomarkerek	15
2.6 Kapilláris elektroforézis	17
2.7 Exoglikozidáz alapú glikán szekvenálás	19
2.8 Gépi tanulás	20
2.9 Döntési fa.....	21
3. A PhD munka fő célkitűzései.....	23
4. Anyagok és módszerek.....	24
4.1 Etikai engedély	24
4.2 Humán szérum és standard glikoprotein minták	24
4.3 Reagensek	27
4.4 Módszerek	27
4.4.1 Mintaelőkészítés	27
4.4.2 Kapilláris elektroforézis analízis	28
4.4.3 <i>N</i> -kötött glikán szerkezet azonosítás	29
4.4.4 Adatelemzés.....	30
5. Eredmények	33
5.1 A humán szérum minták <i>N</i> -kötött glikánjainak azonosítása	33
5.2 Egészséges, tüdőrákos, COPD-s, valamint egyaránt tüdőrákos és COPD-s betegektől származó humán szérum minták összehasonlítása	41
5.3 Reszekciós műtét hatásának vizsgálata a humán szérum <i>N</i> -kötött glikán profiljára	49
5.4 Kemoterápia hatásának vizsgálata a glikán szerkezet megváltozására	61
6. Megbeszélés.....	76
6.1 <i>N</i> -kötött glikán szerkezetek meghatározása humán szérumban	76
6.2 Potenciális glikobiomarkerek azonosítása a tüdőrák, a COPD és a két betegség együttes jelenlétének kimutatására	76

6.3 Reszekciós műtét hatásának vizsgálata a humán szérumban N-kötött glikán profiljának megváltozására	77
6.4 A kemoterápia glikán szerkezet megváltozására gyakorolt hatásának vizsgálata döntési fa elemzés alkalmazásával	79
7. Összefoglalás	81
8. Summary	83
9. Irodalomjegyzék	85
10. Tárgyszavak	97
11. Köszönetnyilvánítás	97
12. Függelék	98

Rövidítésjegyzék

AAT – α -1-antitripszin

ADC – adenokarcinóma

ANTS – 8-amino-naftalin-1,3,6-triszulfonsav

APTS – 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav

Asn – aszparagin

CART – osztályozási és regressziós fa elemzés

CE – kapilláris elektroforézis

CE-LIF – lézer-indukált fluoreszcens detektorral felszerelt kapilláris elektroforézis

COPD – krónikus obstruktív tüdőbetegség

CRP – C-reaktív protein

CT – komputertomográfia

DNS – deoxiribonukleinsav

DP2 +DP15 – a második (maltóz) és a tizenötödik (maltopentadekóz) foka a maltodextrin kalibráló létrának

EOF – elektroosmotikus áramlás

ER – endoplazmatikus retikulum

GU – glükóz egység

HILIC-UPLC – hidrofíl kölcsönhatású és ultra nagy teljesítményű folyadékkromatográfia összekapcsolása

HPLC – nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

LC – tüdőrák

LCLC – nagysejtes tüdőrák

Man – mannóz

MI – mesterséges intelligencia

miRNS – mikro-ribonukleinsav

ML – gépi tanulás

MRI – mágnesesrezonancia-képalkotás

MS – tömegspektrométer

NSCLC – nem kissejtes tüdőrák

PET – pozitronemissziós tomográfia

Pro – prolin

RPM – percenkénti fordulatszám

RFU –relatív fluoreszcens egység

RNS – ribonukleinsav

RSD – relatív standard deviáció

SCC – laphámrák

SCLC – kissejtes tüdőrák

SD – standard deviáció

Ser – szerin

SVM – támaszvektor gép modell

Thr – treonin

1. Bevezetés

A tüdőrák és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) igen elterjedt megbetegedések az egész világon. A diagnosztizálásuk a mai napig nem kézenfekvő és gyakran csak kései stádiumban történik meg. Kezelésük során is az egyik hátrányt a pontos diagnózis hiánya okozza, hiszen nehéz csak tünetek alapján megkülönböztetni őket. Egy másik nagy akadály, hogy a COPD növeli a tüdőrák kialakulásának kockázatát, ezáltal sok esetben társbetegséggént vannak jelen az emberi szervezetben. Ezért szükség van olyan megbízható, és a betegek számára alacsony kockázattal járó, kevésbé invazív, molekuláris diagnosztikai eljárások továbbfejlesztésére, mint például a vér alapú diagnosztikai módszer, amelyek megfelelő specificitással és érzékenységgel képesek előre jelezni az aktuális betegség (tüdőrák, COPD vagy mindkettő) jelenlétét és prognózisát. Ezáltal jelenleg is nagy hangsúlyt fektetnek új diagnosztikai eljárások fejlesztésére. Az egyik ilyen módszer a molekuláris biomarkerek azonosítása vérszérumból, amely akár egy vérvétel által választ adhatna a betegség típusára. A biomarkerek olyan jellemzők, amelyek objektíven mérnek biológiai vagy patogén folyamatokat vagy terápiás kezelésekre adott válaszok specifikus indikátorai [1]. Az élő sejtek felszínét nagyszámú és igen változatos komplex cukor szerkezetek, – úgynevezett. glikánok – borítják, amelyek már egy betegség korai szakaszában specifikusan módosulhatnak. Az olyan daganatos és gyulladásos folyamatokban, mint a tüdőrák és a COPD, változások következhetnek be a glikán-bioszintézisben, amelyek a sejtfelszíni és a vérben keringő proteinek poszttranszlációs módosulásában számos eltérést eredményezhetnek. Ezeknek a specifikus módosulásoknak az azonosítása potenciális diagnosztikai szerepet tölthet be. Az elmúlt évtizedekben a glikobiomarker kutatásokra egyre nagyobb hangsúlyt fektettek számos betegség diagnosztikai módszereinek fejlesztése során [2]. Az eltérések megbízható és validálható azonosítása nagyszámú minta feldolgozását igényli, aminek kiértékelése új statisztikai módszerek fejlesztését teszi szükségessé.

2. Irodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben ismertetem a tüdőrákot és a COPD-t, mint a tüdő két gyakori megbetegedését. A legfontosabb jellemzők mellett kitérek, a kialakulásuk kockázatára, a diagnosztikai módszerekre és a kezelési lehetőségekre. A korai diagnosztika szerepe mind a két betegség esetén jelentős, ezért kiemelten fontos a fejlesztésük. Potenciális lehetőség van a vérvétel alapú vizsgálatokban. Röviden bemutatom a szérumot és néhány fehérjének a glikozilációs változását, amely során betegség specifikus változások mehetnek végbe. A glikoproteineken található cukor szerkezetek megváltozásai ezáltal biomarkerei lehetnek például a tüdőráknak vagy a COPD-nek is. A kapilláris elektroforézis módszerrel hatékonyan analizálhatók az oligoszacharid tartalmú minták. Kitérek az *N*-kötött glikánok azonosítása során elengedhetetlen exoglikozidáz alapú glikán szekvenálás módszerének leírására. A biológiai minták vizsgálata során keletkező nagy mennyiségű adathalmaz feldolgozása kihívást jelentő feladat. Röviden összefoglalom azokat a lehetőségeket, amikkel a nagy mintaszámú összetett adatbázisok is analizálhatók, mint a gépi tanulás és a döntési fa analízis.

2.1 Tüdőrák

A tüdőrák az egyik legnagyobb halálozási rátával rendelkező daganatos megbetegedés világszerte. A becslések szerint 2,2 millió új rákos megbetegedéssel és 1,8 millió halálessel a tüdőrák volt a második leggyakrabban diagnosztizált rák típus 2020-ban (az első a mellrák) [3]. A hosszútávú dohányzás jelentős mértékben megnöveli a tüdőrák kialakulásának kockázatát [4]. A tüdőrák az arra érzékeny tüdősejtek genomjában bekövetkezett többszörös változás eredményeként jön létre, amelyet a rákkeltő anyagoknak való kitettség tovább fokozhat [5]. A legújabb tanulmányok azt valószínűsítik, hogy a szövettanilag nyilvánvaló tüdőrák a tüdő normális hámsejtjeiben bekövetkező specifikus genetikai és morfológiai változások egymás utáni felhalmozódásának köszönhető [5]. Korai stádiumban többnyire tünetmentes, csak előrehaladott állapotban fordul elő mellkas fájdalom, gyakori köhögés, vér a nyálban, légzési és nyelési nehézségek, étvágytalanság, súlyvesztés, fáradtság és arc vagy nyaki duzzanat [6]. További problémát jelentenek az esetlegesen kialakuló áttétek.

A tüdőrákot két szövettani osztályba soroljuk, amelyek különböző módon nőnek és terjednek: kissejtes tüdő karcinóma (SCLC) és nem kissejtes tüdőkarcinóma (NSCLC), utóbbi az adenokarcinómát (ADC), a nagy sejtes karcinómát (LCLC), valamint a laphámsejtes karcinómát

(SCC) foglalja magába [7]. A megkülönböztetés alapja az érintett sejtek mérete. A nem kissejtes tüdőrák az elterjedtebb, ez adja az esetek körülbelül 90%-át. Ez kevésbé agresszív, mint a kissejtes tüdőrák, sokkal lassabban terjed tovább más szervekre. Ezzel szemben a kissejtes tüdőrák típus teszi ki az esetek 10%-át és hajlamos a gyors terjedésre. A kissejtes tüdőrák két fázisra osztható 1) korlátozott stádiumú kissejtes tüdőrákra, amely esetben a tumor csak a mellkas egyik oldalára terjedt ki, leginkább a tüdőre és a nyirokcsomókra és 2) kiterjedt stádiumú kissejtes tüdőrákra, amely esetén a tumor kiterjedhet a tüdő egyik felére vagy akár mind a két felére, és megjelenhet a nyirokcsomókban, a mellkasban és a test más részein is [8].

A nem kissejtes tüdőrák fejlődése és kiterjedése több szakaszra bontható 1) rejtett stádium: a rákos sejtek például egy köpet citológiai vizsgálatán megjelennek, de a tumor helye nem azonosítható. 2) 0. stádium esetén a rákos sejtek csak a légutakat bélelő sejtek felső rétegében találhatók meg, a daganat nem terjed ki a tüdő mélyebb rétegeibe és a daganatos sejtek nem terjednek túl a légutakon. 3) I. stádium esetén egy kisebb tüdőrákos daganat (3 cm-nél kisebb) azonosítható, amely még nem terjedt el a környező tüdőhártyán, nyirokcsomókon, vagy a tüdő fő hörgő ágain. 4) II. stádium azt jelenti, hogy a rákos sejtek elterjedtek a tüdő közelében lévő nyirokcsomókon is. Ezen belül II/A stádium: a tumor mérete három és öt cm között van. II/B stádium: a tumor mérete öt és hét cm között változik. Azonban mind a két II. stádiumhoz akár más faktorok romlása is vezethet, nemcsak a tumor mérete, mint például a nyirokcsomókra való kiterjedtség vagy esetleg két tumor is jelen van. 5) III. stádium azt jelenti, hogy a rákos sejtek mind a tüdőben, mind a nyirokcsomóban jelen vannak a mellkas közepén. Két részre osztható a III. stádium is: III/A stádium: ebben az esetben a tüdőrákos sejtek a mellkas ugyanazon az oldalán terjedtek el, ahol kialakultak a tüdőben. III/B stádium: esetén a mellkas másik oldalára is áttértek a rákos sejtek, sőt akár a kulcscsont felett is. 6) IV. stádium magába foglalja azokat az eseteket (a tumor méretétől függetlenül), amikor az alábbi három dologból kettő teljesül: a rákos sejtek megjelennek a másik oldali tüdőn is vagy a tüdő, vagy a szív körüli folyadékban is. [9].

A tüdőrák diagnosztizálásának első lépése a fizikai vizsgálatok elvégzése, amit képalkotó vizsgálatok és köpet citológia követ. A röntgen, MRI, CT és PET felvételek részletesebb képet adhatnak a beteg állapotáról és kisebb elváltozások is azonosíthatók vele. A köpet citológia a köhögés során keletkező váladékban meghatározza, hogy van-e rákos sejt. Jelenleg a non-invazív képalkotó módszerek alapján történik a daganat kiterjedtségének a meghatározása és ezeket az

eljárásokat egészíti ki a szövethistológia. A szövettani vizsgálat az alapvető és legmegbízhatóbb módszer, a képalkotó eljárással azonosított potenciális daganatos elváltozás jelenlétének bizonyítására, valamint annak malignus vagy benignus természetének, illetve pontos szövettani meghatározásának is [10]. A szövethistológiához tartozó mintavétel a biopszia, amelynek típusai bronchoszkópia, ultrahang irányítású bronchoszkópia, mediasztinoszkópia és vékonytű biopszia [11]. Bronchoszkópia, más néven légúti tükrözés során a garat helyi érzéstelenítését követően a bronchoszkópot végig vezetik a légcsövön keresztül a hörgőkbe, majd mintát vesznek a hörgők nyálkahártyájából és a környezetükből, valamint a tüdőszövetből. A mediasztinoszkópiával (gátortükrözés) a két tüdő közötti terület térképezhető fel, beleértve a szívet, a légcsövet, a nyelőcsövet, a csecsemőmirigyet és a nyirokcsomókat a daganat kiterjedésének meghatározására. A tű biopszia során a mellkasfalán keresztül tűt vezetnek a képalkotó tesztek alapján gyanús tüdőszövetbe és mintát vesznek belőle. Amennyiben ez nem lehetséges, akár műtéti úton is történhet a mintavétel. A pontos diagnózis és a stádium meghatározása elősegíti az optimális kezelés kiválasztását is. Azonban a szövethistológiai eljárások mind kockázatos invazív módszerek.

2.2 A tüdőrák kezelése

A tüdőrák esetén a megfelelő terápia kiválasztását számos tényező befolyásolja többek között a daganat típusa (kissejtes vagy nem kissejtes), mérete, az elhelyezkedése, az előrehaladottsága és a szervezet egészségi állapota is. Ebből kifolyólag a legjobb kezelés kiválasztása igen bonyolult. A leggyakoribb lehetőségek a műtét, a sugárkezelés, a kemoterápia és az immunterápia, illetve néhány esetben akár ezek kombinációja is lehetséges. 2015-ben a tüdőrákos betegek esetében alkalmazott kezelések közül a műtétek 22%-ot, a radioterápia 38,8%-ot és a kemoterápia 39,2%-ot tettek ki [12]. Három típusú tüdőtumor eltávolító műtétet különböztetünk meg: a lobektómiát (a tüdő egy vagy több részének eltávolítása), a pneumonektómiát (az egész tüdő eltávolítása) és a szegmentektómiát (tüdő csak egy kis darabjának eltávolítása). A sugárkezelés a sugárzás impulzusait alkalmazza a rákos sejtek elpusztítására. A kemoterápia során alkalmazott készítmények kihasználják a rákos sejtek sokkal gyorsabb osztódását, azonban az egészséges sejteket is pusztítják, ezáltal mellékhatásként számos esetben különböző anémiák is megjelennek, mint például neutropénia, trombocitopénia, limfocitopénia. Ezért is fontos a kezelés alatt a beteg folyamatos monitorozása. A kemoterápiás kezelést mind a négy típusú tüdőrák (ADC, SCC, LCLC, SCLC) esetén alkalmazzák [12]. A kemoterápia esetén megkülönböztetünk adjuváns és

neoadjuváns kezelést, illetve az előre haladott (III és IV stádiumban) daganatos megbetegedés esetén alkalmazott terápiát [13]. A neoadjuváns kemoterápia lehetővé teszi a mikrometasztázisok korai kezelését, amivel a tumor akár teljes regressziója is elérhetővé válik. Ebben az esetben a műtétet megelőzően alkalmazzák a kemoterápiát, azonban az eredményessége kutatások hiányában még vitatott [13–15]. Az adjuváns kemoterápiát potenciális reszekciós operációt követően alkalmazzák II/A és III/A stádium besorolású daganatok esetén. A hatékonysága azon a feltételezésen alapul, hogy a műtétet követően a gyógyulást leggyakrabban a távoli metasztázisok kialakulása akadályozza. Tanulmányok bizonyították, hogy az 5 éves túlélési esély megnő még a nagyobb tumorok esetén is (>4cm) [13,16] adjuváns kemoterápia alkalmazása során. Előrehaladott tüdőrákos betegek esetén, amikor már számos metasztázis is kialakult, már nem alkalmazható reszekciós műtét. Ezekben az esetekben palliatív terápia javasolt, ami az immunterápia megjelenése előtt leggyakrabban platina dublett volt, karboplatinval vagy ciszplatinnal, gemcitabinnal, vinorelbinnel vagy taxánokkal (paclitaxel vagy docetaxel) [13]. A kezelések hatékonyságát növelheti a minél szélesebb körű ismeret a beteg állapotáról.

2.3 Krónikus obstruktív tüdőbetegség

A tüdőrák mellett a tüdő egy másik igen elterjedt megbetegedése a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), amely megelőzhető és kezelhető légúti rendellenesség, amit progresszív, részben reverzibilis légáramlás korlátozódás és tüdő hiperinfláció jellemez [17]. Mind a tüdőrák, mind a COPD esetén a magas mortalitási arány többek között a korai stádiumukbeli tünetmentességnek és a megfelelő megkülönböztető diagnosztikai eszközök hiányának tudható be [6]. Mindemelllett a COPD kialakulása növeli a tüdőrák kialakulásának a kockázatát is, ebből kifolyólag a két betegség sokszor társbetegséggént van jelen a szervezetben [18]. Habár nem pontosan ismert ennek a kapcsolatnak a mechanizmusa, azonban hozzájárulnak a genetikai és epigenetikai változások, az immunrendszer, a tüdő mikrokörnyezetének és mikrobiómájának szabályozási zavara, valamint a dohányzás által generált oxidatív stressz is.

A krónikus obstruktív megbetegedés az emfizéma és a krónikus hörghurut kialakulása [19]. Az emfizéma során a léghólyagocskák kitágulnak, a tüdőszövet károsodik és csökken az egységnyi légző felület, mindemelllett a krónikus hörghurut gyulladást és szűkületet okoz a hörgőkben, aminek következtében nyálka halmozódik fel. Mind a két megbetegedés elzáródáshoz vezet a légzőrendszerben, ezáltal nehézlégzést és légzési problémákat okozhat [20]. A COPD

kialakulásának leggyakoribb kockázati tényezője a dohányzás, de más környezeti hatások is előidézhetik, mint például a légszennyező anyagok (vegyi anyagok, füst, por) hosszútávú inhalációja [21]. A fejlődő országokban a dohányfüst mellett komoly problémát jelentenek, hogy az otthonok gyakran rosszul szellőznek, és a családok arra kényszerülnek, hogy belélegezzék a főzéshez és fűtéshez használt tüzelőanyagok égéstermékeit. A külső tényezők mellett a COPD kialakulásában genetikai tényezők is szerepet játszhatnak, a COPD-ben szenvedők körülbelül 5% -ánál a betegség kialakulása α -1-antitripszin (AAT) hiányára vezethető vissza (fiatalkori COPD) [22]. Ez a fehérje védi a tüdőszöveteket károsodástól, amelyet a neutrofil elasztáz enzim aktivitás növekedése okoz és emfizéma kialakulásához vezethet [23]. Tudományos kutatások azt mutatják, hogy a COPD-s betegek nagy arányban kerülnek ki a 40 év felettiek közül, és olyanok köréből, akik élete során a dohányzás valamely formája (cigaretta, szivar, pipa, akár csak passzív formában is) legalább rövid ideig megjelent [24].

A COPD korai diagnózisa nem egyszerű, mivel nincs önmagában megfelelő teszt az azonosításához. A diagnózis elsősorban a páciens életmódjának és genetikai történetének feltérképezésén, fizikai vizsgálatokon, tüneteken és vérvizsgálat eredményein alapul. A tüdőfunkciók értékelésére spirometria vizsgálatot alkalmaznak. Ez a vizsgálat az alapja a COPD stádiumának meghatározásának is. A páciens állapotáról részletesebb képet kaphatunk képalkotó diagnosztikai módszerekkel, mint például röntgennel vagy CT vizsgálattal, amelyek részletes képet mutatnak a tüdőről, az érrendszerről és a szívről is [25].

2.4 Szérum

A humán vér elemzése útján részletes képet kaphatunk az egyén egészségi állapotáról. A vért már időszámításunk után a második században alkalmazták arra, hogy meghatározzák a betegség típusát, habár ekkor leginkább a vérnek csak a fizikai tulajdonságait vizsgálták [26]. Az emberi szervezet vérkeringésének és a mikroszkóp felfedezésének köszönhetően rohamos fejlődésnek indult az emberi szervezetben lejátszódó folyamatok megismerése és a különféle betegségek diagnosztizálása [26]. Napjainkban bár számos megbetegedésre és kóros elváltozásra következtethetünk a vér elemzésével, még mindig további lehetőségeket rejt a biomarker kutatás területén. Vér alapú új molekuláris diagnosztikai eljárások fejlesztése, molekuláris markerek feltárása, validálása klinikai alkalmazásra a ma még nehezen azonosítható betegségek

diagnosztizálásához vezethet. Ennek köszönhetően a tüdőrák és a COPD korai felismerése is lehetővé válhat, amely a túlélési esély jelentős növekedését eredményezheti.

A vér fő komponensei: a sejt (alakos) elemek (vörösvértestek, fehérvérsejtek, vérlemezkék) és a plazma. A vörösvértestek oxigént szállítanak a szervezetben a hemoglobin nevű fehérje segítségével. A hemoglobin lehetővé teszi, hogy a vörösvértestek felvegyék az oxigént a tüdőből. A fehérvérsejtek a test immunrendszerének részét képezik, segítenek a fertőzések és betegségek leküzdésében. Többféle típusát különböztetjük meg: granulociták (bazofilek, neutrofilek, eozinofilek), limfociták, monociták. A vérlemezkék segítik a véralvadást.

A plazma a vér folyékony állománya, amely extracelluláris mátrixot alkotva oldott sókat, glükózt és fehérjéket egyaránt tartalmaz. [27]. Feladatait a benne található molekulák határozzák meg, például tápanyag és anyagcsere termékek szállítása, hormonok szállítása, belső homeosztázis szabályozása az ozmotikus nyomás biztosításával, pH szabályozással, hőszabályozással. A plazmában található fehérjék két csoportra oszthatók, plazma fehérjékre és szabályozó fehérjékre. A szabályozó fehérjék közé tartoznak az enzimek és hormonok, ezek sokkal kisebb mennyiségben vannak jelen a plazmában, mint a plazma fehérjék. A plazma fehérjék 3 fő csoportja az albuminok, a fibrinogének és a globulinok. Az albumin a plazma fehérjék körülbelül 54 v/v%-át teszi ki és a májban képződik. Az albuminok meghatározó szerepet játszanak a vér ozmotikus nyomásában, vagyis jelenlétük megtartja a vizet az ereken, és a szövetekből az erek falain keresztül a véráramba juttatják azt. Másrészt kötő fehérjeként és szállító, hordozóként is szolgál a zsírsavak és szteroid hormonok számára [28]. A fibrinogén a plazma proteinek csupán 7%-át teszik ki. Az albuminhoz, valamint az alfa- és béta-globulinokhoz hasonlóan a fibrinogént is a máj termeli. A véralvadásban elengedhetetlen szerepe van a fibrinogéneknek [28]. A véralvadási folyamat lejátékozódását követően szérumot kapunk. A teljes plazma proteinek körülbelül 38 %-át a globulinok teszik ki, amelyek három fő alcsoportja: alfa-, béta- és gammaglobulinok, amelyek heterogén csoportot alkotnak. Az alfa-, és bétaglobulinok az albuminhoz hasonlóan részt vesznek a vas, a zsírsavak és a zsírban oldódó vitaminok, mint például A-, D-, E- és K-vitaminok szállításában a sejtekhez, illetve hozzájárulnak a vér ozmotikus nyomásához is. A gammaglobulinok azok a fehérjék, amelyek közreműködnek az immunrendszer működésében. Az alfa frakció főleg α -1-antitripszinből és haptoglobinnal áll. A fő béta globulin fehérje a transferrin [29]. A humán vérben öt izotípusú immunglobulint különböztetünk meg azok nehéz lánc alapján: immunglobulin G (IgG),

immunglobulin M (IgM), immunglobulin A (IgA), immunglobulin E (IgE) és immunglobulin D (IgD). Az IgA fontos szerepet játszik a nyálkahártyák védelmében. Az IgG a szérumban legnagyobb koncentrációban lévő antitestje, amelynek feladata, hogy védelmet nyújtson a bakteriális és vírusos fertőzések ellen, kialakulása azonban időbe telik a fertőzést követően. Az IgM a vérben az az antitest, amelyik először reagál a szervezetben egy új fertőzésre. Az IgE normál esetben alacsony koncentrációban van jelen a vérben, mennyisége allergiás reakciók során vagy paraziták elleni védekezésben növekedik meg jelentősen. Az IgD a legkevésbé tanulmányozott immunglobulin, ez annak is köszönhető, hogy csak nagyon kis koncentrációban van jelen a vérben. Amellett, hogy ezek a fehérjék fontos szerepet játszanak az emberi szervezet immunrendszerének szabályozásában, a rajtuk lévő glikán szerkezetek módosulásai révén információt szolgáltathatnak a szervezetben aktuálisan zajló fiziológias és patológias folyamatokról is [27].

Számos megbetegedés esetén, mint például gyulladás, rák, fertőzések, alkoholizmus, vizsgálták a szérumban lévő glikoproteinek poszttranszlációs módosulásait [31,32]. Az AAT glikoprotein esetén a máj megbetegedésekor deszialilációt [33,34], az elágazások mennyiségének megnövekedését [35,36], és emelkedett fukozilációt [37] állapítottak meg. Az AAT glikozilációja különböző az egyes gyulladásos megbetegedések esetén [31], vagyis különböző gyulladásos megbetegedések más glikozilációs mechanizmust eredményeznek az AAT felületén, például a szisztémás lupusz eritematózus [38] és a gyulladásos tüdőbetegség [39] is. Azonban a gyulladás következtében fellépő szialiláció csökkenést több kutatás is bizonyítja [40,41]. Az AAT, a haptoglobin és a transferrin fehérjék glikozilációjában a szializáció növekedése tapasztalható gyomorrák esetén [42].

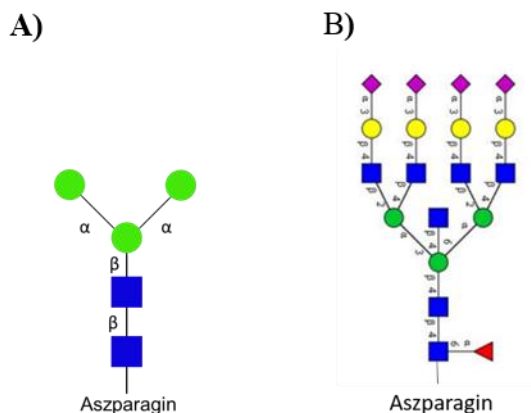
Az IgG glikozilációjának változása számos betegség esetén, mint például reumás ízületi gyulladás [43–45], Chron-betegség [45,46], tuberkolózis [46] és fiatalkori ízületi gyulladás [46] esetén a galaktóz mennyiségének csökkenésében jelenik meg. A haptoglobin fehérje esetén gyulladás hatására megváltozik a fukoziláció mértéke [47,48]. A haptoglobin vizsgálata esetén fukoziláció növekedését tapasztalták reumás ízületi gyulladásban szenvedő betegek esetén [49], azonban ez a glikozilációs változás figyelhető meg májbetegség, alkoholizmus [47,50,51] és szeronegatív betegek esetén is [49]. A rákos megbetegedésekről általánosan elmondható, hogy a haptoglobin glikozilációjában megváltoztatja a fukozilációt és a szializációt (hasnyálmirigy-, máj-, prosztata-, tüdő-, emlő-, petefészek-, vastagbél- és gyomorrák esetén is), valamint megnöveli az elágazások

számát [52]. A fukoziláció növekedését azonosították a haptoglobin glikozilációs változásában mellrák [53] és petefészekrák [54] esetén is, azonban egyik esetben sincs változás az $\alpha(2-6)$ szialsav esetén [31]. A transferrin glikánjainak elágazásában, fukozilációjában vagy szialilációjában bekövetkező változásokat figyelték meg számos rosszindulatú [55,56], örökletes (galactosemia [57], veleszületett glikozilációs rendellenesség [58] gyulladásos és más súlyos megbetegedések [59]. Szénhidráthiányos transferrint azonosítottak COPDs megbetegedés esetén [60]. A transferrin glikozilációját alkoholizmussal összefüggésben is vizsgálták. A kutatások azt bizonyították, hogy a transferrin szialsav [61], galaktóz és *N*-acetilglükózamin tartalma is lecsökkent [62]. Montreuil és mtsai cirhózisos és hepatitiszes betegeknél állapították meg a transferrinhez kapcsolódó glikánoknál az elágazások mennyiségének növekedését. A transferrin glikozilációs profiljában változás lép fel malignus máj rák esetén is. Hasonlóan a benignus megbetegedés esetén az elágazások növekedése figyelhető meg, továbbá fukóz kapcsolódik az perifériás *N*-acetilglükózaminhoz és négyszeres növekedés lép fel a galaktózhoz $\alpha(2-3)$ kapcsolódású szialsav mennyiségében [55,63]. A haptoglobin és a transferrin fehérjék esetén a jelentős fukoziláció változásokat a fukóz csoport periférikus *N*-acetilglükózaminhoz kapcsolódása magyarázhatja [31]. Azonban sok esetben a teljes szérum glikozilációs változásai is fontos információt hordoznak a szervezet egészségi állapotáról [64–69].

2.5 Glikoziláció - Glikobiomarkerek

A fehérjék sokféleségének és folyamatos változásának köszönhetően, vizsgálatuk révén részletes képet kaphatunk a sejtek, szövetek, de akár az egész emberi szervezet működéséről és az esetleges megbetegedésekről [70]. A fehérjék felületén a glikozilációnak nevezett folyamat során az endoplazmatikus retikulumban (ER) és a Golgi-komplexben kovalensen kötött szénhidrátkomponensek alakulhatnak ki. Az oligoszacharidok és a fehérjék közti kapcsolat kialakulása számos enzim együttes működésének eredménye. Elsősorban szekréciós, membrán, lizoszómális fehérjék esetén alakul ki, de megfigyelhető bizonyos citoszól, és magfehérjék esetén is. Az ER-ben a fehérjékhez kapcsolódó glikán csoportok többféle szerepet betölthetnek, úgy, mint szortírozó jel, elősegíthetik a funkcióképes konformáció kialakulását, fehérjekomplexek létrehozását, a polipeptidlánc stabilizálását, sejt–sejt és sejt–extracelluláris mátrix kölcsönhatások kialakulását [71–73]. A glikoproteineknek három fő típusa van, amelyet a szénhidrátkötés helye alapján különböztetünk meg: 1) *N*-kötött, amikor a szénhidrát rész az aszparagin (Asn) sav amid csoportjához 2) az *O*-kötött a szerin (Ser), a treonin (Thr) vagy a hidroxilizin hidroxil csoportjához

3) a C-kötött a triptofán szén oldalláncához kapcsolódik. Az N-kötött glikolizáció Asn-X-Ser/Thr konzervált konszenzus szekvenciánál megy végbe, ahol X bármely aminosav lehet kivéve a prolin (Pro), ez az X aminosav meghatározza az N-kötött glikoziláció hatékonyságát [74]. Minden N-kötött glikán szerkezet azonos, úgynevezett magszerkezettel rendelkezik, amit az 1. ábra szemléltet. Az N-glikánok mag szerkezete további cukor egységekkel meghosszabbíthatók így szerkezeti felépítésük alapján három csoportra oszthatók: 1) oligomannóz (a maghoz csak mannóz csoportok kapcsolódnak), 2) komplex (N-acetil-glükózaminil-transzferázok segítségével képződött, úgynevezett antennák kötődnek a maghoz) és 3) hibrid (a mag mannóz (Man) $\alpha(1-6)$ karjához csak mannóz származékok kapcsolódnak, míg a Man $\alpha(1-3)$ karjához antennák kapcsolódnak) [72]. Az O-kötött glikánok vizsgálata sokkal összetettebb, mivel különböző fehérje-glikán kötésekre épülnek fel és rendkívül változatos szerkezetekkel rendelkeznek [75].



1. ábra: Az aszparagin-kötött glikán struktúra magszerkezete (A panel), valamint FA4BG4S(3)4 szerkezet, mint példa egy tipikus komplex aszparagin-kötött glikán struktúrára (B panel) A szerkezetek sematikus ábrázolása során az egyes monoszacharidok és kötések a következők szerint kerültek megjelenítésre: zöld kör:mannóz, kék négyzet: N-acetil glükózamin, piros háromszög: fukóz, sárga kör: galaktóz, lila rombusz: N-acetilneuraminsav, α , β : határozza meg a kötés irányát a gyűrű síkjához képest, a számok (2,3,4,6) a kötés pozícióját jelölik

A glikoziláció az egyik leggyakoribb ko- és poszttranszlációs módosulás az eukarióta sejtekben, amely specifikus lehet a szervezetben lejátszódó folyamatokra, ezáltal különféle betegségek következtében kialakult változásokra is [76]. A glikánok analízise egyre nagyobb szerepet tölt be a diagnosztikai módszerek sorában. Már hat évtizede ismert, hogy a rákos megbetegedések befolyással vannak a glikozilációra [77]. A tüdőrák diagnosztikai módszereinek kutatása során

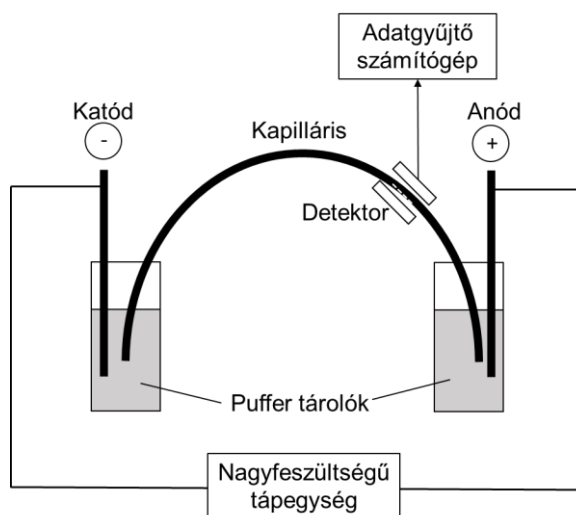
jelentős áttörést jelentene a megbízható, vérszérumból detektálható biomarkerek, valamint glikobiomarkerek azonosítása [65,78]. Ennek köszönhetően elkerülhetők lennének a fájdalmas invazív beavatkozások, mint például a biopszia. Az optimális rák biomarkerek olyan molekulák, amelyeket kizárólag a rákos sejtek és / vagy a tumor mikrokörnyezete állít elő elegendő mennyiségben ahhoz, hogy a daganat fejlődésének korai szakaszában megfelelően kimutathatók legyenek [79]. Azonban a biomarker alkalmazása nemcsak a diagnosztikában lehet hasznos, hanem a prognosztikus és a kezelésre adott válasz prediktív eszközeként is jelentős lehet [80]. A tüdőrák plazma, illetve szérumbiomarkereinek jellege széles skálán mozog, lehet fehérje, DNS, miRNS természetű, specifikus gének polimorfizmusa, valamint egy gén kópiaszámának változása, vagy akár a poszttranszlációs módosulás révén kialakult oligoszacharid szerkezet is. Az egyesült államokbeli FDA (Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala) által jóváhagyott biomarker a tüdőrák esetén a „Carcinoembryonic” antigén, amit még 1985-ben fogadtak el. Azonban ez a fehérje több ráktípus esetén is azonosítható, mint például vastagbél, gyomor, hasnyálmirigy, és mellrák, így nem specifikus a tüdőrákra [81]. Az α -1-antitripszin glikozilációs formája alapján következtetni lehet a kialakult tüdő tumor típusára, illetve meg lehet különböztetni a jóindulatú és a rossz indulatú tumoros elváltozásokat is [82]. Lattova és mtsai tüdőrákos betegek szövetmintáit vizsgálták tömegspektrometriás módszerekkel, és az eredményeik alapján az *N*-glikánok szerkezeti változásairól számoltak be [50]. Szignifikáns különbségeket kaptak a rosszindulatú betegek különböző stádiumú szövetmintái között, még az első stádiumú és az egészséges szövetminták között is.

2.6 Kapilláris elektroforézis

Az aszparagin-kötött glikánok analízisére számos módszert alkalmaznak, mint például: a nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC), kapilláris elektroforézis (CE), tömegspektrometria (MS) és a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) [30]. Az általam vizsgált humán szérumbiomarkerek analíziséhez kapilláris elektroforézis módszert alkalmaztam lézer indukált fluoreszcens detektálással, mivel a szérumban található glikoproteinekről lehasított *N*-kötött glikánok, viszonylag kis mennyiségben és kis koncentrációban is detektálhatók vele. A CE kis mennyiségű biomolekulák elválasztására jól alkalmazható. A mérés alapja a molekulák elektromos térben történő migrációja, amely két mechanizmus, az elektroosmotikus áramlás (EOF) és az elektroforetikus mobilitás együttes befolyása révén játszódik le. Az EOF a háttér elektrolit tömegáram, ami bevonat nélküli kapillárisban az anódtól a katód felé halad a negatív felületi töltés

miatt, bizonyos pH érték felett. Az elektroforetikus mozgás a töltés és a hidrodinamikai térfogat arányának függvénye. A minta töltése határozza meg, hogy az anód vagy a katód irányába mozdul el a molekula, a mérete pedig befolyásolja a migrációs sebességét [83].

A kapilláris elektroforézis előnyös fluorofórral jelölt oligoszacharidok vizsgálatánál a nagy elektromos tér hatására végbemenő gyors és hatékony elválasztásnak köszönhetően [84]. Az aszparagin-kötött oligoszacharidok elemzéséhez fontos megjegyezni, hogy nem tartalmaznak optikailag aktív csoportot (kromofór vagy fluorofór) és csak a szílsavat tartalmazók rendelkeznek inherens töltéssel (negatív). Így a glikánok analízise lézer indukált detektorral felszerelt kapilláris elektroforézis készülékkel (CE-LIF) csak optikailag aktív csoportok hozzáadása után lehetséges. A leggyakrabban alkalmazott festékek a cukormolekulák jelöléséhez a 2-AB, 2AA, PA, 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS) [85] és a 8-amino-naftalin-1,3,6-triszulfonsav (ANTS) [86]. Az APTS és ANTS előnye a detektálhatóság mellett, hogy a neutrális glikánokat is háromszoros negatív töltéssel látja el, ezáltal elősegítve az elektromos térben történő migrációjukat [85]. A méréshez szükséges minta térfogata femto- és nanoliter közötti tartományban mozog. Lézer indukált detektorral felszerelt készülékekkel az analit akár fmol anyagmennyisége is detektálható. A gélelektroforézis során néhány milliliter szeparáló gél akár több száz mintára elegendő lehet. A mérések során a kapilláris és az elválasztó közeg hőmérséklete szabályozható. Egy hagyományos elektroforetikus elválasztáshoz alkalmazott készülék főbb egységei: a kapilláris, a tápegység, a mintatartó, a puffertartó edények, a detektor és a jel gyűjtéséhez alkalmazható számítógép. A készülék sematikus felépítését a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: Egy kapilláris elektroforézis készülék vázlatos felépítése

Az oligoszacharidok kapilláris elektroforézissel különféle minta típusokból elemezhetők, mint például szilárd szövetekből [87], plazmából [88], szérumból [66,89], nyálból [90,91] és formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintából [92] is. Minden esetben a mintában lévő fehérjéről PNGase F enzim segítségével le kell hasítani a cukor szerkezeteket, majd azokat el kell különíteni a minták fehérjétől a további analízis érdekében.

2.7 Exoglikozidáz alapú glikán szekvenálás

A glikoziláció során keletkező *N*-kötött glikánok azonosításának egyik módja az úgynevezett exoglikozidáz alapú szekvenálás. Az elmúlt évtizedekben az oligoszacharidok szekvenálási technológiája nagymértékű fejlődésen ment keresztül, ami elősegítette a glikoproteinek analízisét is [93,94]. A cukormolekulák szekvenciájának meghatározásához kötés specifikus exoglikozidáz enzimek segítségével monomerenként lebontjuk a szerkezeteket, ezáltal építőelemei alapján azonosíthatjuk őket. A szekvenálás első lépéseként általában az *N*-kötött glikán struktúrák nem redukáló végein lévő szíalsavak lehasítása történik meg szialidáz enzim segítségével. Ezt követően a galaktóz monomerek levágása β -galaktozidáz enzim felhasználásával valósítható meg. A glikán mag struktúrájához közvetlenül kapcsolódó *N*-acetyl-glükózamin felszabadításához az *N*-acetyl-glükózaminidáz (hexózaminidáz) enzim használható. A fukóz monomerek hasításához többféle enzim alkalmazható attól függően, hogy a glikán szerkezet mely részéhez kapcsolódik. Van olyan fukozidáz enzim, amely az α 1-2, 3, 4 fukóz monomer kötések hasítja le, míg az α 1-2 fukozidáz csak az α 1-2 terminális fukóz molekulákat vágja le. Az α -mannozidáz enzim a Man monomerek lehasítását végzi a molekuláról [72]. Az azonosítás során az enzimeket a glikán mintákhoz adjuk egyenként, az első mintához csak a szialidáz enzimet, a másodikhoz a szialidáz és galaktozidáz enzimet, a harmadikhoz szialidáz, galaktozidáz és hexózaminidáz enzimet is, a negyedikhez még fukozidáz enzimet, az ötödikhez csak a mannozidáz enzimet. Az enzimatis reakciók minimum 1 óra alatt mennek végbe 37 °C-on történő inkubáció mellett. A leemésztett minták elemzése lézer indukált detektorral ellátott kapilláris elektroforézissel történik. Az elektroferogramok összehasonlítása során az eredeti enzimmel még nem leemésztett minta elektroferogramját hasonlítjuk az egyes enzimatisan emésztett minta elektroferogramjával. Az összehasonlítás alapja az egyes glikán szerkezetekhez tartozó glükóz egység (GU) értékek, amik az enzimatis emésztés során megváltoznak, így a változásból az eredeti glikán struktúra vissza követhető. A

GU értéket az adott glikán szerkezet monoszacharidjai és azok kapcsolódási típusai együttesen határozzák meg.

2.8 Gépi tanulás

A mesterséges intelligencia (MI) olyan tudományterület, ami a problémamegoldás érdekében ötvözi a számítástechnikát és a robusztus adatbázisokat [95]. A technológiájának intenzív kutatása és az omika bevezetése az orvosi elemzésekbe, mint például a proteomika, genomika, transzkriptomika, radiomika, metabolomika és glikomika, potenciális alapot teremt a rákprognózis módszereinek javításához is [96]. Az MI egyik tudományága a gépi tanulás (ML), amely statisztikai módszerekkel tanítja az algoritmusokat bemeneti adatok segítségével előrejelzések vagy osztályozások készítésére [97]. Az ML-nek fontos szerepe van az egyre növekvő adattudomány területén. A gépi tanulást már a biomarkerek és a radiomika asszociációs kapcsolatok feltérképezésében is alkalmazták [19, 20]. Jayasurya és mtsai két módszert hasonlítottak össze, a Bayes hálózaton alapuló (BN) és a támaszvektor gép modelleket (SVM), annak érdekében, hogy megállapítsák a BN modell hiányos bemeneti adatokkal van-e olyan pontos, mint az SVM. Az analízishez nem kissejtes tüdőrákos betegek pozitronemissziós tomográfiás (PET) felvételeit, patológiás adatait és állapotuk információját használták fel bemeneti adatként arra, hogy feltérképezzék, milyen pontosan tudják előre jelezni a rákos megbetegedés kimenetelét és a kétéves túlélési arányt. Bebizonyították, hogy kevesebb adattal a BN módszer jobb, mint az SVM és az orvosi területen alkalmasabb az előrejelzésekre. [99]. Ezen kívül Sun és mtsai számítógépes tomográfiai felvételeket vizsgáltak a tüdőrák korai diagnózisának elősegítése érdekében [100]. Prognosztikus modelljeik kidolgozásához számos módszert alkalmaztak, például SVM-eket és egyéb osztályozókat, beleértve a neurális hálózatokat, LASSO regressziókat, véletlenszerű erdőket, döntési fákat és k-legközelebbi szomszédok algoritmusát. Ezen túlmenően a radiomikai adatok, például PET képek felhasználhatók a tüdőrák szövettani altípusainak előrejelzésére ML modellek alapján [101].

A biomarker kutatások egyre nagyobb figyelmet kaptak az elmúlt évtizedekben, ugyanakkor a hatalmas mennyiségű nyers adat értelmezéséhez kifinomult statisztikai módszerek kifejlesztése is elengedhetetlen. A biomarker kutatások ezért számos új statisztikai módszer kidolgozását indukálták a biomedikai kutatásokban [102]. A ML és a különböző típusú omika kombinációja úttörő módszer a tüdőrák korai diagnózisában is [19, 24][103]. Sok esetben a gépi tanulást

alkalmazták az *N*-glikoproteinek szerkezeti osztályozására, mint például a mag és az antennáris fukoziláció megkülönböztetésére [104]. A gépi tanulás például felhasználták két analitikai módszer, a HPLC és az MS összehasonlítására hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegek humán szérum mintáinak *N*-glikozilációs analíziseként kapott eredményeinek elemzésével [67]. A genomikai jellemzők és az ML-modell megközelítések alapján a tüdőrák besorolása [105], a kiújulás kockázata [106], a kórszövettani fokozat [107] vagy akár prognosztikai biomarkerek [108] előrejelzése is elvégezhető. A gépi tanulási elemzéssel kombinált mutációs jellemzők előre jelezhetik a tüdőrák gyógyszerrezisztenciáját vagy akár rosszindulatú betegségek prognózisát is [31, 32]. A proteomika, az RNS és a miRNS expresszió ML módszerekkel történő elemzése szintén segítheti a tüdőrákkal kapcsolatos diagnosztikai kutatások fejlődését [110–114]. A fent említett publikációk alapján az ML módszerek segíthetik a humán szérum minták glikomikai elemzését és új molekuláris diagnosztikai módszerek fejlesztéséhez járulhatnak hozzá.

2.9 Döntési fa

A döntési fa algoritmus a felügyelt gépi tanulási algoritmusok közé tartozik, amely prediktív tanulási modellként bináris változók analízisére is alkalmas. Használható mind osztályozási, mind regressziós feladatokhoz [115]. Ez a széles körben alkalmazott adatbányászati módszer több kovariánson alapuló osztályozási rendszer létrehozására vagy egy célváltozóra vonatkozó előrejelzési algoritmus fejlesztésére alkalmas. A technika ágszerű csoportosítási struktúrát alkalmaz a populáció osztályozásához, ami egy fordított faként jelenik meg gyökér, belső és levél csomópontokban [116]. Az algoritmus nem parametrikus és hatékonyan képes kezelni bonyolult, nagy adatmennyiségű táblázatokat is. Kellően nagy adathalmaz esetén két részre bontjuk azt, egy tanító és egy validáló adatsora. A tanító adathalmaz alapján épül fel az osztályozó fa modell és a validáló halmazzal ellenőrizzük a modell pontosságát [117]. Az osztályozó döntési fa módszer segítséget nyújthat potenciális tüdőrák biomarkerek azonosításához különböző mérési módszerek elemzésével, mint például szérum minták felületnövelt lézer-deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometria analízisével hatékonyan meg lehet különböztetni az NSCLC betegek mintáit az egészségestől [118]. Osztályozási és regressziós fa analízis (CART) segítségével Patz és mtsai azonosítottak négy szérum fehérjét, amelyek potenciális segítséget nyújthatnak a tüdőrák diagnosztizálásánál, hasznosak lehetnek a tüdőbetegségben szenvedő betegek kezelésében, és a tüdőrák kialakulása szempontjából potenciálisan magas tüdőrák kockázattal rendelkező személyek

azonosításában [68]. A CART analízis alkalmas lehet a betegek foglalkozási expozíciója révén kialakult tüdőrák munkahelyi összefüggéseinek elemzésére is [119].

3. A PhD munka fő célkitűzései

A tüdőrákos megbetegedés nagyarányú halálozási statisztikájának egyik fő oka a kései diagnózis. Erre megoldást jelenthet a korai diagnosztizálás. Jelen PhD munka célja a tüdőrákos megbetegedés korai stádiumban történő azonosításának elősegítése potenciális glikobiomarkerek azonosítása révén. Első lépésként a humán vérszérumban található aszparagin-kötött glikán profil meghatározását terveztem lézer indukált detektorral felszerelt kapilláris elektroforézis készülék használatával. Ezt követően az elektroferogramon elválasztott *N*-kötött oligoszacharid szerkezetek azonosítását tűztem ki célul. A munka következő fázisában egészséges, tüdőrákos, COPD-s, valamint tüdőrákos és COPD-s betegektől származó szérum minták glikán profiljának az összehasonlítása volt a cél jelentős specifikus eltérések keresése érdekében. A betegség specifikus potenciális glikobiomarkerek azonosítása révén az elért eredmények információt nyújthatnak új molekuláris diagnosztikai módszerek fejlesztéséhez.

Munka második szakaszában tüdőrákkal diagnosztizált betegek szérum mintáinak *N*-glikomikai elemzésével foglalkoztam. Ezen vizsgálatok során célom volt, hogy megvizsgáljam, hogyan alakul a tüdőrákos betegek glikán profilja a reszekciós műtétet követően a kiindulási állapothoz képest. Van-e korrelációs kapcsolat az egyes klinikai paraméterek és a glikán szerkezetek minőségi és mennyiségi megváltozása között. A kérdés megválaszolásához a tüdőrákos betegtől gyűjtött szérum mintákat analizáltam, amelyek a reszekciós műtétet megelőzően, és azt követően kerültek levételre. Munkám során vizsgálni kívántam továbbá a kemoterápia során bekövetkező glikán profil változását, valamint azt, hogy van-e korrelációs kapcsolat a klinikai paraméterek és a glikán szerkezetek mennyiségének megváltozása között. A vizsgálatra szánt minták a kezelés különböző fázisaiban kerültek levételre. A vizsgálatok során az egyes glikán szerkezetek megváltozását nemcsak egyenként akartam analizálni, hanem a különböző glikán típusok együttes változását is. Az eredményeket figyelembe véve a tüdőrákos betegek kezelésének kimeneteléről potenciális prognosztikai képet kaphatunk a vérszérum minták elemzésével, ami akár a kezelés hatékonyságát is megnövelheti.

4. Anyagok és módszerek

Ebben a fejezetben részletesen bemutatom a PhD munkám során felhasznált szérum mintákat. Megadom a minták gyűjtéséhez elengedhetetlen etikai engedély számát és a felhasznált reagenseket. A módszerek leírását a szérum minták feldolgozásához alkalmazott minta előkészítési protokoll lépéseivel kezdem. Ezt követően a minták analíziséhez használt kapilláris elektroforézis módszer pontos paramétereit ismertetem. Ez a fejezet tartalmazza az N-kötött glikán szerkezetek azonosításához az exoglikozidáz alapú szekvenálás lépéseit. Az Adatelemzés alfejezet foglalja magában a döntési fa és a regressziós analízis módszerének leírását és paramétereit.

4.1 Etikai engedély

A 23580-1/2015/EKU (0180/15) számon nyilvántartott etikai engedély alapján a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar és a miskolci Semmelweis Kórház Tüdőgyógyászati Osztályával együttműködésben egészséges és különböző stádiumú, valamint kezelés előtti és utáni krónikus obstruktív tüdőbetegségben és tüdőrákban szenvedő személyektől gyűjtöttünk szérum mintákat.

4.2 Humán szérum és standard glikoprotein minták

A tüdőrák és COPD biomarker keresés esetén a vizsgálatba 90 krónikus obstruktív tüdőbeteget, 90 tüdőrákos beteget és 90 mind a két betegségben szenvedő beteget vontam be. A kontroll csoportba egészséges emberektől gyűjtöttünk szérum mintákat alvadási aktivátort tartalmazó szérumcsövekbe (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA). A levett vérmintákból elválasztott szérum frakciót a minta előkészítésig -80 °C hőmérsékleten tároltuk. A specifikus glikobiomarker azonosításokhoz az egyes csoportokba tartozó mintákból azonos mennyiséget összekevertem, így négy úgynevezett „pool”-ozott mintát készítettem (LC, COPD, LC+COPD és Kontroll). Ezeknek a mintáknak az N-kötött glikán profilját hasonlítottam össze, hogy potenciális glikobiomarkereket azonosítsak. A további munkám során 17 tüdőrákos betegről, akik reszekciós műtéten estek át, mintát vettünk a műtét előtt és után is. Ezeket a mintákat elemeztem döntési fa és regressziós analízissel. Szintén döntési fa analízissel elemeztem 33 olyan tüdőtumoros páciens humán szérum mintájának N-kötött glikán profilját, akik kemoterápiás kezelésben részesültek. Az egyes mintavételek a kezeléseik között voltak, ezáltal végig követve a kezelés hatékonyságát is. Az 1. és 2. táblázat tartalmazza az N-glikozilációs analízisbe bevont műtött, illetve kemoterápiás kezelésben részesült betegek adatait.

Beteg #	Élet kor (év)	Nem	Szövettani besorolás	Stádium
1	78	férfi	laphámrák	I/B
2	70	férfi	kissejtes neuroendokrin karcinóma	I/A
3	61	nő	adenokarcinóma	II/B
4	79	nő	adenokarcinóma	I/B
5	52	férfi	adenokarcinóma	III/B
6	63	férfi	laphámrák	II/B
7	68	nő	adenokarcinóma	I/A
8	53	férfi	adenokarcinóma	I/A
9	58	nő	adenokarcinóma	I/A
10	75	férfi	adenokarcinóma	III/A
11	66	nő	adenokarcinóma	I/A
12	61	férfi	anaplasztikus sejtes karcinóma	II/B
13	63	nő	adenokarcinóma	I/A
14	70	férfi	adenokarcinóma	I/A
15	68	férfi	laphámrák	II/A
16	75	férfi	adenokarcinóma	I/A
17	77	férfi	adenokarcinóma	I/A
Átlag életkor (év): 66,8, Medián életkor: 68 (év), Életkor tartomány: 52–79 (év)				

1. táblázat *A vizsgált műtött betegek adatai*

Beteg #	Életkor (év)	Nem	Szövettani besorolás	Stádium	Alkalmazott kemoterápia
1	59	férfi	laphámrák	IV	TAX-CBP
2	55	férfi	laphámrák	IV	GEM- CBP
3	67	férfi	kissejtes neuroendokrin karcinóma	III/B	CBP-ETO
4	58	nő	adenokarcinóma	IV	PEM-CDDP
5	70	férfi	adenokarcinóma	IV	PEM-CDDP
6	69	férfi	adenokarcinóma	IV	Mylan
7	61	nő	adenokarcinóma	IV	GEM-CBP
8	47	férfi	adenokarcinóma	III/B	GEM-CBP
9	68	férfi	adenokarcinóma	IV	GEM-CBP
10	53	férfi	kissejtes neuroendokrin karcinóma	IV	CBP-ETO
11	69	férfi	adenokarcinóma	I/A	GEM-CBP
12	58	férfi	kevert laphám és mirigysejtes tüdőrák	III/B	GEM-CBP
13	62	férfi	kissejtes neuroendokrin karcinóma	IV	platina - etoposid
14	61	férfi	laphámrák	III/B	GEM-CBP
15	69	nő	kissejtes neuroendokrin karcinóma	III/A	CPB –ETO
16	69	nő	adenokarcinóma	III/A	GEM+CBP
17	74	férfi	adenokarcinóma	III/A	GEM+CBP
18	66	nő	adenokarcinóma	IV	GEM-CBP
19	63	férfi	adenokarcinóma	IV	GEM-CBP
20	67	férfi	laphámrák	III/A	CBP-TXT/C
21	47	férfi	adenokarcinóma	I/B	GEM+CBP
22	62	férfi	adenokarcinóma	III/B	GEM-CBP
23	62	férfi	kissejtes neuroendokrin karcinóma	IV	CBP-ETO
24	61	férfi	adenokarcinóma	I/B	GEM+CBP
25	72	férfi	laphámrák	IV	GEM-CBP
26	56	férfi	laphámrák	III/B	TAX+CBP
27	65	nő	adenokarcinóma	I/A	GEM-CBP
28	70	férfi	laphámrák	IV	TAX-CBP
29	63	nő	kissejtes neuroendokrin karcinóma	III/A	CBP-VP
30	73	férfi	adenokarcinóma	III/A	GEM-CBP
31	72	nő	adenokarcinóma	IV	PEM-CBP
32	59	nő	adenokarcinóma	III/A	CDDP/TXT/C radio
33	65	férfi	laphámrák	III/B	GEM-CBP

Átlag életkor: 63,4 (év), Medián életkor: 63 (év), Életkor tartomány: 47–74 (év)
--

2. táblázat *A kemoterápiás kezelés során követett betegek adatai*

A humán szérumban lévő aszparagin-kötött glikánok azonosításához standard fehérjéket használtam. A felhasznált IgG-t és IgA-t, az α -1-antitripsint, a transferrint, a haptoglobint, a fetuint és a ribonukleáz B-t a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől vásároltuk.

4.3 Reagensek

A kísérleti munka során felhasznált anyagok: nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és Nonidet P-40 a VWR-től (Radnor, PA, USA) származnak. Az acetonitril, a tetrahidrofurán (THF), a nátrium cianoborohidrid (NaBH_3CN , 1 M THF-ben oldva), glicerin, ditioneitol (DTT) és az ecetsav Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) gyártmányú. A szénhidrát származékképzéshez a Beckman (Fullerton, CA, USA) által kifejlesztett Fast Glycan Labeling and Analysis Kit-et használtam a gyártó utasításai szerint, ahol ettől eltértem azt jeleztem. A felhasznált peptid-N-glikozidáz F enzimet (PNGase F) az Asparia Glycomics, (San Sebastian, Spanyolország) gyártotta. A szekvenáláshoz szükséges exoglikozidáz enzimeket: szialidáz A (*Arthrobacter ureafaciens*), β -galaktozidáz (*Jack bean*) and β -N-acetil hexóaminidáz (*Jack bean*) a ProZyme (Hayward, CA, USA) állította elő.

4.4 Módszerek

4.4.1 Mintaelőkészítés

A humán szérum minták feldolgozása során a kutatócsoportunk által már korábban fehérjék N-glikán szerkezetének vizsgálatára kidolgozott mintaelőkészítési protokollokat módosítottam a minták optimális analíziséhez [120,121].

A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztott minták kiolvasztását egy forgó-rotációs készüléken (BioSan Programmable Rotator Multi Bio RS-24) hajtottam végre. A kiolvasztott mintákból $2\text{ }\mu\text{l}$ mennyiséget hígítottam ötszörösére HPLC tisztaságú vízzel. A fehérjék szerkezetének felületét hozzáférhetővé kellett tenni az endoglikozidáz enzim számára, azaz denaturálni kellett. A denaturáláshoz $5\text{ }\mu\text{l}$ denaturáló oldatot (0,0017% NP-40, 0,625% SDS, 12,5 mM DTT) pipettáztam a mintákhoz és kétlépéses denaturálást alkalmazva először 10 percig $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, majd 10 percig $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten inkubáltam. Ezután következett az N-kötött glikánok felszabadítása a fehérjéről, amihez a mintaelegyhez $20\text{ }\mu\text{l}$ vizet és $1\text{ }\mu\text{l}$ PNGase F enzimet adtam (200 mU) és

60 °C hőmérsékleten egy órán keresztül inkubáltam a reakciókeveréket. Az endoglikozidáz emésztési reakciót 120 µl -20 °C hőmérsékletű acetonitrillel állítottam le annak érdekében, hogy precipitáljuk a minta fehérje és polipeptid tartalmát. A kicsapódott fehérje frakciót centrifugálással 13 500 RPM (Microspin 12, BioSan, Riga, Lettország,) fordulatszámon 5 perc alatt különítettem el a cukorkomponensektől. A felülúszót, amely a lehasított glikánokat tartalmazta, tiszta mikorcentrifuga csövekbe pipettáztam át, majd 60 °C hőmérsékleten egy óra alatt beszárítottam SpeedVac (Jouan RC 10.10 Vacuum Concentrator Centrifugal System, Jouan, San Francisco, CA, USA) készülékben. A beszárított mintát a jelölő oldattal vittem újra folyadékba. A jelöléshez kétlépéses redukív aminálást alkalmaztam. Az első lépésben egy Schiff-bázis képződik savas katalizátor jelenlétében, a második lépésben pedig redukálás játszódik le, ami stabil konjugátumot hoz létre. A jelölő oldat 4 µL 40 mM 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS) 20%-os ecetsavban oldva, 2 µL NaBH₃CN (1 M koncentrációban THF-ben oldva) és 4 µL 20%-os ecetsav. Az APTS maga a jelölő festékanyag, az ecetsav a katalizátor, amely felgyorsítja a reakciót, a NaBH₃CN pedig a redukálószer. A reakciót zárt Eppendorf csőben egy órán keresztül 50 °C hőmérsékleten hagytam lejátszódni, majd nyitott kupakkal 80 percig 55 °C-on beszárítottam [122]. A jelölő reagenseket nagy feleslegben alkalmaztam annak érdekében, hogy megakadályozzam a reakciót az esetlegesen megmaradt, amin tartalmú molekulákkal. A jelölést követően a felesleges festéket mágneses gyöngyök segítségével eltávolítottam a kit leírásában leírt gyors glikán mintaelőkészítési protokoll szerint. A kinyert mintát 50 µl HPLC tisztaságú vízben oldottam fel. A fent leírtak alapján előkészített humán szérum mintákat lézer indukált fluoreszcens detektorral ellátott kapilláris elektroforézissel analizáltam.

4.4.2 Kapilláris elektroforézis analízis

A kapilláris elektroforézis méréseket PA800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman, Fullerton, CA, USA) készüléken végeztem el, amely lézer indukált fluoreszcens detektorral volt ellátva (gerjesztés: 488 nm/emisszió: 520 nm). Minden CE mérés 40 cm effektív hosszúságú (50 cm teljes hossz) 50 µm belső átmérőjű bevonat nélküli szilika kapillárisban történt. Az elválasztáshoz HR-NCHO gélt (Beckman) használtam. Az elválasztások során 30 kV elektromos potenciált alkalmaztam fordított polaritású módban (katód az injektálási oldalon, anód a detektálási oldalon) 30 °C hőmérsékleten. A detektálási érzékenység és a reprodukálhatóság növelése érdekében háromlépcsős minta-injektálási eljárást alkalmaztam: 1. lépés: 1 psig 5 másodperces vízinjektálás, 2. lépés: 3 kV 3 másodperces minta-injektálás és 3. lépés: 2 kV 2 másodperces

standard injektálás. A standardok injektálása a nagy pontosságú GU-értékek meghatározásához volt szükséges, amelyet a GUcal szoftver (www.gucal.hu) segítségével végeztem el. Az adatgyűjtést és elemzést a 32Karat (10.1 verzió) szoftvercsomaggal (Beckman) végeztem. Az elválasztott csúcsok relatív százalékos területértékeit a PeakFit v4.12 szoftverrel (SeaSolve Software Inc., San Jose, Kalifornia) számoltam ki.

4.4.3 *N*-kötött glikán szerkezet azonosítás

A humán szérumban a PNGase F enzim segítségével lehasított *N*-glikánok azonosítását első lépésben exoglikozidáz szekvenálással végeztem el. A folyamat során exoglikozidáz enzimeket alkalmaztam, amelyek monomerenként lebontják az aszparagin-kötött glikán szerkezeteket. A szérumban *N*-kötött glikánjairól első lépésként az α 2-3,6,8-kötött szialsavakat hasítottam le szialidáz A típusú enzimmel, ezt követően a β 1-4,6-kötött galaktóz monomereket vágtam le kardbab (Jack bean) β -galaktozidáz enzimmel és utolsó lépésként kardbab (Jack bean) hexóaminidáz enzimmel eltávolítottam a β 1-2,4,6-kötött *N*-acetyl-glükózaminokat. Az enzimatis reakciók 37 °C hőmérsékleten egy éjszakán át tartottak [93]. Az enzimatisan emésztett mintákat CE-LIF alkalmazásával analizáltam. Kapilláris elektroforetikus analízis esetén az ismeretlen analitcsúcsok azonosítására az elektroferogramon meghatározott migrációs időket egy lineáris, α (1-4) kapcsolt glükóz egységeket tartalmazó polimer komponenseinek migrációs idejéhez hasonlítjuk, ezáltal glükóz egység (GU) értékeket határozzunk meg az egyes csúcsokhoz [123]. Ez a módszer analóg a gázkromatográfiában alkalmazott Kovats-retenciós indexszel [124].

Az elektroferogramokat összehasonlítottam, visszafejtve, hogy mik voltak a kiindulási glikán szerkezetek. Az egyes csúcsok eltolódása jelezte a szerkezet megváltozását az enzimatis emésztés hatására. Meghatároztam az egyes csúcsokhoz tartozó GU értékeket, amiket felhasználva a glycostore adatbázis (www.glycostore.org) alapján ellenőriztem az exoglikozidázos szekvenálás alapján lehetséges struktúrákat. Azoknak a szerkezeteknek az azonosításához, amelyek nem voltak egyértelműen meghatározhatók a szekvenálás és az adatbázis alapján, olyan standard fehérjéket alkalmaztam, amelyek a szérumban nagy arányban előfordulnak, mint például IgG, IgA, α -1-antitripszin, transferrin és haptoglobin. Emellett, olyan fehérjék, amelyeknek aszparagin-kötött glikánjai jól ismertek, mint például fetuin és a ribonukleáz B, szintén segítettek a minták *N*-glikán összetételének meghatározásában. A fehérjékről a glikánok lehasítását és elkülönítését a szérumban esetén ismert mintaelőkészítési módszer segítségével végeztem el. A szérumban *N*-kötött glikán

szerkezeteinek pontos meghatározásához egymás után lemértem kapilláris gél elektroforézissel az ismert standard fehérjék szekvenálási lépései során kapott *N*-glikán profilokat és a humán szérumból minták szekvenálási mintáit is. Ezeket a méréseket összehasonlítva azonosítottam be a lehetséges *N*-glikán szerkezeteket a szérumból mintákban. A standard fehérjék aszparagin kötött glikán összetételét a szakirodalom alapján gyűjtöttem össze [16,88,125–132].

4.4.4 Adatelemzés

A munkám során létrehozott adatbázist, amit a tüdőrákos betegektől származó szérumból minták aszparagin-kötött oligoszacharidjainak elemzése során határoztam meg, már egyszerű statisztikai módszerekkel nem lehet megbízhatóan feldolgozni. Ez az adatbázis tartalmazza az általam vizsgált szérumból minták elektroferogram adatait (migrációs idők, GU értékek, relatív csúcs alatti terület %- ok, eltérések értékei az egyes minták között) és a betegre vonatkozó adatokat (kor, nem, kezelés típusa, dohányos, kísérőbetegségek, a daganat típusa, a műtét kimenetele, a kezelés hatékonysága, a C-reaktív protein (CRP) szint, vércukorszint, a dohányzással töltött évek száma, az elszívott cigaretta mennyisége, a betegség stádiuma). Ezért a műtött és a kemoterápiás kezelésben részesült betegek mintáinak elemzéséhez döntési fa analízist, valamint regressziós analízist alkalmaztam.

A diszkrét klinikai paraméterek és a glikomikai adatok összefüggésének feltárása

A diszkrét klinikai paraméterek és a glikomikai adatok összefüggésének feltárásához döntési fa analízist alkalmaztam. A munka ezen fázisában reszekciós műtéten átesett és kemoterápiás kezelésben részt vett betegek szérumból mintáinak glikomikai adatait elemeztem az egyes betegekhez tartozó bináris klinikai paraméterekkel. A korábban meghatározott A műtött tüdőrákos betegek esetén 51 klinikai paramétert, míg a kemoterápiás esetekben 105 klinikai paramétert vizsgáltam 21 aszparagin-kötött glikán változásaival szemben. A betegek anamnéziséből a tüdőrák lehetséges rizikófaktoraként közölt klinikai adatokat választottam ki az elemzésekhez [133]. A diszkrét változók a következők voltak: dohányos (dohányzó vagy korábban leszokott a dohányzásról), a beteg neme (nő vagy férfi), kísérőbetegségek vagy azok hiánya, mint például cukorbetegség, érelmeszesedés, krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), a daganat típusa (laphámsejtes karcinóma, adenokarcinóma, anaplasztikus sejtes karcinóma, kissejtes neuroendokrin karcinóma, kevert laphám és mirigysejtes tüdőrák), a műtét kimenetele, pozitív vagy negatív (sikeres daganat eltávolítás és felépült beteg vagy sikertelen reszekció, ha a daganat két éven belül kiújult), valamint

egyéb gyakran előforduló betegségek (lipóma, hiperlipidémia, spondilózis, ízületi gyulladás, göbös pajzsmirigy csonttritkulás, nikotinabusus, poszt tüdővész, Waldenström makroglobulinémia, lábszár trombózis, tüdőgyulladás, gerincvelősérv, gége műtéti eltávolítása, halláskárosodás, myoma okozta hisztterektómia, májciszta, gyomor antrumának gyulladása, aranyér, magas koleszterinérték, prosztata megnagyobbodás, ízületi gyulladás, patkóbélfekély, corpus alienum ulnae, ülőidegzsába, porckorongsérv, isiász vagy alkoholos polyneuropathia jelenléte vagy hiánya). A kemoterápiás betegek esetén a kezelés hatékonyságát is figyelembe vettük (regresszió, stagnáló, vagy progresszió lépett fel a tumor esetén). Mivel a rendelkezésre álló alkalmas betegek száma korlátozott volt, viszont a vizsgált faktorok száma nagy, az egyes paraméterek párosításával további független változókat, azaz klinikai paramétereket generáltunk. Például a COPD érelmeszesedéssel való komorbiditását további független változónak tekintettük. A döntési fa összetettsége nem korlátozódott egy bizonyos mélységre, hanem eredendően a változók határozták meg. Logikailag a diszkrét változókat 0 vagy 1 egész számként kezeltük, azaz, ha a páciens dohányzott, akkor a változó értéke 1; egyébként 0. Minden kiválasztott diszkrét klinikai adatot mátrix formába transzformáltunk. A diszkrét változókat osztályozási fa elemzéssel becsültük meg a MathWorks, Matlab (Natick, MA, USA) szoftver beépített függvényeinek segítségével. Az elemzés során a döntési fa egy olyan fa, aminek belső csúcsaiban az N -kötött glikánok csúcs alatti területeinek változásai vannak, a levelek pedig az egyes klinikai paraméterek meglétét vagy hiányát jelentik. A modell túltanításának elkerülése érdekében az adatkészleteket két részre osztottuk: az egyik a tanítási, a másik a viselkedés szabályozására szolgált. A modell pontosságát keresztvalidálással ellenőriztük, és a helyesen minősített adatok alapján értékeltük ki. Így a pontosság = 1 azt az esetet képviseli, amikor az összes minta osztályozása helyes volt. Az eredmények értékelése során az elfogadási küszöböt a műtött betegek esetén 0,63-nak választottuk meg, míg a kemoterápián részt vett betegek esetén a nagyszámú klinikai paraméterek miatt az elfogadási küszöb értéket megemeltük 0,8-ra a prognózis megbízhatóságának érdekében [134]. Az elfogadási érték, vagy más néven jósaági faktor manuális meghatározásánál figyelembe vettük, hogy racionálisan elemezhető számú döntési fa kerüljön további értékelésre. A küszöbérték feletti eseteket értékeltük, míg az alatti eseteket figyelmen kívül hagytam. Mind a két kezelés típus esetén megvizsgáltam az N -kötött glikánok változását egyenként és csoportosítva is.

A folytonos klinikai paraméterek és a glikomikai adatok összefüggésének feltárása

A folytonos paraméterekhez tartozó adatok elemzéséhez, mint például a beteg életkora, a CRP szint, vércukorszint, a dohányzással töltött évek száma, az elszívott cigaretta mennyisége, a betegség stádiuma, többváltozós regressziós analízis alkalmazása lehetséges. Ezzel a módszerrel modellezhető a különböző változók közötti korreláció. Jelen munka során azt vizsgáltam, hogy az egyes folytonos változók mely glikán szerkezetek megváltozásával modellezhetők. A modellek elkészítéséhez a Matlab (MathWorks, MA, USA) szoftver stepwiselm függvényét alkalmaztam, ahol a küszöb értéket 0,005-nek tekintettem. Ez a függvény előre és hátra lépésenkénti regressziót használ a végső modell meghatározásához. Egy kezdeti modellből indul ki és minden lépésben megkeresi a modellhez hozzáadandó vagy eltávolítandó elemeket megadott kritériumok alapján. A 3. ábra tartalmazza az alkalmazott scriptet, amely paramétereit változtatva kerestem meg az optimális modelleket. Többféle kiindulási modellt próbáltam ki (konstans, lineáris, interakciók, négyzetes és tisztán négyzetes), amik közül az interakciós modell volt megfelelő az adatokhoz. Ez azt jelenti, hogy a kiindulási modell egy metszéspontot, minden egyes prediktorhoz egy lineáris tagot, valamint a különböző prediktorok párjainak összes szorzatát (négyzetes tagok nélkül) tartalmazza. A tagok eltávolításának és hozzáadásának a kritériumát az R^2 növelésének választottam meg. A modell javítható a 'PEnter' értékének megadásával, ami 0 és 0,1 között választható meg. A 'PEnter' mögötti szám határozza meg a tag hozzáadásának feltételét, vagyis ha a modell R^2 értékének növekedése nagyobb, mint a 'PEnter' értéke akkor adja hozzá a tagot a modellhez. A műtött betegek adatainak elemzésénél a végleges modell esetén ezt a küszöbértéket 0,005-nek választottam. A regressziós analízis esetén értékelhető eredményt csak a műtött betegeknél sikerült elérni, a kemoterápián részt vett betegek esetén nem.

```
[d1,d2]=xlsread('mutott_adatok.xlsx','reg')
X=d1(:,2:end-6);
Y=d1(:,end-5:end);
R2=[]
P2=[]
%%
for k=1:6
y=Y(:,k)
mdl = stepwiselm(X,(y),'interactions','PEnter',0.005)
R2=[R2; mdl.Rsquared.Ordinary]
P2=[P2; mdl.Rsquared.Ordinary]
end
```

3. ábra: A műtött betegek adatai alapján végzett modellezés Matlab scriptje

5. Eredmények

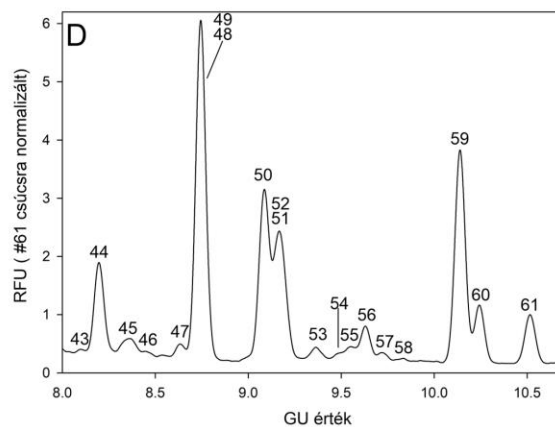
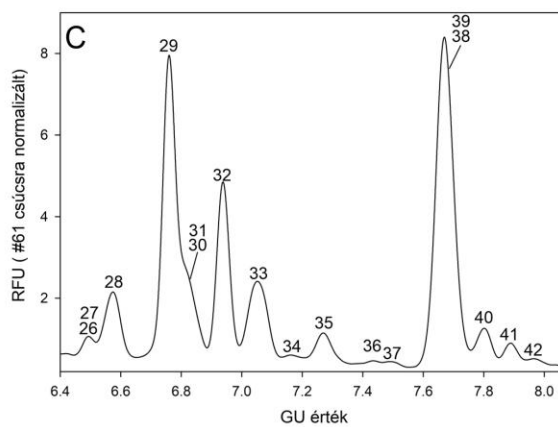
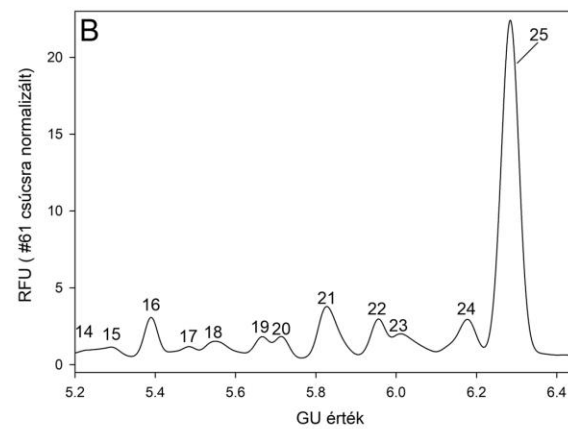
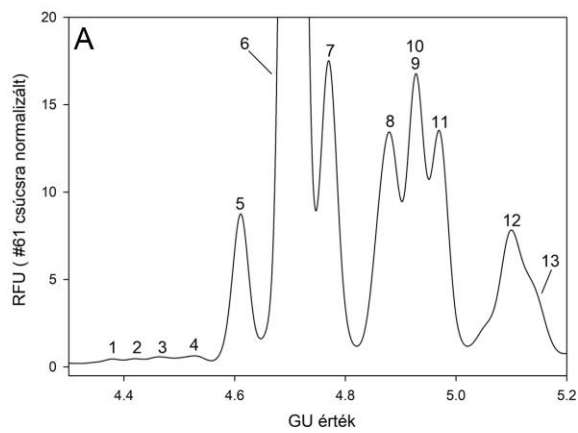
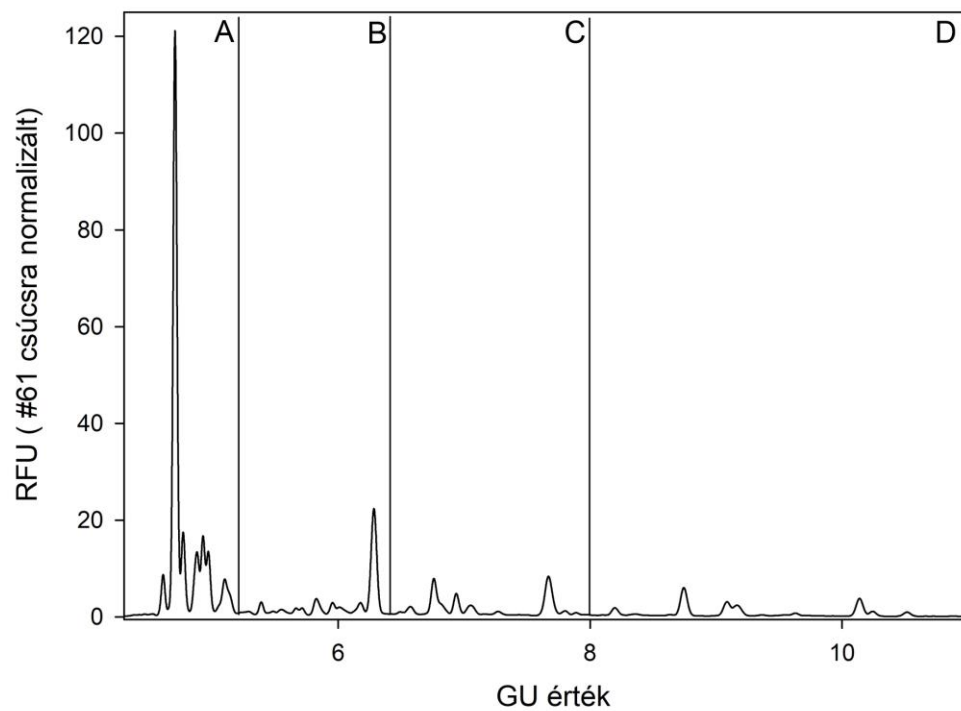
Ebben a fejezetben ismertetem a PhD munkám során elért eredményeket. A humán szérumban azonosított N-kötött glikán szerkezeteket. A tüdőrákos megbetegedések diagnosztikai módszereinek fejlesztését elősegítő glikán panelt, amely potenciális glikobiomarkeret tartalmaz a tüdőrákhoz, a COPD-hez, valamint a két betegség együttes jelenlétéhez. A glikán panel mellett jelentős specifikus eltéréseket határoztam meg a glikán csoportok vizsgálata esetén is. Bemutatom reszekciós műtéten vagy kemoterápián átesett betegek szérum mintáinak döntési fa analízis eredményeit is. Jelentős összefüggéseket állapítottam meg a tüdőrákos betegektől származó minták kezelés előtti és utáni glikolizációs különbségek és betegek klinikai paraméterei között. A reszekciós műtéten átesett betegek mintái esetén a regressziós analízis eredményeit is leírom.

5.1 A humán szérum minták N-kötött glikánjainak azonosítása

A PhD munkám során 90 COPD-s, 90 tüdőrákos és 90 mind a két betegségben szenvedő beteg szérum mintáját vizsgáltam. Első lépésként annak érdekében, hogy csökkentsem a minták statisztikai szórását összekevertem az egyes betegségekhez tartozó mintákat, ezáltal négy úgynevezett „pool”-ozott minta között végeztem összehasonlítást. A mintaelőkészítést követően CE-LIF-vel analizáltam a mintákat és hasonlítottam össze az egészséges önkéntesektől származó mintákkal. Az optimalizált módszer intra és interday reprodukálhatóságának hibája is 3,5% alatt volt. Annak érdekében, hogy könnyebben össze tudjam hasonlítani a különböző minták elektroferogramjait az elektroferogram időskáláját GU értékre konvertáltam át a GUcal szoftver felhasználásával.

A 4. ábrán látható a „pool”-ozott egészséges szérum N-glikán profilja a 61 kiválasztott glikán szerkezet megjelölésével. Az elektroferogramon számozásra került minden olyan csúcs, amely potenciálisan glikán szerkezetet jelölhet, mivel a módszer és az eredmény reprodukálhatóságát vizsgáló ismételt mérések során nem változtak. Az elválasztott glikán struktúrák azonosítását a GU adatbázis alapján, exoglikozidáz emésztésen alapuló szénhidrát szekvenálás alkalmazásával, glikoprotein standardok (ribonukleáz B, IgG, α -1-antitripszin) oligoszacharidjainak az összehasonlításával és korábban publikált irodalmi adatok alapján végeztem el. Az exoglikozidáz alapú szekvenálás folyamatát az 5. ábra mutatja be, lentől felfelé: szialidáz A, galaktozidáz és hexozaminidáz. Az elektroferogramok összehasonlítása során az egyes csúcsok GU eltolódásai révén szolgáltatnak információt a glikán struktúrák azonosításához. A 6. ábrán a szérum fehérjék

N-kötött glikán profiljainak összehasonlítása látható a humán szérum mintával. Ez alapján a szekvenálás után ismeretlenül maradt oligoszacharidokat is azonosítottam.

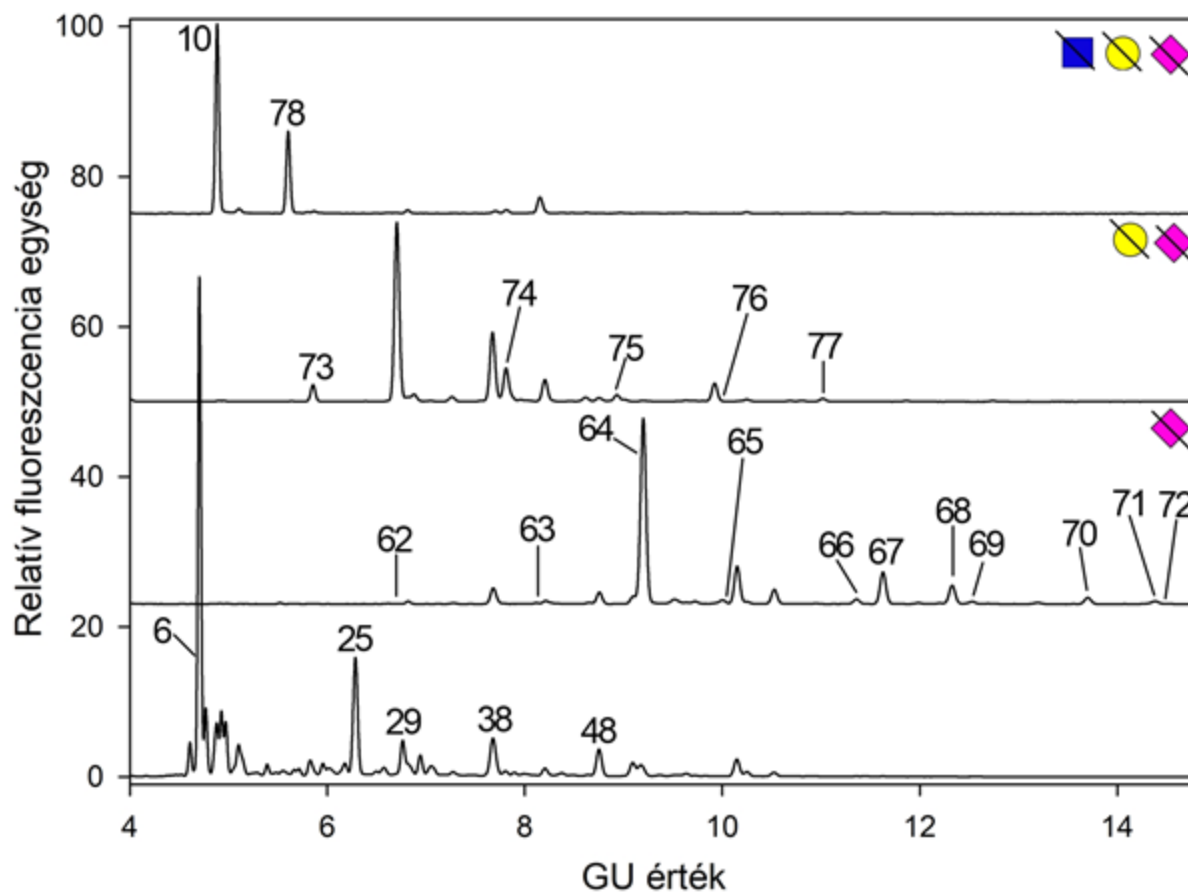


4. ábra: A kapilláris elektroforézis analízis során felszabadított és APTS jelölt N-kötött glikánok elektroferogramja a „pool”-ozott egészséges minta esetén (felső panel). Az ábrán számokkal jelöltem meg az egyes csúcsokat. Az alsó panelek a kinagyított elektroferogram részletei: A) GU 4,3-5,2; B) GU 5,2-6,4; C) GU 6,4-8,1; és D) GU 8,0-10,7. A hozzájuk tartozó szerkezeteket, GU értékeket és relatív csúcs alatti terület százalékokat a 3. táblázat tartalmazza. Az elválasztás paraméterei: 40 cm effektív kapilláris hossz (50 cm teljes hossz), 50 μ m belső átmérő nem bevont falú olvasztott kvarc kapilláris; 30 kV (0.17 min ramp time) elválasztó feszültség fordított polaritási módban. LIF detektálás (gerjesztés: 488 nm, emisszió: 520 nm); elválasztás hőmérséklete: 30 °C. Injektálás: víz preinjektálás 5 s / 1 psig, ezt követi 3 kV / 3 s minta injektálás és 2 kV / 2 s belső standard (DP2 és DP15).

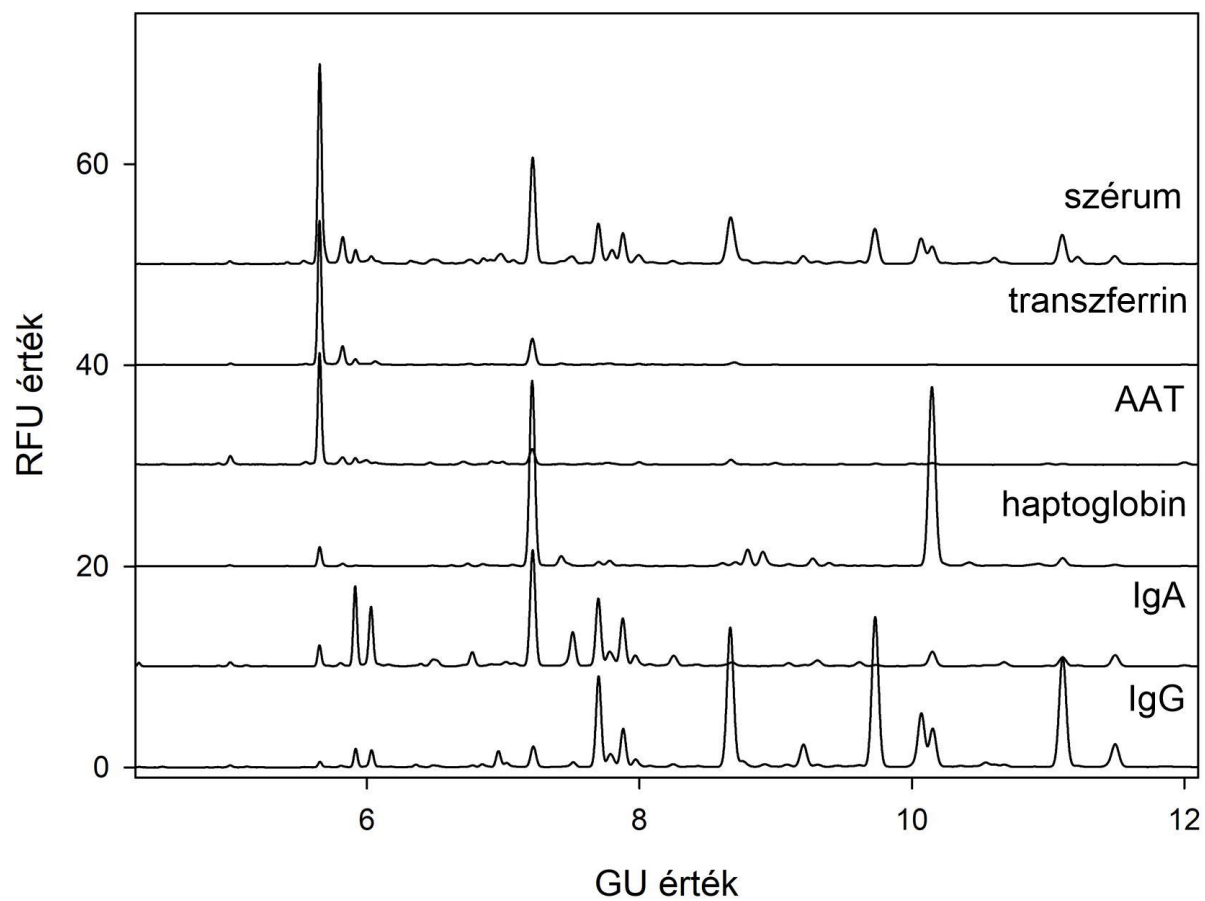
A 3. táblázat a „pool”-ozott humán szérum minták azonosított N-kötött glikán struktúráit tartalmazza a 4. ábrán található számozás alapján. A szerkezetek azonosítása első lépésként a GU értékek alapján a GlycoStore adatbázis felhasználásával történt (glycostore.org). A 3. táblázatban a # jelölésű glikán struktúrák azonosítása az exoglikozidázos emésztés folyamata révén került azonosításra az 5. ábra alapján. A csillaggal jelölt oligoszacharid struktúrák meghatározása standard fehérjék, IgG (*), RNáz B (**), és AAT (***) glikomikai profiljának összehasonlításával lett azonosítva [69,135,136]. Fontos megjegyezni azt is, hogy az azonosított 61 glikán mellett nem találtam a patológiás minták esetén több glikán csúcsot a kontroll mintával összehasonlítva.

	<i>N</i> -glikán struktúra	GU	Relatív csúcs alatti terület (%)			<i>N</i> -glikán struktúra	GU	Relatív csúcs alatti terület (%)	
1	A4G4[3,3,3,6]S4 [#]	4,4	0,0955	±0,003	40	M6 ^{**}	7,8	0,8338	±0,039
2	A4G4[3,3,3,3]S4 [#]	4,46	0,0935	±0,002	41	A3G3[3]S1 [#]	7,89	0,5296	±0,013
3	A1G1S1 [#]	4,51	0,1307	±0,006	42	FA3 [#]	7,98	0,4379	±0,011
4	FA4G4[3,3,3,6]S4 ^{***}	4,57	0,1285	±0,004	43	A2B[6]G1	8,08	0,2962	±0,009
5	FA4BG4[3,3,3,3]S4[#]	4,62	0,6814	±0,015	44	FA2B[*]	8,2	1,9016	±0,064
6	A2G2[6]S2[*]	4,71	21,8425	±0,953	45	A2B[3]G1 [*]	8,35	0,6615	±0,026
7	FA3G3[6]S3[#]	4,77	0,9032	±0,026	46	M7 ^{**}	8,48	0,3190	±0,014
8	A2G2[3]S2^{***}	4,88	2,4776	±0,098	47	M7 ^{**}	8,62	0,3836	±0,013
9	A2BG2S2[*]	4,93	1,5508	±0,038	48	FA2[6]G1[*]	8,75	6,1207	±0,293
10	M3				49	M7^{**}			
11	FA2G2S2[*]	4,97	2,3546	±0,052	50	FA2[3]G1[*]	9,09	2,9771	±0,134
12	FA2BG2S2[*]	5,1	1,2156	±0,026	51	FA2B[6]G1[*]	9,17	2,5049	±0,067
13	FA3G3[3]S3^{***}	5,14	1,2645	±0,031	52	M8^{**}			
14	A2[6]G1S1 [*]	5,24	0,1604	±0,007	53	A4G4[6]S1	9,34	0,1668	±0,008
15	A2[3]G1[6]S1	5,3	0,1631	±0,005	54	A4G4[3]S1	9,48	0,1636	±0,004
16	FA3BG3S3 [#]	5,39	0,5907	±0,026	55	FA2B[3]G1 [*]	9,55	0,4411	±0,012
17	A4G4[6]S3	5,47	0,8155	±0,040	56	M8 ^{**}	9,64	0,5983	±0,023
18	A2[3]G1[3]S1 [*]	5,56	0,2984	±0,012	57	M8 ^{**}	9,73	0,3001	±0,009
19	FA2G2[6]S2 ^{***}	5,66	0,3043	±0,018	58	FA4 ^{***}	9,86	0,0874	±0,004
20	A3G3[6]S2	5,72	1,1683	±0,031	59	FA2G2[*]	10,14	3,5100	±0,089
21	FA2[6] G1S1 [*]	5,83	0,7706	±0,029	60	M9 ^{**}	10,25	0,9882	±0,042
22	A4G4[3,3,3]S3	5,95	0,9457	±0,024	61	FA2BG2 [*]	10,52	0,8847	±0,035
23	FA2[3]G1S1 [*]	6,03	0,5180	±0,017	62	A1G1	6,62	Szekvenálás	
24	A3G3[3]S2	6,17	0,8196	±0,030	63	A2[3]G1	8,12	Szekvenálás	
25	A2G2[6]S1[*]	6,28	13,1137	±0,465	64	A2G2	9,17	Szekvenálás	
26	FA2B[6]G1S1 [*]	6,48	0,4828	±0,016	65	A2BG2	10	Szekvenálás	
27	FA2B[3]G1S1 [*]				66	A3[6]G3	11,36	Szekvenálás	
28	A2BG2S1[*]	6,58	1,3189	±0,034	67	A3[3]G3	11,63	Szekvenálás	
29	FA2G2S1[*]	6,76	4,1359	±0,095	68	FA3G3	12,33	Szekvenálás	
30	A2[*]	6,82	2,7863	±0,119	69	FA3BG3	12,54	Szekvenálás	
31	M5^{**}				70	A4G4	13,72	Szekvenálás	
32	FA2BG2S1[*]	6,94	2,2966	±0,063	71	FA4G4	14,38	Szekvenálás	
33	A4G4[6]S2	7,05	1,3916	±0,049	72	FA4BG4	14,45	Szekvenálás	
34	A4G4[3]S2	7,17	0,5179	±0,023	73	A1	5,86	Szekvenálás	
35	A2B[*]	7,27	0,7528	±0,023	74	A3	7,81	Szekvenálás	
36	A2[6]G1	7,4	0,1440	±0,004	75	A4	8,94	Szekvenálás	
37	A3G3[6]S1	7,51	0,1470	±0,005	76	FA3B	9,93	Szekvenálás	
38	FA2[*]	7,67	9,5132	±0,270	77	FA4B	11,02	Szekvenálás	
39	M6^{**}				78	FM3	5,09	Szekvenálás	

3. táblázat: Az egészséges önkéntesektől gyűjtött szérumban azonosított N-kötött glikán szerkezetek a hozzájuk tartozó CE-LIF GU értékekkel és a relatív csúcs alatti területük a standard szórás (SD) értékekkel együtt. Félkövér karakterekkel a > 1% relatív csúcs alatti területtel rendelkező szerkezetek vannak feltüntetve (legalább az egyik minta esetén eléri az 1%-ot). A 62-78 számú glikán szerkezetek a szekvenálás során létrejövő közbenső állapotok (4. ábrán vannak feltüntetve). A szerkezet rövidítések Harvey nomenklatúráját követik [137]. Az egyes csúcsokhoz tartozó glikán szerkezetek azonosítása a következő sorrendben történt: 1) GU érték szerint a GlycoStore adatbázis alapján (glycostore.org); 2) figyelembe véve a 4. ábrán látható, egymást követő exoglikozidáz emésztési kísérletek eredményeit (#-mal jelölve) és 3.) az összes többi glikánszerkezetet a szérumban nagy mennyiségben előforduló glikoproteinek és standard fehérjék N-glikozilációs információi alapján azonosítottam: IgG (*), RNáz B (**) és AAT (***). A 6. ábra szemlélteti a szérumban nagy mennyiségben található fehérjék glikolizációs profilját összevetve a humán szérumban glikolizációs profiljával. A humán szérumban található oligoszacharid struktúrák azonosítását nehezítette, hogy sok esetben a szérumban fehérjék teljes glikolizációs profiljának sem ismert minden glikán szerkezete.



5. ábra: Az egészséges kontroll minta exoglikozidáz emésztés alapú szénhidrát szekvenálása a szialidáz (◆), galaktozidáz (●), és hexózaminidáz enzimekkel (■), a kérdéses glikán szerkezetek azonosságának ellenőrzése érdekében. A számozás az egyes glikán szerkezetekhez tartozó csúcsokat jelöli. Lentről felfelé haladva az egyes elektroferogramok: exoglikozidáz enzimmel nem kezelt szérum, szialidáz enzimmel emésztett, szialidáz és galaktozidáz enzimmel emésztett, szialidáz, galaktozidáz és hexózaminidáz enzimmel emésztett szérum minták. Az elválasztás paraméterei megegyeznek a 3. ábrán leírtakkal. A csúcsokhoz tartozó glikán szerkezeteket és GU értékeket a 3. táblázat tartalmazza.



6. ábra: *Néhány magas koncentrációjú szérum fehérje (IgG, IgA, haptoglobin, α -1-antitripszin, transzferrin) és a humán szérum N-kötött glikán profiljának összehasonlítása*

5.2 Egészséges, tüdőrákos, COPD-s, valamint egyaránt tüdőrákos és COPD-s betegetől származó humán szérum minták összehasonlítása

Az *N*-kötött glikán struktúrák azonosítását követően az egyes glikán struktúrákhoz tartozó relatív csúcs alatti terület meghatározása történt, mind a kontroll minta mind a patológiás minták esetén. Az integrálással meghatározott relatív csúcs alatti területeket összehasonlítottam az egyes „pool”-ozott tüdőrákos, COPD-s és mind a két betegségben szenvedő betegetől származó minták esetén a kontroll minta értékeivel. Az integrálási lépés előtt az elektroferogramokat normalizáltam a 61. csúcs (FA2BG2) magasságára (RFU értékére), azaz az egyes csúcsokhoz tartozó csúcs magasságokat elosztottam a 61. csúcs maximumához tartozó RFU értékkel és megszoroztam 100-zal. Erre a normalizálási lépésre azért volt szükség, hogy minél kisebb legyen mérésből eredő hiba és az összehasonlításnál pontosabban összetudjuk vetni a relatív csúcs alatti terület százalékokat. Az FA2BG2 szerkezetet azért választottam, mert ez egy jól elkülönült csúcs az elektroferogramon, ami minden mérésnél stabilan detektálható. A normalizálási lépést követően a relatív csúcs alatti terület % -okat számítottam ki úgy, hogy elosztottam a relatív csúcs alatti területet az elektroferogram kiintegrált csúcs alatti területeinek összegével és megszoroztam 100-zal. A 3. táblázat tartalmazza a 4. ábrán megjelölt glikán szerkezeteket azok számított CE-LIF GU értékeit és a relatív csúcs alatti terület százalékokat az SD értékekkel. Csak azokat a csúcsokat vettem figyelembe az összehasonlításoknál, ahol a relatív csúcs alatti terület százalék legalább 1% (félkövérrel jelöltek a táblázatban) legalább egy minta esetén. Minden mérést háromszor ismételt meg és relatív csúcs alatti terület százalék átlagos RSD értéke 3,46%. A 3. táblázat 62-78. sorai tartalmazzák az exoglikozidázos emésztés során az egyes szekvenálási lépések után detektálható felszabaduló glikánokat.

A „pool”-ozott tüdőrákos, COPD-s, valamint tüdőrákban és COPD-ben egyszerre szenvedő betegek szérum mintáinak relatív csúcs alatti terület százalékait összehasonlítottam a „pool”-ozott egészséges minta relatív csúcs alatti terület százalékával. Az összehasonlítást az alábbi képlet alapján végeztem el: $(1 - \text{relatív csúcs alatti terület a beteg minta esetén} / \text{relatív csúcs alatti terület a kontroll minta esetén})$ és ezt az értéket megszoroztam 100-zal. A 4. táblázat tartalmazza azokat a glikán szerkezeteket, amelyeknek a relatív csúcs alatti terület százaléka a kontroll mintához képest nagyobb volt mint 33%, vagyis amik két kritériumot teljesítenek: 1) az *N*-kötött glikán struktúra relatív csúcs alatti terület százaléka nagyobb mint 1% (félkövérrel jelölt struktúrák az 1.

táblázatban) legalább az egyik minta csoport esetén és 2) a relatív csúcs alatti terület százaléka megváltozása nagyobb mint 33 % legalább egy csoport esetén.

Az eredmények alapján jelentős változások figyelhetők meg a tüdőrákos minta esetén a kontrollhoz képest (4. táblázat 3. oszlop) az alábbi glikán szerkezetek esetén: FA4BG4[3,3,3,3]S4 (#5. csúcs: +167%), FA3G3[6]S3 (#7. csúcs: +176%), A2BG2S2 + M3 (#9-10. csúcs: +133%), FA2G2S2 (#11. csúcs: +105%), FA2BG2S2 (#12. csúcs: +50%), A2BG2S1 (#28. csúcs: -33%), FA2G2S1 (#29. csúcs: -41%), FA2BG2S1 (#32. csúcs: -41%), A2B (#35. csúcs: +36%) és FA2G2 (#59. csúcs: -36%). Ezek a változások potenciális glikobiomarkerei lehetnek a tüdőráknak. Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy az alábbi glikán struktúrák relatív csúcs alatti terület százaléka jelentős mértékben megnőtt a COPD-s minta esetén is a kontrollhoz képest: FA4BG4[3,3,3,3]S4 (#5. csúcs, LC:+167%, COPD: +106%), FA3G3[6]S3 (#7. csúcs: LC: +176%, COPD: +79%) A2BG2S2 + M3 (#9-10. csúcsok, LC:+133%, COPD: +58%), FA2BG2S2 (#12 csúcs, LC:+50%, COPD: +33%) és FA2G2 (#59 csúcs: LC: -36%, COPD: -34%). Ebből kifolyólag ezek a struktúrák indikálhatják mind a két betegség (tüdőrák vagy COPD) jelenlétét is. Ráadásul az FA3G3[6]S3 (#7. csúcs, LC:+176%, COPD: +79%, LC+COPD: +56%) struktúra relatív csúcs alatti terület százaléka megnövekedése jelezheti a tüdőrákos vagy COPD-s megbetegedést, vagy akár a két betegség együttes jelenlétét is. Az A2BG2S1 struktúra (#28. csúcs) csak kis mértékben növekedett meg (+12%) a COPD esetén a kontrollhoz képest, azonban jelentősen lecsökkent (-33%) a tüdőrákos minta esetén a kontrollhoz képest. A szerkezet így alkalmas glikobiomarkere lehet a tüdőráknak és segíthet a COPD-től való megkülönböztetésben is.

A #29. csúcs (FA2G2S1) relatív csúcs alatti terület százaléka megváltozásával a csak COPD-s beteg mintájától (-4%) megkülönböztethető lehet a COPD és tüdőrák együttes jelenléte (-37%), viszont a csak tüdőrákos betegétől nem (-41%). Az összes patológiás minta esetén az #59. csúcs relatív csúcs alatti terület százaléka csökkent (FA2G2, LC: -36%, COPD: -34%, LC+COPD: -39%), ezért ez a glikán csak az egészséges kontrolltól való megkülönböztetést segíti elő. Meg kell jegyezni azt is, hogy az FA2 + M6 (#38-39. csúcs) és az A2BG2S2 + M3 (#9-10. csúcsok) csúcsok együtt vándorolnak, így az egyéni változásait nem lehet megfelelően értékelni.

Sorszám	N-glikán szerkezet	LC vs Kontroll %	COPD vs Kontroll%	LC + COPD vs Kontroll %	LC vs COPD %
5	FA4BG4[3,3,3,3]S4	167 ±7,4	106 ±5,2	18 ±0,9	29 ±1,4
7	FA3G3[6]S3	176 ±9,7	79 ±3,8	56 ±3,0	54 ±2,5
9-10	A2BG2S2, M3	133 ±6,3	58 ±2,8	29 ±1,4	47 ±2,2
11	FA2G2S2	105 ±5,1	15 ±0,7	4 ±0,2	79 ±4,2
12	FA2BG2S2	50 ±2,9	33 ±1,8	16 ±0,7	13 ±0,9
28	A2BG2S1	-33 ±1,6	12 ±0,6	-17 ±1,0	-41 ±1,9
29	FA2G2S1	-41 ±2,1	-4 ±0,2	-37 ±1,7	-39 ±2,0
32	FA2BG2S1	-41 ±2,1	-30 ±1,5	-26 ±1,3	-17 ±0,8
35	A2B	36 ±2,1	0 ±0	12 ±0,6	35 ±2,0
38-39	FA2, M6	15 ±0,9	-18 ±0,9	28 ±1,6	41 ±2,1
59	FA2G2	-36 ±1,7	-34 ±1,6	-39 ±2,1	-3 ±0,1

4. táblázat: Tüdőrákos (LC), COPD-s és mind a két betegségben szenvedő betegek (COPD és LC) szérum mintájának relatív csúcs alatti területének összehasonlítása a kontroll mintával, azokban az esetekben, ahol legalább az egyik különbség >33% (félkövér számok) bármely csúcsra, amelyeknek a relatív csúcs alatti területe nagyobb, mint 1% akár a beteg akár az egészséges minták közül. A százalék különbségek után az SD értékek vannak feltüntetve.

A gyógyszeriparban gyakori eljárás az N-kötött glikánok csoportos analízise a hatásmechanizmusra gyakorolt befolyásuk szerint. A csoportosítás alapja az elágazás, a szializáció és a fukoziláció mértéke. A szénhidrátszerkezetek esetében az antennák kiépítettsége az elágazásuk mértékét jelenti, így a glikán szerkezetek mono-, bi-, tri- és tetraantennáris típusokra oszthatók. Az antennák kiépítettsége mellett figyelembe vettem a terminális szíálsavak számát is, a mono-, bi-, tri- és tetraszialiláció relatív csúcsterület-változásának tendenciájára összpontosítva. Az egyes csoportokba tartozó N-glikán szerkezeteket az 5. táblázat foglalja össze.

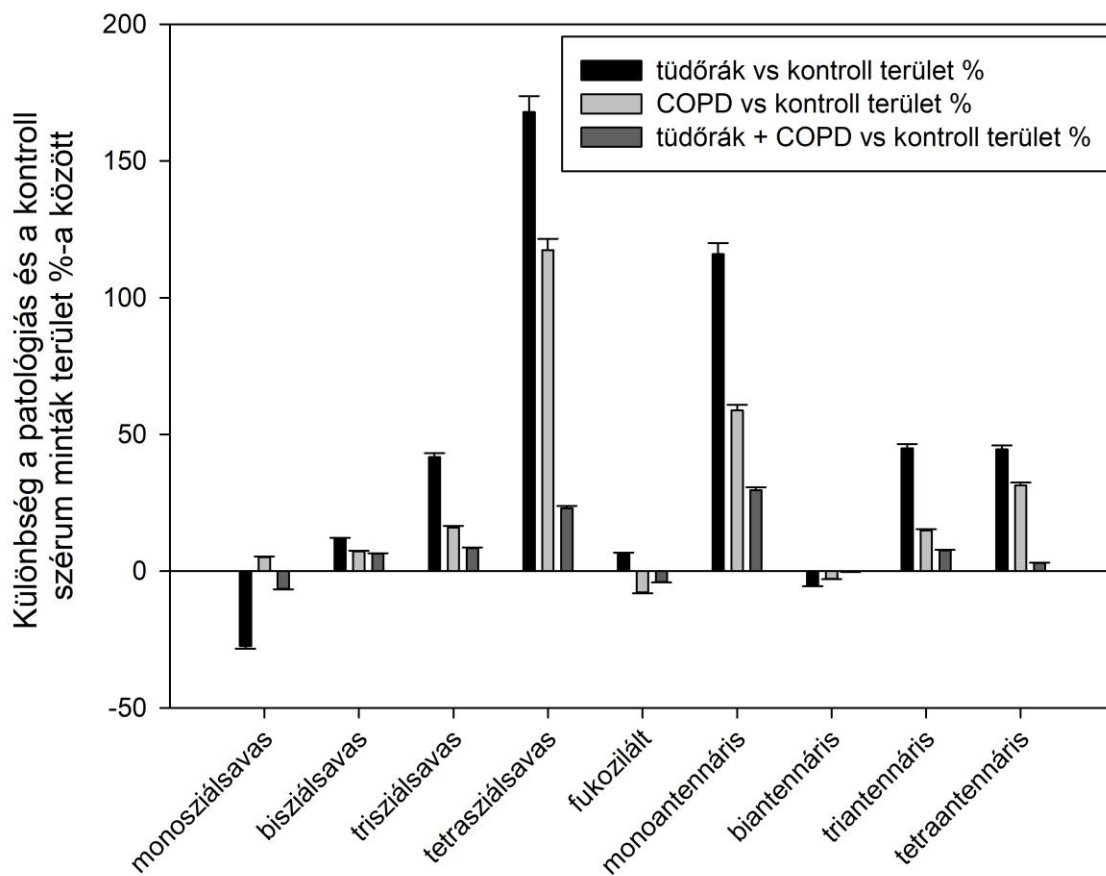
N-glikán csoportok	N-glikán sorszámok (3. táblázat alapján)
monosziálsavas	3, 14, 15,18, 21, 23, 25-29, 32, 37, 41, 53, 54
bisziálsavas	6, 8, 9, 11, 12, 19, 20, 24, 33, 34
trisziálsavas	7, 13, 16, 17, 22
tetrasziálsavas	1, 2, 4, 5
fukozilált	4, 5, 7, 11-13, 16, 19, 21, 23, 26, 27, 29, 32, 42, 44, 48, 50, 51, 55, 58, 59, 61
monoantennáris	3
biantennáris	6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 21, 23, 25-30, 32, 35, 36, 38, 43-45, 48, 50, 51, 55, 59, 61
triantennáris	7, 13, 16, 20, 24, 37, 41, 42
tetraantennáris	1, 2, 4, 5, 17, 22, 33, 34, 53, 54, 58

5. táblázat: A vizsgált N-glikán csoportokba tartozó oligoszacharid szerkezetek összefoglalása. A sorszámozást a 3. táblázat alapján tüntettem fel.

A 7. ábra a vizsgált N-kötött glikán csoportok relatív csúcs alatti terület százalékos eltéréseit mutatja be. A monosziálsavas glikánok relatív csúcs alatti terület százaléka kis mértékben növekedett a COPD esetén (+5%), kis mértékben csökkent a COPD és a tüdőrák együttes jelenléte esetén (-6%), és lényegesen csökkent a tüdőrák vonatkozásában (-27%) a kontrollhoz képest. A monosziálsavas glikán csoport ezáltal a tüdőrák lehetséges biomarkerei közé sorolható. A bi-, tri- és tetrasziálsavas glikán csoportok relatív csúcs alatti terület százalékának megváltozása különböző módon növekedett a COPD, a tüdőrák és a két betegség együttes jelenléte esetén összehasonlítva az egészséges kontroll mintával. A legnagyobb növekedés a tüdőrák esetében volt (bisziálsavas: +12%, trisziálsavas: +42%, tetrasziálsavas: +168%), közepes a COPD (bisziálsavas: +7%, trisziálsavas: +16%, tetrasziálsavas: +117%), és legkisebb a két betegség együttes jelenléte esetén (bisziálsavas: +6%, trisziálsavas: +8%, tetrasziálsavas: +23%). A fukozilált N-glikánok relatív csúcs alatti terület százaléka kis mértékben csökkent a COPD (-8%) és a két betegség együttes jelenlétekor (-4%), ezzel szemben kis mértékben megnőtt a tüdőrákos mintánál (+7%) a kontroll mintához képest.

A relatív csúcs alatti terület százalék változása a mono-, tri- és tetraantennáris glikánok esetén hasonló a bi-, tri- és tetrasziálsavas glikánokhoz, ami azt jelenti, hogy mind a három minta esetén nőtt a mennyiségük a kontroll mintához képest. A legnagyobb növekedés a tüdőrák esetén volt ebben az esetben is (monoantennáris: +116% triantennáris: +45% tetraantennáris: +44.5%), közepes növekedés figyelhető meg a COPD esetén (monoantennáris: +59% triantennáris: +15%

tetraantennáris: +31%), míg a legkisebb növekedés a két betegség együttes jelenléte esetén volt tapasztalható (monoantennáris: +30% triantennáris: +7.5% tetraantennáris: +3%). Ezzel ellentétben a biantennáris *N*-kötött glikánok esetén a relatív csúcs alatti terület százaléka alig csökkent vagy nem is változott a patológiás mintáknál (COPD-s (-3%), tüdőrákos (-5%) és a két betegség együttes jelenléte (-0.3%)) a kontroll mintához képest. Azonban közelebbről megvizsgálva az eredményeket arra következtetnek, hogy ezeket a kis változásokat okozhatja a különféle biantennáris szerkezetek növekedésének és csökkenésének az összjátéka, vagyis a relatív csúcs alatti terület százalék néhány szerkezet esetén jelentős mértékben csökkent (például: A2BG2S1 (#28. csúcs): LC: -33%, LC+COPD: -17%; FA2G2S1 (29. csúcs): LC: -41%, COPD: -4%, LC+COPD: -37%; FA2G2 (#59. csúcs): LC: -36%, COPD: -34%, LC+COPD: -39%); míg néhány szerkezet esetén jelentősen megnövekedett (például: A2BG2S2 + M3) (#9-10. csúcsok): LC: +133%, COPD: +58%, LC+COPD: +29%; FA2G2S2 (#11. csúcs): LC: +105%, COPD: +15%, LC+COPD: +4%; FA2BG2S2 (#12. csúcs): LC: +50%, COPD: +33%, LC+COPD: +16% és A2B (#35. csúcs): LC: +36%, LC+COPD: +12%). A teljes változás mértéke ezáltal kiegyenlítődt. Mindezek alapján elmondható, hogy a mono-, tetraszialilezett, fukozilezett, valamint a mono-, tri- és tetraantennáris *N*-kötött glikán csoportok biomarkerként szolgálhatnak a tüdőrák, a COPD és a két betegség együttes megjelenésére. Ezek közül is a legnagyobb mértékű változások a kontroll mintához képest a tüdőrákos minta esetén voltak megfigyelhetők.



7. ábra: Specifikus N-glikán csoportok (Szialoformák: mono-, bi-, tri- és tetraszialisiláció; fukozilált; elágazó: mono-, bi-, tri- és tetraantennáris) relatív csúcs alatti területeinek változásai a tüdőrák (fekete), a COPD (sötétszürke) és a két betegség együttes jelenléte (szürke) esetén a kontroll mintához képest a hozzájuk tartozó RSD értékekkel feltüntetve. Az eredményekhez az 6. táblázat adatait használtam felé.

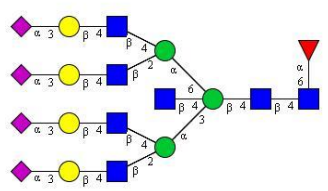
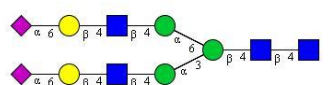
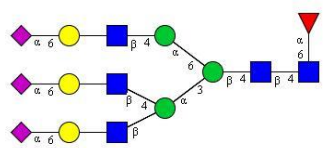
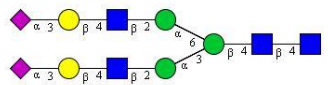
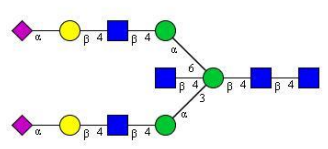
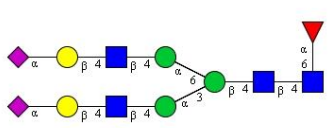
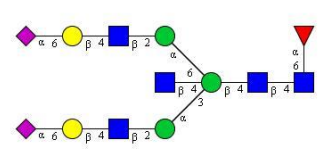
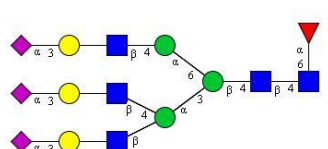
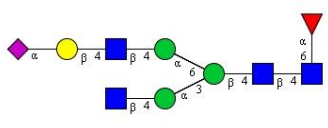
Sorszám	GU	LC	COPD	LC+COPD	Kontroll
1	4,4	0,281	0,224	0,119	0,096
2	4,46	0,286	0,301	0,146	0,094
3	4,51	0,282	0,208	0,169	0,131
4	4,57	0,292	0,241	0,159	0,128
5	4,62	1,817	1,406	0,805	0,681
6	4,71	19,798	22,278	23,245	21,842
7	4,77	2,491	1,616	1,405	0,903
8	4,88	2,770	2,881	2,799	2,478
9-10	4,93	3,607	2,452	2,004	1,551
11	4,97	4,827	2,699	2,444	2,355
12	5,1	1,819	1,615	1,409	1,216
13	5,14	1,205	1,160	1,217	1,265
14	5,24	0,213	0,832	0,226	0,160
15	5,3	0,523	0,323	0,217	0,163
16	5,39	0,525	0,670	0,583	0,591
17	5,47	1,027	0,800	0,733	0,815
18	5,56	0,691	0,425	0,341	0,298
19	5,66	0,609	0,446	0,366	0,304
20	5,72	1,443	1,190	1,152	1,168
21	5,83	0,905	0,948	0,692	0,771
22	5,95	1,157	0,994	0,959	0,946
23	6,03	0,530	0,719	0,636	0,518
24	6,17	1,063	0,811	0,806	0,820
25	6,28	8,071	13,337	13,597	13,114
26-27	6,48	0,516	0,512	0,488	0,483
28	6,58	0,881	1,483	1,092	1,319
29	6,76	2,443	3,975	2,589	4,136
30-31	6,82	2,173	2,350	2,242	2,786
32	6,94	1,349	1,618	1,697	2,297
33	7,05	1,227	1,561	1,420	1,392
34	7,17	0,440	0,361	0,300	0,518
35	7,27	1,025	0,756	0,840	0,753
36	7,4	0,354	0,172	0,122	0,144
37	7,51	0,364	0,172	0,098	0,147
38-39	7,67	10,913	7,762	12,167	9,513
40	7,8	0,767	0,832	0,785	0,834
41	7,89	0,417	0,579	0,530	0,530
42	7,98	0,635	0,569	0,526	0,438
43	8,08	0,458	0,438	0,418	0,296
44	8,2	1,854	1,566	2,083	1,902

Sorszám	GU	LC	COPD	LC+COPD	Kontroll
45	8,35	0,717	0,672	0,699	0,661
46	8,48	0,379	0,331	0,316	0,319
47	8,62	0,521	0,467	0,375	0,384
48-49	8,75	4,310	4,160	4,876	6,121
50	9,09	2,936	2,676	2,054	2,977
51-52	9,17	3,036	2,550	2,749	2,505
53	9,34	0,356	0,261	0,216	0,167
54	9,48	0,169	0,261	0,235	0,164
55	9,55	0,572	0,374	0,367	0,441
56	9,64	0,512	0,544	0,483	0,598
57	9,73	0,392	0,314	0,233	0,300
58	9,86	0,299	0,269	0,146	0,087
59	10,14	2,263	2,331	2,135	3,510
60	10,25	0,719	0,797	0,812	0,988
61	10,52	0,770	0,709	0,676	0,885

6. táblázat: COPD-ben, tüdőrákban (LC) és ezek komorbiditásában (LC+COPD) szenvedő betegektől, illetve egészséges kontroll önkéntesektől gyűjtött, majd „pool”-ozott humán szérumban azonosított N-glikán szerkezetek glükóz egység (GU) és relatív csúcs alatti terület %-os értékei. A csúcsok sorszáma megfelel a 4. ábra számozásának. Ezeket az adatokat használtam fel a minták összehasonlításához.

5.3 Reszekciós műtét hatásának vizsgálata a humán szérumban N-kötött glikán profiljára

A „pool”-ozott minták analízise és a minta előkészítési módszer fejlesztése után, olyan tüdőrákos betegek mintáinak analízisére került sor, akiknek a kezelésük során műtéten átvitták a szervezetéből a tumort. 17 tüdőrákos beteg szérumban mintájának glikán profilját vizsgáltam lézer indukált kapilláris elektroforézissel műtét előtt és a műtétet követően. A tüdőrákos humán szérumban minták korábbi vizsgálatainak alapján 21 N-kötött glikán szerkezet relatív csúcs alatti területének megváltozását vizsgáltam diszkrét és folytonos tanulási modellekkel, hogy van-e korrelációs kapcsolat az egyes klinikai paraméterek és az N-kötött glikánok mennyiségének változásai között. Azokat a glikán szerkezeteket választottam ki első lépésben, amelyek relatív csúcs alatti terület% legalább egy „pool”-ozott minta esetén legalább 1% volt (3. táblázat félkövérrel jelölt szerkezetek). Azonban a listát módosítanom kellett az együtt vándorló csúcsok (M3, M5, A2, A2B) és a nagyon kis csúcsok (A4G4[6]S3, A3G3[6]S2, A4G4[3,3,3]S3) miatt. Kivettem a további vizsgálatból őket, mert ezeknek a további analízise bizonytalanra tette volna az eredményeket. Az FA2BG2S2 és az FA3G3S(3)3 együtt vándorló szerkezeteket egy csúcsként kezeltem, mivel nem tudtam meghatározni a szerkezetek egyedi terület% értékeit kellő biztonsággal. Mindemellett jól elkülönülő stabil oligoszacharidokat bevontam az analizált struktúrák sorába (M9, FA2[6]G1S1). Az így kiválasztott oligoszacharid szerkezeteket a 7. táblázat tartalmazza. A döntési fa analízis a gépi tanításban a prediktív modellezés egyik megközelítése. A döntési fa analízis során 51 klinikai változót vettem figyelembe beleértve az egyéni és a generált klinikai változó párokat is. A 8. táblázat összefoglalja a korrelációs kapcsolatokat a klinikai változók és az N-kötött glikán szerkezetek mennyiségének megváltozása között, azokban a vizsgált esetekben, ahol a modell pontosságának értéke meghaladja a 0,63-t. A 8. ábrán bemutatom a sikeres műtét példáján keresztül a döntési fa felépítését.

Sorszám	Szerkezet neve	Glikán szerkezet
1	FA4BG4S(3)4	
2	A2G2S(6)2	
3	FA3G3S(6)3	
4	A2G2S(3)2	
5	A2BG2S2	
6	FA2G2S2	
7	FA2BG2S2, FA3G3S(3)3	 
8	FA2[6]G1S1	

Sorszám	Szerkezet neve	Glikán szerkezet
9	A3G3S(3)2	
10	A2G2S(6)1	
11	A2BG2S1	
12	FA2G2S1	
13	FA2BG2S1	
14	A4G4S(6)2	
15	FA2, M6	
16	FA2B	

Sorszám	Szerkezet neve	Glikán szerkezet
17	FA2[6]G1, M7	
18	FA2[3]G1	
19	M8, FA2B [6]G1	
20	FA2G2	
21	M9	

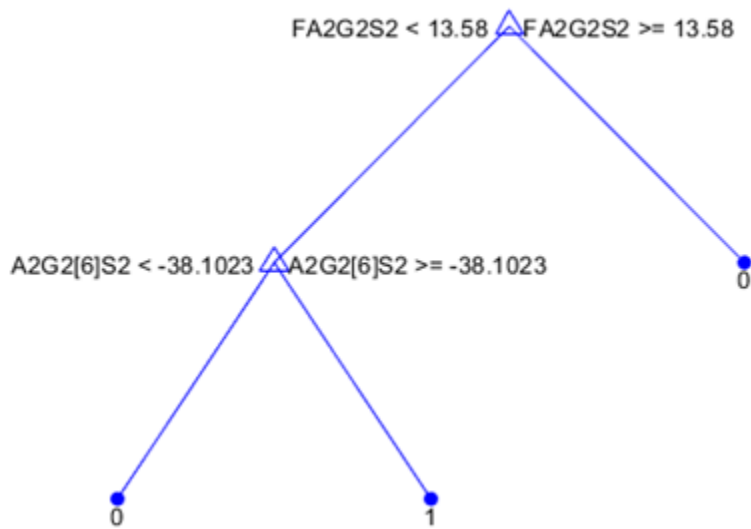
7. táblázat: A műtött betegek vérszérum mintái esetén vizsgált glikán struktúrák listája, kódja és szerkezete

Az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgálat idején is rendszeresen dohányzók esetén a #15. csúcs (FA2 és M6 együtt vándorló glikán szerkezetek) relatív csúcs alatti területe nem nőtt 11,35%-ot vagy azt meghaladó mértékben (a modell pontosság: 0,75). Azonban ennek az együtt vándorló glikán csúcsnak (#15. csúcs FA2+M6) a relatív csúcs alatti terület növekedése legalább 16,14%

volt abban az esetben mikor a beteg már abbahagyta a dohányzást és a műtét során sikerült eltávolítani a tumort (a modell pontossága 0,88). Abban az esetben mikor a tüdőrák mellett más betegségei is voltak a páciensnek, mint például lipóma, hiperlipidémia, spondilózis, ízületi gyulladás, göbös pajzsmirigy vagy csonttritkulás, de nem volt cukorbeteg, érlemeszesedése vagy COPD-je a #21. csúcs (M9) relatív csúcs alatti területének növekedése jelentős 35% vagy annál nagyobb (modell pontossága: 0,75). A #21. glikán szerkezet (M9) mennyiségének emelkedését indukálja az az eset is mikor a beteg már abbahagyta a dohányzást és a tüdőrák mellett nem volt érlemeszesedése, a növekedés mértéke legalább 17,8% a korreláció pontossága pedig 0,81. A sikeres műtét eredményeként a #2. csúcs (A2G2S(6)2) relatív csúcs alatti területe 38,1%-nál nem csökkent nagyobb mértékben és a #6. csúcs (FA2G2S2) mennyisége nem nőtt 13,58%-ot vagy annál nagyobb mértékben (a modell pontossága: 0,69). Sikeres műtét után azon betegeknél, akiknek a tüdőrák mellett COPD is kialakult a szervezetében a szérum mintájukban a #6. csúcs (FA2G2S2) mennyisége legalább 31,67%-kal megnövekedett (a modell pontossága: 0,69). A mintavételek időpontjában is rendszeresen dohányzó betegek esetén, akiknek a műtétjük kimenetele pozitív volt kis mértékű változás figyelhető meg a #2 (A2G2S(6)2) és a #3 (FA3G3S(6)3) glikán szerkezetük mennyiségének megváltozásában. A #2 csúcs (A2G2S(6)2) relatív csúcs alatti területének növekedése minimum 9,34% volt vagy ha a növekedés kisebb volt, mint 9,34% vagy esetleg csökkenés volt tapasztalható akkor a #3 (FA3G3S(6)3) csúcs relatív csúcs alatti terület növekedése is legalább 3,96% volt (a korreláció pontossága 0,63). Amikor a tüdőrákos betegnél a COPD is kialakult, de nincs érlemeszesedése, akkor a #12 glikán szerkezet (FA2G2S1) mennyisége legalább 10,97%-kal megnövekedett (a modell pontossága 0,81%). Azonban a COPD és az ateroszklerózis együttes megjelenése az #1 (FA4BG4[3,3,3,3]S4) és a #20 (FA2G2) glikán szerkezetek mennyiségében indukált változásokat. Az #1 csúcs (FA4BG4[3,3,3,3]S4) relatív csúcs alatti területe legalább 18,51%-kal megnövekedett vagy ellenkező esetben az #1 csúcs megváltozása mellett a #20 (FA2G2) glikán szerkezet relatív csúcs alatti területe 28,15%-nál nagyobb mértékben lecsökkent (a modell pontossága 0,63). A korrelációs analízis azt is kimutatta, hogy a tüdőrákos betegek esetén, akiknek nem volt érlemeszesedése a sikeres operáció után az #5 glikán szerkezet (A2BG2S2) relatív csúcs alatti területe 19,10%-nál nagyobb mértékben lecsökkent, vagy ellenkező esetben a #2 glikán szerkezet (A2G2S(6)2) mennyisége legalább 9,34%-kal növekedett meg (a modell pontossága: 0,63). A #7 csúcs (FA2BG2S2 és FA3G3S(3)3 együtt vándorló glikán szerkezetek) csúcs alatti területe esetén legalább 35,24%-os növekedés volt

tapasztalható (a modell pontossága: 0,88) azoknál a tüdőrákos betegeknél, akiknél nem alakult ki atheroszklerózis és az operáció során nem tudták eltávolítani a tumort. A tüdőrák érlelmeszedéssel együtt az #5 (A2BG2S2) és a #2 (A2G2S(6)2) glikán szerkezetek mennyiségének megváltozását befolyásolja: az #5 (A2BG2S2) relatív csúcs alatti területét nem csökkenti 19,10%-nál nagyobb mértékben, illetve a #2 (A2G2S(6)2) relatív csúcs alatti területét nem növeli meg 6,06%-nál nagyobb mértékben (a modell pontossága 0,63). Sikeres műtét esetén az atheroszklerotikus tüdőrákos betegeknél a #11. (A2BG2S1) oligoszacharid szerkezet relatív csúcs alatti területe legalább 18,37%-kal növekedett meg (a modell pontossága: 0,75). Mindemellett a #13 csúcs (FA2BG2S1) relatív csúcs alatti területének növekedése legalább 19,26% volt azon dohányzó páciensek esetén, akiknek a műtét során nem sikerült eltávolítani a tumort (a modell pontossága: 0,81). Dohányzásról leszokott beteg sikertelen műtétje után a szérumban meghatározott *N*-kötött glikán profilon az alábbi változásokat tapasztaltam: #4 (A2G2S(3)2) glikán szerkezethez tartozó relatív csúcs alatti terület 28,26%-nál nagyobb mértékben csökkent vagy ellenkező esetben a #18 (FA2[3]G1) glikán szerkezet csúcs alatti területe 18,79%-nál jelentősebb mértékben csökkent (a modell pontossága 0,69). Korrelációs vizsgálat eredményeként az is megállapítható, hogy a #3 (FA3G3S(6)3) és a #13 (FA2BG2S1) glikán szerkezetek mennyiségének megváltozását indukálja a sikertelen műtét a tüdőrák és a COPD együttes jelenlétének. A #3 (FA3G3S(6)3) glikán szerkezet 34,01%-nál nagyobb mértékben csökkent vagy ellenkező esetben a #13 (FA2BG2S1) glikán szerkezet relatív csúcs alatti területe legalább 19,26%-kal növekedett meg (a modell pontossága 0,69).

A fentiek alapján a 8. táblázat összefoglalja azokat a modelleket, amelyek lehetőséget adhatnak, a tüdőrákos betegek reszekciós műtétjének hatékonyságának nyomon követésére a molekuláris módszerek fejlesztése révén. Ez a glikobiomarker panel validálást követően jó alapot adhat a betegek állapotának egyszerűbb, gyorsabb és pontosabb meghatározásához.



8. ábra: Példa a döntési fa modellre sikeres műtét esetén. A modell leírja, hogy sikeres műtét után az FA2G2S2 glikán szerkezet mennyisége 13,58%-nál nem nő nagyobb mértékben és az A2G2[6]S2 glikán szerkezet mennyisége 38,1%-nál nem csökken jobban. Az egyes háromszögek csúcsa írja le a háromszög két szárára vonatkozó feltételt. Az 1 azt jelenti, hogy a megadott feltétel teljesül a vizsgált klinikai paraméter esetén, a 0 pedig azt, hogy nem teljesül.

Klinikai paraméter	Eredmény	Pontosság
Sikeres műtét	$\Delta A2G2S(6)2 \geq -38,1$ és $\Delta FA2G2S2 < 13,58$	0,69
Dohányos	$\Delta FA2, M6 < 11,35$	0,75
Érelmeszesedése van	$\Delta A2BG2S2 \geq -19,10$ és $\Delta A2G2S(6)2 < 6,06$	0,63
Van más kísérő betegsége is	$\Delta M9 \geq 35$	0,75
Dohányos sikeres műtéttel	$\Delta A2G2S(6)2 \geq 9,34$ vagy $\Delta A2G2S(6)2 < 9,34$ és $\Delta FA3G3S(6)3 \geq 3,96$	0,63
Dohányzásról leszokott sikeres műtéttel	$\Delta FA2, M6 \geq 16,14$	0,88
Dohányos sikertelen műtéttel	$\Delta FA2BG2S1 \geq 19,26$	0,81
Dohányzásról leszokott sikertelen műtéttel	$\Delta A2G2S(3)2 < -28,26$ vagy $\Delta A2G2S(3)2 \geq -28,26$ és $\Delta FA2[3]G1 < -18,79$	0,69
COPD sikertelen műtéttel	$\Delta FA3G3S(6)3 < -34,01$ vagy $\Delta FA3G3S(6)3 \geq -34,01$ és $\Delta FA2BG2S1 \geq 19,26$	0,69
Érelmeszesedés sikeres műtéttel	$\Delta A2BG2S1 \geq 18,37$	0,75
Sikeres műtét érelmeszesedés nélkül	$\Delta A2BG2S2 < -19,10$ vagy $\Delta A2BG2S2 \geq -19,10$ és $\Delta A2G2S(6)2 \geq 9,34$	0,63
Sikertelen műtét érelmeszesedés nélkül	$\Delta FA2BG2S2, FA3G3S(3)3 \geq 35,24$	0,88
Érelmeszesedés és COPD is kialakult	$\Delta FA4BG4[3,3,3,3]S4 \geq 18,51$ vagy $\Delta FA4BG4[3,3,3,3]S4 < 18,51$ és $\Delta FA2G2 < -28,15$	0,63
COPD igen, érelmeszesedés nem alakult ki	$\Delta FA2G2S1 \geq 10,97$	0,81
Sikeres műtét COPD-vel	$\Delta FA2G2S2 \geq 31,67$	0,69
Dohányzásról leszokott érelmeszesedés nélkül	$\Delta M9 \geq 17,80$	0,81

8. táblázat: A diszkrét paraméterek és az egyes N-kötött glikán szerkezetek relatív csúcs alatti területének megváltozása közötti korrelációs kapcsolat, a döntési fa elemzésének eredményei. A táblázatban csak a 0,63 –nál nagyobb pontosságú modelleket tüntettem fel.

Az N-kötött glikánok diszkrét analízisét, vagyis a korrelációs kapcsolatokat vizsgálatát a klinikai paraméterekkel, nemcsak egyenként, hanem glikán csoportokat létrehozva is elvégeztem. A

kiválasztott 21 glikán szerkezetet az alábbi alcsoportokra osztottam: afukozilált (fukóz monomert nem tartalmazó glikán szerkezetek és magasfokúan mannozilezett glikán szerkezetek), szialilált, terminális galaktozilált és semleges glikánok (összes szíalsav nélküli, töltéssel nem rendelkező glikán). Az adott glikán szerkezetek különálló vizsgálata mellett 51 diszkrét klinikai paramétert határoztam meg a glikán alcsoportok esetén is. A gépi tanítási modellek eredményeit a 9. táblázatban foglaltam össze a hozzájuk tartozó pontosságok értékeivel. Csak azok a korrelációk lettek feltüntetve, ahol a pontosság értéke legalább 0,63. A relatív csúcs alatti területe az afukozilált glikán csoportnak 21%-nál nagyobb mértékben csökkent több klinikai paraméter esetén is: 1) a dohányzásról leszokott sikertelen műtét esetén (modell pontossága 0,69), 2) sikertelen műtét COPD-vel nem rendelkező betegek esetén (modell pontossága 0,69), 3) sikertelen műtét esetén ateroszklerózisos páciens esetén (modell pontossága 0,75), 4) sikertelen műtét diabéteszes betegek esetén (modell pontossága: 0,75), 5) cukorbetegség érelmeszesedés (modell pontossága 0,81) vagy 6) COPD nélkül (modell pontossága 0,75) vagy 7) dohányzással (a modell pontossága 0,81), 8) dohányosok érelmeszesedés (modell pontossága 0,69) vagy 9) COPD nélkül (modell pontossága 0,69). Ez alapján elmondható, hogy a teljes afukozilált glikán csoport mennyisége nagymértékben csökkent akkor, amikor sikertelen műtét vagy cukorbetegség párosult valamely más általunk vizsgált paraméterrel. Azonban a teljes afukozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe nem csökkent 21%-nál nagyobb mértékben sikeres műtét esetén, mikor a tumoros sejteket teljes mértékben eltávolították a páciens szervezetéből, (a modell pontossága 0,69) vagy dohányzásról leszokott nem cukorbeteg esetén (modell pontossága 0,63). Ráadásul diabétesz és COPD nélkül a műtétet követően az afukozilált cukrok mennyiségének növekedése legalább 4,57% volt vagy kisebb mint 1,4% vagy esetleg csökkenés volt tapasztalható (a modell pontossága 0,63). Sikeres műtét a dohányos páciensek esetén indukálja a semleges glikán szerkezetek megváltozását, ami 9,26%-nál nagyobb csökkenésben nyilvánult meg (a modell pontossága: 0,63). Két klinikai paraméter hatására is megváltozott a szialilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe: dohányzásról leszokott betegek sikeres műtéttel és ateroszklerózis diabétesz nélkül. Az érelmeszesedés cukorbetegség nélkül a szialilált glikánok mennyiségének legalább 7,41%-os növekedését eredményezte (a modell pontossága: 0,75), ezzel szemben a sikeres műtét a nem dohányzók esetén csökkentette a szialilált glikán csoport relatív csúcs alatti területét több mint 1,05%-kal (a modell pontossága: 0,81). A tüdőrákos diabéteszes betegek esetén a műtét után a terminális galaktozilált glikánok relatív csúcs alatti területe megnövekedett legalább 81,53%-kal

(a modell pontossága 0,81). A tüdőrák más betegségekkel társulva, mint például lipóma, hiperlipidémia, spondilózis, ízületi gyulladás, göbös pajzsmirigy vagy csontritkulás szintén hatással voltak a teljes terminális galaktozilált glikánok relatív csúcs alatti területére, nagyobb mint 81,53%-os növekedést okozva vagy ellenkező esetben mikor a változás kisebb mint 81,53%, akkor a szialilált oligoszacharidok mennyisége is megváltozott, legalább 9,07%-kal megnőtt (a modell pontossága 0,69). A tüdőrák, a COPD és az érlelmeszesedés együttes jelenléte a szialilált és az afukozilált glikán alcsoportok mennyiségének megváltozását indukálta a műtétet követően. Ennek a három betegségnek a kombinációja révén a szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területe legalább 7,4%-kal növekedett vagy ha nem nőtt 7,4%-nál többet, akkor az afukozilált glikán alcsoport mennyisége csökkent maximum 5,56%-ot, de nem kevesebbet mint 2,21% (a modell pontossága: 0,63). A dohányzásról leszokott betegek érlelmeszesedéssel ugyanolyan változásokat indukáltak a szérum *N*-kötött glikán profilban, mint a COPD-s érlelmeszesedésben szenvedő páciensek.

Klinikai paraméter	Modell	Pontosság
Sikeres műtét	Δ teljes afukozilált $\geq -21\%$	0,69
Cukorbeteg	Δ teljes terminális galaktozilált $\geq 81,53\%$	0,81
Van egyéb kísérő betegség is	Δ teljes terminális galaktozilált $\geq 81,53\%$ vagy Δ teljes terminális galaktozilált $< 81,53\%$ és Δ teljes szialilált $\geq 9,065\%$	0,69
Dohányos sikeres műtéttel	Δ semleges $< -9,26\%$	0,63
Dohányzásról leszokott sikeres műtéttel	Δ teljes szialilált $< -1,05\%$	0,81
Dohányzásról leszokott sikertelen műtéttel	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,7
Sikertelen műtét COPD nélkül	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,69
Sikertelen műtét érlemeszesedéssel	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,75
COPD érlemeszesedéssel	Δ teljes szialilált $\geq 7,4\%$ vagy Δ teljes szialilált $< 7,4\%$ és $-5,56\% \leq \Delta$ teljes afukozilált $< -2,21\%$	0,63
Cukorbeteg COPD nélkül	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,75
COPD és cukorbetegség nélkül	Δ teljes afukozilált $\geq 4,57\%$ vagy Δ teljes afukozilált $< 1,4\%$	0,63
Cukorbeteg sikertelen műtéttel	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,75
Érlemeszesedés cukorbetegség nélkül	Δ teljes szialilált $\geq 7,41\%$	0,75
Cukorbeteg érlemeszesedés nélkül	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,81
Cukorbeteg dohányos	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,81
Dohányzásról leszokott nem cukorbeteg	Δ teljes afukozilált $\geq -21\%$	0,63
Dohányos COPD nélkül	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,69
Dohányzásról leszokott érlemeszesedéssel	Δ teljes szialilált $\geq 7,4\%$ vagy Δ teljes szialilált $< 7,4\%$ és $-5,56\% \leq \Delta$ teljes afukozilált $< -2,21\%$	0,63
Dohányos érlemeszesedés nélkül	Δ teljes afukozilált $< -21\%$	0,69

9. táblázat: A klinikai tulajdonságok és az N-glikán szerkezetek relatív csúcs alatti területének megváltozása közötti kapcsolatok, a döntési fa vizsgálatának eredménye. Az egyes modellekhez tartozó pontosság a harmadik oszlopban van feltüntetve.

A lineáris regresszió eredményei (lásd a 10. táblázat) azt mutatták, hogy a dohányzással eltöltött évek, a beteg életkora, a vércukorszintje, a CRP értéke, a tüdőrák stádiuma, és az elszívott cigaretták mennyisége lineáris korrelációban van az N-kötött glikánok relatív csúcs alatti területének megváltozásával az R^2 értékét is figyelembe véve. Az 1-6. egyenletek bemutatják a

lineáris regressziós modelleket, amelyek leírják a klinikai paraméterek és az *N*-kötött glikánok relatív csúcs alatti területeinek megváltozása közötti kapcsolatot. Az 1. egyenlet azt mondja meg, hogy a dohányzással eltöltött évek száma, milyen összefüggésben áll a következő *N*-kötött glikán szerkezetek relatív csúcs alatti területek megváltozásával: FA2G2S1, FA2[6]G1 and M7, FA2[3]G1, FA2B[6]G1 and M8, FA2G2 és M9 (#12. #17–21. csúcsok). A tüdőrák stádiuma megváltoztatja a mennyiségét a A4G4S(6)2, FA2[6]G1 és M7, FA2B[6]G1 és M8, FA2G2 és M9 (#14. #17. #19–21. csúcsok) glikán szerkezeteknek a 3. egyenlet szerint. A páciens életkora, az elszívott cigaretták száma, a vércukorszint és a CRP érték változást eredményeznek a FA2[6]G1 és M7, FA2[3]G1, FA2B[6]G1 and M8, FA2G2 és M9 (#17–21. csúcsok) cukor struktúrák relatív csúcs alatti területében a 2., 4., 5. és 6. egyenletek alapján.

Regressziós modellek egyenletei	R ²	Egyenlet sorszáma
$y \sim -6,31 + 1,81 \cdot x_{12} \pm 0,16 \cdot x_{17} \cdot x_{18} + 0,76 \cdot x_{17} \cdot x_{19} + (-0,90) \cdot x_{17} \cdot x_{20} + 0,03 \cdot x_{17} \cdot x_{21} + (-0,38) \cdot x_{18} \cdot x_{19} + 0,74 \cdot x_{18} \cdot x_{20} + (-0,03) \cdot x_{20} \cdot x_{21}$	0,99	(1)
$y \sim 48,64 + 0,34 \cdot x_{21} + 0,22 \cdot x_{17} \cdot x_{19} + (-0,25) \cdot x_{17} \cdot x_{20} + (-0,14) \cdot x_{18} \cdot x_{19} + 0,17 \cdot x_{18} \cdot x_{20} + 0,02 \cdot x_{19} \cdot x_{20}$	0,95	(2)
$y \sim 2,32 + 0,05 \cdot x_{14} + 0,001 \cdot x_{17} \cdot x_{20} + 0,001 \cdot x_{19} \cdot x_{21}$	0,81	(3)
$y \sim 397250 + 1688 \cdot x_{17} \cdot x_{18} + (-1408) \cdot x_{17} \cdot x_{19} + (-1623) \cdot x_{18} \cdot x_{20} + 393 \cdot x_{18} \cdot x_{21} + 832 \cdot x_{19} \cdot x_{20}$	0,77	(4)
$y \sim 5,79 + 0,01 \cdot x_{17} \cdot x_{18} + (-0,01) \cdot x_{17} \cdot x_{19} + 0,005 \cdot x_{17} \cdot x_{21} + (-0,01) \cdot x_{18} \cdot x_{19} + 0,01 \cdot x_{18} \cdot x_{20} + (-0,01) \cdot x_{18} \cdot x_{21} + 0,01 \cdot x_{19} \cdot x_{20} + 0,005 \cdot x_{20} \cdot x_{21}$	0,99	(5)
$y \sim 18,8 + (-0,04) \cdot x_{17} \cdot x_{19} + 0,04 \cdot x_{17} \cdot x_{21} + (-0,05) \cdot x_{18} \cdot x_{21} + 0,04 \cdot x_{19} \cdot x_{20}$	0,96	(6)

10. táblázat: A meghatározott regressziós modellek a folytonos változók (azaz a folytonos klinikai paraméterek) és az *N*-glikán struktúrák relatív csúcs alatti területének változása közötti kapcsolat elemzésére a megfelelő négyzetes regressziós együtthatókkal. A független változók jelölése a 7. táblázat nomenklatúráját követi, például: az *x*₁₂ a #12. csúcs relatív csúcs alatti területének változását jelenti.

5.4 Kemoterápia hatásának vizsgálata a glikán szerkezet megváltozására

A PhD munkám során a műtött tüdőrákos betegek vizsgálatához hasonlóan, 33 kemoterápiás kezelésen részt vevő beteg mintáját is analizáltam. A betegek kezelésének különböző fázisaiban levett vérszérum mintákból meghatároztam az aszparagin-kötött glikán profilokat lézer indukált detektorral felszerelt kapilláris elektroforézissel. A kemoterápiás betegek mintái esetén is korrelációt kerestem bizonyos klinikai paraméterek és a kemoterápiás kezelés hatására megváltozó *N*-kötött glikánok relatív csúcs alatti terület változásai között. A glikán profilból a műtött betegek vizsgálatával megegyezően 21 *N*-kötött glikán struktúrát választottam ki, amelyek listáját a 7. táblázat tartalmazza. Az elemzéshez a diszkrét döntési fa analízist alkalmaztam 105 klinikai változóval (beleértve az önálló és a származtatott változókat is). A 11. táblázat foglalja össze az egyes klinikai paraméterek és az *N*-kötött glikán szerkezetekhez tartozó csúcs alatti területek megváltozásának korrelációs modelljeit, ahol a modell pontossága nagyobb, mint 0,8. A #20 (FA2G2) cukorszerkezet kivételével minden vizsgált glikán szerkezet megjelenik legalább egyszer a táblázatban, vagyis jelentős változással bír valamely klinikai paraméter esetén. Az eredmények azt mutatták, hogy a cukorbetegség jól definiált korreláció mellett nagy hatással van számos glikán szerkezet relatív csúcsterületének változására, úgymint a #3 (FA3G3S(6)3), #4 (A2G2S(3)2), #6 (FA2G2S2), #8 (FA2[6]G1S1), #12 (FA2G2S1), #17 (FA2[6]G1+ M7), #18 (FA2[3]G1) és a #21 (M9)-nek. A cukorbeteg tüdőrákos betegek mintái esetén háromféle korreláció figyelhető meg:

- 1) a #18 (FA2[3]G1) relatív csúcsterülete több mint 29,77%-kal lecsökkent, míg a #17 (FA2[6]G1+ M7) 34,01%-nál nagyobb mértékben nem csökkent
- 2) a #18 (FA2[3]G1) relatív csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 29,77% miközben a #12 (FA2G2S1) relatív csúcs alatti területe legalább 36,35%-kal nőtt
- 3) #21 (M9) relatív csúcs alatti területe 40,22%-nál nagyobb mértékben csökkent és a #18 (FA2[3]G1) relatív csúcs alatti területe 29,77%-nál nem csökkent nagyobb mértékben miközben a #12 (FA2G2S1) relatív csúcs alatti területe nem nőtt 36,35%-nál nagyobb mértékben, a modell pontossága 0,816.

Azokban az esetekben mikor a cukorbetegség mellé COPD társult a #3 (FA3G3S(6)3) glikán szerkezet relatív csúcs alatti területe legalább 186,71%-kal megnőtt vagy ellenkező esetben a #4 (A2G2S(3)2) struktúra csúcs alatti területe 47,73%-nál nagyobb mértékben lecsökkent, a modell

pontossága 0,918. Az elemzés eredményeképp az is elmondható 0,827 pontossággal, hogy ha a cukorbeteg tüdőrákos betegnél nem alakult ki COPD a #21 (M9) glikán szerkezet relatív csúcs alatti területe 12,72 %-nál nagyobb mértékben lecsökkent, amíg a #8 (FA2[6]G1S1) szerkezet csúcs alatti területe nem nőtt nagyobb mértékben, mint 10,6%. Abban az esetben mikor a tüdőrákos betegnél alapbetegségként jelen van a diabétesz és az érlemeszesedés is a #21 (M9) cukorszerkezet relatív csúcs alatti területe 40,22%-nál nagyobb mértékben lecsökkent vagy ellenkező esetben a #4 (A2G2S(3)2) struktúra csúcs alatti területe 47,73%-nál nagyobb mértékben csökkent, a modell pontossága 0,939. Azonban mikor a tüdőrákos betegnek a diabétesz mellett nincs érlemeszesedése jól definiálható változás a #18 (FA2[3]G1) (nagyobb mint 29,77%-os csökkenés) és a #17 (FA2[6]G1+ M7) (29,49%-nál nem nagyobb csökkenés) cukor szerkezetek relatív csúcs alatti területeinél figyelhetők meg 0,857 pontossággal. Az érlemeszesedéssel is diagnosztizált tüdőrákos betegek esetén, akiknél nem alakult ki COPD a kemoterápia hatására a #9 (A3G3S(3)2) és a #19 (FA2B [6]G1 + M8) aszparagin-kötött glikán szerkezetek relatív csúcs alatti területeinél alakult ki jelentős változás: a #9 (A3G3S(3)2) területe legalább 305,54%-kal nőtt vagy 70,47%-nál nagyobb mértékben csökkent vagy a #9 (A3G3S(3)2) csúcs alatti területe 305,54%-nál kevesebbet nőtt vagy maximum 70,47%-ot csökkent és a #19 (FA2B[6]G1 + M8) szerkezet relatív csúcs alatti területe is 43,92%-nál jobban lecsökkent, modell pontossága 0,888.

A döntési fa analízis során a dohányzást és arról való leszokást is társítottuk klinikai paraméterek mellé. Ez alapján megállapítottam, hogy a cukorbeteg tüdőrákos betegek esetén, akik leszoktak a dohányzásról a kemoterápia hatására megnövekedett a relatív csúcs alatti területe a #12 (FA2G2S1) glikán szerkezetnek minimum 36,35%-kal, ezzel ellenkező esetben a #18 (FA2[3]G1) és #21 (M9) szerkezetek relatív csúcs alatti területe csökkent nagyobb mértékben, mint 29,77%, illetve 12,18%, a modell pontossága 0,918. Az általam vizsgált tumoros betegek közül, akinél nem alakult ki COPD és sikeresen leszokott a dohányzásról a kemoterápia során jól definiálható módon változott a relatív csúcs alatti területe az #1 (FA4BG4S(3)4), #2 (A2G2S(6)2), #9 (A3G3S(3)2) és #21 (M9) glikán szerkezeteknek:

- 1) #9 (A3G3S(3)2) relatív csúcs alatti területe minimum 169,3%-ot nőtt;
- 2) #9 (A3G3S(3)2) relatív csúcs alatti területe nem nőtt 169,3%-nál nagyobb mértékben és az #1 (FA4BG4S(3)4) relatív csúcs alatti területe több mint 51,51%-ot csökkent;

3) #9 (A3G3S(3)2) relatív csúcs alatti területe nem nőtt 169,3%-nál nagyobb mértékben és a #1 (FA4BG4S(3)4) relatív csúcs alatti területe nem csökkent 51,51%-nál nagyobb mértékben miközben a #2 (A2G2S(6)2) relatív csúcs alatti területe minimum 22,75%-ot nőtt;

4) a #9 (A3G3S(3)2) relatív csúcs alatti területe nem nőtt 169,3%-nál nagyobb mértékben és az #1 (FA4BG4S(3)4) relatív csúcs alatti területe nem csökkent 51,51%-nál nagyobb mértékben, miközben a #2 (A2G2S(6)2) relatív csúcs alatti területe nem nőtt 22,75%-nál nagyobb mértékben és a #21 (M9) relatív csúcs alatti területe legalább 10,03 %-ot, de kevesebbet, mint 13,08%-ot növekedett, a modell pontossága 0,827.

Ezzel szemben azoknál, a betegeknél, akiknél ugyanúgy nem alakult ki COPD azonban nem szoktak le a dohányzásról az alábbi modellt azonosítottam:

1) a #21 (M9) glikán szerkezet csúcs alatti területe 14,9%-nál nagyobb mértékben csökkent és a #7 (FA2BG2S2 és FA3G3S(3)3 együtt vándorló glikán szerkezetek) csúcs alatti területe nem nőtt 6,31%-nál nagyobb mértékben;

2) a #21 (M9) glikán szerkezet csúcs alatti területe 14,9%-nál nagyobb mértékben nem csökkent és a #18 (FA2[3]G1) cukor struktúra csúcs alatti területe 40,36%-nál nagyobb mértékben csökkent

3) a #21 (M9) glikán szerkezet csúcs alatti területe 14,9%-nál nagyobb mértékben nem csökkent, a #18 (FA2[3]G1) csúcs alatti területe 40,36%-nál nem csökkent nagyobb mértékben és a #10 (A2G2S(6)1) csúcs alatti területe 25,36%-nál nagyobb mértékben csökken, a modell pontossága 0,878.

A tüdőrák kísérő betegségei mellett kapcsolatot kerestem a glikán struktúrák relatív csúcs alatti területeinek megváltozása és a kemoterápiás kezelés kimenetele, azaz a tumor regressziója, progressziója és stagnálása között is. A dohányzásról leszokott tüdőrákos betegek esetén, akiknél a kemoterápia után progresszió volt megfigyelhető a #9 (A3G3S(3)2) glikán szerkezet csúcs alatti területének nagysága legalább 381,2%-kal megnőtt vagy ellenkező esetben a #6 (FA2G2S2) glikán szerkezet csúcs alatti terület növekedése volt minimum 97,37% (modell pontossága: 0,847). Az osztályozó algoritmus eredményei azt mutatták, hogy bizonyos glikán szerkezetek (#2 (A2G2S(6)2), #3 (FA3G3S(6)3), #5 (A2BG2S2), #9 (A3G3S(3)2), #12 (FA2G2S1), #15 (FA2+M6), #16 (FA2B), #17 (FA2[6]G1+ M7), #18 (FA2[3]G1) és #21 (M9)) relatív csúcs alatti

területének megváltozása és a kezelés kimenetele között jól definiálható kapcsolat van női minták esetén. Ez alapján legalább 381,2%-os növekedés volt tapasztalható a #9 (A3G3S(3)2) glikán szerkezet mennyisége esetén a vizsgált tüdőrákos nőknél, ahol a tumor progressziót mutatott a kezelést követően (a modell pontossága:0,98). Ezenkívül a tumor regresszióval nem rendelkező nőbetegek szérum mintái esetén három esetet azonosítottam a glikán szerkezet változásban:

- 1) a #9 (A3G3S(3)2) relatív csúcs alatti területe legalább 305,54%-kal nőtt;
- 2) a #9 (A3G3S(3)2) relatív csúcs alatti területe nem nőtt 305,54%-nál nagyobb mértékben, míg a #12 (FA2G2S1) relatív területe legalább 46,38%-kal nőtt
- 3) a #9 (A3G3S(3)2) glikán szerkezet relatív csúcs alatti területe nem nőtt 305,54%-nál nagyobb mértékben, de emellett a #12 (FA2G2S1) mennyiségének megváltozása nem haladta meg a 46,38%-os növekedést, illetve a #21 (M9) és #5 glikán struktúrák relatív csúcs alatti területei legalább 11,62%-kal, illetve 14,88%-kal növekedtek 0,847 pontossággal.

A női betegek esetén a kezelést követően a stagnáló tumor állapotnál a #12 (FA2G2S1), #15 (FA2+M6), #16 (FA2B), #17 (FA2[6]G1+ M7) és #21 (M9) glikán szerkezetek csúcs alatti területei jól definiálható módon változtak meg (a modell pontossága: 0,847). Vagy a #12 (FA2G2S1) csúcs relatív csúcs alatti területe legalább 46,38%-kal nőtt, vagy ellenkező esetben a #16 (FA2B) csúcs relatív csúcs alatti területe legalább 47,55%-kal csökkent, a #21 (M9) glikán relatív csúcs alatti területe legalább 19,23%-kal nőtt, a #15 (FA2+M6) csúcs relatív csúcs alatti területe pedig nem nőtt 13,49%-nál nagyobb mértékben. A modell további elemei alapján a női betegek esetén a tumor stagnáló állapota a kemoterápiás kezelést követően a #15 (FA2+M6) csúcs relatív területének növekedését indukálta, amelynek mértéke 13,49% és 18,68% között volt, miközben a #12 (FA2G2S1) glikán szerkezet relatív területe vagy nem nőtt 46,38%-nál nagyobb mértékben, vagy ellenkező esetben a #15 (FA2+M6) glikán szerkezet minimum 18,68%-kal nőtt miközben a #17 (FA2[6]G1+ M7) glikán szerkezet relatív csúcs alatti területe csökkent vagy nagyon kis mértékben (<1,77%) nőtt.

Azonban mikor a kezelés után a beteg állapotában bizonyítottan változás állt be (progresszió vagy regresszió) az alábbi négy eset lépett fel a glikán szerkezetek csúcs alatti területének megváltozásában a kezelés hatására (a modell pontossága 0,806):

- 1) a #9 (A3G3S(3)2) glikán struktúra csúcs alatti területe minimum 381,2%-kal megnőtt;
- 2) a #9 (A3G3S(3)2) struktúra csúcs alatti területe nem nőtt 381,2%-nál nagyobb mértékben és a #3 (FA3G3S(6)3) szerkezet csúcs alatti területe 59,74%-nál nagyobb mértékben csökkent;
- 3) a #9 (A3G3S(3)2) struktúra csúcs alatti területe nem nőtt 381,2%-nál nagyobb mértékben és a #3 (FA3G3S(6)3) szerkezet csúcs alatti területe nem csökkent 59,74%-nál nagyobb mértékben, a #18 (FA2[3]G1) és a #21 (M9) glikán szerkezetek csúcs alatti területei 29,77%-nál, illetve 12,18%-nál nagyobb mértékben csökkentek;
- 4) a harmadik esettel megegyező mértékben változott a #9 (A3G3S(3)2) és a #3 (FA3G3S(6)3) cukor struktúrák, azonban a #18 (FA2[3]G1) esetén a csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 29,77%, mindemellett a #2 (A2G2S(6)2) glikán szerkezet csúcs alatti területe 9,67%-nál nagyobb mértékben csökkent és a #16 (FA2B) glikán szerkezet csúcs alatti területe nem nőtt 22,65%-nál nagyobb mértékben.

A cukorbeteg tüdőrákos páciensek esetén mikor a kemoterápiás kezelés hatására regresszió volt megfigyelhető jól definiálható változás jelentkezett a #12 (FA2G2S1), a #18 (FA2[3]G1), a #21 (M9) és a #6 (FA2G2S2) glikán szerkezeteken. Három esetet különíthetünk el:

- 1) #12 (FA2G2S1) glikán szerkezet csúcs alatti területe legalább 36,35%-ot nőtt;
- 2) a #12 (FA2G2S1) struktúra relatív csúcs alatti területének növekedése nem volt 36,35% vagy annál nagyobb, miközben a #18 (FA2[3]G1) és a #21 (M9) glikánok relatív csúcs alatti területének csökkenése nagyobb, mint 28,20%, illetve 12,18%;
- 3) a második esettel megegyezik a #12 (FA2G2S1) és a #18 (FA2[3]G1) glikán szerkezetek változása, de a #21 (M9) cukor struktúra relatív csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 12,18% és a #6 (FA2G2S2) glikán szerkezet csúcs alatti területének 13,78%-nál nagyobb volt a csökkenés mértéke.

Ugyanezen glikán változások vannak abban az esetben is mikor a cukorbeteg páciens esetén a kezelés hatására a progresszió folyamata kizárható, a modell pontossága 0,878. A tüdőrák mellett érlelmeszesedéssel is diagnosztizált betegek esetén mikor a kemoterápiás kezelést követően a

progresszió lépett fel a döntési fa elemzés eredményeként 0,847 pontosságú modell alapján a következő glikán struktúra változások léptek fel:

- 1) a #9 (A3G3S(3)2) glikán szerkezet csúcs alatti területe minimum 381,2%-ot nöött;
- 2) ellenkező esetben a #10 (A2G2S(6)1) glikán szerkezet csúcs alatti területe nem nöött 26,56%-nál nagyobb mértékben és a #6 (FA2G2S2) glikán szerkezet csúcs alatti területe minimum 97,37%-ot nöött;
- 3) a #6 (FA2G2S2), a #9 (A3G3S(3)2) és a #10 (A2G2S(6)1) glikán szerkezet csúcs alatti területe nem nöött legalább 97,37%-ot, 381,2%-ot, illetve 26,56%-ot és a #14 (A4G4S(6)2) glikán szerkezet mennyisége 48,34%-nál nagyobb mértékben csökkent.

Azon tüdőrákos betegeknél, akiknél nem alakult ki COPD a kezelés mindhárom kimenetele jól definiálható változást eredményezett a glikán szerkezetek változásában. Regresszió esetén a #6 (FA2G2S2) és a #18 (FA2[3]G1) glikán szerkezetek csúcs alatti területei csökkentek le legalább 10,96%, illetve 27,89%-kal, a modell pontossága: 0,888. Progresszió esetén 0,867 modell pontossággal az alábbi változások figyelhetők meg:

- 1) a #17 (FA2[6]G1+ M7) glikán szerkezetek csúcs alatti területe 34,01%-nál nagyobb mértékben csökkent
- 2) a #17 (FA2[6]G1+ M7) glikán szerkezetek csúcs alatti területe 34,01%-nál nem csökkent nagyobb mértékben és a #10 (A2G2S(6)1) szerkezet csúcs alatti területe 17,85%-nál nagyobb mértékben csökkent és a #15 (FA2+M6) szerkezetek csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 7,71%,
- 3) a #17 (FA2[6]G1+ M7) és a #10 (A2G2S(6)1) csúcsok csúcs alatti területei nem csökkentek nagyobb mértékben, mint 34,01%, illetve 17,85% akkor a #21 (M9) glikán szerkezet csúcs alatti területe 26,03%-nál nagyobb mértékben csökkent, a modell pontossága 0,867.

Abban az esetben mikor a kezelés után a tumor állapota nem változott (nem javult és nem is romlott), az #1 (FA4BG4S(3)4) glikán szerkezet csúcs alatti területe 51,51%-nál nagyobb mértékben csökkent, a modell pontossága 0,878. A döntési analízis eredményeképp megállapítható, hogy az érlemeszedéssel is diagnosztizált tüdőrákos betegeknél mikor a kemoterápiás kezelés hatására a tumor állapota stagnált a vérszérumból kinyerhető glikán szerkezetek jelentős változást mutattak:

- 1) a #14 (A4G4S(6)2) glikán szerkezet minimum 56,55%-kal megnövekedett;
- 2) a #14 (A4G4S(6)2) és a #9 (A3G3S(3)2) glikán struktúrák csúcs alatti területei nem nőttek 56,55%-nál, illetve 70,47%-nál nagyobb mértékben;
- 3) #14 (A4G4S(6)2) glikán struktúra csúcs alatti területe nem nőtt 56,55%-nál nagyobb mértékben, azonban a #9 (A3G3S(3)2) cukor szerkezet csúcs alatti területe minimum 70,47%-ot nőtt és a #19 (FA2B [6]G1 + M8) glikán szerkezetek 43,92%-nál nagyobb mértékben csökkentek;
- 4) ebben az esetben is a #14 (A4G4S(6)2) glikán struktúra csúcs alatti területe nem nőtt 56,55%-nál nagyobb mértékben, és a #9 (A3G3S(3)2) cukor szerkezet csúcs alatti területe minimum 70,47%-ot nőtt, a #19 (FA2B [6]G1 + M8) nem csökkent nagyobb mértékben mint 43,92%, miközben a #11 (A2BG2S1) és a #7 (FA2BG2S2 és FA3G3S(3)3 együtt vándorló glikán szerkezetek) glikán szerkezetek csúcs alatti területe minimum 31,66%-ot, illetve 22,98%-ot csökkent;
- 5) megegyezik a negyedik esettel a #14 (A4G4S(6)2), a #9 (A3G3S(3)2), a #19 (FA2B [6]G1 + M8), a #11 (A2BG2S1) tekintetében azonban a #7 (FA2BG2S2 és FA3G3S(3)3 együtt vándorló glikán szerkezetek) nem csökkent nagyobb mértékben, mint 22,98%, illetve a #2 (A2G2S(6)2) glikán szerkezet csúcs alatti területe 7,4%-nál nagyobb mértékben csökkent a modell pontossága 0,827.

Amikor a tüdőrák mellett más kísérőbetegség is előfordult (ami nem COPD, érelmeszesedés vagy cukorbetegség volt) és a kemoterápia hatására stagnált a tumor állapota a glikán szerkezet változásokban az alábbiakat tapasztaltam: a #15 (FA2+M6) struktúra csúcs alatti területe minimum 72,91%-t nő vagy ellenkező esetben a #8 (FA2[6]G1S1), a #21 (M9) és a #4 (A2G2S(3)2) cukor szerkezetek csúcs alatti területei nem csökkentek nagyobb mértékben, mint 61,81%, 40,22%, illetve 27,40%, miközben a #13 (FA2BG2S1) szerkezet csúcs alatti területének csökkenése 19,12 és 17,96 között volt. A meghatározott modell pontossága 0,806. A vérérszérum glikán szerkezetének változása 0,806 pontosságú modellel írható le abban az esetben, mikor a tüdőbeteg páciensnek nincs COPD-je és a kemoterápia hatására nincs javulás a beteg állapotában. A glikán struktúrák lehetséges csúcs alatti területeinek változásai:

- 1) #9 csúcs alatti területe minimum 252,31%-ot nőtt;

- 2) #9 (A3G3S(3)2) csúcs alatti területe nem nőtt 252,31%-nál nagyobb mértékben és a #19 (FA2B [6]G1 + M8) csúcs alatti területe minimum 30,14%-ot csökkent;
- 3) a #9 (A3G3S(3)2) csúcs alatti területe nem nőtt 252,31%-nál nagyobb mértékben, #19 (FA2B [6]G1 + M8) csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 30,14% és a #21 (M9) csúcs alatti területe minimum 12,18%-ot csökkent
- 4) a #9 (A3G3S(3)2) és #19 (FA2B [6]G1 + M8) struktúrákat tekintve megegyezik a harmadik esettel és #21 (M9) cukor szerkezet csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 26,03%, illetve a #10 (A2G2S(6)1) glikán csúcs alatti területe 17,85%-nál nagyobb mértékben csökkent;
- 5) a #9 (A3G3S(3)2), #19 (FA2B [6]G1 + M8), #21 (M9) szerkezetek változásai megegyeznek a negyedik esettel, azonban a #10 (A2G2S(6)1) szerkezet csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 17,85% és az #1 (FA4BG4S(3)4) szerkezet csúcs alatti területe minimum 51,51%-kal csökkent.

Klinikai paraméterek	Eredmények	Pontosság
Cukorbetegség	$\Delta\text{FA2}[3]\text{G1} < -29,77$ és $\Delta\text{FA2}[6]\text{G1} + \text{M7} > -34,01$ vagy $\Delta\text{FA2}[3]\text{G1} > -29,77$ és $\Delta\text{FA2G2S1} > 36,35$ vagy $\Delta\text{FA2}[3]\text{G1} > -29,77$ és $\Delta\text{FA2G2S1} < 36,35$ és $\Delta\text{M9} < -40,22$	0,816
Érelmeszesedés COPD nélkül	$\Delta\text{A3G3S}(3)2 > 305,54$ vagy $\Delta\text{A3G3S}(3)2 < -70,47$ vagy $-70,47 \leq \Delta\text{A3G3S}(3)2 < 305,54$ és $\Delta\text{FA2B}[6]\text{G1} + \text{M8} < -43,92$	0,888
Cukorbetegség és COPD	$\Delta\text{FA3G3S}(6)3 > 186,71$ vagy $\Delta\text{FA3G3S}(6)3 < 186,71$ és $\Delta\text{A2G2S}(3)2 < -47,73$	0,918
Cukorbetegség COPD nélkül	$\Delta\text{M9} < -12,72$ és $\Delta\text{FA2}[6]\text{G1S1} < 10,60$	0,827
Cukorbetegség és érelmeszesedés	$\Delta\text{M9} < -40,22$ vagy $\Delta\text{M9} > -40,22$ és $\Delta\text{A2G2S}(3)2 < -47,73$	0,939
Cukorbetegség érelmeszesedés nélkül	$\Delta\text{FA2}[3]\text{G1} < -29,77$ és $\Delta\text{FA2}[6]\text{G1} + \text{M7} > -29,49$	0,857
Dohányzásról leszokott cukorbeteg	$\Delta\text{FA2G2S1} > 36,35$ vagy $\Delta\text{FA2G2S1} < 36,35$ és $\Delta\text{FA2}[3]\text{G1} < -29,77$ és $\Delta\text{M9} < -12,18$	0,918
Dohányos COPD nélkül	$\Delta\text{M9} < -14,90$ és $\Delta\text{FA2BG2S2} + \text{FA3G3S}(3)3 < 6,31$ vagy $\Delta\text{M9} > -14,90$ és $\Delta\text{FA2}[3]\text{G1} < -40,36$ vagy $\Delta\text{M9} > -14,90$ és $\Delta\text{FA2}[3]\text{G1} > -40,36$ és $\Delta\text{A2G2S}(6)1 < -25,36$	0,878
Dohányzásról leszokott COPD nélkül	$\Delta\text{A3G3S}(3)2 > 169,30$ vagy $\Delta\text{A3G3S}(3)2 < 169,30$ és $\Delta\text{FA4BG4S}(3)4 < -51,51$ vagy $\Delta\text{A3G3S}(3)2 < 169,30$ és $\Delta\text{FA4BG4S}(3)4 > -51,51$ és $\Delta\text{A2G2S}(6)2 > 22,75$ vagy $\Delta\text{A3G3S}(3)2 < 169,30$ és $\Delta\text{FA4BG4S}(3)4 > -51,51$ és $\Delta\text{A2G2S}(6)2 < 22,75$ és $10,03 \leq \Delta\text{M9} < 13,08$	0,827
Dohányzásról leszokott tumor progresszióval	$\Delta\text{A3G3S}(3)2 > 381,20$ vagy $\Delta\text{A3G3S}(3)2 < 381,20$ és $\Delta\text{FA2G2S2} > 97,37$	0,847

Klinikai paraméterek	Eredmények	Pontosság
Cukorbeteg tumor regresszióval	$\Delta FA2G2S1 \geq 36,35$ vagy $\Delta FA2G2S1 < 36,35$ és $\Delta FA2[3]G1 < -28,20$ és $\Delta M9 < -12,18$ vagy $\Delta FA2G2S1 < 36,35$ és $\Delta FA2[3]G1 < -28,20$ és $\Delta M9 \geq -12,18$ és $\Delta FA2G2S2 < -13,78$	0,908
Cukorbeteg tumor progresszió nélkül	$\Delta FA2G2S1 \geq 36,35$ vagy $\Delta FA2G2S1 < 36,35$ és $\Delta FA2[3]G1 < -28,20$ és $\Delta M9 < -12,18$ vagy $\Delta FA2G2S1 < 36,35$ és $\Delta FA2[3]G1 < -28,20$ és $\Delta M9 \geq -12,18$ és $\Delta FA2G2S2 < -13,78$	0,878
Nő tumor regresszió nélkül	$\Delta A3G3S(3)2 \geq 305,54$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 305,54$ és $\Delta FA2G2S1 \geq 46,38$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 305,54$ és $\Delta FA2G2S1 < 46,38$ és $\Delta M9 \geq 11,92$ és #5 $\geq 14,88$	0,847
Nő tumor progresszióval	$\Delta A3G3S(3)2 \geq 381,20$	0,980
Nő stagnáló tumor állapot	$\Delta FA2G2S1 \geq 46,38$ vagy $\Delta FA2G2S1 < 46,38$ és $\Delta FA2 + M6 < 13,49$ és $\Delta FA2B < -47,55$ és $\Delta M9 \geq 19,23$ vagy $\Delta FA2G2S1 < 46,38$ és $13,49 \leq \Delta FA2 + M6 < 18,68$ vagy $\Delta FA2G2S1 < 46,38$ és $\Delta FA2 + M6 \geq 18,68$ és $\Delta FA2[6]G1 + M7 < 1,77$	0,847
Nő stagnáló tumor állapot nélkül	$\Delta A3G3S(3)2 \geq 381,20$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 381,20$ és $\Delta FA3G3S(6)3 < -59,74$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 381,20$ és $\Delta FA3G3S(6)3 \geq -59,74$ és $\Delta FA2[3]G1 < -29,77$ és $\Delta M9 < -12,18$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 381,20$ és $\Delta FA3G3S(6)3 \geq -59,74$ és $\Delta FA2[3]G1 \geq -29,77$ és $\Delta A2G2S(6)2 < -9,67$ és $\Delta FA2B < 22,65$	0,806
Érelmeszesedés és tumor progresszió	$\Delta A3G3S(3)2 \geq 381,20$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 381,20$ és $\Delta A2G2S(6)1 < 26,56$ és $\Delta FA2G2S2 \geq 97,37$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 381,20$ és $\Delta A2G2S(6)1 < 26,56$ és $\Delta FA2G2S2 < 97,37$ és $\Delta A4G4S(6)2 < -48,34$	0,847
Érelmeszesedés és stagnáló tumor állapot	$\Delta A4G4S(6)2 \geq 56,55$ vagy $\Delta A4G4S(6)2 < 56,55$ és $\Delta A3G3S(3)2 < 70,47$ vagy $\Delta A4G4S(6)2 < 56,55$ és $\Delta A3G3S(3)2 \geq 70,47$ és $\Delta FA2B [6]G1 + M8 < -43,92$ vagy $\Delta A4G4S(6)2 < 56,55$ és $\Delta A3G3S(3)2 \geq 70,47$ és $\Delta FA2B [6]G1 + M8 \geq -43,92$ és $\Delta A2BG2S1 < -31,66$ és $\Delta FA2BG2S2 + FA3G3S(3)3 < -22,98$ vagy $\Delta A4G4S(6)2 < 56,55$ és $\Delta A3G3S(3)2 \geq 70,47$ és $\Delta FA2B [6]G1 + M8 \geq -43,92$ és $\Delta A2BG2S1 < -31,66$ és $\Delta FA2BG2S2 + FA3G3S(3)3 \geq -22,98$ és $\Delta A2G2S(6)2 < -7,40$	0,827
Kísérő betegség és stagnáló tumor állapot	$\Delta FA2 + M6 \geq 72,91$ vagy $\Delta FA2 + M6 < 72,91$ és $\Delta FA2[6]G1S1 \geq -61,81$ és $\Delta M9 \geq -40,22$ és $\Delta A2G2S(3)2 \geq -27,40$ és $-19,12 \leq \Delta FA2BG2S1 < -17,96$	0,806
Tumor regresszió COPD nélkül	$\Delta FA2[3]G1 < -27,89$ és $\Delta FA2G2S2 < -10,96$	0,888
Tumor regresszió nélkül és COPD nélkül	$\Delta A3G3S(3)2 \geq 252,31$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 252,31$ és $\Delta FA2B [6]G1 + M8 < -30,14$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 252,31$ és $\Delta FA2B [6]G1 + M8 \geq -30,14$ és $\Delta M9 < -26,03$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 252,31$ és $\Delta FA2B [6]G1 + M8 \geq -30,14$ és $\Delta M9 \geq -26,03$ és $\Delta A2G2S(6)1 < -17,85$ vagy $\Delta A3G3S(3)2 < 252,31$ és $\Delta FA2B [6]G1 + M8 \geq -30,14$ és $\Delta M9 \geq -26,03$ és $\Delta A2G2S(6)1 \geq -17,85$ és $\Delta FA4BG4S(3)4 < -51,51$	0,806

Klinikai paraméterek	Eredmények	Pontosság
Tumor progresszió COPD nélkül	$\Delta FA2[6]G1 + M7 < -34,01$ vagy $\Delta FA2[6]G1 + M7 \geq -34,01$ és $\Delta A2G2S(6)1 < -17,85$ és $\Delta FA2 + M6 \geq -7,71$ vagy $\Delta FA2[6]G1 + M7 \geq -34,01$ és $\Delta A2G2S(6)1 \geq -17,85$ és $\Delta M9 < -26,03$	0,867
Stagnáló tumor COPD nélkül	$\Delta FA4BG4S(3)4 < -51,51$	0,878

11. táblázat: A döntési fa elemzés eredményei, amelyek megfelelő pontossággal leírják a klinikai jellemzők és az N-kötött glikán struktúrák relatív csúcs alatti területeinek változása közötti összefüggéseket a kemoterápiás kezelésen részt vett tüdőrákos betegek esetén.

Az egyedi glikán szerkezetek változása és a klinikai paraméterek közötti kapcsolat mellett, a cukor struktúrákat alcsoportokba rendezve is kerestem korrelációkat a betegekhez tartozó klinikai paraméter párokkal. Az N-kötött glikán szerkezeteket az alábbi csoportokra osztottam: teljes afukozilált (afukozilált és magas mannóz cukor struktúrák), szialilált, terminális galaktozilált és semleges (minden glikán szialsav nélkül) glikán alcsoportok. Az egyedi glikán vizsgálathoz hasonlóan itt is 105 klinikai változót vontam be az osztályozó döntési fa analízisbe, hogy kapcsolatot találjak a glikán alcsoportok csúcs alatti területeinek változásaival. A 12. táblázatban összefoglaltam a 0,85-nél nagyobb pontosságú modelleket.

Klinikai paraméterek	Eredmények	Pontosság
Cukorbetegség COPD nélkül	$15,68 \leq$ teljes afukozilált $< -15,16$ vagy $-15,16 \leq$ teljes afukozilált és $19,01 \leq$ teljes terminálisan galaktozilált és teljes szialilált $< 13,29$ vagy $-15,16 \leq$ teljes afukozilált és $-24,16 \leq$ teljes terminális galaktozilált $< -23,08$	0,87
Cukorbetegség érelmeszesedéssel	teljes afukozilált $\geq 30,45$ vagy $-12,58 \leq$ teljes afukozilált $< -12,23$ vagy teljes afukozilált $< -12,58$ és teljes szialilált $\geq -6,39$	0,93
Cukorbetegség érelmeszesedés nélkül	teljes afukozilált ≥ -16 és $-12,37 \leq$ teljes terminális galaktozilált $< -12,085$ vagy teljes afukozilált ≥ -16 és teljes terminális galaktozilált $\geq 19,01$ és teljes szialilált $< 13,29$	0,88
Cukorbeteg dohányos	teljes afukozilált $< -15,16$ és semleges $< 5,25$ vagy teljes afukozilált $\geq -15,16$ és $-12,37 \leq$ teljes terminális galaktozilált $< -12,09$	0,90

Klinikai paraméterek	Eredmények	Pontosság
Dohányzásról leszokott cukorbeteg	30,45=<teljes afukozilált vagy -18,60 < teljes afukozilált < 10,14 és -36,74 =< teljes szialilált és -24,16 =<teljes terminális galaktozilált <-23,17 vagy 10,14 =< teljes afukozilált < 10,35 és -36,74 =< teljes szialilált vagy 10,35 =< teljes afukozilált és -36,74 =< teljes szialilált és teljes terminális galaktozilált < -2,24	0,87
Dohányzásról leszokott, tumor progresszióval	3,97 =< teljes afukozilált < 4,46 vagy teljes afukozilált < 3,97 és -25,70 =< teljes terminális galaktozilált < -25,21	0,89
Cukorbeteg tumor regresszió nélkül	semleges < 2,52 és teljes terminális galaktozilált< -10,73 és teljes afukozilált <-0,26 vagy semleges < 2,52 és teljes terminális galaktozilált>= -10,73 és teljes afukozilált <-15,28 vagy -1,04 =< teljes afukozilált< -0,26 és teljes terminális galaktozilált >= -10,73 és semleges< 2,52	0,91
Cukorbeteg, tumor progresszióval	semleges < 2,52 és teljes terminális galaktozilált< -10,73 és teljes afukozilált <-0,26 vagy semleges < 2,52 és teljes terminális galaktozilált>= -10,73 és teljes afukozilált <-15,28 vagy -1,04 =< teljes afukozilált< -0,26 és teljes terminális galaktozilált >= -10,73 és semleges< 2,52	0,92
Nő tumor regresszióval	teljes afukozilált>= -18,61 és 3,60 =< semleges< 3,73 vagy -18,61 =< teljes afukozilált< -7,48 és semleges< 3,60 és teljes szialilált >=-11,64 és teljes terminális galaktozilált >=6,49 vagy -7,48 =< teljes afukozilált és semleges< 3,60 és -11,64 =< teljes szialilált <0,13 és teljes terminális galaktozilált >=6,49 vagy -7,48 =< teljes afukozilált és -2,35=<semleges< -2,03 és 0,13 =< teljes szialilált és teljes terminális galaktozilált >=6,49	0,86
Nő tumor progresszióval	teljes terminális galaktozilált >= -33,22 és semleges <-1,27 és teljes szialilált <6,60	0,97
Nő stagnáló tumorral	-6,18=<teljes afukozilált <-6,10 vagy teljes afukozilált> =-0,03 és -1,81=<semleges< -1,58 vagy -0,21=< teljes afukozilált<-0,03 vagy teljes afukozilált> =-0,03 és semleges< -1,81 és 20,97=<teljes szialilált <22,34	0,88
Stagnáló tumor COPD nélkül	teljes afukozilált <-21,66 vagy teljes terminális galaktozilált <34,83 és 2,69 =< teljes afukozilált< 3,97 vagy teljes terminális galaktozilált <-15,51 és -21,66 =< teljes afukozilált< 2,69	0,88

12. táblázat: A klinikai tulajdonságok és az N-glikán szerkezetsoportok relatív csúcs alatti területének megváltozása közötti kapcsolatok, a döntési fa vizsgálatának eredménye. Az egyes modellekhez tartozó pontosság a harmadik oszlopban van feltüntetve.

A cukorbeteg tüdőrákos betegek esetén, akiknél nem alakult ki COPD, a kemoterápia hatására több glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe is megváltozott úgy, mint a teljes afukozilált, a teljes terminális galaktozilált és a teljes szialilált:

- 1) a teljes afukozilált csoport csúcs alatti területe minimum 15,68%-ot nöött vagy minimum 15,16%-ot csökkent;
- 2) a teljes afukozilált nem csökkent nagyobb mértékben, mint 15,16%, miközben a teljes terminális galaktozilált csoport csúcs alatti területe minimum 19,01%-ot nöött és a teljes szialilált csoport csúcs alatti területe nem nöött 13,29%-nál nagyobb mértékben;
- 3) a teljes afukozilált csoport csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 15,16% és a teljes terminális galaktozilált csoport csúcs alatti területe 24,16 és 23,08% közötti értékkel csökkent, a modell pontossága 0,87.

A cukorbetegség érlemeszesedéssel befolyással volt a kemoterápia után a teljes afukozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területének legalább 30,45%-kal történő megnövekedésére vagy 12,58 és 12,23% közötti csökkenésére vagy nem csökkent 12,58%-nál nagyobb mértékben, ami mellett a teljes szialilált alcsoport mennyisége nem csökkent 6,39%-nál nagyobb mértékben (a modell pontossága:0,93). Azonban amikor a cukorbetegség mellé nem társult érlemeszesedés, a kemoterápia hatására a teljes afukozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe nem csökkent 16%-nál nagyobb mértékben, miközben a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe 12,37 és 12,09% közötti értékkel csökkent vagy minimum 19,01%-kal nöött, mialatt a teljes szialilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe nem nöött 13,29%-nál nagyobb mértékben, a modell pontossága 0,88. Cukorbeteg dohányzó tüdőrákos betegek esetén a kemoterápia hatására a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe 15,16%-nál nagyobb mértékben csökkent, és a semleges glikán alcsoport csúcs alatti területe nem növekedett 5,25%-nál nagyobb mértékben, azonban mikor a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 15,16%, akkor a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport területe 12,37-12,09%-kal csökkent, a modell pontossága 0,9. Azoknál a cukorbeteg tüdőrákos betegeknél, akik leszoktak a dohányzásról a glikán alcsoportok csúcs alatti területeinek változásai következőképpen alakultak:

- 1) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe legalább 30,45%-kal nőtt;
- 2) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe kevesebb, mint 18,60%-kal csökkent vagy 10,14%-nál kevesebbet nőtt, a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területe maximum 36,74%-ot csökkent és a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport 23,17 és 24,16% között csökkent;
- 3) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe 10,14 és 10,35% közötti értékkel nőtt, és a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 36,74%
- 4) a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területének változása megegyezik a harmadik esettel, míg a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe minimum 10,35%-kal nőtt és a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe minimum 2,24%-ot csökkent, a modell pontossága 0,87.

A diabéteszes tüdőrákos betegek esetén egyedi glikán változások léptek fel, mind a progresszió (a modell pontossága 0,92) mind a regresszió nélküli (a modell pontossága 0,91) betegek esetén a kemoterápiás kezelés után: a semleges glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe nem nőtt 2,52%-nál nagyobb mértékben, és emellett változott a teljes terminális galaktozilált és a teljes afukozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe:

- 1) a teljes terminális galaktozilált és a teljes afukozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe is 10,73%-nál, illetve 0,26%-nál nagyobb mértékben csökkent;
- 2) a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 10,73%, miközben a teljes afukozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti terület 15,28%-nál nagyobb mértékben vagy 0,26-1,04% között csökkent, a modell pontossága 0,92 és 0,91.

A női tüdőrákos betegek esetén a glikán alcsoportok csúcs alatti területének megváltozása jól definiálható mind a három kezelési kimenetel esetén, regresszió (pontosság 0,86), progresszió (pontosság 0,97), stagnáló (pontosság 0,88).

A tumor regressziójánál négy eset lehetséges:

- 1) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nem csökkent 18,61%-nál nagyobb mértékben és a semleges glikán alcsoport csúcs alatti területe 3,6 és 3,73% közötti értékkel nőtt;
- 2) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe 7,48-18,61% között csökkent, a semleges glikán alcsoport mennyisége nem növekedett 3,6%-nál nagyobb mértékben, a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 11,64% és a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe minimum 6,49%-kal nőtt;
- 3) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nem csökkent 7,48%-nál nagyobb mértékben, a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területe maximum 11,64%-ot csökkent vagy maximum 0,23%-t nőtt mialatt a semleges és a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport csúcs alatti területének megváltozása megegyezett a második esettel;
- 4) a teljes afukozilált és a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoportok csúcs alatti területének változása megegyezett a harmadik eset változásaival, míg a semleges glikán szerkezetek alcsoportjának csúcs alatti területe 2,03-2,35% közötti értékkel csökkent és a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területe legalább 0,13%-kal nőtt.

Amikor a nők esetén a kemoterápia hatására progresszió lépett fel a tüdőtumor esetén a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoportok csúcs alatti területe 33,22%-nál nem csökkent nagyobb mértékben, a semleges glikán alcsoportok csúcs alatti területe minimum 1,27%-kal csökkent és a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nem növekedett 6,6%-nál nagyobb mértékben.

Abban az esetben mikor a női páciens esetén a kemoterápia nem okozott javulást, de a tumor sem fejlődött tovább (stagnált) a vérszérumból meghatározott glikán alcsoportok változásai az alábbiak voltak:

- 1) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe 6,1-6,18% vagy 0,03-0,21% között csökkent;

2) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nőtt vagy maximum 0,03%-t csökkent és a semleges glikán alcsoport csúcs alatti területe 1,58-1,81 % között csökkent;

3) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe nem csökkent nagyobb mértékben, mint 0,03%, a semleges glikán alcsoport csúcs alatti területe minimum 1,81%-ot csökkent és a teljes szialilált glikán alcsoport csúcs alatti területének növekedése 20,97-22,34% között volt.

A COPD-vel nem diagnosztizált betegeknél a kemoterápia hatására stagnáló tumor esetén a teljes afukozilált és a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport csúcs alatti területei változtak meg:

1) a teljes afukozilált glikán alcsoport területe 21,66%-nál nagyobb mértékben csökkent

2) kevesebb mint 2,69%-ot nőtt és kevesebb mint 21,66%-t csökkent akkor a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe 15,51%-nál nagyobb mértékben csökkent

3) a teljes afukozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe 2,69% és 3,97% között nőtt, akkor a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport nem nőtt 34,83%-nál nagyobb mértékben, a modell pontossága 0,88.

A dohányzásról leszokott tüdőrákos betegek esetén, mikor a kemoterápiás kezelés után progresszió lépett fel a tumornál a teljes afukozilált glikán alcsoport csak kis mértékben nőtt meg (3,97-4,46%), illetve amikor a növekedés nem volt 3,97% vagy annál nagyobb akkor a teljes terminális galaktozilált glikán alcsoport csúcs alatti területe csökkent (25,21-25,70%).

Összefoglalva a kemoterápiás betegek szérum mintájának analízise során elért eredményeket a meghatározott modellek bizonyítják, hogy a döntési fa elemzéssel kapcsolatot lehet találni az egyes klinikai paraméterek és a fehérjékhez kötött glikán szerkezet megváltozások között.

6. Megbeszélés

6.1 N-kötött glikán szerkezetek meghatározása humán szérumban

A vérszérum vizsgálatok újfajta megközelítésébe tartoznak a glikomikai vizsgálatok. A glikoproteineken található glikán struktúrákat számos rákos és krónikus gyulladásos megbetegedés befolyásolhatja [138]. A humán vérszérum glikomikai adatai értékes források lehetnek számos rosszindulatú megbetegedés diagnosztikájának. Számos tanulmányban különféle módszerekkel analizálták a humán vérszérumban vagy plazmában található glikoproteinek glikán szerkezetét [66,88,139]. Lijuan Zhang és munkatársai összegyűjtöttek 92 glikán szerkezetet, amit humán szérumban vagy plazmában azonosítottak [139]. Saldova és mtsai. 165 N-kötött glikán szerkezetet azonosítottak kontroll humán szérum mintákban UPLC analitikai módszer segítségével [135]. Azonban ezek a szerkezetek sok esetben nem reprodukálhatóan mérhetők és/vagy drága és időigényes analitikai módszerek alkalmazását kívánják meg. PhD munkám során egészséges vérszérum mintából azonosítottam 61 aszparagin-kötött glikán szerkezetet nagy érzékenységű lézer indukált fluoreszcencia detektálással felszerelt kapilláris elektroforézissel. Az azonosított oligoszacharid szerkezetek hozzájárulhatnak újfajta glikobiomarker alapú diagnosztikai módszerek fejlesztéséhez. A komplex szérummintákból származó aszparaginhoz kötött oligoszacharidok analízise során újfajta hőmérséklet szabályozott denaturációs protokollt, valamint hosszabb enzimátikus felszabadítási és párolgási származékképzési időt alkalmaztam. Ezzel a módszerrel több, viszonylag kisebb csúcs (<1%) is reprodukálhatóan mérhető volt.

6.2 Potenciális glikobiomarkerek azonosítása a tüdőrák, a COPD és a két betegség együttes jelenlétének kimutatására

A tüdőrákos megbetegedések a mai napig nagy halálozási rátával rendelkeznek. Ehhez a kései diagnózis nagymértékben hozzájárul. A pontos diagnózist sokszor nehezíti, hogy mind a tüdőrák, mind a COPD hasonló tünetekkel jelentkeznek, amit korai stádiumban nehéz észre venni. Ráadásul a két betegség sok esetben együtt van jelen a szervezetben. Arnold és mtsai a tüdőrák azonosításához öt glikáncsúcs csoportot határoztak meg biomarkerként HPLC-vel, amelyek jelentős eltéréseket mutattak a tüdőrákos beteg és a kontroll minták között [140]. A kromatogramon ezek a csúcsok nem egy glikán szerkezetet takartak, így eltérések azonosításánál csak glikán szerkezet típusokat határoztak meg, mint például csökkenést figyeltek meg biantennáris fukozilált glikán szerkezetek esetén és növekedést állapítottak meg szialsavas, monoantennáris és a több

sziálsavat tartalmazó glikán szerkezetek esetén. A glikánepitópok lektin- vagy antitestalapú vizsgálata azonban nehézkes lehet a specifitások reprodukálhatósága vagy az alacsony affinitású kötések miatt. Pavic és munkatársai elsőként vizsgálták a glikánok megváltozását COPD betegek esetén [141]. A minták analizéséhez Hidrofil kölcsönhatású és ultra nagy teljesítményű folyadékkromatográfia összekapcsolását (HILIC-UPLC) alkalmazták. Rávilágítottak arra, hogy a COPD megbetegedés és annak előrehaladottsága összefüggésbe hozható a glikán szerkezetek megváltozásával. A PhD munkám során egészséges önkéntesektől vett szérumból minták *N*-kötött glikán profilját hasonlítottam össze tüdőrákos, COPD-s, valamint mind a két betegségben szenvedő betegektől származó szérumból mintákkal. Az analízis eredményeként meghatároztam egy glikán szerkezeteket tartalmazó panelt, amik potenciális glikobiomarkerei lehetnek a COPD-nek, a tüdőráknak és a két betegség együttes jelenlétének is. Ezenkívül az *N*-glikán alcsoportok, például a fukozilált, mono-, bi-, tri- és tetraszialilált, valamint a mono-, bi-, tri- és tetraantennás glikánok változásai szintén értékes diagnosztikai információkat hordoznak. A 2. táblázatban szereplő glikán panel és a megfelelő alcsoportok még megbízhatóbb információt nyújthatnak, mivel egy adott betegség által okozott többszörös szerkezeti változások összességét reprezentálják. Ez különösen igaz az elágazó szialilált struktúrákra, mivel a legújabb genotipizálási adatok az *N*-acetylglükózamin transzferáz (α -1,6-mannozilglikoprotein-6- β -*N*-acetylglükózamin transzferáz) aktivitásának jelentős növekedését, azaz a tüdőrákban megnövekedett elágazást jeleztek [142].

6.3 Reszekciós műtét hatásának vizsgálata a humán szérumból *N*-kötött glikán profiljának megváltozására

A humán szérumból aszparagin-kötött glikán profilja értékes információkkal szolgálhat a rosszindulatú megbetegedések, mint például a tüdőrák biomarkereinek kutatásához. Munkám során szérumból proteinek *N*-kötött glikánjainak változásait is analizáltam a tüdő tumor reszekciós műtét előtt és után. A műtét előtti és utáni minták *N*-glikánjait lézer indukált fluoreszcens detektorral felszerelt kapilláris elektroforézissel vizsgáltam. A viszonylag kis mintaszám ellenére is jelentős összefüggéseket találtam a cukor szerkezetek mennyiségének megváltozása és a diszkrét, valamint a folytonos klinikai paraméterek között. Az osztályozási fa elemzése egy olyan *N*-glikán döntési modell halmazt eredményezett, amely akár felhasználható a tüdődaganat műtéti úton történő eltávolításának nyomon követésére is. A műtét pozitív kimenetele szignifikáns korrelációt mutatott az *N*-glikánok változásával a még dohányzó és a már dohányzásról leszokott betegek esetében is, valamint mind az érlemeszedésben szenvedő mind a nem szenvedő betegek esetén is.

Mindemellett a negatív kimenetelű műtétek mind a dohányzó mind a már leszokott betegek esetében is összefüggésbe hozható bizonyos *N*-glikán struktúrák (FA2BG2S1, A2G2S(3)2, FA2[3]G1) relatív csúcs alatti területének jelentős változásával. A negatív kimenetelű reszekciós műtét - amikor a tüdőrák mellett a COPD is jelen van vagy a tüdőrák mellett érlemeszesedés nem figyelhető meg - az FA3G3S(6)3 és az FA2BG2S1 vagy az FA2BG2S2 és az FA3G3S(3)3 relatív csúcs alatti területek megváltozásával hozhatók összefüggésbe. A tüdőrák és a COPD együttes megjelenése is szignifikáns korrelációt mutat, érlemeszesedéssel vagy anélkül is, az FA4BG4S(3)4 és az FA2G2 vagy az FA2G2S1 relatív csúcs alatti területének változásával. A COPD-s tüdőrákos betegek esetében a műtét pozitív kimenetele mellett még jelentősebb növekedés figyelhető meg az FA2G2S2 relatív csúcs alatti területén. Az érlemeszesedésben nem szenvedő dohányzásról leszokott tüdőrákos betegek humán szérumának *N*-glikán profiljában a műtéti reszekció megnövelte az M9 glikán szerkezetének relatív csúcs alatti területét. A fentebb felsorolt összefüggések alapot adhatnak olyan módszerek fejlesztésére, amelyek a tüdőrákos betegek reszekciós műtétei során nyomon követhetik a kezelés hatékonyságát. A vizsgálatokat nagyobb számú mintára kiterjesztve, majd a validálást követően még megbízhatóbb és pontosabb képet kaphatunk a kezelések hatékonyságának kimeneteléről az aszparagin-kötött glikán profil ismerete által.

A klinikai paraméterek és az egyes *N*-kötött glikán struktúrák relatív csúcs alatti terület változásai közötti kapcsolat elemzése mellett az *N*-kötött glikánokból alkotott csoportok relatív csúcs alatti terület változásai és a klinikai paraméterek összefüggéseit is. Meghatároztam azokat a legjelentősebb klinikai paramétereket, amelyek a teljes afukozilált alcsoport relatív csúcs alatti területében változást okoztak a műtét előtt és után. Az érlemeszesedéssel diagnosztizált tüdőrákos betegek, akik leszoktak a dohányzásról vagy a tüdőrák mellett a COPD is jelen van a szervezetükben ugyanúgy változtatták meg mind a teljes afukozilált, mind a szialilált glikán struktúrák mennyiségét. Abban az esetben, mikor tüdőrák mellett más kísérőbetegség is kialakult, a korrelációs modellben nemcsak a szialilált glikán csoport relatív csúcs alatti terület változása, hanem a terminális galaktozilált glikán csoport mennyisége is jelentősen megváltozott. Cukorbeteg tüdőrákos betegek esetén a reszekciós műtét változást generált a terminális galaktozilált glikán alcsoport relatív csúcs alatti területében. Az 51 vizsgált diszkrét klinikai paraméter közül csak egy (dohányzó beteg pozitív kimenetelű reszekciós műtéttel) határozott meg kielégítő pontosságú modellt a semleges glikánok relatív csúcs alatti területének megváltozására.

A folytonos klinikai paraméterek *N*-glikán profilra gyakorolt hatását lineáris regressziós analízissel értékeltem, amelynek eredményeként lineáris korrelációt határoztam meg a tüdőtumor reszekciós műtét által okozott *N*-glikán változások és a folytonos klinikai paraméterek között a humán szérumban. A folytonos paraméterek között figyelembe vettem az életkort, a CRP értéket, a vércukorszintet, az elszívott cigaretta mennyiségét, a dohányzással eltöltött éveket és a betegség stádiumát. Az így azonosított összefüggések felhasználásával *N*-glikánokból álló panel állítható össze, amely segítségével meghatározhatjuk a betegség stádiumát.

6.4 A kemoterápia glikán szerkezet megváltozására gyakorolt hatásának vizsgálata döntési fa elemzés alkalmazásával

A tüdőrák kezelésének egyik leggyakoribb módszere a kemoterápiás kezelés. Azonban ennek a hatékonysága sem 100%-os, ezáltal az eredményességének növelése és figyelemmel kísérése hozzájárulhat a beteg élettartamának növeléséhez. Kutató munkám során összefüggéseket kerestem a kemoterápiás kezelésen résztvevő tüdőrákos betegek klinikai paraméterei és a kezelés hatására bekövetkező aszparagin-kötött glikomikai változások között.

Az analízis eredményeként a kemoterápia kezelésének kimenetele kellő megbízhatósággal specifikus változásokat eredményezett a vizsgált *N*-kötött glikánok között (A3G3S(3)2, FA2B[6]G1, M8, M9, FA2[6]G1S1, FA2BG2S2, FA3G3S(3)3, FA2[3]G1, A2G2S(6)1, FA4BG4S(3)4 ΔA2G2S(6)2, ΔFA2G2S2 ΔFA2[6]G1. FA2, M6) abban az esetben mikor a beteget nem diagnosztizálták COPD-vel csak tüdőrákkal. A nők esetén szintén jól modellezhető változásokat tapasztaltam a kezelés kimeneteleinek függvényében, a progresszió esetén a A3G3S(3)2 glikán szerkezet változásában, a stagnáló tumor állapot esetén pedig az FA2G2S1, FA2, M6, FA2B, M9, FA2[6]G1 és M7 cukor szerkezeteknél. A cukorbetegség jelenlétében önmagában (FA2[3]G1, FA2[6]G1, M7, FA2G2S1, M9) és COPD-vel (FA3G3S(6)3, A2G2S(3)2) vagy érelmeszesedéssel (M9, A2G2S(3)2) társulva is egyedi változások jelentek meg a vizsgált glikán struktúrák mennyiségében a kezelés hatására. A tüdőrákos betegek esetén, akiknél nem alakult ki a COPD akár leszoktak a dohányzásról (A3G3S(3)2, FA4BG4S(3)4, A2G2S(6)2, M9) akár nem, a kezelés idejére (M9, FA2BG2S2, FA3G3S(3)3, FA2[3]G1, A2G2S(6)1) meghatározott glikán szerkezetek mennyisége specifikus modell szerint változott a szérum minták analízise alapján. Az eredmények azt is megerősítették, hogy a tüdőrákos cukorbeteg kezelt pácienseknél, azonos modell volt felállítható a tumor regresszió és a tumor progresszió nélküli esetekben (FA2G2S1, FA2G2S2, FA2[3]G1, M9). Megbízható modellt találtam meg az

érelmeszesedéssel és tüdőrákkal is küzdő páciensek esetén, mikor a kezelést követően a progresszió lépett fel (A3G3S(3)2, A2G2S(6)1, FA2G2S2, A4G4S(6)2) vagy nem változik a tumor állapota (A4G4S(6)2, A3G3S(3)2, FA2B[6]G1, M8, A2BG2S1, FA2BG2S2, FA3G3S(3)3, A2G2S(6)2). Nagyobb mintaszám esetén a kapott eredmények megbízhatóságát és pontosságát tovább lehetne növelni. A PhD munkám során elért eredmények segítséget nyújthatnak olyan gyakorlati diagnosztikai módszerek fejlesztésében, amelyek nyomon követhetik a kemoterápiás kezelések hatékonyságát.

Az adott glikán szerkezetek különálló vizsgálata mellett, azt is megvizsgáltam, hogy az egyes glikán alcsoportok a kezelések hatására történő változása milyen összefüggésben vannak a betegekhez tartozó klinikai paraméterekkel. A glikán alcsoportoknál is a női kezelt betegek esetén a kemoterápia hatékonysága a felállított modellekkel jól meghatározható a kemoterápia mind három kimenetelét tekintve (regresszió, progresszió, stagnáló tumor). A cukorbetegségben szenvedő betegek esetén megbízható pontossággal határoztam meg modelleket a kezelés hatására történő változásokra számos klinikai paramétert figyelembe véve, mint például COPD diagnózis hiánya, érelmeszesedés jelenléte vagy hiánya, dohányzás vagy dohányzásról való leszokás, tumor progresszió vagy tumor regresszió hiánya. Az egyes glikán szerkezetek mennyiségének változását csoportosítva megnőtt az eredmények megbízhatósága.

Sajnos a modellek felállítása esetén a kezelés típusát nem tudtuk figyelembe venni, a kis mintaszám következtében nem értünk el megbízható eredményeket. A kemoterápiás kezelések esetén a folytonos klinikai paraméterek esetén nem találtunk megbízható regressziós összefüggéseket a meglévő adatok alapján.

7. Összefoglalás

A PhD munkám fő célkitűzése az volt, hogy elősegítse a vérszérumban lévő *N*-glikán szerkezetek kutatását és a diagnosztikai fejlesztésekben való alkalmazhatóságukat. Már számos kutatás bizonyította, hogy a rosszindulatú tumoros megbetegedések és a szervezetben fellépő gyulladások hatására specifikus glikozilációs folyamatok mennek végbe. A munkám folyamán tüdőbetegektől származó humán vérszérum minták *N*-glikánjainak analízisét végeztem el lézer indukált fluoreszcens detektorral kapcsolt kapilláris elektroforézis módszerrel. Vizsgálataim során meghatároztam 61 *N*-glikán struktúrát a humán vérszérumban. Ezek a szerkezetek adták meg azokat a glikán alcsoportokat, amelyekben potenciális glikobiomarkereket kerestem a tüdőrák, a COPD és a két betegség együttes diagnosztizálására. Az volt a célom, hogy olyan specifikus módosulásokat találjak, amelyek az adott betegségre jellemzőek. A kutatómunka eredményeként összeállítottam egy 13 *N*-kötött glikán struktúrából álló panelt, amely potenciális glikobiomarkereket tartalmaz a tüdőrák, a COPD, valamint a két betegség együttes jelenlétére a szervezetben. A legtöbb nagy mértékű változás a tüdőrák esetén volt megfigyelhető az FA4BG4[3,3,3,3]S4, FA3G3[6]S3, A2BG2S2, M3, FA2G2S2, FA2BG2S2, A2BG2S1, FA2G2S1, FA2BG2S1, A2B, és az FA2G2 glikán struktúrák esetén. Azonban a FA4BG4[3,3,3,3]S4, FA3G3[6]S3, A2BG2S2, M3, FA2BG2S2, FA2G2 glikán struktúrák mennyisége jelentősen változott a COPD kialakulásakor is. Amikor mind a két betegség együttesen volt jelen a szervezetben csak a FA3G3[6]S3, FA2G2S1, FA2G2 glikán szerkezetekben lépett fel jelentős eltérés. Az adott glikán szerkezetek különálló vizsgálata mellett megvizsgáltam azt is, hogy milyen hatással vannak a szervezetben kialakult kóros állapotok az egyes glikán csoportok megváltozására. A tüdőrák kialakulása jelentősen befolyásolja a mono- tri- és tetrasziálsavas és a mono- tri- és tetraantennáris *N*-glikán struktúrák mennyiségét. A COPD esetén kisebb mértékű változások figyelhetők meg a tüdőrákhoz képest, azonban a tetrasziálsavas, a mono- és a tetraantennáris csoportok esetén nagymértékű a növekedés.

A tüdőrák diagnosztikai módszereinek fejlesztése mellett napjainkban kiemelkedő a kezelés hatékonyságának és nyomon követhetőségének fejlődése is. Másik fő célkitűzésem volt, hogy a már diagnosztizált és kezelt betegek humán szérum mintájának vizsgálata által információt kapjak az egyes betegek klinikai paraméterei és a vérszérumban lévő *N*-glikán szerkezetek kezelés hatására történő megváltozásáról. Tüdőrákos betegek vérszérum mintáit analizáltam CE –LIF módszerrel, annak érdekében, hogy összefüggéseket találjak az egyes betegekhez tartozó klinikai

paraméterek és a kezelés hatására bekövetkező specifikus glikomikai változások között. Az adatok feldolgozásához egyedül álló módon döntési fa elemzést alkalmaztam. Az eredményeim bebizonyították, hogy a módszer alkalmas a korrelációk feltérképezésére a tüdőrákos betegek esetén. Két típusú kezelést vizsgáltam, a reszekciós műtétet és a kemoterápiát. Mind a két esetben specifikus változásokat találtam a kezelés hatására számos klinikai paraméter esetén. Ezek az összefüggések validálást követően jelentősen hozzájárulhatnak olyan módszerek fejlesztéséhez, amellyel egyszerűbbé válik mind a műtétek, mind a kemoterápiás kezelések hatékonyságának nyomon követése és esetlegesen a kezelések kimenetelének javítása az időben történő beavatkozások által. A megfelelő kezelés kiválasztása nagy szerepet játszhat a terápia hatékonyságában, ezáltal minden információ hasznos lehet, amely elősegítheti a személyre szabott terápia kiválasztását is.

8. Summary

The main goal of my thesis work was to promote the research of *N*-glycan structures in blood serum and their applicability in diagnostic developments. Numerous studies have already proven that specific glycosylation processes take place as a result of malignant transformation and inflammations. I analyzed the *N*-glycan profile of human blood serum samples from lung cancer patients using CE-LIF and determined 61 *N*-glycan structures in human blood serum. These structures provided a glycan panel, in which I searched for potential glycobiomarkers for the diagnosis of lung cancer, COPD and their comorbidity. My goal was to find specific changes that were characteristic of the given disease or disease group. As a result, a panel of 13 *N*-linked glycan structures were determined containing potential glycobiomarkers for lung cancer, COPD and their comorbidity. The most significant changes were observed in the case of lung cancer affecting the following oligosaccharides; FA4BG4[3,3,3,3]S4, FA3G3[6]S3, A2BG2S2, M3, FA2G2S2, FA2BG2S2, A2BG2S1, FA2G2S1, FA2BG2S1, A2B, and FA2G2. However, the amount of FA4BG4[3,3,3,3]S4, FA3G3[6]S3, A2BG2S2, M3, FA2BG2S2 and FA2G2 glycan structures also significantly changed in case of COPD. In case of lung cancer comorbidity with COPD the relative peak area of FA3G3[6]S3, FA2G2S1 and FA2G2 structures considerably changed. In addition to the individual examination of the specific glycan structures, I also investigated how lung cancer, COPD and their comorbidity affected the glycan subclasses. The development of lung cancer significantly altered the level of mono-, tri- and tetrasialylated as well as the mono-, tri- and tetraantennary *N*-glycan structures. In case of COPD, smaller changes could be observed compared to lung cancer, however, the tetrasialylated, mono- and tetraantennary classes had a great extent increment.

My second main goal was to reveal any correlation between changes in the *N*-glycan profile as a result of treatment and clinical parameters by examining the human serum samples of already diagnosed and treated patients. I analyzed the blood serum samples of lung cancer patients utilizing CE-LIF and applied a classification tree analysis in a novel way to process the data. My results proved that the method was suitable for mapping correlations between the changes of *N*-glycans and the clinical parameters in lung cancer patients. I analyzed two types of treatments, resection surgery and chemotherapy. In both, I found specific changes in the amount of the examined *N*-linked glycan structures as a result of the treatment in case of several clinical parameters. The specified correlations, after validation, could promote the development of a monitoring method

measuring the effectiveness of surgeries and chemotherapy treatments and possibly improving the outcome of the treatments through timely interventions. Applying the proper treatment plays an important role in effectiveness, and for selecting the right one, accurate diagnostic information is key.

9. Irodalomjegyzék

- [1] K. Strimbu, J.A. Tavel, What are biomarkers?, *Curr. Opin. HIV AIDS*. 5 (2010) 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>.
- [2] S.A. Svarovsky, Cancer Glycan Biomarkers and their Detection - Past, Present and Future, *Anal. Methods*. (2006) 323–350.
- [3] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA. Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [4] L.A. Loeb, V.L. Ernster, K.E. Warner, J. Abbotts, J. Laszlo, Smoking and Lung Cancer : An Overview1 ' 2, 44 (1984) 5940–5958.
- [5] Y. Sekido, K.M. Fong, J.D. Minna, Molecular Genetics of Lung Cancer, *Annu. Rev. Med.* 54 (2003) 73–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152202>.
- [6] S.S. Birring, M.D. Peake, Symptoms and the early diagnosis of lung cancer, *Thorax*. 60 (2005) 268 LP – 269. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.032698>.
- [7] H. Lemjabbar-Alaoui, O.U.I. Hassan, Y.W. Yang, P. Buchanan, Lung cancer: Biology and treatment options, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1856 (2015) 189–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>.
- [8] G.R. Simon, H. Wagner, Small Cell Lung Cancer*, *Chest*. 123 (2003) 259S-271S. https://doi.org/https://doi.org/10.1378/chest.123.1_suppl.259S.
- [9] F.C. Detterbeck, D.J. Boffa, L.T. Tanoue, The new lung cancer staging system, *Chest*. 136 (2009) 260–271. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0978>.
- [10] M. Reck, K.F. Rabe, Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 849–861. <https://doi.org/10.1056/nejmra1703413>.
- [11] L.M. Ofiara, A. Navasakulpong, N. Ezer, A.V. Gonzalez, The Importance of a Satisfactory Biopsy for the Diagnosis of Lung Cancer in the Era of Personalized Treatment, *Curr. Oncol.* 19 (2012) 16–23. <https://doi.org/10.3747/co.19.1062>.
- [12] T. Lu, X. Yang, Y. Huang, M. Zhao, M. Li, K. Ma, J. Yin, C. Zhan, Q. Wang, Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades, *Cancer Manag. Res.* 11 (2019) 943–953. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S187317>.
- [13] N. Duma, R. Santana-Davila, J.R. Molina, Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment, *Mayo Clin. Proc.* 94 (2019) 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>.
- [14] K. Bogos, Z. Kiss, G. Gálffy, L. Tamási, G. Ostoros, V. Müller, L. Urbán, N. Bittner, V. Sárosi, A. Vastag, Z. Polányi, Z. Nagy-Erdei, Z. Vokó, B. Nagy, K. Horváth, G. Rokszin, Z. Abonyi-Tóth, J. Moldvay, Revising incidence and mortality of lung cancer in central europe: An epidemiology review from hungary, *Front. Oncol.* 9 (2019).

<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01051>.

- [15] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2019, CA. Cancer J. Clin. 69 (2019) 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- [16] L. Jia, T. Ma, Y. Liang, H. Du, J. Shu, X. Liu, Z. Zhang, H. Yu, M. Chen, Z. Li, Alterations in serum protein glycopatterns related to small cell lung cancer, adenocarcinoma and squamous carcinoma of the lung, RSC Adv. 10 (2020) 7181–7193. <https://doi.org/10.1039/c9ra10077f>.
- [17] B. Prasad, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), Int. J. Pharm. Res. Technol. 10 (2020). <https://doi.org/10.31838/ijprt/10.01.12>.
- [18] A. Forder, R. Zhuang, V.G.P. Souza, L.J. Brockley, M.E. Pewarchuk, N. Telkar, G.L. Stewart, K. Benard, E.A. Marshall, P.P. Reis, W.L. Lam, Mechanisms Contributing to the Comorbidity of COPD and Lung Cancer, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023) 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms24032859>.
- [19] A.G.N. Agustí, A. Noguera, J. Sauleda, E. Sala, J. Pons, X. Busquets, Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease, Eur. Respir. J. 21 (2003) 347–360. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00405703>.
- [20] J.B. Soriano, G.T. Visick, H. Muellerova, N. Payvandi, A.L. Hansell, Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care, Chest. 128 (2005) 2099–2107. <https://doi.org/10.1378/chest.128.4.2099>.
- [21] P.J. Barnes, P.G.J. Burney, E.K. Silverman, B.R. Celli, J. Vestbo, J.A. Wedzicha, E.F.M. Wouters, Chronic obstructive pulmonary disease, Nat. Rev. Dis. Prim. 1 (2015) 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.76>.
- [22] James C. Hogg, Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease, Lancet. 364 (2004) 709–721.
- [23] S.K. Brode, S.C. Ling, K.R. Chapman, Alpha-1 antitrypsin deficiency: A commonly overlooked cause of lung disease, C. Can. Med. Assoc. J. 184 (2012) 1365–1371. <https://doi.org/10.1503/cmaj.111749>.
- [24] A.L. Hansell, J.A. Walk, J.B. Soriano, What do chronic obstructive pulmonary disease patients die from? A multiple cause coding analysis, Eur. Respir. J. 22 (2003) 809–814. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00031403>.
- [25] H. Osiecki, M. Gillis, Chronic obstructive pulmonary disease, J. Complement. Med. 7 (2008) 14–20. <https://doi.org/10.31838/ijprt/10.01.12>.
- [26] D. Berger, A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory, Med. Lab. Obs. 31 (1999) 28–30, 32, 34–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162198>.
- [27] V.M. Mathew J, Sankar P, Physiology, Blood Plasma, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/#!po=96.4286>.
- [28] Anatomy & Physiology, 2017. <https://doi.org/10.5399/osu/1116>.
- [29] J.T. Busher, Serum Albumin and Globulin, Clin. Methods Hist. Phys. Lab. Exam. (1990).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250048>.

- [30] L.R. Ruhaak, S. Miyamoto, C.B. Lebrilla, Developments in the identification of glycan biomarkers for the detection of cancer, *Mol. Cell. Proteomics*. 12 (2013) 846–855. <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.026799>.
- [31] G.A. Turner, N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins, *Clin. Chim. Acta*. 208 (1992) 149–171. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(92\)90073-Y](https://doi.org/10.1016/0009-8981(92)90073-Y).
- [32] O. Gornik, G. Lauc, Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases, *Dis. Markers*. 25 (2008) 267–278. <https://doi.org/10.1155/2008/493289>.
- [33] M.C. Bordas, N.S. Serbource-Goguel, J.M. Feger, J.M. Maccario, J.M. Agneray, G.M. Durand, Evaluation of the degree of desialylation of serum α 1-acid glycoprotein and α 1-antitrypsin, *Clin. Chim. Acta*. 125 (1982) 311–318. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90262-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90262-5).
- [34] N. Serbource-Goguel, M. Corbic, S. Erlinger, G. Durand, J. Agneray, J. Feger, Measurement of Serum α 1-Acid Glycoprotein and α 1-Antitrypsin Desialylation in Liver Disease, *Hepatology*. 3 (1983) 356–359. <https://doi.org/10.1002/hep.1840030313>.
- [35] N. Serbource-Goguel Seta, G. Durand, M. Corbic, J. Agneray, J. Feger, Alterations in relative proportions of microheterogenous forms of human α 1-acid glycoprotein in liver disease, *J. Hepatol*. 2 (1986) 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(86\)80083-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(86)80083-6).
- [36] M. Jezequel, N.S. Seta, M.M. Corbic, J.M. Feger, G.M. Durand, Modifications of Concanavalin A patterns of α 1-acid glycoprotein and α 2-HS glycoprotein in alcoholic liver disease, *Clin. Chim. Acta*. 176 (1988) 49–57. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(88\)90173-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(88)90173-8).
- [37] D. Biou, P. Chanton, D. Konan, N. Seta, H. N’Guyen, J. Feger, G. Durand, Microheterogeneity of the carbohydrate moiety of human α 1-acid glycoprotein in two benign liver diseases: Alcoholic cirrhosis and acute hepatitis, *Clin. Chim. Acta*. 186 (1989) 59–66. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90204-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90204-0).
- [38] A. Mackiewicz, R. Marcinkowska-Pieta, S. Ballou, S. Mackiewicz, I. Kushner, Microheterogeneity of α 1-acid glycoprotein in the detection of intercurrent infection in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*. 30 (1987) 513–518. <https://doi.org/10.1002/art.1780300505>.
- [39] N. Biomedical, 668 (1981) 235–245 ©, 668 (1981) 235–245.
- [40] S.K. Moule, M. Peak, S. Thompson, G.A. Turner, Studies of the sialylation and microheterogeneity of human serum α 1-acid glycoprotein in health and disease, *Clin. Chim. Acta*. 166 (1987) 177–185. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(87\)90420-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(87)90420-7).
- [41] T. Pawłowski, A. Mackiewicz, Minor microheterogeneity of α 1-acid glycoprotein in rheumatoid arthritis, *Prog. Clin. Biol. Res*. 300 (1989) 223–226.
- [42] J. Bones, S. Mittermayr, N. O’Donoghue, A. Guttman, P.M. Rudd, Ultra performance liquid chromatographic profiling of serum N-glycans for fast and efficient identification of cancer associated alterations in glycosylation, *Anal. Chem*. 82 (2010) 10208–10215.

<https://doi.org/10.1021/ac102860w>.

- [43] R.B. Parekh, R.A. Dwek, B.J. Sutton, D.L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T.W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG., *Nature*. 316 (1985) 452–457. <https://doi.org/10.1038/316452a0>.
- [44] J.M. Pekelharing, E. Hepp, J.P. Kamerling, G.J. Gerwig, B. Leijnse, Alterations in carbohydrate composition of serum IgG from patients with rheumatoid arthritis and from pregnant women., *Ann. Rheum. Dis.* 47 (1988) 91–95. <https://doi.org/10.1136/ard.47.2.91>.
- [45] M. Tomana, R.E. Schrohenloher, W.J. Koopman, G.S. Alarcón, W.A. Paul, Abnormal glycosylation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases., *Arthritis Rheum.* 31 (1988) 333–338. <https://doi.org/10.1002/art.1780310304>.
- [46] R. Parekh, D. Isenberg, B. Ansell, I. Roitt, R. Dwek, T. Rademacher, GALACTOSYLATION OF IgG ASSOCIATED OLIGOSACCHARIDES: REDUCTION IN PATIENTS WITH ADULT AND JUVENILE ONSET RHEUMATOID ARTHRITIS AND RELATION TO DISEASE ACTIVITY, *Lancet*. 331 (1988) 966–969. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)91781-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)91781-3).
- [47] S. Thompson, C.A. Kelly, I.D. Griffiths, G.A. Turner, Abnormally-fucosylated serum haptoglobins in patients with inflammatory joint disease, *Clin. Chim. Acta.* 184 (1989) 251–258. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90058-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90058-2).
- [48] S. Thompson, C.O. Record, G.A. Turner, Studies of lotus-extracted haptoglobin in inflammatory bowel disease., *Biochem. Soc. Trans.* 19 (1991) 264S. <https://doi.org/10.1042/bst019264s>.
- [49] H. Stibler, Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed., *Clin. Chem.* 37 (1991) 2029–2037.
- [50] E. Lattová, J. Skříčková, J. Hausnerová, L. Frola, L. Křen, I. Ihnatová, Z. Zdráhal, J. Bryant, M. Popovič, N-Glycan profiling of lung adenocarcinoma in patients at different stages of disease, *Mod. Pathol.* 33 (2020) 1146–1156. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0441-3>.
- [51] A.C. Mann, S. Thompson, C.O. Record, C.H. Self, G.A. Turner, Monosaccharide composition of haptoglobin purified from alcoholic cirrhotic and control sera determined by HPAE, *Biochem. Soc. Trans.* 21 (1993) 2423. <https://doi.org/10.1042/bst021214s>.
- [52] S. Zhang, S. Shang, W. Li, X. Qin, Y. Liu, Insights on N-glycosylation of human haptoglobin and its association with cancers, *Glycobiology*. 26 (2016) 684–692. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww016>.
- [53] S. Thompson, B.M. Cantwell, C. Cornell, G.A. Turner, Abnormally-fucosylated haptoglobin: a cancer marker for tumour burden but not gross liver metastasis., *Br. J. Cancer*. 64 (1991) 386–390. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.314>.
- [54] S. Thompson, G.A. Turner, Elevated levels of abnormally-fucosylated haptoglobins in cancer sera., *Br. J. Cancer*. 56 (1987) 605–610. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.249>.
- [55] K. Yamashita, N. Koide, T. Endo, Y. Iwaki, A. Kobata, Altered glycosylation of serum

- transferrin of patients with hepatocellular carcinoma., *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 2415–2423.
- [56] K. Matsumoto, Y. Maeda, S. Kato, H. Yuki, Alteration of asparagine-linked glycosylation in serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma., *Clin. Chim. Acta.* 224 (1994) 1–8. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)90115-5).
 - [57] L. Sturiale, R. Barone, A. Fiumara, M. Perez, M. Zaffanello, G. Sorge, L. Pavone, S. Tortorelli, J.F. O'Brien, J. Jaeken, D. Garozzo, Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia., *Glycobiology.* 15 (2005) 1268–1276. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj021>.
 - [58] M. Edwards, F. McKenzie, S. O'callaghan, D. Somerset, P. Woodford, J. Spilsbury, M. Fietz, J. Fletcher, Prenatal diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia) by cordocentesis and transferrin isoelectric focussing of serum of a 27-week fetus with non-immune hydrops., *Prenat. Diagn.* 26 (2006) 985–988. <https://doi.org/10.1002/pd.1543>.
 - [59] T. Arndt, R. Hackler, T. Müller, T.O. Kleine, A.M. Gressner, Increased serum concentration of carbohydrate-deficient transferrin in patients with combined pancreas and kidney transplantation., *Clin. Chem.* 43 (1997) 344–351.
 - [60] S.W. Stites, M.E. Nelson, L.J. Wesselius, Transferrin concentrations in serum and lower respiratory tract fluid of mechanically ventilated patients with COPD or ARDS., *Chest.* 107 (1995) 1681–1685. <https://doi.org/10.1378/chest.107.6.1681>.
 - [61] H. Stibler, S. Borg, Evidence of a Reduced Sialic Acid Content in Serum Transferrin in Male Alcoholics, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 5 (1981) 545–549. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1981.tb05358.x>.
 - [62] H. Stibler, S. Borg, Carbohydrate Composition of Serum Transferrin in Alcoholic Patients, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10 (1986) 61–64. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1986.tb05616.x>.
 - [63] B. Campion, D. Léger, J.M. Wieruszeski, J. Montreuil, G. Spik, Presence of fucosylated triantennary, tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by the human hepatocarcinoma cell line Hep G2., *Eur. J. Biochem.* 184 (1989) 405–413. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15032.x>.
 - [64] L.R. Ruhaak, C. Stroble, J. Dai, M. Barnett, A. Taguchi, G.E. Goodman, S. Miyamoto, D. Gandara, Z. Feng, C.B. Lebrilla, S. Hanash, Serum glycans as risk markers for non-small cell lung cancer, *Cancer Prev. Res.* 9 (2016). <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0033>.
 - [65] A. Kirwan, M. Utratna, M.E. O'Dwyer, L. Joshi, M. Kilcoyne, Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/490531>.
 - [66] T. Matsumoto, S. Hatakeyama, T. Yoneyama, Y. Tobisawa, Y. Ishibashi, H. Yamamoto, T. Yoneyama, Y. Hashimoto, H. Ito, S.I. Nishimura, C. Ohyama, Serum N-glycan profiling is a potential biomarker for castration-resistant prostate cancer, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53384-y>.

- [67] R. Wang, Y. Liu, C. Wang, H. Li, X. Liu, L. Cheng, Y. Zhou, Comparison of the methods for profiling: N -glycans - Hepatocellular carcinoma serum glycomics study, *RSC Adv.* 8 (2018) 26116–26123. <https://doi.org/10.1039/c8ra02542h>.
- [68] E.F. Patz, M.J. Campa, E.B. Gottlin, I. Kusmartseva, R.G. Xiang, J.E. Herndon, Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 5578–5583. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.5392>.
- [69] L. Royle, M.P. Campbell, C.M. Radcliffe, D.M. White, D.J. Harvey, J.L. Abrahams, Y.G. Kim, G.W. Henry, N.A. Shadick, M.E. Weinblatt, D.M. Lee, P.M. Rudd, R.A. Dwek, HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software, *Anal. Biochem.* 376 (2008) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.12.012>.
- [70] R.E. Banks, M.J. Dunn, D.F. Hochstrasser, J.C. Sanchez, W. Blackstock, D.J. Pappin, P.J. Selby, Proteomics: New perspectives, new biomedical opportunities, *Lancet.* 356 (2000) 1749–1756. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03214-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03214-1).
- [71] A. Varki, G. Research, T. Center, Biological Roles of Glycans *Glycobiology Advance Access Downloaded from, Glycobiology.* (2016) 3–49. <http://glycob.oxfordjournals.org/>.
- [72] A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar, P.H. Seeberger, eds., No Title, Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- [73] J. Szeberényi, *Molekuláris sejtbológia*, (n.d.).
- [74] S.H. Shakin-Eshleman, S.L. Spitalnik, L. Kasturi, The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6363–6366. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6363>.
- [75] S. Wopereis, D.J. Lefeber, É. Morava, R.A. Wevers, Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A review, *Clin. Chem.* 52 (2006) 574–600. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.063040>.
- [76] R.K.T. Kam, T.C.W. Poon, The potentials of glycomics in biomarker discovery, *Clin. Proteomics.* 4 (2008) 67–79. <https://doi.org/10.1007/s12014-008-9017-9>.
- [77] H. Haider Khan, B. Shi, Y. Tian, T. Wang, S. Hussain, F. Ullah Khan, Z. Khan, B. Ashfaq, H. Ahmad, T. Ahmad, Glycan regulation in cancer, nervous and immune system: A narrative review, *Biomed. Res. Ther.* 6 (2019) 3113–3120. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i4.536>.
- [78] M.N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J.L. Abrahams, N.H. Packer, Cell surface protein glycosylation in cancer, *Proteomics.* 14 (2014) 525–546. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300387>.
- [79] G. Sozzi, M. Boeri, Potential biomarkers for lung cancer screening, *Transl. Lung Cancer Res.* 3 (2014) 139–148. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.06.04>.
- [80] K.A. Ruiz-Ceja, Y.I. Chirino, Current FDA-approved treatments for non-small cell lung cancer and potential biomarkers for its detection, *Biomed. Pharmacother.* 90 (2017) 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.018>.

- [81] S. V. Glavey, D. Huynh, M.R. Reagan, S. Manier, M. Moschetta, Y. Kawano, A.M. Roccaro, I.M. Ghobrial, L. Joshi, M.E. O'Dwyer, The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis, *Blood Rev.* 29 (2015) 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.01.003>.
- [82] Y. Liang, T. Ma, A. Thakur, H. Yu, L. Gao, P. Shi, X. Li, H. Ren, L. Jia, S. Zhang, Z. Li, M. Chen, Differentially expressed glycosylated patterns of α -1-antitrypsin as serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer, *Glycobiology*. 25 (2014) 331–340. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu115>.
- [83] G. Lu, C.L. Crieffeld, S. Gattu, L.M. Veltri, L.A. Holland, Capillary Electrophoresis Separations of Glycans, *Chem. Rev.* 118 (2018) 7867–7885. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00669>.
- [84] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Capillary Zone Electrophoresis, *J. Chromatogr. Libr.* 30 (1985) 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)60829-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60829-5).
- [85] F.A. Guttman, A. Chen, R.A. Evangelista, N. Cooke, High-Resolution Capillary Gel Electrophoresis of Reducing Oligosaccharides Labeled, 242 (1996) 234–242.
- [86] C. Chiesa, C. Horváth, Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides derivatized with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, *J. Chromatogr. A.* 645 (1993) 337–352. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83394-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83394-8).
- [87] L. Kim, M.S. Tsao, Tumour tissue sampling for lung cancer management in the era of personalized therapy: What is good enough for molecular testing?, *Eur. Respir. J.* 44 (2014) 1011–1022. <https://doi.org/10.1183/09031936.00197013>.
- [88] F. Clerc, K.R. Reiding, B.C. Jansen, G.S.M. Kammeijer, A. Bondt, M. Wuhrer, Human plasma protein N-glycosylation, *Glycoconj. J.* 33 (2016) 309–343. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9626-2>.
- [89] B. Mészáros, G. Járvas, A. Farkas, M. Szigeti, Z. Kovács, R. Kun, M. Szabó, E. Csánky, A. Guttman, Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD and their comorbidity using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1137 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121913>.
- [90] E. Gebri, Z. Kovács, B. Mészáros, F. Tóth, Á. Simon, H. Jankovics, F. Vonderviszt, A. Kiss, A. Guttman, T. Hortobágyi, N-Glycosylation Alteration of Serum and Salivary Immunoglobulin A Is a Possible Biomarker in Oral Mucositis, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 1747. <https://doi.org/10.3390/jcm9061747>.
- [91] B. Meszaros, Z. Kovacs, E. Gebri, H. Jankovics, F. Vonderviszt, A. Kiss, A. Simon, S. Botka, T. Hortobagyi, A. Guttman, N-glycomic analysis of z(Iga1) partitioned serum and salivary immunoglobulin a by capillary electrophoresis, *Curr. Mol. Med.* 20 (2020). <https://doi.org/10.2174/1566524020666200413114151>.
- [92] B. Donczo, A. Guttman, Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 155 (2018) 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.065>.
- [93] A. Guttman, K.W. Ulfelder, Exoglycosidase matrix-mediated sequencing of a complex

- glycan pool by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 781 (1997) 547–554. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00724-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00724-3).
- [94] L. Royle, C.M. Radcliffe, R.A. Dwek, P.M. Rudd, Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions., *Methods Mol. Biol.* 347 (2006) 125–143. <https://doi.org/10.1385/1-59745-167-3:125>.
- [95] A.S.A.B. Simmons, S.G. Chappell, *Artificial Intelligence-Definition and Practice*, 13 (1988) 14–42.
- [96] Y. Gao, R. Zhou, Q. Lyu, Multiomics and machine learning in lung cancer prognosis, *J. Thorac. Dis.* 12 (2020) 4531–4535. <https://doi.org/10.21037/jtd-2019-itm-013>.
- [97] F. Jiang, Y. Jiang, H. Zhi, Y. Dong, H. Li, S. Ma, Y. Wang, Q. Dong, H. Shen, Y. Wang, Artificial intelligence in healthcare: Past, present and future, *Stroke Vasc. Neurol.* 2 (2017) 230–243. <https://doi.org/10.1136/svn-2017-000101>.
- [98] H.J.W.L. Aerts, E.R. Velazquez, R.T.H. Leijenaar, C. Parmar, P. Grossmann, S. Cavalho, J. Bussink, R. Monshouwer, B. Haibe-Kains, D. Rietveld, F. Hoebers, M.M. Rietbergen, C.R. Leemans, A. Dekker, J. Quackenbush, R.J. Gillies, P. Lambin, Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach, *Nat. Commun.* 5 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms5006>.
- [99] K. Jayasurya, G. Fung, S. Yu, C. Dehing-Oberije, D. De Ruyscher, A. Hope, W. De Neve, Y. Lievens, P. Lambin, A.L.A.J. Dekker, Comparison of Bayesian network and support vector machine models for two-year survival prediction in lung cancer patients treated with radiotherapy, *Med. Phys.* 37 (2010) 1400–1407. <https://doi.org/10.1118/1.3352709>.
- [100] T. Sun, J. Wang, X. Li, P. Lv, F. Liu, Y. Luo, Q. Gao, H. Zhu, X. Guo, Comparative evaluation of support vector machines for computer aided diagnosis of lung cancer in CT based on a multi-dimensional data set, *Comput. Methods Programs Biomed.* 111 (2013) 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2013.04.016>.
- [101] S.H. Hyun, M.S. Ahn, Y.W. Koh, S.J. Lee, A Machine-Learning Approach Using PET-Based Radiomics to Predict the Histological Subtypes of Lung Cancer, *Clin. Nucl. Med.* 44 (2019) 956–960. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002810>.
- [102] C. Yoo, L. Ramirez, J. Liuzzi, Big data analysis using modern statistical and machine learning methods in medicine, *Int. Neurourol. J.* 18 (2014) 50–57. <https://doi.org/10.5213/inj.2014.18.2.50>.
- [103] Y. Xie, W.Y. Meng, R.Z. Li, Y.W. Wang, X. Qian, C. Chan, Z.F. Yu, X.X. Fan, H.D. Pan, C. Xie, Q.B. Wu, P.Y. Yan, L. Liu, Y.J. Tang, X.J. Yao, M.F. Wang, E.L.H. Leung, Early lung cancer diagnostic biomarker discovery by machine learning methods, *Transl. Oncol.* 14 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100907>.
- [104] H. Hwang, H.K. Jeong, H.K. Lee, G.W. Park, J.Y. Lee, S.Y. Lee, Y.M. Kang, H.J. An, J.G. Kang, J.H. Ko, J.Y. Kim, J.S. Yoo, Machine Learning Classifies Core and Outer Fucosylation of N-Glycoproteins Using Mass Spectrometry, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57274-1>.

- [105] T. Matsubara, T. Ochiai, M. Hayashida, T. Akutsu, J.C. Nacher, Convolutional neural network approach to lung cancer classification integrating protein interaction network and gene expression profiles, *J. Bioinform. Comput. Biol.* 17 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1142/S0219720019400079>.
- [106] N. Emaminejad, W. Qian, Y. Guan, M. Tan, Y. Qiu, H. Liu, B. Zheng, Fusion of Quantitative Image and Genomic Biomarkers to Improve Prognosis Assessment of Early Stage Lung Cancer Patients, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 63 (2016) 1034–1043. <https://doi.org/10.1109/TBME.2015.2477688>.
- [107] Bracaglia, 乳鼠心肌提取 HHS Public Access, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.10.014>.Association.
- [108] W.T. Liu, Y. Wang, J. Zhang, F. Ye, X.H. Huang, B. Li, Q.Y. He, A novel strategy of integrated microarray analysis identifies CENPA, CDK1 and CDC20 as a cluster of diagnostic biomarkers in lung adenocarcinoma, *Cancer Lett.* 425 (2018) 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.043>.
- [109] D.D. Wang, W. Zhou, H. Yan, M. Wong, V. Lee, Personalized prediction of EGFR mutation-induced drug resistance in lung cancer, *Sci. Rep.* 3 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep02855>.
- [110] V. Malik, S. Dutta, Y. Kalakoti, D. Sundar, Multi-omics Integration based Predictive Model for Survival Prediction of Lung Adenocarcinoma, 2019 Grace Hopper Celebr. India, GHCI 2019. (2019). <https://doi.org/10.1109/GHCI47972.2019.9071831>.
- [111] T.Y. Lee, K.Y. Huang, C.H. Chuang, C.Y. Lee, T.H. Chang, Incorporating deep learning and multi-omics autoencoding for analysis of lung adenocarcinoma prognostication, *Comput. Biol. Chem.* 87 (2020) 107277. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107277>.
- [112] K.H. Yu, G.J. Berry, D.L. Rubin, C. Ré, R.B. Altman, M. Snyder, Association of Omics Features with Histopathology Patterns in Lung Adenocarcinoma, *Cell Syst.* 5 (2017) 620–627.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.10.014>.
- [113] T.T. Giang, T.T. Giang, T.P. Nguyen, T.P. Nguyen, D.H. Tran, Stratifying patients using fast multiple kernel learning framework: Case studies of Alzheimer’s disease and cancers, *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 20 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12911-020-01140-y>.
- [114] T. Zhong, M. Wu, S. Ma, Examination of independent prognostic power of gene expressions and histopathological imaging features in cancer, *Cancers (Basel)*. 11 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers11030361>.
- [115] A. Sharma, Machine Learning 101: Decision Tree Algorithm for Classification, *Data Sci. Blogathon.* (2021). <https://www.analyticsvidhya.com/blog/2021/02/machine-learning-101-decision-tree-algorithm-for-classification/>.
- [116] M. Banerjee, E. Reynolds, H.B. Andersson, B.K. Nallamotheu, Tree-based analysis: A practical approach to create clinical decision-making tools, *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes.* 12 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.118.004879>.

- [117] Y.Y. Song, Y. Lu, Decision tree methods: applications for classification and prediction, *Shanghai Arch. Psychiatry*. 27 (2015) 130–135. <https://doi.org/10.11919/j.issn.1002-0829.215044>.
- [118] S.Y. Yang, X.Y. Xiao, W.G. Zhang, L.J. Zhang, W. Zhang, B. Zhou, G. Chen, D.C. He, Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer, *BMC Cancer*. 5 (2005) 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-83>.
- [119] T.W. Kim, D.H. Koh, C.Y. Park, Decision tree of occupational lung cancer using classification and regression analysis, *Saf. Health Work*. 1 (2010) 140–148. <https://doi.org/10.5491/SHAW.2010.1.2.140>.
- [120] C. Váradi, C. Lew, A. Guttman, Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies, *Anal. Chem*. 86 (2014) 5682–5687. <https://doi.org/10.1021/ac501573g>.
- [121] M. Szigeti, A. Guttman, Automated N-Glycosylation Sequencing of Biopharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11493-6>.
- [122] B. Reider, M. Szigeti, A. Guttman, Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination, *Talanta*. 185 (2018) 365–369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.101>.
- [123] S. Mittermayr, A. Guttman, Influence of molecular configuration and conformation on the electromigration of oligosaccharides in narrow bore capillaries, *Electrophoresis*. 33 (2012) 1000–1007. <https://doi.org/10.1002/elps.201100681>.
- [124] E. Kováts, Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone, *Helv. Chim. Acta*. 41 (1958) 1915–1932. <https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>.
- [125] D. Kolarich, A. Weber, P.L. Turecek, H.P. Schwarz, F. Altmann, Comprehensive glyco-proteomic analysis of human α 1- antitrypsin and its charge isoforms, *Proteomics*. 6 (2006) 3369–3380. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500751>.
- [126] H. Yin, M. An, P. kin So, M.Y.M. Wong, D.M. Lubman, Z. Yao, The analysis of alpha-1-antitrypsin glycosylation with direct LC-MS/MS, *Electrophoresis*. 39 (2018) 2351–2361. <https://doi.org/10.1002/elps.201700426>.
- [127] A. Bondt, S. Nicolardi, B.C. Jansen, T.M. Kuijper, J.M.W. Hazes, Y.E.M. van der Burgt, M. Wuhler, R.J.E.M. Dolhain, IgA N- and O-glycosylation profiling reveals no association with the pregnancy-related improvement in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 19 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1367-0>.
- [128] A. Bondt, S. Nicolardi, B.C. Jansen, K. Stavenhagen, D. Blank, G.S.M. Kammeijer, R.P. Kozak, D.L. Fernandes, P.J. Hensbergen, J.M.W. Hazes, Y.E.M. Van Der Burgt, R.J.E.M. Dolhain, M. Wuhler, Longitudinal monitoring of immunoglobulin A glycosylation during pregnancy by simultaneous MALDI-FTICR-MS analysis of N-and O-glycopeptides, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep27955>.
- [129] C. Váradi, S. Mittermayr, Á. Szekrényes, J. Kádas, L. Takacs, I. Kurucz, A. Guttman,

Analysis of haptoglobin N-glycome alterations in inflammatory and malignant lung diseases by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 34 (2013) 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/elps.201300041>.

- [130] T. Fujimura, Y. Shinohara, B. Tissot, P.C. Pang, M. Kurogochi, S. Saito, Y. Arai, M. Sadilek, K. Murayama, A. Dell, S.I. Nishimura, S.I. Hakomori, Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate disease or normal subjects, *Int. J. Cancer*. 122 (2008) 39–49. <https://doi.org/10.1002/ijc.22958>.
- [131] L. Royle, A. Roos, D.J. Harvey, M.R. Wormald, D. Van Gijlswijk-Janssen, E.R.M. Redwan, I.A. Wilson, M.R. Daha, R.A. Dwek, P.M. Rudd, Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems, *J. Biol. Chem*. 278 (2003) 20140–20153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301436200>.
- [132] A. Quaranta, A. Sroka-Bartnicka, E. Tengstrand, G. Thorsén, N-Glycan profile analysis of transferrin using a microfluidic compact disc and MALDI-MS, *Anal. Bioanal. Chem*. 408 (2016) 4765–4776. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9570-4>.
- [133] J. Malhotra, M. Malvezzi, E. Negri, C. La Vecchia, P. Boffetta, Risk factors for lung cancer worldwide, *Eur. Respir. J.* 48 (2016) 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>.
- [134] D. Rajput, W.J. Wang, C.C. Chen, Evaluation of a decided sample size in machine learning applications, *BMC Bioinformatics*. 24 (2023) 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05156-9>.
- [135] R. Saldova, A. Asadi Shehni, V.D. Haakensen, I. Steinfeld, M. Hilliard, I. Kifer, Å. Helland, Z. Yakhini, A.L. Børresen-Dale, P.M. Rudd, Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC, *J. Proteome Res*. 13 (2014) 2314–2327. <https://doi.org/10.1021/pr401092y>.
- [136] K.J. Lee, S.M. Lee, J.Y. Gil, O. Kwon, J.Y. Kim, S.J. Park, H.S. Chung, D.B. Oh, N-glycan analysis of human α 1-antitrypsin produced in Chinese hamster ovary cells, *Glycoconj. J.* 30 (2013) 537–547. <https://doi.org/10.1007/s10719-012-9453-7>.
- [137] D.J. Harvey, A.H. Merry, L. Royle, M.P. Campbell, P.M. Rudd, Symbol nomenclature for representing glycan structures: Extension to cover different carbohydrate types, *Proteomics*. 11 (2011). <https://doi.org/10.1002/pmic.201100300>.
- [138] D.H. Dube, C.R. Bertozzi, Glycans in cancer and inflammation - Potential for therapeutics and diagnostics, *Nat. Rev. Drug Discov*. 4 (2005) 477–488. <https://doi.org/10.1038/nrd1751>.
- [139] Y. Lan, C. Hao, X. Zeng, Y. He, P. Zeng, Z. Guo, L. Zhang, Serum glycoprotein-derived N- and O-linked glycans as cancer biomarkers., *Am. J. Cancer Res*. 6 (2016) 2390–2415.
- [140] J.N. Arnold, R. Saldova, M.C. Galligan, T.B. Murphy, Y. Mimura-Kimura, J.E. Telford, A.K. Godwin, P.M. Rudd, Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer, *J. Proteome Res*. 10 (2011) 1755–1764. <https://doi.org/10.1021/pr101034t>.
- [141] T. Pavić, D. Dilber, D. Kifer, N. Selak, T. Keser, C.D.S. Ljubičić, A. Vukić Dugac, G. Lauc, L. Rumora, O. Gornik, N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G

in chronic obstructive pulmonary disease 11 Medical and Health Sciences 1102
Cardiorespiratory Medicine and Haematology, J. Transl. Med. 16 (2018) 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1695-0>.

- [142] Z. Elek, Z. Kovács, G. Keszler, M. Szabó, E. Csanky, J. Luo, A. Guttman, Z. Rónai, High
Throughput Multiplex SNP-analysis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung
Cancer., Curr. Mol. Med. 20 (2020) 185–193.
<https://doi.org/10.2174/1566524019666191017123446>.

10. Tárgyszavak

tüdőrák

krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD)

N-kötött glikánok

kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással (CE-LIF)

glikobiomarker

osztályozó fa analízis

lung cancer

chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

N-linked glycans

capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection (CE-LIF)

glycobiomarker

classification tree analysis

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Prof. Dr. Guttman András, a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium igazgatójának munkám során nyújtott szakmai iránymutatásáért és támogatásáért.

Köszönettel tartozom a Miskolci Semmelweis Kórház és Egyetemi Oktatókórház (MISEK) Pulmonológia Osztály munkatársainak, Dr. Csánky Eszter osztályvezető főorvos asszonynak, Dr. Szabó Miklós osztályvezető helyettes főorvos úrnak és Kun Renátának akik begyűjtötték a mintákat a kísérleteimhez és dokumentálták a betegek adatait.

Köszönetemet fejezem ki a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium munkatársainak, akik szakmai tanácsokkal segítették munkámat, kiemelten Borza Beátának, Reider Baláznak, Szigeti Mártonnak Járvás Gábornak, Kovács Zsuzsannának és Farsang Róbertnek, Farkas Annának.

A doktori értekezésem az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-19-3-I-DE-492 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program és a BIONANO_GINOP-2.3.2-15-2016-00017 projektek támogatásával készült. Köszönöm a családomnak és barátaimnak a támogatást és a megértést, melyet irányomban tanúsítottak munkám során.

12.Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/24/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mészáros Brigitta

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mészáros, B.**, Járvas, G., Farkas, A., Szigeti, M., Kovács, Z., Kun, R., Szabó, M., Csányi, E., Guttman, A.: Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD and their comorbidity using capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. B. 1137, 1-7, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121913>
IF: 3.205
2. **Mészáros, B.**, Járvas, G., Kun, R., Szabó, M., Csányi, E., Abonyi, J., Guttman, A.: Machine Learning Based Analysis of Human Serum N-glycome Alterations to Follow up Lung Tumor Surgery.
Cancers (Basel). 12 (12), 1-13, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12123700>
IF: 6.639

További közlemények

3. Farkas, A., **Mészáros, B.**, Szarka, M., Szigeti, M., Kappelmayer, J., Szabó, M., Csányi, E., Guttman, A.: Modeling of the Desialylated Human Serum N-glycome for Molecular Diagnostic Applications in Inflammatory and Malignant Lung Diseases.
Curr. Mol. Med. 20 (10), 765-772, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1566524020666200422085316>
IF: 2.222
4. **Mészáros, B.**, Kovács, Z., Gebri, E. Z., Jankovics, H., Vonderviszt, F., Kiss, A., Simon, Á., **Botka, S.**, Hortobágyi, T., Guttman, A.: N-glycomic analysis of Z(IgA1) partitioned serum and salivary immunoglobulin A by capillary electrophoresis.
Curr. Mol. Med. 20 (10), 781-788, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1566524020666200413114151>
IF: 2.222





5. Gebri, E. Z., Kovács, Z., **Mészáros, B.**, Tóth, F., Simon, Á., Jankovics, H., Vonderviszt, F., Kiss, A., Guttman, A., Hortobágyi, T.: N-Glycosylation Alteration of Serum and Salivary Immunoglobulin A Is a Possible Biomarker in Oral Mucositis.
J Clin Med. 9 (6), 1-14, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9061747>
IF: 4.241
6. **Mészáros, B.**, Járvas, G., Hajba, L., Szigeti, M., Dallos, A., Guttman, A.: Quantitative characterization of plasma treated PDMS microfluidic substrates by inverse gas chromatography.
Sens. Actuators B. Chem. 258, 1184-1190, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.185>
IF: 6.393

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,922

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,844**

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

Debrecen, 2023.01.19.

