

MTA Doktori Értekezés

**Differenciáldiagnosztikai, prognosztikai és prediktív
szöveti biomarkerek vizsgálata tüdőrákban**

Moldvay Judit

**Budapest
2019**

TARTALOMJEGYZÉK

1. ÖSSZEFOGLALÁS	3
2. SUMMARY	4
3. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
4. BEVEZETÉS	7
4.1. A tüdőrák epidemiológiája, stádiumai	7
4.2. A tüdőrák differenciáldiagnosztikai és prognosztikai markerei	9
4.3. Távoli áttétek tüdőrákban	14
4.4. Molekuláris célzott terápia tüdőrákban	18
4.5. Immunterápia tüdőrákban	25
4.6. Az onkoterápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatása	26
5. CÉLKITŰZÉSEK	29
6. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	30
6.1. Betegcsoportok	30
6.2. Peritumorális agyödéma megítélése	34
6.3. Fénymikroszkópos szövettani jellemzők vizsgálata	36
6.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok	39
6.5. mRNS vizsgálat claudin fehérjék esetében	47
6.6. EGFR státusz meghatározás	49
6.7. KRAS mutáció meghatározás	54
6.8. Teljes genom szekvenálás	55
6.9. Statisztikai próbák	56
6.10. Etikai engedélyek	58
7. EREDMÉNYEK	59
7.1. Differenciáldiagnosztikai és prognosztikai markerek vizsgálata tüdőrákban	59
7.1.1. <i>TTF-1 fehérje expresszió vizsgálata tüdőrákban [1]¹</i>	59
7.1.2. <i>Claudin fehérje expresszió tüdőrákok szövettani altípusaiban [2]</i>	60
7.1.3. <i>Claudin fehérjék prognosztikus szerepének vizsgálata tüdőrákban [3]</i>	63
7.2. Távoli áttétet adó tüdőrákok vizsgálata	66
7.2.1. <i>Távoli áttétek helyének és megjelenési idejének vizsgálata tüdő adenocarcinomában [4]</i>	66
7.2.2. <i>Agyi áttétet adó tüdőrákok klinikopatológiai jellemzőinek vizsgálata [5]</i>	72
7.2.3. <i>Protein expresszió vizsgálata primer tüdőrákokban és azok agyi áttéteiben [6]</i>	78
7.2.4. <i>Protein expresszió vizsgálata agyi áttétet adó tüdőrákok szövettani altípusaiban [7]</i>	82
7.2.5. <i>mTOR expresszió vizsgálata agyi áttétet adó tüdőrákban [8]</i>	84
7.2.6. <i>Áttétképződés genomikai vizsgálata tüdő adenocarcinomában [9]</i>	87

¹ Az irodalmi hivatkozások áttekintésének megkönnyítése érdekében a disszertáció alapját képező publikációk [1] – [23] jelöléssel kerültek feltüntetésre.

7.3.	EGFR-TKI kezelés prediktív faktorainak vizsgálata tüdőrákban	92
7.3.1.	<i>Jelentős prediktív értékű EGFR mutáció agyi áttétet adó tüdőrákban [10]</i>	92
7.3.2.	<i>EGFR mutáció, amplifikáció és protein expresszió vizsgálata tüdő adenocarcinómában [11]</i>	94
7.3.3.	<i>Klasszikus és ritka EGFR mutációk előfordulási gyakoriságának vizsgálata tüdő adenocarcinómában [12]</i>	98
7.3.4.	<i>EGFR protein expressziót befolyásoló protokoll modifikációk tüdő adenocarcinómában [13]</i>	103
7.3.5.	<i>EGFR expresszió vizsgálata tüdő adenocarcinómák szövettani altípusaiban [14]</i>	106
7.3.6.	<i>KRAS mutáció altípusok vizsgálata tüdő adenocarcinómában [15]</i>	109
7.3.7.	<i>A KRAS mutáció incidenciája és a távoli áttét helyére vonatkozó prognosztikai értéke tüdő adenocarcinómában [16]</i>	113
7.3.8.	<i>KRAS-mediált tüdő carcinogenesis gátlása [17]</i>	117
7.4.	Immunellenőrzőpont-gátló kezelések prediktív faktorainak vizsgálata tüdőrákban ...	121
7.4.1.	<i>PD-1/PD-L1 expresszió a tüdő adenocarcinómák szöveti jellemzőinek függvényében [18]</i>	121
7.4.2.	<i>PD-1/PD-L1 expresszió vizsgálata tüdőrákok agyi áttéteiben [19]</i>	124
7.4.3.	<i>PD-1/PD-L1 expresszió vizsgálata tüdő adenocarcinómában és annak agyi áttéteiben [20]</i>	129
7.5.	Citotoxikus kemoterápia szöveti biomarker expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata	133
7.5.1.	<i>ERCC1 expresszió vizsgálata tüdőrákban [21]</i>	133
7.5.2.	<i>Neoadjuváns kemoterápia hatása az ERCC1 expresszióra nem-kissejtes tüdőrákban [22]</i>	136
7.5.3.	<i>Platinabázisú kemoterápia hatása a tüdőrákok PD-1/PD-L1 expressziójára [23]</i>	140
8.	MEGBESZÉLÉS	143
8.1.	Tüdőrákok differenciáldiagnosztikai és prognosztikai markereinek vizsgálata	143
8.2.	Tüdőrákok távoli áttéteinek vizsgálata	148
8.3.	Tüdőrákok prediktív faktorainak vizsgálata	162
8.3.1.	<i>EGFR-TKI kezelés</i>	162
8.3.2.	<i>Immunterápia</i>	174
8.4.	Tüdőrákok kemoterápiájának hatása egyes szöveti biomarkerek expressziójára	181
8.5.	Epilógus	187
9.	EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	188
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	190
11.	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK BIBLIOGRÁFIAI ADATAI	192
11.1.	A disszertáció alapjául szolgáló közlemények [1-23]	192
11.2.	A disszertáció témájában megjelent közlemények	194
11.3.	A disszertáció témájában megjelent könyvfejezetek	196
11.4.	Nem a disszertáció témájában megjelent közlemények és könyvfejezetek	197
11.5.	Tudománymetria adatok	200
12.	IRODALOMJEGYZÉK	201

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A tüdőrák világviszonylatban és Magyarországon is a vezető daganatos halálok, és felfedezésekor a betegek közel felében már távoli áttét mutatható ki. Közülük kiemelendő az agyi- és a csontáttét az életminőséget és a túlélést rontó hatása miatt. Az utóbbi években a tüdőrák terápiájában látványos fejlődés tapasztalható, előbb a molekuláris célzott terápia bevezetésével, majd pedig az immunterápia térhódításával.

Az eredményes kezelés érdekében elengedhetetlen a pontos diagnózis felállítása, ehhez pedig szükségesek differenciáldiagnosztikai markerek. A prognosztikai markerek tanulmányozása segítheti az eredményesebb terápiás stratégiák kidolgozását, emellett számos prognosztikai markerről bebizonyosodott, hogy prediktív értékkel is bír. Az újabb terápiás modalitásokhoz nélkülözhetetlenné vált a patológiai háttér a betegszelekcióhoz szükséges prediktív markerek meghatározásához, aminek nemcsak terápiás-, hanem költséghatékonyság szempontjából is nagy jelentősége van.

A jelen disszertációban bemutatjuk a tüdőrák differenciáldiagnosztikai, prognosztikai és prediktív szöveti biomarkereivel kapcsolatos kutatásaink főbb eredményeit. A mára már a rutin diagnosztika részét képező TTF-1 expresszió mellett érintjük a tight junction protein claudinok differenciáldiagnosztikai és prognosztikai értékét is. Vizsgáljuk a tüdőrák intrapulmonális lokalizációját a távoli áttétek helyének és megjelenési idejének tükrében. Több tanulmányunk is az agyi áttétet adó tüdőrákok kérdéskörével foglalkozik, beleértve azok klinikopatológiai jellemzőit és az agyi áttét körüli ödémával való kapcsolatát. Primer tumor–agyi áttét mintapárokon vizsgáljuk egyes prognosztikai és prediktív értékű proteinek expresszióját. Nagy beteglétszámú kohorszokban elemezzük az EGFR és KRAS mutációk és azok altípusainak előfordulását és klinikai jellemzőkkel való kapcsolatait. Külön fejezetet képez a disszertációban az immunterápia prediktív faktorainak vizsgálata mind primer tüdőrákokban, mind pedig agyi metasztázisokban. Végezetül bemutatjuk azokat az eredményeket, amelyeket platinabázisú kemoterápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatásának vizsgálata során kaptunk.

Bízunk benne, hogy eredményeink hozzájárulnak a tüdőrák eredményesebb és költséghatékonyabb terápiájához, mindezek révén pedig a betegek életminőségének és túlélésének javításához.

2. SUMMARY

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths both worldwide and in Hungary. Moreover, at the time of diagnosis distant metastasis can be detected in nearly half of the affected patients. Of these, brain and bone metastases should be highlighted for their negative impact on the quality of life and survival. In recent years, a spectacular improvement has taken place in lung cancer therapy, first with the introduction of molecular targeted treatment, and then with the rise of immunotherapy.

An accurate and precise diagnosis is essential for effective treatment and requires differential diagnostic markers. Studying prognostic markers can help develop more effective therapeutic strategies, and many prognostic markers have been shown to have predictive value as well. For novel therapeutic modalities, an appropriate pathological background has become vital to determine predictive markers for suitable patient selection. This is of great importance not only from a therapeutic but also from a cost-effectiveness point of view.

This dissertation presents the main findings of our research on differential diagnostic, prognostic, and predictive tissue biomarkers of lung cancer. In addition to TTF-1 expression, which is already part of routine diagnostics, the differential diagnostic and prognostic values of tight junction protein claudins are also discussed. We investigate the importance of intrapulmonary localization of lung cancer in terms of the location and time of onset of distant metastases.

Several of our studies address the issue of brain metastasis of lung cancer, including its clinicopathological characteristics and its connection to cerebral peritumoral edema. Primary tumor–brain metastasis tissue pairs are tested for the expression of certain proteins of prognostic and predictive value. In large patient cohorts, we investigate the frequency of EGFR and KRAS mutations and their subtypes, and their associations with clinical features. A separate chapter of the dissertation is devoted to the examination of predictive factors of immunotherapy in both primary lung cancers and brain metastases. Finally, we present the results of studying the effect of platinum-based chemotherapy on tissue biomarkers.

We are confident that our results will contribute to more efficient and cost-effective therapies for lung cancer, thereby improving the quality of life and survival of patients.

3. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADC	Adenocarcinoma
AF	Allél frekvencia
Akt	Serine/threonine kinase
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
BAC	Bronchiolo-alveolar carcinoma
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CAS	Cellular apoptosis susceptibility protein
CI	Confidence Interval
CK	Citokeratin
c-KIT	Stem cell factor receptor
c-MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CT	Computed tomography
DNV	Dinucleotide variation
ECOG PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFR-TKI	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor
EMA	European Medicines Agency
ErbB	HER receptor család
ERCC1	Excision repair cross-complementation group 1
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FDG	18-fluoro-dezoxi-glükóz
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FLEX vizsgálat	First-line in Lung cancer with ErbituX vizsgálat
HE	Hematoxin-eozin
HER	Human epidermal growth factor receptor
HR	Hazard Ratio
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
IC	Immune cell (immunsejt)
IHC	Immunohistochemistry
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAC	Lepidikus adenocarcinoma
L-ADC	Lepidikus terjedést mutató adenocarcinoma
LCC	Large cell carcinoma (nagysejtes tüdőrák)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein/ERK kinase
MR	Mononuclear ring (mononukleáris gyűrű)
MRI	Magnetic resonance imaging
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mtsai	Munkatársai
NGS	Next generation sequencing

NLAC	Nem-lepidikus terjedésű adenocarcinoma
NSCLC	Non-small cell cancer (nem-kissejtes tüdőrák)
OR	Odds ratio
ORR	Objective response rate
OS	Overall survival (teljes túlélés)
PCR	Polymerase chain reaction
PCI	Profilactic cranial irradiation
PDGF	Platelet derived growth factor
PD-1	Programmed cell death-1
PD-L1	Programmed cell death ligand-1
pEGFR	Phospho-EGFR
PET	Positron emission tomography
PFS	Progression free survival (progressziómentes túlélés)
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-kinase
pl.	Például
PS	Performance status
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RET	REarranged during Transfection, proto-oncogene
ROS1	ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase
RR	Response rate (terápiás válaszarány)
RRM1	Ribonucleotide reductase regulátor alegysége
RT-PCR	Real-time PCR (valósídejű PCR)
SCC	Squamous cell carcinoma (laphámrák)
SCLC	Small cell lung cancer (kissejtes tüdőrák)
SD	Standard Deviació
SNV	Single nucleotide variation
TC	Tumor cell (tumorsejt)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TK	Tirozinkináz
TKI	Tirozinkináz inhibitor
TMA	Tissue microarray
TMB	Tumor mutation burden
TNF α	Tumor necrosis factor- α
TNM	Tumor lymph Node Metastasis
TTF-1	Thyroid transcription factor-1
vs.	Versus
WBRT	Whole brain radiotherapy
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing
WHO	World Health Organization
wt	Wild type (vad típusú)

4. BEVEZETÉS

4.1. A tüdőrák epidemiológiája és diagnosztikája

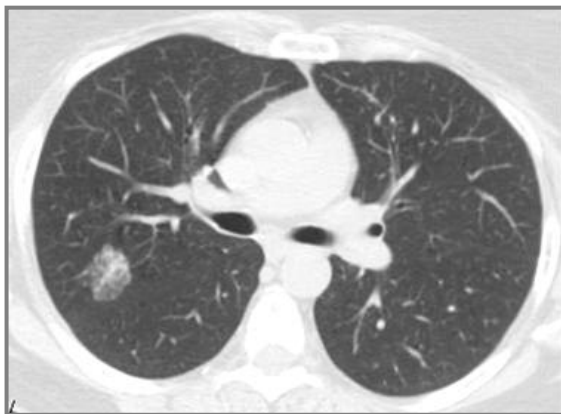
A tüdőrák világviszonylatban és Magyarországon is a vezető daganatos halálok. A világon évente 1,8 millió új tüdőrákos esetet észlelnek, és ez a betegség felelős a daganatos halálozás kb. 20%-áért¹.

Hazánkban a tüdőrák incidenciája 7000-8000, míg prevalenciája 22 000-23 000 körüli, és leggyakrabban a 65-70 év közötti korosztályt érinti^{2,3}. A férfi/nő arány jelentősen változott az elmúlt években, mivel míg 1980-ban a tüdőrákban szenvedőknek csak 18%-a volt nő, addig ez az arány 2018-ban 42%-ra növekedett⁴. A tüdőrák az idősebb korosztály betegsége, 40 éves kor alatt ritkán fordul elő. 2017-ben a betegek 76%-a volt 60 évesnél idősebb.

A tüdőrák közel 90 %-ának kialakulásáért a dohányzás felelős. A dohányzás – különösen a cigarettafüstben található policiklikus aromás szénhidrogének és nitrozaminok – 15-szörösére fokozza a tüdőrák kialakulásának kockázatát. A kémiai karcinogének elsősorban a DNS károsítása révén, génhibák felhalmozódásával vezetnek daganatelőtti állapotokhoz, majd lokalizált és később invazív daganatokhoz⁵⁻⁸. Hazánkban a felnőtt lakosság egyharmada dohányzik, amivel vezető szerepet töltünk be Európában. Éppen ezért a hazai tüdőrákos esetek jelentős részében feltehetően magas a tumor mutációs terhelés (TMB = tumor mutation burden), aminek egyes daganatellenes terápiás modalitásoknál, így például az immunterápiánál, prediktív szerepe lehet.

A modern képalkotó eljárások és egyéb diagnosztikus módszerek gyors fejlődése, továbbá a kombinált daganatellenes kezelések alkalmazása ellenére az ötéves túlélés napjainkban még mindig 15-20% körül mozog. A leghosszabb túlélést továbbra is a nagyon korai stádiumban elvégzett komplett sebészi reszekciótól várhatjuk. Közismert azonban, hogy még a legkorábbi – az IA – stádiumban műtött esetekben is csak a betegek kb. 70%-a éri el az ötéves túlélést. Mivel a nemzetközi szakmai ajánlások szerint az ilyen esetekben nem indikált a műtét utáni kiegészítő (adjuváns) onkoterápia, ezért rendkívül nagy jelentőségű lenne egy megbízható prognosztikai marker, amely segítene eldönteni, hogy kik profitálhatnak legtöbbet a műtét utáni gyógyszeres kezelésemből⁹⁻¹¹.

A tüdőrákok felismerésére panaszok kapcsán, vagy szűrés során kerül sor. A szűréssel felismert tüdőrákok korábbi stádiumúak és gyakran perifériás elhelyezkedésűek (1. ábra), míg a panaszok kapcsán diagnosztizált daganatok előrehaladottabb stádiumúak⁴, és nemritkán centrális elhelyezkedésűek, endobronchialisán láthatók (2. ábra).



1. ábra. Jobb oldali perifériás tüdő adenocarcinoma CT képe



2. ábra. Jobb főhörgőt elzáró tüdő laphámrák

A diagnózis felállítását képalkotó módszerek (RTG, CT [computed tomography], MRI [magnetic resonance imaging], PET-CT [positron emission tomography- computed tomography]) segítik, amelyek a mintavételhez szükséges pontos lokalizáció meghatározása mellett a stádium meghatározásához is nélkülözhetetlenek¹².

A tüdőrák diagnosztizálásához elengedhetetlen megfelelő méretű és minőségű szövetminta, vagy megfelelő számú daganatsejtet tartalmazó citológiai minta nyérése. A sebészi mintavételi eljárásoktól eltekintve, a tüdőrák diagnózisának 2/3-a bronchoscopos úton nyert mintából, 1/3-a pedig egyéb mintából (transthoracalis tűbiopszia citológia/hisztológia, mellkasi folyadék citológia, subcutan terime aspirációs citológia, áttéti citológia/hisztológia) kerül felállításra.

Manapság a citológiai és/vagy hisztológiai verifikálás mellett egyes szövettani altípusok esetében már bizonyos molekuláris genetikai vizsgálatok is a rutin diagnosztika részét képezik⁷.

4.2. A tüdőrák differenciáldiagnosztikai és prognosztikai markerei

A pontos patológiai diagnózis elengedhetetlen az eredményes terápia meghatározásához. Mivel a tüdőrákok háromnegyed része irreszekábilis stádiumban kerül felismerésre, a daganatok többségében a diagnózis bronchoscopos excisio során nyert kicsiny szövettani mintából, vagy bronchoscopos kefebiopszia, illetve transthoracalis tűbiopszia citológiai mintájából kerül felállításra. Összességében a tüdőrák diagnózisa hazánkban több mint 60%-ban citológiai mintán alapul.

A tüdőrákok szövettani altípus szerinti meghatározásának mértékét az egyre bővülő gyógyszeres terápiás lehetőségek jelentősen befolyásolják. Míg korábban elegendő volt a kissejtes tüdőrák (SCLC) / nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) elkülönítés, addig manapság már a nem-kissejtes tüdőrákon belül is pontosan meg kell határozni a főbb altípusokat, így az adenocarcinomát (ADC), a laphámrákot (SCC) és a nagysejtes carcinomát (LCC). 2015-ben emellett megjelent a főbb szövettani típusok újabb klasszifikációja, azonban ennek klinikai relevanciáját még további átfogó vizsgálatok kell, hogy meghatározzák¹³.

4.2.1. TTF-1

Az 1990-es években a tüdő ADC-k és az SCC-k elkülönítésének – terápiás konzekvencia hiányában – még nem volt akkora jelentősége, mint manapság. Az ezredfordulóra azonban új kemoterápiás szerek jelentek meg (pl. pemetrexed), amelyek hatásosabbnak bizonyultak ADC-ben, mint SCC-ben. Néhány évvel később megjelentek az első molekuláris célzott terápiák, amelyek kifejezetten ADC-ben mutattak terápiás hatékonyságot.

A TTF-1 (thyroid transcription factor-1) egy sejtmagi transzkripciós faktor, ami jól differenciált tüdő ADC-ben immunhisztokémiai (IHC) vizsgálattal nukleáris pozitivitást mutat. 2000-ben már közöltek eredményeket a TTF-1 differenciáldiagnosztikus értékére vonatkozóan tüdőrákban, azonban az esetszám igen alacsony volt, mindössze 13 primer, és 21 áttéti daganatot tanulmányoztak¹⁴. Annak érdekében, hogy ezen IHC reakció a rutin diagnosztikában is helyet kaphasson, átfogóbb vizsgálatok váltak szükségessé. [1]^{15 2}

² A disszertáció alapját képező publikációk mondat végén [1] – [23] jelöléssel, szövegben #1 – #23 jelöléssel kerültek feltüntetésre.

4.2.2. Tight junction proteinek tüdőrákban

A claudinok tight junction proteinek, melyek fontos szerepet játszanak a celluláris adhézióban, a glanduláris differenciációban és a sejtproliferációban. Ezigaz a claudinok 24 altípusát írták le¹⁶. Bár korábban számos normál szövetben és szolid tumorban kimutatták a claudinok különböző altípusát, normál hörgőhámában és tüdőrákok szövettani altípusaiban csak igen kevés volt ismert a claudin expresszió és az intracelluláris lokalizáció. [2]¹⁷

A claudinok prognosztikai értéke meglehetősen ellentmondásos. Emelkedett claudin-1 expresszió volt kimutatható primer colon carcinomában és annak metasztázisaiban¹⁸. Ezzel szemben Miyamoto és mtsai vizsgálatában a csökkent claudin-1 pozitivitás járt daganat kiújulással nyelőcső laphámrákban¹⁹. Invazív pancreas carcinoma sejtkultúrájában a claudin-4 overexpresszió csökkentette a sejtek invazivitását és túlélését²⁰, ezzel szemben emlőrákban a fokozott claudin-4 expresszió magasabb tumor grade-del és kedvezőtlen prognózissal társult²¹. Emlő ductalis carcinomában és ductalis carcinoma in situ eseteiben a claudin-7 expresszió negatívan korrelált a tumor grade-del, ugyanakkor pancreas carcinomában a claudin-7 expresszió kedvező prognosztikai faktornak bizonyult^{22,23}. A fenti daganatokkal ellentétben, tüdőrákban a claudinok prognosztikai szerepéről csak rendkívül kevés irodalmi adat állt rendelkezésre. [3]²⁴

4.2.3.A tüdőrák prognózisával összefüggésbe hozható egyéb szöveti biomarkerek [6]²⁵ [7]²⁶

A sejtdifferenciáció markerei. A sejtdifferenciáció markerei közül néhányat a rutin klinikai gyakorlatban is alkalmazunk. Tüdőben elhelyezkedő adenocarcinoma esetén a CK-7 (citokeratin-7) pozitivitás primer pulmonális eredetre utal, szemben a CK-20 pozitivitással, amely a gastrointestinalis eredetet támasztja alá²⁷.

A pan-CK ezzel szemben általános immunhisztokémiai markere a hámeredetű daganatoknak, és immunfestődésének intenzitása emlőrákban fordítottan korrelált a daganat prognózisával és a távoli áttétek megjelenésének rizikójával²⁸.

A HBME-1 (Hector Battifora mesothelial antigen-1) fehérje expresszióját alapvetően a pajzsmirigyrákok prognózisának megítélésére használják, mivel az erős immunfestődés agresszív biológiai viselkedésre utal²⁹. Emellett azonban expressziója egyéb szolid

daganatokban is kimutatható, így például malignus mesotheliomában és tüdő adenocarcinomában³⁰.

A chromogranin-A a neuroendocrin differenciáció klasszikus markere, és tüdőrákban elsősorban a carcinoidok, a kissejtes carcinoma és a nagysejtes neuroendocrin carcinoma igazolására használják. Szenszitivitása a carcinoidok esetében a legnagyobb, meghaladja a 90%-ot³¹. Emellett azonban az NSCLC-k 10-15%-ában is kimutatható, és expressziója általában kedvezően befolyásolja a platinabázisú kemoterápiára adott választ³².

A sejtproliferációt és a sejtciklust szabályozó elemek. Tüdőrákban a sejtproliferáció mértékének megítélésére általában a Ki-67 expressziót használják, amelynek fontos szerepe van a típusos és atípusos carcinoidok elkülönítésében. Habár a magasabb Ki-67 protein expresszió nem-kissejtes tüdőrákban is a daganat agresszívabb biológiai viselkedésére utal, a releváns cut-off érték még nem került meghatározásra³³. Éppen ezért a Ki-67-re vonatkozó információ nem játszik szerepet a terápiás döntéshozatalban, így a rutin patológiai diagnosztikában nem történik Ki-67 IHC vizsgálat.

Az EGFR (epidermal growth factor receptor = epidermális növekedési faktor receptor) egy 165 kDa molekulatömegű glikoprotein, amely a receptor tirozinkináz (TK) molekulacsalád tagja és egészséges szövetekben a sejtek növekedését segíti elő. Génje a 7p12.3-q22.1 kromoszóma régióra lokalizálódik és 26 exonból áll. Számos daganatban – így például NSCLC-ben, tripla-negatív emlőrákban, petefészekrákban, valamint gyomorrákban – az EGFR gén mutációja mutatható ki³⁴.

Az nm23 volt az elsőként azonosított metasztázis inhibitor gén. Egy számos szolid tumort elemző, 49 tanulmány eredményeit tömörítő metaanalízis szerint az alacsony nm23 expresszió korrelál a nyirokcsomó érintettségével és kedvezőtlen túléléssel jár³⁵.

A cyclinek a sejtciklus szabályozásában részt vevő fehérje-család, melynek tagjai a sejtciklus különböző szakaszaiban más-más cyclin-dependens kinázokat aktiválnak, amelyek azután más-más fehérjéket foszforilálnak. Korai stádiumú tüdő adenocarcinomában a cyclin D1 kedvezőtlen prognosztikai faktornak bizonyult, mivel fokozott expressziója rövidebb kiújulásmentes túléléssel járt³⁶. A cyclin D3 overexpresszió hasonlóképpen rossz prognosztikai faktor volt tüdőrákban, mivel rövidebb teljes túléléssel járt³⁷.

A p27^{kip1} egy cyclin-dependens kináz gátló, amely számos daganatban megjelenik. Tüdőrákban a prognosztikai szerepére vonatkozó vizsgálatok nem igazoltak egyértelmű összefüggést a fehérje expressziója és a betegség lefolyása között³⁸.

A p16 az SCLC carcinogenesisében résztvevő fehérje, amelyet a P16 tumor szuppresszor gén kódol. Mivel diagnosztikus szenzitivitása SCLC-ben meghaladja a 90%-ot, így expressziójának meghatározása fontos kiegészítő vizsgálat lehet differenciáldiagnosztikai kérdésekben³⁹. Expressziója ugyanakkor tüdő adenocarcinomákban is kimutatható, és alacsony kifejeződése magasabb nyirokcsomó státusszal és rövidebb túléléssel párosul⁴⁰.

A sejttadhézió molekulái. A kollagén XVII fehérje összetett hámozott – így az epidermisben – a hemidesmosomális adhézis komplex része, és melanomákban a malignus transzformáció és a daganat invazivitás markere⁴¹. Kevésbé ismert szerepe a tüdőrák áttétképzésében.

A CD44 molekula egy adhézis glikoprotein, amelynek számos ún. splice variánsa lehetséges. Ezek közül a v6 variáns (CD44v6) az, amely többféle daganat esetében – így gastrointestinalis carcinomákban és NSCLC-ben – is az áttétképző képesség hatékony előrejelzőjének bizonyult^{42,43}.

Az E-cadherin és a β -catenin a sejt-sejt adhézióban játszik szerepet. Az E-cadherin egy 120 kDa transzmembrán glikoprotein, amely intracellulárisan a β -cateninnel képez komplexet, és biztosítja az aktin citoskeletonhoz való kapcsolódását. A β -catenin emellett a Wnt szignalizációban is szerepet játszik, a Wnt/ β -catenin károsodás pedig számos humán daganatban kimutatható. Az E-cadherin/ β -catenin komplex károsodása kedvezőtlen prognosztikai faktornak bizonyult tüdő adenocarcinomában, emellett negatív prediktív értékkel bírt EGFR-TKI (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor) terápia alkalmazásakor^{44,45}. A syndecan-1 egy sejt felszíni transzmembrán heparánszulfát proteoglikán, amely fontos szerepet játszik a sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatásokban. Szerepe ellentmondásos a daganatok biológiai viselkedésének meghatározásában, mivel egyes tumorokban expressziója a differenciált fenotípus markere, más esetekben jelenléte fokozott inváziós képességre utal⁴⁶. Tüdőrákban a preklinikai vizsgálatok eredményei alapján a syndecan-1 expresszió elvesztése magasabb tumor grade-del és kedvezőtlenebb túléléssel jár⁴⁷.

A *DNS-repair*-ben és az apoptózisban szerepet játszó molekulák. A *DNS-repair*-ben szerepet játszó topoizomeráz II expresszióját elsősorban mint prediktív faktort vizsgálták kissejtes tüdőrákban, mivel ebben a szövettani altípusban a topoizomeráz II gátló etoposidnak kulcsszerepe van a terápiában. Ugyanakkor, annak ellenére, hogy ennek az enzimnek a magasabb szintje a DNS hibajavítás fokozása révén kedvező prognosztikai faktornak tartható, expresszióját kevésbé vizsgálták tüdőrákban a távoli áttétek képződésével összefüggésben.

Az apoptózis (programozott sejthalál) fontos szerepet játszik a carcinogenesisben, mivel a proapoptotikus aktivitás hiánya, vagy az antiapoptotikus hatás fokozódása daganatok keletkezéséhez vezethet⁴⁸. Hasonlóan más szolid tumorokhoz, tüdőrákban is a leggyakrabban vizsgált képviselői a proapoptotikus Bax, az antiapoptotikus Bcl-2, a CAS (cellular apoptosis susceptibility protein), az apoptózist kiváltó jelutakban szereplő caspase-ok és a halálreceptor Fas⁴⁹. Kevésbé ismert ugyanakkor ezen biomarkerek szerepe az áttétképződésben, különösen a tüdőrákban oly gyakori agyi áttétek esetén.

A korábban „*A genom őre*”-ként is emlegetett P53 tumor szupresszor gént és az általa kódolt p53 fehérjét az 1990-es évek közepén igen intenzíven vizsgálták tüdőrákban. Prognosztikai értékük ellentmondásosnak bizonyult, aminek hátterében részben az állt, hogy NSCLC betegcsoportokat vizsgáltak, és nem különítették el még a két fő szövettani altípust (ADC, SCC) sem. Emellett igen gyakran stádium szempontjából is heterogén populációt tanulmányoztak^{50,51}. Fentieket támasztja alá egy francia együttműködésben végzett vizsgálatunk is, amelynek során 227 operált NSCLC beteg tumormintáinak p53 protein expresszióját elemeztük, és csak a korai stádiumú ADC csoportban figyeltünk meg negatív prognosztikai értéket, a SCC-nél és késői stádiumban nem⁵². Ezzel szemben, egy magyar betegeket vizsgáló tanulmányban I stádiumú operált tüdő SCC esetében a p53 immunhisztokémiai pozitivitás, ami a tumorszupresszor funkció kiesésére utal, kedvezőtlen prognosztikai faktornak bizonyult⁵³. Ezek az eredmények is ráirányítják a figyelmet a homogén betegcsoportok vizsgálatának jelentőségére. Érdeemes megemlíteni, hogy annak ellenére, hogy a tüdőrákok 50-80%-a expresszálja a p53 fehérjét és ezzel párhuzamosan a daganatok kb. felében P53 mutáció kimutatható, a korábbi preklinikai vizsgálatok biztató eredményei ellenére a P53-gátlás, mint aktív onkoterápia tüdőrákban még nem valósult meg⁵⁴.

mTOR, a komplex szöveti biomarker. Az mTOR (mammalian target of rapamycin) egy 289 kDa tömegű szerin-treonin proteáz, amely számos jelet integrálva hat a sejtek proliferációjára, tápanyagellátására és energiahelyzetére. Befolyásolja emellett a sejtek metabolikus stresszekre (pl. hipoxia, tápanyaghiány) adott válaszát és ezzel összefüggésben az autofágiát vagy a DNS-repairt is. Az mTOR kináz a sejtekben két multiprotein komplexben található. Az mTORC1 komplex elemeként a Raptor, az mTORC2 komplex elemeként pedig a Rictor a komplex fontos fehérjéje. Az mTORC1 fontos célfehérjéi a riboszómális S6 kináz (S6K), illetve a 4E kötő fehérje (4EBP). Ezek aktivitása – többek között az S6 foszforilációján keresztül – olyan onkogének átírását is érintik, mint pl. a c-MYC, a cyclin D vagy a VEGF.

Az mTOR szerepet játszik egyes daganatok kialakulásában a PI3K/AKT/mTOR jelút elemeinek mutációs és aktivitás változásai révén, és emiatt az mTOR gátlás a daganatellenes terápiák egyik fontos részévé vált, különösen veserákok esetében⁵⁵. Tüdőrákokban ezzel szemben az mTOR-t kevésbé vizsgálták, és humán adatok nem voltak ismeretesek primer daganat és távoli áttétek – így például agyi metasztázisok – mTOR expressziójára vonatkozóan. [8]⁵⁶

4.3. Távoli áttétek tüdőrákban

Annak ellenére, hogy a tüdőrákos betegek döntő többségében a diagnózis felállításakor már jelen van nyirokcsomó- és/vagy távoli szervi áttét, keveset tudunk a metasztatizálás egyes lépéseiről, a lymphogen és/vagy a hematogen terjedés során detektálható biomarkerekről és azok változásairól. Különösen igaz ez az SCLC-re, aminek hátterében részben az áll, hogy ennél a szövettani típusnál csak igen korai stádiumban és erősen szelektált betegcsoportban történik műtéti beavatkozás, ami lehetővé tenné szöveti biomarker expresszió vizsgálatát. Éppen ezért nagy jelentőségű az a vizsgálat, amelynek eredményéről Munkacsoportunk a közelmúltban számolt be. 32 SCLC-s beteg operált primer tumorának és nyirokcsomó áttétének FFPE blokkjain 2560 gén expressziójának vizsgálata történt meg. Mindössze 13,1%-ban, 336 gén esetében volt szoros korreláció a primer tumor és a nyirokcsomó áttét között, ami ráirányítja a figyelmet a tumor heterogenitás tanulmányozásának fontosságára⁵⁷.

További lépésként felmerül a *primer tumor – lymphogen áttét – hematogen áttét* sor vizsgálata.

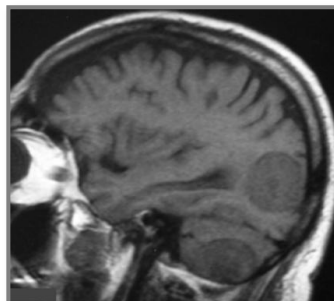
A tüdőrák diagnosztizálásakor az esetek 40-45%-ában már távoli hematogén áttétek igazolhatók. A betegek döntő többségénél ilyenkor a primer tumor sebészi eltávolítására már nem kerülhet sor. Jól szelektált esetekben, izolált agyi-, csont- vagy mellékvese áttétnél, különösen nyirokcsomó áttét hiányában (N0 stádiumban), a primer tüdőtumor és a szoliter metasztázis sebészi eltávolítása jelentősen megnövelheti a túlélést. Tüdőrákban távoli áttétek leggyakrabban – csökkenő gyakorisági sorrendben – a tüdőben, agyban, csontban, mellékvesében, pleurán, és a májban jelennek meg. Kevés adat állt rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a primer daganat pontos intrapulmonális lokalizációja összefüggést mutat-e az áttét helyével, az áttétek megjelenésének sorrendiségével, illetve az áttét megjelenéséig eltelt időintervallummal. [4]⁵⁸

4.3.1. Agyi áttét

Az agyi metasztázisok 40-50%-a tüdőrákból, 15-25%-a emlőrákból, 5-20%-a melanoma malignumból fejlődik ki⁵⁹. Tüdőrák esetében a betegek 30-50%-ában várható agyi áttét megjelenése a betegség lefolyása során, ami a hazai incidencia adatok szerint évente több mint 2500 új beteget jelent⁴. Az agyi áttét megjelenése rendkívül kedvezőtlenül hat a beteg általános állapotára és életminőségére. A tünetek és panaszok nagyban függenek az agyi áttét lokalizációjától és méretétől, ez utóbbi pedig magából a tumorszövetből és a peritumorális ödémából tevődik össze (3. és 4. ábra).



3. ábra. Jelentős peritumorális ödémával járó bal oldali frontális lebenyi áttét CT képe



4. ábra. Peritumorális ödéma nélküli parietalis és occipitalis agyi áttét MRI képe

A peritumorális ödéma jelenlétének és pontos méretének ismerete rendkívül fontos, mert számos esetben leginkább ez felel a neurológiai tünetekért, ezért ödéma-csökkentő kezeléssel drámai állapotjavulás érhető el. Tüdőrákra vonatkozóan kevésbé volt ismert a peritumorális agyödéma és a daganat szövettani altípusa közti kapcsolat. [5]⁶⁰ Hasonlóképpen kevésbé volt tanulmányozott az agyi áttét és az ép agyszövet közti mikroszkópos morfológiai kapcsolat, beleértve a mononukleáris immunsejtek denzitását és pontos intra- és peritumorális lokalizációját. [19]⁶¹

Tekintettel arra, hogy az agyi áttét rendkívül nagy terhet ró mind a betegre, mind pedig az őt ellátó személyzetre, kiemelkedő jelentőségűek az agyi áttét rizikóját felbecsülő tanulmányok. Tüdőrákban kevés ezzel foglalkozó publikáció jelent meg, ráadásul a közlemények nemritkán heterogén betegpopulációt vizsgáltak mind a stádiumot, a szövettani altípust, mind pedig az alkalmazott terápiát illetően. Az agyi áttét rizikójának meghatározása komoly diagnosztikus és terápiás konzekvenciával bírhat. Nagyszámú beteg bevonásával végzett vizsgálatok eredményei alapján, magas kockázat esetén nem-kissejtes tüdőrákban is mérlegelhetővé válhatna a profilaktikus agyi irradiáció (profilactic cranial irradiation = PCI), hasonlóan a kissejtes tüdőrák ellátásához. Magas rizikó fennállása esetén továbbá – különösen akkor, ha több gyógyszer közül választhatunk – mérlegelni lehetne olyan készítmény alkalmazását, amelyről ismert a megfelelő mértékű agyi penetráció. Példa erre az ALK (anaplastic lymphoma kinase) transzlokáció pozitív adenocarcinomában szenvedő betegeknél már elsővonalis kezelésként alkalmazható másodikgenerációs ALK gátló alectinib, szemben az elsőgenerációs crizotinib utáni szekvenciális alectinib terápiával, mivel ismert, hogy az alectinib lényegesen jobb vér-agy gát penetrációt mutat, mint a crizotinib. Mindezek alapján indokoltá vált agyi áttétet adó és nem adó tüdőrákok klinikopatológiai elemzése az agyi áttét rizikófaktorainak meghatározása céljából. [6]²⁵

Irodalmi adatok szerint az agyi áttétes tüdőrákos betegek teljes túlélése igen széles határok, 5,9 és 68 hónap között változhat. Tüdőrák esetén mindössze néhány tanulmányban – nagyon alacsony betegszám mellett – vizsgálták a nyirokcsomó áttét nélküli, izolált agyi áttétes („*brain only*”) betegeket, és hosszabb túlélést tapasztaltak⁶².

Érdemes volt tehát átfogó elemzést végezni annak vizsgálatára, hogy a *brain only* státusz hogyan befolyásolja a tüdőrákos betegek onkológiai ellátását, és ennek milyen kihatása lehet az agyi áttét utáni túlélésre, valamint a teljes túlélésre. [5]⁶⁰

Tekintettel arra, hogy az agyi áttét nemritkán életet veszélyeztető állapot, ezért egyes esetekben az áttét még akkor is eltávolításra kerül műtétileg, ha a betegség stádiuma alapján nem jönne szóba metastasectomia. Amennyiben az ilyen betegeknél korábban a primer tüdőtumor is eltávolításra került sebészi úton, úgy a reszekált primer tumor és agyi áttét formalin fixált paraffinba ágyazott (FFPE) archivált szövetmintái kiváló alapot szolgáltatnak összehasonlító immunhisztokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatokhoz. Ennek segítségével meghatározhatóvá vált egyes szöveti biomarkerek expressziójának változása az agyi áttétben a primer tüdődaganathoz viszonyítva. [6]²⁵ [7]²⁶ [8]⁵⁶

Az is kevésbé volt ismert, hogy hogyan változik a daganat molekuláris genetikai státusza a metasztázálás során, illetve, hogy az alkalmazott onkoterápiák – különösen a platinabázisú kemoterápia – hatása kimutatható-e az áttétek genetikai elemzésével. [9]⁶³ Egy ilyen jellegű vizsgálathoz azonban már nem volt elegendő archivált, FFPE szövetminta megléte, így ez újabb feladat elé állította a klinikusokat, a patológusokat és a kutatókat.

4.3.2. Csontáttét

Csontáttét a tüdőrákos betegek 25-30%-ában már a primer tumor diagnózisának felállításakor igazolható, és további 10%-ukban a betegség lefolyása során jelenik meg. Hazánkban ez évente több mint 2000 olyan új beteget jelent, akik már csontáttétet adott tüdőrákkal kerültek felfedezésre⁴.

A csontmetasztázis a betegek életminőségének romlásával és jelentős állapotrosszabbodással is járhat, ami a további onkológiai kezelések megadását is veszélyeztetheti. Kezelésének bázisszere a biszfoszfonát, aminek alkalmazhatóságát azonban korlátozza a vesefunkció beszűkülése. A tüdőrákok 85-90%-ban dohányzás következtében alakulnak ki, a dohányzás pedig – részben az érrendszer károsítása révén – hozzájárul a vese ereinek károsodásához és így a vesefunkció beszűküléséhez. Munkacsoportunk 570 csontáttétet adott tüdőtumoros beteg retrospektív adatelemzése alapján a tüdőrák diagnózisának felállításakor a betegek 8,67%-ában már patológiás tartományban találta a vesefunkciót⁶⁴. A csontáttét megjelenésekor a betegek

16,11%-ának volt kóros tartományban a vesefunkciós értéke, míg a legutolsó elérhető laboratóriumi lelet alapján ez az arány már 26,37% volt. Tekintettel arra, hogy a betegek 40%-ának már a tüdőrák igazolásakor ismert volt a csontmetasztázisa, ez az arány önmagában felhívja a figyelmet a kevésbé nephrotoxikus szerek alkalmazásának sürgető igényére csontáttétet adott tüdőrákban. A csontáttét tüdőrákban köztudottan egy kedvezőtlen prognosztikai faktor, azonban nem volt kellően ismert, hogy ezen betegcsoporton belül változik-e a prognózis függően a primer tumor molekuláris jegyeitől, így például a KRAS mutációs státusztól. Hasonlóképpen kevés adat állt rendelkezésre a tüdőrákok egyéb távoli szervi áttéteinek (tüdő, agy, mellékvese, pleura, máj) KRAS státusztól függő prognózisára vonatkozóan. A fentiekben ismertetett, 570 csontáttétes tüdőrákos beteg klinikai adatait elemző munka adatbázisa kiváló alapot nyújtott további – a daganatok molekuláris státuszára, illetve metasztatizálási mintázatára vonatkozó – elemzésekhez. [16]⁶⁵

4.4. Molekuláris célzott terápia tüdőrákban

Az elmúlt évek transzlációs kutatásainak eredményei forradalmasították a tüdőrákos betegek egy jól körülírt csoportjának ellátását⁶⁶⁻⁷⁰. A daganatszövetben lévő driver mutációk kimutatásán alapuló molekuláris célzott terápiák mind a gyógyszer bevitelének módjában, mind pedig a mellékhatás-profilban új irányt mutattak. A szájon át szedhető készítmények alkalmazása az esetek döntő többségében csak kevés és jól menedzselhető mellékhatással járt, és alkalmazásával elkerülhetővé vált az alopecia, illetve a beteg életminőségét jelentősen rontó hányás, vérkép- és vesekárosodás. Több hónapos – egyes esetekben akár több éves – kedvező terápiás válasz után azonban megjelenik a daganatos progresszió, ami újabb terápiás megközelítések szükségességét veti fel⁷¹. Míg korábban szisztémás progresszió esetén maradt a citotoxikus kemoterápia alkalmazása, mint lehetséges kezelési mód, addig manapság hihetetlen sebességgel bővülnek a molekuláris célzott terápiák során kialakuló rezisztenciával kapcsolatos ismereteink, és szerencsére hasonló tempóban bővülnek az ilyen esetekre vonatkozó kezelési lehetőségek is^{2,72}.

Manapság a hazai klinikai gyakorlatban a tüdőrák molekuláris célzott terápiája elsősorban az adenocarcinomák EGFR-gátló és ALK-gátló – kisebb részben ROS1-gátló vagy BRAF-gátló – kezeléseként valósul meg, azonban a jelen disszertáció nem érinti az ALK (anaplastic lymphoma kinase) transzlokáció, a ROS1 (ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase) transzlokáció és a BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) V600E mutáció kimutatását vagy gátlását, ezért ezzel a kérdéskörrel a továbbiakban nem foglalkozunk.

4.4.1. EGFR mutáció, amplifikáció, overexpresszió

Az EGFR az ErbB (HER) receptor család tagja, melynek négy képviselője: az EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 és a HER4/ErbB4. Közülük az ErbB2-nek a többitől eltérően nincs természetes ligandja, az ErbB3 pedig nem rendelkezik kináz aktivitással. Az EGFR részt vesz a sejtosztódás, az érképződés, a daganatsejt invázió és az áttétképzés fokozásában, valamint a programozott sejthalál csökkentésében.

2004-ben látott napvilágot az a bejelentés, miszerint a tüdőrákos szövetmintából kimutatható EGFR mutáció előre jelzi az EGFR-TKI terápiás hatékonyságát^{73,74}. Még ugyanebben az évben Magyarországon is megtörtént az első ismert EGFR-mutáns és génamplifikált tüdőrákban szenvedő beteg molekuláris diagnosztika által irányított kezelése, ami drámai javulást eredményezett mind radiológiailag, mind pedig klinikailag. [10]⁷⁵ Ez a terápiás stratégia jelentős szemléletbeli változást hozott az onkopulmonológiában, és nagyban felértékelte a patológusok és a molekuláris biológusok szerepét. Fontos volt tehát mihamarabb bekapcsolódni ebbe a témakörbe, gyűjteni a hazai tapasztalatokat, valamint elősegíteni a nemzetközi diagnosztikus és terápiás ajánlások mielőbbi hazai bevezetését^{67,76-79}. [11]⁷⁶ [12]⁸⁰ Azóta már itthon is számtalanszor bebizonyosodott a molekuláris célzott terápia hatásossága, és nemegyszer igen látványos és tartós terápiás válasznak lehettünk a szemtanúi^{71,81-83}.

EGFR mutáció. A tüdőrákok közül döntően a nem-kissejtes tüdőrákokban, azon belül is az adenocarcinomákban mutatható ki EGFR mutáció, gyakrabban a nemdohányzóknál, mint a dohányzóknál (50% vs. 10%), a lepidikus terjedést mutató adenocarcinomákban, mint a más szöveti típusokban (40% vs. 3%), a távol-keleti betegekben, mint a más etnikai csoportban (30% vs. 8%), és a nőkben, mint a férfiakban (42% vs. 14%)⁸⁴.

Az EGFR-TKI-k iránti érzékenység szempontjából az EGFR gén tirozinkináz doménjének mutációi meghatározó jelentőségűek. A pozitív prediktív értékkel bíró aktiváló mutációk az ATP-kötő hely körül következnek be, részben mint kis deléciók (19-es exonban, 746-753 kodonok körül) vagy aminosavcserével járó mutációk (21-es exonban, L858R, L861Q, G719C), és azon túl, hogy fokozott kináz aktivitást hoznak létre, fokozzák a kináz gátlók kapcsolódását a receptorhoz^{73,74}. Előfordulnak még „ritka mutációk” is, elsősorban a 18-as exonban. A ritka mutációk az EGFR-TKI terápiás hatékonysága szempontjából rendkívül heterogén csoportot alkotnak, ugyanakkor az alacsony esetszám miatt nehéz a prognosztikai és/vagy a prediktív értéküket meghatározni. Éppen ezért fontosak az ilyen mutációval rendelkező betegekről szóló esetismertetések⁸². A ritka mutációk közül kiemelkedő fontosságú a 20-as exon 790-es kodonjának mutációja (T790M), ami az EGFR-TKI kezelés szempontjából rezisztencia-mutációnak tekinthető.

Mind az európai, mind pedig a magyar tüdő adenocarcinomás betegekben az EGFR-mutáció gyakorisága 10–15%. Tekintettel arra, hogy hazánkban kevésbé volt ismert az EGFR mutációkon belül az egyes altípusok, különösen a ritka, EGFR szenitizáló mutációk %-os aránya, szükségessé vált erre vonatkozóan átfogó vizsgálat elvégzése. [12]⁸⁰

EGFR amplifikáció. Az EGFR mutáció analízis prediktív marker jellegét bejelentő 2004-es közlemény után megnőtt az igény arra, hogy az egyes országokban felmérjék az adenocarcinomás betegekben az EGFR mutáció gyakoriságát, és ezt akár kiegészítsék a daganat EGFR amplifikáció és EGFR protein expresszió vizsgálatával. [11]⁷⁶ Ez utóbbit az indokolta, hogy az EGFR mutáció/amplifikáció/expresszió konkordanciájára vonatkozóan igen kevés adat állt rendelkezésre. Annak ellenére, hogy korábban felmerült az EGFR amplifikáció mint az EGFR-TKI kezelés kedvező prediktív faktora egyidejűleg fennálló EGFR mutáció esetén, manapság a rutin klinikai gyakorlatban nem történik amplifikáció meghatározás ilyen indikációval.

EGFR overexpresszió. Az EGFR protein expresszió IHC módszerrel történő kimutatása a 2000-es évek közepén a napi rutin patológiai diagnosztika részévé vált mint EGFR-TKI-ra vonatkozó betegszelekciós metodika. Szükségessé vált ugyanakkor a különböző laboratóriumokban alkalmazott diagnosztikus módszerek standardizálása, és annak vizsgálata, hogy a kimutatási protokollok finom változtatása vajon befolyásolja-e az EGFR

protein expressziójának mértékét az IHC detektálás során. [13]⁷⁷ Fontos kérdésként merült fel emellett, hogy az EGFR aktiváltságára utaló foszforilációs státusz (pEGFR expresszió) mutat-e kapcsolatot a tüdő adenocarcinomák szövettani jellemzőivel, továbbá a daganatok EGFR génre vonatkozó molekuláris altípusaival. [14]⁸⁵

Az EGFR overexpresszió kimutatásának fontosságát támasztja alá az a tény, hogy a tirozinkináz gátlók mellett az EGFR gátlás másik fő megközelítési módja a monoklonális antitestek alkalmazása. Erre példa a cetuximab (Erbix[®] Merck), ami egy humán-egér monoklonális IgG1 antitest, és amely a ligand kötődés blokkolása révén gátolja az EGFR funkcionális aktivációját. A FLEX (First-line in Lung cancer with Erbitux) vizsgálat során a cetuximabot cisplatin-vinorelbin kemoterápiával kombinálták és elsővonalbeli kezelésként alkalmazták előrehaladott nem-kissejtes tüdőrákban⁸⁶. A teljes túlélés szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a cetuximab kezelésben is részesülők csoportjában, szemben a csak kemoterápiát kapó betegekkel. A cetuximabbal végzett sikeres klinikai vizsgálat eredménye ellenére az EMEA (European Medicines Agency) nem fogadta be a cetuximab-kezelés indikációs körébe a nem-kissejtes tüdőrákot. A gyártónak ezért olyan biomarkert kellett keresnie, amelynek segítségével egy kiválasztott betegpopulációban magasabb terápiás hatékonyságot lehet elérni. A későbbiekben beadott kérelemben a FLEX vizsgálat retrospektív biomarker-analízise alapján szelekciós kritériumként a daganat részletes EGFR immunhisztokémiai vizsgálata szerepelt. Az immunpozitív daganatsejtek arányából és az immunfestődés intenzitásából számított pontszám (Hirsch score) vizsgálata alapján a 200-as score feletti daganatoknál a cetuximabbal kiegészített kemoterápia már szignifikánsan magasabb terápiás válaszarányt mutatott (28,1% vs. 44,4%, $p=0,002$), szemben a korábbi 29,6% vs. 32,6%-kal ($p=0,36$)⁸⁷. A biztató vizsgálati eredmények ellenére tüdőrákban az EGFR ellenes monoklonális antitest terápiának a rutin klinikai gyakorlatba való bevezetésére még várni kell.

Habár az EGFR immunhisztokémiai vizsgálat hazánkban is közel két éven át az EGFR-TKI kezelés hivatalosan elfogadott prediktív markere volt, ez nyilvánvalóan nem biztosított megfelelő betegszelekciót, mivel az immunreakció az EGFR extracelluláris doménjét detektálja és nem ad információt az EGFR transzmembrán tirozinkináz régiójáról. Ez a magyarázata annak, hogy 2009-től a tüdő adenocarcinomás betegek kiválasztása a tumorszövetből/tumorsejtekből történő EGFR mutáció analízis eredményén alapul.

4.4.2. EGFR-TKI kezelés és annak prediktív markerei

A klasszikus EGFR szenitizáló mutációt (exon 19 deléció, exon 21 L858R pontmutáció) hordozó adenocarcinomában szenvedő betegeknél az elsővonalbeli kezelésként alkalmazott elsőgenerációs EGFR-TKI készítmények, így a gefitinib (Iressa®, AstraZeneca) és az erlotinib (Tarceva® Roche) 60-80%-os terápiás választ és 9-13 hónap progressziómentes túlélést eredményeztek. A legkedvezőbb és leghosszabb ideig tartó terápiás választ leginkább az exon 19 deléció pozitív betegeknél figyelhetjük meg^{71,75} (5. és 6. ábra).



5. ábra. Gefitinib terápia előtt:
Kiterjedt, kétoldali tüdőinfiltrátum



6. ábra. 3 hónapos gefitinib terápia után:
Nagyfokú radiológiai regresszió

A sokszor látványos és hosszantartó kedvező terápiás válasz ellenére a betegeknél előbb-utóbb gyógyszerrezisztencia lép fel, aminek hátterében az esetek kb. felében exon 20 T790M mutáció áll⁸⁸. Az ilyen rezisztencia leküzdésére – preklinikai modellekben – alkalmasnak bizonyult a második generációs, irreverzibilis EGFR gátló afatinib (Giotrif®, Boehringer-Ingelheim), ugyanakkor ez a szer a fázis II/III (Lux-Lung 1) vizsgálatban a gefitinib/erlotinib után progrediáló betegeknél csak 7%-ban mutatott terápiás választ⁸⁹. Az afatinibet végül a kemoterápiával való összehasonlításban nyújtott kedvező eredmény alapján törzskönyvezték. Alkalmazása lassítja a központi idegrendszeri áttétek kialakulását, meglévő cerebrális metasztázis esetén pedig terápiás hatékonyságot mutat⁸³.

Az EGFR-TKI rezisztencia leküzdésében napjainkban a legnagyobb szerepet az osimertinib (Tagrisso®, AstraZeneca) játsza. A harmadik generációs osimertinibnek a T790M rezisztencia mutáció gátlását az AURA vizsgálatok igazolták. A szer nemcsak a terápiás

válaszarányban (71% vs. 31%), illetve a PFS-ben (10,1 hónap vs. 4,4 hónap) bizonyult jobbnak a kemoterápiánál, hanem a központi idegrendszeri penetrációban és a betegségkontroll arányban (92%) is⁹⁰. Habár az osimertinibet elsődlegesen a T790M rezisztencia leküzdésére fejlesztették ki, a gyógyszer T790M mutáció hiányában is hatékony klasszikus EGFR szenzitizáló mutációk meglétekor. A T790M mutáció mellett más rezisztencia mechanizmusok is felismerésre kerültek, így pl. a MET amplifikáció, ami kb. 5%-ban tehető felelőssé. Hasonlóképpen ismertté vált a kb. 10%-ban megjelenő HER2 amplifikáció, valamint az 1-2%-ban kialakuló BRAF vagy PIK3CA mutáció. Az esetek egy töredékében a daganatsejtekben fellépő kissejtes transzformáció a kissejtes tüdőrákban alkalmazandó kemoterápia indikációját veti fel. Az osimertinib széleskörű alkalmazása újabb rezisztencia mutációk kifejlődésének kedvez, így pl. megjelennek az L858R/T790M/C797S, vagy a 19 Del/T790M/C797S mutáció sorozatok.

Míg az EGFR-TKI kezelés szempontjából pozitív prediktív faktor az EGFR szenzitizáló mutációk jelenléte, addig az EGFR rezisztencia mutációk mellett negatív prediktív értékkel bír a daganat KRAS mutáció pozitivitása is⁹¹. Az esetek döntő többségében a KRAS-mutáció jelenléte kizárja EGFR mutáció vagy ALK transzlokáció fennállását. Ez az alapja annak, hogy – tekintettel a KRAS mutáció magas előfordulási gyakoriságára hazánkban – a KRAS mutáció első lépésként történő meghatározása egyfajta költségkímélés érdekében került bevezetésre és alkalmazásra. Ezt a megközelítést a remények szerint hamarosan bevezetésre kerülő génpanel szekvenálási vizsgálatok fogják megszüntetni.

A betegszelekciós módszereknek nemcsak a terápia eredményessége szempontjából van kiemelkedő jelentősége, hanem a rendelkezésre álló pénzügyi források korlátozott volta is szükségessé teszi ezek alkalmazását. A megfelelően személyre szabott kezelés („tailored therapy”) mind terápiás-, mind pedig költséghatékonyaság szempontjából kívánatos, nem beszélve az onkológiai betegellátás számos etikai kérdéséről is^{78,92}.

4.4.3. KRAS mutáció vizsgálata

Tüdőrákban a KRAS mutáció prognosztikai és prediktív értékét vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak voltak. EGFR-TKI kezelésben részesült betegek adatait egyesítő és elemző négy vizsgálat eredménye szerint nem volt túlélésbeli különbség a KRAS mutáns és a vad típusú daganatok között⁹³. Más vizsgálatokban ugyanakkor a KRAS

mutáció negatív prognosztikai faktornak bizonyult, különösen korai stádiumú ADC-ben⁹⁴. A KRAS mutáció kemoterápiára vonatkozó prediktív értéke ugyancsak ellentmondásos. Egy – előrehaladott NSCLC-ben szenvedő – 1677 beteg adatait elemző metaanalízis szerint KRAS mutáció esetén az elsővonalbeli kemoterápiára adott objektív terápiás válaszarány (objective response rate = ORR) rosszabb volt, a progressziómentes túlélés (progression free survival = PFS) pedig rövidebb⁹⁵. Mindemellett számos vizsgálat nem tudott prediktív értéket igazolni a KRAS mutációra vonatkozóan, NSCLC elsővonalbeli kemoterápiája esetén^{96,97}.

Tekintettel arra, hogy hazánkban a gyakori dohányzás miatt a tüdőrákok kb. 30%-ában KRAS mutáció figyelhető meg, adottak voltak a feltételek a KRAS mutáció molekuláris altípusai és különböző klinikopatológiai paraméterek (dohányzás, PFS, OS [overall survival = teljes túlélés]) közötti korreláció vizsgálatára. [15]⁹⁸ Lehetséges volt emellett a KRAS mutáció altípusok és platinabázisú kemoterápiára adott terápiás válasz összefüggéseinek tanulmányozása is.

A KRAS mutáció altípus elemzésének szükségességét az a klinikai tapasztalat is alátámasztja, hogy KRAS mutáció pozitív daganatos betegek egy csoportjánál igen gyors lefolyást és kiterjedt metasztatizálást figyelhetünk meg. [16]⁶⁵

Annak ellenére, hogy tüdőrák sejtvonalakban a KRAS gén aktiváló mutációját már 35 évvel ezelőtt leírták, továbbá, hogy a tüdő adenocarcinomák 25-30%-a KRAS mutációt hordoz, a KRAS még mindig nem vált valódi terápiás célponttá⁹⁹. A génmutációk leginkább a 2-es exonon figyelhetők meg [G12C (39%), G12D (17%), vagy G12V (21%)]¹⁰⁰. Mivel a KRAS farnezilációja szükséges a sejtmembránhoz való transzlokációhoz és aktívvá váláshoz, vizsgálták a farnezil-transzferáz-gátlókat, mint lehetséges terápiás célpontokat. Habár egérmodellekben hatásosak voltak, a farnezil-transzferáz-gátlók emberben nem mutattak terápiás aktivitást^{101,102}. A szignál transzdukció KRAS alatti tagjainak (BRAF, MEK-ERK, PI3K-AKT) gátlása szintén nem váltotta be a hozzájuk fűzött reményeket, a kombinált terápiák alkalmazását pedig a jelentős toxicitás korlátozta¹⁰³. A KRAS direkt gátlását korábban nem tartották lehetségesnek a gyógyszeresen direkt módon támadható kötőhelyek hiánya miatt, azonban a KRAS egy allosztérikus kötőhelyének felfedezése megteremtette az alapját egy allosztérikus G12C-mutáció-specifikus gátlószer kifejlesztésének, ami inaktív formában stabilizálja a KRAS-t¹⁰⁴. Ezek a szerek biztató

eredményt mutattak preklinikai modellekben, és várható a közeljövőben klinikai vizsgálatba történő bevezetésük¹⁰⁵. Mindemellett, intenzív kutatások folynak a KRAS-t és az EGFR-t érintő szignál transzdukciós útvonalra vonatkozóan, különös tekintettel az ERBB receptor család több tagját is blokkoló pan-ERBB-gátló tirozinkináz afatinibre. [17]¹⁰⁶

4.5. Immunterápia tüdőrákban

Az immunterápia az elmúlt években valódi paradigmaváltást hozott a tüdőrák terápiájában. Az immunrendszer mozgósításának gondolata a daganatellenes küzdelem sikere érdekében nem új keletű. A korábbi immunterápiás megközelítések azonban tüdőrákban kevés sikert hoztak, aminek hátterében többek között a gazdaszervezet immunszuppresszív citokin expressziója és az antigénprezentáló sejtek csökkent MHC antigén expressziója is állhatott. Az új fejlesztésű szerek közül legígéretesebbnek az immunellenőrzési pont gátlók (immune checkpoint inhibitors) körébe tartozó anti-CTLA-4, anti-PD-1 és anti-PD-L1 antitest terápia tűnik, de intenzíven vizsgálják különféle vakcinák alkalmazását is¹⁰⁷.

4.5.1. Az immunterápia prediktív markerei

Tekintettel az immunterápia költséges voltára, nagy hangsúlyt kapnak a betegszelekciót célzó biomarkerek. A PD-L1 fehérje expressziója kimutatható egyes daganatokban, valamint a daganatot infiltráló T-lymphocytákban és más immunsejtekben^{108,109}. Egyes vizsgálatok, így pl. a KEYNOTE-001 vizsgálat, összefüggést találtak a tumorsejtek erős PD-L1-expressziója ($\geq 50\%$) és a magasabb ORR, hosszabb PFS és OS között pembrolizumabbal kezelt NSCLC-s betegekben¹¹⁰. Habár a KEYNOTE-001 és más vizsgálatok is ígéretesnek ítélték meg a PD-L1-expresszió, mint biomarker alkalmazását, számos kérdés vár még megválaszolásra a klinikai gyakorlatba történő bevezetésig. A tüdőrák ismertén heterogén tumor, így egy kicsiny biopsziás minta PD-L1-expressziója nem reprezentálja kellőképpen az egész daganatot¹¹¹. A PD-L1-expresszió ráadásul dinamikusan változhat, így különbség lehet egy primer tumor és annak metasztázisa között, emellett nem kellően ismert a PD-L1-expresszió esetleges változása kemoterápia hatására^{112,113}. További fontos kérdés a tumorinfiltráló lymphocyták PD-1- és

PD-L1-expressziójának jelentősége, és végül, de nem utolsó sorban az immunhisztokémiai vizsgálatra legalkalmasabb antitest kiválasztása és az immunreakciók kiértékeléséhez elengedhetetlen cut-off érték meghatározása¹¹⁴. Az alapvető probléma jelenleg az eltérő immunhisztokémiai technológiák és protokollok használata az egyes gyógyszerek esetében, ami eleve összehasonlíthatatlanná teszi ezen eredményeket. Mindezek alapján elengedhetetlennek tűnik regionális és nemzetközi validációs vizsgálatok mielőbbi megszervezése és elvégzése.

A klinikai gyakorlatban a rutin patológiai feldolgozás során a daganat számos olyan hisztológiai jellemzői is leírásra kerülnek a HE metszetek vizsgálatakor, amelyeknek valójában nincs terápiát befolyásoló hatásuk. Így például a tumor nekrosis jelenléte, a daganat lepidikus terjedése, érbetörés jelenléte, vagy a tumort infiltráló immunsejtek denzitása. Ezeknek a jellemzőknek a daganatsejtek és az immunsejtek PD-1/PD-L1 expresszióval való kapcsolatát átfogó módon korábban még nem vizsgálták. [18]¹¹⁵

Hasonlóképpen nem vizsgálták még nagy esetszámon tüdő adenocarcinoma agyi áttéteiben a PD-1/PD-L1 expressziót, valamint az intratumorális és az áttét körüli immunsejt denzitást. [19]⁶¹

A primer tüdőrák és az agyi áttét szövetminták PD-1/PD-L1 expressziójának tanulmányozása mellett igen nagy jelentősége lehet a primer tumorból és annak agyi áttétéből származó mintapárok vizsgálatának, hiszen igen kevés adat áll rendelkezésre ezen fehérje expressziók konkordanciájával kapcsolatban. [20]¹¹⁶ Tekintettel arra, hogy nemritkán az agyi áttét műtéti eltávolítása megelőzi a primer tumor verifikálásának lehetőségét, egy ilyen vizsgálat eredményének komoly klinikai relevanciája lehet.

4.6. Az onkoterápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatása

A klinikai gyakorlatban az onkoterápiák – így a kemoterápia és a sugárterápia – hatásosságát rendszerint a képalkotó eljárásokkal megfigyelhető tumor volumen változás alapján ítéljük meg. A daganat térfogatának változatlanlansága ugyanakkor nem feltétlenül jelenti azt, hogy a terápia hatására nem következett be strukturális vagy molekuláris változás. Éppen ezért, a hagyományos CT vizsgálatokat egyre inkább felváltják a metabolikus aktivitás változását is detektálni képes vizsgálmódszerek, így a perfúziós CT,

a PET-CT, a dinamikus MRI és a diffúziós MRI¹¹⁷. Ezen módszerekkel már pontosabb képet kaphatunk a daganaton belüli szerkezeti változásról, például nekrosis megjelenéséről laphámrákban, vagy egy kezdetben szolid szerkezetű adenocarcinoma lepidikus terjedési mintázatúvá alakulásáról. Mindezek a képalkotó eljárások azonban nem adnak információt a tüdőrákok szöveti biomarkereinek funkcionális állapotáról, így azokról sem, amelyeknek egyes terápiák szempontjából prediktív értéke lehet. Tüdőrák esetében a kezeletlen primer tumorból vett bronchoscopos szövettani minta, valamint a neoadjuváns kemoterápia utáni sebészi minta összehasonlítása kiváló alapot teremt a szöveti biomarkerek tanulmányozásához¹¹⁸.

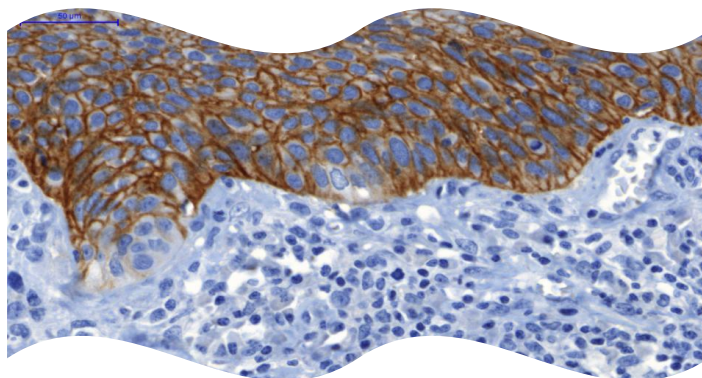
Munkacsoportunk 62 beteg kemoterápia előtti bronchoscopos és kemoterápia utáni sebészi archivált szövetmintáin tanulmányozta immunhisztokémiai módszerrel a daganatsejtek Ki-67 proliferációs marker expressziós arányát¹¹⁹. Habár a kemoterápiára válaszolók és a nem válaszolók között nem észleltünk szignifikáns különbséget a Ki-67 expresszió csökkenésének mértékében, vizsgálatunk megerősítette, hogy a kemoterápia hatásának tanulmányozására a neoadjuváns kezelésben részesült betegek szövetmintáinak elemzése alkalmas, és ez megalapozta az ezirányú további vizsgálatainkat.

Az irreszekábilis tüdőrákok kezelésében mind a mai napig döntő szerepet játszik a platinabázisú kemoterápia. Korábbi közlemények arra utaltak, hogy az ERCC1 (excision repair cross-complementation group-1) fehérje – amelynek fontos szerepe van a platina-származékok indukálta DNS-adduktok kijavításában – a platinabázisú kemoterápiák negatív prediktív markere lehet¹²⁰. Nem állt rendelkezésre azonban kellő adat arra vonatkozóan, hogy az ERCC1 protein expresszió hogyan változik platinabázisú kemoterápia hatására. [21]¹²¹ [22]¹²² Hasonlóképpen, nem volt kellően ismert, hogy kemoterápia hatására változik-e a tüdőrák immunterápiájának prediktív markereként alkalmazott PD-L1 fehérje expresszió. [23]¹²³

Az elmúlt évek kutatásai alapján a tüdőrák diagnosztikájában felhasznált markerek egy részéről (pl. TTF-1) kiderült, hogy prognosztikai jelentőségük is van. Hasonlóképpen, a korábban csak prognosztikai faktorként ismert markerek többségéről (pl. EGFR, PD-L1) egyre inkább bebizonyosodik, hogy prediktív értékkel is bírnak. A prognosztikai markerek

nemcsak a daganat biológiai viselkedéséről nyújthatnak információkat, hanem bizonyos szervspecifikus esetekben (pl. agyi áttét) a gyógyszeres kezelés megválasztásában is irányt mutathatnak. A tüdőrák molekuláris célzott terápiájának és immunterápiájának prediktív markerei nemcsak az eredményesebb kezelést szolgálják, hanem jelentős költséghatékonyságot is eredményezhetnek. Emellett különösen megnőhet a jelentőségük akkor, amikor a beteg életkora, performance statusa és/vagy társbetegségei miatt ezen onkoterápiáknak még az alkalmazhatósága is megkérdőjeleződik.

A jelen disszertáció célja, hogy a tüdőrák diagnosztikus, prognosztikus és prediktív markereit vizsgáló saját tanulmányok eredményeit összefoglalja, és elhelyezze azokat a szakirodalomban fellelhető kutatási eredmények szövevényes hálózatában.



5. CÉLKITÚZÉSEK

1. A TTF-1 fehérje expresszió differenciáldiagnosztikai értékének meghatározása primer és áttéti tüdő adenocarcinomákban. [1]
2. Egyes claudin fehérjék expressziójának tanulmányozása normál hörgőhámában és a tüdőrák főbb szövettani altípusaiban, továbbá prognosztikai szerepük meghatározása nem-kissejtes tüdőrákban. [2, 3]
3. Nagy betegszámú kohorszban a primer tüdőrák lokalizációja és a távoli áttétek helye, megjelenési ideje és a megjelenéstől számított túlélés összefüggéseinek vizsgálata. Az agyba korán, illetve későn metasztatizáló tüdőrákok klinikopatológiai tulajdonságainak jellemzése, különös tekintettel az agyi áttét körül kialakuló ödémára. [4, 5]
4. Protein expressziós különbségek vizsgálata primer tüdőrákokban és azok agyi áttéteiben. [6-8]
5. Platinabázisú kemoterápia mutagén hatásának vizsgálata tüdő adenocarcinomában, és ennek kapcsolata az áttétképződéssel. [9]
6. Az EGFR státusz vizsgálata tüdőrákban, különös tekintettel a klasszikus és ritka EGFR mutációk közti különbségekre. [10-14]
7. A KRAS mutáció prognosztikai és prediktív értékének, továbbá a távoli áttét helyével való kapcsolatának vizsgálata tüdő adenocarcinomában. [15-17]
8. Az immunterápia prediktív faktorainak vizsgálata primer tüdő adenocarcinomában és agyi áttétekben. [18-20]
9. Platinabázisú kemoterápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatásának vizsgálata tüdőrákban. [21-23]

6. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Valamennyi vizsgálatban döntő szerepem volt a vizsgálat megtervezésében, a betegkohorsz kialakításában, az adatbázis felépítésében, a statisztikai eredmények értékelésében, továbbá a kézirat megírásában. Számos vizsgálatban részt vettem egyrészt a TMA (tissue microarray) kialakításában a reprezentatív tumorterületek kijelölésével, másrészt a HE (hematoxin-eozin) festett metszetek elemzésében, a daganatok szövettani altípusának, illetve a daganatok HE metszeten vizsgálható patomorfológiai jellegzetességeinek meghatározása céljából. A legtöbb vizsgálatban magam végeztem az immunhisztokémiai reakciók kiértékelését és a szövettani képanyag összeállítását. Az EGFR és KRAS vizsgálatok során a tumormintákból a mutációk meghatározását vagy a társszerző kollaborációs partnerek végezték, vagy azokra a rutin betegellátás keretében került sor.

A #9 közleményben szereplő genetikai vizsgálatokat és a komplex statisztikai kiértékelést a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontjának kutatói végezték, szerepem a betegkiválasztásban, a klinikai adatok és minták biztosításában, a szükséges engedélyek és betegbeleegyező nyilatkozatok megszerzésében, valamint az exitust követően a haladéktalan kórboncolás megszervezésében volt.

A #17 vizsgálatban csak a betegpopuláció kialakításában, valamint az EGFR, pEGFR, ErbB2, pErbB2 és TTF-1 IHC reakciók kiértékelésében és képi dokumentálásában vettem részt, ezért a továbbiakban a munkának csak ezt a részét tárgyalom részletesen a módszerek leírásánál, az eredmények ismertetésénél és a megbeszélés során.

6.1. Betegcsoportok

A jelen disszertációban bemutatott 23 vizsgálatban összesen több mint 4600 beteg szövettani mintáit és/vagy klinikopatológiai paramétereit elemeztük. Az 1. és a 2. táblázatban bemutatjuk ezen betegek legfontosabb klinikopatológiai jellemzőit és az alkalmazott főbb vizsgálómódszerek esetszámait.

#	Betegszám	Férfi/Nő	Átlag-életkor (év)	Szövettan (mintaszám)				Tüdőrák stádium (esetszám)			
				ADC	SCC	SCLC	Egyéb	I	II	III	IV
1	50*	30/20	60	50	-	-	-	50	-	-	-
2	104	54/50	59	46	30	15	13	89	15	-	-
3	137	76/61	58	95	42	-	-	137	-	-	-
4	1126	541/585	62	1126	-	-	-	116	80	308	622
5	575	311/264	60	272	99	118	86	**59	32	120	343
6	59	41/18	57	22	32	-	5	30	15	8	6
7	52	36/16	57	20	29	-	3	26	13	7	6
8	119	56/63	61	134	-	-	-	28	7	12	72
9	1	1/0	25	1	-	-	-	-	-	-	1
10	1	0/1	66	1	-	-	-	-	-	-	1
11	136	55/81	56	136	-	-	-	NA	NA	NA	NA
12	419	203/216	64	419	-	-	-	I-IIIa: 68		IIIB-IV: 351	
13	50	NA	NA	50	-	-	-	NA	NA	NA	NA
14	110	50/60	57	110	-	-	-	110	-	-	-
15	505	262/243	61	505	-	-	-	-	-	167	338
16	500	245/255	62	500	-	-	-	-	-	-	500
17	65	27/38	62	65	-	-	-	20	12	23	10
18	208	104/104	59	208	-	-	-	-	-	-	208
19	268	125/143	68	268	-	-	-	I-IIIa: 268			-
20	61	30/31	60	61	-	-	-	**22	15	16	6
21	17	11/6	51	9x2	8x2	-	-	6	5	5	1
22	46	29/17	57	19x2	27x2	-	-	**11	9	16	4
23	28	19/9	57	14x2	12x2	-	2x2	**13	6	7	-
Σ	4637	2306/2281	58	4149	326	133	107	840	332	954	2294

*Emellett 50 egyéb szervi primer tumor tüdőáttétét vizsgáltuk kontrollként. **Az ismert klinikai stádiumok megoszlása (összesen 31 betegnél nem volt ismert). NA: nincs adat (186 betegnél). Az összevont stádium adatoknál arányos megoszlással számoltunk.

1. táblázat. A disszertáció alapját képező 23 vizsgálatban szereplő primer tüdőrákos betegek száma, valamint a főbb klinikopatológiai jellemzők

#	Betegszám	Klinikai adat-feldolgozás esetszám	Radiológiai adat-feldolgozás esetszám	Szövetminta (mintatszám)			IHC vizsgálat antitestek száma	EGFR FISH vizsgálat esetszám	EGFR/KRAS mutáció analízis esetszám
				primer tumorból	agyi áttétből	tumor párok			
1	50	-	-	50	-	-	1	-	-
2	104	-	-	104*	-	-	5	-	-
3	137	137	-	137	-	-	5	-	-
4	1126	1126	1126	-	-	-	-	-	-
5	575	575	575	-	-	-	-	-	-
6	59	59	-	59	26	26	29	-	-
7	52	52	-	52	26	26	29	-	-
8	119	-	.	67	67	15	3	-	-
9	1	1	-	1	1	3	-	-	WGS
10	1	1	1	1	-	-	1	1	1
11	136	136	9	136	-	-	1	127	135
12	419	419	151	419**	-	-	-	-	419
13	50	-	-	50	-	-	1	-	-
14	110	-	-	110	-	-	2	-	110
15	505	505	505	505**	-	-	-	-	505
16	500	500	500	-	-	-	-	-	-
17	65	-	-	65	-	-	5	-	65
18	208	208	208	-	208	-	2	-	-
19	268	-	-	268	-	-	2	-	154
20	61	61	-	-	-	61	2	-	15
21	17	17	17	17x2	-	-	6	-	-
22	46	46	46	46x2	-	-	1	-	-
23	28	28	28	28x2	-	-	2	-	-
Σ	4637	3871	3166	2102	328	79	97	128	1404

*: 22 reprezentatív tumormintán mRNS szint meghatározás is történt. **: Az esetek kb. 1/3-ában citológiai minta került feldolgozásra. WGS: Whole Genome Sequencing.

2. táblázat. A disszertáció alapját képező 23 vizsgálatban szereplő primer tüdőrákos betegek száma, valamint az alkalmazott főbb vizsgálómódszerek esetszámai

Az egyes kohorszok közti átfedés mértéke nem érte el a 10%-ot. Valamennyi vizsgálatba hazai betegeket vontunk be, akiknek döntő többsége (95%) az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben került ellátásra. 2200 betegnél csak klinikai és radiológiai adatfeldolgozás történt, míg közel 2500 esetben primer tüdőrák és/vagy agyi áttét archivált szövetmintáit analizáltuk. 79 esetben ugyanazon beteg primer tumorát és annak távoli áttétét, döntően agyi áttétét, tehát mintapárokat tanulmányoztunk. Az agyi áttétek sebészi eltávolítására legtöbbször az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben került sor, míg ezen minták patológiai kiértékelése a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt. Mindezek alapján a betegek sebészi ellátását és daganatuk patológiai diagnosztizálását illetően relatíve homogén betegcsoportok kialakítására nyílt lehetőségünk.

A vizsgált tüdődaganatok szövettani besorolása a vizsgálat évének megfelelő WHO (World Health Organization) tüdőrák klasszifikáció alapján történt. Hasonlóképpen, a daganatok TNM osztályozását a vizsgálat évében érvényben lévő TNM beosztás alapján végeztük.

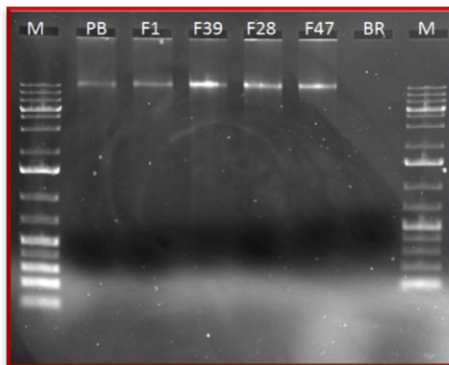
Az immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok döntő többségében a minták sebészi reszekcióból származtak, és valamennyi esetben formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintát dolgoztunk fel. Ezzel szemben az EGFR és KRAS mutáció meghatározására a betegek kb. 1/3-ában bronchoscopos mintavételből, transthoracalis tűbiopsziából, vagy malignus mellkasi folyadékgyüleméből származó citológiai preparátumból került sor. Az EGFR és KRAS mutáció analízisek a Semmelweis Egyetem I. és II. sz. Patológiai Intézetében történtek, és a vizsgálatok nagyobb részében a rutin patológiai mintafeldolgozás részét képezték.

A #1 vizsgálatban kontrollként 50 – nem pulmonális eredetű – adenocarcinoma szolgált.

A #2 vizsgálatban az immunhisztokémiai vizsgálatok mellett 22, szövettanilag reprezentatív tumormintán mRNS szint meghatározás is történt.

A #17 esettanulmányunk 6 órán belül elvégzett kórboncolás során eltávolított daganatminták mínusz 80°C-on archivált szövetmintáinak elemzésén alapult. Minőségellenőrző vizsgálatunk során agaróz gélelektroforézissel igazoltuk, hogy az autopsziás vizsgálatból származó fagyasztott szövetből izolált DNS minták nem fragmentáltak, hasonlóan a friss vérből izolált DNS mintához (7. ábra). Ezt követően

történt meg mind a recidív primer tumorból, mind pedig a többszörös áttétekből a teljes genom szekvenálás (whole genome sequencing = WGS).

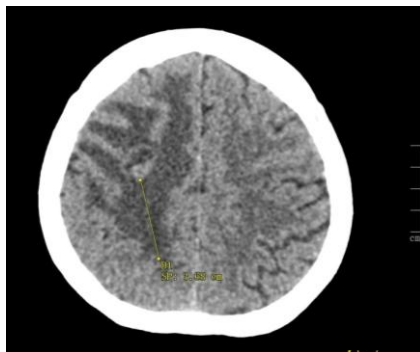


7. ábra. Gélelektroforézis a haladéktalan kórboncolással nyert ultramélyfagyasztott tumorminták (F1, F39, F28, F47) DNS fragmentáltságának megítélésére, összehasonlítva a friss vérből izolált DNS mintával (PB)

6.2. Peritumorális agyödéma megítélése

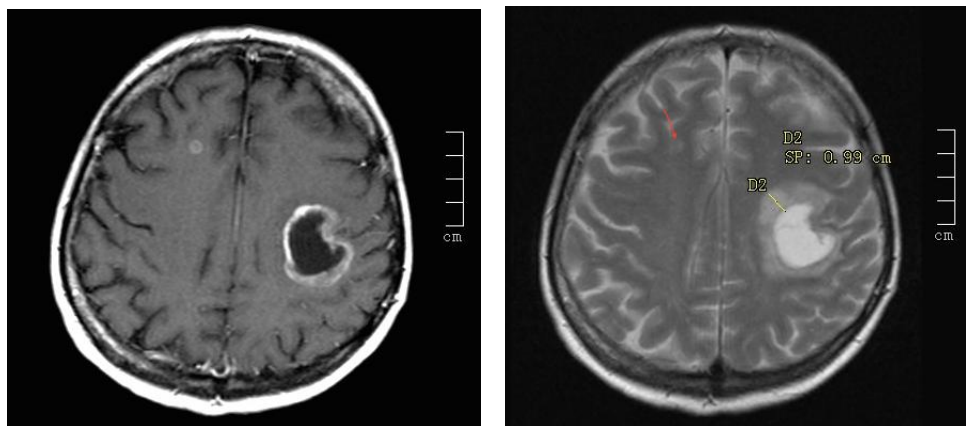
Az agyi áttétek körül megjelenő ödémát az agyi CT és MRI vizsgálatok képanyagát és a hozzá tartozó leleteket áttekintve vizsgáltuk. A radiomorfológiai adatok alapján 3 kategóriát hoztunk létre. Jelentősnek tekintettük az ödémát, ha az 10 mm-nél nagyobb volt, mérsékeltnek pedig, ha 1-10 mm között volt. Meghatároztuk azon eseteket is, ahol nem volt vizenyő kimutatható.

Az ödéma méretének meghatározását a képalkotót megjelenítő program beépített mérőeszközeivel végeztük (Syngo Plaza, Siemens). A CT képeken az ödémát perifokális hipodenzitásként azonosítottuk, vastagságát pedig a daganat legnagyobb axialis kiterjedésénél mértük a tumor szélétől a hipodenzitás határáig sugárirányban (8. ábra).



8. ábra. Koponya áttét CT felvétele. Tüdőrák jobb oldali frontális lebenyi agyi metasztázisa, jelentős (>10 mm-es) peritumorális ödémával

A peritumorális ödéma meghatározását az MRI képeken is hasonlóan végeztük el. A tumor határát pontosan meghatároztuk a kontrasztos T1 súlyozott képek segítségével, és azonos magasságban lemértük a T2 súlyozott vagy FLAIR (*fluid attenuation inversion recovery*) képeken a perifokális hiperdenzitást a tumor határától a hiperdenzitás széléig sugárirányban (9. ábra).



9. ábra. Koponya MRI felvétel: Tüdőrák okozta multiplex agyi metasztázis

A bal oldali centrális áttét körül <10 mm-es peritumorális ödéma látható. A jobb oldali frontális kis áttét körül nincs ödéma, és maga a kis tumor is csak alig okoz jelzavart a T2-súlyozott képen (B: piros nyíl). A T1-súlyozott kontrasztos (A) és a T2-súlyozott (B) képek teljesen identikus szeletek, ahogy az a sulcusok mintájából is látszik.

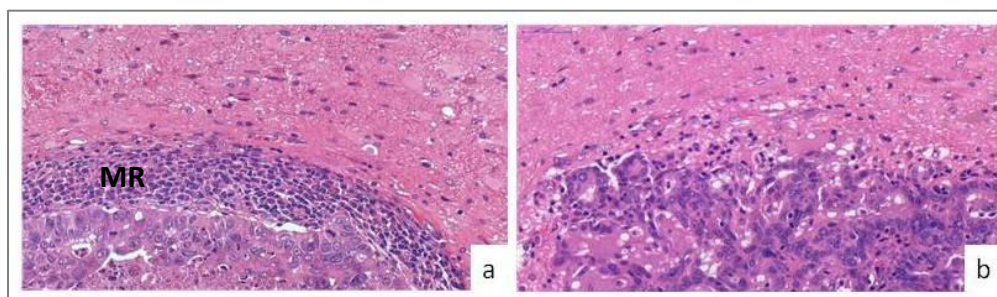
Legtöbbször a legnagyobb axiális tumorméret magasságában mértük a peritumorális ödéma szélességét. A koponyacsonthoz közeli felszínes elváltozások esetén azonban a peritumorális ödéma kifejezetten aszimmetrikusan, döntően a csonttal ellentétes oldalon jelent meg a mélyebb állományba terjedve, így ekkor a mérést abban a szeletben és síkban végeztük, ahol az ödéma a legnagyobb kiterjedésű volt.

Egyes betegeknél nem volt lehetőség az agyi képalkotás képi dokumentációjának részletes vizsgálatára, ilyen esetekben az írásos radiológiai lelet alapján határoztuk meg a peritumorális ödéma kategóriáját, hagyatkozva a radiológus általi mérési adatokra.

A #5 betegcsoportban 413 esetben volt radiológiai információ elérhető a peritumorális ödéma mértékéről. Az – 52 beteget tartalmazó – #7 betegcsoportunkban, ahol a primer tumor és agyi áttét klinikopatológiai összehasonlítását végeztük, peritumorális ödémára vonatkozó információ 20 esetben volt elérhető.

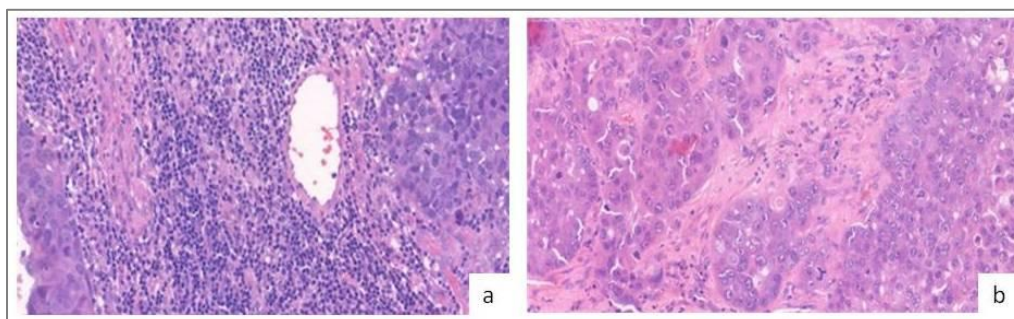
6.3. Fénymikroszkópos szövettani jellemzők vizsgálata

A #18 vizsgálatban a HE festett metszeteken meghatározásra került az adenocarcinomák (ADC) differenciáltsági foka (grade I-III). Rögzítettük emellett, ha a tumorban nekrózis volt jelen, ha érbetörés volt megfigyelhető, és meghatároztuk a daganatban a lepidikus terjedési mód %-os arányát. Ez utóbbi alapján lepidikus terjedésű komponenssel rendelkezőnek tartottuk a tumort, ha ez az arány $\geq 20\%$ volt. A #3 és a #13 vizsgálatban ugyancsak elkülönítettük a lepidikus terjedésű ADC-ket a solid variánstól. A #19 és #20 vizsgálatunk során a primer tüdő és agyi áttét minták HE festett metszetein meghatároztuk, hogy a daganatsziget körül jelen van-e mononukleáris sejtekből álló infiltrátum, azaz mononukleáris gyűrű (mononuclear ring = MR) (10. ábra).



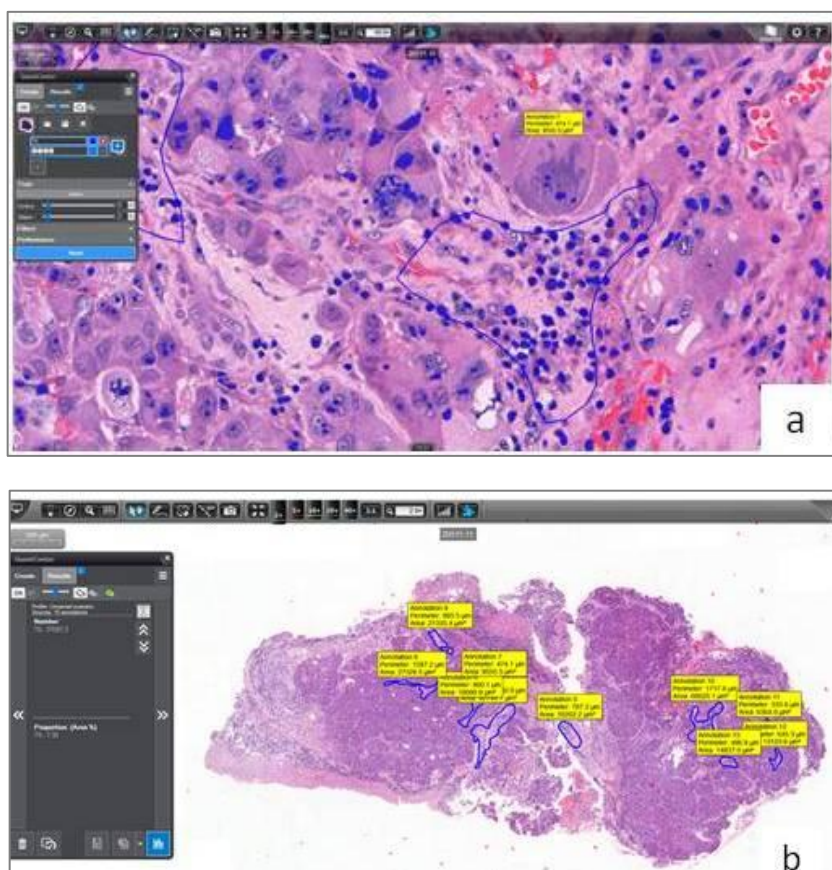
10. ábra. Az agyi áttét és a normál agyszövet között mononukleáris gyűrű jelen van (a), nincs jelen (b). HEx200

Meghatároztuk emellett a daganat stromájában megfigyelhető mononukleáris sejtek mennyiségét is az egyes minták HE festett metszetein. Ennek során a lymphocyták, macrophagok és plazmasejtek jelenlétét egyaránt figyelembe vettük. Két csoportot hoztunk létre az alapján, hogy a tumor stromának több vagy kevesebb, mint 20%-ában voltak megfigyelhetőek gyulladásos sejtek (11. ábra).



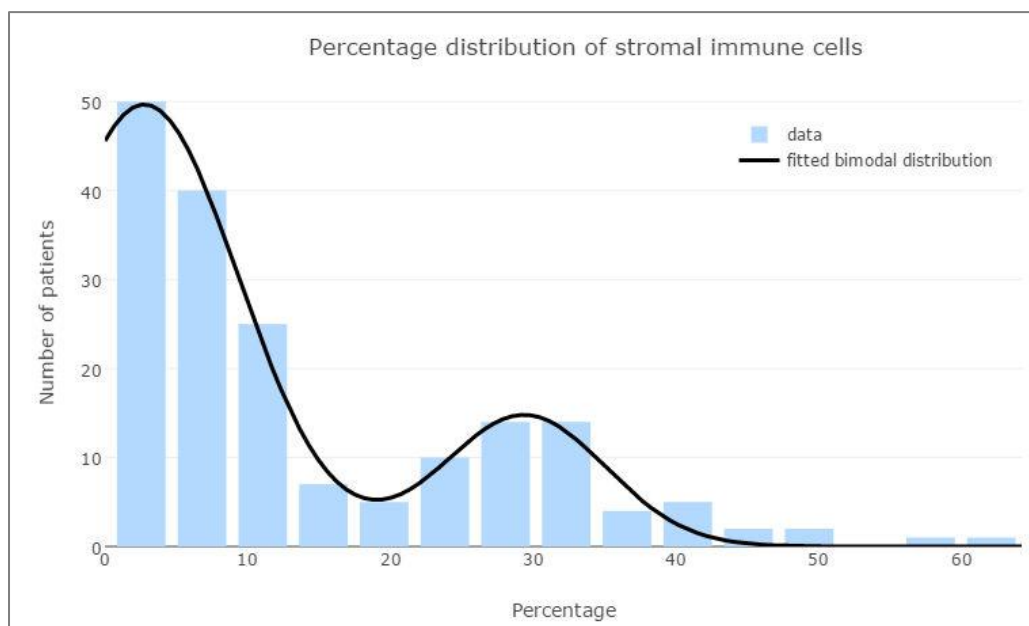
11. ábra. Tüdő ADC-ben mononukleáris sejtek a stroma $>20\%$ -ában (a), $<20\%$ -ában (b) vannak jelen. HEx200

Tüdő ADC esetén az intratumorális mononukleáris sejtes infiltráció meghatározásakor nem beszélhetünk általánosan elfogadott, klinikailag releváns határértékről. A 20%-os cut-off alkalmazása Tian és mtsai munkájának eredményén alapult, akik tripla-negatív emlőcarcinomákat vizsgálva határozták meg ezt az értéket¹²⁴. Ezen határérték tüdő ADC-ben történő alkalmazhatósága érdekében a stromában jelen lévő mononukleáris sejtek mennyiségét 179 tüdő ADC agyi áttét mintában digitális méréssel határoztuk meg CaseViewer szoftver QuantCenter moduljának segítségével (3DHISTECH Ltd, Budapest, Magyarország) (12. ábra). Ehhez a metszeteket Panoramic 250 Flash szkennерrel (3DHISTECH Ltd, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk, majd kijelöltük a tumor stroma reprezentatív részeit (a), és Pattern Quant modullal megtanítottuk a programnak az immunsejtek felismerését. Ennek eredményeképpen a program automatikusan leszámolta a kijelölt területek méretét és az ott található immunsejtek számát, és megadta a tumor stromát infiltráló immunsejtek területre vetített %-os arányát (b).



12. ábra. A tumor stromában jelen lévő mononukleáris sejtek mennyiségének meghatározása digitális módszerrel.

A 179 mintában lement stromális mononukleáris sejtek mennyisége a 13. ábrán látható grafikonról olvasható le.



13. ábra. Az intratumorális mononukleáris sejtek mennyiségének eloszlása.

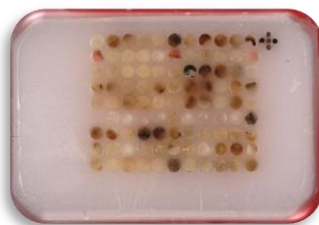
Az oszlopokra illesztett eloszlási görbe kétcsúcsú eloszlást mutat, melynek minimuma 20% körül mutatkozik. A mérés jól mutatja, hogy a 20%-os cut-off érték tüdő ADC-ben is jól alkalmazható, így ezen határérték alapján sorolhatjuk a betegeket intenzív ($\geq 20\%$), vagy gyenge ($< 20\%$) intratumorális mononukleáris sejtes infiltrációval bíró csoportba.

A digitális mérésre nem alkalmas tumormintákon (ahol a HE festés nem volt elég kontrasztos ahhoz, hogy a program megfelelően el tudja különíteni a sejteket) ezen paramétert szemikvantitatív módon, fénymikroszkóp segítségével határoztuk meg.

6.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

6.4.1. TMA konstrukció

A TMA-kat TMA Master (3D HISTECH Ltd, Budapest, Magyarország) berendezéssel készítettük. A reprezentatív tumorterületeket HE festett metszeteken jelöltük ki, melynek segítségével ezen területek re-lokalizálhatóvá váltak az FFPE donor blokk mintákon. A mintákból három, egyenként 2 milliméter átmérőjű, reprezentatív szövethengert helyeztünk át a befogadó (recipiens) blokkba. Rendszerint 70 szövethengert tartalmazó recipiens blokkot használtunk (14. ábra). Az orientáció megkönnyítése céljából, továbbá az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz kontroll szövetként, normál máj, tonsilla, placenta és vese mintákból helyeztünk el 1-1 szövethengert minden TMA blokkban. Az elkészült TMA blokkokból 4 µm vastagságú metszetek készültek.



14. ábra. 70 tumormintát tartalmazó TMA recipiens blokk

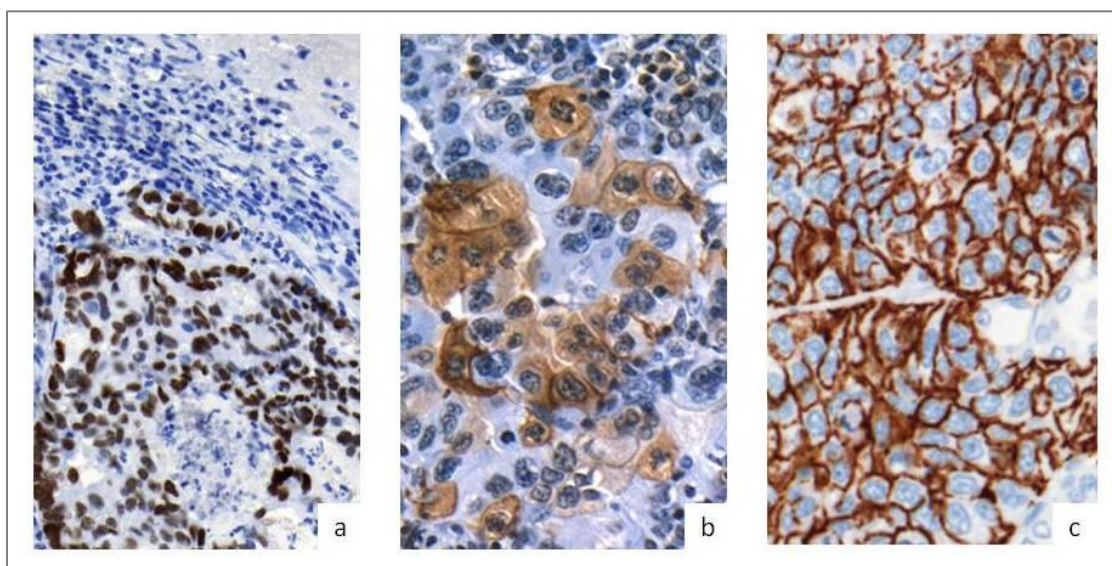
A TMA rendkívüli költséghatékonysággal rendelkezik, továbbá alkalmazásával lehetővé válik standard reakciókörülmények (antigén feltárás, reagens mennyiség, inkubációs idő és hőmérséklet) alkalmazása, ami növeli az IHC reakciók kiértékelésének pontosságát.

6.4.2. IHC módszerek.

Az eredeti FFPE blokkból [#10, #11, #13, #18-23] vagy a TMA blokkból [#6-8, #14, #17] 4 µm vastagságú metszetek készültek, majd adhézios szilánnal bevont felszínű SuperFrost Ultra Plus tárgylemezekre helyeztük őket (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Germany). A tárgylemezeket 60°C-on legalább 2 órán keresztül melegítettük, hogy az IHC reakció előtt megfelelő adhéziót érjünk el. Deparaffinálást követően az endogén peroxidázok blokkolására 30 percig 1%-os hidrogén-peroxid tartalmú metanolt alkalmaztunk. A hő indukálta epitóp feltárásra (heat-induced epitope retrieval (HIER)) egyes esetekben 6,1-es pH-val rendelkező feltáró oldatban (TRS, Dako, Glostrup, Denmark) 0,1 M Tris bázis és 0,01 M etilén-diamin-tetraacetát (pH 9,0; T/E)

keverékét használtuk, más esetekben 0,01 M citrát puffert (pH 6,0) alkalmaztunk. Egyes esetekben a metszeteket tartalmazó tárgylemezeket és az oldatokat 5 literes rozsdamentes acél kuktában (Tefal Clipso), 2 percig, teljes nyomáson inkubáltuk. A rutin vizsgálatokban nem használt antitesteket először kontroll szöveteken optimalizáltuk kétszeres hígításban, a korábban leírt feltárási körülmények között. Az előkezelt metszeteket az elsődleges antitesttel vagy szobahőmérsékleten 90 percig, vagy pedig +4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, melyet a polymer-HRP conjugate EnVision+ detektáló rendszer (Dako) követett, vagy 41°C-on Ventana ES (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) automata immundetektáló rendszert alkalmaztunk 40 percig. A peroxidáz aktivitást DAB (3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid) hidrogén-peroxid kromogén szubsztrát kittel mutattuk ki. A sejtmagokat rendszerint hematoxilinnel vizualizáltuk, majd a metszeteket glicerín-zselatin segítségével fedtük le.

Valamennyi esetben alkalmaztunk negatív és pozitív kontrollt, a negatív kontrollok primer antitest alkalmazása nélkül végzett reakciók voltak, míg pozitív kontrollként az adott antitest standard pozitív szövetmintáját alkalmaztuk. Az IHC reakciók eredményeit leggyakrabban szemikvantitatív módon, egymástól függetlenül, két patológus elemezte. A kiértékelésnél a standard kritériumok mellett figyelembe vettük a pozitív sejtek százalékos arányát és a festődés szubcelluláris lokalizációját is (15. ábra). A metszetek digitalizálását Mirax Scan (Göttingen, Germany) segítségével végeztük el, és a mikroszkópos képeket is ennek segítségével készítettük.



15. ábra. Immunpozitivitás szubcelluláris lokalizációja tüdőrákban.

a: p53 nukleáris pozitivitás tüdő ADC agyi áttétében (x200), b: pErbB2 citoplazmatikus pozitivitás tüdő ADC-ben (x400), c: claudin-1 membranózus pozitivitás tüdő SCC-ben (x400)

6.4.3. Alkalmazott primer antitestek.

6.4.3.1. A #6 és #7 vizsgálat során alkalmazott primer antitestek

A #6 és #7 vizsgálatban alkalmazott antitesteket és hígításokat a 3. táblázat foglalja össze.

	Primer antitest	Klón	Gyártó	Előkezelés	Hígítás
1	Pan-Cytokeratin	Mouse/AE1-AE3	DakoCytomation	T/E	kit 2x
2	CK7	Mouse/OV-TL12/30	DakoCytomation	T/E	kit 2x
3	Collagen XVII	Mouse/6D1	Házilag készített	T/E	1:100
4	Collagen XVII	Mouse/9G2	Házilag készített	T/E	1:30
5	CD44v6	Mouse/VFF-7	NovoCastra	T/E	1:50
6	β -catenin	Mouse/17C2	NeoMarkers	T/E	1:30
7	E-cadherin	Mouse/36B5	Novocastra	Citrát	1:20
8	EGFR	Mouse/EGFR.25	Novocastra	T/E	1:100
9	p16	Mouse/6H12	Novocastra	T/E	1:30
10	p27 ^{kip1}	Mouse/SX53G8	DakoCytomation	T/E	1:50
11	p53	Mouse/PAb240	DakoCytomation	T/E	1:50
12	p53	Mouse/DO-7	DakoCytomation	T/E	kit 2x
13	p63	Mouse/4A4	NeoMarkers	T/E	1:50
14	Cyclin D1	Rabbit/ SP4	NeoMarkers	T/E	1:100
15	Cyclin D3	Mouse/DCS-22	DakoCytomation	T/E	1:30
16	Ki-67	Mouse/MIB-1	DakoCytomation	T/E	kit 2x
17	Topoisomerase II- α	Mouse/3F6	Novocastra	T/E	1:20
18	Caspase-3	Mouse/3CSP03	NeoMarkers	T/E	1:300
19	Caspase-8	Rabbit/polyclonal	NeoMarkers	T/E	1:200
20	Caspase-9	Rabbit/polyclonal	NeoMarkers	T/E	1:200
21	CAS	Mouse/30F12	Novocastra	T/E	1:50
22	Bax	Rabbit/polyclonal	Santa Cruz Biothechnology	T/E	1:2000
23	nm23	Rabbit/polyclonal	DakoCytomation	Citrát	1:100
24	Bcl-2	Mouse/124	DakoCytomation	T/E	kit 2x
25	Fas-310	Mouse/GM30	Novocastra	T/E	1:200
26	TTF-1	Mouse/SPT24	Novocastra	TRS	1:50
27	Chromogranin-A	Rabbit/polyclonal	DakoCytomation	T/E	1:3000
28	HBME-1	Mouse/HBME-1	DakoCytomation	T/E	1:100
29	Syndecan-1	Mouse/MI15	DakoCytomation	Citrát	1:50

T/E = 0.1 M Tris-HCl : 0.01 M EDTA, pH 9.0, Citrát = 0.1 M Citric acid-sodium citrate buffer, pH 6.0, TRS = Modified citrate buffer pH 6.1 (DakoCytomation)

3. táblázat. Az IHC vizsgálatok során alkalmazott antitestek, előkezelések és hígítások

A #6 és #7 vizsgálat során az immunreakciók kiértékelésénél fontos cél volt az immunreakciók erősségének osztályozása, elemzése és egységessé tétele, valamint a reakciók és a minták jobb differenciálhatósága. Például a pan-CK festődés a CK7-nél erősebb reakciót adott, ami indokolta eltérő pontrendszer alkalmazását. Az immunfestődések értékelésére alkalmazott pontrendszereket a 4. táblázat foglalja össze.

	0	1	2	3	Antitestek
1. pontrendszer	<2%	2-10%	11-40%	>40%	p53 (N)*, p63 (N)
2. pontrendszer	<5%	5-20%	21-50%	>50%	CK7 (C), BP180 (C), EGFR (CM), p16 (N), cyclin D1 (N), cyclin D3 (N), topol α (N), caspase-3 (C), caspase-8 (C, pN), caspase-9 (C, N), Bax (C, N), Bcl-2 (C), FAS-310 (CM), TTF1 (N), chromogranin A (C), HBME-1 (CM, C), syndecan-1 (CM, C)
3. pontrendszer	<10%	10-30%	31-60%	>60%	pan-cytokeratin (C), CD44v/6 (CM, C), β -catenin (CM), E-cadherin (CM), p27 ^{kip1} (N), Ki-67 (N), CAS (C, N), nm23 (C, N)

* Festődési mintázatok: CM: cell membrane (sejtmembrán), C: cytoplasmic (citoplazmatikus), N: nuclear (nukleáris), pN: perinuclear (perinukleáris)

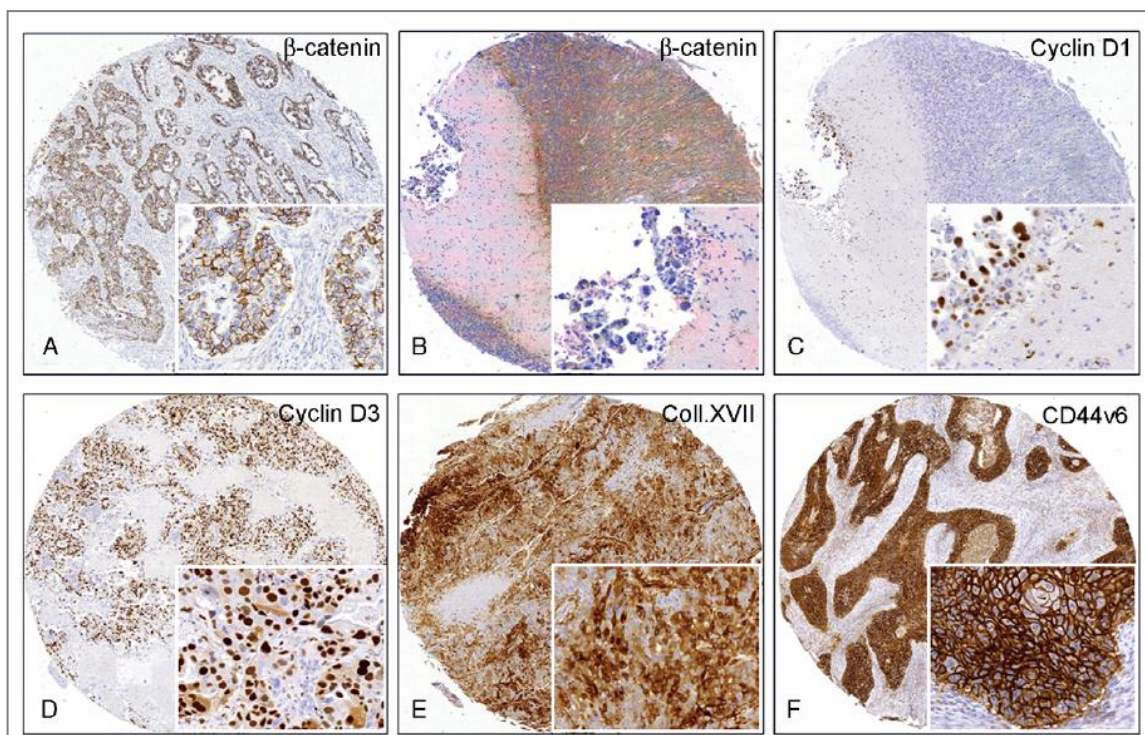
4. táblázat. A #6 és #7 vizsgálat során az immunfestődések értékelésére alkalmazott pontrendszerek

A tüdőrákok operált agyi áttéteiből készült TMA-kon elvégzett IHC reakciók egy részét a 16. ábra szemlélteti.

A sejtmembrán részleges β -catenin vesztese (A) látható nagysejtes tüdőrák agyi áttétében.

A β -catenin immunfestődés teljes eltűnése (B), valamint erőteljes cyclin D1 expresszió (C) figyelhető meg tüdő adenocarcinoma agyi áttétében.

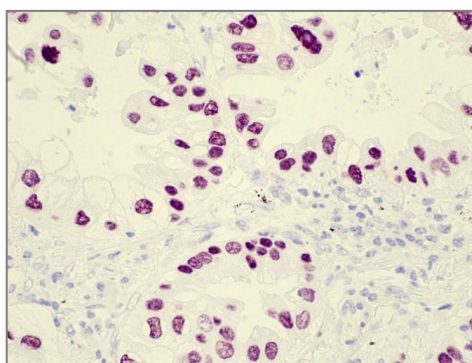
Cyclin D3 overexpresszió (D), collagen XVII overexpresszió (E), valamint CD44v6 overexpresszió (F) észlelhető tüdő laphámrák agyi áttétében.



16. ábra. Reprezentatív IHC reakciók TMA szövethengereken a #6 és #7 vizsgálatban szereplő szöveti biomarkerekkel tüdőrákok agyi áttéteiben (x100, inzert: x200)

6.4.3.2. TTF-1 IHC vizsgálata

A #1 vizsgálatban elvégzett TTF-1 IHC reakció során DAKO M3575 monoklonális antitestet, 1%-os Vector (H3300) antigén feltáró folyadékot és 1:50-es hígítást alkalmaztunk. A pozitív tumorsejtek %-os arányától függően a daganatokat negatív (<5%), gyengén pozitív (5-30%), illetve erősen pozitív (>30%) csoportba soroltuk. Az immunpozitivitás nukleáris volt (17. ábra).



17. ábra. Nukleáris immunpozitivitás TTF-1 pozitív tüdő adenocarcinomában (x400)

6.4.3.3. mTOR IHC vizsgálata

A #8 vizsgálat során TMA készítést követően IHC vizsgálatokat végeztünk. Antigén feltáráshoz valamennyi reakciónál citrát puffert (pH 6,0) és kuktát használtunk. A primer antitestek az alábbiak voltak: anti-phospho-mTOR (#2976 klón; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-phospho-S6 (#2211 klón; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) és anti-Rictor (#A500-002A klón; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA). Az első két antitestnél a hígítás 1:100 volt és előhívóként Novolink (Novocastra, Wetzlar, Germany) detekciós rendszert alkalmaztunk, míg a harmadik esetében a hígítás 1:1000 volt, az előhívást pedig Vectastain Elite Universal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) detektáló kittel végeztük.

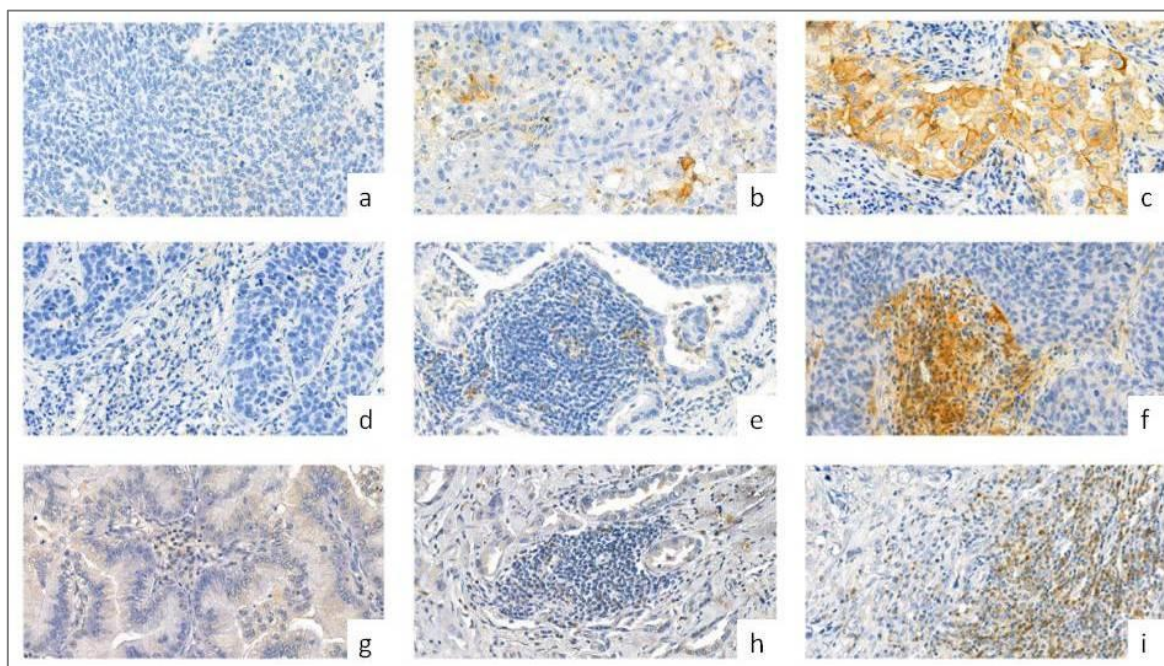
6.4.3.4. ERCC1 IHC vizsgálata

A #21 és a #22 vizsgálat során az ERCC1 immunhisztokémiai reakciót a standard avidin-biotin-peroxidáz komplex módszerrel végeztük el. Citráttal végzett antigén feltárást követően primer antitestként egér 8F1 klón monoklonális ERCC1 antitestet (Abcam, Cambridge, UK) alkalmaztunk 1:50-es hígításban. Az immunpozitivitás nukleáris volt, a tumorokat $\geq 5\%$ -os immunpozitív sejt gyakoriság esetén tekintettük pozitívnak.

6.4.3.5. PD-1 és PD-L1 IHC vizsgálata.

A #18, #19 és #20 tanulmányok során a PD-1/PD-L1 IHC vizsgálatokat a TMA blokkok 4 μ m vastagságú metszetein végeztünk el az előírásoknak megfelelő lépéseket követve Leica Bond-Max automatával (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). A deparaffinálást és a szövetek fixálását követően antigén feltárást és a peroxidáz blokkolást végeztünk. A primer antitestekkel 30 perces inkubálást végeztünk szobahőn, majd a szekunder antitest került a metszetekre. A PD-L1 festéshez SP142-es klont (hígítás 1:100; Spring Bioscience, Ventana; Oro Valley, AZ, USA), kontroll szövetként placentát használtunk. A PD-1 festéshez ab52587 antitestet alkalmaztunk (hígítás 1:100; Abcam, Cambridge, UK), kontroll szövetként tonsilla szolgált. Az immunreakciókat a Bond polymer Refine Detection kittel (DS9800, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) hívtuk elő, a sejtmagokat hematoxilinnel festettük.

Az elkészült metszeteken a tumorsejtek PD-L1 pozitívását, valamint az immunsejtek PD-L1 és PD-1 pozitívását vizsgáltuk. Az immunsejtek vizsgálatakor a lymphocytákat, a plazmasejteket és macrophagokat is figyelembe vettük. A pozitív sejtek százalékos mennyiségét szemikvantitatív módon határoztuk meg. A tumorsejtek esetén 1%, 5% és 50%-os határértékeket, míg az immunsejtekénél 1%, 5% és 10%-os határértékeket alkalmaztunk (18. ábra). A határértékeket a klinikai és kísérletes tanulmányokban alkalmazott határértékek alapján határoztuk meg¹²⁵⁻¹²⁸. Az így kapott adatokból létrehoztunk egy kombinált értéket a POPLAR tanulmányt követve¹²⁹. Ennek megfelelően a tumor- és immunsejtek PD-L1 expressziója alapján négy csoportba soroltuk az eseteket: „nem expresszáló”, „alacsonyan expresszáló”, „közepesen expresszáló” és „magasan expresszáló” (5. táblázat).



18. ábra. A PD-L1 és PD-1 fehérje expresszió tüdő adenocarcinómában. PD-L1 expresszió tumorsejtekben (a=<1%, b=>5%, c=>50%), PD-L1 expresszió immunsejtekben (d=<1%, e=>5%, f=>10%), és PD-1 expresszió immunsejtekben (g=<1%, h=>5%, i=>10%) (x200)

PD-L1 tumorsejtek (TC)		PD-L1 immunsejtek (IC)	
Érték	Pozitív sejtek aránya	Érték	Pozitív sejtek aránya
TC 3	≥50%	IC 3	≥10%
TC 2	≥5% és <50%	IC 2	≥5% és <10%
TC 1	≥1% és <5%	IC 1	≥1% és <5%
TC 0	<1%	IC 0	<1%
Kombinált értékek			
TC 3 vagy IC 3		magasan expresszáló	
TC 2/3 vagy IC 2/3		közepesen expresszáló	
TC 1/2/3 vagy IC 1/2/3		alacsonyan expresszáló	
TC 0 és IC 0		nem expresszáló	
TC: tumorsejt; IC: immunsejt; PD-L1: programozott sejthalál ligand-1			

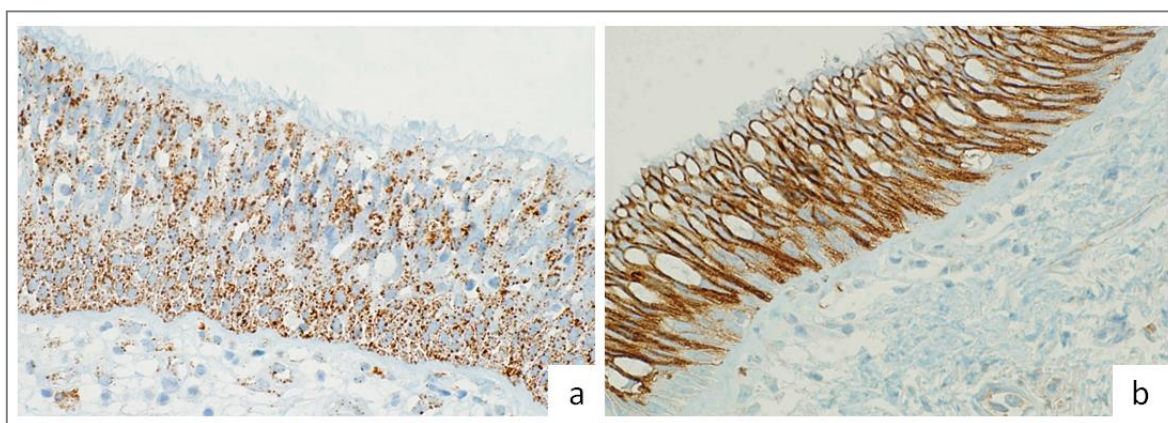
5. táblázat. A POPLAR tanulmány alapján a PD-L1 expresszió meghatározásához létrehozott kombinált értékek

6.4.3.6. Claudin fehérjék IHC vizsgálata.

Az FFPE szövettani blokkokból 4 µm-es metszeteket készítettünk. Deparaffinálást követően az endogén peroxidáz blokkolás 1%-os H₂O₂-methanol oldatban történt 30 percen át, 37°C fokon. Az antigén feltárást mikrohullámú sütőben végeztük. Claudin-1 és -3 esetében két különböző feltáró oldatot alkalmaztunk: 1% Vector [H3300] *Antigen Retrieval Solution* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mikrohullámú sütőben [800 W, 20 perc], valamint Dako *Antigen Retrieval Solution* (Dako, Glostrup, Denmark) mikrohullámú sütőben [800 W, 40 perc]. Claudin-2, -4 és -7 esetében a Vector *Antigen Retrieval Solution*-t használtuk mikrohullámú sütőben 800 W-on, 20 percen át. A metszeteket ezt követően 1 órán át inkubáltuk claudin-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje elleni primer antitestekkel (Zymed, San Francisco, CA, USA), 1:100 hígításban, szobahőn. A claudin-2 és -4 egér monoklonális antitestek, míg a claudin-1, -3 és -7 nyúl poliklonális antitestek voltak. Negatív kontrollként primer antitestet nem tartalmazó hígító oldatot, vagy megfelelő izotípusú IgG szérumot alkalmaztunk. Az antigén-antitest komplexet *Streptavidin—HRP detection system* (Dako LSAB2, K0675) detekciós rendszerrel vizualizáltuk, majd előhívóként 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) volt a

kromogén. A metszeteket Mayer's hemalaun-nal festettük, dehidráltuk, majd fedőlemezzel láttuk el.

A reakciók értékelése az immunpozitív sejtek arányától függően történt: 0: <5%, 1: 5-20%, 2: 21-40%, 3: 41-60%, 4: 61-80%, 5: 81-100%. A daganatsejtek immunpozitivitásának intenzitása csak minimálisan változott az egyes tumorok között, ezért erre a paraméterre a kiértékelés során nem tértünk ki. Tekintettel arra, hogy a normál hörgőhámsejtek valamennyi vizsgált claudin fehérjét expresszálták, ez kiváló belső kontrollt biztosított a kiértékeléshez. Míg a claudin-1, -3, -4 és -7 membranózus festődést mutatott, addig a claudin-2 esetében finoman granulált citoplazmatikus festődés volt megfigyelhető (19. ábra).



19. ábra. Claudin expresszió normál hörgőhámsejtekben (a: claudin-2, b: claudin-7, x400)

6.5. mRNS vizsgálat claudin fehérjék esetében

A claudin IHC-k szempontjából reprezentatív tumormintákon mRNS meghatározást is végeztünk. Ennek során 5 ADC, 8 SCC, 4 SCLC és 5 carcinoid szövetmintát, valamint 9 tumormentes tüdőszövetet tanulmányoztunk.

Az RNS-t az FFPE szövetekből a High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Indianapolis, Indiana, USA) segítségével izoláltuk. A minták méretétől függően 2-8 db, 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A daganatos területek mikrodisszekáltuk. Kontrollként ép tüdőszövetet alkalmaztunk. Minden minta 16 órás proteináz-K emésztésen esett át. Az izolálás minden lépése a gyártó utasításai szerint történt. A teljes RNS izolálást követően a mintákat

-80°C-on tároltuk felhasználásig. A teljes RNS integritását a korábban leírtak szerint ellenőriztük¹³⁰. A reverz traszkripció előtt a teljes RNS-t DNáz kezelésnek vetettük alá. A teljes RNS (500 ng) reverz transzkripciója a következők szerint zajlott: 50 perc, 42°C-on, 30 µl-ben, MuLv reverz transzkriptázzal (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és RNáz inhibitorral (Applied Biosystems), random hexamer primereket (Applied Biosystems) használva. A valós idejű (real time) PCR-t 2 µg cDNS-sel, 25 µl végtér fogatban végeztük az ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) alkalmazásával. Minden reakció 25 µl SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, 1708851) reakcióelegyben zajlott. Az alkalmazott primereket a 6. táblázat foglalja össze.

	Forward	Reverse	Accession number
Claudin-1	ttcgtacctggcattgactgg	gcgcgatatttcttctgcag	GI4559277
Claudin-2	acctgctaccgccactctgt	ctccctggcctgcattatctc	GI9966780
Claudin-3	ctgctctgctgctcgtgtcc	ttagacgtagtccttgcggtcgtag	GI21536298
Claudin-4	ggctgctttgctgcaactgtc	gagccgtggcaccttacacg	GI14790131
Claudin-7	catcgtggcaggtcttgcc	gatggcagggccaaactcatac	GI24496764
Gapdh	gaaggtgaaggtcggagt	gaagatggtgatgggatttc	GI7669491
β-actin	cctggcaccagcacaat	gggccggactcgatcatac	GI15928802
RNS polymerase II	gcaccacgtccaatgacat	gtgcggctgcttcataa	GI14589948

6. táblázat. A claudin real-time PCR vizsgálat során alkalmazott primerek

A valós idejű PCR-ekből két párhuzamos reakciót futtattunk 96-lyukú plate-ekben az alábbiak szerint: kezdeti denaturáció 2 percig, 95°C-on, majd 40 ciklus denaturáció (95°C, 20 másodperc), anelláció (63°C, 30 másodperc) és extenzió (72°C, 1 perc).

Az adatok elemzését a REST software-rel (expression software tool, www.wzw.tum.de/genequantification) végeztük, referenciagénként pedig a GAPDH és β-actin átlagát használtuk.

6.6. EGFR státusz meghatározás

6.6.1. EGFR mutáció analízis

DNS kivonás FFPE anyagból. A #11 vizsgálat során a paraffinos blokkból készült 3-5 db 5 µm-es metszetet 100%-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd 5 mg/ml-es proteináz-K (Sigma-Aldrich) oldattal 50°C-on, 16 órán keresztül emésztettük. A fehérjét 3,3 M-os ammónium-acetát oldattal kicsaptuk, a felülúszót 1ml -20°C-os izopropanollal és 1 ml -20°C-os 70%-os etanollal mostuk, a pelletképződést 5 µl glikogén hozzáadásával segítve. Szárítást követően, a pelletben lévő DNS-t 50µl desztillált vízben oldottuk.

DNS kivonás citológiai kenetekből. A fedőlemezt 40 órás xilolos áztatással eltávolítottuk. A kenetre 200 µl 5mg/ml-es proteináz-K oldatot pipettáztunk, steril sebészi pengével a kenet sejtjeit a folyadékba kapartuk, majd az emésztőoldattal együtt 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe pipettáztuk. Az 50°C-on, 16 órán keresztül tartó emésztést követően az eljárás megegyezett az FFPE anyagoknál leírtakkal.

Nested PCR (polimeráz-láncreakció). Az EGFR gén 18-as, 19-es és 21-es exonjait tartalmazó DNS szakaszokat kétlépcsős – „nested” – PCR-rel amplifikáltuk. A 25 µl-es PCR oldat 1x-es PCR puffert, 0,2 mM-os dNTP-t, 1,5 mM MgCl₂-t, 0,5U PlatinumTaq polimerázt (Invitrogen) és 0,4 µM forward és reverse primert tartalmazott. Az alkalmazott primereket a 7. táblázat foglalja össze.

Név	5'_3' szekvencia
18externalF*	CAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC
18externalR*	CCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG
18nestedF	GCCATGTCTGGCACTGCTTT
18nestedR	AGTAGATGATGGAAATATACAGCTTGC
19externalF	CTGGTAACATCCACCCAGATCACTG
19externalR	GAGATGAGCAGGGTCTAGAGCAGAG
19nestedF	CAGATCACTGGGCAGCATGTGG
19nestedR	CTAGAGCAGAGCAGCTGCCAGACAT
21externalF	CTGAATTCGGATGCAGAGCTTCTT
21externalR	CATCCTCCCCTGCATGTGTAAA
21nestedF	GATGCAGAGCTTCTCCCATGAT
21nestedR	GCATGTGTAAACAATACAGCTAGTGG
19mF	ATCCCAGAAGGTGAGAAAGATAAAATTC

7. táblázat. A nested és a mutáció-dúsító PCR során használt primerek. A *-gal jelölt primerek megegyeznek a Lynch és mtsai által használtakkal⁷³. A többi primer saját tervezés.

A PCR futtatása során touch-down protokollt alkalmaztunk: 1 ciklus: 95°C 2 percig; 10 ciklus: 94°C 30 másodpercig, 62°C – ciklusonként 1°C-kal csökkentve – 30 másodpercig, 72°C 45 másodpercig, 30 ciklus: 94°C 30 másodpercig, 52°C 30 másodpercig, 72°C 45 másodpercig; majd befejezésként 1 ciklus: 72°C 10 percig. A PCR termék mennyiségét 1,5%-os agaróz-gélben történő futtatással ellenőriztük. Elégtelen mennyiség esetén az első PCR 1 µl-jén egy második PCR-t végeztünk, a DNS-szakaszon beljebb lévő primerekkel. A kontamináció elkerülését párhuzamos vízkontroll alkalmazásával ellenőriztük.

Mutáció-dúsító PCR. Az alacsony arányban előforduló mutáns allélek dúsítására a mutáció-dúsító PCR technika Asano és mtsai által leírt, módosított változatát alkalmaztuk¹³¹. A többlépcsős PCR módszer lényege, hogy a vad típusú génszakaszt – a mutáció lehetséges előfordulási helyén, a hot spot-nál – szelektíven hasítjuk.

A 19-es exon PCR termékét a 19mF (forward) és a 19nestedR primerrel PCR reakcióval reamplifikáltuk. A 19mF primer a TTAA_ATAA mutagenézissel megszüntette az egyik olyan restrikciós hasítási helyet, melyet a 19 exon deléciói nem érintenek. 1µl PCR terméket 1 IU MseI restrikciós enzimmel hasítunk 37°C-on, 4 órán keresztül, 5 µl-es reakció-térfogatban. Az enzim a vad típusú, 2239-2242. pozícióban lévő – a L747-R748 aminosavak kódolásában résztvevő – TTAA szekvenciát hasítja, amelyet szinte minden 19-es exon deléció eltüntet. A hasítási terméket Montage® PCR Centrifugal Filter Device-szal (Millipore) szűrtük, majd a 19mF és a 19nestedR primerekkel újabb PCR reakcióval amplifikáltuk. Pozitív kontrollként a H1650 (19-es exon deléciót tartalmazó) és a H358 (vad típusú EGFR-t tartalmazó) sejtkultúrák 3/97 arányú elegyét használtuk, a mintákkal párhuzamosan kezelve.

A 21-es exon PCR termékének 1 µl-jét 1 IU MscI restrikciós enzimmel, 37°C-on, 4 órán keresztül, 5 µl-es reakció-térfogatban hasítottuk. Az enzim a vad típusú TGGCCA szekvenciát hasítja, melyet az T2573G>L858R mutáció GGGCCA-vá alakít. A hasítási terméket Montage® PCR Centrifugal Filter Device-szal szűrtük, majd a 21nestedF és 21nestedR primerekkel – újabb PCR reakcióban – amplifikáltuk. Pozitív kontrollként a H1975 (a T790M mellett L858R mutációt is tartalmazó) és a H358 sejtkultúrák 3/97 arányú elegyét használtuk, a mintákkal párhuzamosan kezelve. A kontamináció elkerülését mindkét eljárás esetében párhuzamos vízkontroll alkalmazásával zártuk ki.

Szekvenálás. A PCR termék szekvenálhatóságát gélfuttatással ellenőriztük. A megfelelő PCR terméket Montage® PCR Centrifugal Filter Device-szal szűrtük. BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kittel (Applied Biosystems, Foster City, CA) végzett Sanger-reakciót követően a terméket DyeEx 2.0 Spin Kittel (Qiagen) tisztítottuk. Formamidos elegyítést és denaturálást követően az elektroforézist ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készüléken végeztük, 61 cm-es kapillárist és POP-6 polimert alkalmazva. A 19-es exon mutáció-dúsító PCR termékét leszámítva, minden PCR terméket két irányból, a nested primerekkel szekvenáltunk. 19-es exon mutáció-dúsító PCR termékét, mivel a 19mF primerhez a deléciós hot spot túl közel van, csak egy irányból, a 19nestedR primerrel szekvenáltuk. A vad típustól eltérő, fenotípust érintő, szekvenciavariációkat csak ismételt PCR reakciót és kétirányú szekvenálást követő, újbóli megjelenés után fogadtuk el mutációnak. Két ellentétes eredményű reakciót követően, a 3. reakció eredménye döntött. A 19-es exon mutáció-dúsító PCR-e során észlelt mutációt követően a DNS izolálás utáni teljes procedúrát megismételtük.

6.6.2. EGFR FISH (fluorescence in situ hybridization)

A #10 esettanulmányban és a #11 vizsgálatban a tumorsejtek EGFR génjének kópiaszámát FISH vizsgálattal, LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Vysis EGFR próbával (Abbott Laboratories, Des Plaines, IL, USA) határoztuk meg. A vörös szín jelöli az EGFR gént, a zöld szín a 7-es kromoszóma centroméráját. A magokat DAPI (kék színű) háttérfestéssel jelöltük. A hibridizációig a metszeteket Discovery Automatic Hybridizator (Ventana, Tucson, AZ, USA) automatával vagy manuálisan Tissue Conversion Kittel (Qbiogene) kezeltük. Utóbbira akkor került sor, ha az automatával történő előkezelést követően a jelerősség és/vagy a minta állapota nem volt megfelelő, és ezért a vizsgálat megismétlésére volt szükség. Az ismétlések során a manuális procedura standardnak mondható, 45 perces emésztési idejét csökkentettük vagy növeltük az első vizsgálatot követően látott mikroszkópos kép alapján (alul- vagy túlemésztettség). A 16 órás hibridizációt követően a minta utókezelését minden esetben a Tissue Conversion Kittel végeztük. A kiértékelést a Capuzzo és mtsai által leírt kritériumrendszer alapján végeztük¹³². FISH pozitívnak nyilvánítottuk a mintát, ha az magas poliszómás (a tumorsejtek $\geq 40\%$ -a tartalmazott ≥ 4 génkópiát) vagy génamplifikált volt (a tumoros

sejtek EGFR/17-es kromoszóma aránya ≥ 2 , vagy ≥ 15 EGFR génkópia/sejt a vizsgált sejtek $\geq 10\%$ -ában). Az alkalmazott próba és a kiértékelés módja egyaránt megegyezett a gefitinib fázis II (S0126) és fázis III (ISEL), valamint az erlotinib fázis III (BR.21) vizsgálataiban használt FISH analízissel¹³³⁻¹³⁵.

6.6.3. EGFR immunhisztokémia (IHC)

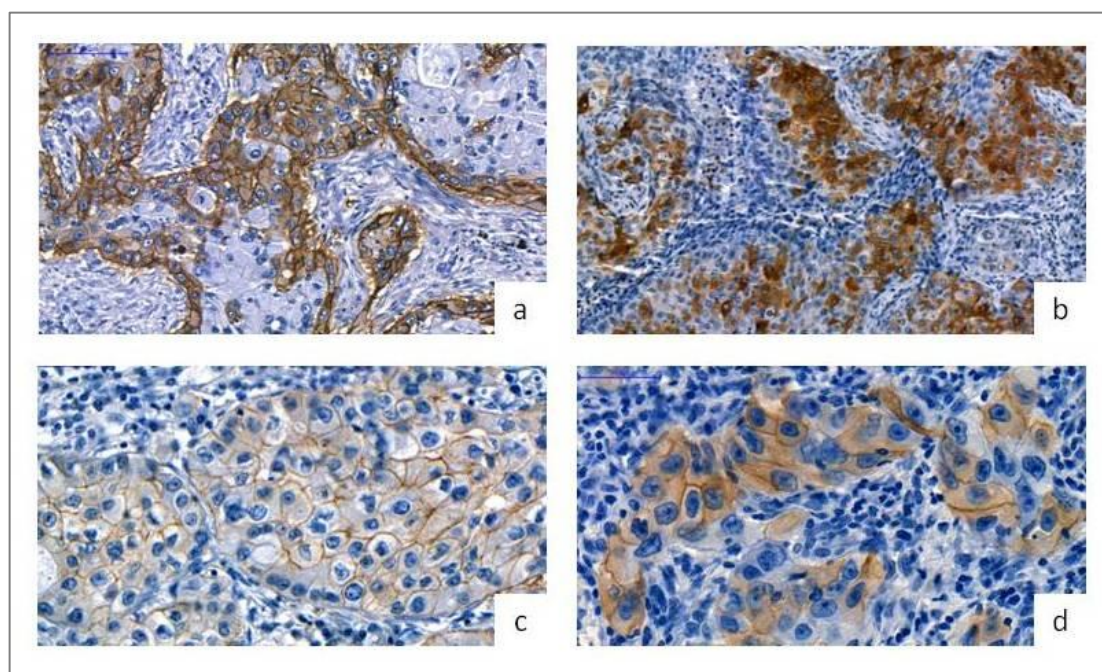
Az EGFR fehérje expresszióját – hematoxinin háttérfestés mellett – leggyakrabban a Dako cég EGFR pharmDxTM kit-jével vizsgáltuk és egér monoklonális anti-humán EGFR (EGFR-EC, klón 2-18C9) primer antitestet használtunk. A #11 vizsgálatban a mintát IHC pozitívnak minősítettük, ha a daganatos sejtek több mint 10%-a mutatott membránfestődést, hasonlóképpen a BR.21 és az ISEL klinikai vizsgálatokhoz^{132,134}. A #11 és #17 vizsgálatokban a pontosabb EGFR státusz megállapítást lehetővé tévő szemikvantitatív IHC pontszámot is meghatároztuk a Capuzzo és mtsai által leírtakhoz hasonlóan: meghatároztuk a membránfestődés intenzitását (0, 1+, 2+ = a kit kontrollmetszetének festődési intenzitásával megegyező, 3+) és az immunpozitív sejtek százalékos gyakoriságát (0%–100%). A két érték szorzata (Hirsch score, H-score) alapján kategorizáltuk a mintákat (0–300)¹³⁵.

A #13 vizsgálatban célunk volt annak vizsgálata, hogy az IHC vizsgálat egyes lépéseinek módosítása milyen hatással van az IHC reakcióra. Ennek érdekében az antigén feltárást nemcsak a gyártó által javasolt módon (100 μ l 0,1% proteináz-K 0,015 mol/L nátrium-azidot tartalmazó TRIS-HCl pufferben, 5 percen át szobahőn, majd 3+2 perc mosás desztillált vízben) végeztük el, hanem megtörtént a metszetek pH 6,0-os citrát oldatban történő inkubálása is 3x5 percen át, mikrohullámú sütőben, 750 Watton. Hasonlóképpen, módosítottuk az inkubációs időt is, így a primer antitesttel (egér monoklonális anti-humán EGFR antitest; klón 2-18C9) való inkubálást a standard mód (szobahőn, 30 percen át) mellett elvégeztük +4°C-on, egy teljes éjszakán át is.

A #14 vizsgálatban az EGFR expresszió mellett meghatároztuk a foszforilált EGFR fehérje (pEGFR) epresszióját is. Ennek során nyúl monoklonális IgG primer antitesteket (pY1173, Epitomics, Burlingame, CA; pY1086, Zymed, Vienna, Austria) alkalmaztunk 1:50-es hígításban.

A #17-es vizsgálatban ismert KRAS mutáns tüdő adenocarcinomákban tanulmányoztuk az EGFR-nek és a pEGFR-nek, továbbá az ErbB2 proteinnek és annak foszforilált alakjának, a pErbB2-nek az expresszióját. TMA készítést követően az IHC vizsgálatokat a standard avidin-biotin-peroxidáz módszerrel végeztük. A primer antitestek és a hígítások az alábbiak voltak: EGFR: 1:100 (Invitrogen, #28-0005), pEGFR: Tyr1086, 1:100 (Thermo, #369700), ErbB2: 1:600 (Dako, #A0485) és pErbB2: Tyr1221/1222, 1:300 (Cell Signaling, #2243).

A kiértékelés H-score alapján történt. Az EGFR és a pEGFR, valamint az ErbB2 és a pErbB2 immunpozitivitás reprezentatív képeit a 20. ábrán mutatjuk be.



20. ábra. EGFR és ErbB2 protein expresszió vizsgálata tüdő adenocarcinoma mintákban
(a: EGFR, x200, b: pEGFR, x200, c: ErbB2, x400, d: pErbB2, x400)

6.7. KRAS mutáció meghatározás

A #15, #16 és #17 vizsgálatokban az FFPE blokkokból készült HE festett metszeteken meghatároztuk a tumorban gazdag mikroszkopikus területeket, majd ezek makrodisszekciója történt. A DNS-t a MasterPureTM DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, WI) segítségével izoláltuk, a gyártó használati utasításainak megfelelően. A KRAS mutációkat mikrofluidika alapú restrikciós fragmentum kimutató rendszer segítségével szűrtük ki, amely esetében a minimálisan szükséges mutáns tumorsejt-arány 5%. A sense primer egy mismatch primer volt, és a PCR terméke a vad típusú KRAS gén esetében tartalmazta a BstNI vagy a BglI enzimek által felismert restrikciós helyeket. A DNS amplifikációt az AmpliTaq Gold (Applied Biosystems Inc., CA) készlettel végeztük, a primer párok pedig a következők voltak: KRAS 12-es kodon: 50-GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-30 és 50-GGTCCTGCACCAGTAATA TG-30; és 13-as kodon: 50-GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGA CCT-30 és 50-GGTCCTGCACCAGTAAT ATG-30. A reakció mix összetétele reakciónként a következő volt: 2,5 µl 10 PCR puffer + Mg²⁺, 200 µM minden dNTP-ből, 1,00 pM/primer, 0,8 U AmpliTaq Gold DNS polimeráz. A reakciók mindkét esetben az alábbiak szerint zajlottak: 38 ciklus; denaturáció 95°C-on, 1 percig; primer anelláció 55°C-on, 1 percig; elongáció 72°C-on, 5 percig. A felamplifikált termékeket restrikciós endonukleázokkal emésztettük: 80U BstNI-vel (New England BioLabs, MA) a 12-es kodon esetében, 60°C-on és 80U BglI-vel a 13-as kodonnál, 37°C-on; az emésztés mindkét esetben 4 óra alatt, 30 µl térfogatban történt. Az emésztett PCR termékeket mikrofluidika alapú Experion gélelektroforézis rendszerrel (Experione DNA 1 K Analysis Kit; Bio-Rad Laboratories, CA) vizsgáltuk. Meghatároztuk a mutáns és a vad típusú sávok denzitásának arányait, és – az érzékenységi határnak megfelelően – azokat a mintákat, amik 5% feletti nem vad típusú sávot tartalmaztak, mutáció pozitívnak nyilvánítottuk. A mutáns mintákban található bázispár cseréket az ABI3130 Genetic Analyzer System (Life Technologies, Carlsbad, CA) segítségével, a BigDye[®] Terminator v1.1 Kittel ellenőriztük és határoztuk meg.

6.8. Teljes genom szekvenálás (whole genome sequencing = WGS)

A #9 vizsgálatban a mutációs folyamatok elemzéséhez frissen lefagyasztott vér- és boncolási tumormintákat használtunk, melyekből a genomiális DNS-t High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) segítségével vontuk ki. Ezen minták teljes genom szekvenálását Illumina HiSeq X Ten (Edinburgh, Genomics) készüléken végeztük, 60-80-szoros lefedettséggel, 150 bázispáros párosított végű szakaszokon. A szekvenciákat a GRCh38/hg38 referencia genomra illesztettük a Burrows-Wheeler illesztési algoritmus segítségével¹³⁶. Az indelek újraillesztése a Genome analysis Toolkit (GATK 3.4. verzió) segítségével történt meg¹³⁷.

A szubklonális mutációk kiemelt fontossága miatt egy pontosított eljárást fejlesztettünk ki az oligometasztatikus tumorok mutációinak keresésére. Kiindulópontnak a GATK MuTect programot használtuk¹³⁸, melynek eredményeit az összes közös eredetű primer, illetve áttét mintára vonatkozóan egyesítettük. A mutációs adatokat a tumorminták közös eredetét kihasználva pontosítottuk. Az így kapott, szűrt mutációs adatokból Venn diagramot készítettünk az egyes variánsok különböző mintákban való előfordulása alapján, majd ebből kiindulva tumor filogenetikai fát szerkesztettünk.

Többféle onkoterápiás kezelés (cisplatin, gefitinib, afatinib) nyomát kerestük a genomban. A pontmutációk kontextusát is tartalmazó mutációs spektrumokat a COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) adatbázis alapján elemeztük¹³⁹, és bontottuk fel az ott publikált mutációs spektrumokra a deconstructSigs R programcsomag segítségével¹⁴⁰. A kezelés hatására történő változások specifikus felismerését a TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) adatai alapján, kezeletlen dohányzó és nemdohányzó páciensek adatainak elemzésével igazoltuk. Az áttétek keletkezésének idejét az egyes – kezelés által okozott – variánsok különböző mintákban meghatározott allélfrekvenciája alapján becsültük meg. A mutációkat az InterVar program segítségével annotáltuk¹⁴¹, és a „patogén” vagy „lehetséges, hogy patogén” kategóriákba tartozó mutációkat vizsgáltuk. A „driver” mutációkat tartalmazó gének kópiaszámát a lefedettség feltérképezésével állapítottuk meg. Az EGFR gén amplifikációját eredményező szerkezeti variánsokat (kromoszóma transzlokáció, intrakromoszomális transzlokáció, hosszú deléción) a CREST (*Clipping REveals STructure*) algoritmus segítségével határoztuk meg¹⁴². A mutáns EGFR gén kópiaszámát amplifikált régióban található heterozigóta polimorfizmusok és mutációk allélfrekvenciái alapján becsültük meg. Ehhez a tumortartalmat a TP53 gén heterozigóta állapotvesztéses régiójában található polimorfizmusok allélfrekvenciája alapján becsültük meg.

6.9. Statisztikai próbák

A legtöbb vizsgálat esetében az adatok kiértékeléséhez SPSS 17.0 programot (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA), GraphPad Prism 5 szoftvert (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), illetve az R és python programnyelvek statisztikai csomagjait használtuk. A kategorikus változókat χ^2 próbával, illetve 2x2-es kontingencia táblázatok segítségével Fisher egzakt teszttel hasonlítottuk össze. Odds ratio-t (OR) is 2x2 kontingencia táblázatok segítségével számoltunk. A folytonos változókat normális eloszlás esetén ANOVA (analysis of variance) vizsgálattal elemeztük, post hoc tesztként Scheffe módszert alkalmaztunk. A normalitást Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük. Nemparametrikus változók esetén 2 kategóriás összehasonlításnál Mann-Whitney U tesztet, több kategória esetén Kruskal-Wallis próbát alkalmaztunk. Wilcoxon tesztet azon esetekben használtunk, ahol párosított változókat hasonlítottunk össze (például a primer tumor és az agyi metasztázis azonos immunhisztokémiai markerét). A korrelációs analízis során a Spearman-féle korrelációs együtthatót határoztuk meg.

Amennyiben a vizsgált betegcsoporton szükség volt többszörös összehasonlítások elvégzésére is, statisztikailag szignifikánsnak végül csak azokat az eredményeket tüntettük fel, melyek a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően is szignifikánsak maradtak. Az így kapott p értékeket p^* -ként jelöltük.

A túlélés elemzéséhez egyváltozós modellben Kaplan-Meier görbéket hoztunk létre, a statisztikai különbséget log-rank módszerrel ellenőriztük. Multivariáns analízishez Cox hazard modellt használtunk. A vizsgálat elvégzéséhez kiválasztottuk a változókat, melyek feltételezhetően a legnagyobb mértékben befolyásolták a túlélést, ezért minden változón elvégeztük az univariáns vizsgálatot, mely ebben az esetben a Kaplan-Meier görbe felrajzolását és a log-rank számítás elvégzését jelentette. Folytonos változók esetén kategorikus, 2 elemet tartalmazó változókat hoztunk létre az irodalomban leggyakrabban használt cut-off értékek alapján. Az összefüggéseket minden esetben csak akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$ volt.

A #19 vizsgálat során annak érdekében, hogy klinikailag még egységesebb betegcsoportokat vizsgáljunk, 4 alcsoportot hoztunk létre a primer tumor kezelése és az agyi áttét szoliter vagy multiplex megjelenése alapján: (1) a primer tumor műtéti kezelése és szoliter agyi áttét (51 fő), (2) a primer tumor műtéti kezelése és multiplex agyi áttét (25

fő), (3) nem operált primer tumor és szoliter agyi áttét (90 fő), (4) nem operált primer tumor és multiplex agyi áttét (42 fő). A modellszelekció a „survival” R csomag segítségével történt. A többváltozós modellbe foglalt változók kiválasztásához elsőként az adott változó értéke szerint definiált betegcsoportokra a Kaplan-Meier módszerrel meghatároztuk az SKM(t) túlélési görbéket, majd ezeket log-rank teszttel vetettük össze. Az arányos kockázat fennállásának teszteléséhez minden változó esetén manuálisan vizsgáltuk meg a túlélési görbék $-\log(-\log(\text{SKM}(t)))$ transzformáltját. Azokban az esetekben, amikor ötnél kevesebb változóra teljesült az arányos kockázat fennállása, az adott betegcsoportra nem illesztettünk többváltozós modellt. A modellszelekciót Collett általános útmutatása alapján a következő módon végeztük: kezdetben a változók azon halmazára illesztettük a többváltozós Cox-regressziós modellt, melyekre egyaránt teljesült az arányos kockázat fennállása és a log-rank teszt p-értéke nem haladta meg a 0,25-öt¹⁴³. Azon változók közül, melyek hasonló mennyiségeket jellemeznek (például a PD-1 expresszió pozitív immunsejteket leíró különböző küszöbértékek), azt az egyet választottuk a többváltozós modellbe, melynél a log-rank p-érték a legkisebb volt és teljesült az arányos kockázat fennállása. Az így illesztett kezdeti modellt tovább finomítottuk a legkevesbé szignifikáns hatású változók fokozatos kizárásával, mialatt az AIC (*Akaike information criterion*) értékét nem engedték lépésenként több mint 10%-kal növekedni. Végül azokat a változókat, amelyeknek a log-rank teszt eredménye alapján nem volt szignifikáns hatása (de teljesült rá az arányos kockázat fennállása), egyesével hozzávettük a Cox-modellhez, és megtartottuk azokat, amelyek az AIC értékét csökkentették.

A #6 vizsgálatban klaszter analízist végeztünk. Az immunfestés alapján meghatározott értékeket a betegekről elérhető összes adattal együtt egy hagyományos MS-Excel munkafüzetbe jegyeztük le Liu et al. útmutatása alapján¹⁴⁴. A mért értékeket binárisra alakítottuk (a negatív vs. pozitív kategóriákat a 0 vs. 1-3, vagy a 0-1 vs. 2-3 felosztással meghatározva) és a Pearson-féle χ^2 , illetve a Fisher egzakt tesztekkel elemeztük. Statisztikailag szignifikánsnak azokat az eredményeket tekintettük, melyeknél a p-érték nem haladta meg a 0,05-öt. A különféle biomarkerek expresszióját a 3 NSCLC csoport között minden lehetséges páronkénti összehasonlítással korreláltattuk.

A biomarkerek expressziója és a betegek túlélésére vonatkozó adatok közti esetleges összefüggést a Kaplan-Meier görbék meghatározásával és a rajtuk végzett log-rank teszttel vizsgáltuk. Az immunfestéssel meghatározott expressziós értékeket emellett átalakítottuk egy olyan alakra, melyet a Deconvoluter szoftver fel tud dolgozni klaszteranalízisre. Felügyelet nélküli hierarchikus klaszterezéssel, a Cluster szoftver segítségével létrehoztuk a betegek leszármazási fáját az alapján, hogy milyen expressziós profil volt náluk megfigyelhető. A korrelációkat Treeview heat-map-en ábráztuk, ahol a páciensek közti távolság, tehát a dendrogram vízszintes ágainak a hossza fordítottn arányos az expressziós profilok közti hasonlósággal.

6.10. Etikai engedélyek

Az archivált szövettani blokkok felhasználásához az alábbi etikai engedélyekkel rendelkezünk: *„Tüdőtumorok prognosztikai és prediktív faktorainak vizsgálata”* (ETT-TUKEB, 510/2013, 52614-4-213/EKU), *„Tüdőtumorok prognosztikai és prediktív faktorainak vizsgálata fiatal betegekben, vagy családi halmozódás esetén”* (ETT-TUKEB, 7214-1/2016/EKU), *„Tüdőtumorok prognosztikai és prediktív faktorainak vizsgálata”* ETT-TUKEB 23636-2/2018, 23636/10/2018/EÜIG) és *„Agyi áttétek genomikai elemzése, klonális eredet, szervi specificitás vizsgálata”* (ETT-TUKEB 86/2015).

7. EREDMÉNYEK

7.1. Differenciáldiagnosztikai és prognosztikai markerek vizsgálata tüdőrákban

7.1.1. TTF-1 fehérje expresszió vizsgálata tüdőrákban [1]

A #1 vizsgálatban primer és áttéti tüdő adenocarcinomák TTF-1 expresszióját hasonlítottuk össze.

A normál tüdőszövetben intenzív nukleáris immunfestődés volt megfigyelhető a II típusú pneumocytákban és a Clara sejtekben, ami a primer ADC esetekben jó belső kontrollként szolgált.

Az 50 primer ADC közül 46 TTF-1 pozitívnak bizonyult, és közülük 30 tumorszövet mintában intenzív festődést figyelhattunk meg (8. táblázat). Az áttéti ADC esetek közül kizárólag a két pajzsmirigyrák eredetű minta volt pozitív; mindkettőben intenzív nukleáris immunfestődés volt látható.

			TTF-1 IHC		
		Esetszám	–	+	++
Primer tüdő ADC (n=50)		50	4	16	30
Áttéti tüdő ADC (n=50)	emlőrák	13	13	-	-
	vastagbélrák	13	13	-	-
	végbélrák	13	13	-	-
	veserák	7	7	-	-
	gyomorrák	2	2	-	-
	pajzsmirigyrák	2	-	-	2

8. táblázat. TTF-1 IHC primer és áttéti tüdő ADC-ben

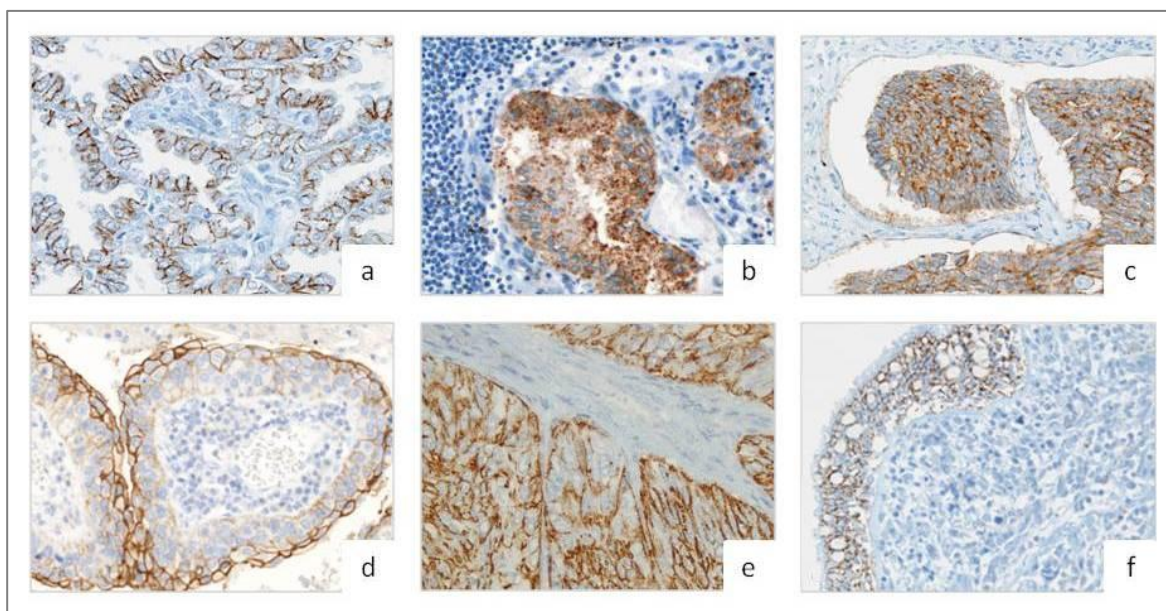
Tekintettel arra, hogy pajzsmirigyrákok leg többje expresszálja a TTF-1-et, eredményeink alapján primer tüdő ADC-ben a TTF-1 IHC 100%-os specificitása és 92%-os szenzitivitása igazolható.

7.1.2. Claudin fehérje expresszió tüdőrákok szövettani altípusaiban [2]

Claudin expresszió normál hörgőhámában. A normál hörgőhámsejtek valamennyi vizsgált claudint expresszálták, azonban a celluláris lokalizáció különböző volt.

A claudin-1 leggyakrabban basolateralis membrán pozitivitást mutatott, míg a claudin-2-re minden esetben citoplazmatikus festődés volt jellemző, gyakran apicalis predominanciával. Ezzel szemben a claudin-3, -4 és -7 esetében körkörös membránpozitivitás volt megfigyelhető.

Claudin expresszió a tüdőrákok szövettani altípusaiban. Az immunpozitív tumorokban a daganatsejtek általában diffúz módon és meglehetősen egyenletesen festődtek. Az immunfestődés intenzitása hasonló, vagy akár erősebb is volt, mint a szomszédos normál hörgőhám, a celluláris lokalizáció pedig rendszerint megegyezett (21. ábra). Ugyanazon tumor különböző területein csak elvétve figyeltük meg heterogenitást az immunfestődésben.



21. ábra. Claudin expresszió tüdőrákok főbb szövettani altípusaiban

a: claudin-1 ADC-ben, b: claudin-2 SCLC-ben, c: claudin-3 SCLC-ben, d: claudin-4 ADC-ben, e: claudin-7 SCC-ben, f: claudin-4 carcinoidban, pozitív normál hámsejtek mellett negatív tumorsejt festődés. (x200)

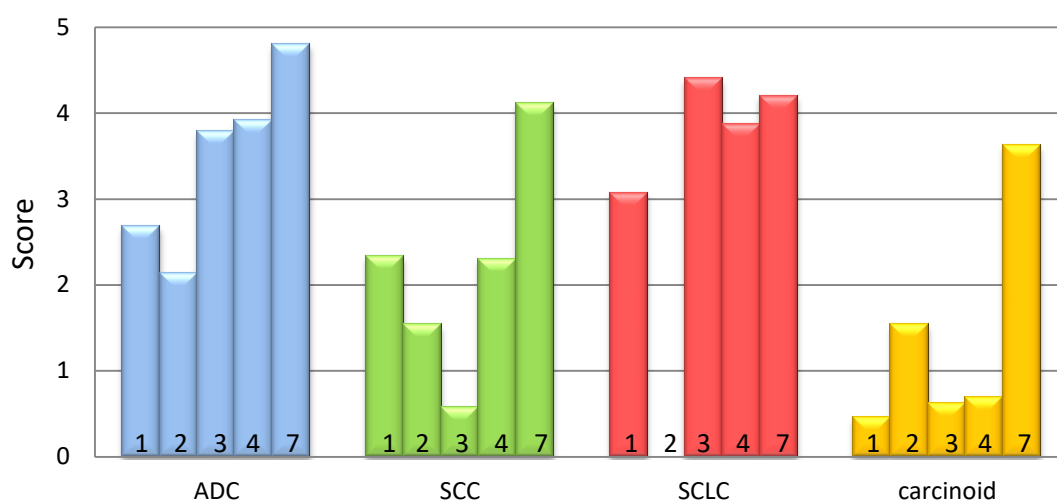
A pozitív immunreakciók kiértékelésére 1-5 közötti score rendszert alkalmaztunk a pozitív tumorsejtek %-os arányától függően. Az eredményeket a 9. táblázatban foglaltuk össze és

a 22. ábrán szemléltetjük. A végső score értékek a pozitív és negatív értékeket egyaránt magukban foglalták.

	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-7
ADC (átlag ± SD)	2.67 ± 1.91	2.13 ± 1.63	3.78 ± 1.09	3.91 ± 1.13	4.78 ± 0.47
SCC (átlag ± SD)	2.33 ± 2.14	1.53 ± 1.57*	0.57 ± 1.33	2.30 ± 1.58	4.10 ± 1.16
SCLC (átlag ± SD)	3.07 ± 0.88	0 ± 0	4.40 ± 0.74	3.87 ± 1.19	4.20 ± 1.37
Carcinoid (átlag ± SD)	0.46 ± 1.13*	1.15 ± 2.19*	0.62 ± 1.50*	0.69 ± 1.70*	3.62 ± 2.10

SD: standard deviáció, *: Az átlagértékhez képest magas SD érték a csak kevés esetben megfigyelhető erős immunpozitivitás következménye

9. táblázat. Claudin expresszió tüdőrákok főbb szövettani altípusaiban



22. ábra. Claudin-1, -2, -3, -4, -7 expresszió tüdőrákok főbb szövettani altípusaiban

A 10. táblázatban bemutatjuk a claudin IHC eredmények Mann-Whitney U-próbával végzett páros összehasonlításainak valószínűségi értékeit.

	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-7
SCC-ADC	ns	ns	0.0001	0.0001	0.0053
SCLC-ADC	ns	0.0002	ns	ns	ns
SCC-SCLC	ns	0.0009	0.0001	0.0019	ns
ADC-carcinoid	0.0006	ns	0.0001	0.0001	ns
SCC-carcinoid	0.0076	ns	ns	0.0045	ns
SCLC-carcinoid	0.0001	ns	0.0001	0.0004	ns

ns: statisztikailag nem szignifikáns

10. táblázat. Tüdőrákok szövettani altípusainak claudin expressziók szerinti összehasonlítása

ADC és SCC esetében szignifikáns különbség volt megfigyelhető a claudin-3, -4 és -7 expresszióban. Ezzel szemben az ADC és az SCLC között csak a claudin-2 expresszióban találtunk szignifikáns különbséget. Az SCLC és a carcinoid összehasonlításakor jelentős különbséget észleltünk a claudin-1, -3 és -4 expresszióban.

Mivel az IHC átlag score értékek nem jelezték az IHC negatív tumorok arányát, ezért erre vonatkozó analízist is végeztünk. ADC-ben a claudin-1 12/46, míg a claudin-2 14/46 esetben volt negatív. Ezzel szemben SCC-ben nemcsak ennek a két fehérjének, hanem a claudin-3-nak (25/30) és a claudin-4-nek (6/30) az esetében is megfigyelhettünk negatív tumorokat. Az SCLC a claudin-2-t nem expresszálta, ugyanakkor a többi claudinra nézve – egyetlen claudin-7 esettől eltekintve – valamennyi szövetminta pozitívnak bizonyult. A carcinoidok ezzel szemben valamennyi claudin esetében mutattak immunnegativitást. A reprezentatív 22 mintán elvégzett RT-PCR analízis a különböző claudinok mRNS és protein expressziójának párhuzamos változását igazolta. A claudin-1, -2, -3, -4 és -7 mRNS expressziót a tüdőrákok szövettani altípusaiban a 11. táblázatban mutatjuk be.

	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-7
SCC- <u>ADC</u>	U 2.735	U 1.266	U 3.660	U 1.604	U 4.766
SCLC- <u>ADC</u>	U 1.308	U 1.361	D 3.138	U 1.334	U 1.988
SCC- <u>SCLC</u>	U 2.336	U 1.593	U 15.155*	U 1.329	U 2.617
ADC- <u>carcinoid</u>	D 7.240	D 1.496	D 4.121	D 4.403*	D 4.724*
SCC- <u>carcinoid</u>	D 2.647	D 1.181	D 1.126	D 2.744	D 4.434
SCLC- <u>carcinoid</u>	D 5.537	D 1.099	D 12.933*	D 3.300*	D 2.377
NORM- <u>ADC</u>	D 1.308	D 2.364	D 1.112	U 4.463*	D 1.583
NORM- <u>SCC</u>	D 1.253	U 1.484	U 1.226	U 3.178	D 4.713
NORM- <u>SCLC</u>	U 1.785	U 2.364	U 16.222*	U 3.779*	D 1.801
NORM- <u>carcinoid</u>	D 9.468*	D 3.021	D 4.582	U 1.014	D 7.480*

Az értékek a hányszoros különbséget jelzik összehasonlítva a második szövettani típust (aláhúzott, vastagított) az elsővel. NORM: normál tüdőszövet. U: up-regulált, D: down-regulált. *p < 0.05.

11. táblázat. Claudin-1, -2, -3, -4 és -7 mRNS expresszió tüdőrákok szövettani altípusaiban

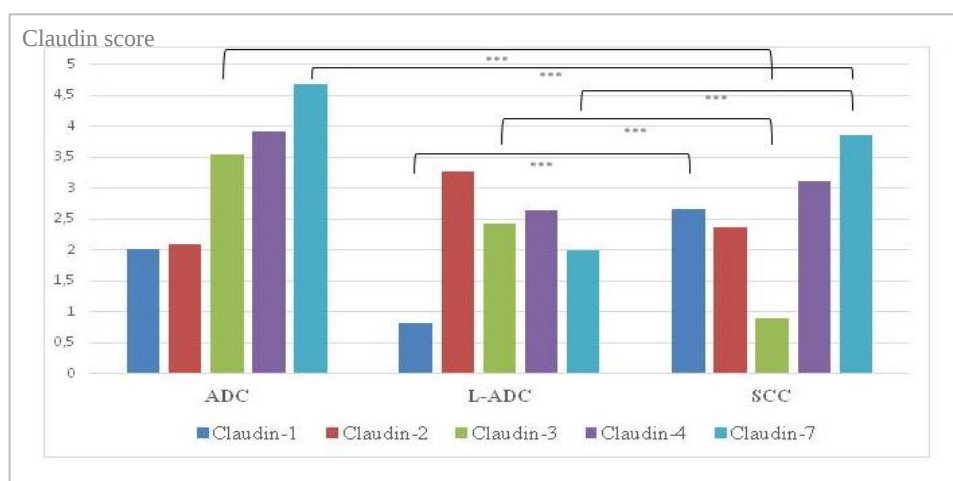
Jelentős claudin-3 up-regulációt figyelhattunk meg SCLC-ben a carcinoiddal és az SCC-vel szemben. A carcinoidokban emellett csökkent claudin-3, -4 és -7 mRNS expresszió volt detektálható valamennyi egyéb szövettani típussal összevetve, ami egybeesik az IHC eredményekkel.

Az RT-PCR vizsgálat során referenciaként normál tüdőszövetből készült homogenizátum szolgált. ADC-ben claudin-4 up-regulációt figyelhattunk meg összehasonlítva a normál szövetet, SCC-ben azonban nem találtunk szignifikáns különbséget. Ezzel szemben SCLC-ben claudin-3 és -4 up-reguláció, míg carcinoidban claudin-1 és -7 down-reguláció volt megfigyelhető.

7.1.3. Claudin fehérjék prognosztikus szerepének vizsgálata tüdőrákban [3]

Ebben a vizsgálatban patológiai I stádiumú primer tüdődaganatokat hasonlítottunk össze; laphámrákot (SCC) adenocarcinomával, azon belül is lepidikus terjedést mutató (L-ADC) és nem mutató (ADC) altípussal. Az immunhisztokémiai reakciók és kiértékelésük módja megegyezett az imént bemutatott #2 vizsgálatban leírtakkal.

Az egyes szövettani alcsoportok összehasonlításakor jelentős claudin expresszióbeli különbséget észleltünk (23. ábra).



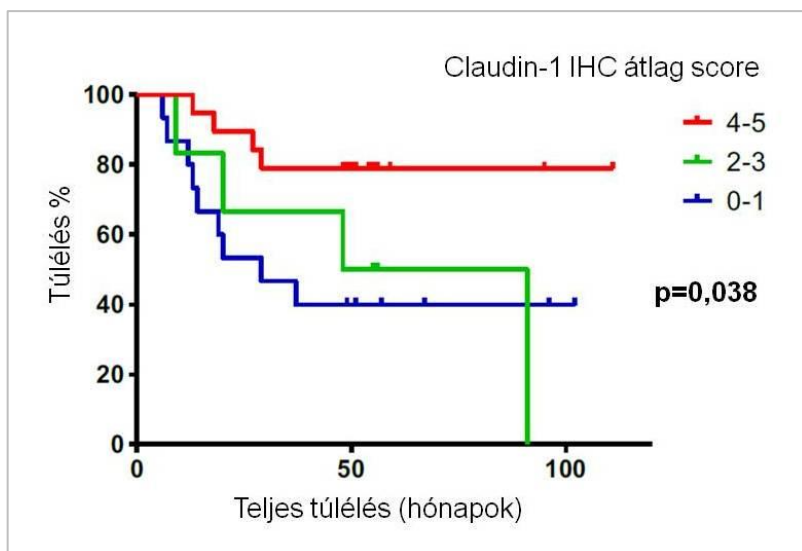
23. ábra. Claudin-1, -2, -3, -4 és -7 protein expressziós különbségek tüdőrákok szövettani altípusaiban ***Csak az erősen szignifikáns különbségeket jelöltük ($p < 0,001$)

Claudin expresszió szerinti megoszlás. A **claudin-1**-ben az ADC különbözött az L-ADC-től ($p=0.009$), és az SCC is különbözött az L-ADC-től ($p < 0.001$). A **claudin-2**-ben az ADC ugyancsak különbözött az L-ADC-től ($p=0.005$). Ami a **claudin-3** expressziót illeti,

szignifikáns különbség volt megfigyelhető valamennyi alcsoportra vonatkozóan: ADC – L-ADC ($p=0.004$), LADC – SCC ($p<0.001$) és ADC – SCC ($p<0.001$). **Claudin-4** esetében csak az ADC – L-ADC különbözött ($p=0.001$), míg a **claudin-7** esetében az ADC – L-ADC ($p<0.001$) és az L-ADC – SCC ($p<0.001$) különbség is szignifikáns volt.

Szövettan szerinti megoszlás. **ADC**-ben szignifikáns pozitív korreláció volt demonstrálható a claudin-1 és -3, valamint a claudin-3 és -4 között (mindkettő: $p<0.001$). **L-ADC**-ben szignifikáns pozitív különbség volt megfigyelhető a claudin-1 és -4 ($p=0.029$), továbbá a claudin-4 és -7 ($p=0.004$) expresszió között. L-ADC-ben pozitív volt a korreláció a claudin-1 és -4, továbbá a claudin-4 és -7 között ($p<0.001$). A korreláció még kifejezettebb volt a claudin-3 és -4 között ($p<0.001$). Ami az **SCC**-t illeti, negatív volt a korreláció a claudin-2 és -3 ($p=0.027$), valamint a claudin-2 és -7 ($p=0.008$) expresszió között. Kiemelendő, hogy ellentétben az ADC-vel és az L-ADC-vel, SCC esetében nem volt korreláció a claudin-3 és -4 között ($p=0.131$).

Teljes túlélés a claudin expresszió függvényében. A teljes populációt illetően a magas claudin-2 expresszió kedvező prognosztikai faktornak bizonyult, amennyiben a 0-1 vs. 2-5 score értékkel rendelkező csoportot hasonlítottuk össze ($p=0.009$). Az alcsoport elemzés során azonban a claudin-2 expresszió már nem bírt prognosztikai értékkel. **ADC**-ben egyetlen vizsgált claudin sem mutatott korrelációt a teljes túléléssel. **L-ADC**-ben mindössze a claudin-4 esetén volt egy trend megfigyelhető az expresszió és a kedvezőbb teljes túlélés között a 0-1 vs. 2-5 score értékek elemzésekor ($p=0.087$). **SCC**-ben ezzel szemben szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a claudin-1 expresszió és a kedvezőbb teljes túlélés között ($p=0.038$) (24. ábra). SCC-ben emellett a claudin-3-nál egy ellentétes irányú tendenciát tudtunk megfigyelni ($p=0.070$); magas claudin-3 expresszió rosszabb túléléssel párosult, ami statisztikailag szignifikáns lett, amennyiben az elemzést 0-1 vs. 2-5 score értékek alapján végeztük ($p=0.029$).



24. ábra. Claudin-1 IHC átlag score érték és teljes túlélés összefüggése SCC-ben

Klinikopatológiai paraméterek és claudin expresszió összefüggései. A teljes populáció vizsgálatakor a claudin expresszió és a dohányzás között negatív összefüggést találtunk claudin-2 esetében ($r=-0,227$, $p=0,036$), ezzel szemben claudin-3-nál a magasabb expresszió társult erősebb dohányzással ($r=0,251$, $p=0,026$). **ADC**-ben nem észleltünk korrelációt a claudin-1, -2, -3, -4, -7 és a nem, életkor, vagy dohányzási státusz között. **L-ADC**-ben nem volt összefüggés a claudin expresszió és a nem vagy az életkor között, ugyanakkor a claudin expresszió és a dohányzás összefüggésének elemzésekor pozitív korreláció volt demonstrálható a claudin-3 expresszió és a dohányzás között ($p=0,020$). Emellett csaknem szignifikáns, hasonló összefüggés volt megfigyelhető claudin-4 esetében is ($p=0,054$). **SCC** esetében nem találtunk összefüggést a vizsgált claudinok expressziója és a nem, az életkor, vagy a dohányzás között.

7.2. Távoli áttétet adó tüdőrákok vizsgálata

7.2.1. Távoli áttétek helyének és megjelenési idejének vizsgálata tüdő adenocarcinomában [4]

7.2.1.1. Klinikopatológiai jellemzők és távoli szervi áttétek lokalizációja

A vizsgálati kohorszban szereplő 1126 ADC beteg klinikopatológiai jellemzőit és a távoli áttétek helyeit a 12. táblázatban foglaltuk össze.

Metastatic site *	Total	Lung	Bone	Brain	Adrenal	Pleura	Liver	Skin	Pericard.
Number of patients	1126	380	319	278	149	143	141	36	19
Sex									
Males	541 (48%)	172 (45%)	155 (49%)	124 (45%)	67 (45%)	64 (45%)	70 (50%)	18 (50%)	7 (37%)
Females	585 (52%)	208 (54%)	164 (51%)	154 (55%)	82 (55%)	79 (55%)	71 (50%)	18 (50%)	12 (63%)
Smoking									
never	194 (17%)	71 (19%)	67 (21%)	45 (16%)	15 (10%)	39 (27%)	23 (16%)	5 (14%)	3 (16%)
ex	327 (29%)	106 (28%)	84 (26%)	77 (28%)	36 (24%)	42 (29%)	43 (31%)	9 (25%)	6 (32%)
current	534 (47%)	174 (46%)	139 (44%)	136 (49%)	86 (58%)	51 (36%)	63 (45%)	19 (53%)	9 (47%)
no data	71 (6%)	29 (8%)	29 (9%)	20 (7%)	12 (8%)	11 (8%)	12 (9%)	3 (8%)	1 (5%)
Primary TU location (side)									
left	432 (38%)	135 (35%)	125 (39%)	109 (39%)	57 (38%)	55 (39%)	51 (36%)	19 (53%)	9 (47%)
right	681 (60%)	235 (62%)	193 (60%)	167 (60%)	90 (61%)	88 (61%)	90 (64%)	17 (47%)	10 (53%)
na	13 (2%)	10 (3%)	1 (1%)	2 (1%)	2 (1%)	0	0	0	0
Primary TU location (central vs. peripheral)									
central	434 (39%)	129 (34%)	155 (49%)	119 (43%)	69 (46%)	59 (41%)	62 (44%)	18 (50%)	11 (58%)
peripheral	690 (61%)	251 (66%)	164 (51%)	159 (57%)	80 (54%)	83 (58%)	79 (56%)	18 (50%)	8 (42%)
Primary TU location (upper vs. lower)									
upper/middle lobe	741 (66%)	237 (63%)	205 (64%)	188 (68%)	98 (66%)	75 (52%)	88 (62%)	22 (61%)	12 (63%)
Lower lobe	374 (33%)	133 (37%)	113 (36%)	88 (32%)	49 (33%)	68 (48%)	53 (38%)	14 (39%)	7 (37%)
Stage at diagnosis									
I	116 (10%)	34 (9%)	18 (6%)	19 (7%)	6 (4%)	9 (6%)	10 (7%)	1 (3%)	2 (11%)
II	80 (7%)	12 (3%)	4 (1%)	12 (4%)	3 (2%)	1 (1%)	7 (5%)	0	0
III	308 (27%)	37 (10%)	59 (19%)	56 (20%)	17 (11%)	15 (11%)	20 (14%)	5 (14%)	1 (5%)
IV	622 (55%)	297 (78%)	238 (75%)	191 (69%)	123 (83%)	118 (82%)	104 (74%)	30 (83%)	16 (84%)
Appearance of mets									
early (at diagnosis)	622 (55%)	286 (75%)	164 (75%)	114 (41%)	110 (73%)	100 (69%)	71 (50%)	19 (52%)	11 (58%)
late	243 (22%)	94 (25%)	155 (25%)	164 (59%)	39 (27%)	43 (31%)	70 (50%)	17 (48%)	8 (42%)
Organ distribution **									
single organ	435	195 (66%)	124 (52%)	127 (67%)	54 (44%)	70 (59%)	41 (39%)	13 (43%)	7 (43%)
multiple organ	187	102 (34%)	114 (48%)	64 (33%)	69 (56%)	48 (41%)	63 (61%)	17 (57%)	9 (57%)
Median OS (mo) single organ **		17.3	10.1	10.5	12.8	10.1	14.1	6.9	7.4
Median OS (mo) multiple organ **		9.7	6.0	4.6	5.7	5.2	6.8	1.8	5.6

Data shown in parentheses are column percentages; mo, months; mets, metastases; OS, overall survival; pericard, pericardial.

* Includes single and multiple organ metastatic disease.

** At the time of diagnosis.

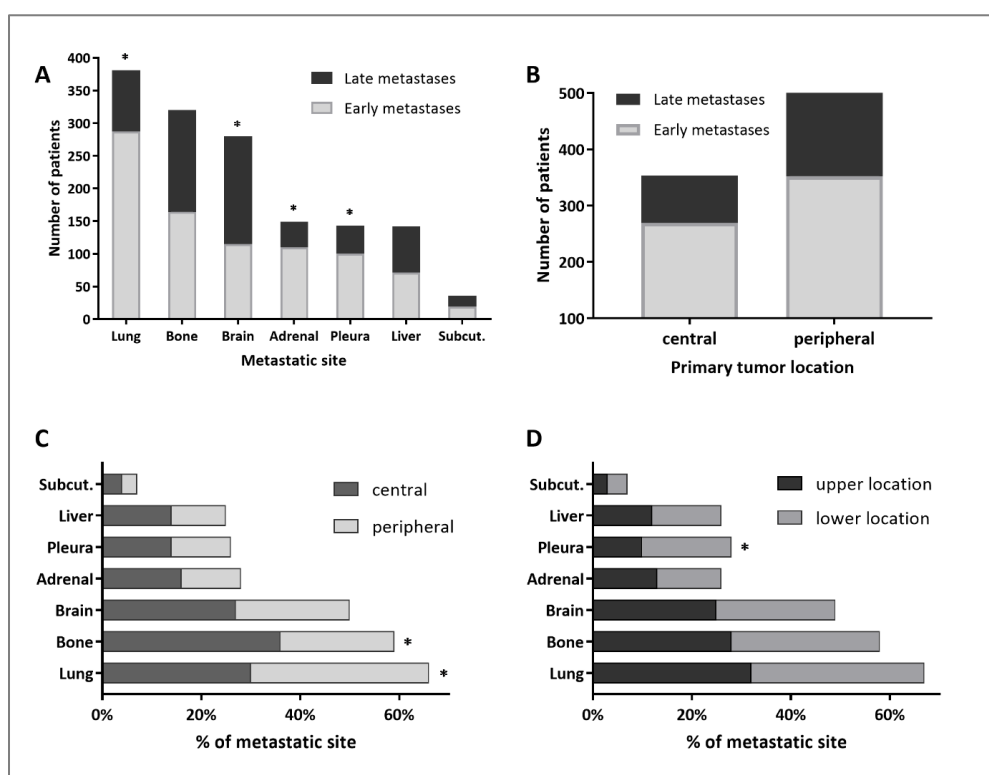
12. táblázat. Különböző távoli szervi áttétet adó ADC-ben szenvedő betegek klinikopatológiai jellemzői

A jobb oldali tumorok gyakoribban voltak, mint a bal oldaliak (60% vs. 40%, $p < 0.001$). Perifériás daganatot 61%-ban észleltünk (vs. centrális = endobronchialisán látható 39%, $p < 0.001$), hasonlóképpen gyakoribb volt a felső tüdőmező tumora (felső- és középlebeny), mint az alsó lebeny (66% vs. 33%, $p < 0.001$). A diagnózis felállításakor 435 betegnél (38%) volt igazolható egyetlen távoli szervet érintő áttét, míg 187 betegnél (16%) multiplex metasztázis volt jelen. Az utánkövetés ideje alatt további 243 betegnél (22%) alakult ki távoli áttét, amelyeket késői metasztázisnak tartottunk. A follow-up periódus végére 865

betegnek (77%) lett IV stádiumú betegsége és összesen 918 beteg (82%) hunyt el. A leggyakoribb távoli szervi áttéti helyek az alábbiak voltak: tüdő (33%), csont (28%), agy (25%), mellékvese (13%), pleura (13%), máj (12%) subcutis (3%). 19 betegnél (1.5%) volt pericardialis metasztázis igazolható, míg 29 betegnél (2,6%) egyéb ritka áttéti helyet (lép, vese, peritoneum, stb.) figyelhettünk meg.

7.2.1.2. Az áttéti helyspecifikus időrend és az áttéti helyek közti kapcsolat

A tüdő- ($p<0.001$), a mellékvese- ($p<0.001$) és a pleuraáttétek ($p<0.001$) korábban, míg az agyi áttétek ($p=0.002$) későbbben jelentkeztek (25. ábra A).



25. ábra. A metasztázis helyek megoszlása a korai és késői megjelenés tekintetében, és a primer tumor elhelyezkedése az áttét helyéhez és sorrendiségéhez viszonyítva 1126 tüdő ADC-ben

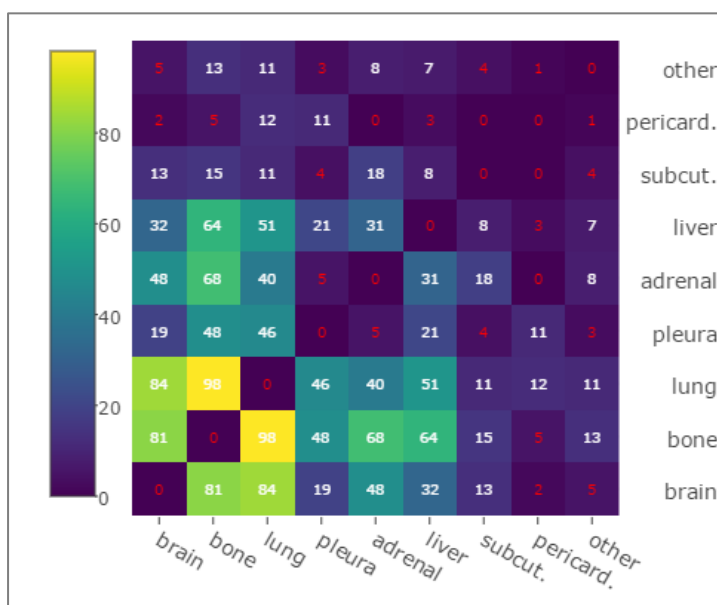
A csont-, máj- és subcutan metasztázisok nem mutattak korai vagy késői megjelenési tendenciát.

A centrális primer tumorok szignifikánsan gyakrabban adtak korai metasztázist, mint a perifériás tumorok (OR 1.43, 95% CI 1.061-1.951, $p=0.02$) (25. ábra B).

Csontáttét gyakrabban fordult elő centrális daganatoknál (OR 1.86, 95% CI 1.39-2.50, $p=0.017$), míg a perifériás tumorokra a tüdőáttét volt jellemző (OR 1.35, 95% CI 1.04-1.74, $p=0.015$). A többi áttéti helyet illetően nem volt szignifikáns összefüggés (25. ábra C).

Az áttétek és a primer tumor tüdőlebenyi elhelyezkedésének (felső- és közép- vs. alsó lebeny) kapcsolatát vizsgálva azt találtuk, hogy a pleuraáttétek szignifikánsan gyakrabban alakultak ki alsó lebenyi primer tumorok esetén (OR 1.97, 95% CI 1.38-2.82, $p=0.001$) (25. ábra D). A többi áttéti helynél nem volt megfigyelhető szignifikáns összefüggés.

Annak vizsgálatára, hogy mely metasztázisok fognak várhatóan együtt megjelenni, klaszter analízissel meghatároztuk az esetszámot minden lehetséges metasztatikus párral, és megvizsgáltuk két metasztatikus hely időfüggő megjelenését is (26. ábra). Tekintettel az elemzések összetett voltára, csak a klinikailag releváns eredményeket részletezzük.



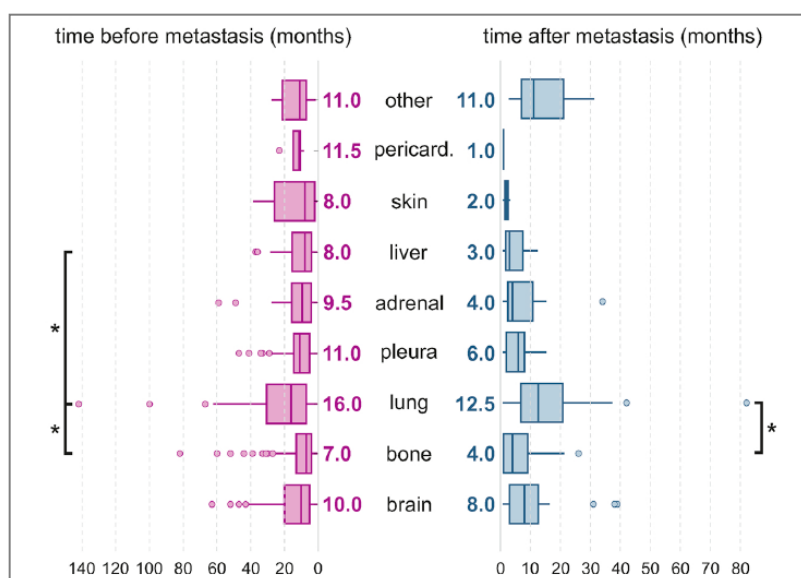
26. ábra. Klaszter analízis a különböző áttéti helyek egyidejű megjelenésének valószínűségéről. A számok azon betegek számát jelzik, akikben az adott két áttét egyidőben jelent meg. Az erős asszociációjú kombinációkat kézzel, a gyengéket sárgával jelöltük. A klaszteranalízisek az adott kategóriában legalább 8 betegen alapultak. Az 5 vagy annál kisebb esetszámokat pirossal jelöltük.

Az agyi áttétek általában a csont- és a tüdőmetasztázisokkal együtt mutatkoztak ($n=81$, ill. 84), a csontmetasztázisok pedig gyakran együtt jelentkeztek a tüdőáttétekkel ($n=98$). Találtunk összefüggést ezenkívül a csontáttét és a mellékvese áttét ($n=68$) valamint a csontáttét és a májáttét ($n=64$) között.

A csontáttétes betegekben a vártnál 2.2%-kal nagyobb volt a valószínűsége annak, hogy mellékvese áttétük is lesz, továbbá 2.1%-kal nagyobb, hogy májáttétben is szenvednek (Eredeti közlemény, 2. ábra B⁵⁸). Más oldalról viszont, pleuraáttét esetén a vártnál 1.4%-kal kisebb volt a valószínűsége, hogy agyi áttét jelenik meg, és 1.2%-kal kisebb, hogy mellékvese áttét alakul ki. Mindemellett, a pleura- és a pericardialis metasztázis (+0.8%), valamint a mellékvese- és a bőrmetasztázis (+1.2%) is gyakrabban jelent meg együtt, mint az várható lett volna függetlenség esetén. Ezek az eredmények Bonferroni korrekció után is szignifikánsak maradtak 0.05 szignifikancia szint mellett.

Vizsgáltuk azt is, hogy az áttétek megjelenése milyen sorrendben követi egymást (Eredeti közlemény, 2. ábra C⁵⁸). Kiemelendő, hogy a tüdőáttétek rendszerint megelőzték az agyi- (esetek 97%-a), a csont- (esetek 86%-a), illetve a máj- (esetek 84%-a) metasztázisok kialakulását. A májáttétek minden betegnél később jelentek meg, mint a pleuraáttétek. A mellékvese metasztázisok ugyanakkor az esetek 89%-ában korábban jelentek meg, mint az agyi áttétek. Ezek az eredmények Bonferroni korrekció után is szignifikánsak maradtak 0.05 szignifikancia szint mellett.

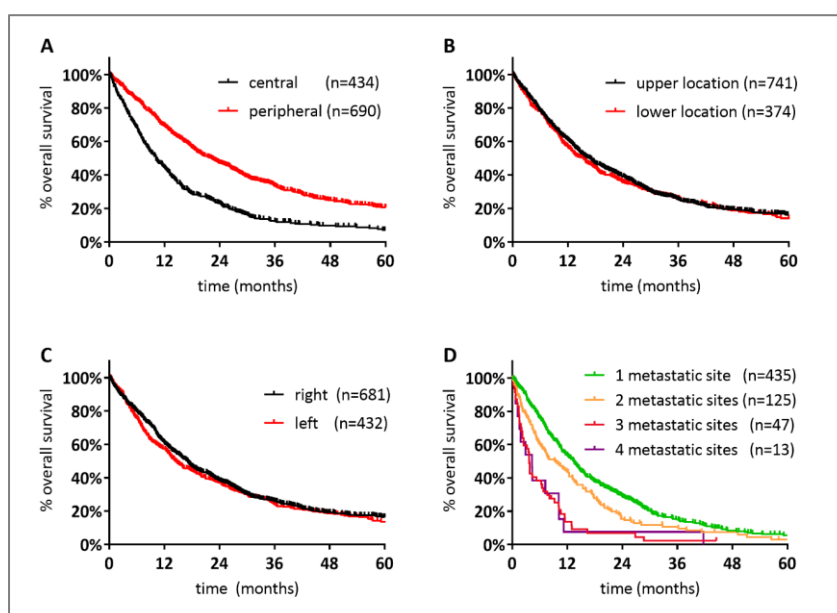
Annak megítélésére, hogy mely szervek azok, ahol egy adott metasztázis röviddel az előző után jelentkezik vagy hamar követ egy korábbi áttétet, lokalizációként ábrázoltuk a metasztázisok megjelenése előtti és utáni időintervallumokat (27. ábra).



27. ábra. Két metasztázis megjelenése előtti és utáni időintervallumok ábrázolása szervi lokalizációkra lebontva

Eredményeink szerint a tüdőáttétek hosszabb idővel jelennek meg egy másik áttét után (medián: 16 hónap), mint a csontáttétek (medián: 7 hónap), vagy a májáttétek (medián: 8 hónap). Hasonlóképpen, egy már meglévő tüdőáttét után több idő telik el egy újabb áttét megjelenéséig (medián: 12,5 hónap), mint a csontáttéteknél (medián: 4 hónap). Ezek az eredmények Bonferroni korrekció után is szignifikánsak maradtak 0.05 szignifikancia szint mellett.

Túlélés vizsgálata. A centrális primer tumorban szenvedők medián teljes túlélése (OS) rövidebb volt, mint a perifériás primer tumoros betegeké (10.2 vs. 22.2 hónap, HR 2.075, 95%CI 1.792–2.402, $p=0.001$ (28. ábra A).



28. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék a primer tüdő ADC-k lokalizációjának (A–C) és a távoli áttéti helyek számának (D) függvényében

Ezzel szemben nem volt szignifikáns különbség a medián teljes túlélésben az alsó tüdőmezőben és a felső tüdőmezőben (felső- és középlebény) kialakult primer tumorok között (28. ábra B), és nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a jobb tüdőben és a bal tüdőben kialakult primer tumoroknál sem (28. ábra C). Kiemelendő, hogy a Cox regressziós analízis – amelyben szerepeltek a standard prognosztikus paraméterek (életkor, dohányzási státusz, ECOG PS [Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status], TNM) – szintén azt igazolta, hogy a primer tüdőrák centrális vagy perifériás lokalizációja független prognosztikai faktornak tartható (HR 1.558, $p<0.001$).

A teljes kohorsz 1126 betegéből 622-ben (55%) a távoli szervi metasztázis már a tüdő ADC diagnózisának idején detektálható volt. Közülük 435 betegnél (69%) egyetlen áttéti hely volt csak igazolható, míg 125 betegnél (20%) kettő, 47 betegnél (7,5%) három, 13 betegnél (2%) négy, 2 betegnél (0,3%) pedig öt metasztatikus helyet találtunk.

A medián OS a két áttéti hellyel bíró betegeknek rosszabb volt, mint egyetlen áttéti hely esetében (9,4 vs. 13,4 hónap, HR 1.339, 95%CI 1.087–1.648, $p=0.006$) (28. ábra D). Továbbá, a három áttéti hellyel bíró betegeknek rövidebb volt az OS, mint két áttéti hely esetében (3,7 vs. 9,4 hónap, HR 1.917, 95%CI 1.347–2.727, $p=0.001$). Kiemelendő, hogy négy és öt áttéti helynél már nem volt érdemi különbség (4,3 és 3,8 hónap; $p=0.385$), és értékek hasonlóak voltak a három áttéti helynél megfigyelthez. Egy további Cox regressziós analízis, amelybe diagnóziskor IV stádiumú betegeket vontunk be ($n=622$), azt mutatta, hogy az egyetlen áttéti hely (vs. a kettő vagy több; HR 1.555, $p<0.001$) és a perifériás primer tumor lokalizáció (vs. a centrális; HR 1.457, $p<0.001$), szignifikánsan befolyásolták a teljes túlélést, függetlenül az életkortól, a dohányzási státusztól, az ECOG PS-től, és a primer tumor T stádiumától (Eredeti közlemény, 3. táblázat⁵⁸).

Egy további Cox regressziós analízis, melybe a diagnóziskor I-III stádiumú betegeket vontuk be ($n=504$), azt igazolta, hogy a primer tumor lokalizációja továbbra is prognosztikai értékű, függetlenül a távoli szervi metasztázisok későbbi megjelenésétől (HR 1.607, $p<0.001$). Kiemelendő, hogy ebben a kohorszban a késői áttétek megjelenése önmagában független prognosztikai faktornak bizonyult (HR 1.506, $p<0.001$).

Onkológiai kezelésre vonatkozó adatok az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet betegei esetében álltak rendelkezésünkre ($n=860$; 76%). Közülük 574 beteg (64%) részesült szisztémás kemo- és/vagy radioterápiában, 121 beteg (14%) műtéttel kombinált kemo- és/vagy radioterápiában, 51 beteg (6%) csak sugárkezelést, míg 141 beteg (16%) csak palliatív kezelést kapott. A centrális tumoros betegek (vs. perifériások) gyakrabban kaptak kizárólag szisztémás kemo- és/vagy radioterápiát (74% vs. 57%), vagy csak palliatív kezelést (20% vs. 14%). Ennélfogva perifériás primer tumor esetén gyakoribb volt a műtéttel kombinált kemo- és/vagy radioterápia (20% vs. 5%). Egy feltáró, többváltozós Cox regressziós elemzés – benne a standard prognosztikai paraméterekkel (életkor, dohányzási státusz, ECOG PS, TNM, onkoterápia), azt mutatta, hogy a primer tüdőrák lokalizációja (i.e. centrális vs. perifériás elhelyezkedése) egyéb változóktól függetlenül is prognosztikai értékkel bír a teljes túlélésre vonatkozóan (HR 1.699, $p<0.001$).

7.2.2. Agyi áttétet adó tüdőrákok klinikopatológiai jellemzőinek vizsgálata [5]

Az agyi áttétet adó tüdőrákban szenvedő betegek klinikopatológiai és radiológiai jellemzőit a 13. táblázatban foglaltuk össze.

	Betegszám
Hörgőrendszeri lokalizáció	548 (95%)
centrális	319 (58%)
perifériás	229 (42%)
Lebenyi lokalizáció*	527 (92%)
felső lebeny	307 (58%)
középső lebeny	36 (7%)
alsó lebeny	241 (26%)
Szövettani altípusok	575 (100%)
ADC	272 (47%)
SCLC	118 (21%)
SCC	99 (17%)
egyéb**	86 (15%)
Távoli metasztázis diagnóziskor IV stádiumú betegség esetén	341 (59%)
agy	180 (53%)
N stádium	467 (81%)
N0 ("brain only")	135 (29%)
N1-3	332 (71%)
Peritumorális ödéma	413 (72%)
nincs ödéma	70 (17%)
1-10 mm	120 (29%)
>10 mm	223 (54%)
Agyi áttét lokalizációja	452 (79%)
supratentoriális	283 (62%)
infratentoriális	80 (18%)
mindkettő	89 (20%)
Kisagyi érintettség	35 (17%)

*A daganatok 9%-ában a primer tumor a főhögőben helyezkedett el. **Egyéb szövettani altípusok: 41 anaplastikus carcinoma, 27 nem specifikálható carcinoma, 12 nagysejtes neuroendocrin carcinoma, 4 adenosquamosus carcinoma és 2 pleiomorph sarcomatoid carcinoma.

13. táblázat. Agyi áttétet adó tüdőrákok klinikopatológiai jellemzői

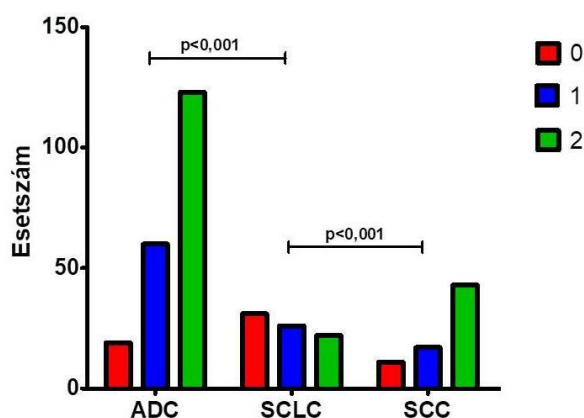
A betegek több mint felénél multiplex agyi áttét volt kimutatható (51,5%), SCLC esetén a többszörös megjelenés szignifikánsabban gyakoribb volt (42 szoliter, 74 multiplex, $p=0,024$). Gyakrabban mutattunk ki multiplex áttéteket az alsó tüdőlebenyekben elhelyezkedő primer tumoroknál ($p=0,048$). Magasabb T, illetve N stádium esetén

ugyancsak valószínűbb volt a multiplex metasztatizálás ($p<0,001$ és $p=0,001$). ADC és SCC legtöbbször supratentoriális áttétet adott, míg SCLC esetén valamennyi vizsgált agyi régió érintett volt ($p=0,041$).

Az agyi áttétek átlagos mérete $20,7\pm 11,7$ mm (3,0-55,0 mm) volt. A legnagyobb áttétek a főhörgőben lévő tüdőrákoknál alakultak ki (23,7 mm, $p=0,002$). Az áttétek átlagos mérete SCC-ben 23,7 mm, ADC-ben 20 mm, SCLC-ben 19,6 mm volt. A különbség SCC-SCLC és SCC-ADC között szignifikánsnak bizonyult ($p=0,044$, illetve $p=0,024$). A multiplex áttétek szignifikánsan kisebbek voltak, mint a szoliterok ($p=0,001$). Az agyi áttét mérete pozitív korrelációt mutatott a peritumorális ödéma mértékével ($r=0,330$, $p<0,001$).

A peritumorális ödéma szélesebb volt a supratentoriális metasztázisoknál, mint az infratentoriálisaknál ($p=0,019$), a fiatalabb betegeknél (≤ 50 év), mint az idősebbeknél ($p=0,042$), továbbá a nőknél, mint a férfiaknál ($p=0,016$).

Peritumorális agyödéma főként ADC-re és SCC-re volt jellemző, míg SCLC-ben a betegek 39,2%-ánál egyáltalán nem lehetett ödémát kimutatni. A különbség ADC-SCLC és SCC-SCLC között szignifikáns volt (mindkettő $p<0,001$) (29. ábra).

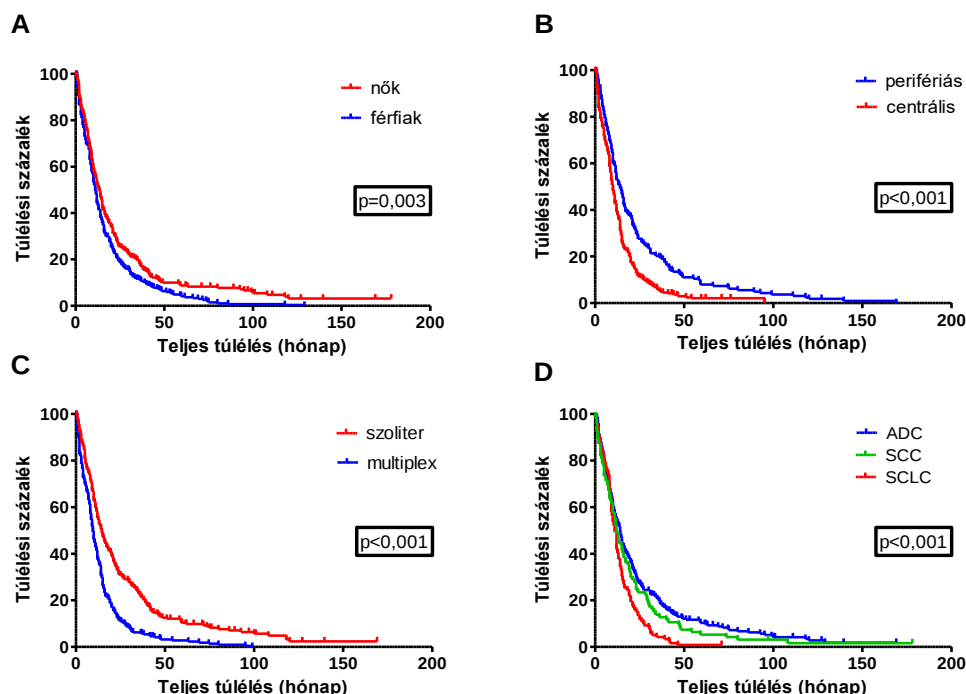


29. ábra. Peritumorális ödéma a tüdőrák különböző szövettani altípusaiban.
(0: nincs ödéma, 1: mérsékelt ödéma, 2: jelentős ödéma)

7.2.2.1. Túlélés.

A medián teljes túlélés 12,0 hónap volt (átlag: 19,2 hónap, 0-178 hónap), a túlélés az agyi áttét felfedezése után pedig 5,0 hónap (átlag: 11,2 hónap, 0-176 hónap). Hosszabb volt a teljes túlélés nőknél ($p=0,003$), perifériás tüdőrákban szenvedőknél ($p<0,001$) és

szoliter agyi áttét esetén ($p < 0,001$). A teljes túlélés a leghosszabb ADC-ben volt (átlag: 25,0 hónap), ezt követte az SCC (20,4 hónap), majd az SCLC (13,6 hónap) ($p < 0,001$) (30. ábra).



30. ábra. Az agyi áttéttel rendelkező betegek teljes túlélése a nem (A), a primer tumor lokalizációja (B), az áttét multiplicitása (C) és a főbb szövettani altípusok (D) függvényében

Nem volt különbség a teljes túlélésben az életkor, az agyi áttét mérete, a peritumorális ödéma, illetve az intracranialis tumor lokalizáció függvényében.

A multivariáns analízis ($n=391$) szerint a túlélést elsősorban a primer tumor reszekciója ($p < 0,001$), az agyi áttét műtéti eltávolítása ($p < 0,001$), a mellkasi irradiáció ($p < 0,001$) és az agyi sugárterápia, különösen a sztereotaxiás besugárzás WBRT-vel kombinálva ($p=0,002$) befolyásolta kedvezően, míg rövidebb túlélés volt megfigyelhető multiplex agyi áttét és centrális primer tüdőtumor esetén ($p=0,036$, illetve $p=0,022$).

A primer tumor eltávolításának hatása a túlélésre. Az operált betegcsoportban ($n=158$) csak az I stádium bizonyult jobb prognosztikai faktornak a többi stádiumhoz képest ($p=0,003$). A centrálisan elhelyezkedő tüdőrák kedvezőtlen prognosztikai tényező volt ($p=0,005$). Azon betegeknél, ahol nem lehetett elvégezni a primer tumor eltávolítását, az agyi áttét műthetősége kedvező prognózist jelentett ($p=0,006$).

Agyi metastasectomia és hatása a túlélésre. Az operált agyi áttéttel rendelkező csoportban (n=254) a szövettani eloszlás az alábbi volt: 144 ADC, 51 SCC, 24 SCLC és 35 egyéb típus. A peritumorális ödéma 185 esetben volt meghatározható, ebből 119 esetben jelentős fokú, 52 betegnél mérsékelt ödéma volt megfigyelhető, míg 14 agyi áttét körül nem volt vizenyő. Az agyi áttét reszekciója után a medián teljes túlélés 10,0 hónap volt. Rövidebb volt a túlélés centrális primer tumorok ($p=0,024$) és multiplex agyi áttétek esetén ($p=0,004$). Kiemelendő, hogy a jelentős perifokális ödémával bíró betegeknek jobb volt a túlélésük ($p=0,007$), tekintettel arra, hogy a medián túlélés jelentős ödémánál 26,5 hónap, mérsékelt ödémánál 17,2 hónap, míg ödéma nélküli esetekben 6,4 hónap volt. Nem befolyásolta a túlélést sem a tentoriális elhelyezkedés, sem pedig az áttét mérete.

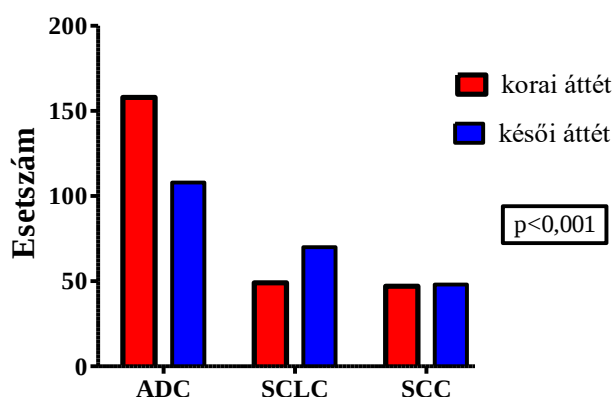
Azon betegeknél, akiknél nem lehetett elvégezni a metastasectomiát (n=303), a medián túlélés mindösszesen 3 hónap volt, és a multiplex áttét szignifikánsan rosszabb túléléssel párosult ($p=0,005$). A kombinált kemoterápia és az agyi besugárzás ezzel szemben növelte a túlélést (mindkettő $p<0,001$).

Az aktív onkoterápia nélküli betegek túlélése. Azon 41 betegnél, akik nem részesültek aktív onkoterápiában, a medián túlélés 2,0 hónap, míg az agyi áttét felfedezése utáni túlélés 1,5 hónap volt.

7.2.2.2. Metasztatizálási idő

Az agyi metasztázis megjelenéséig eltelt idő 565 betegnél volt meghatározható, az átlag $7,8\pm 12,9$ hónap volt. A metasztatizálási idő szignifikánsan rövidebb volt centrális tüdőrák esetén a perifériáshoz képest (5,3 vs. 9,0 hónap, $p=0,035$). A magasabb T, illetve N stádium ugyancsak rövidebb metasztatizálási idővel járt ($r=-0,110$, $p=0,016$ és $r=-0,191$, $p<0,001$). A primer tüdőrák eltávolítása esetén az agyi áttét megjelenéséig eltelt idő hosszabb volt, mint ahol nem volt lehetőség a primer tumor reszekciójára ($p<0,001$). ADC-ben a medián metasztatizálási idő 0,5 hónap volt, ezt követte az SCC (3,3 hónap), majd az SCLC (5,0 hónap).

További vizsgálatok céljából a metasztatizálási időben két kategóriát hoztunk létre: korai áttétnek tekintettük a 0-3 hónap között kialakultakat (n=311), későinek pedig a 3 hónap után megjelenteket (n=254). Korai áttét elsősorban ADC-re volt jellemző, míg az SCLC legtöbbször a betegség későbbi fázisában adott agyi áttétet ($p<0,001$) (31. ábra).



31. ábra. A szövettani altípusok és a metasztatizálási idő közti összefüggés

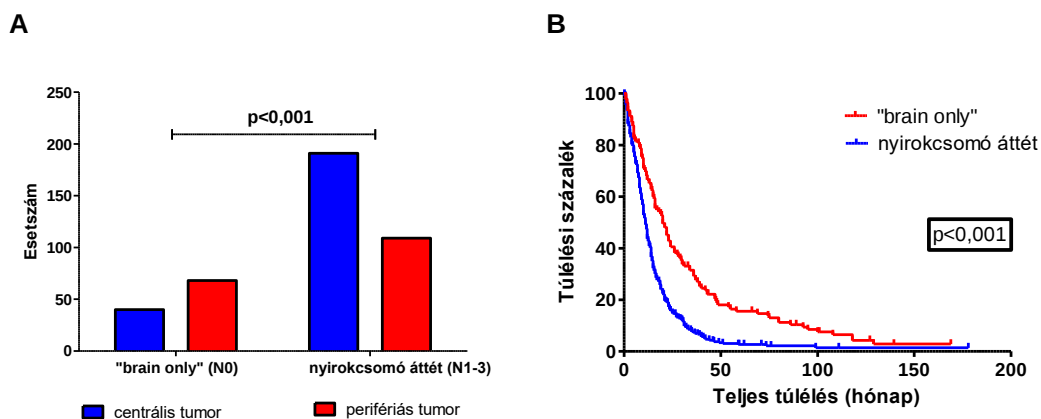
Azon betegcsoportban, ahol nem történt meg a primer tumor eltávolítása (n=401), a metasztatizálási idő a szövettani típusok tekintetében még jelentősebb eltérést mutatott. Ezen betegcsoportban az ADC-ben a korai agyi áttét az esetek 76%-ában fordult elő, ezzel ellentétben SCLC esetén korai áttét csak 45%-nál volt megfigyelhető ($p<0,0001$).

7.2.2.3. „Brain only” metasztázis

Munkánk során 467 olyan agyi áttétet adó tüdőrákos beteg adatait vizsgáltuk, akiknek klinikai és/vagy patológiai N stádiuma meghatározható volt. 135 esetben találtunk olyan betegeket, akiknek nem volt nyirokcsomó áttétük a tüdőrák diagnózisakor. Az ilyen, N0 stádiumú betegek primer tumora szignifikánsan gyakrabban fordult elő perifériásan ($p<0,001$), míg a nyirokcsomó áttéttel rendelkező betegekben gyakrabban volt centrális a tüdőrák ($p<0,001$).

Brain only agyi áttét gyakrabban fordult elő ADC-ben és legtöbbször szoliter metasztázissal társult ($p=0,001$). *Brain only* esetén a metastasectomiák aránya magasabb volt (78/135), gyakrabban jelent meg az agyi áttét 3 hónapnál később ($p=0,004$), és az

átlagos metasztatizálási idő is szignifikánsan hosszabb volt, mint N1-3 esetén (9,2 vs. 4,4 hónap, $p < 0,001$) (medián: 6,0 hónap vs. 1,0 hónap). Hasonlóképpen, a teljes túlélés is szignifikánsan hosszabb volt a *brain only* csoportban, szemben a nyirokcsomó áttétes betegekkel (31,1 vs. 15,3 hónap, $p < 0,001$) (medián: 20 vs. 11 hónap) (32. ábra).



32. ábra. A: Nyirokcsomó áttét jelenléte és a primer tumor lokalizációja közti összefüggés.
B: Nyirokcsomó áttét jelenléte és a teljes túlélés közti összefüggés.

A *brain only* betegcsoportban a nők teljes túlélése hosszabb volt, mint a férfiaké, de a különbség nem volt szignifikáns (40,5 hónap vs. 27,5 hónap, $p = 0,068$).

7.2.3. Protein expresszió vizsgálata primer tüdőrákokban és azok agyi áttéteiben [6]

Összesen 59 NSCLC beteg tumormintáit elemeztük, köztük 26, agyi metasztázist adó primer tüdőrákot (**LCMet**), ezen tumorok agyi áttéteit (**BrMet**), továbbá 33 olyan primer tüdőrákot, amely hosszú utánkövetés során sem adott semmilyen távoli áttétet (**LC**). A 29 IHC festés eredményét korreláltattuk a tumor progresszióra vonatkozó vizsgálati csoportokkal (14. táblázat). Amennyiben a χ^2 és a Fischer exact teszt eredményei egyaránt szignifikánsnak bizonyultak ($p < 0.05$), az adott molekula expressziójának különbségét a fenti csoportok között szignifikánsnak tartottuk.

Number	Marker	LC		LC vs. LCMet		LCMet		LC vs. BrMet		BrMet		LCMet vs. BrMet	
		c/to	%	P	P*	c/to	%	P	P*	c/to	%	P	P*
1	CK7	25/32	78	0.061	0.120	24/25	96	0.531	0.738	22/26	87	0.187	0.351
2	Collagen XVII CD 44v6	15/33	46	0.021#	0.035#	19/26	73	0.043	0.062	18/25	72	0.931	1.000
3		19/32	60	0.033	0.039	20/23	87	0.041	0.066	18/21	86	0.905	1.000
4	β -Catenin	30/33	91	0.026	0.036	18/26	69	0.049#	0.089#	13/25	52	0.208	0.258
5	EGFR p16	23/32	72	0.919	1.000	19/26	73	0.001	0.002	18/26	69	0.760	1.000
6		15/32	47	0.536	0.599	15/25	60	0.002#	0.003#	21/26	81	0.029	0.040
7	p53 (DO7) p63	16/29	55	0.780	1.000	13/22	59	0.004	0.007#	21/24	88	0.035#	0.048#
8		14/32	44	0.643	0.788	12/24	50	0.007#	0.009#	7/26	27	0.068	0.103
9	Cyclin D ₁	22/33	67	0.048#	0.090#	23/26	89	0.185	0.272	22/26	85	0.093	0.145
10	Cyclin D3 Topoisomerase II- α	23/33	70	0.051	0.068	23/26	89	0.116	0.101	25/26	96	0.685	1.000
11		23/33	70	0.084	0.117	23/26	89	0.040#	0.065#	21/26	81	0.298	0.610
12	Ki 67 Caspase 3	23/33	70	0.725	0.784	17/26	65	0.010	0.016	21/26	81	0.211	0.349
13		32/33	97	0.380	1.000	25/25	100	0.332	0.381	21/26	81	0.012#	0.025#
14	Caspase 9	7/33	21	0.146	0.162	10/26	39	0.001	0.001	17/26	65	0.052	0.095
15		21/33	64	0.005#	0.007#	24/26	92	0.005#	0.007#	22/26	85	0.385	0.668
16	CAS	27/33	82	0.018	0.026	13/26	50	0.116	0.142	18/26	69	0.158	0.258
17		0/33	0	0.004#	0.008#	1/26	4	0.004#	0.008#	3/26	12	0.298	0.610
18	Chromogranin A CD138	27/33	82	0.009	0.013	13/26	50	0.259	0.358	18/26	69	0.003	0.005
19		0/33	0	0.031#	0.038#	1/26	4	0.045	0.080	3/26	12	0.298	0.610
20		20/32	63	0.256	0.441	16/26	62	0.003	0.003	24/25	96	0.003	0.005

14. táblázat. Az egyes vizsgálati csoportok között expressziós különbséget mutató biomarkerek

7.2.3.1. A vizsgálati csoportok biomarker profiljának összehasonlítása

Az **LC** és az **LCMet** csoportok biomarker profiljának összehasonlításakor a collagen XVII, a CD44v6 és a caspase-9 overexpressziója, míg a β -catenin és a cellular apoptosis susceptibility protein (CAS) down-regulációja volt megfigyelhető az LCMet csoportban. Az expresszió fokozódása az agyi áttéti csoportban csaknem szignifikás volt a cyclin D1, a cyclin D3 és a CK7 esetében. Csaknem valamennyi tumormintában magas Ki-67 proliferációs indexet találtunk és gyakori volt az EGFR expresszió is (70%), függetlenül a daganat progressziós státuszától.

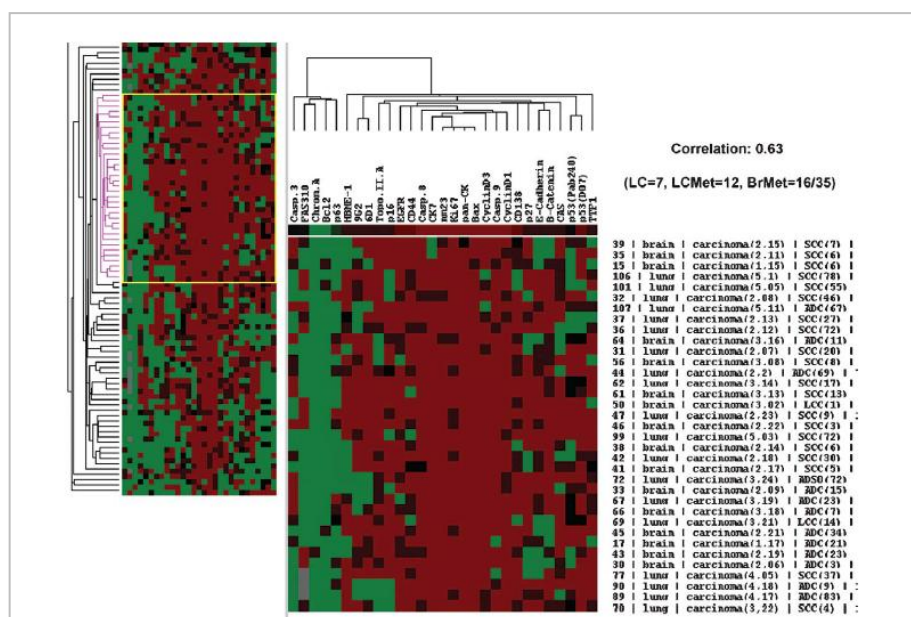
Az **LC** és a **BrMet** csoportok összehasonlításakor a collagen XVII, CD44v6, p16, p53, cyclin D3, caspase-3, caspase-9 és CD138 agyi áttétben való fokozott expresszióját észleltük, míg a β -catenin expressziója az áttétet nem adott tüdőrák csoportban volt magasabb.

Az **LCMet** és **BrMet** csoportok között ugyancsak megfigyeltünk biomarker expressziós különbségeket. Az agyi áttéti csoportban a p16, topoisomerase II α és CD138 proteinek jelentős emelkedése volt detektálható, emellett csaknem szignifikánsnak bizonyult a p53 és caspase-3 expresszió emelkedés a metasztatikus progresszió során.

7.2.3.2. Az NSCLC esetek IHC profilján alapuló nem-felügyelt (unsupervised) hierarchikus klaszter analízise

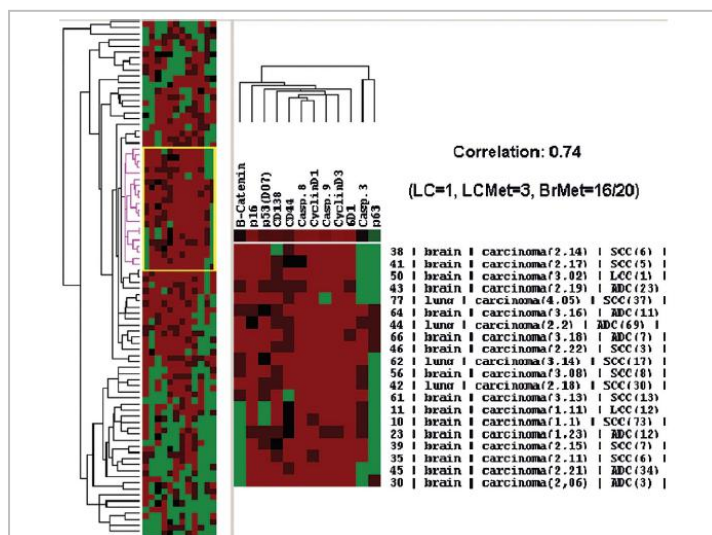
Egyetlen felügyelt (supervised) szöveti biomarker csoport – úgymint a sejtciklus szabályozással, az apoptózissal vagy a sejtadhézióval kapcsolatos markerek csoportja – sem mutatott nyilvánvaló klasztereződést a progressziós alcsoportokra vonatkozóan. Hasonlóképpen, egyetlen – korlátozott markerkiválasztáson alapuló – hierarchikus klaszterezés sem eredményezte az esetek szegregálódását a progresszióra vonatkozó olyan csoportokba, amelyek egyértelműen tükrözték volna a hisztológiai altípusokat.

A 85 NSCLC minta 29 biomarker expresszióján alapuló, nem-felügyelt hierarchikus klaszterezése egy 35 esetből álló közepes méretű és mérsékelt korrelációt (0,63) mutató klasztert eredményezett, amint azt a 33. ábrán látható Treeview képen mutatjuk be. A csoport 16 agyi áttétből (BrMet), valamint 12 – agyi áttétet adó – primer tumorból (LCMet) és 7 – áttétet nem adó – primer tumorból (LC) áll.



33. ábra. 35 esetből álló korlátozott klaszter analízis Treeview képe

A expressziós különbségeket mutató biomarkerekre (Lásd korábbi 14. táblázat) korlátozódó klaszterezés erősebb korrelációt eredményezett. Amikor a cyclin D1, cyclin D3, p16, p53, caspase-3, -8, -9, CD44v6, β -catenin, CD138 és collagen XVII volt kombinálva, a 16 agyi áttét – összerendezve mind a 29 markerrel (*Betegek és Módszerek*, 3. táblázat) – ismét klaszterbe rendeződött, azonban a csoport itt kisebb volt ($n=20$), a korreláció viszont erősebb (0,74) (34. ábra).

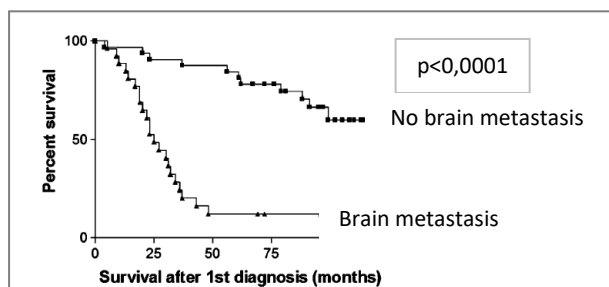


34. ábra. 20 esetből álló korlátozott klaszter analízis Treeview képe

A lehető legerősebb pozitív korrelációt (0,93) akkor figyeltük meg, amikor az antitest panel a cyclin D1, -D3, p16, Ki-67 és collagen XVII markert tartalmazta; a klaszter itt 24 esetből (16 BrMet, 7 LCMet, 1 LC) állt.

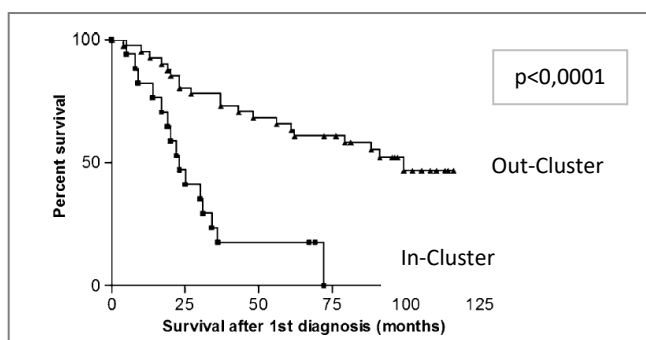
7.2.3.3. A biomarker expressziók és a betegek túlélése közti összefüggések

Az agyi áttétet adott és nem adott daganatok között a teljes túlélésre vonatkozóan szignifikáns különbséget találtunk ($p<0,0001$) (35. ábra).



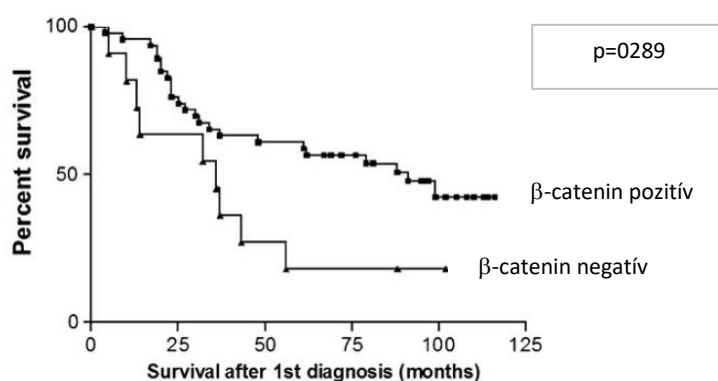
35. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék agyi áttétet adó és nem adó NSCLC-ben

A 34. ábrán bemutatott, klaszteren belüli csoportok esetei szignifikánsan rosszabb prognózissal jártak, mint a klaszteren kívüli esetek (36. ábra)



36. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék a klaszteren belüli és kívüli esetekben

A β -catenin IHC pozitívitásának gyakorisága az LC csoportban 91%, az LCMet csoportban 69%, míg a BrMet csoportban 52% volt ($p=0,03$), és kedvező prediktora volt a túlélésnek (91 hónap vs. 36 hónap; $p=0,289$) (37. ábra).



37. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék NSCLC-ben, függően a β -catenin expressziótól

7.2.4. Protein expresszió vizsgálata agyi áttétet adó tüdőrákok szövettani altípusaiban [7]

A #6 vizsgálatban elemzett 59 primer tüdőrák és 26 agyi áttét közül 26 primer tumorban és azok agyi áttéteiben a 29 antitesttel végzett IHC eredményekből szövettani alcsoport elemzést végeztünk. Kontrollként további 26 primer tüdő tumor szolgált, ahol a betegeknél hosszú utánkövetés mellett sem volt megfigyelhető agyi áttét megjelenése. Az agyi áttétek előrejelzésére használt regressziós analízis eredményeképpen ADC-ben a magasabb kollagén XVII ($p=0,011$), míg SCC-ben az emelkedett caspase-9 ($p=0,008$), CD44v6 ($p=0,031$), valamint a csökkent CAS ($p=0,029$) és Ki-67 ($p=0,032$) expresszió járt együtt agyi áttét kialakulásával (15. táblázat).

	ADC	SCC
Tüdőrák agyi áttéttel vs. tüdőrák agyi áttét nélkül	+ kollagén XVII	+ caspase-9 + CD44v6
		– CAS – Ki-67
Agyi áttétben biomarker nyerése	p16, topoll α , CAS, syndecan-1, cyclin D1	caspase-3
Agyi áttétben biomarker vesztese	β -catenin	

+: magasabb expresszió, – : alacsonyabb expresszió; Félkövér jelzés: $p<0,001$ szintű szignifikancia

15. táblázat. Biomarker expresszió agyi áttétet adó és nem adó tüdőrákokban

Megvizsgáltuk a különböző biomarkerek nyerését és vesztesét a metasztázis képzés során (15. táblázat). ADC-ben a p16, topoll α , syndecan-1, CAS és cyclin D1 expresszió szignifikánsan növekedett (valamennyi esetben $p<0,05$), és nem szignifikánsan ugyan, de növekedett a cyclin D3 és a Ki-67 expresszió is ($p=0,066$ és $p=0,083$). SCC-ben mindössze a caspase-3 expresszió növekedését észleltük ($p<0,05$). Biomarker elvesztést kizárólag az ADC alcsoportban detektáltunk a β -catenin vesztese formájában ($p=0,037$), míg az E-cadherin és bax markerek expresszió csökkenése megközelítette a statisztikailag szignifikáns mértéket ($p=0,054$ és $p=0,059$).

A dohányzás és a vizsgált markerek (16. táblázat). Áttétet adó ADC-nél pozitív korreláció volt kimutatható a dohányzás mértéke és a p16 ($p=0,024$), valamint a caspase-8 ($p=0,045$) expresszió között. A nem-metasztatizáló SCC csoportban negatív korreláció volt megfigyelhető a dohányzás mértéke és a caspase-3 expresszió között ($p=0,039$). Agyi metasztatizáló SCC-ben negatív korreláció volt észlelhető a dohányzás és p27 expresszió között ($p=0,038$), fontos azonban megemlítenünk, hogy ebben a betegcsoportban egyetlen eset kivételével a betegek mindannyian – vagy korábban, vagy a mintavétel idején is – dohányoztak.

A nem és a vizsgált markerek (16. táblázat). Nőknél ADC-ben csökkent cyclin D1 expressziót találtunk a férfiakhoz képest, de csak a nem-metasztatizáló csoportban ($p=0,016$). SCC esetén nem találtunk különbségeket a nemek tekintetében az egyes biomarkerek között.

A peritumorális ödéma és a vizsgált markerek (16. táblázat). ADC esetén nem találtunk eltérést ebben a vonatkozásban, sem a primer tumorban, sem a metasztatizálásban. Primer SCC esetén az emelkedett β -catenin ($p=0,026$) és E-cadherin ($p=0,026$), úgymint a csökkent caspase-9 ($p=0,037$) expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a peritumorális ödéma nagyságával. Az SCC agyi áttéteiben a csökkent CD44v6 expresszió mutatott erősen szignifikáns korrelációt a peritumorális ödéma nagyságával ($p=0,002$).

	ADC				SCC		
	Nem metasztatizáló primer tüdőrák	Agyi áttétképző primer tüdőrák	Agyi áttét		Nem metasztatizáló primer tüdőrák	Agyi áttétképző primer tüdőrák	Agyi áttét
Dohányzás		+ p16 + caspase-8					
					- caspase-3	- p27	
Női nem							
	- cyclin D1						
Peritumorális ödéma						+ β -catenin + E-cadherin	
						- caspase-9	- CD44v6

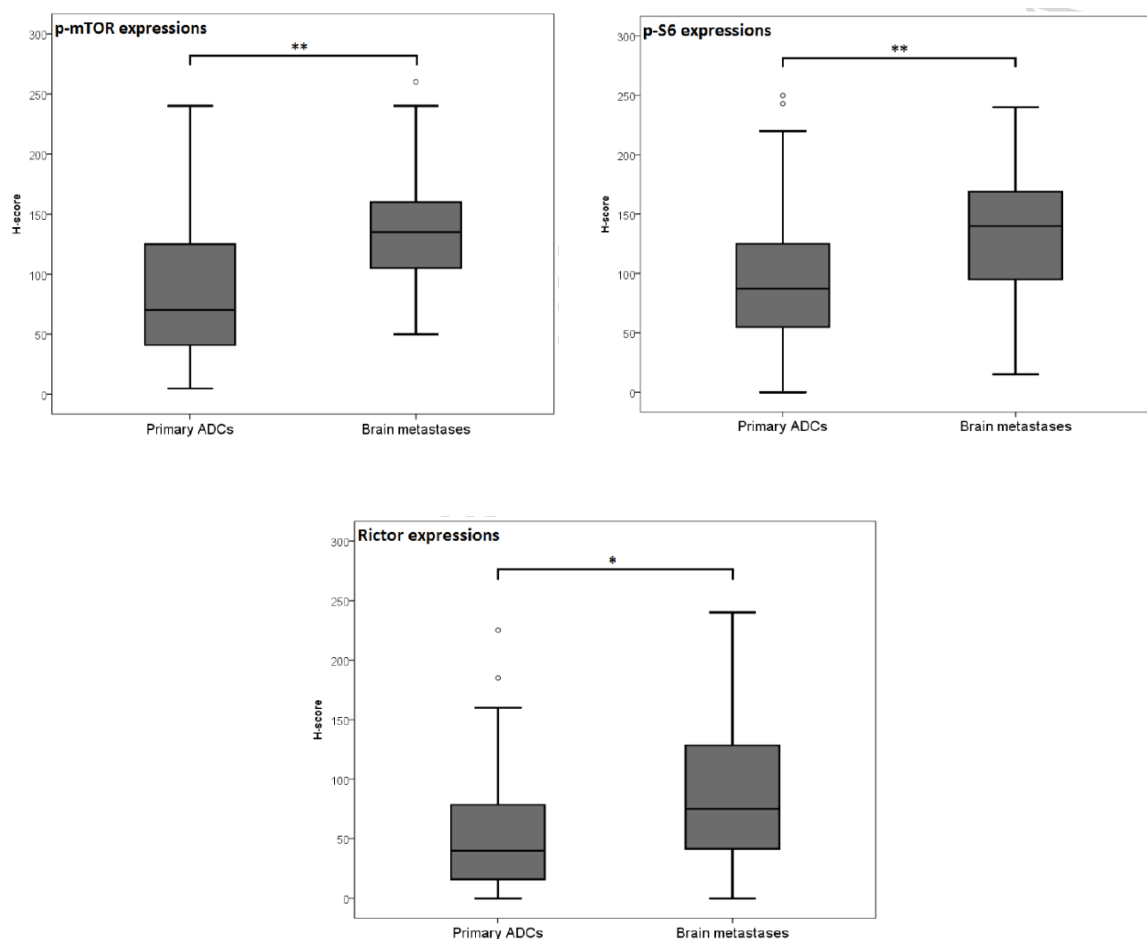
+: emelkedett expresszió, -: csökkent expresszió

16. táblázat. Biomarker expressziós különbségek ADC és SCC között a dohányzás, a nem és az agyi áttét körül kialakult peritumorális ödéma függvényében

7.2.5. *mTOR protein expresszió vizsgálata agyi áttétet adó tüdőrákban [8]*

7.2.5.1. p-mTOR, p-S6 és Rictor expresszió meghatározása primer tüdő ADC-ben (n=67) és tüdő ADC-k agyi áttéteiben (n=67).

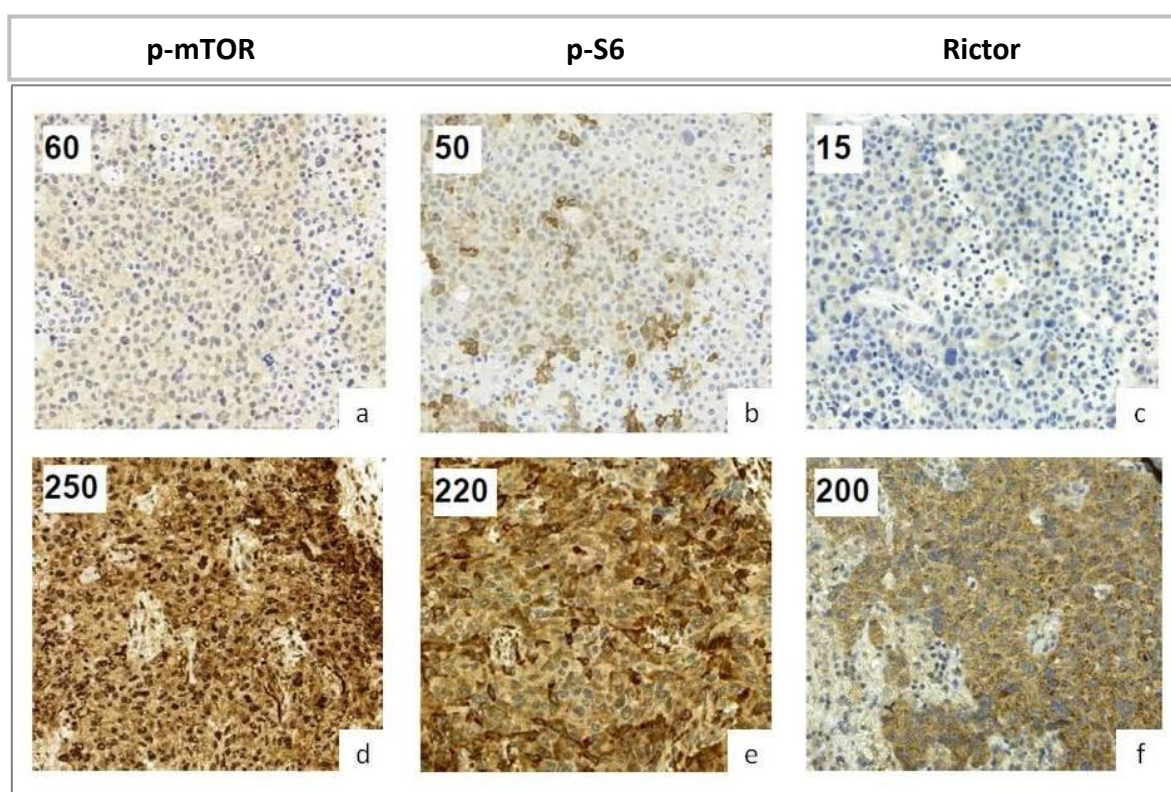
Emelkedett p-mTOR expressziót (H-score átlag ≥ 110), p-S6 expressziót (H-score átlag ≥ 115) és Rictor expressziót (H-score átlag ≥ 60) detektáltunk a primer ADC-k 33%, 34% és 37%-ában, továbbá tüdő ADC-k agyi áttéteinek 79%, 70% és 66%-ában. Az átlag H-score értékek valamennyi esetben magasabbak voltak az agyi áttétekben, mint a primer tüdő tumorokban (p-mTOR: 84 ± 55 vs. 136 ± 49 , $p < 0.0001$; p-S6: 97 ± 61 vs. 136 ± 54 , $p < 0.0001$; Rictor: 54 ± 48 vs. 87 ± 57 , $p < 0.001$) (38. ábra).



38. ábra. p-mTOR, p-S6 és Rictor protein expressziós szintek (H-score) primer tüdő ADC-ben és tüdő ADC-k agyi áttéteiben. (*: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$)

7.2.5.2. *mTORC1 és mTORC2 aktivitás meghatározása primer tüdő ADC-kben (n=67) és tüdő ADC-k agyi áttéteiben (n=67)*

A daganatok mTORC1 és mTORC2 aktivitását a p-mTOR, p-S6 és Rictor protein expresszió alapján becsültük meg (39. ábra). A p-mTOR immunfestődés erőssége korrelál az mTOR kináz aktivitásával, amely része mindkét komplexnek. A p-S6 expresszió korrelál az mTORC1 aktivitásával (az mTORC1 aktiválja a p70S6K-t, amely foszforilálja a riboszomális S6-ot), a Rictor (az mTORC2 eleme) expressziója pedig korrelál az mTORC2 aktivitásával.



39. ábra. mTORC1 (p-mTOR, p-S6) és mTORC2 (p-mTOR, Rictor) aktivitás reprezentatív képei tüdő ADC agyi áttéteiben. A bal felső sarokban az IHC H-score érték látható. Alacsony mTORC1/alacsony mTORC2 aktivitás (a-c), magas mTORC1/magas mTORC2 aktivitás (d-f). (x200)

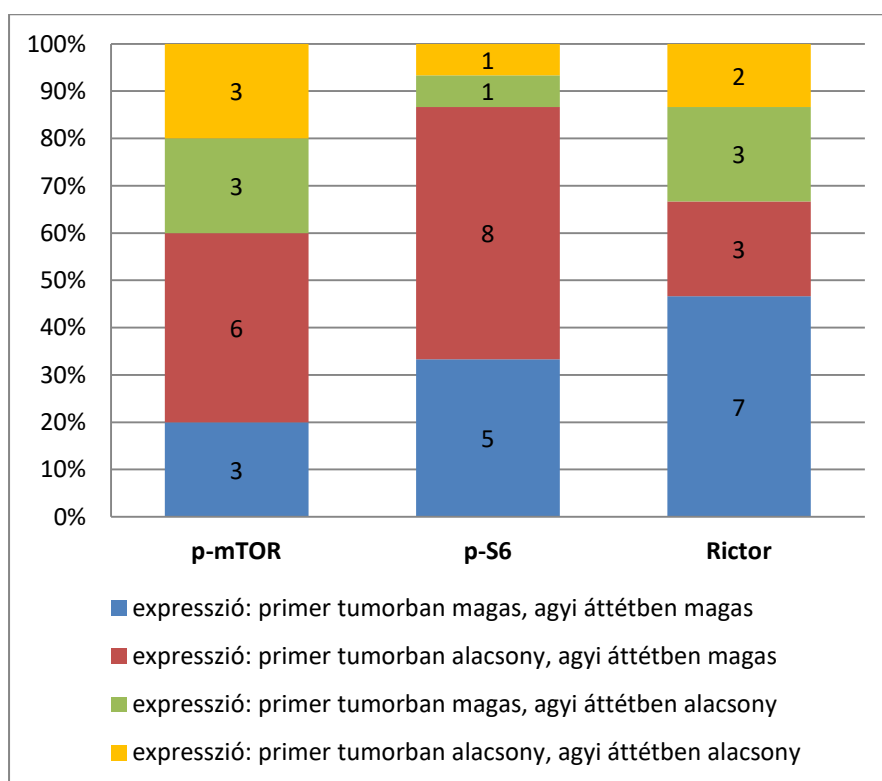
7.2.5.3. *p-mTOR, p-S6 és Rictor expresszió a vizsgált klinikopatológiai paraméterekkel összefüggésben*

A „magas” és „alacsony” p-mTOR, p-S6 és Rictor expressziók sem a primer tumorokban, sem pedig az agyi áttétekben nem mutattak korrelációt a vizsgált klinikai paraméterekkel (életkor, nem, dohányzási státusz, agyi áttét mérete), ugyanakkor primer

ADC-ben megfigyelhető volt egy trend a magasabb TNM stádium és az emelkedett Rictor expresszió között ($p=0.067$). Emellett az emelkedett Rictor expresszió gyakrabban fordult elő szoliter agyi áttét esetén, összehasonlítva a multiplex áttétekkel (70% vs. 33%, $p=0,061$).

7.2.5.4. p-mTOR, p-S6 és Rictor expresszió primer-áttéti tumorpár szövetmintákon

A párosított tumormintákban ($n=15$) a primer tumor és agyi áttéte között expressziós különbséget figyelhettük meg a p-mTOR-nál és a p-S6-nál az esetek 60%-ában (9/15), míg a Rictornál az esetek 40%-ában (6/15). Az expressziós különbséget mutató agyi áttétek legtöbbjénél az mTORC1 aktivitás emelkedett (p-mTOR: 6/9, p-S6: 8/9), ugyanakkor a Rictor expresszió az agyi áttétet adó primer tumorok 67%-ában (10/15) volt magas (40. ábra).



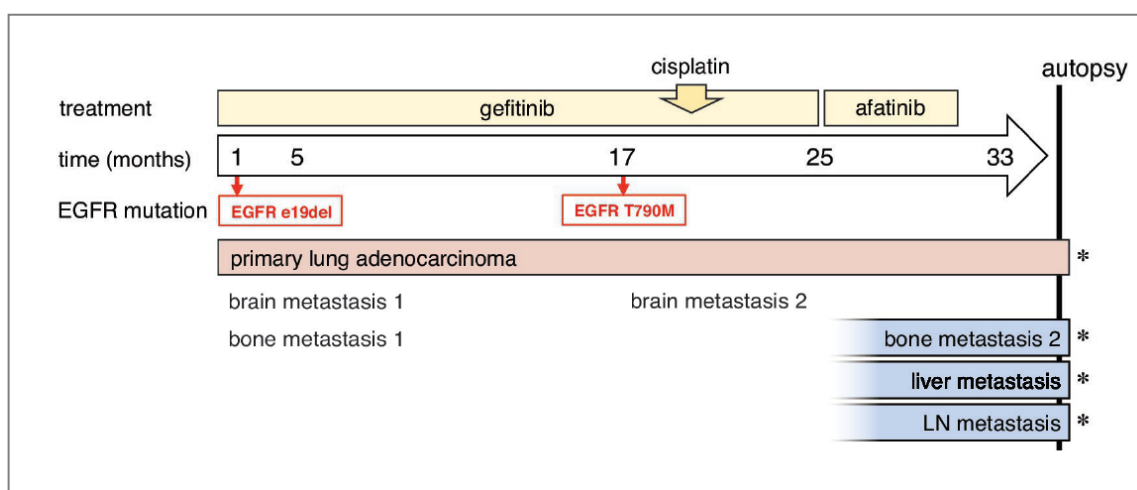
40. ábra. p-mTOR, p-S6 és Rictor expresszió változások megoszlása primer tüdő ADC-kben és agyi áttéteikben

Magas Rictor expresszió volt megfigyelhető az agyi áttétet adó primer tumorok 67%-ában, szemben az agyi áttétet nem adott primer tumorok 28%-os arányával ($p<0.01$).

7.2.6. Áttétképződés genomikai vizsgálata tüdő adenocarcinomában [9]

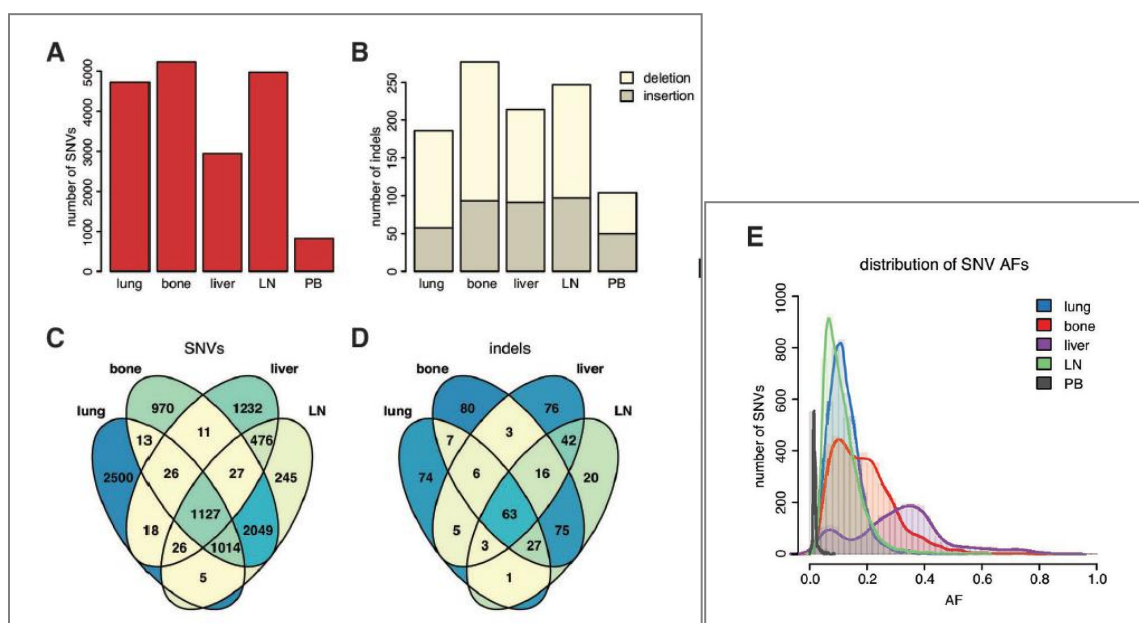
A #9 vizsgálatban egy 25 éves, nemdohányos, már a diagnóziskor agyi- és csontáttétet adott, EGFR szenzitizáló mutáció pozitív tüdő ADC-ben szenvedő férfi kórtörténetét és a primer tüdőtumor recidívájából, a csont-, a máj- és a nyirokcsomó áttéteiből származó autopsziás, fagyasztott tumorminták teljes genom szekvenálásának eredményeit dolgoztuk fel. A molekuláris genetikai vizsgálatok rendkívül részletes és szerteágazó volta miatt e helyütt csak a klinikai szempontból legrelevánsabb eredményeket ismertetjük.

Neurológiai tünetek kapcsán felfedezett agyi áttét műtéti eltávolítását követően, tekintettel a IV stádiumú (agyi- és csontáttét), EGFR exon 19 deléción pozitív tüdő ADC-re, gefitinib kezelés indult, amelyre parciális remisszió következett be (41. ábra). Progresszió 16 hónappal később jelentkezett, amikor is EGFR T790M rezisztencia igazolódott a recidív tüdőtumor bronchoscopos mintájából. 1 ciklus cisplatin-pemetrexed kezelést követően – cisplatin okozta mellékhatások miatt – a terápiát pemetrexeddel folytatták, majd 8 hónappal később – újabb progresszió miatt – afatinibre (2. generációs, irreverzibilis EGFR-TKI) váltottak. A beteg a diagnózis felállítását követő 33. hónapban hunyt el. Kizárólag a boncolás igazolta a kicsiny máj- és nyirokcsomó áttéteket, azok a néhány nappal korábbi CT vizsgálat során nem voltak detektálhatók.



41. ábra. A betegség időbeni lefolyása és az alkalmazott onkoterápiák főbb lépései

A szomatikus mutációk pontos detektálása. Annak érdekében, hogy detektáljuk a szomatikus mutációkat, beleértve az SNV-ket (single nucleotide variations) és az indeleket (kis inszerciók és deléciók), megvizsgáltuk a recidív primer tumort és a metasztázisokat, majd összevetettük a perifériás vér DNS mintájával. A megfelelő szűrőmódszerek alkalmazásával kapott végső adatok 9832 SNV-re, 330 inszercióra és 485 delécióra vonatkoztak (42. ábra A–D). Az SNV allél frekvencia (AF) megoszlás arra utal, hogy a csont- és a májjátétben magasabb volt a tumortartalom, az ugyanazon mintában megfigyelhető kettős csúcs pedig szubklonális mutációk meglétét jelzi (42. ábra E).

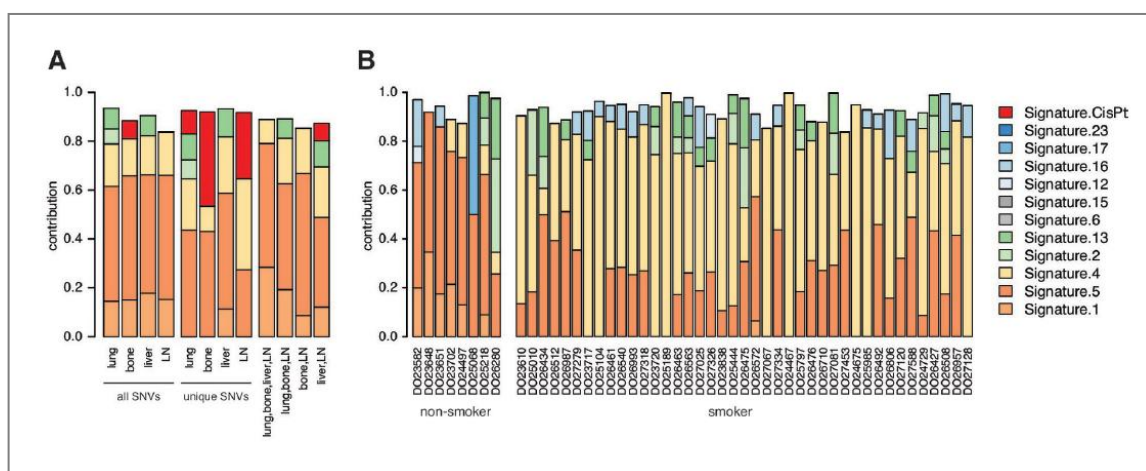


42. ábra. A vizsgált mintákban detektált mutációk (A, B), az egyes minták közti átfedések (C, D), valamint az SNV AF-ek megoszlásának bemutatása (E)

Mindössze két driver mutáció a metasztatikus tüdő ADC-ben. Valamennyi mintában megtaláltuk az EGFR exon 19 aktiváló mutációt, valamint az gefitinib terápia rezisztenciáért felelős EGFR T790M mutációt. Emellett kimutattunk a 17-es kromoszómán – heterozigótaság vesztes következtében létrejött – homozigóta TP53 R280T mutációt is. Semmilyen más szomatikus mutációt nem találtunk a vizsgált mintákban, ami arra utal, hogy az EGFR aktiváció és a TP53 inaktiváció önmagában elegendő a tüdő adenocarcinoma kialakulásának beindításához.

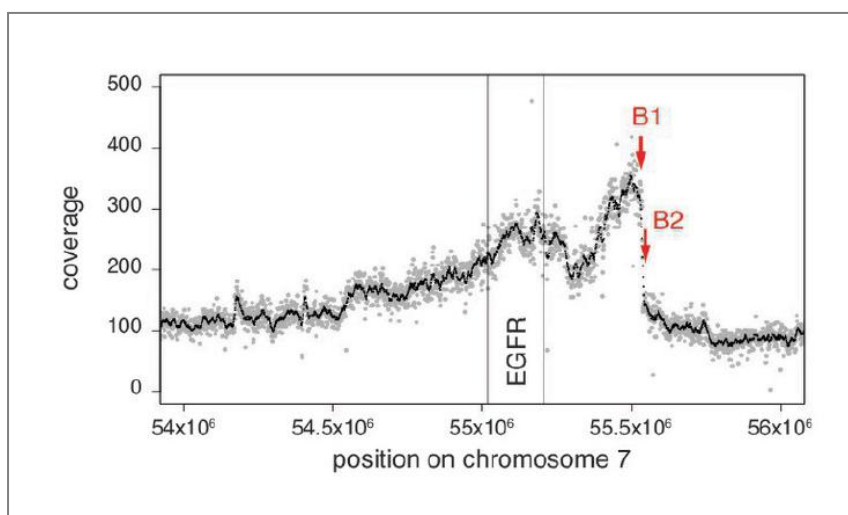
A cisplatin kezelés okozta mutációk detektálása A vizsgálat egyik fő célja volt az onkológiai kezelés indukálta mutációk detektálása a metasztatizálás folyamatának jobb megértése céljából. Azt feltételeztük, hogy az ilyen mutációk valószínűleg szubklonálisak lesznek, amennyiben a kezelés egy már meglévő tumorhelyet vagy metasztázist érint, de klonálisak, ha az áttét a kezelést követően, egyetlen sejtől fejlődik ki. A vizsgálat során valóban tudtunk detektálni mutációkat különböző allélfrekvenciával.

Annak vizsgálatára, hogy az egyetlen ciklus cisplatin terápia valóban mutagén volt-e, cisplatin-kezelt humán sejtvonalak mutációs spektrumának alapján¹⁴⁵ definiáltunk egy cisplatin-indukálta triplet SNV mintázatot, és kerestük ennek megjelenését a tumormintáinkban már detektált SNV-k között. A valamennyi tripletmintázatra való lebontás, amely szerepel a COSMIC adatbázisban primer tüdőrákra és a mintavételezett áttétekre vonatkozóan¹³⁹, valamint a cisplatin mintázat megmutatta, hogy a cisplatin SNV hozzájárult mind a primer tüdő tumor, mind pedig a csont- és nyirokcsomó-metasztázisok mintájának azon egyedi mutációihoz (43. ábra A), melyek nem voltak jelen a TCGA-eredetű, cisplatin kezelésben nem részesült, dohányos és nemdohányos betegekből származó tüdő ADC és SCC génszekvenciákban (43. ábra B). Mindez arra utal, hogy valóban cisplatin-indukálta SNV-ket detektáltunk a cisplatinnal kezelt betegünk tumormintáiban.



43. ábra. A cisplatin kezelés mutagén hatásának igazolása a COSMIC adatbázis (A) és a TCGA tüdőrákra vonatkozó teljes genom szekvenálás eredményeinek (B) felhasználásával

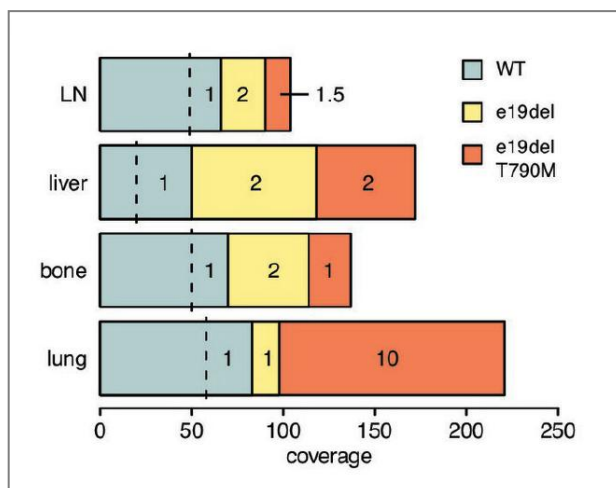
Strukturális átrendeződések hatása az EGFR génre. Annak vizsgálatára, hogy az afatinib kezelés okozott-e változást az EGFR génben, génkópia szám analízist végeztünk. Az EGFR lókuszt és a teljes 7-es kromoszóma szekvencia-lefedettsége azt mutatta, hogy az EGFR gén amplifikálódott is (44. ábra), amely jelenség gyakran megfigyelhető EGFR mutáns tüdő ADC-ben.



44. ábra. Az EGFR gén amplifikációját az illesztett szekvencia megnövekedett lefedettsége mutatja. B1 és B2 jelzi a két leképezett töréspontot.

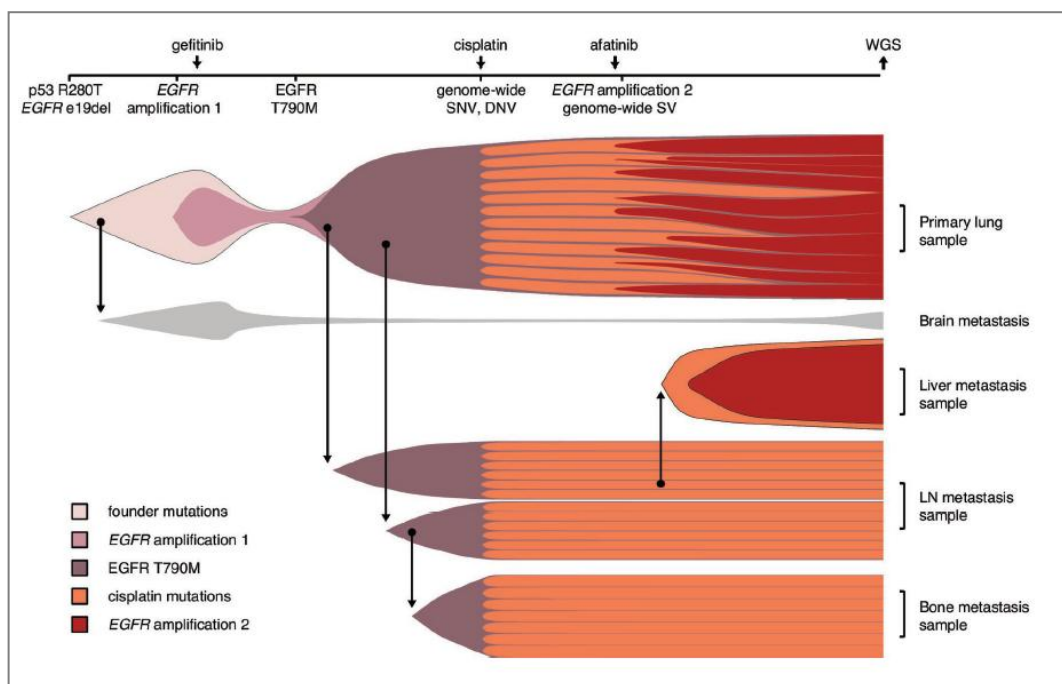
Az amplifikációs események időzítésének becslésére meghatároztuk az egyes EGFR allélok kópiaszámát, feltételezván, hogy a T790M mutáció az exon 19 deléciót (e19del) hordozó allélon következett be, és felhasználván az AF információkat és a tumortartalomra vonatkozó adatokat. Ez utóbbiakat a heterozigotáság veszteség szenvedett TP53 lókuszon lévő csírvonal SNP AF-ekből pontosan ki tudtuk számítani.

Minden minta különböző volt: egy normál allél mellett a primer tumor (lung) egy e19del allélt és tíz további e19del+T790M allélt tartalmazott, míg a távoli metasztázisok két e19del allélt és egy vagy két e19del+T790M allélt tartalmaztak (45. ábra). A nyirokcsomó mintában a számítások az e19del+T790M allélből 1,5 kópiát jeleztek, ezért úgy véljük, hogy ez két sejtpopulációnak a keveredéséből adódott.



45. ábra. A vad típust (wild type = wt), exon 19 deléciót (e19del) és e19del+T790M mutációt tartalmazó EGFR allélok kópiaszáma a recidív primer tüdő tumorban (lung), a csontáttétben (bone), a májáttétben (liver) és a nyirokcsomó metasztázisban (LN)

A tumor növekedésének és terjedésének filogenetikai modellje. A szomatikus mutációk szövetminták közti eloszlása lehetővé tette a tumor filogenezisének ábrázolását, amelyben a korai és késői EGFR amplifikációs eseményeket is jeleztük (46. ábra).



46. ábra. A primer tüdő tumor és az áttétek kapcsolatát bemutató filogenetikai modell. A cisplatin által indukált mutáns szubklónokat is ábrázoltuk.

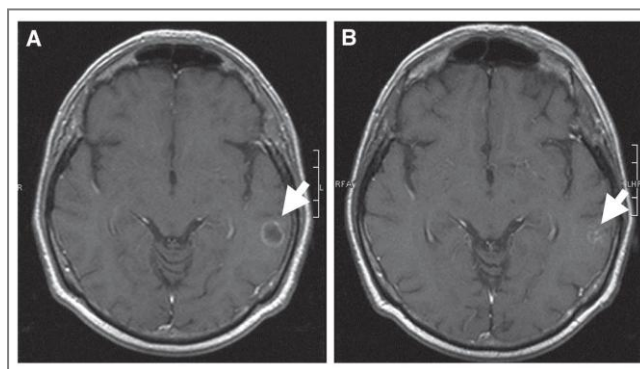
7.3. EGFR-TKI kezelés prediktív faktorainak vizsgálata tüdőrákban

7.3.1. Jelentős prediktív értékű EGFR mutáció agyi áttétet adó tüdőrákban [10]

Ebben a vizsgálatban egy 63 éves, nemdohányzó nőbeteg tumormintáját dolgoztuk fel 2004-ben az EGFR státusz meghatározása céljából, akkor még igen úttörőnek számító molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával.

A beteg anamnézisében 2000-ben – adenocarcinoma miatt elvégzett – jobb felső lobectomia szerepelt. A műtéti szövettan grade II tumort igazolt érbetöréssel és a visceralis pleura infiltrációjával. Tekintettel a szövettani eredményre 4 kúra cisplatin-etoposid adjuváns kezelésben részesült. Közel 3 éven át tünet- és panaszmentes volt, majd 2003-ban neurológiai tünetek kapcsán multiplex agyi áttét igazolódott (47. ábra A). 2003 szeptemberében 12x3 Gy WBRT (teljes agyi besugárzás) kezelés történt. A koponya irradiáció befejezése után 6 héttel készült koponya MRI javulást nem mutatott.

A néhány hónappal korábban a szakirodalomban megjelent biztató eredményű esetismertetésekre alapozva – az Országos Gyógyszerészeti Intézet engedélyének birtokában – 2004 januárjától napi 250 mg gefitinib (Iressa) kezelést kezdtünk¹⁴⁶. Három héttel később neurológiai státuszában drámai javulás volt megfigyelhető. Nyolc héttel a terápia megkezdése után a koponya MRI mérsékelt regressziót írt le, majd újabb 8 héttel később az agyi áttétek teljes regresszióját igazolta (47. ábra B).



47. ábra. A multiplex agyi áttét közül a bal oldali parietalis lebenyben lévő (nyíl) mutatjuk be a nagyfokú regressziót. A: Gefitinib kezelés előtt, B: 4 hónapos kezelés után.

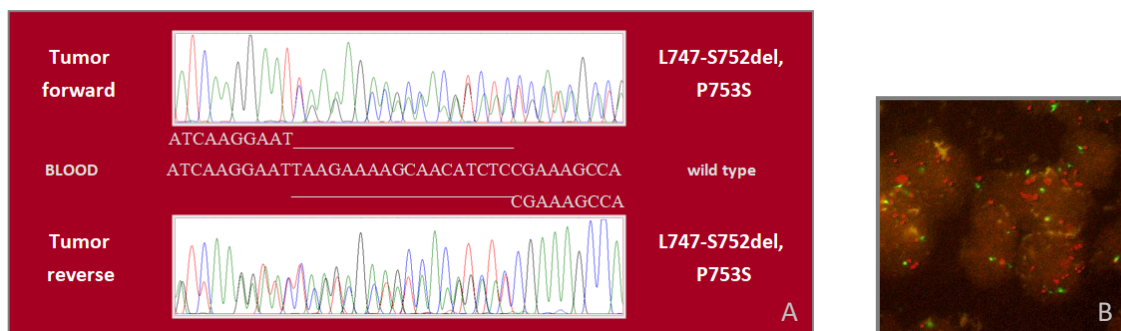
8 hónappal a gefitinib kezelés megkezdését követően a beteg továbbra is tünet- és panaszmentes volt, a rendszeres kontroll koponya MRI vizsgálatok pedig nem jeleztek áttétet.³

³ Az eset publikálásakor 8 hónapos utánkövetési adat állt a rendelkezésünkre, azonban érdemes kihangsúlyozni, hogy a beteg progressziómentes túlélése több mint 4 év volt.

Mivel 2004 áprilisában napvilágot látott az a nagy horderejű felfedezés, amely szerint az EGFR gén kinázdoménjének bizonyos aktiváló mutációit hordozó NSCLC-k egy része rendkívüli érzékenységet mutat az EGFR-TKI gefitinibbel és erlotinibbel szemben^{73,74}, ezért a 2000-ben eltávolított primer tumor FFPE blokkjából EGFR meghatározást végeztünk.

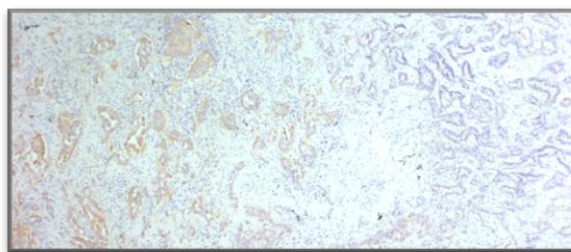
EGFR mutáció analízis. A 18-as és a 21-es exon vad típusúnak bizonyult. A 19-es exon szekvenálása az ATP-hely körül bekövetkezett heterogén mutáció (L747-S752 deléció / P753S) megjelenését igazolta (48. ábra A). A szekvenciaváltozást az eredeti DNS-minták két független PCR-reakciójának mindkét irányból elvégzett szekvenálásával igazoltuk. Az eredményeket a PCR-termékek plazmidokba történő klónozásával és a klónok univerzális primerekkel történő szekvenálásával megerősítettük. Ugyanez a mutáció az egyes PCR-termékek mind a hat klónjában megtalálható volt, ami arra utalhat, hogy a FISH-analízissel megállapított génamplifikáció elsősorban a mutáns allélre vonatkozott. A perifériás fehérvérsejtekben, illetve a műtéti szövettani blokkban lévő tumor körüli normál tüdőszövetben nem találtunk mutációt, ami jelzi a mutáció szomatikus eredetét.

FISH analízis. Ennek során az EGFR génamplifikációját észleltük (48. ábra B).



48. ábra. A primer tumor EGFR génmutáció (A) és EGFR génamplifikáció (B) pozitívnak bizonyult

EGFR immunhisztokémia. Egyes látóterekben EGFR IHC pozitívítás, míg máshol negativitás olt megfigyelhető, ami utal a daganat intratumorális heterogenitására (49. ábra).



49. ábra. Heterogén EGFR immunfestődés a primer tüdőtumornban (x40)

7.3.2. EGFR mutáció, amplifikáció és protein expresszió vizsgálata tüdő adenocarcinomában [11]

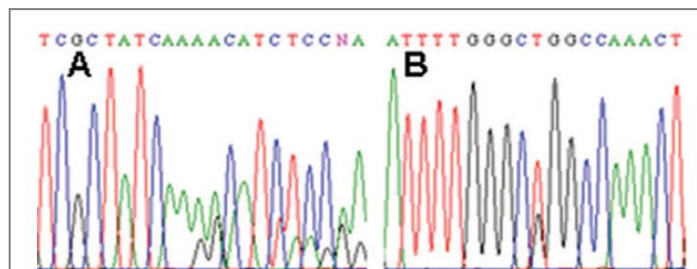
A fenti esetismertetés vizsgálati tapasztalatait felhasználva, elvégeztük 127, tüdő ADC-ben szenvedő betegnél az EGFR státusz (génmutáció, génamplifikáció, protein expresszió) prospektív meghatározását. Eredményeinket a 17. táblázatban foglaltuk össze.

Parameter Y	All	Mutation+			FISH+			Amplified*			IHC+		
		%	(Nmut+/ N Y- examined)	P	%	(N FISH+/ N Y- examined)	P	%	(Namp+/ N Y- examined)	P	%	(N IHC+/ N Y- examined)	P
Total	127	13.5	(17/126)		40	(39/97)		6	(6/97)		59	(68/116)	
Sex													
Female	74	16	(12/74)	0.286	42	(24/57)	0.649	7	(4/57)	1.000	58	(39/67)	0.916
Male	53	10	(5/52)		38	(15/40)		5	(2/40)		59	(29/49)	
Smoking status													
Current/former	52	4	(2/51)	<0.0001	42	(16/38)	0.354	5	(2/38)	0.366	64	(32/50)	0.388
Never	31	42	(13/31)		54	(13/24)		13	(3/24)		73	(22/30)	
Female	25	40	(10/25)	0.676	47	(9/19)	0.327	11	(2/19)	0.521	71	(17/24)	1.000
Male	6	50	(3/6)		80	(4/5)		20	(1/5)		83	(5/6)	
Unknown	44	5	(2/44)		71	(25/35)		3	(1/35)		39	(14/36)	
Age (year) +/-	54.9	58.3/54.0	0.086	54.1/56.7	0.163	50.3/56.0	0.135	55.0/54.6	0.795				
Mutant	17				63	(10/16)	0.051	25	(4/16)	0.007	73	(11/15)	0.204
Wild type	109				36	(29/80)		3	(2/80)		56	(56/100)	
FISH+	39	26	(10/39)	0.051							66	(25/38)	0.377
Amplified*	6	67	(4/6)	0.007							100	(6/6)	0.078
FISH-	58	10.5	(6/57)								57	(30/53)	
IHC+	68	16	(11/67)	0.204	45	(25/55)	0.377	11	(6/55)	0.078			
IHC-	48	8	(4/48)		36	(13/36)		0	(0/36)				
IHC score													
0-99	74	8.1	(6/74)	0.025	31	(17/55)	0.077	0	(0/55)	<0.0001	35	(26/74)	<0.0001
100-199	25	16	(4/25)		57	(12/21)		5	(1/21)		100	(25/25)	
200-300	17	31	(5/16)		60	(9/15)		33	(5/15)		100	(17/17)	

Specimens of 90 primary tumors and 37 metastases were obtained from 21 pathology departments. There were seven bronchoscopic biopsies and two small brain biopsies. The others were samples of surgical resections of the standard size. amp, gene amplification; mut, mutation.
*Subgroup of the FISH+ group.

17. táblázat. Az EGFR mutációs, FISH, és IHC státusza, valamint a tüdő ADC-s betegek klinikopatológiai jellemzői közötti összefüggés prospektív analízise

EGFR mutáció analízis. Az esetek 99%-ában (n=126) sikeres volt az analízis. 17 esetben detektáltunk mutációt (13,5%), közülük 9 volt exon 19 deléción és 7 volt exon 21 pontmutáció (6x T2573G>L858R, 1x T2582A>L861Q) (50. ábra, A és B). Ezek mellett az EGFR-TKI terápiára ismertén pozitív prediktív értékű mutációk mellett identifikáltunk egy új pontmutációt is a 19-es exonon (G2227A>A743T).

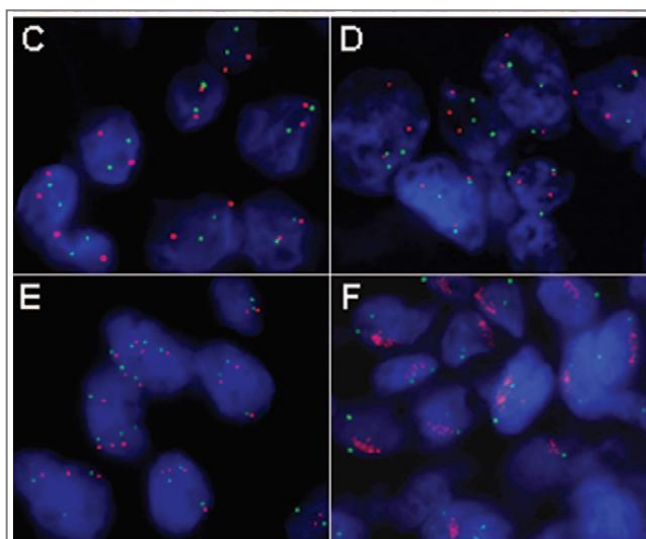


50. ábra. Az exon 19 deléció (del2235-2249 del746-750) (A) és az exon 21 pontmutáció (T2573G>L858R) (B) kromatogramja

A mutációs arány feltűnően magasabb volt a nemdohányosokban (42%) mint a jelenlegi és korábbi dohányosokban (4%) ($p < 0,001$).

Tendencia volt megfigyelhető a magasabb EGFR mutációs arány és a női nem, a FISH pozitív esetek, illetve az EGFR IHC pozitív daganatok között. Amennyiben az IHC H-score értékeket 3 kategóriába soroltuk (0-99, 100-199, 200-300), úgy a korreláció már szignifikánsnak bizonyult ($p = 0,025$).

EGFR FISH analízis. 118 betegnél történt FISH analízis, ami 97 esetben volt sikeres (51. ábra). Az esetek 40%-a ($n=39$) FISH pozitívnak bizonyult, közülük 6 esetben találtunk EGFR génamplifikációt. Egy minta EGFR amplifikációt és poliszómiát mutatott, a többi esetben a poliszómia amplifikáció nélkül volt jelen. Diszómia volt jelen 42 esetben, alacsony triszómia 1 esetben, magas triszómia 14 esetben, míg alacsony poliszómia 1 esetben. Ezeket a mintákat FISH negatívnak értékeltük (60%).

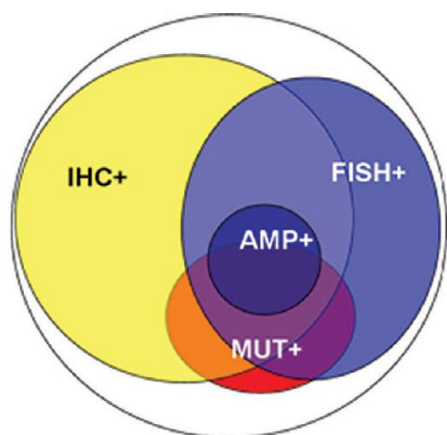


51. ábra. FISH analízis tüdő ADC-ben. C: diszómia, D: magas triszómia, E: magas poliszómia, F: génamplifikáció. Az EGFR gén szignál vörös színű, a 7-es kromoszóma szignál zöld színű.

Szignifikáns kapcsolat volt megfigyelhető az EGFR génamplifikáció és az EGFR génmutáció jelenléte között ($p=0,007$).

EGFR IHC analízis. Az EGFR protein expresszió meghatározás az esetek 99%-ában volt sikeres ($n=116$). Overexpresszió 68 betegnél volt detektálható (59%). Nem volt szignifikáns összefüggés megfigyelhető az IHC pozitivitás és a vizsgált klinikopatológiai paraméterek között (életkor, nem, dohányzási státusz). Habár valamennyi génamplifikált esetben intenzív EGFR membránfestődést tapasztaltunk, statisztikailag a protein expresszió nem mutatott összefüggést a génkópia számmal.

Mintaanalízis mindhárom fenti módszerrel. Kilencven beteg esetében mindhárom vizsgálati módszert sikerrel alkalmaztuk, így ez a populáció az EGFR státusz alapján 8 alcsoportra volt osztható (52. ábra). Ebben megnyilvánul a három módszer függetlensége az EGFR státusz elemzésére vonatkozóan. A mutáció-, a FISH- és az IHC pozitív betegek egyik alcsoportja sem fedte át egymást teljesen, így egyik módszer sem helyettesítheti a másikat, vagy szolgálhat preszelekciós módszerként. A tüdő ADC-knek csak mindössze 24% -a volt teljesen negatív EGFR státuszú mindhárom módszerrel.



Mutáció	FISH	IHC	esetszám	gyakoriság
+	+	+	7	7,8%
+	+	-	3	3,3%
+	-	+	3	3,3%
+	-	-	1	1,1%
-	+	+	18	20%
-	+	-	10	11,1%
-	-	+	26	28,9%
-	-	-	22	24,4%
Összesen:			90	100%
*Amp+ Mut+			4	4,4%
*Amp+ Mut-			2	2,2%

52. ábra. Az ADC betegek alcsoport elemzése az EGFR státuszok alapján.

* FISH alcsoportok, Amp: amplifikáció, Mut: mutáció.

EGFR mutáns tumorok terápiás válasza gefitinib vagy erlotinib kezelésre. Tíz betegnél került sor gefitinib vagy erlotinib kezelésre, miután igazolódott az EGFR tirozinkináz régió mutációja (18. táblázat, prospektív analízis). Valamennyi betegnél terápiás válasz volt megfigyelhető, öt betegnél komplett remisszió, míg öt betegnél parciális remisszió formájában. Az exon 19 deléció pozitív betegek érzékenyebbek voltak az EGFR-TKI kezelésre, mint az exon 21 L858R pontmutáció pozitívak. Amíg az öt exon 19 deléció pozitív betegből négyen komplett remissziót mutattak, addig az exon 21 L858R pozitív öt betegből csak egyetlenegy. A jól reagáló betegek közül öt volt FISH pozitív, közülük kettőben amplifikáció volt megfigyelhető. Négy beteg volt FISH negatív, egy esetben pedig a FISH analízis nem volt sikeres. EGFR protein overexpresszió 6 esetben volt jelen. Három EGFR mutáns, terápiára reagáló beteg EGFR IHC negatívnak bizonyult. Egy esetben az IHC nem volt értékelhető, itt a FISH negatív volt. Egy másik betegnél – aki erlotinibre parciális remissziót mutatott – kizárólag génmutáció igazolódott (T2573G>L858R), normál génkópia szám és negatív EGFR IHC mellett.

Retrospektív biomarker analízis EGFR-TKI kezelésre jól reagáló NSCLC betegek tumormintáiból. Annak elemzésére, hogy melyik biomarker rendelkezik EGFR-TKI kezelésre vonatkozóan a legerősebb prediktív értékkel, retrospektív módon vizsgáltuk 9 NSCLC beteg tumorának EGFR státuszát (18. táblázat, retrospektív analízis). Nyolc beteg erlotinib, míg 1 beteg gefitinib kezelésben részesült. Három betegnél komplett remisszió, 5 betegnél parciális remisszió, 1 esetben pedig stabil betegség volt megfigyelhető. Hét esetben FFPE tumorminta, míg 2 esetben mindössze citológiai kenet állt rendelkezésünkre. Ezen esetekben az EGFR IHC után a tumorsejteket lekapartuk a tárgylemezről mutáció analízis céljából, így FISH vizsgálatra már nem volt lehetőség. A mutáció analízis mind a 9 esetben sikeres volt. Nyolc betegnél EGFR mutációt igazoltunk (hat exon 19 deléció, két exon 21 pontmutáció). Két betegnél csak bronchoscopos biopsziás minta állt rendelkezésre. Itt a tumorsejt arány olyan alacsony volt, hogy a standard PCR és szekvenálás technikával nem lehetett mutációt identifikálni. Amikor azonban mutáció-dúsító PCR-t alkalmaztunk, akkor abban a mintában, ahol a tumorsejt arány 25% volt, exon 19 deléciót tudtunk kimutatni. A csak 10% tumorsejtet tartalmazó szövetmintából nem lehetett mutáció analízist végezni.

A génkópia számot 6 betegnél sikerült meghatározni. Valamennyien FISH pozitívak voltak. Kettőnél EGFR amplifikáció, négyenél pedig poliszómia volt detektálható. Az egyik parciális remissziót mutató beteg bronchoscopos mintája mutáció negatív, de poliszómia pozitív volt. A terápiás választ mutató 9 beteg közül ötnek a tumora EGFR protein overexpressziót mutatott, négynek pedig IHC negatív volt.

Analysis	Case	Histology	Age	Sex	Smoking status	EGFR status			TKI	Response		
						Phenotype	FISH	IHC (score)				
Prospective	Pr 1	ADC	61	F	Never	del747-750insP	+	+	(150)	Gefitinib	CR	
	Pr 2	ADC	45	F	Never	del746-752insV	+	(ampl)	+	(240)	Gefitinib	CR
	Pr 3	ADC	50	M	Former	del747-753insS	–	+	(60)	Erlotinib	CR	
	Pr 4	ADC	55	F	Never	del746-750	+	–	(0)	Erlotinib	CR	
	Pr 5	ADC	59	F	Never	L858R	ND	+	(120)	Gefitinib	CR	
	Pr 6	ADC	67	F	Never	del746-750	–	+	(15)	Erlotinib	PR	
	Pr 7	ADC	53	F	Never	L858R	–	–	ND	Erlotinib	PR	
	Pr 8	ADC	67	M	Never	L858R	+	–	(0)	Erlotinib	PR	
	Pr 9	ADC	64	F	Never	L858R	–	–	(0)	Erlotinib	PR	
	Pr 10	ADC	55	M	Never	L858R	+	(ampl)	+	(270)	Erlotinib	Primar: PR, meta: SD
	Pr 11	ADC	62	M	Never	L858R	+	(150)	+	(270)	Erlotinib, ceased*	
	Pr 12	ADC	57	F	Never	del746-750	+	(ampl)	+	(180)	–	–
	Pr 13	ADC	54	F	?	del747-751	+	(ampl)	+	(270)	–	–
	Pr 14	ADC	43	F	Never	del746-750	+	–	(5)	–	–	–
	Pr 15	ADC	56	F	Smoker	del747-753insS	–	+	(180)	–	–	–
	Pr 16	ADC	62	F	Never	L861Q	+	+	(240)	–	–	–
	Pr 17	ADC	81	M	?	A743T	–	–	ND	–	–	–
Retrospective	Rtr 1	ADC	58	F	Never	del747-753insS	+	+	(150)	Gefitinib	CR	
	Rtr 2	ADC	68	F	Never	del746-750	ND (smear)	–	(0)	Erlotinib	CR	
	Rtr 3	adsq. c.	62	F	Former	L858R	+	(ampl)	+	(160)	Erlotinib	CR
	Rtr 4	ADC	66	F	Never	del746-750	ND (smear)	–	(5)	Erlotinib	PR	
	Rtr 5	ADC	50	M	Never	del746-751insA	+	(ampl)	+	(120)	Erlotinib	PR
	Rtr 6	ADC	65	F	Never	L858R	+	+	(70)	Erlotinib	PR	
	Rtr 7	ADC	72	F	Never	del746-750	ND	–	(5)	Erlotinib	PR	
	Rtr 8	anap. c.	54	M	Former	del746-750 [†]	+	–	(0)	Erlotinib	SD	
	Rtr 9	anap. c.	60	F	?	wild type [‡]	+	+	(200)	Erlotinib	PR	

Each mutant sample contained only one confirmed mutation. All samples were taken before EGFR TKI therapy. ADC, adenocarcinoma; adsq. c., adenosquamous carcinoma; anap. c., anaplastic carcinoma; F, female; M, male; meta, metastasis; ?, not known; ND, not determined; ampl, gene amplification; CR, complete response; PR, partial response; Retros, retrospective; SD, stable disease.

*Cessation due to skin rash.

[†]Bronchoscopic biopsy specimen with 25% tumor cell proportion. Mutant-enriched PCR assay was applied.

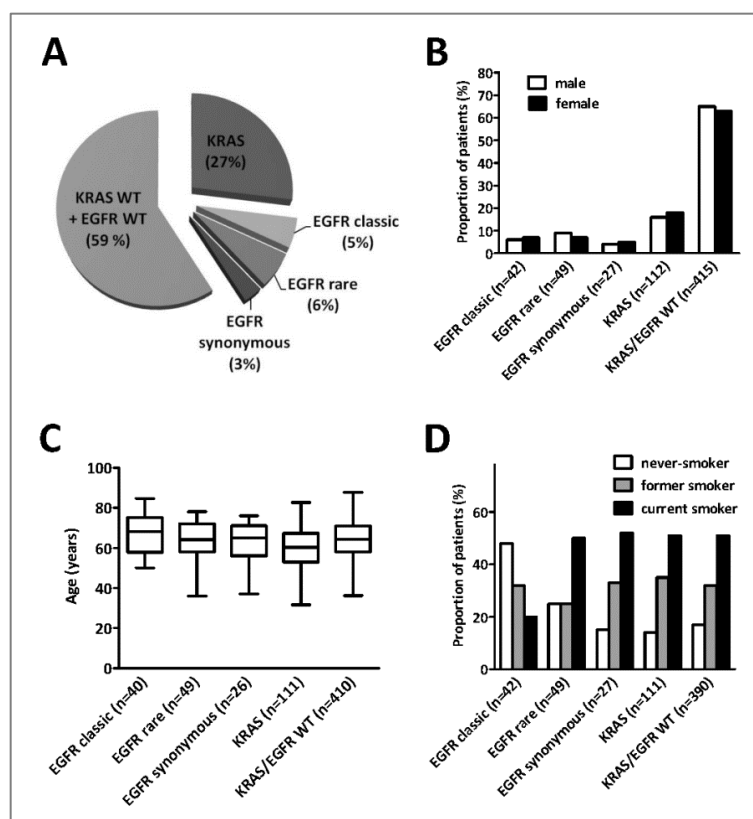
[‡]Bronchoscopic biopsy specimen with <10% tumor cell proportion. Mutant-enriched PCR assay was applied.

18. táblázat. Biomarker analízis EGFR-TKI kezelésre jól reagáló NSCLC betegek tumormintáiból

7.3.3. Klasszikus és ritka EGFR mutációk előfordulási gyakoriságának vizsgálata tüdő adenocarcinomában [12]

A vizsgált 814 tüdő adenocarcinomás betegből 580 volt KRAS vad típusú (wt) (71%) és 216 volt KRAS mutáns (27%). Tizennyolc esetben (2%) nem történt KRAS analízis (53. ábra A). 42 klasszikus EGFR mutációt (5%) (négy betegnél egyidejű KRAS mutációval), 49 ritka EGFR mutációt (6%) (aminosav cserével járó, nem-klasszikus mutáció; három betegnél egyidejű KRAS mutációval), és 27 szinonim mutációt (3%) (aminosav cserével

nem járó, nem-klasszikus mutáció; kilenc betegnél egyidejű KRAS mutációval) detektáltunk (53. ábra B). Az esetek 59%-ában (n=480) kettős vad (wt EGFR/wt KRAS) mutációs státuszú daganatot találtunk.



53. ábra. A EGFR és KRAS mutációk megoszlása tüdő ADC-ben. A: Mutációs státusz a teljes kohorszban (n=814), B: A mutációs státusz és a nem között nincs szignifikáns összefüggés. C: A KRAS mutáció pozitív betegek szignifikánsan fiatalabbak, mint a klasszikus EGFR mutáció pozitívak, vagy mint a wt EGFR/wt KRAS daganatban szenvedők (p=0.0002). D: Ellentétben a klasszikus EGFR mutációval, a ritka EGFR mutációk szignifikáns összefüggést mutatnak a dohányzással (p=0.0062). WT: wild-type (wt).

Kiemelendő, hogy öt beteg esetében G719X vagy L861Q, ritka, szenitizáló EGFR mutációt detektáltunk¹⁴⁷. Vizsgálatunkban a 2014. július 28-án lekért COSMIC adatbázisban tüdődaganatokban már leírt szinonim és ritka EGFR mutációkat (n=33) azonosítottunk¹⁴⁸. 20 esetben más szervi malignus daganatban már közölt mutációt találtunk, és emellett 45, eddig nem publikált új mutációt mutattunk ki.

EGFR T790M rezisztencia mutáció nem volt egyetlen esetben sem kimutatható. 16 betegnél összesen 39 mutációt azonosítottunk, ami azt jelenti, hogy ezen betegek daganatai komplex mutációs mintázatot (legalább két különböző EGFR mutáció egyidejű jelenléte egy mintán belül) mutattak.

A KRAS mutáns ADC-s betegek szignifikánsan fiatalabbak voltak, mint a klasszikus EGFR mutáns, vagy mint a wt EGFR/wt KRAS daganatban szenvedők ($p=0.0002$) (53. ábra C). A klasszikus EGFR mutáció szignifikáns összefüggést mutatott a sohasem dohányzott státusszal az összes többi mutációs állapothoz képest ($p<0.0001$) (53. ábra D). A ritka EGFR mutációk dohányzáshoz társultak, szemben a klasszikus EGFR mutációkkal ($p=0.0062$) (53. ábra D).

7.3.3.1. Az EGFR/KRAS mutációs státusz és a túlélés vizsgálata.

A klasszikus vs. ritka EGFR mutációk különböző hatással voltak a betegek teljes túlélésre. Klinikai utánkövetési adat, beleértve a teljes túlélést is, 419 előrehaladott stádiumú (nem reszekált IIIA, továbbá IIIB – IV) betegnél állt a rendelkezésünkre (19. táblázat).

		Total	Classic EGFR Mutation	Rare EGFR Mutation	Synonymous EGFR Mutation	KRAS mutation	KRAS and EGFR wild-type	P value
Total		419 ^a (100)	22 ^c (5)	26 ^d (6)	16 ^e (4)	80 ^b (20)	271 ^a (65)	
Age (mean $\pm$ SD)		63.9 $\pm$ 10.3	67.4 $\pm$ 10.4	63.5 $\pm$ 9.8	64.3 $\pm$ 8.80	59.9 $\pm$ 10.9	64.6 $\pm$ 9.8	0.003
Gender	Male	203 (48)	7 (32)	13 (50)	7 (44)	37 (46)	135 (50)	0.571
	Female	216 (52)	15 (68)	13 (50)	9 (56)	43 (54)	136 (50)	
ECOG status	0	185 (45)	13 (59)	13 (50)	8 (50)	35 (44)	116 (45)	0.709
	1–2	223 (55)	9 (41)	13 (50)	8 (50)	45 (56)	144 (55)	
	Unknown data	11	0	0	0	0	11	
Smoking status	Never-smoker	70 (17)	9 (43)	6 (23)	3 (19)	8 (10)	44 (17)	0.028
	Former smoker	134 (33)	7 (33)	6 (23)	6 (37)	34 (43)	81 (32)	
	Current smoker	198 (50)	5 (24)	14 (54)	7 (44)	37 (47)	131 (51)	
	Unknown data	17	1	0	0	1	15	
Tumor Stage	Unresected IIIA	68 (16)	2 (9)	5 (19)	10 (63)	16 (20)	36 (13)	<0.001
	IIIB–IV	351 (84)	20 (91)	21 (81)	6 (37)	64 (80)	235 (87)	

Data shown in parentheses are column percentages. Categorical parameters of the different mutational groups were analyzed by χ^2 . Age as a continuous variable was analysed in the mutational groups by analysis of variance and Tukey's multiple comparison test.

^a KRAS molecular analysis was not done in four cases.

^b EGFR molecular analysis was not done in 54 cases.

^c Two concomitant KRAS mutations were identified.

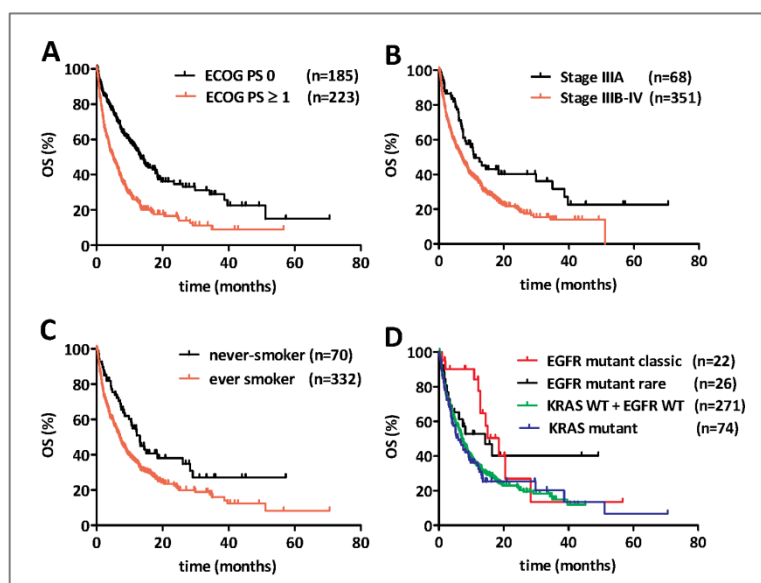
^d Two concomitant KRAS mutations were identified, and KRAS analysis was not done in two cases.

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; EGFR, epidermal growth factor receptor.

19. táblázat. Az utánkövetési adatokkal rendelkező, előrehaladott stádiumú ADC-ben szenvedő betegek (n=419) főbb klinikopatológiai jellemzői

A túlélés elemzésekor vizsgáltuk a nem, az életkor, az ECOG PS, a betegség stádiuma, a dohányzás, valamint a daganat EGFR/KRAS mutációs státuszának szerepét. A férfiak teljes túlélése lényegesen rövidebb volt mint a nőké (HR, 1.32; 95% CI, 1.04–1.66; $p=0.0195$). A jó performansz státusszal (ECOG PS 0) rendelkező betegek teljes túlélése szignifikánsan hosszabb volt, mint az ECOG PS 1-2 betegeké (HR, 2.07; 95% CI, 1.63– 2.62; $p<0.0001$)

(54. ábra A). A IIIB vagy IV stádiumú daganatban szenvedők teljes túlélése rosszabb volt, mint a reszekción át nem esett, de IIIA stádiumú betegeké (HR, 0.637; 95% CI, 0.478–0.850; $p=0.002$) (54. ábra B), ugyanakkor a IIIB és IV stádium között nem találtunk túlélésbeli különbséget. Kedvezőbb volt a teljes túlélés a sosem dohányzottnál, összehasonlítva a valaha dohányzottakkal (HR, 0.666; 95% CI, 0.497–0.892; $p=0.0063$) (54. ábra C). A klasszikus EGFR mutáció jelentős túlélési előnnyel járt, összevetve a wt EGFR-rel (HR, 0.58; 95% CI, 0.37–0.91; $p=0.020$), vagy a KRAS mutációval (HR, 0.52; 95% CI, 0.31–0.89; $p=0.0167$) (54. ábra D). Ezzel ellentétben a teljes túlélést illetően nem volt szignifikáns különbség a ritka EGFR pozitív, a wt EGFR és a KRAS mutáns esetek között. Kiemelendő, hogy a KRAS mutációnak nem volt teljes túlélést befolyásoló hatása. A multivariációs túlélési elemzések azt mutatták, hogy az ECOG PS és a betegség stádiuma mellett a klasszikus EGFR mutáció is független prediktív faktora túlélésnek (HR, 0.45; 95% CI, 0.25–0.82; $p=0.009$) [<http://links.lww.com/JTO/A803>].⁴ Kiemelendő, hogy ezzel szemben a ritka EGFR mutáció nem volt a teljes túlélés szignifikáns, független előrejelzője.

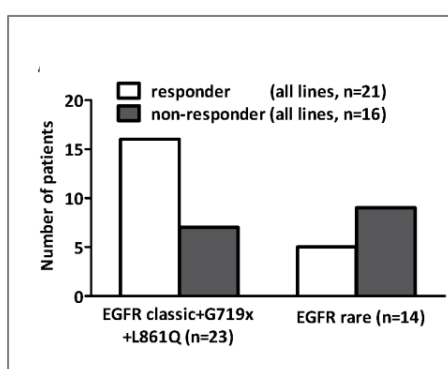


54. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék az előrehaladott stádiumú ADC betegeknél a medián teljes túlélésre vonatkozóan. A: ECOG PS 1–2 vs. ECOG PS 0; $p<0.0001$. B: IIIB–IV vs. IIIA stádium; $p=0.002$. C: sosem dohányzott vs. valaha dohányzott; $p=0.006$. D: EGFR klasszikus mutáns tumoroknál a medián OS szignifikánsan hosszabb volt, mint wt EGFR/wt KRAS tumoroknál ($p=0.02$), vagy mint KRAS mutáns tumoroknál ($p=0.002$), de nem volt hosszabb, mint ritka EGFR mutáns tumoroknál ($p=0.529$).

⁴ A kiegészítő digitális tartalom elérhetőségét [...] jelöltük.

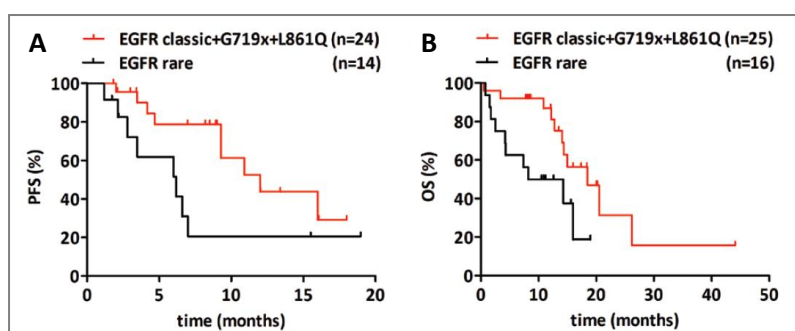
7.3.3.2. Az EGFR mutációs státusz és az EGFR-TKI terápiára adott válasz.

Függetlenül a terápiás vonal sorszámától, a IIIB/IV stádiumú, klasszikus EGFR mutáció pozitív ADC-ben szenvedő betegeknél szignifikánsan magasabb terápiás válaszarány (response rate, RR) volt megfigyelhető, szemben a ritka EGFR mutációs daganatokban szenvedőkkel (71% vs. 37%; $p=0.039$) [<http://links.lww.com/JTO/A803>]. Ez a különbség megjelent egy statisztikailag nem szignifikáns, de klinikailag jelentős medián PFS különbségben is (klasszikus EGFR mutáció: 12.0 hónap, ritka EGFR mutáció: 6.2 hónap; ($p=0.076$)) [<http://links.lww.com/JTO/A804>]. A medián teljes túlélésben nem találtunk szignifikáns különbséget a fenti két betegcsoport vizsgálatokor ($p=0.212$). Fontos kihangsúlyozni, hogy amikor az összehasonlítandó csoportokat úgy állítottuk össze, hogy klasszikus EGFR mutáció plusz szenzitizáló ritka EGFR mutáció (G719 vagy L861)¹⁴⁷ vs. egyéb ritka EGFR mutáció, akkor a terápiás válaszarányban szignifikáns különbséget tudtunk detektálni (RR 70% vs. 36%; $p=0.044$) (55. ábra).



55. ábra. Terápiás válaszarány összehasonlítása EGFR klasszikus mutáció pozitív plusz szenzitizáló ritka EGFR mutáció pozitív vs. egyéb ritka EGFR mutáció pozitív tüdő ADC-k között

Érdemes kiemelni, hogy ezt a felbontást alkalmazva ugyancsak szignifikáns volt a különbség a PFS-ben is ($p=0.048$) (56. ábra A) és az OS-ben is ($p=0.01$) (56. ábra B).

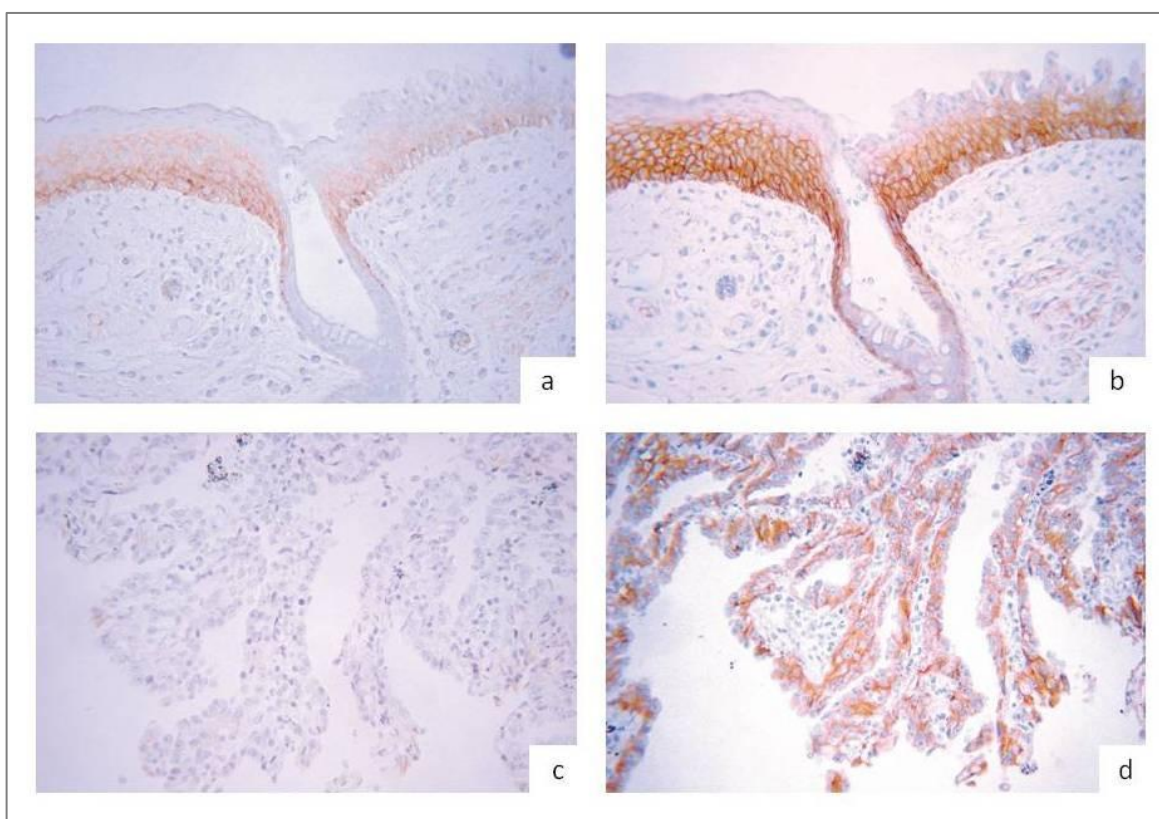


56. ábra. A: PFS és B: OS összehasonlítása EGFR klasszikus mutáció pozitív plusz szenzitizáló ritka EGFR mutáció pozitív vs. egyéb ritka EGFR mutáció pozitív tüdő ADC-k között

7.3.4. EGFR protein expressziót befolyásoló protokoll modifikációk tüdő adenocarcinómában [13]

A retrospektív analízis során 50 tüdő ADC EGFR protein expresszióját elemeztük, és 8 esetben találtunk IHC negativitást az EGFR pharmDxTM kit alkalmazásával. Tekintettel arra, hogy a belső kontrollként szolgáló szöveti struktúrák (perifériás idegek, bronchialis epithelium) gyengén pozitívak voltak, továbbá, mivel a gyártó által biztosított kontroll metszet is pozitív volt, ezeket a tumorokat EGFR negatívnak minősítettük.

Mivel az antigén feltárási technikák alapvetően befolyásolhatják az antigén detektálás hatékonyságát, teszteltük az EGFR pharmDxTM kit-et mikrohullámú sütőben, citrát oldattal történt antigén feltárást követően előbb EGFR overexpressziót mutató fej-nyaki laphámrák szövetmintán (57. ábra a, b), majd a tüdő ADC szövetmintákon (57. ábra c, d).



57. ábra. EGFR expresszió normál laryngealis epithel szöveten (pozitív kontroll) (a, b) és tüdő ADC mintákon (c, d) EGFR pharmDxTM protokoll (a, c), majd ennek módosított változatának alkalmazásával (b, d).

Antigén feltárás: a, c: proteináz K emésztés és FDA protokoll; b, d: mikrohullámú sütőben való kezelés, hosszabb inkubálás a primer antitesttel és LSAB előhívó. Figyeljük meg a szignifikánsan intenzívebb immunreakciót a „b” kép normál epithel sejtjein, összehasonlítva az „a” képpel.

57. ábra leírásának folytatása

A tüdő bronchoalveolaris carcinoma mintáját negatívnak minősítettük az EGFR pharmDx™ eredeti FDA protokolljának alkalmazását követően (c). Mikrohullámú sütőben történő antigén feltárás, megnyújtott inkubálási idő a primer antitesttel, valamint LSAB előhívó használatát követően a korábban negatívnak tartott tumorsejtek több mint 50%-a intenzív membrán EGFR immunfestődést mutatott (d). (EGFRx200)

A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a specifikus immunreakció nemcsak az EGFR membrán pozitív laphámrákos sejteken, hanem a szomszédos normál laphám- és hengerhám-sejteken is erősebbé vált (57. ábra a vs. b), ami arra utal, hogy az alkalmazott IHC protokoll modifikáció – tehát a proteináz-K emésztés helyett az alternatív antigén feltárás (citrát oldattal, mikrohullámú sütőben) alkalmazása – jelentősen javította az EGFR pharmDx™ kit teljesítményét. Fontos kihangsúlyozni, hogy ez a módosítás nem befolyásolta a háttétfestődést.

Teszteltük azt is, hogy vajon a primer antitest inkubációs idejének megnövelése, és egy másik detektáló rendszernek, az LSAB kit-nek (jelzett streptavidin-biotin [LSAB] módszeren alapuló IHC Kit [VitroView™]) az alkalmazása befolyásolja-e az EGFR IHC reakciót. Eredményeink azt mutatták, hogy a fej-nyakrákos teszt metszeteken ezek a módosítások nem befolyásolják az EGFR IHC pozitív sejtek arányát és a festődés intenzitását.

A következőkben a nyolc EGFR negatívnak értékelt tüdő ADC mintát újra megvizsgáltuk, és összehasonlítottuk a mikrohullámú sütőben elvégzett antigén feltárás után alkalmazott FDA protokoll eredményét a különböző antigén feltáró módszerek mellett alkalmazott, egy éjszakán át tartó primer antigén inkubálás mellett és az LSAB detektáló kit használata során kapott eredményekkel.

Az egyik minta esetében ismételt vizsgálatokkal sem volt pozitív reakció detektálható a normál bronchialis epithelium sejtekben, annak ellenére, hogy az alternatív antigén feltáró módszert alkalmaztuk, és kipróbáltuk a vizsgálat során tesztelt valamennyi egyéb metodikai módosítást is. Mindezek alapján szövetfixálási probléma gyanúja merült fel, és a mintát osztályozhatatlannak minősítettük.

A megmaradt hét esetből négy EGFR IHC pozitívvá vált a mikrohullámú sütőben, citrát oldattal elvégzett antigén feltárás és a primer antitest megnövelt inkubációs idejének kombinált alkalmazása következtében (20. táblázat). A négy pozitív eset a protokoll

modifikációt követően rendkívül különböző EGFR protein expressziót mutatott; az IHC pozitív tumorsejtek százalékos aránya 10% és >50% érték között változott (20. táblázat) (57. ábra c, d).

<i>Case N°</i>	<i>Protocol</i>			
	<i>FDA</i>	<i>MW-FDA</i>	<i>FDA-long</i>	<i>MW-long</i>
1	0	0	>50	>50
2	0	0	<10	>50
3	0	0	>20	<10
4	0	1	>10	>20
5	0	nt	nt	0*
6	0	nt	nt	0
7	0	nt	nt	0
8	0	nt	nt	0

Data are expressed in % of EGFR+ cancer cells. FDA= original FDA-approved protocol. MW-FDA= FDA protocol, but the antigen retrieval was replaced by microwave cooking. FDA-long= FDA protocol, but the incubation with the primary antibody was extended to overnight at 4°C. MW-long= similar protocol to FDA-long, but the antigen retrieval was switched to microwave cooking. MW-long used LSAB developing reagent. *=fixation problem

20. táblázat. A tüdő ADC mintákon EGFR pharmDxTM kit-tel végzett EGFR IHC vizsgálat során alkalmazott technikai módosítások hatása az EGFR IHC reakciókra

Összehasonlítván a pozitív tumorsejtek százalékos arányát a különböző metodikai módosítások alkalmazását követően, nyilvánvalóvá vált, hogy az EGFR reakcióra a legnagyobb hatással a primer antitest inkubációs idejének megnyújtása volt, mivel ez négy – korábban negatívnak értékelt – daganatban erős pozitív festődést eredményezett (20. táblázat). Mindemellett, az antigén feltárás módszerének módosítása tovább befolyásolta az EGFR fehérje kimutatásának hatékonyságát (20. táblázat). Az EGFR pharmDxTM előhívójának LSAB kit-re történő cseréje nem változtatta meg az EGFR IHC reakció specifitását vagy intenzitását.

7.3.5. EGFR expresszió vizsgálata tüdő adenocarcinómák szövettani altípusaiban [14]

A #14 vizsgálat során kiegyensúlyozott betegszámú kohorszokat hoztunk létre annak céljából, hogy I stádiumú tüdő adenocarcinómák (ADC) szövettani alcsoportjaiban, így lepidikus terjedési mintázatot mutató ADC-ben (LAC) és lepidikus terjedést nem mutató ADC-ben (NLAC), tanulmányozzuk az EGFR protein expresszióját és autofoszforilációját (21. táblázat). Az utóbbit pEGFR (phospho-EGFR; Y1173) antitest alkalmazásával végeztük.

Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a két szövettani csoport között az életkor, a nem és a daganat EGFR és KRAS molekuláris altípusa tekintetében, ugyanakkor az IB stádium gyakoribb volt a NLAC csoportban ($p=0,0002$), a nemdohányos státusz pedig a LAC csoportban ($p=0,017$).

	n (%)			P
	Adenocarcinoma	Nonlepidic (NLAC)	Lepidic (LAC)	
No. patients	110	49	61	
Mean age (y)	57.1	54.2	59.0	NS
Sex				
Male	50 (45.5)	26 (53.1)	24 (39.3)	
Female	60 (54.5)	23 (46.9)	37 (60.7)	NS
Stage				
IA	78 (70.9)	26 (53.1)	52 (85.2)	
IB	32 (29.1)	23 (46.9)	9 (14.8)	0.0002
Smoking habit				
Smoker	72 (65.5)	38 (77.6)	34 (55.7)	
Exsmoker or nonsmoker	38 (34.5)	11 (22.4)	27 (44.3)	0.017
Mutation status				
EGFR	22 (20.0)	14 (28.6)	8 (14.6)	NS
K-RAS	26 (23.65)	11 (22.4)	15 (27.3)	NS

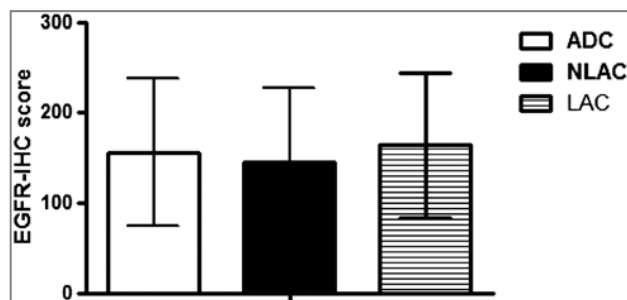
Statistical analysis was performed by the χ^2 test.

21. táblázat. A vizsgált NLAC és LAC betegek klinikopatológiai jellemzői

Eltekintve az IA stádiumú LAC esetek kedvezőbb túlélésétől, a két szövettani alcsoport között a prognózis szempontjából nem volt szignifikáns különbség [<http://links.lww.com/PDM/A44>]⁵.

A teljes ADC csoport, továbbá a vizsgált két szövettani altípus EGFR protein expresszióját (Hirsch score) összehasonlítva, nem észleltünk szignifikáns különbséget (58. ábra).

⁵ A kiegészítő digitális tartalom elérhetőségét [...] jelöltük.



58. ábra. EGFR protein expresszió a vizsgált ADC altípusokban (LAC, NLAC). Az adatok az átlag $\pm$ SD értéket mutatják.

A pEGFR IHC vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a pEGFR+ tumorok szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a LAC csoportban, mint az NLAC csoportban (22. táblázat). Sem az EGFR immunpozitivitásnak, sem pedig a pEGFR immunpozitivitásnak nem volt prognosztikai értéke.

	n (%)		P
	NLAC	LAC	
Incidence of pEGFR + tumors	7/49 (14.3)	22/61 (36.1)	0.01
Surviving patients	3/32 (9.4)	16/45 (35.6)	
Dead patients	4/17 (23.5)	6/16 (37.5)	
P	NS	NS	
Male	1/48 (2.1)	8/61 (13.1)	NS
Female	6/48 (12.5)	14/61 (23.0)	NS
P	NS	NS	
Smoker	1/38 (2.6)	13/34 (38.2)	0.0002
Nonsmoker	3/11 (27.3)	8/27 (29.6)	NS
P	0.031	NS	

LAC indicates minimal invasive adenocarcinoma/lepidic variant; NLAC, adenocarcinoma without lepidic growth; P level was determined by the Fisher exact test; pEGFR, Y1173 phosphorylated EGFR.

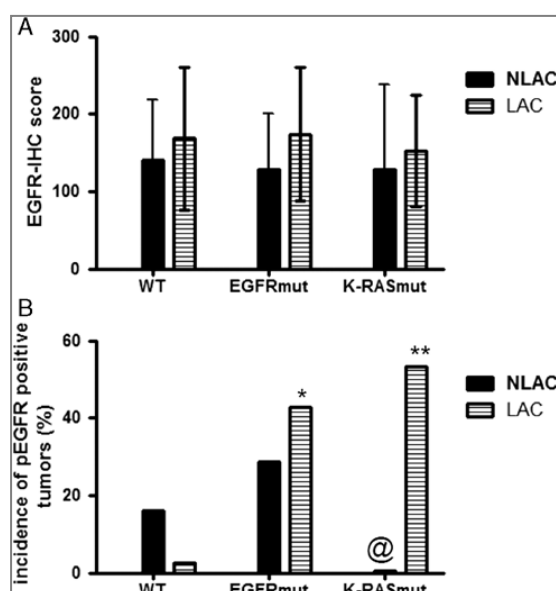
22. táblázat. A pEGFR előfordulási gyakorisága a vizsgált ADC-k klinikopatológiai alcsoportjaiban

Habár a nemnek egyre nagyobb jelentősége van tüdő ADC-ben – mivel a nemdohányzó nőkben gyakrabban alakul ki EGFR mutáns tüdőrák, ami jól reagál EGFR-TKI terápiára –, ennek ellenére jelen vizsgálatunkban a pEGFR+ tumorok aránya hasonló volt a nők és a férfiak körében.

A dohányzás negatívan befolyásolja az EGFR-TKI terápiára való érzékenységet, ezért megvizsgáltuk az EGFR autofoszforylációját a dohányzási anamnézis függvényében. A konstitutív EGFR aktivitással rendelkező (pEGFR+) tumorok gyakorisága szignifikánsan

alacsonyabb volt dohányosokban, mint nemdohányosokban, azonban kizárólag az NLAC alcsoportban (22. táblázat). Érdekes azt is kiemelni, hogy a dohányos csoportban a LAC tumorok között gyakoribb volt a pEGFR+ eset. Habár a KRAS mutáció gyakoriságának tekintetében nem volt különbség a két alcsoport között, az EGFR mutáció gyakoribb volt az NLAC csoportban, de a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns értéket.

Az EGFR protein expresszió vizsgálatakor azt találtuk, hogy bár a LAC tumorok tendencia szinten magasabban expresszálják az EGFR-t mint az NLAC tumorok, nincs különbség az EGFR expresszióban az EGFR mutáns, a KRAS mutáns és a wt/wt (dupla vad típusú) daganatok között (59. ábra A).



59. ábra. EGFR protein expresszió és aktivitás tüdő ADC szövettani altípusaiban (LAC, NLAC).

A: EGFR protein IHC (Hirsch score; átlag ± SD). B: pEGFR (phospho-EGFR; Y1173) pozitív tumorok incidenciája a molekuláris altípus függvényében *p=0.009, **p=0.000 vs. wt LAC tumorok, @p=0.06 vs. wt NLAC tumorok (Fisher exact test). WT: wt/wt tumorok.

NLAC-ban kizárólag az EGFR mutáns, vagy a wt/wt esetek tartalmaztak pEGFR+ tumorokat, ez azonban nem volt így az LAC esetében (59. ábra B). Ez utóbbi altípusnál a pEGFR+ daganatok incidenciája szignifikánsan magasabb volt az EGFR mutáns tumorokban, mint a wt/wt esetekben, de meglepő módon a KRAS mutáns tumorokban is (59. ábra B). További kiemelő eredmény, hogy az EGFR mutáns esetek között az EGFR+ tumorok %-os aránya magasabb tartományban mozgott (28,6% – 42,9%), összehasonlítva a wt esetek tumoraival (2,6% – 16,1%).

7.3.6. KRAS mutáció altípusok vizsgálata tüdő adenocarcinomában [15]

A KRAS mutáció altípusait vizsgáltuk 1125, előrehaladott stádiumú tüdő ADC-s betegben. Közülük 764 daganat volt wt KRAS (67,9%), 335 betegé KRAS kodon 12 mutáns (29,8%), 26 betegé pedig KRAS kodon 13 mutáns (2,3%). A teljes mutációs arány 32,1% volt (361/1125). A mutációk 92,8%-a 12-es kodont, 7,2%-a a 13-as kodont érintette.

7.3.6.1. Betegjellemzők és a 12-es és 13-as kodonok mutációs státusza

A bevonási kritériumok (diagnóziskor irreszekábilis III vagy IV stádiumú tüdő ADC, platinabázisú kemoterápia, ECOG PS 0 vagy 1 és komplett klinikai utánpótlás) alapján összesen 338 wt KRAS (67%), 147 kodon 12 mutáns (29%) és 20 kodon 13 mutáns (4%) daganatban szenvedő beteget vontunk be az analízisbe. Valamennyien kaukázusiak voltak. A KRAS mutáció klinikai relevanciájának megítélése céljából összehasonlító elemzéseket végeztünk, melyek eredményét a 23. táblázatban foglaltuk össze.

	No. of patients (%)	KRAS status			P value
		WT (%)	KRAS12 (%)	KRAS13 (%)	
All patients	505 (100%)	338 (67%)	147 (29%)	20 (4%)	
Age (years) ^a					0.119
<55	109 (21.6%)	66 (19.5%)	35 (23.8%)	8 (40%)	
55–64	251 (49.7%)	166 (49.1%)	77 (52.4%)	8 (40%)	
≥ 65	145 (28.7%)	106 (31.4%)	35 (23.8%)	4 (20%)	
Smoking ^b					0.059
Never-smoker	63 (12.5%)	49 (14.5%)	13 (8.8%)	1 (5%)	
Ever-smoker	398 (78.8%)	249 (73.7%)	132 (89.8%)	17 (85%)	
Gender					0.120
Male	262 (51.9%)	186 (55%)	66 (44.9%)	10 (50%)	
Female	243 (48.1%)	152 (45%)	81 (55.1%)	10 (50%)	
ECOG PS					0.307
0	279 (55.2%)	190 (56.2%)	77 (52.4%)	12 (60%)	
1	226 (44.8%)	148 (43.8%)	70 (47.6%)	8 (40%)	
Stage					0.668
III	167 (33.1%)	115 (34%)	47 (32%)	5 (25%)	
IV	338 (66.9%)	223 (66%)	100 (68%)	15 (75%)	
Response ^c					0.260
PD + SD	240 (47.9%)	157 (46.4%)	72 (49%)	11 (55%)	
CR + PR	245 (48.9%)	161 (47.6%)	75 (51%)	9 (45%)	
Survival					
Median PFS (days) ^d		211 (189–232)	185 (156–214)	157 (0–323)	0.534
Median OS (days) ^d		479 (395–563)	471 (329–613)	330 (185–475)	0.917

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status. PD, progressive disease; SD, stable disease; CR, complete response; PR, partial response

^a Mean age was 60.1 years (range, 33–79; SD = 8.04) for the entire patient population, 60.7 years (range, 33–79; SD = 7.93) for the WT patients, 58.8 years (range, 39–78; SD = 8.16) for the KRAS codon 12 mutant group and 58.1 years (range, 47–73; SD = 8.02) for the KRAS codon 13 mutant cohort.

^b In 44 cases, smoking status was not available.

^c In 20 cases, response data were not available.

^d Confidence interval (95%) is given in parentheses; data shown in parentheses are column percentages.

23. táblázat. A KRAS mutációs státusz és a vizsgált klinikopatológiai jellemzők közötti összefüggés előrehaladott stádiumú tüdő ADC-ben szenvedő betegekben (n=505)

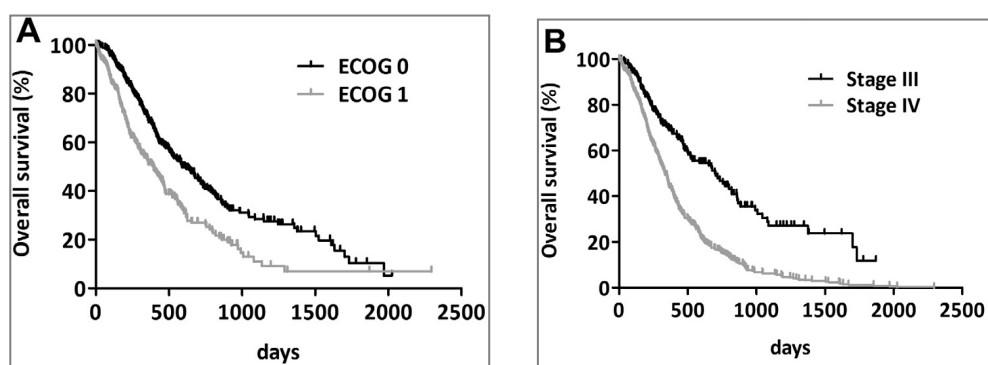
Nem volt szignifikáns összefüggés a daganatok KRAS mutációs státusza és a nem, a betegség stádiuma, a kemoterápiára adott válasz, a PFS, vagy az OS között (23. táblázat).

A KRAS mutáció meglehetősen nem mutatott összefüggést az életkorral az alábbi csoportbontásban: <55, 55–64 és ≥65 év ($p=0,119$). Az egy-utas variancia analízis (ANOVA) teszt Tukey multiplex összehasonlítással ugyanakkor szignifikáns különbséget jelzett a wt KRAS és a KRAS kodon 12 mutáns daganatban szenvedők között (60,7 év vs. 58,8 év; $p=0,032$).

Kiemelendő, hogy a valaha dohányzottak és a KRAS mutáció között csaknem szignifikáns, pozitív összefüggés volt látható ($p=0,059$) (23. táblázat). Amikor azonban a KRAS mutáns eseteket egybevettük (wt KRAS / $n=298$ / vs. kodon 12 és 13 mutáns KRAS / $n=167$ /), a KRAS mutáció pozitivitás és a valaha dohányzott státusz közti pozitív összefüggés elérte a statisztikailag szignifikáns szintet ($p=0,018$). Ennek megfelelően megnövekedett kockázatot találtunk a valaha dohányzott, és előrehaladott stádiumú ADC-ben szenvedők körében, hogy daganatuk KRAS mutációt hordoz ($HR=1,93$; 95% CI=1,1136–3,3512; $p=0,0089$), ami a KRAS mutáns tumorra vonatkozóan közel kétszeres kockázatnak felel meg.

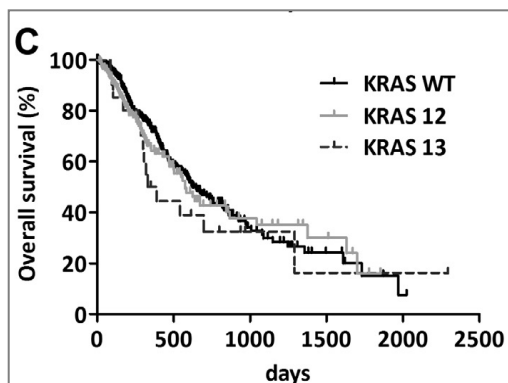
7.3.6.2. Prognosztikai faktorok platinabázisú kemoterápiával kezelt, előrehaladott stádiumú tüdő ADC-ben

Amikor klinikopatológiai faktoroknak (nem, tumor stádium, KRAS státusz ECOG PS) a betegség kimenetelére vonatkozó prediktív értékét vizsgáltunk, azt láttuk, hogy az ECOG PS 0 betegek teljes túlélése szignifikánsan hosszabb volt, mint az ECOG PS 1 betegeké ($p<0,001$) (60. ábra A). Azt is megfigyelhettük, hogy a III stádiumú betegek teljes túlélése szignifikánsan hosszabb volt, mint a IV stádiumú betegeké ($p<0,001$) (60. ábra B).



60. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék platinabázisú kemoterápiával kezelt, előrehaladott stádiumú tüdő ADC-ben. A: Kedvezőbb teljes túlélés ECOG PS 0 vs. 1 esetén. B: Kedvezőbb teljes túlélés III stádiumú vs. IV stádiumú betegség esetén.

A fentiekkel ellentétben a daganat KRAS mutációs státusza, illetve a mutáció altípusa nem mutatott összefüggést a betegek teljes túlélésével ($p=0,621$) (60. ábra C).



60. ábra C. A daganatok mutációs státusza nem mutat összefüggést a teljes túléléssel

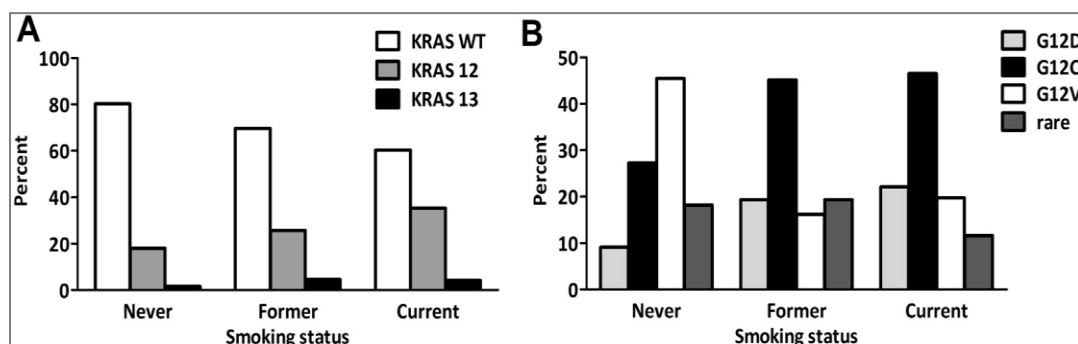
A PFS-re és az OS-re vonatkozó prognosztikai faktor vizsgálat során a multivariációs Cox regressziós modellel nem találtunk összefüggést a nemmel, a dohányzási státusszal és a KRAS státusszal. Ezzel ellentétben a betegség korábbi klinikai stádiuma és az alacsonyabb ECOG PS érték független, kedvező prognosztikai faktornak bizonyult mind a PFS-re, mind pedig az OS-re vonatkozóan (stádium–PFS: $p<0,001$; stádium–OS: $p=0,002$; ECOG PS–PFS: $p<0,001$; ECOG PS–OS: $p<0,001$).

7.3.6.3. Szubtípus specifikus KRAS kodon 12 mutációk előrehaladott stádiumú tüdő ADC-ben

A következőkben a KRAS kodon 12 mutáns daganatban szenvedő betegek klinikopatológiai jellemzőit vizsgáltuk, és elemeztük azok kapcsolatát az aminosav-specifikus mutációs státusszal. Hasonlóan a teljes kohorszhoz, a dohányzási státusz és a daganatok specifikus KRAS kodon 12 mutációi között csaknem szignifikáns összefüggés volt kimutatható ($p=0.055$). Éppen ezért további analízist végeztünk a KRAS mutációs státusz és a dohányzás kapcsolatát illetően (61. ábra).

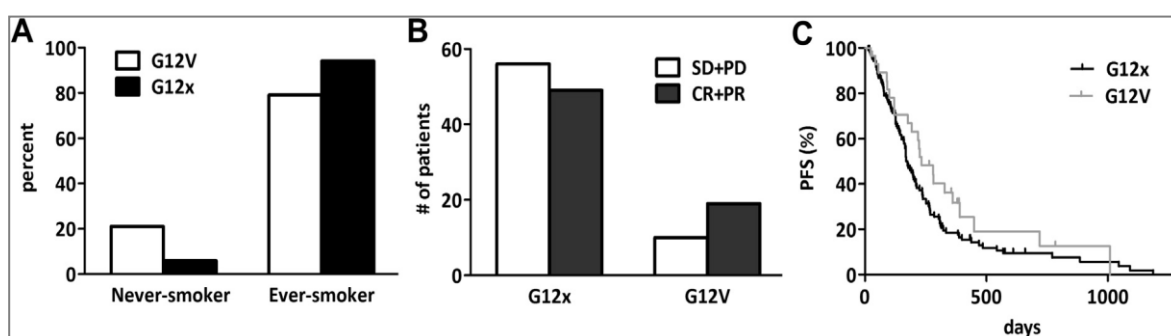
A KRAS kodon 12 mutáció sokkal gyakoribb volt a jelenlegi és/vagy korábbi dohányosokban, mint a sohasem dohányzottakban ($p=0,032$) (61. ábra A).

Kiemelendő, hogy az aminosav-specifikus mutációk elemzése azt igazolta, hogy a G12V KRAS mutáció gyakrabban fordul elő a sohasem dohányzottakban, mint a jelenlegi és a korábbi dohányosokban (61. ábra B).



61. ábra. A betegek dohányzás szerinti megoszlása a wt KRAS, KRAS kodon 12 mutáció pozitív és a KRAS kodon 13 mutáció pozitív csoportokban (A), valamint a KRAS kodon 12 mutációk altípusaiban (B). A: A KRAS mutáció szignifikánsan gyakoribb a jelenlegi és korábbi dohányosokban ($p=0,032$). B: A G12V KRAS mutáció gyakrabban fordul elő a nemdohányosokban.

A G12V KRAS mutációs alcsoport további elemzése során azt találtuk, hogy a G12V KRAS mutáció pozitivitás sokkal gyakoribb a nemdohányosok körében, mint az egyéb KRAS mutáció (G12x) fajták ($p=0,016$) (62. ábra A). Ennek az alcsoportnak a betegek kedvezőbben reagáltak a platinabázisú kemoterápiára ($p=0,077$) (62. ábra B). Emellett ezeknél a betegeknél detektálható volt egy – bár statisztikailag nem szignifikáns, de klinikailag figyelemre méltó – megnövekedett medián PFS érték (233 nap vs. 175 nap; $p=0,145$), szemben a G12x KRAS mutáns daganatban szenvedőkkel (62. ábra C). Kiemelendő, hogy ez a különbség csökkent az OS adatok vonatkozásában.



62. ábra. Dohányzási adatok, kemoterápiás válasz és PFS G12V KRAS mutáns tüdő ADC-ben, összehasonlítva az egyéb KRAS mutációkkal (G12x). A: A nemdohányosokban gyakoribb a G12V KRAS mutáció altípus, mint a G12x ($p=0,016$). B: A G12V KRAS mutáció altípusú daganatban szenvedő betegeknél kedvező tendencia figyelhető meg a kemoterápiás választ illetően ($p=0,077$); a betegek száma szerint feltüntetett adatok. C: A G12V KRAS mutáns daganatban szenvedő betegeknél kedvező tendencia észlelhető a PFS hosszát illetően, szemben a G12x típusú esetekkel (medián PFS 233 nap vs. 175 nap; $p=0,145$).

7.3.7. A KRAS mutáció incidenciája és a távoli áttét helyére vonatkozó prognosztikai értéke tüdő adenocarcinómában [16]

A vizsgálatban résztvevő 500 ADC beteg klinikopatológiai paramétereit a 24. táblázatban foglaltuk össze. 362 betegnél (72%) egyetlen szervre lokalizálódó metasztatikus betegséget találtunk, 138 betegnél (28%) pedig többszervi érintettséget. A leggyakoribb áttéti helyek voltak a tüdő (45.6%), a csont (26.2%), a mellékvese (17.4%), az agy (16.8%), a pleura (15.6%) és a máj (11%).

Metastatic site	Total	Single-organ	Multiple-organ	Lung*	Bone*	Adrenal*	Brain*	Pleura*	Liver*
Number of patients	500	362**	138	228	131	87	84	78	55
Single-organ only				152	50	38	53	43	16
Age (mean $\pm$ SD)	61.9 $\pm$ 9.4	62.3 $\pm$ 9.3	60.8 $\pm$ 9.7	62 $\pm$ 8.9	60 $\pm$ 10.7	63.1 $\pm$ 6.8	59.7 $\pm$ 9.2	66.8 $\pm$ 10.4	64.4 $\pm$ 9.1
Gender	Male	245 (49%)	181 (50%)	64 (46%)	102 (45%)	74 (56%)	34 (39%)	36 (43%)	26 (47%)
	Female	255 (51%)	181 (50%)	74 (54%)	126 (55%)	57 (44%)	53 (61%)	48 (57%)	29 (53%)
ECOG PS	0-1	459 (94%)	335 (94%)	124 (92%)	218 (97%)	115 (91%)	75 (87%)	77 (93%)	71 (91%)
	>1	32 (6%)	21 (6%)	11 (8%)	7 (3%)	11 (9%)	11 (13%)	6 (7%)	5 (9%)
	Unknown	9	6	3	3	5	1	1	2
Smoking	Never	67 (15%)	52 (16%)	15 (12%)	29 (14%)	18 (16%)	7 (9%)	7 (9%)	4 (8%)
	Former	141 (31%)	104 (31%)	37 (30%)	61 (29%)	32 (28%)	20 (25%)	25 (32%)	20 (41%)
	Current	250 (54%)	179 (53%)	71 (58%)	117 (57%)	65 (58%)	52 (66%)	45 (58%)	30 (41%)
	Unknown	42	27	15	21	16	8	7	6
KRAS	Wild-type	357 (71%)	263 (73%)	94 (68%)	148 (65%)	94 (72%)	58 (67%)	60 (71%)	65 (83%)
	Mutant	143 (29%)	99 (27%)	44 (32%)	80 (35%)	37 (28%)	29 (33%)	24 (29%)	9 (16%)
Median OS (months)	10.8	11.67	6.87	15.6	7.9***	14.4***	10.3***	8.8***	8.9***

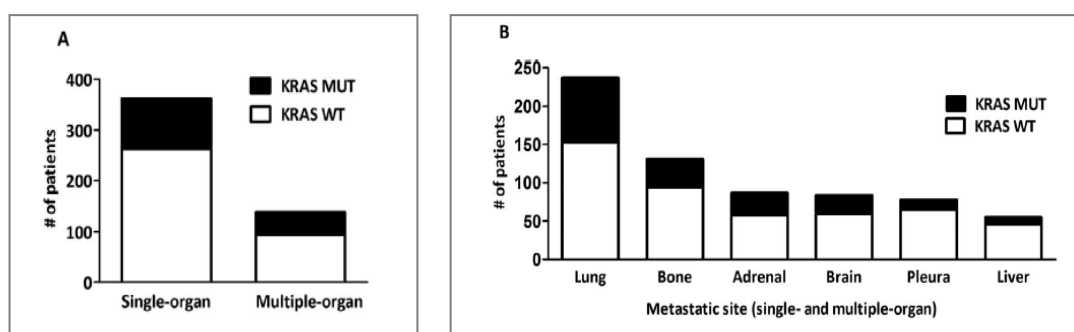
24. táblázat. A betegek klinikopatológiai jellemzői. *Az értékek mind az egyszervi, mind pedig a többszervi áttéteket tartalmazzák, kivéve az OS-t. **Tíz esetben a felsoroltakon túli áttétek (renális, subcutan) voltak jelen. ***Kizárólag az egyszervi áttétes betegek kerültek vizsgálatra.

Nem találtunk szignifikáns életkori különbséget az egyszervi (62.3 $\pm$ 9.3 év) és a többszervi (60.8 $\pm$ 9.7 év) áttétes kohorsz között. A csak pleurális áttétben szenvedők (66.8 $\pm$ 10.4 év) idősebbek voltak mint a csak tüdő- (62 $\pm$ 8.9 év), csont- (60 $\pm$ 10.7), mellékvese- (63.1 $\pm$ 6.8 év) vagy agyi (59.7 $\pm$ 9.2) áttétes betegek ($p=0.0024$, $p=0.0008$, $p=0.0132$, illetve $p=0.002$). Agyi áttét fiatalabbakban fordult elő, mint tüdőáttét ($p=0.0094$). Az ECOG PS 0-1 betegek aránya hasonló volt a különböző szervspecifikus áttéti betegcsoportokban. Kiemelendő, hogy a pleuraáttétes betegek csoportjában magasabb volt a nemdohányosok aránya (27%), mint az egyéb áttéti helyek esetében (12.2%) ($p=0.0018$).

7.3.7.1. A KRAS mutációs státusz áttéti hely-specifikus variációja

A KRAS mutáció incidenciája 28.6% volt a teljes kohorszban. A többszervi áttétes betegekben a KRAS mutáció gyakoriságának nem-szignifikáns emelkedése volt látható

(vs. egyszervi áttét, 32% vs. 27%) (24. táblázat) (63. ábra A). Érdekes megemlíteni, hogy a csont-, a mellékvese- és az agyi áttétes betegekben a KRAS mutáció gyakorisága hasonló volt (28%, 33% és 29%) (63. ábra B). A tüdőáttétes esetekben ugyanakkor megnövekedett KRAS gyakoriság volt megfigyelhető összevetve az extrapulmonális áttétes esetekkel (35% és 26.5%) ($p=0.0125$) (63. ábra B). Ezzel ellentétben a pleurális és hepatikus disszemináció alacsonyabb KRAS mutációs gyakorisággal járt (17% és 16%), összevetve az egyéb áttéti helyekkel ($p<0.001$ és $p=0.0023$).



63. ábra. A KRAS mutációs státusz áttéti hely-specifikus variációja.

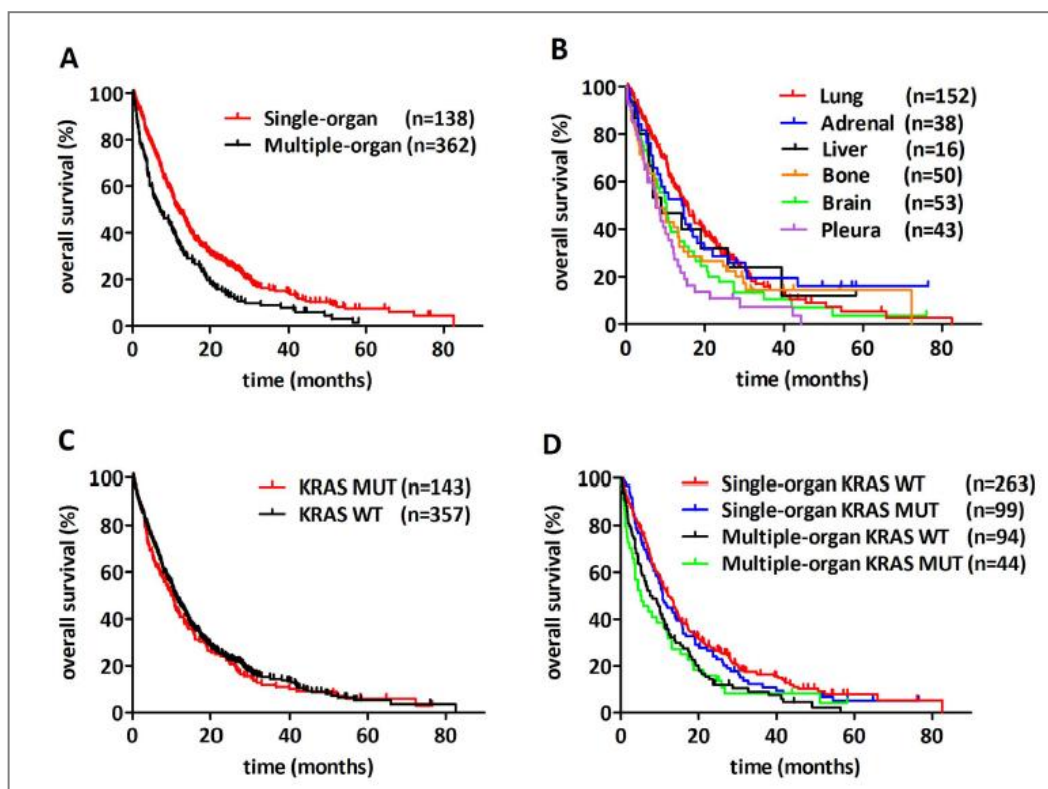
- A: A többszörös szervi áttétes betegekben a KRAS mutáció arányának nem-szignifikáns emelkedése figyelhető meg, összevetve a szoliter áttétekkel (32% vs. 27%).
- B: A csont-, a mellékvese- és az agyi áttétes betegekben a KRAS mutáció gyakorisága hasonló volt. Tüdőáttétnél megnőtt a KRAS gyakoriság, összevetve az extrapulmonális áttéttel ($p=0.0125$). Ezzel szemben a pleura- és a májáttét alacsonyabb KRAS mutációs gyakorisággal járt a többi áttéti helyhez képest ($p<0.001$ és $p=0.0023$).

7.3.7.2. Túlélés az áttéti helyek és a KRAS státusz függvényében

A többszervi metasztázisú betegek medián teljes túlélése (OS) szignifikánsan rövidebb volt, mint az egyszervi áttétes betegeké (6.8 vs. 11.6 hónap; HR, 95% CI, 0.498–0.788, $p<0.001$) (64. ábra A). A továbbiakban összehasonlítottuk az egyes áttéti helyek prognosztikus jelentőségét (64. ábra B). A csak pleuraáttéttel bíró betegek teljes túlélése szignifikánsan rövidebb volt, mint a csak tüdőáttétes betegeké (medián OS, 7.5 vs. 15.6 hónap, HR, 0.460, 95% CI, 0.255–0.646; $p<0.001$), vagy a csak mellékvese áttéteseké (medián OS, 7.5 vs. 14.4 hónap, HR, 1.896, 95% CI, 1.154–3.114; $p=0.011$). Emellett az agyi áttétben szenvedők teljes túlélése szignifikánsan rövidebb volt a tüdőáttétes betegekhez képest (medián OS, 10.3 vs. 15.6 hónap; HR, 1.5; 95% CI, 1.004–2.117;

$p=0.04$). A többi áttétre vonatkozó összehasonlítás során nem észleltünk statisztikailag szignifikáns különbséget.

A továbbiakban megvizsgáltuk a KRAS mutációs státusz jelentőségét a teljes túlélésre vonatkozóan (64. ábra C), beleértve a többszervi áttétes és az egyszervi áttétes alcsoportok összehasonlítását (64. ábra D). Fontos megjegyezni, hogy ezekben az összehasonlításokban nem találtunk szignifikáns összefüggést.



64. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék metasztatikus helyek (A, B) és KRAS mutációs státusz (C, D) szerinti teljes túlélésre vonatkozóan tüdő ADC-ben

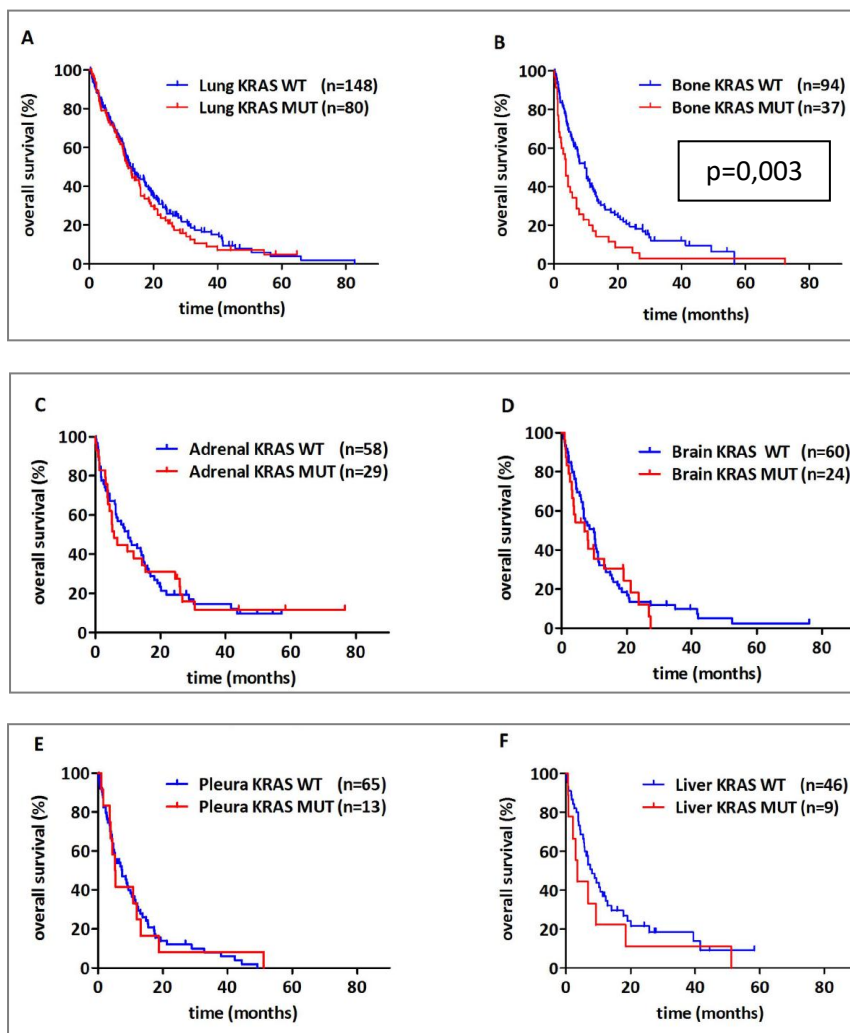
A: Többszervi metasztázis esetén a betegek medián teljes túlélése szignifikánsan rövidebb, mint egyszervi metasztázis esetén (6.8 vs. 11.6 hónap; HR, 0.62; 95% CI, 0.498–0.788; $p<0.001$).

B: Az egyszervi áttétek összehasonlításakor látható, hogy a pleuraáttétes betegek medián teljes túlélése szignifikánsan rosszabb, mint a tüdőáttétes betegeké (7.5 vs. 15.6 hónap; HR, 0.460; 95% CI, 0.255–0.646; $p<0.001$), vagy mint a mellékvese áttétes betegeké (7.5 vs. 14.4 hónap; HR, 1.896; 95% CI, 1.154–3.114; $p=0.011$). Mindemellett, agyi metasztázis esetén a medián teljes túlélés jelentősen csökkent, összehasonlítva a tüdőáttétes betegek túlélésével (10.3 vs. 15.6 hónap; HR, 1.5; 95% CI, 1.004–2.117; $p=0.04$). A többi metasztázis hely összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbséget a túlélésben.

C: A KRAS mutációs státusznak nem volt prognosztikai értéke a teljes vizsgálati kohorszban.

D: A KRAS mutációs státusznak nem volt prognosztikai értéke az egyszervi- és a többszervi metasztázisos alcsoportok túlélésre vonatkozó elemzése során.

Megvizsgáltuk a daganatok KRAS mutációs státusza és a betegek medián teljes túlélése közti összefüggéseket a különböző szervekbe adott áttétek esetén. Ebben az analízisben az egyszervi- és a többszervi metasztázisokat is bevontuk. Eredményeinket a 65. ábrán foglaltuk össze.



65. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék metasztatikus tüdő ADC-ben a daganat KRAS státusza és a távoli szervi érintettség függvényében.

A: Tüdőáttét, B: Csontáttét, C: Mellékvese áttét, D: Agyi áttét, E: Pleuraáttét, F: Májáttét. Ebben az elemzésben mind az egyszervi-, mind pedig a többszervi áttétes betegek szerepelnek. Kiemelendő, hogy a csontáttétől eltekintve ($p=0,003$), nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a többi áttéti helyre vonatkozó összehasonlítás során.

Statisztikailag szignifikáns és klinikailag releváns összefüggést figyelhettünk meg csontáttétben. KRAS mutáns tumorok esetén a csontáttétben szenvedő (egyszervi-, vagy többszervi áttétes) betegek medián teljes túlélése rövidebb volt, mint a wt KRAS daganatban szenvedő, csontáttétes betegeké (3.7 vs. 9.7 hónap; HR, 0.49; 95% CI, 0.31–

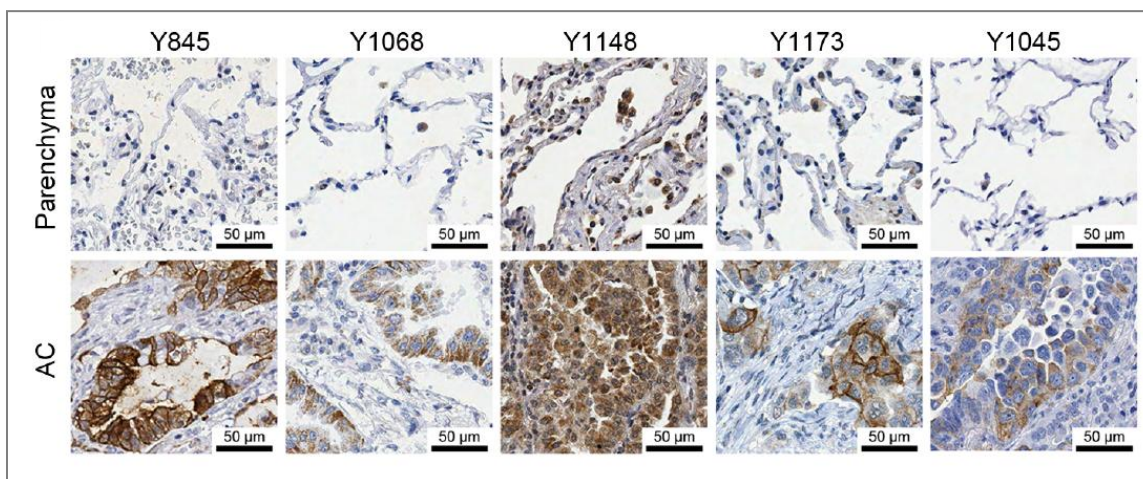
0.79; $p=0.003$) (65. ábra B). A kizárólag egyszervi, csontáttétes betegek vizsgálatakor ($n=13$) is megfigyelhető volt egy tendencia a KRAS mutáció pozitivitás és a rövidebb medián teljes túlélés között (7.0 vs. 10.2 hónap; $p=0.21$). Fontos kihangsúlyozni, hogy egyetlen más áttéti szerv-specifikus összehasonlításban sem találtunk szignifikáns különbséget (65. ábra A, C-F).

7.3.8. KRAS-mediált tüdő carcinogenesis gátlása [17]

A *Betegek és Módszerek* fejezetben leírtaknak megfelelően, a #17 vizsgálat eredményeinek bemutatásakor csak az általam végzett munkának, a humán tüdő adenocarcinoma szövetmintákon történt EGFR, pEGFR, ErbB2, pErbB2 és TTF-1 immunhisztokémiai reakciók kiértékelésének eredményét ismertetem részletesen.

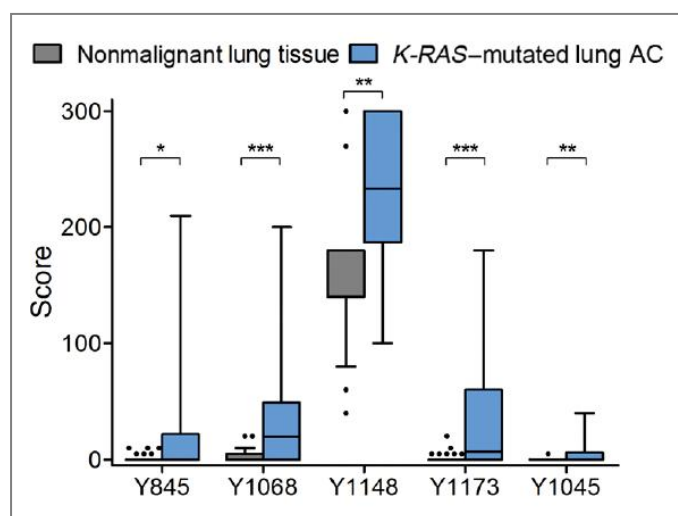
Ezen IHC reakciók elvégzését az indokolta, hogy az ebben a munkában szereplő mRNS expressziós adatbázis (*Gene Expression Omnibus; GSE75037*) elemzése szerint a KRAS mutáns tüdő ADC-k expresszálják az ERBB jelátvitelben részt vevő géneket, és ezeknek a géneknek a mRNS expressziója jelentősen megnő a tumorszövetben a normál tüdőszövethez viszonyítva. Továbbá, a KRAS mutáns daganat és a szomszédos tüdőparenchyma génexpressziós aránya magasabbnak bizonyult II-IV stádiumú tüdő ADC-ben, összehasonlítva az I stádiumú daganatokkal, ami az ERBB jelátviteli útnak a malignus progresszióban betöltött szerepére utal. Különösen megfigyelhető volt az ERBB család receptorainak és számos ligandumának mRNS up-regulációja humán KRAS mutáns tüdő ADC szövetben a szomszédos normál tüdő parenchymához viszonyítva.

Annak eldöntése érdekében, hogy a megfigyelt ERBB aktivációs jelek a daganaton belül a tumorsejtekből vagy a stromából származnak-e, IHC vizsgálatokat végeztünk sebészileg eltávolított, olyan humán, tüdő mucinosus ADC mintákon, amelyekről ismert volt, hogy KRAS mutációt hordoznak. A daganatszövetben és a környező normál tüdőszövetben is vizsgáltuk a különböző aktiváló tirozin-foszforilációs helyeket, így az Y845, Y1068, Y1148 és az Y1173, továbbá az inaktiváló Y1045 helyet (66. ábra) (68. ábra A).



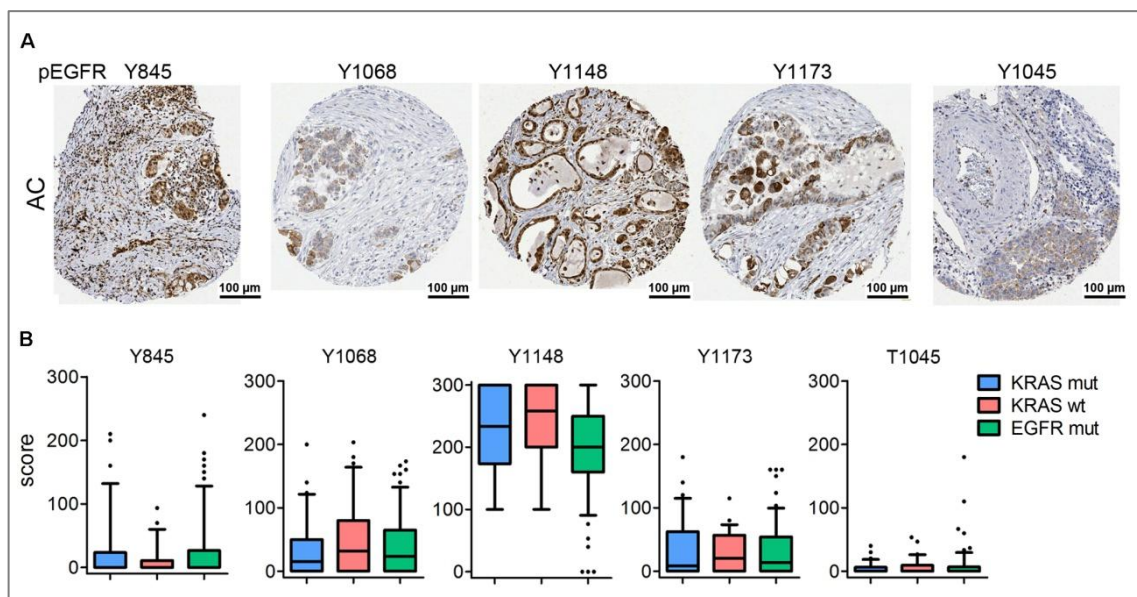
66. ábra. KRAS mutáns tüdő adenocarcinoma (AC) és környező normál tüdőszövet (parenchyma) pEGFR protein expressziója különböző foszforilációs helyeken. A skála sávok 50 µm-t jelölnek.

Az immunfestések valamennyi foszforilációs hely esetében mutattak pozitív tumorsejt festődést, ugyanakkor a tumor stromális elemeiben az Y1068 és az Y1173 expresszió teljesen hiányzott, továbbá az Y1148 festődési intenzitása lényegesen erősebb volt a tumorsejtekben, mint a stromában (67. ábra).



67. ábra. KRAS mutáns tüdő adenocarcinoma (AC) és környező normál tüdőszövet pEGFR protein expressziója (H-score 0-300) különböző foszforilációs helyeken. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)

Mindemellett – az EGFR aktivációját illetően – nem észleltünk érdemi különbséget a KRAS mutáns, a wt KRAS és az EGFR mutáns daganatok között, ami arra utal, hogy tüdő ADC-ben az EGFR onkogén driver-től függetlenül aktivált (68. ábra B).



68. ábra. pEGFR expresszió humán, KRAS mutáns, tüdő ADC szövetmintákon.

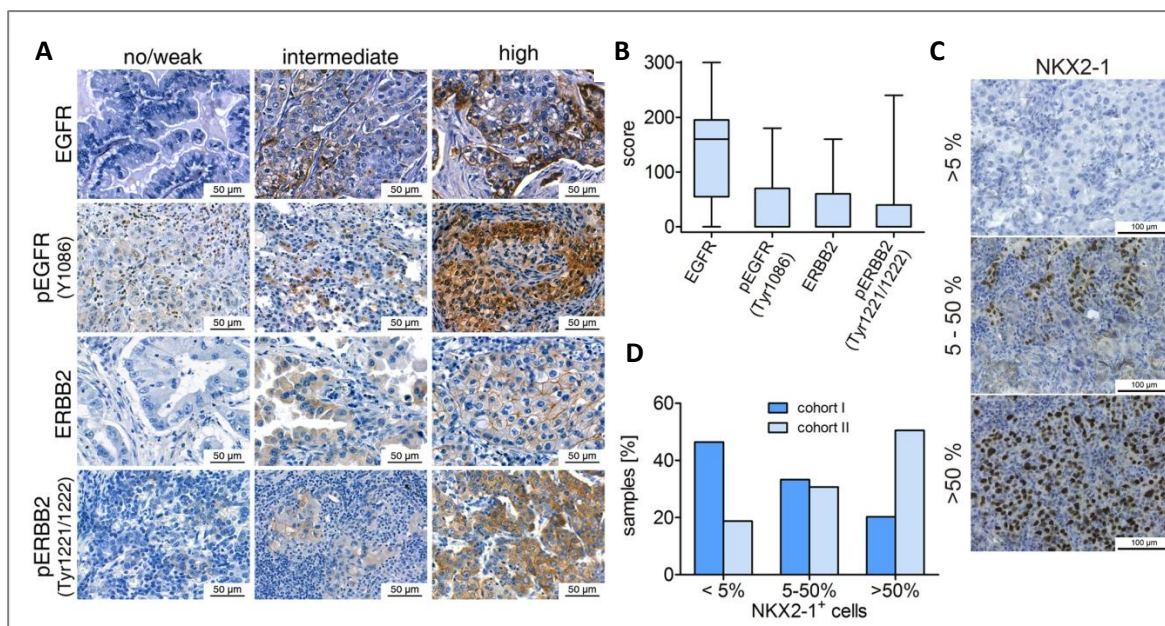
A: A KRAS mutáns ADC-k kismagyítású, reprezentatív IHC képei, amelyekben az immunreakciók jelzik az EGFR foszforilációs helyeit. A skála sávok 100 μ m-t jelölnek.

B: KRAS mutáns tüdő ADC-k EGFR foszforilációs hely szerinti IHC H-score értékei (KRAS mutáns: n=31-35; wt KRAS: n=31-32; EGFR mutáns: n=65).

A 0-300 között változó H-score értékeket a megfelelő oszlopdiagramok jelölik.

Ezt követően alkalmunk nyílt egy újabb betegkohorsz vizsgálatára, amelyben KRAS mutáns tüdő ADC mintákon tudtuk megerősíteni a tumorsejtek EGFR expresszióját és aktivációját, kiegészítve az IHC reakciókat egy újabb foszforilációs hely, az Y1086 vizsgálatával (69. ábra A). Emellett azt találtuk, hogy ezen tumorokban az ErbB2 és annak aktivált formája (pErbB2) is expresszálódik (69. ábra A és B).

Tekintettel arra, hogy a mucinosus tüdő ADC-kben gyakran hiányzik a transzkripció faktor NK2 homebox-1 (NKX2-1, más néven TTF-1) expressziója, megvizsgáltuk ezt az ADC szövetmintákon, és úgy találtuk, hogy mindkét kohorsz tumorai igen heterogén NKX2-1 expressziót mutatnak (69. ábra C és D).



69. ábra. EGFR, pEGFR, ErbB2, pErbB2 és NKX2-1 (TTF-1) expresszió KRAS mutáns humán tüdő ADC szövetmintákon

A: KRAS mutáns humán tüdő ADC-k reprezentatív EGFR, pEGFR, ErbB2 és pErbB2 IHC képei (festődési intenzitás: nincs/gyenge, közepes, erős). A skála sávok 50 µm-t jelölnek.

B: A C ábrán leírt minták H-score értékei (csoportonként n≥35 tumorminta).

C: KRAS mutáns humán tüdő ADC-k reprezentatív NKX2-1 (TTF-1) IHC képei (immunpozitív sejtek %-os aránya: <5 %, 5-50% és >50%). A skála sávok 100 µm-t jelölnek.

D: Az NKX2-1 (TTF-1) pozitív tumorsejtek %-os arányának megoszlása a KRAS mutáns tüdő ADC-k EGFR expressziójának és aktivációjának vizsgálata céljából kialakított két vizsgálati kohorszban.

Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy az ERBB szignálút aktivált a KRAS mutáns tüdő ADC tumorsejtekben.

7.4. Immunellenőrzőpont-gátló kezelések prediktív faktorainak vizsgálata tüdőrákban

7.4.1. PD-1/PD-L1 expresszió a tüdő adenocarcinomák szöveti jellemzőinek függvényében [18]

Sebészileg eltávolított 268 ADC-ben a tumorszövet HE metszetein meghatározott patológiai jellemzőket (grade, lepidikus terjedési mintázat, nekrosis jelenléte, érbetörés), valamint az EGFR és a KRAS státuszt, továbbá egyes klinikai paramétereket (életkor, nem, dohányzási státusz, COPD jelenléte) korreláltattuk a daganatok PD-L1 és PD-1 fehérje expressziójával.

A tumor grade és a nekrosis jelenléte vagy a lepidikus tumor terjedés közti korreláció.

A tumor grade pozitívan korrelált a nekrosis jelenlétével ($R=0.325$, $p^{*6}=0.014$), és negatív korrelációt mutatott a lepidikus terjedési mintázattal ($R=0.339$, $p^{*}<0.001$).

PD-L1 és PD-1 expressziók egymás közti korrelációja.

Erős pozitív korreláció volt megfigyelhető a tumorsejtek (tumor cell = TC) PD-L1 expressziója és az immunsejtek (immune cell = IC) PD-L1 expressziója között, határértékek (cut-off) nélkül is ($p<0.001$, $R=0.430$). Az eredmény szignifikáns maradt a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazása után is ($p^{*}<0.001$).

Pozitív volt a korreláció a PD-L1 TC és a PD-1 IC expresszió között ($p<0.001$, $R=0.250$), továbbá a PD-L1 IC és a PD-1 IC expresszió között ($p<0.001$, $R=0.289$), határértékek nélkül is. Többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazása után azonban kizárólag a PD-L1 IC és a PD-1 IC közti korreláció maradt szignifikáns ($p^{*}=0.003$).

Különböző határértékek alkalmazásakor is szignifikáns korrelációt tapasztaltunk a PD-L1 TC és a PD-1 IC között, többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően is (eredeti közlemény 2. táblázat¹¹⁵).

PD-1/PD-L1 expresszió és klinikai paraméterek közti korreláció.

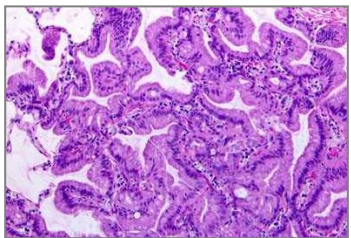
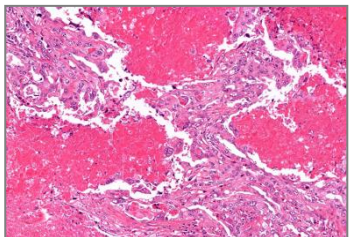
A dohányzási státusz relatíve erős korrelációt mutatott a PD-1 IC expresszióval határértékek nélkül is ($p<0.001$, $R=0.275$), amely összefüggés szignifikáns maradt többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően is ($p^{*}=0.037$).

A PD-L1 TC, PD-L1 IC és a PD-1 IC expressziók és az egyéb klinikopatológiai jellemzők (életkor, nem, COPD jelenléte) között nem volt megfigyelhető szignifikáns összefüggés.

⁶ A többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazása után kapott p értéket p*-gal jelöltük.

Lepidikus tumor terjedés és PD-1/PD-L1 expresszió. A lepidikus tumor terjedési mintázat alacsonyabb PD-L1 TC, PD-L1 IC és PD-1 IC expresszióval társult, határértékek nélkül ($p < 0.001$, $R = -0.329$; $p < 0.001$, $R = -0.306$ és $p < 0.001$, $R = -0.302$) (25. táblázat). Valamennyi korreláció a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően is szignifikáns maradt (mindháromra: $p^* < 0.001$).

Tumor nekrozis és PD-1/PD-L1 expresszió. A tumor nekrozis jelenléte magasabb PD-L1 TC, PD-L1 IC és PD-1 IC expresszióval társult, határértékek nélkül ($p < 0.001$, $R = 0.283$; $p < 0.001$, $R = 0.215$ és $p < 0.001$, $R = 0.290$) (25. táblázat). A PD-L1 TC-re és a PD-1 IC-re vonatkozó korreláció a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően is szignifikáns maradt (PD-L1 TC: $p^* = 0.004$; PD-1 IC: $p^* = 0.002$).

		Pozitív sejtek %-os aránya	p	Pearson's R	p*
Lepidikus tumor terjedés 	PD-L1 TC	no cut-off	<0.001	-0.329	<0.001
		<1% vs. ≥1%	<0.001	-0.280	0.049
		<5% vs. ≥5%	<0.001	-0.283	0.004
		<50% vs. ≥50%	<0.001	-0.225	ns.
	PD-L1 IC	no cut-off	<0.001	-0.306	<0.001
		<1% vs. ≥1%	<0.001	-0.252	0.045
		<5% vs. ≥5%	<0.001	-0.216	ns.
		<10% vs. ≥10%	ns.	-0.093	ns.
	PD-1 IC	no cut-off	<0.001	-0.302	<0.001
		<1% vs. ≥1%	<0.001	-0.231	ns.
		<5% vs. ≥5%	<0.001	-0.216	ns.
		<10% vs. ≥10%	<0.001	-0.208	ns.
Tumor nekrozis jelenléte 	PD-L1 TC	no cut-off	<0.001	0.283	0.004
		<1% vs. ≥1%	<0.001	0.241	ns.
		<5% vs. ≥5%	<0.001	0.293	0.002
		<50% vs. ≥50%	<0.001	0.254	0.041
	PD-L1 IC	no cut-off	<0.001	0.215	ns.
		<1% vs. ≥1%	0.016	0.149	ns.
		<5% vs. ≥5%	0.004	0.177	ns.
		<10% vs. ≥10%	0.043	0.125	ns.
	PD-1 IC	no cut-off	<0.001	0.290	0.002
		<1% vs. ≥1%	<0.001	0.270	0.013
		<5% vs. ≥5%	0.003	0.184	ns.
		<10% vs. ≥10%	0.018	0.146	ns.

TC: tumorsejt, IC: immunsejt, ns.: nem szignifikáns
p*: p-érték többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció után
A nem-szignifikáns korrelációkat és azokat a korrelációs értékeket, amelyek a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció után nem-szignifikánssá váltak, szürke színnel jelöltük.

25. táblázat. A tumorsejtek és immunsejtek PD-1/PD-L1 expressziója és a különböző szövettani jellemzők közti korreláció tüdő ADC-ben

Tumor grade és PD-1/PD-L1 expresszió. A tumor grade és a PD-1 IC expresszió között pozitív korreláció volt megfigyelhető határértékek nélkül ($p < 0.001$, $R = 0.231$), ami azonban nem maradt szignifikáns a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően. Amikor azonban különböző határértékeket alkalmaztunk, az eredmény még a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció után is szignifikáns maradt (eredeti közlemény, 3. táblázat¹¹⁵). A tumor grade és a PD-L1 TC, illetve a PD-L1 IC expresszió között csak egy gyenge pozitív korreláció volt látható, ami azonban mindkét esetben eltűnt a korrekció után.

Stromális immunsejt denzitás és PD-1/PD-L1 expresszió. Pozitív korreláció volt megfigyelhető a stromális immunsejt denzitás és a PD-L1 TC expresszió között határértékek nélkül ($p < 0.001$, $R = 0.226$), ami azonban nem maradt szignifikáns a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően.

Nem volt korreláció igazolható a stromális immunsejt denzitás és az immunsejtek PD-1/PD-L1 fehérje expressziója között.

Érbetörés és PD-1/PD-L1 expresszió. Nem találtunk összefüggést a daganatos érbetörés és a tumorsejtek és immunsejtek PD-1/PD-L1 fehérje expressziója között.

Az EGFR mutációs státusz és a PD-1/PD-L1 expresszió, vagy egyéb hisztológiai és klinikai paraméterek közti összefüggés. Az EGFR mutáció negatív korrelációt mutatott a PD-1 IC expresszióval határértékek nélkül ($p = 0.019$, $R = -0.225$), továbbá a PD-L1 TC expresszióval 5%-os határérték szintnél ($p = 0.029$, $R = -0.212$), azonban a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekciót követően már egyik összefüggés sem volt kimutatható. Az EGFR mutáció jelenléte negatívan korrelált a dohányzási státusszal ($p = 0.011$, $R = -0.255$), azonban ez a tendencia nem maradt meg a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció után. Megfigyelhattunk további összefüggéseket is az EGFR mutáció jelenléte és az egyéb vizsgált paraméterek között (lepidikus tumor terjedési mintázat: $p = 0.020$, $R = 0.222$; COPD: $p = 0.017$, $R = -0.236$; tumor nekrosis jelenléte: $p = 0.016$, $R = -0.231$), azonban közülük egyik összefüggés sem maradt szignifikáns a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekció alkalmazását követően.

A KRAS mutációs státusz és a PD-1/PD-L1 expresszió, vagy egyéb hisztológiai és klinikai paraméterek közti összefüggés. Nem észleltünk korrelációt a KRAS mutációs státusz és a PD-L1 TC és PD-L1 IC, sem pedig a KRAS mutációs státusz és a PD-1 IC expresszió között. Hasonlóképpen, nem tudtunk korrelációt igazolni a KRAS mutáció megléte és egyik vizsgált klinikopatológiai paraméter között sem.

7.4.2. PD-1/PD-L1 expresszió vizsgálata tüdőrákok agyi áttéteiben [19]

Ebben a vizsgálatban tüdő adenocarcinomák (ADC) agyi metasztázisának szövetmintáit vizsgáltuk 208 olyan betegnél, akiknek agyi áttétét műtétiileg eltávolították. Szoliter agyi áttéte 141 betegnek volt; 112 volt supratentorialis, 29 pedig infratentorialis lézió. Multiplex agyi áttétben 67 beteg szenvedett, esetükben a reszekciós műtétre neurológiai tünetek miatt, palliatív célból került sor. Postoperatív sugárkezelésben 142 beteg részesült (82 WBRT [teljes agyi besugárzás], 25 stereotaxiás irradiáció, 35 esetben mindkettő). A primer tüdőtumor eltávolítására 76 esetben (36,5%) került sor. Az agyi műtétet megelőzően kemoterápiás kezelésben 75 beteg (36,1%) részesült, és szteroid kezelést közvetlenül az agyi műtét előtt (1 hónapon belül) 137 beteg (65,9%) kapott.

7.4.2.1. Intratumorális stromális és peritumorális immunsejtek (IC)

Az esetek 68,7%-ában <20%, 31,3%-ában pedig $\geq 20\%$ volt az intratumorális stromális IC arány. Az esetek 55,7%-ában az áttét körül jelen volt mononukleáris sejtekből álló peritumorális gyűrű (MR), 44,3%-ában pedig hiányzott. Összességében az esetek 38%-ában MR hiánya és a stromális IC igen alacsony aránya vagy hiánya volt tapasztalható.

7.4.2.2. Az immunsejtek és a PD-1/PD-L1 expresszió közti korreláció

Pozitív korreláció volt megfigyelhető a stromális IC denzitás és az MR megléte között ($p=0.001$; chi-square, Pearson's $R=0.324$).

Az agyi áttétekben az alacsony stromális IC denzitás korrelált az alacsony PD-L1 TC expresszióval bármelyik határértéknél (1%-os, 5%-os és 50%-os határértéknél; $p=0.021$, 0.028 és 0.009; Pearson's $R=0.180$, 0.172 és 0.203) (26. táblázat).

A $\geq 20\%$ stromális IC denzitás korrelált a PD-L1 IC expresszióval valamennyi határértéknél (1%-os, 5%-os és 10%-os határértéknél; $p<0.001$, $p<0.001$ és $p=0.013$; Pearson's $R=0.315$, 0.341 és 0.196). Emellett, az MR jelenléte ugyancsak pozitív korrelációt mutatott a PD-L1 IC expresszióval valamennyi határértéknél ($p=0.011$, $p<0.001$ és $p=0.006$; Pearson's $R=0.212$, 0.323 és 0.231).

	Patient groups Based on Percentage of Positive Cells	Stromal Immune Cells (<20% vs >20%)		Mononuclear Ring (not present vs present)	
		P-value	Pearson's R	P-value	Pearson's R
PD-L1 tumor cells	<1% vs ≥1%	.021	0.180	ns	—
	<5% vs ≥5%	.028	0.172	ns	—
	<50% vs ≥50%	.009	0.203	ns	—
PD-L1 immune cells	<1% vs ≥1%	<.001	0.315	.011	0.212
	<5% vs ≥5%	<.001	0.341	<.001	0.323
	<10% vs ≥10%	.013	0.196	.006	0.231
PD-1 immune cells	<1% vs ≥1%	.004	0.226	.003	0.242
	<5% vs ≥5%	ns	—	ns	—
	<10% vs ≥10%	ns	—	.044	0.166
Groups used in the POPLAR study					
PD-L1 tumor cells or immune cells	Non-expressors vs any-expressors	<.001	0.302	.026	0.185
	Lower-expressors vs high/ medium-expressors	<.001	0.338	.001	0.275
	Lower-expressors vs high-expressors	<.001	0.361	<.001	0.292

26. táblázat. Az immunsejtek és a PD-1/PD-L1 expresszió közti korreláció tüdő ADC agyi áttéteiben

Az 1%-nál magasabb PD-1 IC expresszió szignifikáns korrelációt mutatott a ≥20% stromális IC denzitással ($p=0.004$, Pearson's $R=0.226$) és az MR jelenlétével ($p=0.003$, Pearson's $R=0.242$).

Ami a POPLAR vizsgálatban használt csoportosítást illeti, az agyi metasztázisokban a 'PD-L1-et magasan expresszálók' MR jelenlétével és ≥20% stromális IC denzitással társultak, összehasonlítva a 'PD-L1-et alacsonyan expresszálók'-kal ($p<0.001$ és $p<0.001$; Pearson's $R=0.292$ és 0.361).

Érdemes kihangsúlyozni, hogy a POPLAR vizsgálat szerint 'PD-L1-et magasan expresszálók' magasabb PD-1 IC expresszióval társultak, bármely határérték esetén ($p<0.001$, $p=0.006$ és $p=0.001$; Pearson's $R=0.355$, 0.218 és 0.269).

7.4.2.3. Az MR jelenlétének vagy a stromális IC denzitásának korrelációja a klinikai jellemzőkkel

Fontos megfigyelés, hogy a magas stromális IC denzitású, vagy az MR-rel rendelkező betegek aránya hasonló volt az agyi áttét műtete előtt kemoterápiát, vagy szteroid kezelést kapott, illetve nem kapott betegekben ($p=0.997$ és $p=0.452$; valamint $p=0.186$ és $p=0.879$; chi-square).

7.4.2.4. A PD-L1 és a PD-1 expresszió korrelációja a klinikai jellemzőkkel

A szteroid kezelésben részesült betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt az immunsejtek PD-L1 expressziója 10%-os cut-off értéknél, összehasonlítva a szteroid kezelést nem kapott betegekkel ($p=0.021$; chi-square, Pearson's $R=0.208$), ugyanakkor nem volt korreláció megfigyelhető a PD-L1 TC és a PD-1 IC vonatkozásában. Nem volt különbség a PD-L1 vagy a PD-1 expresszióban annak függvényében, hogy a beteg az agyi áttét sebészi eltávolítása előtt kapott-e kemoterápiát, vagy nem.

7.4.2.5. A klinikai jellemzők korrelációja a túléléssel

A tüdőrák diagnózisának felállításakor meglévő korai stádium (I-II), a primer tumor sebészi reszekciója, valamint a kemoterápia alkalmazásának hiánya jobb teljes túléléssel (OS) társult univariációs log-rank teszttel ($p<0.001$, $p<0.001$ és $p=0.027$). A multivariációs Cox regressziós analízis során mind a primer tumor sebészi eltávolítása, mind pedig a kemoterápia hiánya független prognosztikai faktornak bizonyult ($p=0.004$, $HR=0.318$, $CI=0.145-0.701$; $p<0.001$, $HR=3.139$, $CI=1.715-5.745$). Ezek a paraméterek nem mutattak szignifikáns összefüggést az agyi metasztázis műtete utáni túléléssel log-rank teszttel ($p=0.064$, $p=0.063$ és $p=0.151$), és a multivariációs Cox regressziós analízis mindössze egy tendenciát jelzett a kedvezőtlen túlélés irányába az előrehaladott stádiumú betegek esetében ($p=0.161$; $HR=1.595$, $CI=0.831-3.062$).

A szoliter agyi áttétes betegek metastasectomia utáni túlélése kedvezőbb volt, összehasonlítva a multiplex agyi áttétes betegekkel ($p=0.012$; log-rank), amely különbség a multivariációs Cox regressziós analízis után is megmaradt ($p=0.010$, $HR=0.656$, $CI=0.476-0.905$). Ami azonban az OS-t illeti, már nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető ($p=0.095$; log-rank; $p=0.174$, $HR=0.796$, $CI=0.573-1.106$; Cox).

A supratentorialis szoliter agyi áttétes betegek kedvezőbb OS-t és agyi metastasectomia utáni túlélést mutattak, mint az infratentorialis szoliter agyi áttétes betegek ($p=0.012$ és 0.001 ; log-rank). A multivariációs Cox regressziós analízis, azonban már nem igazolta az agyi áttét lokalizációjának független prognosztikai értékét.

A fiatalabb betegekben (≤ 60 év) kedvezőbb OS és agyi metastasectomia utáni túlélés volt megfigyelhető ($p=0.029$ és $p=0.019$; log-rank). Az OS-re vonatkozó összefüggés a

multivariációs Cox regressziós analízis után is szignifikáns maradt ($p=0.032$, $HR=0.554$, $CI=0.323-0.949$).

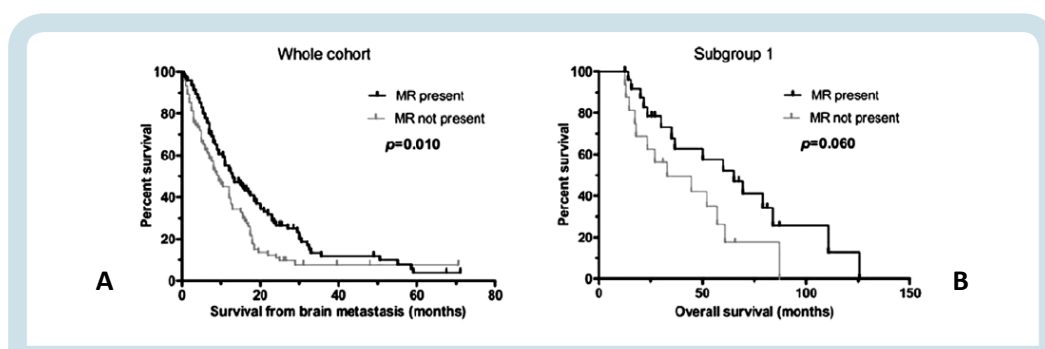
Nem mutatott összefüggést a nem sem az OS-sel, sem pedig az agyi áttét sebészi eltávolítása utáni túléléssel.

7.4.2.6. A mononukleáris sejtek mennyiségének korrelációja a túléléssel

Az agyi áttét körüli MR hiánya kedvezőtlen agyi metastasectomia utáni túléléssel párosult ($p=0.01$; log-rank) (70. ábra A), és a multivariációs Cox regressziós analízis után is megmaradt egy erős tendencia ebbe az irányba ($p=0.050$, $HR=1.731$, $CI=0.578-2.994$).

A $\geq 20\%$ stromális IC denzitású daganatok mindössze egy tendenciát mutattak a kedvezőbb OS irányába ($p=0.066$; log-rank).

Mivel a primer tumor reszekciója, a kemoterápia alkalmazása és az agyi áttétek multiplicitása nagymértékben befolyásolta a túlélést, az alábbi négy – relatíve homogén – betegcsoportban is végeztünk multivariációs Cox regressziós analízist: (I) primer tumor műtete, szoliter agyi áttét ($n = 51$), (II) primer tumor műtete, multiplex agyi áttét ($n = 25$), (III) nem volt primer tumor műtete, szoliter agyi áttét ($n = 90$), és (IV) nem volt primer tumor műtete, multiplex agyi áttét ($n = 42$). Az I-es alcsoportban a POPLAR szerinti “nem vs. bármely expresszálo”, a PD-1 IC “ $<1\%$ vs. $\geq 1\%$ ”, az MR “megléte vs. hiánya” és a kemoterápia “igen vs. nem” kategóriák kerültek alkalmazásra a túlélési Cox analízisben. Az MR hiánya rosszabb OS-sel párosult ($p=0.027$, $HR=3.054$, $CI=1.137-8.202$), a Kaplan-Meier analízis pedig egy tendenciát igazolt az MR megléte és a hosszabb OS között ($p=0.060$) (70. ábra B). A többi alcsoportban nem észleltünk szignifikáns összefüggést.

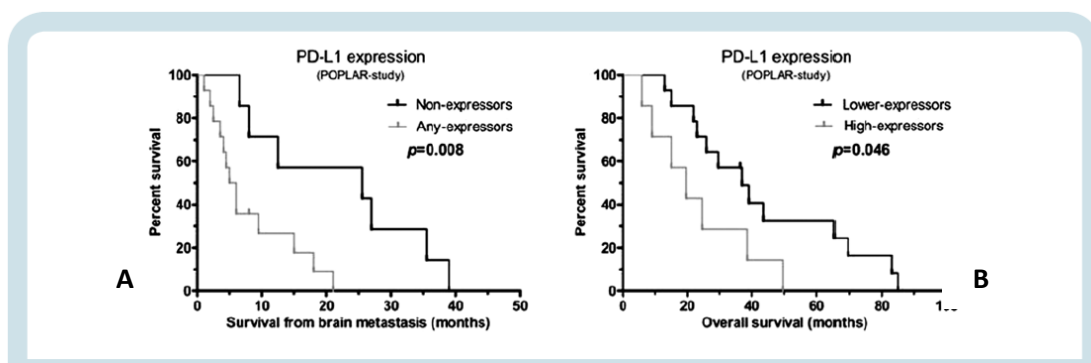


70. ábra. Kaplan-Meier analízisek. Az MR jelenléte az agyi áttét körül jobb agyi metastasectomia utáni túléléssel párosult. Azon szoliter agyi áttétes betegeknél, akiknél megtörtént a primer tüdőtumor sebészi eltávolítása is (Subgroup 1), az MR jelenléte kedvező OS tendenciával járt.

7.4.2.7. A PD-L1 és a PD-1 expresszió korrelációja a túléléssel

A teljes kohorszra vonatkozóan nem találtunk összefüggést az agyi áttétek PD-1/PD-L1 expressziója és az OS vagy az agyi metastasectomia utáni túlélés között, sem bármely IHC határérték esetén, sem pedig a POPLAR-vizsgálatban alkalmazott csoportosításnál. A fent leírt alcsoportok elemzése során a II alcsoportban (primer tumor eltávolítás, multiplex agyi áttét) találtunk túlélésbeli összefüggést. Kaplan-Meier analízissel a <10% PD-1 IC kedvező OS tendenciát mutatott ($p=0.055$). Emellett a Kaplan-Meier analízis az alacsonyabb PD-L1 TC expresszió 1%-os határértékénél szignifikánsan jobb metastasectomia utáni túlélést igazolt ($p=0.023$).

A POPLAR szerinti csoportosítás vizsgálatokor kedvezőbb metastasectomia utáni túlélést találtunk a 'nem-expresszálók' vs. a 'bármely-expresszálók' összehasonlításánál ($p=0.008$, log-rank) (71. ábra A). A Kaplan-Meier analízis kedvezőbb OS-t igazolt az 'alacsonyan-expresszálók' vs. a 'magasan-expresszálók' összehasonlításakor ($p=0.046$) (71. ábra B).



71. ábra. A primer tüdőrákkal műtött és multiplex agyi áttétes betegek csoportjában a PD-L1-et 'nem-expresszálók' jobb agyi áttét utáni túlélést mutattak mint a 'bármely-expresszálók' (A), és a PD-L1-et 'alacsonyan-expresszálók' jobb OS-t mutattak, mint a 'magasan-expresszálók' (B).

7.4.3. PD-1/PD-L1 expresszió vizsgálata tüdő adenocarcinómában és annak agyi áttéteiben [20]

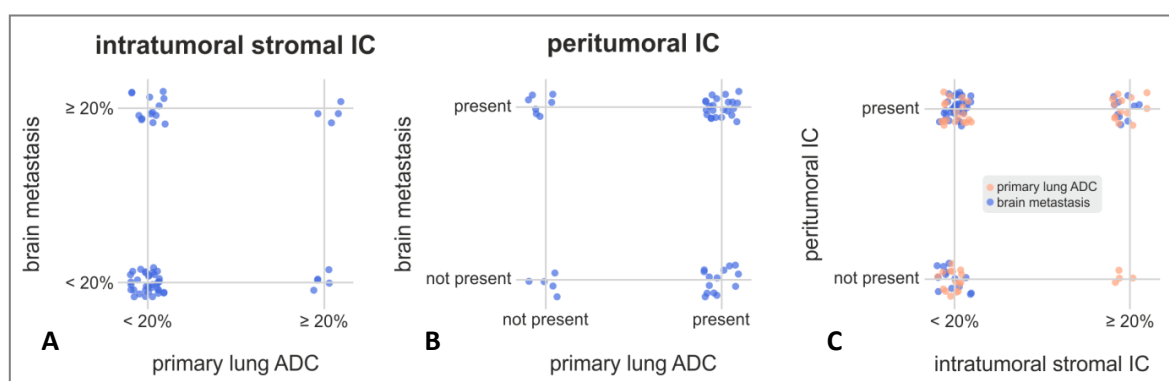
Ebbe a vizsgálatba 61 olyan tüdő ADC-s beteget vontunk be, akiknek mind a primer tüdőtumora, mind pedig az agyi áttéte sebészileg el lett távolítva, így archivált FFPE szövetminta-párok álltak a rendelkezésünkre. A klinikopatológiai adatok között szerepelt a nem, az életkor, a dohányzási státusz, a COPD megléte vagy hiánya, a tüdőrák klinikai stádiuma a diagnózis felállításakor, a daganat EGFR/KRAS mutációs státusza, valamint az alkalmazott onkoterápia. Egyetlen beteg sem részesült immunterápiában.

7.4.3.1. Korreláció a primer tumor és az agyi áttét között az intratumorális stromális IC denzitásra és a peritumorális mononukleáris IC-k jelenlétére vonatkozóan

A primer tüdő ADC-k 83.60%-ában volt <20% és 16.40%-ában volt $\geq 20\%$ az intratumorális stromális IC denzitás. Az esetek 77.59%-ában jelen volt peritumorális mononukleáris IC infiltráció, és 22.41%-ában hiányzott.

Az agyi áttétek 68.97%-ában észleltünk <20% és 31.03%-ában $\geq 20\%$ intratumorális stromális IC denzitást. Az esetek 62.75%-ában jelen volt peritumorális mononukleáris IC infiltráció, és 37.25%-ában hiányzott.

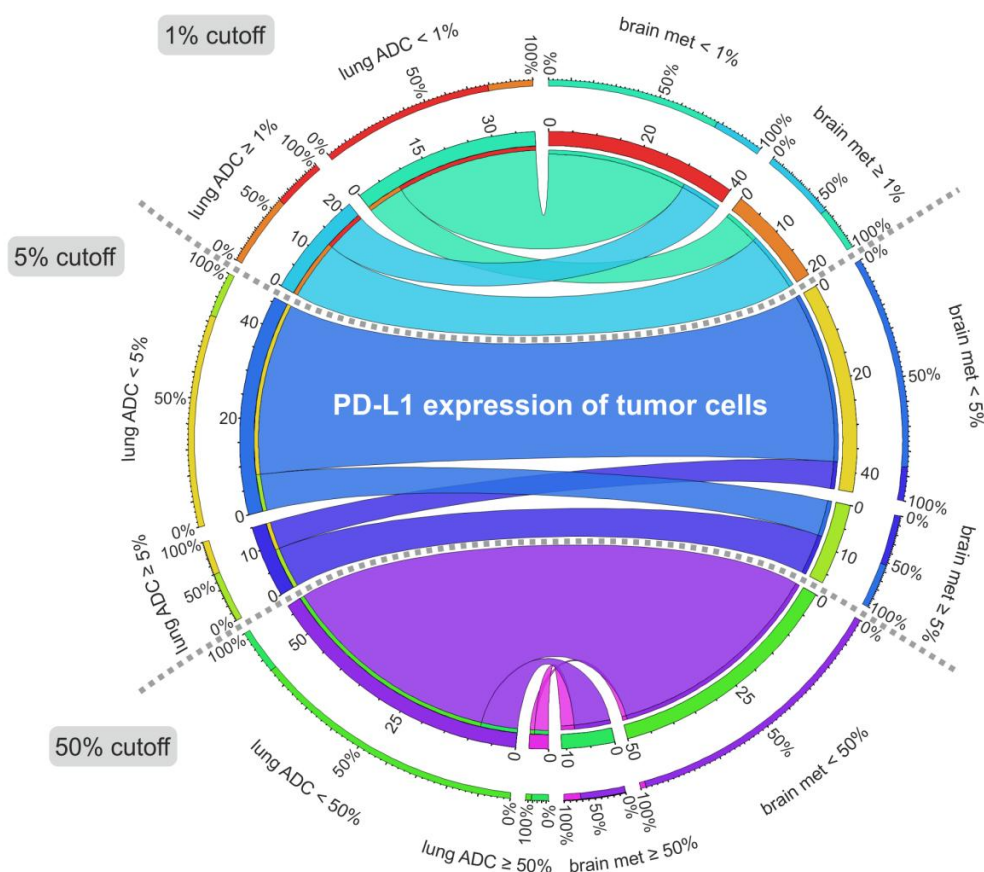
Nem volt korreláció megfigyelhető az intratumorális stromális IC denzitásban ($p=0.353$) vagy a peritumorális mononukleáris IC infiltrációban ($p=0.818$) a *primer tüdő ADC–agyi áttét* mintapárok között (72. ábra A és B). Hasonlóképpen nem találtunk összefüggést az intratumorális stromális IC és a peritumorális IC között az adott tumormintákon belül (primer tüdő ADC: $p=0.063$; agyi áttét: $p=0.158$) (72. ábra C).



72. ábra. Primer tüdő ADC és agyi áttét mintapárok vizsgálata. A: Primer tumor-agyi áttét összehasonlítás az intratumorális stromális IC denzitásra vonatkozóan ($p=0.353$). B: Primer tumor-agyi áttét összehasonlítás a peritumorális IC-re vonatkozóan ($p=0.818$). C: Intratumorális és peritumorális IC összehasonlítás külön a primer tumorokban ($p=0.063$), és külön az agyi áttétekben (0.0158).

7.4.3.2. Primer tüdő ADC-k és agyi metasztázis páruk PD-1/PD-L1 expressziója közti korrelációk

Szignifikáns pozitív korrelációt figyelhettünk meg a tumorsejtek (TC) PD-L1 expressziójában a primer tüdő ADC-k és agyi áttétük között, bármely határértéknél (73. ábra) [eredeti közlemény, 2. táblázat¹⁴⁹].



73. ábra. Primer tüdő ADC-k és agyi áttétük PD-L1 TC expresszióra vonatkozó korrelációi különböző határértékeknél (PD-L1 1%, 5%, 50%).

Az ábra három vízszintes részét külön kell vizsgálni. Annak alapján, hogy a PD-L1 TC expresszió szintje az adott küszöbérték fölé vagy alá esik-e, a betegeket két csoportra osztottuk. A daganatos helyek (bal oldal: primer tüdő tumor, jobb oldal: agyi áttét) különböző kategóriái közötti sávok mutatják, hogy hogyan változott a primer tumorhoz képest az agyi áttét PD-L1 expressziója. Mivel a legtöbb sáv vízszintesen fut és ugyanazon kategóriákat köti össze, az ábra egyértelműen demonstrálja a tumorsejtek PD-L1 expressziójára vonatkozó pozitív korrelációt a primer tüdő tumor és az agyi metasztázis között.

A primer tüdő ADC-k és agyi áttétek között a **PD-L1 TC**-re vonatkozóan a legmarkánsabb pozitív korrelációt határértékek nélkül figyeltük meg; mindazonáltal valamennyi határérték mellett szignifikáns maradt a korreláció még a többszörös összehasonlításra vonatkozó (Bonferroni) korrekció után is (27. táblázat).

Hasonló, bár sokkal gyengébb pozitív korreláció volt megfigyelhető a **PD-L1 IC** expressziót illetően 10%-os határértéknél, de ez az összefüggés már nem maradt szignifikáns a többszörös összehasonlításra vonatkozó korrekciót követően (27. táblázat).

A primer- és az áttéti- párosított minták között nem volt korreláció a **PD-1 IC** expressziót illetően (27. táblázat).

PD-L1 TC primer tüdő ADC-ben vs. annak agyi áttétében			
	Pozitív sejtek %-os aránya	p-érték	Pearson's R
	nincs cut-off	<0.001*	0.464
	<1% vs. ≥1%	0.002*	0.390
	<5% vs. ≥5%	0.001*	0.409
	<50% vs. ≥50%	0.002*	0.393
PD-L1 IC primer tüdő ADC-ben vs. annak agyi áttétében			
	Pozitív sejtek %-os aránya	p-érték	Pearson's R
	nincs cut-off	ns.	-
	<1% vs. ≥1%	ns.	-
	<5% vs. ≥5%	ns.	-
	<10% vs. ≥10%	0.013	0.322
PD-1 IC primer tüdő ADC-ben vs. annak agyi áttétében			
	Pozitív sejtek %-os aránya	p-érték	Pearson's R
	nincs cut-off	ns.	-
	<1% vs. ≥1%	ns.	-
	<5% vs. ≥5%	ns.	-
	<10% vs. ≥10%	ns.	-

*Bonferroni korrekció után is szignifikáns eredmény

ns. nem szignifikáns

27. táblázat. Primer tüdő ADC-k és agyi áttétük közti – PD-1/PD-L1 expressziókra vonatkozó – korrelációk különböző határértékek esetén

A PD-1/PD-L1 expressziót mutató primer tüdőrákok és agyi áttétek esetszáma – különböző határértékek mellett – az alábbi táblázatban foglaltuk össze (28. táblázat).

Primer tüdő ADC						
	<1% vs. ≥1%		<5% vs. ≥5%		<50% vs. ≥50%	
PD-L1 TC	63.93%	36.07%	75.41%	24.59%	93.44%	6.56%
	(39)*	(22)	(46)	(15)	(57)	(4)
	<1% vs. ≥1%		<5% vs. ≥5%		<10% vs. ≥10%	
PD-L1 IC	55.74%	44.26%	90.16%	9.84%	96.72%	3.28%
	(34)	(27)	(55)	(6)	(59)	(2)
PD-1 IC	16.39%	83.61%	54.10%	45.90%	78.69%	21.31%
	(10)	(51)	(33)	(28)	(48)	(13)

Agyi áttét ADC						
	<1% vs. ≥1%		<5% vs. ≥5%		<50% vs. ≥50%	
PD-L1 TC	65.57%	34.43%	72.13%	27.87%	81.97%	18.03%
	(40)	(21)	(44)	(17)	(50)	(11)
	<1% vs. ≥1%		<5% vs. ≥5%		<10% vs. ≥10%	
PD-L1 IC	64.41%	35.59%	93.22%	6.78%	93.22%	6.78%
	(38)	(21)	(55)	(4)	(55)	(4)
PD-1 IC	36.07%	63.93%	75.41%	24.59%	88.52%	11.48%
	(22)	(39)	(46)	(15)	(54)	(7)

*esetszámok

28. táblázat. Primer tüdő ADC-k és agyi áttétek PD-1/PD-L1 immunpozitív eseteinek száma

7.4.3.3. Onkoterápiák hatása az immunsejtek denzitására, valamint a PD-1/PD-L1 expresszióra primer tüdő ADC-kben és azok agyi áttéteiben

A primer ADC-k és agyi áttétek összehasonlításakor azt találtuk, hogy az intratumorális stromális IC-k és a peritumorális IC-k mennyiségére vonatkozó változások iránya (növekedett/csökkent/változatlan) nem függött attól, hogy a betegek a műtét előtt kaptak-e radio-, kemo- vagy szteroid terápiát.

Multivariációs elemzés alapján a PD-L1 TC és PD-L1 IC, illetve a PD-1 IC expresszió változásának irányát illetően sem volt szignifikáns különbség a primer és az áttét daganatok között az alkalmazott onkoterápiáktól függően.

7.5. Citotoxikus kemoterápia szöveti biomarker expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata

7.5.1. ERCC1 expresszió vizsgálata nem-kissejtes tüdőrákban [21]

Ebben a vizsgálatban 17 primer tüdőrák FFPE szövetminta párban (2x9 ADC, 2x8 SCC) tanulmányoztuk a platinabázisú neoadjuváns kemoterápia (14 ciszplatin-gemcitabin, 3 ciszplatin-etoposid; ≥ 2 kúra) szöveti biomarkerekre gyakorolt hatását.

A preoperatív bronchoscopos és a kemoterápia utáni, sebészi szövetmintán megfigyelhető, a vizsgált biomarkerre vonatkozó protein expressziókat a 29. és a 30. táblázatban foglaltuk össze.

7.5.1.1. p53 expresszió a kemoterápia előtti és utáni NSCLC szövetmintákon

A p53 kezdetben 7 esetben volt pozitív és 10 esetben negatív. Kemoterápiát követően 1 daganatban negatívvá vált, míg 4 daganatban pozitív lett. 12 beteg esetében nem volt változás a p53 protein expresszióban kemoterápiát követően (29. táblázat).

7.5.1.2. Fas-ligand expresszió a kemoterápia előtti és utáni NSCLC szövetmintákon

A Fas-ligand kezdetben 5 esetben negatív volt, míg 12 NSCLC mintában pozitív. Kemoterápiát követően 3 – kezdetben negatív tumor (3/5) – pozitívvá vált, ugyanakkor a korábbi 12 pozitív daganatból 3 nem mutatott Fas-ligand IHC expressziót a neoadjuváns kemoterápiát követően (29. táblázat).

7.5.1.3. Bcl-2 expresszió a kemoterápia előtti és utáni NSCLC szövetmintákon

A kezdeti Bcl-2 protein expresszió 15/17 esetben negatív volt. A 15 negatív mintából 3 pozitívvá változott a kemoterápiát követően. A kezdetben pozitív 2 esetből az egyik negatívvá vált a platinabázisú neoadjuváns kezelés után (29. táblázat).

7.5.1.4. Bax expresszió a kemoterápia előtti és utáni NSCLC szövetmintákon

Mindössze egyetlen preoperatív NSCLC tumorminta volt negatív a Bax protein expresszióra. Valamennyi pozitív eset hasonló expressziós intenzitási szintet mutatott. A kemoterápiát követően mind a 17 sebészi tumorminta Bax IHC pozitív volt (29. táblázat).

	p53		FAS		Bcl-2		Bax	
Hisztológia	kemo előtt	kemo után	kemo előtt	kemo után	kemo előtt	kemo után	kemo előtt	kemo után
SCC	pos	pos	poz	neg	neg	neg	pos	pos
SCC	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
SCC	neg	pos*	pos	pos	neg	neg	pos	pos
SCC	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	pos
SCC	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos
SCC	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos	pos
SCC	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos
SCC	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	pos
ADC	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	pos
ADC	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos
ADC	pos	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos
ADC	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
ADC	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
ADC	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos
ADC	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
ADC	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos
BAC**	neg	pos	neg	neg	pos	neg	pos	pos

*A kemoterápiát követően megváltozott expressziót bold-dal jelöltük. **Bronchiolo-alveolaris carcinoma.

29. táblázat. A vizsgált szöveti biomarkerek IHC expressziója kemoterápia előtt és után

7.5.1.5. Ki-67 expresszió a kemoterápia előtti és utáni NSCLC szövetmintákon

Összehasonlítva a kemoterápia előtti és utáni Ki-67 expressziós szinteket, 7 mintában volt növekedés megfigyelhető, míg 3 mintában csökkent a Ki-67 pozitív sejtek %-os aránya. A többi daganatban (n=7) nem volt érdemi változás a proliferációs indexet illetően (30. táblázat).

7.5.1.6. ERCC1 expresszió a kemoterápia előtti és utáni NSCLC szövetmintákon

Kemoterápia előtt 8/17 NSCLC expresszálta az ERCC1-et. Közülük 6 volt SCC, 2 pedig ADC. Egyetlen ADC esettől eltekintve, valamennyi – kezdetben pozitív – tumor ERCC1 negatívvá vált a kemoterápia után. A kemoterápia utáni sebészi biopsziás csoportban nem volt egyetlen olyan daganat sem, amely újonnan vált volna ERCC1 pozitívvá (30. táblázat).

	Ki-67%		ERCC1	
Hisztológia	kemo előtt	kemo után	kemo előtt	kemo után
SCC	25	70*	pos	neg*
SCC	30	50	pos	neg
SCC	70	40	neg	neg
SCC	40	5	pos	neg
SCC	60	80	neg	neg
SCC	10	10	pos	neg
SCC	50	90	pos	neg
SCC	10	20	pos	neg
ADC	5	20	neg	neg
ADC	50	40	neg	neg
ADC	30	30	pos	neg
ADC	5	30	neg	neg
ADC	50	60	pos	pos
ADC	50	90	neg	neg
ADC	0	5	neg	neg
ADC	60	40	neg	neg
BAC**	10	10	neg	neg

*A kemoterápiát követően megváltozott ERCC1 expressziót, illetve a 10%-nál nagyobb Ki-67 expresszió változást bold-dal jelöltük. **Bronchiolo-alveolaris carcinoma.

30. táblázat. Ki-67 és ERCC1 expresszió kemoterápia előtt és után tüdő SCC-ben és ADC-ben.

7.5.1.7. Biomarker expressziók az NSCLC tumorok szövettani altípusaiban

A vizsgált szöveti biomarkerek expressziójában nem volt összefüggés detektálható az egyes szövettani altípusok (ADC/SCC) között, bár kétségtelen, hogy az alacsony esetszám nem tette lehetővé érdemi statisztikai analízis kivitelezését. Mindennek ellenére, az ERCC1 expresszióban különbséget észleltünk a két szövettani altípus között, ahogyan azt leírtuk a fentiekben.

7.5.2. Neoadjuváns kemoterápia hatása az ERCC1 expresszióra nem-kissejtes tüdőrákban [22]

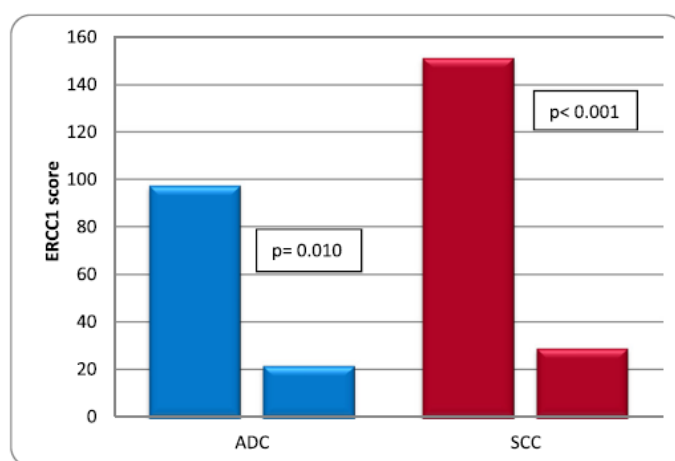
A jelen munkában a #21 vizsgálatban tanulmányozott szöveti biomarkerek közül az ERCC1 protein expresszió – platinabázisú kemoterápiára bekövetkező – változását vizsgáltuk meg részletesebben, nagyobb esetszám mellett, összesen 46 nem-kissejtes tüdőrák szövettani mintán (27 SCC, 19 ADC). 35/46 kemoterápia előtti, bronchoscopos szövetminta mutatott ERCC1 nukleáris immunpozitivitást; az átlagos H-score 129,4 volt. Az SCC és az ADC szövettani alcsoportokban megfigyelhető átlagos ERCC1 H-score értékek között nem volt szignifikáns a különbség, azonban egy pozitív trend megfigyelhető volt az SCC javára (SCC: 151,7; ADC: 97,6; $p=0,065$) (31. táblázat).

No	SCC			ADC		
	H-score kemo előtt		H-score kemo után	H-score kemo előtt		H-score kemo után
1	285	♀	0	285	♀	0
2	285	♀	0	285		160
3	285	♀	20	270		20
4	285		30	270		60
5	270		10	240	♀	0
6	270		10	150	♀	0
7	270		100	140	♀	0
8	270		140	120		0
9	240		0	80	♀	160
10	240		0	10	♀	0
11	240		210	5		10
12	210		60	0	♀	0
13	160		0	0	♀	0
14	160		0	0	♀	0
15	140		0	0	♀	0
16	140	♀	0	0	♀	0
17	120		120	0		0
18	100		60	0		0
19	40		0	0		0
20	40		20	átlag: 97,6		
21	20		0			
22	10	♀	0			
23	10		0			
24	5		0			
25	0		0			
26	0		0			
27	0	♀	0			
átlag: 151,7						

31. táblázat. ERCC1 H-score értékek SCC-ben és ADC-ben platinabázisú kemoterápia előtt és után

Az ADC csoportban 11/19 bronchoscopos minta volt ERCC1 pozitív. Közülük 6 esetben a tumor ERCC1 negatívvá vált kemoterápiát követően, 3 esetben csökkent az expressziós szint, 2 betegnél pedig növekedett. A kemoterápia előtti és utáni ERCC1 expressziók közti különbség szignifikánsnak bizonyult ($p=0.010$) (74. ábra).

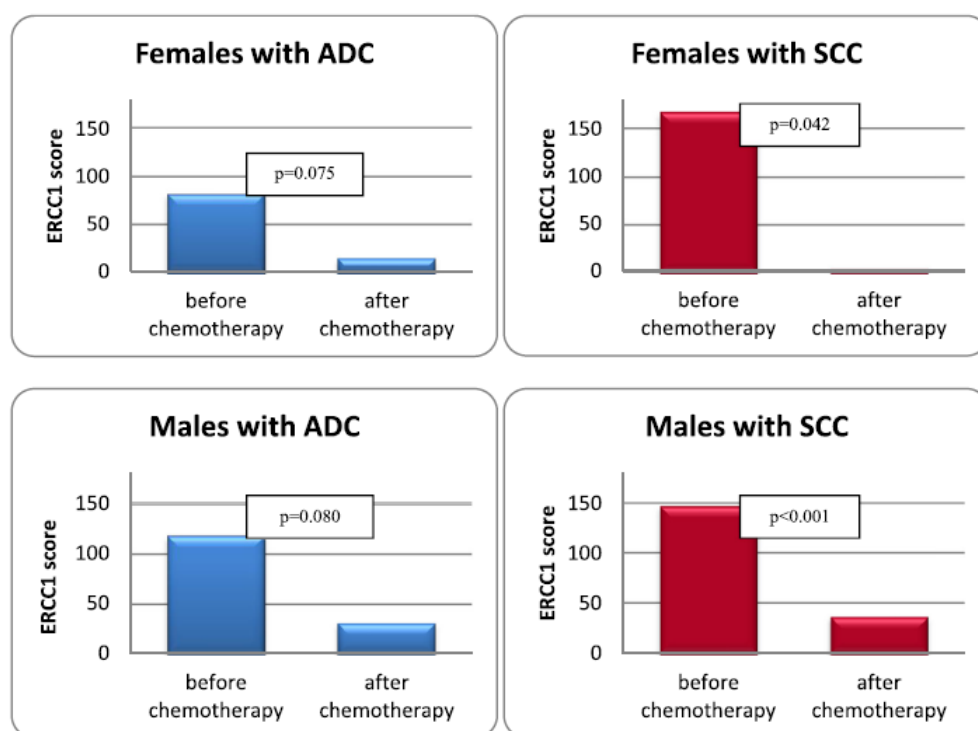
Az SCC csoportban három mintától eltekintve valamennyi tumor (24/27) expresszálta az ERCC1-et, és általában magas H-score-ral. Közülük 13 szövetminta ERCC1 negatívvá vált a kemoterápiát követően, 10 esetben expressziós szint csökkenés volt megfigyelhető, 1 betegnél az ERCC1 expressziós szint változatlan maradt. A kemoterápia előtti és utáni ERCC1 expressziók közti különbség szignifikánsnak bizonyult ($p<0.001$) (74. ábra).



74. ábra. ERCC1 expressziós változások kemoterápiát követően ADC-ben (n=19) és SCC-ben (n=27)

Egyetlen esetben sem találtunk ERCC1 negatívból pozitívvá váló tumormintát. ERCC1 up-reguláció kizárólag az ADC-k között volt megfigyelhető, és ott is mindössze két esetben, amikor is az átlagos H-score növekedés 42,5 volt. Az SCC-k esetében markánsabb volt a H-score csökkenés mértéke, mint az ADC csoportban ($p<0.001$; $p=0.010$).

Ugyancsak kifejezettebb volt az ERCC1 expresszió csökkenésének mértéke a férfiaknál ($p<0.001$), összehasonlítva a nőknél megfigyelttel ($p=0.007$). A nemekre és a szövettani alcsoportokra lebontott ERCC1 H-score összehasonlítást a 75. ábrán mutatjuk be.



75. ábra. Nemek szerinti ERCC1 expresszió-változás összehasonlítás ADC-ben és SCC-ben

Amikor az ERCC1 H-score változást egyénekre lebontva vizsgáltuk, kifejezettebb csökkenést tudtunk demonstrálni az SCC-k esetében ($p=0.032$).

Az életkor mindkét nemben pozitívan korrelált a preoperatív ERCC1 H-score-al ($r=0.295$, $p=0.046$). Ez az összefüggés csaknem szignifikáns volt az ADC-s betegek körében ($r=0.429$, $p=0.067$), és erősen szignifikánsnak bizonyult a nők esetében ($r=0.654$, $p=0.004$). A nőkben az életkor pozitív korrelációt mutatott az ERCC1 H-score változásával ($r=0.504$, $p=0.039$).

Amikor a dohányzás és az ERCC1 expresszió változás közti összefüggést elemeztük, a pack-year index⁷ fordítottan korrelált az ERCC1 H-score csökkenéssel, de csak a férfiaknál ($r=-0.627$, $p=0.009$).

A neoadjuváns kemoterápiák ciklusszáma magasabb volt a nőknél, mint a férfiaknál (2.48 vs. 3.41, $p=0.013$). Szintén magasabb volt az ADC-ben szenvedőknél, mint SCC esetében (3.26 vs. 2.52, $p=0.060$). A férfiaknál a ciklusok száma függött a kombinációs szertől

⁷ Pack-year index: Azon évek száma, melynek során az egyén napi 1 csomag cigarettát szívott el.

(paclitaxel: 3.33, gemcitabin: 2.37, etoposid: 1.75, $p=0.031$). SCC-ben ugyancsak függött a ciklusok száma a kombinációs szertől (paclitaxel: 3.5, gemcitabin: 2.33, etoposid: 2.0, $p=0.028$). Ami a kemoterápia platinum komponensét illeti, nem észleltünk szignifikáns különbséget a cisplatin és a carboplatin alcsoportok között, habár az egyes alcsoportok alacsony esetszámai nem tették lehetővé komolyabb következtetések levonását.

Mindezek ellenére érdemes kiemelni, hogy az ERCC1 H-score csökkenés mértéke nagyobb volt a carboplatin csoportban, összehasonlítva a cisplatinnal (231.7 vs. 109.2, $p=0.070$). Hasonlóképpen, az ERCC1 expresszió csökkenés mértéke kifejezettebb volt azon betegeknél, akik paclitaxelt kaptak, összevetve a gemcitabint és az etoposidot kapott betegek értékeivel (paclitaxel: 224.2 vs. gemcitabin: 109.0 vs. etoposid: 48.6) ($p=0.041$).

A kemoterápiás válasz és egyes klinikai paraméterek, mint az életkor vagy a dohányzási anamnézis, közti korreláció vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns összefüggést ($p=0.205$; $p=0.313$). Hasonlóképpen, nem volt összefüggés a kemoterápiás válasz és az alkalmazott kemoterápiás ciklusok száma ($p=0.518$), a preoperatív ERCC1 H-score ($p=0.757$), a postoperatív ERCC1 H-score ($p=0.711$) és az ERCC1 H-score csökkenés mértéke között ($p=0.640$).

A kezdeti ERCC1 H-score és a teljes túlélés, valamint az ERCC1 H-score változása és a teljes túlélés közti összefüggés elemzésekor nem találtunk szignifikáns korrelációt sem az ADC ($p=0.142$; $p=0.140$), sem pedig az SCC ($p=0.739$; $p=0.892$) esetében.

A kezdeti klinikai stádium (cTNM) és a neoadjuváns kemoterápia utáni patológiai stádium (pTNM) szignifikáns csökkenést mutatott ($p<0.001$), azonban a stádiumok megváltozása nem függött össze sem a kezdeti ERCC1 score-al, sem pedig az ERCC1 score változással.

7.5.3. *Platinabázisú kemoterápia hatása nem-kissejtes tüdőrákok PD-1/PD-L1 expressziójára [23]*

41 tüdőrák tumorpár (20 ADC, 15 SCC, 1 MEC⁸, 1 ADSQ⁹, 4 SCLC) archivált paraffinos szövetmintáin tanulmányoztuk a platinabázisú kemoterápia hatását a tumorsejtek (TC) PD-L1 és az immunsejtek (IC) PD-L1 és PD-1 protein expressziójára, valamint a stromális immunsejt denzitásra. A kiértékeléskor egyrészt használtuk a hagyományos PD-1/PD-L1 IHC score kategóriákat (TC: 1%, 5%, 50%; IC: 1%, 5%, 10%), másrészt – annak érdekében, hogy a nagy kategóriákon belüli változásokat is demonstrálhassuk – bevezettünk egy részletesebb score rendszert is (<1%, 1-5%, 6-10%, 11-20%, 21-30%, 31-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90% és 91-100%).

7.5.3.1. *A neoadjuváns kemoterápia hatása a PD-L1 TC expresszióra*

A teljes kohorszban az eredeti score rendszer alapján 9 betegnél csökkent, háromnál növekedett, 29 betegnél pedig változatlan volt a PD-L1 TC expresszió a neoadjuváns kemoterápiát követően (32. táblázat). A részletesebb score rendszer alkalmazásakor 10 betegnél figyelhattunk meg csökkenést. A leglátványosabb csökkenést egy ADC mintapáron észleltük, amely esetében a bronchoscopos mintában 70%-os volt a PD-L1 TC expresszió, majd 3 ciklus carboplatin-paclitaxel kemoterápia után <1%-ra csökkent. A PD-L1 TC csökkenés csak azon 16 betegnél volt szignifikáns, akik cisplatin-gemcitabin kombinációjú kemoterápiában részesültek ($p=0.02$ mindkét score rendszer mellett), a carboplatin–paclitaxel csoportban nem volt ilyen tendencia megfigyelhető egyik score rendszerrel sem ($p=0.669$ és $p=0.432$). Az ADC és az SCC csoport között nem volt szignifikáns különbség a PD-L1 TC változást illetően ($p=0.428$ és $p=0.189$). Hasonlóképpen nem volt különbség a férfiak és a nők között ($p=0.328$ és $p=0.163$).

⁸ MEC: mucoepidermoid carcinoma

⁹ ADSQ: adenosquamosus carcinoma

[illegible]

*eredeti score rendszer, **részletes score rendszer, ADC: adenocarcinoma, SCC: squamous cell carcinoma, SCLC: small cell lung cancer, ADSQ: adenosquamous carcinoma, MEC: mucoepidermoid carcinoma

32. táblázat. Neoadjuváns kemoterápiára bekövetkező expressziós változások tüdőrákban

7.5.3.2. A neoadjuváns kemoterápia hatása a PD-L1 IC expresszióra

A teljes kohorszban 10 betegnél növekedés, 8 betegnél csökkenés volt megfigyelhető, míg 23 beteg esetében nem változott a PD-L1 IC expresszió a neoadjuváns kemoterápiát követően (32. táblázat). Eredményeink arra utalnak, hogy a kemoterápiának nincs szignifikáns hatása a PD-L1 IC expresszióra ($p=0.643$). Az expressziós változások nem voltak szignifikánsak sem az ADC, sem pedig az SCC alcsoportban ($p=0.541$ és $p=0.104$). Hasonlóképpen nem észleltünk összefüggést az egyéb klinikopatológiai alcsoportok elemzésekor sem (adatokat nem mutatjuk).

7.5.3.3. A neoadjuváns kemoterápia hatása a PD-1 IC expresszióra

A teljes kohorszban 12 betegnél növekedés, 16 betegnél csökkenés volt megfigyelhető, és 13 beteg esetében nem változott a PD-1 IC expresszió a neoadjuváns kemoterápiát követően (32. táblázat). Eredményeink arra utalnak, hogy a kemoterápiának nincs szignifikáns hatása a PD-1 IC expresszióra ($p=0.456$). Az expressziós változások nem voltak szignifikánsak sem az ADC, sem pedig az SCC alcsoportban ($p=0.428$ és $p=0.189$). Hasonlóképpen nem volt különbség a férfiak és a nők között ($p=0.328$ és $p=0.163$).

7.5.3.4. A neoadjuváns kemoterápia hatása a stromális IC denzitásra

A teljes kohorszban 38 tumorminta volt alkalmas a stromális IC kiértékelésére. Négy betegnél növekedés, 6 betegnél csökkenés volt megfigyelhető, és 28 beteg esetében nem változott a stromális IC denzitás a neoadjuváns kemoterápiát követően (32. táblázat). Eredményeink arra utalnak, hogy a kemoterápiának nincs szignifikáns hatása a PD-L1 IC expresszióra ($p=0.534$). Az expressziós változások nem voltak szignifikánsak sem az ADC, sem pedig az SCC alcsoportban ($p=0.67$ és $p=1.0$), és nem észleltünk összefüggést az egyéb klinikopatológiai alcsoportok elemzésekor sem (adatokat nem mutatjuk).

7.5.3.5. A különböző szövettani paraméterek változásai közötti összefüggés

Az egyes szövettani paraméterek – neoadjuváns kemoterápiát követő – változásai közti összefüggések elemzésekor pozitív korreláció volt kimutatható a PD-1/PD-L1 IC és a stromális IC denzitás változása között ($p=0.002$, Spearman $R=0.491$ és $p=0.004$, Spearman $R=0.454$), és következésképpen az immunsejtek PD-1 és PD-L1 expressziója között ($p=0.035$, Spearman $R=0.331$). Ez azt jelenti, hogy a stromális IC denzitás növekedése nagy valószínűséggel együtt jár az immunsejtek PD-1 és PD-L1 expresszió növekedésével.

8. MEGBESZÉLÉS

8.1. Tüdőrákok differenciáldiagnosztikai és prognosztikai markereinek vizsgálata [1-3]

A tüdőrák diagnosztikájában és terápiájában egyre nagyobb szerephez jutnak az egyes differenciáldiagnosztikai, prognosztikai és prediktív markerek.

A terápiás arzenál bővülésével az utóbbi másfél évtizedben döntő jelentőségűvé vált az adenocarcinomák elkülönítése az egyéb szövettani altípusoktól. A #1 vizsgálatban az elsők között igazoltuk, hogy a TTF-1 protein expresszió megfelelő szenzitivitású (92%), és kiváló specificitású (100%) az ADC-k pulmonális eredetének igazolásához, így alkalmazása a klinikai gyakorlatban nagymértékben elősegíti a megfelelő betegszelekciót¹⁵. Eredményünk összhangban áll azokkal a vizsgálatokkal, melyekben a cél a primer tüdő ADC-k és az extrapulmonális ADC-k elkülönítése volt malignus mellkasi folyadékok TTF-1 IHC vizsgálatával¹⁵⁰⁻¹⁵³.

A TTF-1 immunpozitivitás a primer tüdő ADC-k mellett a pajzsmirigyrákokra is jellemző, azonban a klinikai gyakorlatban egyrészt rendkívül ritka a pleurális áttét pajzsmirigyrákban, másrészt alig fordul elő fizikális vizsgálattal nem detektálható, de már távoli áttétet adott pajzsmirigyrák. Kérdéses esetben a tumormintán alkalmazhatjuk a rendkívül szenzitív és specifikus thyreoglobulin immunreakciót, amelynek negatív eredménye tovább erősíti a TTF-1 pozitív malignus mellkasi folyadékgyülem tüdő ADC eredetét. Mindemellett a TTF-1 számos vizsgálatban nagyfokú, akár 100%-os specificitást mutatott a *primer tüdő ADC vs. malignus pleurális mesothelioma* összehasonlítás során is¹⁵⁴.

Ugyancsak 100%-os specificitást igazolt Sturm a tüdő nagysejtes neuroendocrin carcinomájának a basalooid laphám carcinomától való elkülönítésében¹⁵⁵. A TTF-1 p63 IHC-vel való kombinálása nagyban segítheti a kissejtes tüdőráknak (TTF-1+/p63-) a rosszul differenciált laphámráktól (TTF-1-/p63+) való elkülönítését¹⁵⁶.

A primer és metasztatikus tüdő ADC-k differenciáldiagnosztikája nemritkán kihívást jelent, különösen a szoliter kerekárnyékok esetében. Primer tüdő ADC-ben a legtöbb szerző összességében 75% feletti TTF-1 IHC pozitivitást detektált, azonban a csoporton belül

jelentős különbségek mutatkoztak¹⁵⁷. Goldstein 40 bronchiolo-alveolaris carcinoma vizsgálatakor 92%-os pozitívítási arányt és erős IHC festődést észlelt, ugyanakkor a mucinosus ADC-k esetében a pozitívítási arány csak 21% volt, az immunfestődés pedig gyenge intenzitású volt^{158,159}. A TTF-1 nagymértékben segítette a pulmonális eredet igazolását pecsétgyűrű-sejtes carcinomában, szemben az ilyen szövettani típusú extrapulmonális (emlő-, gyomor-, colon-) tumorokkal^{160,161}. Hasonlóképpen, a TTF-1 festés nagyon megbízhatónak bizonyult az agyi áttétek pulmonális-, vagy extrapulmonális eredetének tisztázásában, különösen ADC-k és nagysejtes tüdőrákok esetében¹⁶².

Napjainkra a TTF-1 IHC igen előkelő helyet vívott ki a tüdőrák diagnózisának felállításában. #1 vizsgálatunk eredménye hozzájárult a TTF-1 IHC-nek a pulmonális ADC diagnosztikájában betöltött szerepének meghatározásához. Manapság a tüdő ADC igazolása indikációt jelent egyes kemoterápiás szerek (pl. pemetrexed) alkalmazására, illetve indokoltá teszi olyan molekuláris célpontok (pl. EGFR, ALK, ROS1, BRAF) meghatározását, amelyekre már a mindennapi gyakorlatban alkalmazható terápiás készítmények állnak rendelkezésünkre. A TTF-1 meghatározás emellett fontos szerephez jut az immunterápia esetében is, mivel mások az indikációs körök ADC-ben, mint SCC-ben.

A #2 vizsgálat során a szakirodalomban elsőként írtuk le tüdőrákban, illetve annak különböző szövettani altípusaiban a claudin-1, -2, -3, -4 és -7 protein és mRNS expressziót¹⁷. Az egyes szövettani csoportok közt megfigyelt expressziós különbségek felvetik a claudinok lehetséges szerepét tüdőrákok szövettani altípusaira vonatkozó differenciáldiagnosztikai kérdések megválaszolásában.

Halász és mtsai hepatoblastomákban a claudin-1 és -2 expressziót szignifikánsan magasabbnak találták a jobban differenciált fetális komponensben, mint a daganat embrionális komponensében¹⁶³. Jelen munkánkban a heterogén differenciációt mutató daganatokban a claudin-1 és -4 rendszerint erősebb immunpozitivitást mutatott a jól-differenciált területeken mint a kevésbé-differenciált részekben. Ez a megfigyelés összhangban áll Michl és mtsai eredményével, akik pancreas carcinomában a claudin-4 expressziót, mint a tumor-invazivitás gátlóját azonosították²⁰. Lee és mtsai hasonló összefüggést figyeltek meg gyomorrákban, ahol a csökkent claudin-4 expresszió mind protein-, mind pedig mRNS szinten a daganat alacsony differenciáltsági fokával függött össze¹⁶⁴. Ezt az eredményt Resnick és mtsai is megerősítették¹⁶⁵.

Jelen vizsgálatunkban magas claudin-3 és -4 expressziót figyelhettünk meg tüdő ADC-kben, ami hasonlóságot mutat más szervek adenocarcinomáival, így pl. emlőrákkal, pancreas- és ovarium carcinomával, valamint Barrett oesophagus talaján kialakuló nyelőcsőrákkal¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Az ADC-vel ellentétben SCC-ben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a claudin-3 expressziót illetően. Ez összhangban áll Sobel és mtsai cervix preinvazív léziókban és laphámrákban tett megfigyeléseivel, mely szerint cervicalis intraepithelialis neoplasiákban, in situ carcinomákban és invazív carcinomákban hiányzik a claudin-3 expresszió¹⁷⁰. Tüdő laphámrákokban mi a claudin-4 expressziót – annak ellenére, hogy az átlagos IHC score érték ebben a szövettani altípusban alacsonyabb volt a többihez viszonyítva – szignifikánsan magasabbnak találtuk a jól-differenciált tumor-területeken, valamint a tumor-fészek centrális részén és nemritkán az elszarusodást mutató területek közelében. Hasonló jelenséget figyeltek meg Morita és mtsai bőr SCC-ben¹⁷¹. Amikor összehasonlítottuk az ADC és SCC eseteket, negatív claudin-3 és -4 tumormintákat kizárólag az SCC csoportban találtunk, amely megfigyelésnek differenciáldiagnosztikai értéke lehet. Mindemellett ezek az expressziós különbségek a tüdő ADC-k és SCC-k bronchialis carcinogenesisbeli különbségeire is utalhatnak.

Az SCLC és a carcinoid tumorok valamennyien a neuroendocrin tüdőrákok csoportjába tartoznak. Ezen daganatok differenciáldiagnosztikájának komoly terápiás vonzata van, ugyanakkor egyes esetekben nem könnyű a helyes diagnózis felállítása kicsiny bronchoscopos biopsziás mintából, vagy citológiai preparátumból^{172,173}. Eredményeinknek éppen ezért diagnosztikus értéke lehet, mivel erősen szignifikáns különbséget észleltünk a claudin-1, -3 és -4 expresszióban az SCLC-k és a carcinoidok között. SCLC-ben emellett a claudin-2 expresszió teljes hiányát figyelhettük meg, aminek ugyancsak lehet diagnosztikus értéke. A jelentős claudin-2 expresszió csökkenés az agresszív biológiai viselkedésű SCLC-ben kapcsolódik ahhoz a megfigyeléshez, miszerint cervix intraepithelialis neoplasiában és in situ carcinomában fokozott a claudin-2 expresszió, azonban jelentősen lecsökken invazív cervix rákban¹⁷⁰.

Vizsgálatunk során rendkívül magas claudin-3 expressziót detektáltunk az SCLC esetekben, összehasonlítva a többi tumor típussal. Az SCLC-k és az SCC-k közti különbség oly mértékű, ami differenciáldiagnosztikai értékű lehet, különösen rosszul differenciált és basalioid SCC-k esetében. Mindemellett a magas claudin-3 expresszió SCLC-ben felveti ennek a

fehérjének a molekuláris célpont jellegét is. Ismeretes, hogy a claudin-3 és -4 a *Clostridium perfringens* enterotoxin receptoraként is szolgál, és aktiválódása sejtlízist eredményez. Ugyanakkor a claudin-3 és -4 számos normál szövetben, így a bélben, a tüdőben és a vesében is jelen van, ami akadályozza a *Clostridium perfringens* enterotoxin szisztémás daganatellenes kezelésként való alkalmazását^{174,175}. A claudin-expresszáló sejtekhez való gyógyszer-eljuttatásra vonatkozóan Ebihara és mtsai egy ígéretes eredményről számoltak be, aminek lényege egy claudin-célzó molekula előállítás a *Clostridium perfringens* enterotoxin C-terminális fragmentumának felhasználásával¹⁷⁶. Egy másik onkoterápiás megközelítés az antitest-alapú terápia, mivel ehhez a claudinok – mint transzmembrán proteinek – megfelelő célpontok lehetnek¹⁷⁷.

Jelen munkánkban a claudin-7 expresszió csaknem valamennyi tumormintában emelkedett volt, ezzel szemben a claudin-3 és -4 csak SCLC-ben és ADC-ben volt szignifikánsan emelkedett. Az egyes szövettani altípusok claudin expressziós mintázata arra utal, hogy az SCLC-k egy homogénebb csoportot alkotnak, szemben az ADC-kkel és az SCC-kkel. Érdekes módon, a carcinoid tumorok – még a típusos carcinoidok alcsoportján belül is – heterogén claudin expressziós profilt mutatnak.

Mindezek miatt rendkívül fontos a tüdőrákok szövettani altípusainak további, kiterjesztett vizsgálata, illetve a jelen tanulmányba bevont daganattípusok esetszámának nagyfokú bővítése, hogy jobban megérthessük a claudinok bronchialis carcinogenesisben betöltött szerepét, és főként, hogy kiaknázhassuk az egyes claudinok overexpressziója nyújtotta terápiás lehetőségeket.

A fenti claudin expressziós eredmények birtokában kíváncsivá váltunk arra, hogy a claudin expresszióknak van-e prognosztikai értéke is, így a #3 vizsgálatban ennek tanulmányozását tűztük ki célul²⁴. Vizsgálni kívántuk emellett, hogy az ADC-n belül van-e a szövettani alcsoportok – így a lepidikus terjedést mutató (L-ADC) és nem mutató ADC-k (ADC) – között claudin expressziós különbség. Ez a megközelítés összhangban állt a 2015-ben megjelent WHO tüdőrák szövettani klasszifikációval, amely már élesen kettéválasztja ezen ADC altípusokat¹³.

Eredményeink szerint tüdőrákban a csökkent claudin-1 expresszió rossz prognosztikai faktornak tartható, de csak a laphámrákok esetében. Hasonló eredményt láttak veserákok vizsgálatakor, amikor a csökkent claudin-1 expresszió kedvezőtlen biológiai viselkedéssel

párosult világossejtes veserákban, ugyanakkor jó prognózisra utalt papilláris vesesejtes carcinomában¹⁷⁸. Ugyancsak kedvezőtlen túléléssel párosult az alacsony claudin-1 expresszió II stádiumú colon carcinomában, és emellett magasabb tumor grade-del is járt¹⁷⁹. Gyomorrákban az alacsony claudin-1 expresszió szintén független negatív prognosztikai faktornak bizonyult¹⁸⁰.

Szász és mtsai emlőrák nyirokcsomó áttétében figyelték meg, hogy az alacsony claudin-1 és a fokozott claudin-4 expresszió rövidebb betegségmentes-túléléssel párosult¹⁸¹. Ezzel ellentétben, más kutatók a tripla-negatív emlőrákban a claudin-4 expressziót a kedvező prognózis biomarkerének találták¹⁸², és hasonló volt az összefüggés gyomorrákban is¹⁸³. Mi a jelen munkánkban ugyancsak szignifikáns különbséget figyelhettünk meg az egyes ADC szövettani altípusok között, ami az emlőrákos esetekkel való hasonlóságra utalhat.

Érdekes módon a jelen munkánkban alacsony claudin-1 expressziót figyelhettünk meg a lepidikus terjedésű L-ADC-kben, amelyekben a leghosszabb volt a teljes túlélés a három NSCLC szövettani altípus (L-ADC, ADC, SCC) között. Ennek ellenére a claudin-1 expresszió nem volt prognosztikai értékű az L-ADC alcsoporton belül.

Hasonlóképpen alacsony expressziót észleltünk L-ADC-ben a claudin-3-ra és -4-re vonatkozóan, prognosztikai érték nélkül.

Ami a claudin-7 expressziót illeti, saját vizsgálatunkban nem igazolódott ennek prognosztikai jelentősége, érdemes azonban kiemelni, hogy az ADC alcsoportok között szignifikáns expressziós különbségek voltak demonstrálhatók az ADC-k javára. Más daganatokban, így pl. nasopharyngealis carcinomában, az alacsony claudin-4 és a magas claudin-7 expresszió korrelált a távoli metasztázisok korábbi megjelenésével, továbbá az emelkedett claudin-7 az előrehaladottabb tumor stádiummal¹⁸⁴. Kim és mtsai ugyancsak pozitív összefüggést írtak le ovárium epithelialis carcinomában a magas claudin-7 expresszió és a rövidebb progressziómentes túlélés között¹⁸⁵. Ezzel ellentétben, szájüregi és oropharyngealis SCC-ben a lokális tumor recidívával a claudin-7 expresszió elvesztése korrelált¹⁸⁶.

Jelen munkánk során igyekeztünk a tüdőrákos betegek mind stádium-, mind pedig szövettani altípus szerinti nagyon homogén csoportjait vizsgálni annak érdekében, hogy minimalizáljuk mind az áttétképződés egyes lépéseinek, mind pedig a szövettani – és ezáltal carcinogenesisbeli – különbözőségeknek a hatásait. Eredményeink egyrészt

ráirányítják a figyelmet a tüdő ADC-k heterogenitására, ami megnyilvánul a jelentős claudin expressziós különbségekben is, másrészt tüdő laphámrákban – az igazolt kedvezőtlen prognosztikai érték miatt – alacsony claudin-1 expresszió esetén felvetik szorosabb betegkövetés szükségességét.

8.2. Tüdőrákok távoli áttéteinek vizsgálata [4-9]

A tüdőrákok több mint 40%-át IV stádiumban fedezik fel, tehát már megjelent távoli szervi áttét. A #4 vizsgálatban arra kerestük a választ, hogy tüdő ADC-ben a primer tumor intrapulmonális lokalizációja milyen összefüggést mutat a távoli áttétek helyével, megjelenési idejével és sorrendiségével⁵⁸. Ilyen jellegű tanulmányokra tüdőrákban korábban csak alig volt példa, és azokban is rendszerint szövettanilag heterogén csoportot vizsgáltak, alacsony esetszámmal.

Egyéb szolid tumorok esetében ezzel szemben több ilyen jellegű adat állt rendelkezésre. Colorectalis carcinomában például a bal oldali és a jobb oldali tumorok között jelentős epidemiológiai és biológiai viselkedésbeli különbséget találtak¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Több nagyobb adatbázis elemzése – amelyek döntően nem-metasztatikus daganatokat tartalmaztak – jobb oldali tumor esetében kedvezőtlenebb túlélést igazolt¹⁹⁰⁻¹⁹³. Emellett a primer tumor lokalizációjának jelentőségét a túlélésben IV stádium esetén is kimutatták¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Saját eredményeink értékelése előtt fontos kihangsúlyozni, hogy a szakirodalomban nincs standard definíciója a „centrális” és a „perifériás” tüdőrákoknak. Ketchadjan és mtsai például centrálisnak tartották a tüdőrákot, amennyiben az a mellkas CT-n a tüdőmező belső harmadában helyezkedett el, illetve amennyiben látható volt a bronchosopia során¹⁹⁷. Tekintettel arra, hogy esetünkben mind az 1126 betegnél rendelkezésünkre állt bronchoscopos lelet, a centrális tumor egyértelmű definíciójaként az endobronchialisán látható daganatokat adtuk meg.

Az IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) a 8. kiadású tüdőrák TNM klasszifikációjában 33 115 NSCLC beteg adatait elemezte, hogy meghatározza a primer tumor (T) prognosztikai jellemzőit¹⁹⁸. Érdekes módon e szerint az elemzés szerint az endobronchialis T3 tumorok (kevesebb mint 2 cm-re a bifurcatiós carinától, de azt nem involválva) ugyanolyan prognózissal jártak, mint a perifériás T2 tumorok. Ennek

következtében a szerzők javaslatot tettek az endobronchialis T3 daganatok T2-vé történő re-klasszifikációjára. Mindezek ellenére ebből az IASLC adatbázisból nem történtek elemzések a primer tüdőrák lokalizációja és a hematogén metasztázisok szervi lokalizációja közti összefüggésről. Tüdő ADC-ről jelentek meg sporadikus tanulmányok; így pl. Ito és mtsai azt találták, hogy a teljes túlélés hosszabb a centrális N2 tüdőrákokban¹⁹⁹. Más vizsgálatok ugyanakkor éppen az ellenkezőjét találták²⁰⁰⁻²⁰². Egyes szerzők kapcsolatba hozták a centrális primer tumor lokalizációt a mediastinalis nyirokcsomó érintettséggel^{200,201}, és leírtak egy tendenciát a felső lebenyi primer tumorok és az ellenoldali – felső lebenyi – pulmonális áttétek között²⁰³.

Jelen vizsgálatunk elsőként számolt be arról, hogy a centrális tüdő ADC-kben korábban jelennek meg távoli szervi áttétek, továbbá, hogy míg centrális daganatokban a csontáttét, úgy perifériás daganatokban a tüdőáttét a gyakoribb. Kimutattuk emellett, hogy a pleurális áttétek főként az alsó lebenyekből kiinduló daganatokból származnak.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a primer tumor pontos lokalizációjának ismerete elősegítheti egyénre szabott diagnosztikus és terápiás stratégiák kidolgozását, ráadásul összhangban vannak a frissen megjelent diagnosztikus és stádium-meghatározási irányelvekkel²⁰⁴⁻²⁰⁷.

Kiemelendő, hogy eredményeink alapján tüdőrákban – a távoli áttétekre vonatkozóan – nincs különbség a jobb oldali és a bal oldali ADC-k között, tehát bármely oldali tüdőérintettségénél ugyanazok az onkológiai elvek érvényesülnek a beteg ellátásakor.

Tüdőrákban a távoli áttét megjelenése ismerten egy kedvezőtlen prognosztikai faktor. A közelmúltban több munkacsoport – beleértve az IASLC „*Lung Cancer Staging Project*” vizsgálóit – kimutatta, hogy az egy szervben megjelenő egyetlen távoli áttétnél a túlélés kedvezőbb, mint több áttéti lézió esetében²⁰⁸⁻²¹¹. Ennek megfelelően a 2015-ös IASLC guideline javasolta az extrathoracalis metasztázisok szubklasszifikációját aszerint, hogy egy szervben egyetlen áttét van jelen (M1b), vagy pedig egy szervben több áttét, illetve több szervben több áttét (M1c)²¹¹. Mindezzel összhangban mi is megfigyeltünk egy klinikailag releváns csökkenést a túlélésben az áttéti szervek számának növekedésével.

Vizsgálatunknak ugyanakkor vannak korlátai. A retrospektív jelleg mellett a stádium-meghatározás módja is limitációt jelent, mivel az esetek egy részében klinikai TNM-et, az operált betegeknél pedig patológiai TNM-et használtunk az adatfeldolgozás során.

Emellett, a rutin klinikai gyakorlatban megmutatkozó különbségek bizonyos szempontból heterogénné tették a vizsgálati kohorszt. Így például PET-CT vizsgálatra csak a betegek töredékénél került sor, ami a tünetmentes áttétek aluldiagnosztizálását, ennek következtében pedig a betegség stádiumának alulbecslését vonhatta maga után. Megemlíteném továbbá, hogy a vizsgálati kohorszt öt vezető hazai pulmonológiai intézet 2001-2014 között kezelt primer tüdő ADC-s betegeiből alakítottuk ki. A hosszú időintervallum szükségszerűen heterogenitást eredményezett mind a kivizsgálást, mind pedig a terápiát illetően. Összességében azonban – a rutin klinikai gyakorlatnak megfelelően – a betegek döntő többségénél pontosan került meghatározásra a kezdeti stádium, illetve a hematogén áttétek megjelenési ideje és helye.

Tanulmányunk értékelésének egy másik fontos pontja az ADC-n belüli szövettani és molekuláris altípusok meghatározásának hiánya. A tüdő ADC-k legújabb klasszifikációja 2011-ben jelent meg, és ezt követően számos publikáció megerősítette, hogy a mikropapilláris és a szolid szövettani altípus gyakoribb N1/N2 nyirokcsomó áttéttel, korábbi betegségkiújulással és következésképpen kedvezőtlenebb prognózissal jár, összevetve például a lepidikus terjedést mutató ADC-vel²¹²⁻²¹⁶.

Fontos megemlíteni, hogy a jelen tanulmányban nem került sor a primer tumor lokalizációja és a daganat molekuláris státusza közti kapcsolat elemzésére. Ilyen jellegű vizsgálatot Tseng és mtsai végeztek 1171 ázsiai ADC-s betegben, és azt találták, hogy az EGFR szenzitizáló mutációja gyakoribb volt a felső lebenyi primer tumoroknál²¹⁷. Leírták továbbá, hogy az EGFR L858R mutációja gyakoribb a felső lebenyi daganatokban, összevetve az exon 19 delécióval és a wt EGFR ADC-kkel. Ezek az eredmények etiológiai különbségek gyanúját vethetik fel az EGFR mutáns és wt, továbbá a különböző molekuláris altípusú EGFR mutáns daganatok között. Tekintettel arra, hogy ezek a molekuláris patológiai adatok rendelkezésünkre állnak, a jelen tanulmány folytatásaként vizsgálni kívánjuk a primer tumor lokalizációja, metasztázis mintázata, és a daganat molekuláris altípusa közti esetleges kapcsolatot.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy elsőként számoltunk be kaukázusi betegeknél nagylétszámú kohorsz vizsgálata alapján a primer tüdő ADC lokalizációja és a daganatok metasztázis mintázata közti összefüggésekről. Igazoltuk, hogy a centrális tumorok korábban adnak távoli áttétet és rövidebb teljes túléléssel járnak. Eredményeink

hozzájárulhatnak személyre szabott diagnosztikus, terápiás és utánkövetési stratégiák kidolgozásához.

A távoli szervi metasztázisok közül az agyi áttét a gyakoriságával, valamint a beteg életminőségét és életkilátását rontó hatásával az egyik legnagyobb kihívást jelenti a tüdőrákos betegek ellátásában. Mivel a klinikai gyakorlatban nem volt használatban agyi áttét megjelenésére vonatkozó prediktív marker, továbbá, mivel kevés adat állt rendelkezésre az agyi áttét okozta tünetekért részben felelős peritumorális ödémáról, az #5 vizsgálatban ezek tanulmányozását tűztük ki célul⁶⁰.

Eredményeink szerint agyi áttétet adó tüdőrákok leggyakrabban a jobb felső lebenyben helyezkedtek el, ami a carcinogenesisist illetően összefüggésben lehet azzal, hogy a dohányfüst főként a felső tüdőmezőket károsítja^{218,219}. Azok a primer tumorok viszont, amelyek multiplex agyi áttétet adtak, inkább az alsó lebenyekben helyezkedtek el, ami az e tüdőterületek fokozott keringésének kóroki szerepét vetheti fel. Betegeink 58%-ában a primer tumor endobronchialisán látható, tehát centrális elhelyezkedésű volt, ami annál is inkább kiemelendő, mivel alapvetően a tüdőrákok kétharmada perifériás kiindulású²²⁰. Ez az arányeltolódás itt is felvetette azt a kérdést, hogy vajon a centrális tüdőrákok agresszívabb biológiai viselkedésűek-e, részben annak következtében, hogy a centrális daganatokban szenvedőknél nagyobb a dohányosok aránya²²¹.

Tüdőrákban keveset tudunk az agyi áttét körüli ödéma előfordulási gyakoriságáról, méretének megoszlásáról, illetve a túlélésben játszott szerepéről^{26,222}. Jelen vizsgálatunkban az agyi metastasectomián átesett betegek alcsoportjában a szélesebb peritumorális ödéma hosszabb túléléssel párosult, vélhetően azért, hogy hamarabb okozott akut idegsebészeti beavatkozást szükségessé tevő neurológiai tüneteket.

Az általunk alkalmazott ödéma kategóriák (nincs ödéma, ≤ 10 mm, vagy >10 mm) némileg önkényesnek tűnhetnek, azonban ilyen kategóriákat már mások is alkalmaztak, többek között meningeomák és gliomák vizsgálatakor^{223,224}. Miközben számos kifinomult módszer áll rendelkezésre a korrekt, háromdimenziós mérések elvégzéséhez, beleértve az ödémás régió szegmentálását, ezek a módszerek elég időigényesek. Tanulmányunk során a célunk elsősorban nem a pontos ödéma-volumen meghatározás volt, sokkal inkább az agyi áttétek peritumorális ödéma általi méretnövekedését kívántuk korreláltatni az egyes szövettani altípusokkal.

Az agyi áttétet adó tüdőrákos betegek túlélése széles határok között változott. A primer tumor műtéte esetén a fiatalabb életkor kedvező prognosztikai faktornak bizonyult, ezzel szemben kedvezőtlen volt a csak agyi metastasectomián átesettekénél. Ezen megfigyelés egyik lehetséges magyarázata az a jól ismert tény, hogy fiatal betegekben a tüdőrák agresszívabb biológiai viselkedést mutat, ugyanakkor viszont a fiatal életkor előnyt jelent, ha sor kerülhet a primer tumor sebészi eltávolítására^{225,226}.

Az érpályán át az agy állományát döntően a lebeenyhatárokon érik el a daganatsejtek, így a metasztázisok kialakulására elsősorban a szürke- és fehérállomány határán kerül sor²²⁷. A jelen vizsgálati kohorszban az áttétek 37,4%-a a fossa posteriorra lokalizálódott, aminek életet veszélyeztető következménye lehet. A supratentorialis tumorok nagyobbak voltak és szélesebb peritumorális ödéma vette őket körül, aminek részben magyarázatául szolgálhat, hogy ezek a tumorok később okoznak neurológiai tüneteket, összehasonlítva az infratentorialis agyi áttétekkel.

A vizsgálat talán egyik legfontosabb megállapítása, hogy a *brain only*, tehát diagnóziskor N0 státuszú tüdő ADC-ből származó agyi áttétek külön klinikai entitást képviselnek, mivel jellemző rájuk a primer tüdő tumor perifériás elhelyezkedése, a késői és szoliter agyi áttét, továbbá, mert hosszabb teljes túléléssel járnak. Korábban már igazolták, hogy tüdőrákban a *bulky* mediastinalis nyirokcsomó metasztázis jelenléte fokozza az agyi metasztázis kialakulásának rizikóját^{228,229}. A *brain only* agyi áttétes esetekben ugyanakkor más tumorsejt terjedési mechanizmusok szerepe vetődik fel²³⁰.

A vizsgált agyi áttétes betegek közül legtöbben ADC-ben szenvedtek. Mivel az elmúlt évtizedben az ADC szerte a világon a leggyakoribb szövettani típussá vált tüdőrákban, megelőzve a korábban vezető SCC-t, a tüdőrák okozta agyi áttét ellátása egyre nagyobb kihívást jelent. Eredményeink elősegíthetik az agyi áttét szempontjából nagyrizikójú tüdőrákos betegek kiválasztását, akiknél szorosabb utánkövetés válhat szükségessé, és akiknél – az ilyen jellegű vizsgálatok eredményeinek bővülésével SCLC mellett NSCLC-ben is – felmerülhet profilaktikus agyi besugárzás mérlegelése²³¹. Mindemellett eredményeink elősegíthetik a peritumorális agyödéma kialakulási mechanizmusainak jobb megértését és molekuláris hátterének további tanulmányozását.

A #6 vizsgálatban NSCLC különböző progressziós csoportjaiban (agyí áttétet adó primer tüdőrákok, ezen daganatok agyi áttétei, valamint agyi áttétet nem adó primer tüdőrákok) sebészi FFPE tumorblokkjaiból készült TMA-kon végeztünk IHC elemzéseket²⁵. Eredményeink szerint az emelkedett kollagén XVII, CD44v6 és caspase-9, valamint a csökkent β -catenin és CAS protein expresszió szignifikáns kapcsolatot mutatott a primer tüdőrák agyi áttétképző potenciáljával. Kimutatható volt emellett a sejtproliferációt elősegítő cyclin D1 és cyclin D3 fokozott expressziója a metasztatizáló primer tumorokban, az agyi áttétekben pedig gyakori volt a p16, syndecan-1 (CD138), p53 és caspase-3 expresszió.

Az immunprofil alapján elvégzett klaszter analízis szerint az agyi áttétek 2/3-a egy közös csoportba rendeződött, amelyre kedvezőtlen prognózis volt jellemző. A vizsgált 29 biomarker közül ugyanakkor mindössze a β -catenin expresszió vesztese és/vagy celluláris delokalizációja volt az, ami szignifikáns univariációs prediktora volt a rövidebb túlélésnek. A sejtadhéziós molekulákról ismeretes, hogy szerepet játszanak az áttétképződésben²³². Vizsgálatunkban a β -catenin vesztés és delokalizáció már az agyi áttétet adó primer daganatokban kifejezett volt, összehasonlítva az áttétet nem adó tumorokkal, és ez fokozódott az agyi áttétekben. A sejtmembrán β -catenin vesztése ugyanakkor már a bronchialis carcinogenesis igen korai szakaszában is megfigyelhető, akár dysplasiákban, vagy atypiát mutató metaplasiákban²³³. Hasonlóképpen, csökkent és delokalizált β -catenin expressziót detektáltak bronchiolo-alveolaris carcinómában, összevetve atypusos adenomatosus hyperplasiával²³⁴. Eredményeink összhangban vannak azokkal a vizsgálatokkal, amelyekben a csökkent β -catenin expresszió NSCLC-ben együtt járt lokális daganatinvázióval, regionális áttétképződéssel és rövidebb túléléssel^{235,236}.

Az E-cadherin, ami normál epitél sejtekben a β -catenin funkcionális partnere, az NSCLC progressziója során szintén mutat down-regulációt²³³⁻²³⁵, ami egyes esetekben kedvezőtlen túléléssel párosul²³⁷. Habár mi szintén megfigyeltünk csökkent E-cadherin szintet a progresszió során, az alcsoportok közti különbség nem volt szignifikáns és az E-cadherin nem bírt prognosztikai értékkel.

A kollagén XVII (bullosus pemphigoid antigén, BP180/BPAG2) up-regulációját már leírták tüdő laphámrákban²³⁸. Mi is megfigyeltük ezt a jelenséget az agyi áttétet adó primer

tüdőrák csoportban, azonban a kontrollcsoporttal összevetve a különbség nem volt szignifikáns.

A CD44 a Cox-2 facilitálta tumor invázió potenciális mediátora. Az agyi áttétet adó primer daganatokban és az agyi áttétekben fokozott expresszióját észleltük, ami a Cox-2/prostaglandin E2 útvonal szerepére utalhat, és ami Cox-2 gátlókkal támadható²³⁹. Fontos azonban megfigyelésünket nagyobb beteglétszámú vizsgálattal megerősíteni, mivel más kutatók nem találtak különbséget a Cox-2 expresszióban az agyi áttét adó és nem adó NSCLC-k között²⁴⁰.

A syndecan-1 (CD138) egy multifunkciós transzmembrán heparán-szulfát proteoglikán, ami az NSCLC-k kb. 90%-ában expresszálódik²⁴¹. Szerepe a prognózisban ellentmondásos, mivel egyesek szerint nincs²⁴¹, mások szerint kedvező a prognosztikai értéke²⁴², míg megint mások rossz prognosztikai faktornak tartották²⁴³. Mi emelkedett syndecan-1 expressziót észleltünk az agyi áttéti csoportban, összevetve mindkét primer alcsoporthal, ami a syndecan-1 metasztatizálásban betöltött szerepére utalhat. A túlélési vizsgálatok alapján ugyanakkor nem volt prognosztikai értéke.

A sejtciklust szabályozó cyclinek, cyclin-dependens kinázok és kináz inhibitorok szintén szerepet játszanak az NSCLC prognózisában. Közülük a cyclin E és a cyclin B1 rossz prognosztikai faktor, míg a p21, p27 és p16 kedvező prognózissal jár²⁴⁴. A cyclin D1 szerepe NSCLC-ben kérdéses, mivel egyesek kedvezőtlen²⁴⁵, míg mások független prognosztikai értékűnek tartják²⁴⁶. Esetünkben a cyclin D1 gyakoribb volt az áttétet adó daganatokban, a cyclin D3 pedig fokozott expressziót mutatott az agyi áttétekben. Mindezek tumor progresszióban betöltött szerepre utalnak, ennek ellenére egyik marker sem volt prognosztikus értékű.

A p53 expresszióra vonatkozó vizsgálatok döntő többsége P53 génmutáció következtében megjelenő nukleáris p53 immunpozitivitást írt le NSCLC-ben²⁴⁷, ami gyakran rossz prognózissal társult^{52,53,248}. Habár mi nem igazoltunk prognosztikai értéket, azonban jelentősen emelkedett p53 expressziót detektáltunk az agyi áttéti mintákban. A p53-hoz hasonlóan a p63 (a p53 protein család egy másik tagja) esetében sem igazolódott prognosztikai szerep, ami összhangban van más kutatócsoport eredményével²⁴⁹.

Korábbi vizsgálatok a p16 protein IHC expressziós arányát 70% körülire tették NSCLC-ben, és nem igazoltak prognosztikai értéket²⁵⁰. Később a p16 veszteség gyakoribb voltát (kb. 75%)

igazolták SCC-ben, szemben az ADC-vel²⁵¹, és kimutatták ennek negatív prognosztikai faktor jellegét²⁵². Ezt követően ellentmondásos eredmények születtek a p16+/cyclin D1 expresszió prognosztikai jelentőségét illetően, mivel negatív és pozitív prognosztikai faktornak egyaránt tartották^{246,253}. Saját tanulmányunkban a citoplazmatikus és nukleáris p16 expresszió növekvő gyakoriságát tapasztaltuk a tumoros progresszió során, ami a legkifejezettebb az agyi áttétes csoportban volt.

NSCLC-ben csak kevés adat állt rendelkezésre az apoptózishoz kapcsolódó biomarkerek diagnosztikai és klinikai szerepéről^{244,254}. Általánosságban elfogadott, hogy az apoptotikus faktorok elvesztése agresszívabb biológiai viselkedésű tumort eredményez, és rosszabb túléléssel jár. Ezt a teóriát erősíti az a vizsgálat is, amelyben a Fas, a Fas-ligand és a caspase-3 elvesztése kedvezőtlen túléléssel párosul²⁵⁵, míg ennek ellenkezője figyelhető meg a proapoptotikus Bax expressziója esetén NSCLC-ben²⁵¹. Más vizsgálatok ugyanakkor meglepő módon az antiapoptotikus Bcl-2 magasabb expressziója esetén kedvező túlélést találtak^{244,256,257}. Ezen megfigyelések értékeléséhez elemezni kell, hogy ismeretes volt-e pl. a Bax/Bcl-2 arány, vagy pedig, hogy vizsgálták-e a Bcl-2 aktivitását, foszforilációs státuszát. Saját vizsgálatunkban a CAS fehérje szintje szignifikánsan csökkent az áttétet adó primer tumorokban, összehasonlítva az áttétet nem adókkal, ezzel szemben viszont a Bcl-2, a Bax és a Fas szintjében nem volt érdemi különbség.

A metasztatikus progresszió során növekvő caspase-3 és caspase-9 szintet észleltünk, ami váratlan volt, ugyanakkor nem tudjuk, hogy funkcionálisan inaktív, vagy aktív caspase-okat detektáltunk-e, továbbá, hogy ezek jelátviteli útjai intaktak voltak-e. Ezen két biomarker közül egyiknek sem volt prognosztikai jelentősége.

Elemzésünk során hierarchikus klaszter analízist használtunk, hogy klinikailag releváns NSCLC alcsoportokat azonosítsunk¹⁴⁴. Az agyi áttétek 2/3-ának immunprofilja igen hasonlóan bizonyult (korreláció: 0,74) az alábbi biomarkerek expressziója alapján: cyclin D1, cyclin D3, p16, p53, caspase-3, -8, -9, CD44v6, β -catenin, CD138 és kollagén XVII. Ez arra utalhat, hogy ezekben a daganatokban hasonló szabályozó útvonalak aktiválódnak, és hogy az a néhány primer NSCLC, amely szintén szerepel a klaszterben, már egy agresszív fenotípussal rendelkezik. A klaszteren belüli esetek közti legszorosabb korreláció (0,93) a cyclin D1, cyclin D3, p16, Ki-67 és kollagén XVII overexpresszióval volt

kapcsolatos. Ezen daganatok agresszív fenotípusát a klaszteren kívüli esetekhez képest szignifikánsabb rosszabb túlélés is alátámasztotta.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy NSCLC-ben (1) a β -catenin vesztés és delokalizáció a rossz prognózis egyváltozós előrejelzője; (2) a tumoros progresszióhoz különböző biomarker expressziós változások kapcsolódnak, így a kollagén XVII, CD44v6, caspase-9, cyclin D1 és cyclin D3 up-reguláció valamint a β -catenin és CAS down-reguláció, azonban legtöbbjüknek nincs prognosztikai értéke; és végül (3) komplex immunfenotipizálással és klaszter analízissel meghatározható a betegek egy alcsoportja, akiknél agresszív biológiai viselkedésű NSCLC igazolható és kedvezőtlen túlélés várható. Amennyiben eredményeinket nagyobb betegszámú vizsgálatok is megerősítik, úgy ezek hozzájárulhatnak azon betegek kiválasztásához, akik agyi áttétképződés szempontjából nagyrizikójúak, és akik profitálhatnak preventív célú agyi sugárterápiából.

A fent leírt vizsgálat során nem került sor az NSCLC tumorok szövettani altípusainak átfogó elemzésére, ezért a #7 vizsgálatban egyrészt ezt tűztük ki célul, másrészt korreláltatni kívántuk a protein expressziós eredményeket az agyi áttét körüli ödéma mértékével²⁶.

Amint azt korábban leírtuk, a primer tumorokban, többek között, az emelkedett CD44v6 és caspase-9 expresszió, valamint a csökkent CAS expresszió korrelált az NSCLC agyi metasztatikus potenciáljával. Jelen vizsgálatunkban elsőként mutattunk rá, hogy ez az összefüggés döntően az SCC-re jellemző. Afify és mtsai ugyancsak találtak pozitív összefüggést a CD44v6 expresszió és a tüdő ADC mérete és nyirokcsomó áttétei között²⁵⁸. Oesophagus SCC-ben emellett a CD44v6 expresszió korrelált a TNM stádiummal és a távoli metasztázis megjelenésével²⁵⁹.

A peritumoralis agyödéma pathomechanizmusának jobb megismerése elengedhetetlen egy eredményes terápiás stratégia kialakításához. Munkánk során SCC-ben a primer tüdőrák csökkent caspase-9, és az emelkedett β -catenin és E-cadherin expressziója szélesebb peritumorális agyödémával párosult. Az agyi áttét mintákban SCC-ben az alacsony CD44v6 expresszió mutatott ilyen irányú összefüggést, míg ADC-ben egyik IHC marker sem. Érdemes kiemelni, hogy SCC-ben azok az IHC markerek, amelyek korreláltak az agyi áttétképződéssel, negatív összefüggést mutattak a peritumorális agyödéma méretével. Ilyen marker volt például a CD44v6 és a caspase-9 expresszió.

Elsőként írtuk le, hogy agyi áttétet adó tüdő ADC-ben az emelkedett p16 és caspase-8 expresszió pozitív korrelációt mutat a dohányzással, SCC-ben pedig negatív az összefüggés a p27 expresszió és a dohányzás között. SCC-ben emellett – a nem-metasztatizáló csoportban – negatív korreláció volt detektálható a caspase-3 expresszió és a dohányzás között, ami összhangban áll Chen és mtsai eredményével, akik sejtvonalakkal végzett kutatásaik során kimutatták, hogy a cigarettafüst csökkenti a caspase-3 aktivitást, aminek következtében tüdőrák sejtnövekedés és sejtgyarapodás jön létre²⁶⁰.

Az általunk vizsgált szöveti biomarkerek expressziójának nemek közti különbségéről alig található adat. Munkánk során ADC-ben a csökkent cyclin D1 korrelált a női nemmel, de csak a nem-metasztatizáló betegcsoportban.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy eredményeink rávilágítanak az NSCLC alcsoportonkénti vizsgálatának szükségességére. A detektált molekuláris eltérések információkkal szolgálnak az agyi áttét rizikójának protein expressziós hátteréről, valamint a metasztatizálás folyamata során bekövetkezett immunfenotípus változásról tüdőrákban. Az agyi áttét rizikójának meghatározása elősegítheti az egyénre szabott kivizsgálási és kezelési stratégiák kidolgozását. Példaként említhető a tüdő ADC-ben manapság már rutin kezelési módnak számító ALK-gátló terápia, amellyel kapcsolatban intenzíven vizsgálják, hogy az ALK-gátló tirozinkináz inhibitorok közül melyik legyen az elsővonalban alkalmazott szer. Ismert ugyanis, hogy az elsőgenerációs ALK-gátló crizotinib alacsonyabb vér-agy gát penetrációt mutat, mint a második generációs alectinib. Amennyiben az agyi áttétre nézve nagyrizikójú betegek kiválaszthatóvá válnak, úgy esetükben megfontolandó már elsővonalban alectinibet alkalmazni, szemben a crizotinib utáni szekvenciális alectinib terápiával. Ily módon egyes prognosztikai faktorok idővel prediktív faktorrá válhatnak.

A tüdőrák molekuláris célzott terápiája kapcsán egyre több figyelem fordul más szervek daganatainak hasonló módon történő kezelésére is. Számos szolid daganat terápiájában az mTOR gátlók alkalmazása mára a hétköznapi rutin részévé vált, legfőképpen veserákban²⁶¹. Tekintettel arra, hogy mTOR expressziót korábban már leírtak tüdőrákban²⁶², a #8 tanulmányunkban érdemesnek tartottuk feltérképezni az mTORC1 és C2 aktivitást egy új IHC panel alkalmazásával primer tüdőrákokban és agyi áttétekben⁵⁶. Az IHC panel p-mTOR, p-S6 és Rictor ellenes antitestekből állt. A p-mTOR és a p-S6 expresszió korrelált az mTORC1 aktivitással, míg a p-mTOR és a Rictor expresszió korrelált

az mTORC2 aktivitással. A klinikopatológiai paraméterektől függetlenül, a primer tüdő ADC-k ~30%-a, továbbá az agyi áttét ADC-k ~70%-a fokozott mTORC1 aktivitást mutatott. Ezek az eredmények összhangban állnak azokkal a korábbi publikációkkal, amelyek az mTOR útvonal hiperaktivitását igazolták tüdőrákban²⁶³⁻²⁶⁶. Dobashi és mtsai az mTOR aktiváció nagyobb gyakoriságát írta le primer tüdő ADC-ben, mint normál tüdőszövetben²⁶⁵. Liu és mtsai szignifikánsan emelkedett mTOR/p-mTOR protein szintet találtak NSCLC-ben, a normál szövethez képest²⁶⁶. Emellett az mTOR jelátviteli út aktivációja összefüggést mutatott távoli áttét megjelenésével és rövidebb teljes túléléssel. További vizsgálatok más szervekben is az mutatták, hogy az mTOR tengely már a pre-metasztatikus stádiumban aktivált, de a metasztatikus terjedéssel az mTOR útvonal komponenseinek expressziója tovább növekszik^{267,268}. Tüdőrákok agyi áttéteiben Kato és mtsai a daganatok 31,4%-ában detektáltak mTOR expressziót²⁶⁹. Eredményeink összhangban vannak ezekkel a megállapításokkal, és arra utalnak, hogy az mTOR útvonal döntő szerepet játszik a tüdő ADC-k agyba történő áttétképzésében. Cheng és mtsai 1070 tüdőrák vizsgálata során 8%-os RICTOR amplifikációs gyakoriságot detektáltak. A 85 pozitív eset 11%-ában a RICTOR amplifikáció volt az egyetlen támadható molekuláris célpont²⁷⁰.

A Rictor az áttétképződésben kulcsszerepet játszik. Emlőrákban összefüggést találtak fokozott expressziója és nyirokcsomó áttétek megjelenése között²⁷¹. Vizsgálatunk során fokozott Rictor expressziót detektáltunk a 15 *primer tumor–agyai áttét* mintapár 2/3-ában. Ezenkívül a fokozott Rictor expresszió a primer ADC-k előrehaladottabb stádiumával társult. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy tüdő ADC-ben a megnövekedett Rictor expresszió prognosztikai jelentőségű lehet.

Kwasnicki és mtsai vizsgálatában az mTOR, a Raptor és a Rictor együttes expressziója különböző primer daganatok 47%-ában jelentkezett. 101 olyan tüdőrákból, amely metasztázisokat adott az agyba, 53 mintában észleltek pozitivitást²⁶⁸. Saját vizsgálatunkban mi is magas mTORC1 és C2 aktivitást találtunk a 15 ADC daganatpár 33%-ában. A magas mTORC2 aktivitás a primer ADC-k 16%-ában és az agyi áttétek 51%-ában felveti a kettős mTORC1/2 inhibitorok alkalmazásának létjogosultságát szelektált esetekben.

A kezdeti ígéretes eredmények után tüdőrákban az mTORC1 gátlók mono- vagy kombinációs terápiaként való alkalmazásakor a klinikai vizsgálatok csak szerény eredményeket hoztak²⁷²⁻²⁷⁴. Az elégtelen terápiás válasz hátterében részben a nem megfelelő betegszelekció, részben az mTORC1 gátlás általi aktivált negatív feedback állhatott^{273,275}. Ahhoz, hogy a PI3K/AKT/mTOR útvonal gátlása eredményesebb lehessen, szükséges az aktív mTORC1/C2 arány pontosabb meghatározása, és egy ezen alapuló terápiás stratégia kidolgozása²⁷⁵. A p-S6 és a p-mTOR overexpresszió (ami a fokozott mTORC1 aktivitás jele) mTORC1 gátló terápiákra vonatkozó prediktív értékét már számos daganattípusban leírták²⁷⁶⁻²⁷⁸, ugyanakkor NSCLC-ben kevésbé tanulmányozták. A jelen vizsgálatban leírt IHC panel és a segítségével meghatározott mTORC1 aktivitás profil elősegítheti azon betegek pontosabb kiválasztását, akik nagyobb valószínűséggel reagálnak majd az mTOR gátló kezelésre.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a kimutatott magas mTORC1 és C2 aktivitás az mTOR útvonalának gátlási lehetőségére hívja fel a figyelmet magas mTOR aktivitással bíró primer tüdő ADC-kben és tüdő ADC-k agyi metasztatáisaiban. Az mTOR gátlókkal, betegszelekció nélkül végzett korábbi vizsgálatok csak korlátozott klinikai előnyt igazoltak tüdőrákban, ezzel szemben az mTORC1 és C2 aktivitás alapján végzett betegszelekció vélhetően eredményesebb célzott terápia alkalmazását teszi lehetővé.

Tüdőrákban a metasztatizálás egyes lépéseit, valamint a tumor heterogenitásnak a daganatos progresszióban betöltött szerepét igen intenzíven vizsgálják. Munkacsoportunk egyik kutatócsoportja nemzetközi kollaboráció keretében 2019-ben arra kereste a választ, hogy több tumor-régió RNS vizsgálatával és teljes exom szekvenálással hogyan vizsgálható az intratumor heterogenitás¹⁰. Az eredmények arra utalnak, hogy a kromoszóma-instabilitás egy igen fontos kiváltója az intratumor heterogenitásnak. Mindemellett sikerült azonosítani olyan – prognosztikai jelentőségű – géneket, amelyek egy adott daganatban homogénen expresszálódtak, és amelyek a daganatevolúció korai szakában, klonális kópiaszám nyereség által aktiválódva daganatsejt proliferációt indukáltak. „*Klonális transzkriptom biomarker*” elemzéssel tehát a klinikai gyakorlatban az eddigieknél még eredményesebben felhasználható prognosztikai faktorokat fogunk tudni azonosítani, amelyek elősegítik a személyre szabott terápiát.

Tüdőrákban a távoli szervi metasztázis diagnosztizálása szisztémás onkoterápia bevezetését teszi szükségessé, mindemellett igen gyakran már a távoli áttét megjelenése előtt kapnak a betegek platinabázisú kemoterápiát vagy adjuváns céllal, vagy pedig inoperabilitás miatt. A #9 vizsgálat során mérni és demonstrálni tudtuk a cisplatin kezelésnek egy EGFR exon 19 deléció pozitív tüdő ADC-re gyakorolt mutagén hatását, és ezen információ felhasználásával, továbbá a primer tumor és a különböző szervi metasztázisok genomszekvenciáinak részletes elemzésével meg tudtuk alkotni a daganatevolúció modelljét⁶³.

A citotoxikus kemoterápiák indukálta mutációk aggodalomra adhatnak okot, mivel felgyorsíthatják a daganatsejtekben a rezisztencia kialakulását, az egészséges szövetekben pedig carcinogenesiszt indíthatnak be. Munkacsoportunk egyik kutatócsoportja korábban már publikálta ilyen irányú vizsgálatának eredményeit²⁷⁹. Jelen munkánkban a cisplatin tumorsejtekre gyakorolt mutagenitálásának megállapításához olyan kései metasztázist választottunk, melyben a cisplatin által okozott mutációk klonálisak. A máj- és nyirokcsomó mintákban közös 476 SNV 8%-a volt cisplatin-mintázatú. Ezek a mutációk klonálisak voltak a májáttétben, ami azt sugallja, hogy a cisplatin gigabázisonként legalább 13 SNV-t indukált a májáttét egyetlen őssejtjében. Ez a becsült érték alacsonyabb, mint a sejtvonalak vizsgálatakor megfigyelt, ami a szer tumorsejtekbe való bejutásának korlátozottságára utal. Dohányosok és sosem dohányzottak ADC-jének genomja 12 100, illetve 2600 mutációt tartalmaz gigabázisonként²⁸⁰, azonban ezek a mutációk évtizedek során halmozódnak fel. A cisplatin kezelés ciklusainak ismétlése vélhetően emeli a mutációs arányt, és hozzájárul a szerrel szembeni rezisztencia kialakulásához.

A dohányzás ugyancsak nagyszámú, főként CC>AA DNV-t (dinucleotide variation) okoz, azonban a jelen vizsgálatban el tudtuk különíteni a dohányzás TCGA elemzésen alapuló DNV spektrumát a nemdohányos betegünkben észlelt, cisplatin-indukálta DNV-ktől. Így tehát a cisplatin-indukálta klonális DNV-k azonosítása egy áttéti tumormintában megteremti a lehetőséget annak igazolására, hogy az adott áttét a beteg cisplatin kezelését követően alakult ki.

A vizsgált ADC esetben a májmetasztázis későn jelent meg, és adataink azt erősítik, hogy egyetlen sejtből, vagy sejtklónból fejlődött ki. Ezzel ellentétben, a csont- és a nyirokcsomóáttétek cisplatin-mutációinak szubklonalitása arra utal, hogy ezen

metasztatikus folyamatok már a kemoterápiás kezelés előtt megkezdődtek, még abban az esetben is, ha ezek közül a nyirokcsomó áttétek klinikailag akkor még nem is voltak detektálhatók^{281,282}. Hasonló eredményről colon carcinomában is beszámoltak²⁸³. Két különböző metasztázis hely ugyanazon mutációinak klonális státusza azt sugallja, hogy ez a szubklonalitás inkább az anatómiai lokalizációból és a metasztatizálási útvonalból adódik, semmint a két sejtpopuláció közti interakcióból²⁸⁴.

Az EGFR amplifikáció agresszívabb biológiai viselkedésű tumorral párosul és gyakran a betegség előrehaladott stádiumában következik be²⁸⁵. Az, hogy az extrém mértékű EGFR amplifikáció kizárólag a kiújult primer tumorban volt igazolható, támogatja azt a feltételezést, hogy ez valóban a betegség késői fázisában jelentkezett, és ezt erősíti az EGFR gén előtti amplifikációs töréspontok szubklonalitása is. A gefitinib terápiaáról afatinibre való váltás a nyirokcsomó- és csontmetasztázisok kialakulását követően történt, így felmerül annak a lehetősége, hogy az EGFR amplifikáció egy válaszreakció volt annak érdekében, hogy a tumor – ami akkor már amúgy is hordozta a T790M rezisztencia mutációt – fokozza az afatinibbel szembeni rezisztenciát. Az EGFR gén amplifikációja kromoszóma-transzlokációkon keresztül történt, és a kiújult primer tumorban és a májáttétben egyéb, késői stádiumra utaló génszerkezeti variációkat is azonosítottunk.

A nyirokcsomóban számos májspecifikus, klonális transzlokáció – mint szubklonális esemény – volt azonosítható, ami azt a következtetést erősíti, hogy a májáttét a betegség végső stádiumában, az afatinib kezelésre való váltást követően alakult ki.

Nagy lefedettségű (high-coverage) WGS (teljes genom szekvenálás) minták elemzésén alapuló klonális tumor evolúció detektálás már leírásra került²⁸⁶, és beszámoltak különböző stratégiákról a WGS adatokból származó klonális fejlődés elemzésére^{287,288}.

A tumorok klonális összetételének elemzése azt mutatta, hogy a szubklónok hozzájárulhatnak az áttétképződéshez és terápia rezisztenciát indukálhatnak^{289,290}. A szubklonális események megértésének fontosságát a személyre szabott terápiában jól példázza egy glioblastoma eset evolúciós tanulmánya is²⁹¹.

Az onkoterápiák ugyancsak indukálhatnak szubklonális változásokat, azonban ezidáig csak nagyon kevés WGS tanulmány tűzte ki céljául ennek vizsgálatát. Az aromatáz inhibitorok klonális architektúrára gyakorolt hatását WGS analízissel mutatták ki ösztrogénreceptor-pozitív emlődaganganatokban, tumoros és normál szövet mintapárok neoadjuváns

hormonterápia előtti és utáni vizsgálatával²⁹². Krónikus limfocitás leukémiában keringő tumor DNS-ből azonosították a kezelés utáni terápia rezisztenciát és a klonális előnyt²⁹³.

Bemutatott esetünk kapcsán elsőként közöltük, hogy metasztatikus tumorminták szubklonális eseményeinek analízise felhasználható az áttétképződés időbeliségének retrospektív elemzésére, még standard lefedettségű WGS adatok felhasználásával is, hozzájárulva ezzel az oligometasztatikus betegségek kialakulásának és a kemoterápiás kezelések okozta genetikai változásoknak a jobb megértéséhez.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy bemutattuk a genomika alkalmazását a metasztatikus daganatok progressziójának feltérképezésére, főként a cisplatin terápia mutagén hatásából származó információk felhasználásával. Az irodalomban közölt vizsgálatokhoz hasonlóan, a klonalitásra vonatkozó következtetések levonását a tumoros szövetminták mérete korlátozta. Mindazonáltal a kapott információkat felhasználtuk arra, hogy megmutassuk, a korai és késői metasztázisok ugyanazon proximális nyirokcsomón átjutva tudtak kifejlődni, és a különböző áttéti helyeken lévő, egymástól független, késői EGFR amplifikációs események hozzájárultak ezen tüdő ADC folyamatos progressziójához. Az ilyen – az alkalmazott onkoterápia időbeliségére és az áttétképződésre vonatkozó – tumortípus-specifikus vizsgálatok igen értékes adatokkal szolgálhatnak majd terápiás algoritmusok kialakításához.

8.3. Tüdőrákok prediktív faktorainak vizsgálata

8.3.1. EGFR-TKI kezelés [10-17]

2004 májusában a tüdőrák terápiájában robbanásszerű paradigmaváltás következett be, miután bejelentésre került, hogy a daganatszövetből kimutatott EGFR mutáció előrevetíti az EGFR-TKI terápiás hatékonyságát^{73,74}. Néhány hónappal később megtörtént hazánkban az első EGFR mutáció analízis, aminek pozitív eredménye jól korrelált a látványos javulással; a beteg tartós tünet-, panasz- és tumormentességével, és az igen hosszú teljes túléléssel. Ezt az esetet a #10 közleményünkben publikáltuk⁷⁵.

Az esetismertetés kapcsán érdemes kihangsúlyozni, hogy a daganat nemcsak EGFR szenzitizáló mutációt (EGFR exon 19 deléción), hanem EGFR génamplifikációt is hordozott, így vélhetően ez a szimultán, kettős genetikai károsodás is felelős lehetett a komplett és tartós remisszióért. NSCLC-ben az EGFR génamplifikáció gyakoriságát 9%-ra teszik²⁹⁴.

Az EGFR génamplifikáció megléte korrelál az EGFR protein expresszióval, és ami a prognosztikai faktor jellegét illeti, megléte esetén rendszerint egy rövidebb túlélésre vonatkozó trend figyelhető meg²⁹⁴.

Betegünknel a tumorszövetből EGFR protein meghatározás is történt, ami jól demonstrálta a tüdőrákokra jellemző tumor heterogenitást, mivel egyetlen látótéren belül is megfigyelhattunk EGFR IHC pozitív és negatív területeket.

Tekintettel arra, hogy az EGFR mutáció, amplifikáció és protein expresszió egyidejű fennállására vonatkozóan a 2000-es évek közepén csak minimális adat állt rendelkezésre, a #11 tanulmányban ennek elemzését tűztük ki célul hazai betegek operált ADC szövetmintáinak felhasználásával⁷⁶.

Tanulmányunk bizonyítja, hogy a különböző EGFR diagnosztikai módszerrel (szekvenálás/FISH/IHC) pozitív tüdő ADC-k csak részben fedik át egymást. Rendkívül fontos kihangsúlyozni, hogy az EGFR protein expressziót nem mutató daganatok is hordozhatnak EGFR szenzitizáló mutációt, és így kiváló terápiás válasz érhető el EGFR-TKI kezeléssel. Ugyancsak figyelmet érdemlő, hogy az EGFR mutáns daganatban szenvedők 100%-ában (14 betegből 14-ben) terápiás választ figyeltünk meg erlotinibre, ami arány messze magasabb volt, mint az erlotinib BR21 törzskönyvezési vizsgálatában. Abban a vizsgálatban ugyanis Tsao és mtsai 8 betegből csak 2-nél tapasztaltak terápiás választ (25%), ráadásul a szelekció nélküli, teljes vizsgálati populációban ez az arány mindössze 9% volt¹³⁴.

Abban az időben nem voltak standardizált módszerek az EGFR IHC és EGFR FISH vizsgálatra vonatkozóan, így az egyes közlemények eredményeinek összehasonlítása nemritkán korlátokba ütközött. Nem volt továbbá a klinikai gyakorlatban alkalmazható konszenzus a legjobb prediktív értékkel bíró módszer megállapítására és alkalmazására. Az EGFR FISH vizsgálat kétségtelenül megbízhatóbb módszernek tűnt az IHC-nál az EGFR-TKI predikcióra, azonban annál lényegesen drágább és nehezebben kivitelezhető volt. Saját vizsgálatunkban az EGFR FISH-t illetően több olyan metodikai változtatást is alkalmaztunk, amelyek eredményeképpen 82%-os vizsgálati sikerarányt tudtunk elérni, az EGFR IHC-k sikeraránya pedig 99% volt.

2008-ban még hipotetikusnak számított az a gondolat, hogy az EGFR aktiváló mutációja még akkor is fokozza a receptor aktivitást, ha hiányzik az EGFR protein overexpresszió.

Ennek bizonyítása érdekében 10 olyan EGFR mutáns beteg klinikai adatait elemeztük, akik gefitinib vagy erlotinib kezelésben részesültek. Közülük 5 betegnél komplett, 5-nél pedig parciális remisszió volt megfigyelhető, függetlenül az IHC pozitivitástól. Mindemellett, retrospektíve elemeztük a tumormintáját 9 olyan betegnek, akik kivételesen jó terápiás választ mutattak. Egy kivételével valamennyiük daganata EGFR mutációt hordozott. A mutáció pozitív tumorminták közül 7 EGFR IHC negatív volt, ebből 5 teljesen negatív, 2 pedig nem érte el a pozitívítás akkori, 10%-os kritériumát. Korábbi vizsgálatokban már közöltek eredményeket az EGFR mutáció és az EGFR IHC közti korreláció hiányáról¹³², továbbá arról, hogy gefitinib kezelésben részesülő betegeknél megfigyeltek EGFR mutációt egyidejű EGFR IHC negativitás mellett¹³⁵. Jelen közleményünk volt azonban az első, amely ezt a jelenséget mind gefitinib, mind pedig erlotinib alkalmazása esetén leírta. Kezdetben, világviszonylatban, az EGFR mutáció klinikai jelentőségének megítélését és statisztikai elemzését hátráltatta az alacsony esetszám. Még az erlotinib törzskönyvezési – BR21 – vizsgálatában is csak nyolc olyan beteg volt, akiknek daganata klasszikus EGFR mutációt (exon 19 deléción és exon 21 L858R) hordozott. Közülük mindössze egyetlen betegnél volt komplett-, és egynél parciális remisszió igazolható, ami messze elmaradt az egyéb publikációkban közölt 65-100%-os terápiás válaszarányoktól EGFR mutáns daganatokban, EGFR-TKI kezelés mellett²⁹⁵⁻²⁹⁹. Jelen munkánkban 18 EGFR mutáció pozitív beteg EGFR-TKI kezeléséről (14 erlotinib, 4 gefitinib) tudunk beszámolni. Betegeinknél 100%-os parciális-, vagy komplett remissziós terápiás válaszarányt figyelhettünk meg. Az eredményeket a BR21 vizsgálat eredményeivel összevetve, a jelentős különbség hátterében vélhetően metodikai és labortechnikai kérdések is álltak. 2008 márciusában, a #11 vizsgálatunk eredményeinek publikálásakor még nem volt eldöntött, hogy az EGFR kimutatás mely módszere a legalkalmasabb a betegszelekcióra EGFR-TKI kezelésnél, azonban már ekkor hangsúlyoztuk, hogy önmagában az IHC nem megfelelő, hanem molekuláris diagnosztikai módszerek, elsősorban DNS szekvencia analízis kell, hogy része legyen az EGFR státusz meghatározásnak. Felhívtuk emellett a figyelmet arra is, hogy amennyiben a daganat hordozza az EGFR mutációt, akkor a terápiás hatékonyság független a beteg dohányzási státuszától, tehát önmagában a pozitív dohányzási anamnézis még nem ok arra, hogy ne történjen meg az EGFR mutáció analízis.

Munkánk abból a szempontból is úttörő jellegű volt, hogy elsőként közöltünk Közép-Európából EGFR mutáció gyakoriságra és terápiás válaszarányra vonatkozó átfogó eredményeket.

2015-re már evidenciává vált, hogy a klasszikus EGFR mutációk pozitív prediktív faktorai az EGFR-TKI kezeléseknek. Számtalan publikáció látott napvilágot, több tízezer beteg kórtörténetét elemezték. Kevés volt ugyanakkor a ritka EGFR mutációk epidemiológiájára és prediktív értékére vonatkozó adat, ezért a #12 vizsgálatban ez volt a fő célkitűzésünk⁸⁰.

A ritka EGFR mutációk gyakoriságát nemcsak etnikai hovatartozás befolyásolja, hanem környezeti tényezők és dohányzás is³⁰⁰. Mindezek miatt fontosnak tartottuk a klasszikus és ritka EGFR mutációkra vonatkozó hazai eredményeket összevetni a nemzetközi adatokkal.

A klasszikus EGFR mutációk aránya 5% volt, ami igen hasonlított egy abban az időben megjelent német publikáció 6%-os eredményéhez³⁰¹. A ritka mutációk gyakoriságát 6%-nak találtuk, ami magasabb volt, mint amit hasonló kaukázusi vizsgálatokban leírtak (1,9-2,7%)^{301,302}, vagy mint amit kevert amerikai populációban észleltek (4%)³⁰³, ugyanakkor közel volt a kelet-ázsiai eredményekhez (7-8%)^{147,304,305}. Ennek hátterében állhat az a tény, hogy a minták 76%-ában a 20-as exon is szekvenálásra került, továbbá, hogy a KRAS mutáns daganatok 40%-ában (n=584) megtörtént az EGFR analízis. Hét betegnél ugyanis a KRAS mutáció mellett egyidejű ritka EGFR mutáció is igazolódott, ami 1,2%-os gyakoriságot jelent, és ez összhangban áll korábban publikált adatokkal^{306,307}. Abban az időben nem végeztünk exon 20 T790M vizsgálatot, főként azért, mert EGFR-TKI terápia előtt ennek gyakoriságát 0-0,9%-ra tették^{308,309}.

A ritka mutációk és a nem között nem találtunk szignifikáns összefüggést, hasonlóan francia kutatók eredményeihez³¹⁰. Hasonlóképpen nem volt korreláció a ritka mutáció és az életkor között, ami megegyezett amerikai és ázsiai vizsgálatok eredményeivel^{147,303}. Kiemelendő azonban, hogy a mi vizsgálatunk volt az első, amely ezt az összefüggést kaukázusi betegekben tanulmányozta. A klasszikus EGFR mutáció pozitív daganatban szenvedők idősebbek voltak a ritka mutációsokhoz képest (átlagéletkor 67±9,6 év vs. 64,2±9,2 év), valamint a KRAS mutánsokhoz képest is (60±10,4 év). Hasonló trendet más kutatók is megfigyeltek³⁰¹.

Kohorszunkban – a klasszikus EGFR mutációkkal ellentétben – a ritka mutációk dohányzás-asszociáltak voltak. Hasonló összefüggést figyeltek meg Pallis és mtsai, akik a ritka mutációknak 20,8%-ában, míg a klasszikus mutációknak csak 8%-ában találtak dohányos betegeket. Ezzel ellentétben, ázsiai betegpopulációkban a ritka mutációk is gyakoribbak a sosem dohányzottakban^{147,304}.

Ritka EGFR mutációkra vonatkozóan elsőként közöltünk adatokat kaukázusi betegek elsőgenerációs EGFR-TKI kezelésének terápiás hatékonyságáról is. Klasszikus mutáció esetén a terápiás válaszarány 71%, míg ritka mutációnál 37% volt. Ezek az arányok összhangban voltak kelet-ázsiai publikációkban leírtakkal (74-75% vs. 28-48%)^{147,304}.

A ritka EGFR mutációjú betegek PFS-e 6,2 hónapnak bizonyult, ami összevethető egy 2011-ben közölt ázsiai tanulmány 5 hónapos eredményével¹⁴⁷. A medián OS-t illetően, a klasszikus EGFR mutáció szignifikánsan kedvezőbb teljes túléléssel járt, mint a ritka mutáció (20,5 hónap vs. 7,4 hónap). A klasszikus mutációknál megfigyelt OS összhangban áll más munkacsoportok eredményeivel (19,3–20 hónap), azonban a ritka mutációk esetében ez elmarad más vizsgálatok eredményeitől^{147,302,304}, vélhetően a ritka EGFR mutációk altípusát illető különbségek miatt.

A teljes túlélésre vonatkozó multivariációs analízisben a standard prognosztikai paraméterek közül mindössze az ECOG PS 0 státusz bizonyult a hosszabb OS független prognosztikai faktorának. Emellett a klasszikus EGFR mutáció is szignifikáns pozitív összefüggést mutatott az OS-sel, összhangban Johnson és mtsai eredményével³¹¹. A legtöbb korábbi publikációhoz hasonlóan, mi sem tudtuk igazolni a KRAS mutáció prognosztikai hatását³¹².

Tanulmányunk korlátai közt megemlítendő annak retrospektív jellege, továbbá az, hogy annak ellenére, hogy a kezdeti betegpopuláció létszáma nagy volt (n=814), végül a vártnak megfelelően, a klasszikus vagy a ritka EGFR mutációt hordozó daganatok száma viszonylag alacsony volt. Ennek ellenére kohorszunk abban az időben az egyik legnagyobbak számított, így lehetőséget biztosított bizonyos következtetések levonására, amelyeket nyilvánvalóan további, prospektív vizsgálatokban kell majd validálni. További tisztázandó kérdés, hogy a klasszikus EGFR mutáció jelenti-e önmagában a daganat kedvezőbb biológiai viselkedését, vagy az EGFR-TKI-ra adott terápiás válasz magasabb aránya és így a következményesen hosszabb medián PFS

biztosít-e jobb prognózist. Egy fontos potenciális zavaró tényező lehet a dohányzási státusz, mivel már számos vizsgálat igazolta a nemdohányosok kedvezőbb túlélését^{313,314}. Ebben a vizsgálatban mi magunk is megfigyeltünk szignifikáns túlélési előnyt a nemdohányosokban. Fontos azonban megemlíteni, hogy a klasszikus EGFR mutációk szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a nemdohányosok körében, mint a ritka EGFR mutációk, így elképzelhető, hogy a kedvezőbb OS-ben szerepet játszott a jobb performansz státusz és a dohányzás okozta társbetegségek hiánya is³¹³⁻³¹⁶.

A detektált 49 ritka mutáció közül 20-at munkacsoportunk írt le. Domingues és mtsai, valamint Elghissassi és mtsai publikációink kapcsán felvetették annak lehetőségét, hogy archivált FFPE szövetblokkok alkalmazása miatt artefaktumok keletkeztek a PCR során, amit ritka mutációnak értékeltünk^{317,318}. Ezen 20 mutáció közül 3 mikrodéláció volt, 5 pedig pontmutáció, azonban nem C>T vagy G>A szekvencia változások, amelyek nemritkán mint formalin-indukálta műtermékek jelennek meg. Kiemelendő továbbá, hogy a ritka mutáció pozitív betegek közül öten kedvezően reagáltak EGFR-TKI kezelésre, és esetükben túlélési előny mutatkozott, ami vélhetően nem fordult volna elő, ha nincs jelen szenzitizáló mutáció.

Összegzőképpen elmondható, hogy retrospektív vizsgálatunkban – a klasszikus EGFR mutációkkal összevetve – a ritka EGFR mutációk nem mutattak összefüggést a nemdohányos státusszal, az idősebb életkorral és az EGFR-TKI kezelésre adott kedvezőbb terápiás válasszal. A csak klasszikus EGFR mutációkat célzó vizsgálatok alkalmazásával elveszíthetünk EGFR ritka mutációs olyan betegeket, akik profitálhatnak az EGFR-TKI kezelésből. Éppen ezért rendkívül fontos átfogó, nemzetközi együttműködés keretében vizsgálni a ritka EGFR mutációk prognosztikai és prediktív értékét, különös tekintettel a ritka mutációk molekuláris altípusaira.

Az EGFR-t célzó terápiák két fő támadáspontja a transzmembrán tirozinkináz, valamint az extracelluláris antigén. Az utóbbi esetében az EGFR protein expresszió IHC-vel történő kimutatása szolgálhat prediktív markerként³¹⁹. Számos technikai kérdés merült fel azonban az EGFR IHC-vel kapcsolatban, annál is inkább, mert pl. colorectalis carcinomában szenvedő olyan betegek is reagáltak EGFR-ellenes antitest terápiára, akiknek daganata IHC negatívnak bizonyult³²⁰. A #13 vizsgálatunkban éppen ezért különféle metodikai módosításokat alkalmaztunk, beleértve a primer antitest inkubálási

idejének megnyújtását, valamint a javasolt proteáz emésztés helyett mikrohullámú sütőben történő antigén feltárást⁷⁷. Eredményeink egyik fő üzenete az volt, hogy hiába FDA-elfogadott az EGFR pharmDxTM kit – ami ráadásul 2006-ban az egyetlen ilyen EGFR IHC teszt volt – még akkor is előfordulhat, hogy negatívnak minősítünk olyan tumormintát, amely az általunk alkalmazott módszerrel egyértelműen pozitívnak lenne tartható, és ily módon a beteg – egy nem megfelelő szelekciós módszer miatt – eleshet egy terápiás hatékonysággal kecsegtető EGFR-ellenes antitest kezeléstől.

Eredményeink másrészt ráirányítják a figyelmet a metodikai részletek jelentőségére, továbbá arra, hogy ezek leírása számos publikáció esetében nem történt meg^{321,322}, pedig ez nagyban elősegíthette volna a klinikai gyógyszervizsgálatok eredményeinek pontosabb összehasonlítását.

Az EGFR protein expresszió kiértékelésének minőségét jelentősen megnövelte, amikor bevezették az immunpozitív sejtek százalékos arányának és az immunfestődés intenzitásának szorzatából képezett H-score-t (Hirsch score, 0-300)³²³. Ugyanakkor az EGFR protein expresszió önmagában még nem utal a fehérje aktivitására.

A #14 vizsgálatunkban rámutattunk arra, hogy Y1173 antitest alkalmazásával az aktivált pEGFR detektálható mind a lepidikus terjedést mutató (LAC), mind pedig a nem mutató (NLAC) ADC-kben⁸⁵. Eredményünk a RAS-MAPK jelátviteli út EGFR általi szabályozására utal, és összhangban áll korábbi közlemények eredményeivel³²⁴⁻³²⁸.

Jelen vizsgálatunkban új adatként közöltük, hogy az EGFR aktivitása függ az ADC-ben szenvedők dohányzási státuszától, és ez a megfigyelés megerősíti azt az állítást, hogy a MAPK aktivitása alacsonyabb a dohányos ADC-s betegek esetében³²⁹.

Korábbi tanulmányok javasolták NSCLC-ben az EGFR aktivitás meghatározását lefelé irányuló (downstream) jelátviteli célpontok, például a pAKT vagy a pERK alkalmazásával^{324,330}. Úgy véljük, hogy az AKT vagy az ERK – bár valódi célpontjai az aktív EGFR-nek – számos egyéb downstream útvonal célpontjai is, így nem kellően pontos és csak közvetett információt nyújtanak az EGFR tényleges aktivitásáról. Ezt támasztja alá az is, hogy a pAKT és a pERK klinikopatológiai alkalmazására vonatkozó eredmények ellentmondásosak^{324,330}.

Munkánk során elsőként mutattuk be, hogy az EGFR és a KRAS mutáns tüdő ADC-k hasonló szinten expresszálják az EGFR proteint, de különböző a pEGFR pozitív tumorok

előfordulási gyakorisága. NLAC-ban a KRAS mutáns tumorok pEGFR negatívak, ellentétben az EGFR mutáns vagy EGFR wt daganatokkal. LAC-ban változik a kép, mivel mind a KRAS mutáns, mind pedig az EGFR mutáns daganatok fokozott gyakorisággal expresszálják a pEGFR-t. Érdeemes kihangsúlyozni, hogy az EGFR mutáns tumorokban a pEGFR IHC pozitív tumorok aránya 30-40%, ami arra utal, hogy egyéb molekuláris útvonalak is interferálhatnak az EGFR jelzéssel. A LAC az ADC-n belül egy külön entitás, amit a jobb prognózis, a gyakoribb EGFR mutáció és következésképpen az EGFR-TKI-ra való nagyobb szenzitivitás jellemez^{133,212,330-332}. Ugyanakkor egyes adatok azt mutatják, hogy ebben a szövettani alcsoportban – különösen a nem-mucinózus altípusban – gyakoribb az EGFR amplifikáció és az AKT aktivitás is^{133,333}. Munkánk során kimutattuk, hogy LAC-ban az EGFR autofoszforilációs aktivitása nemcsak az EGFR, hanem a KRAS mutációs státuszától is függ, és paradox EGFR jelátvitelre utal. Az EGFR jelátvitel mutáns RAS-RAF útvonal általi paradox feedback aktivációját colorectalis carcinomában is ismertették³³⁴⁻³³⁶. Adataink arra utalnak, hogy egy ilyen paradoxon jelátviteli mechanizmus tüdő ADC-ben is aktív lehet.

A fenti eredmények alapján elmondható, hogy vizsgálatunk újabb bizonyítékát adta annak, hogy a tüdő ADC egy heterogén szövettani csoport, ráadásul még a lepidikus ADC sem tekinthető homogén szövettani altípusnak.

A tüdőrák molekuláris analízise során az EGFR mellett a KRAS státusz meghatározással kapcsolatban gyűlt össze a legtöbb tapasztalat a 2010-es évek közepére. Különösen igaz ez hazánkra, ahol rutinszerűen tesztelték a KRAS pozitivitást, mint az EGFR-TKI kezelés negatív prediktív faktorát. Bár világviszonylatban is több tanulmány foglalkozott a KRAS mutáció prognosztikai és – kemoterápiára vonatkozó – prediktív értékével, a legtöbb esetben etnikum, szövetten, tumor stádium és onkoterápia szempontjából heterogén populációkat vizsgáltak³¹². A #15 tanulmányunk során éppen ezért kizárólag kaukázusi, III-IV stádiumú ADC-ben szenvedő, olyan betegeket vizsgáltunk, akik platinabázisú kemoterápiában részesültek⁹⁸.

A detektált 32,1%-os KRAS mutációs arány összhangban állt a nagy NSCLC tanulmányok ADC-re vonatkoztatott eredményeivel^{337,338}. Emellett hasonlóak voltak a kodon 12 és 13 mutációs arányok is (92,8% és 7,2%)³³⁸. Ahhoz, hogy meghatározhassuk az aminosav-specifikus KRAS mutáció altípusokat, direkt szekvenálást alkalmaztunk. Kiemelendő, hogy

a főbb altípusok gyakorisága csaknem megegyezett a COSMIC adatbázisban leírtakkal [(G12C (42% vs. 38,6%), G12V (20% vs. 18,4%), G12D (15% vs. 17,1%) és G12A (7% vs. 5,1%)]¹⁴⁸. Nem találtunk különbséget a KRAS mutáns és KRAS wt daganatokban szenvedő betegek között, sem a platinabázisú kemoterápiára adott választ, sem pedig a teljes túlélést illetően. Ez a megfigyelés több vizsgálat eredményével is összhangban áll^{97,338}. Ezzel szemben, egy – közlésünk előtt nem sokkal megjelent, és négy randomizált vizsgálat eredményeit ötvöző – elemzés azt mutatta, hogy a KRAS kodon 13 mutáció vélhetően negatív prediktív faktora az adjuváns kemoterápiának korai stádiumban reszekált ADC-ben³³⁹. Jelen vizsgálatunkba előrehaladott stádiumú betegségben szenvedőket vontunk be, így ilyen irányú, direkt összehasonlítás nem volt lehetséges.

Fontos kihangsúlyozni, hogy a korábbi publikációkban nem szerepel KRAS altípus szerinti – kemoterápiát követő – PFS elemzés előrehaladott stádiumú ADC-ben^{100,340}. Villaruz és mtsai megfigyeltek egy trendet KRAS kodon 13 mutáció pozitív, korai stádiumú, 17 ADC beteg kedvezőbb túlélésével kapcsolatban³⁴¹.

Habár colorectalis carcinomában kimutatták, hogy a G12V transzverzió kedvezőtlen prognosztikai és kemoterápiára vonatkozó prediktív faktor³⁴², tüdőrákban korábban sem a PFS-t, sem pedig az OS-t illetően nem tudtak szignifikáns összefüggést igazolni a KRAS kodon 12 altípusaival^{100,339-341}. Ezen vizsgálatok vagy nem is elemezték a mutáció altípusok prediktív értékét, vagy nem találtak köztük összefüggést. Saját munkánkban a G12V mutáció pozitív ADC-kenél kedvező tendencia mutatkozott a kemoterápiára adott választ illetően, továbbá – ha nem is szignifikánsan, de – hosszabb volt a PFS, mint a többi mutáció altípusú daganatoknál. Ez egybecseng Garassino és mtsai in vitro vizsgálati eredményével, mely szerint ADC sejtvonalakban a különböző aminosav szubsztitúció különböző ciszplatin érzékenységgel társult³⁴³. Jó terápiás választ figyeltek meg a G12V transzverzió mellett, míg a tüdőrákban leggyakoribb G12C mellett volt a leggyengébb a terápiás effektus. Mindezek az eredmények elősegíthetik a személyre szabott citotoxikus terápia kidolgozását.

NSCLC-ben a KRAS 12-es kodont a cigarettafüst-indukálta mutagenézis preferált helyének tartják, ily módon a 12-es kodon mutációi gyakoribbak a dohányosok tüdőrákjában^{344,345}. Kohorszunkban a 12-es kodon mutáció szignifikánsan korrelált a dohányzással, ugyanakkor azt is láttuk, hogy a nemdohányosokban gyakrabban fordul elő G12V

transzverzió, mint más típusú KRAS kodon 12 mutáció. Ez a megfigyelésünk nem egyezik korábbi tanulmányok eredményével, ahol a G12D transzverzió volt a leggyakoribb a nemdohányosokban^{100,339,340,344,346}. Habár ennek az eltérésnek nem világos a magyarázata, háttérében etnikai különbözőség is állhat, mivel mi kizárólag kaukázusi betegeket vizsgáltunk, míg a többi tanulmány vegyes amerikai populációt^{100,339,344}, vagy kelet-ázsiai populációt^{340,346}. Mindennek ellenére eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy kaukázusi ADC betegeknél a kodon 12 mutációk nem mindegyik altípusa dohányzás-indukált. A dohányzási státusznak a hagyományos kemoterápiára vonatkozó prediktív értéke ellentmondásos. Több vizsgálat vagy nem talált prediktív értéket^{315,347}, vagy csak minimálisan hosszabb túlélést igazolt a kemoterápiával kezelt nemdohányosoknál, szemben a dohányzókkal^{348,349}. Kohorszunkban nem találtunk PFS vagy OS különbséget a dohányzás függvényében, ugyanakkor a G12V mutációs alcsoportban kedvezőbb volt a terápiás válasz és a PFS.

Tanulmányunk korlátai közt megemlíthető annak retrospektív jellege, illetve az a tény, hogy nem állt rendelkezésünkre kemoterápia nélküli kontroll csoport, így a KRAS mutáció altípusok prognosztikai és prediktív értékei között nem tudtunk különbséget tenni. Nem rendelkezünk továbbá pontos pack-year adatokkal a dohányzást illetően, ami alapján pontosabb összefüggést állapíthattunk volna meg a dohányzás mértéke és a KRAS mutációk altípusa között. Mindezek ellenére vizsgálatunk eredményei fontos részletekkel szolgálnak a tüdő ADC-ben detektálható KRAS mutációk altípusairól és klinikopatológiai jellemzőkkel való kapcsolatairól. Amennyiben lényegesen nagyobb betegcsoportok vizsgálata is megerősíti a fenti eredményeinket, úgy vélhetően a KRAS mutáció meghatározás már nemcsak mint az EGFR- és/vagy az ALK-gátlás szempontjából negatív prediktív faktor igazolása céljából fog megtörténni, hanem a pontos KRAS mutációs altípus szerepet kaphat a citotoxikus kemoterápia predikciójában is a személyre szabott onkoterápia érdekében.

Intenzív kutatások ellenére a KRAS mutációk prognosztikai és prediktív értékét, és így a klinikai alkalmazhatóságát, kevésbé sikerült körvonalazni^{337,350,351}. Emellett meglepően kevés átfogó adat állt rendelkezésre a KRAS mutációk tüdő ADC-k metasztázisainak szervspecifitására gyakorolt hatásáról³⁵². A #16 vizsgálatunkban a KRAS mutációk incidenciája és prognosztikai értéke mellett azok áttéti hely-specifitását is

vizsgáltuk 500 IV stádiumú tüdő ADC-ben⁶⁵. A KRAS mutáció aránya 28,6% volt, ami összhangban állt más kutatók eredményeivel^{337,338}. A multiplex áttétes betegeknél egy mérsékelt KRAS mutáció gyakoriság növekedést figyelhettük meg. Ilyen adat korábban nem volt tüdőrákban, de leírták a jelenséget colorectalis carcinomában³⁵³. Az áttéti helyeket illetően agyi-, csont- és mellékvese metasztázisok esetében hasonló KRAS mutáció gyakoriságot tapasztaltunk, ami összevethető Doebele és mtsai megfigyelésével³⁵². A csontáttétnél tapasztalt 28%-os KRAS mutáció gyakoriság hasonló, mint amit Confavreux és mtsai, valamint Bittner és mtsai közöltek^{354,355}. Mindemellett mi még azt is leírtuk, hogy pleurális- és máj érintettség esetén csökkent volt, míg intrapulmonális áttétnél gyakoribb volt a primer tumor KRAS mutáció pozitivitása. Colorectalis carcinomában megfigyeltekhez hasonlóan, mi is azt tapasztaltuk, hogy a KRAS mutáció fokozott tüdő-^{356,357} és csökkent májáttét-képző kapacitással párosult^{353,358}.

Más vizsgálókhoz hasonlóan, mi is azt találtuk, hogy a medián OS szignifikánsan csökkent a többszervi áttétben szenvedőknél³⁵⁹, ami felhívja a figyelmet az M stádium heterogenitására²¹¹. Legjobb tudomásunk szerint ez volt az első tanulmány, amely közvetlenül hasonlította össze a KRAS mutációk prognosztikai szerepét a tüdő ADC különböző metasztatikus helyén. Kiemelendő, hogy szignifikáns és klinikailag releváns OS csökkenést igazoltunk a csontáttétes ADC betegeknél, ami nem magyarázható pusztán a KRAS mutáns és KRAS wt betegek közti klinikopatológiai különbségekkel. További figyelemre méltó megfigyelés, hogy a csontáttétes KRAS wt betegeknél a KRAS mutáns esetekhez képest nagyobb gyakorisággal fordult elő többszervi metasztázis (84% vs. 46%, $p < 0,0001$).

A vizsgálat korlátaként említhető – annak retrospektív jellege mellett –, hogy az EGFR mutáció kizárásán túl egyéb onkogén driver mutációkat nem vizsgáltunk. Emellett – a rutin klinikai gyakorlatnak megfelelően – a betegek többségénél klinikai, és nem patológiai TNM állt csak a rendelkezésünkre. Ennek megfelelően nem tudtuk kizárni a tüneteket nem okozó távoli áttéteket, vagy a mikrometasztázisokat. Mindemellett, a ritkább áttéti helyeknél, főként pedig ott, ahol alacsony volt a KRAS mutációs arány – így pl. a májáttéteknél – nem volt elegendő statisztikai erő a KRAS mutáció teljes túlélésre gyakorolt hatásának megítéléséhez.

Mindezidáig kevésbé ismert a KRAS mutáció prognosztikai szerepe, és meglétének igazolása nem jár betegvezetési következményekkel, annak ellenére, hogy kaukázusi betegeknél tüdő ADC-ben ez a leggyakoribb onkogén mutáció. Vizsgálatunk éppen az ilyen kérdésekre kereste a választ, kihasználva azt a sajátságos helyzetet, hogy hazánkban a KRAS mutáció analízis a tüdő ADC-k molekuláris tesztelésének első lépése, így az átlagosnál messze több adat áll a rendelkezésünkre. Eredményünk elsőként igazolta tüdő ADC-k KRAS státuszának a metasztázisok helyével való összefüggését, és kimutatta a KRAS mutáció kedvezőtlen prognosztikai értékét csontáttétet adó tüdő ADC-ben. Mindezek alapján úgy véljük, hogy a KRAS státusz ismerete hatással lehet későbbi diagnosztikus stratégiák kialakítására és terápiás döntések meghozatalára.

A mutáns KRAS-ról korábban azt tartották, hogy egy olyan fixált, konstitutív aktív állapotban van, amely nem igényel upstream szignált, és az ilyen tumorok refrakterek az EGFR-TKI kezelésre^{360,361}. 2016-ban a KRAS G12C mutációjának irreverzibilis inhibitoraival végzett kutatások ugyanakkor azt igazolták, hogy a mutáns KRAS hiperaktiválódhat az upstream effektorok által, lehetővé téve ezzel a receptor tirozinkinázok célzását KRAS-vezérelt tumorokban^{104,362}. Nemzetközi kollaborációban végzett #17 vizsgálatunkban hasonló eredményre jutottunk, és kimutattuk, hogy az ERBB szignalizáció aktív mind az egér-, mind pedig az emberi KRAS mutáns tüdő ADC-kben¹⁰⁶. KRAS mutáció pozitív humán tüdő ADC szövetmintákon EGFR, pEGFR, ErbB2 és pErbB2 IHC vizsgálatot végeztünk, és megállapítottuk, hogy mind az EGFR, mind pedig az ErbB2 és ezen receptorok aktivált formája expresszálódik.

Korábban az erlotinibbel és/vagy gefitinibbel végzett legtöbb klinikai vizsgálatban nem igazoltak terápiás hasznót a KRAS mutáns ADC-ben szenvedőknél^{103,363-365}. Hasonlóképpen nem mutattak ezek a szerek kedvező hatást a carcinogenesis gátlására kísérleti modellekben.

A jelen vizsgálatunkban azonban mind a genetikai EGFR deléció, mind az erlotinib kezelés egy hasonló tumor-menekülési mechanizmust váltott ki, amely a nem-EGFR ErbB receptorcsalád tagjainak aktiválásán alapult, habár ennek a mechanizmusnak a beindítását késleltette az EGFR génkiütés, összehasonlítva a TKI-közvetített gátlással.

Szemben a KRAS mutáns daganatokban terápiás hatékonyságot nem mutató elsőgenerációs TKI erlotinibbel és gefitinibbel, az afatinib megszüntette az ErbB család

tagjainak aktivációját, elnyomta a tumor kompenzációs mechanizmusát, és így a KRAS-vezérelt tüdő ADC hatékony gátlását eredményezte. Hasonlóképpen, a monoklonális antitestek keverékével (pan-Her) végzett pan-ErbB-gátlás hatékonyabban elnyomja a carcinogenesis, mint ahogy célzott volna egyes ErbB-receptorokat³⁶⁶. Kiemelendő, hogy összhangban Kruspig és mtsai eredményével³⁶⁷, megállapítottuk, hogy az irreverzibilis TKI-k, mint például az afatinib vagy a neratinib, down-regulálják az ErbB2 és az ErbB3 fehérjét, ami hasonló jelenség, mint ami pan-Her antitestek alkalmazásakor figyelhető meg³⁶⁶, és ami hozzájárulhat az irreverzibilis TKI-k hatékonyságához.

Az általunk alkalmazott egérmodell nem felel meg a humán mucinózis ADC-nek, mivel különböző az NKX2 (TTF-1) expressziójuk³⁶⁸, továbbá, az egér ADC nem reprezentálja kellőképpen a humán tüdő ADC heterogenitását és komplexitását. Annak ellenére azonban, hogy az állatkísérleti eredmények nem ültethetők át direkt módon a humán gyakorlatba, megfigyeléseink – a jelenlegi véleményekkel szemben – arra utalnak, hogy KRAS mutáns daganatok EGFR-TKI kezeléssel szembeni rezisztenciája vélhetően nem a KRAS konstitutív aktivációjával kapcsolatos, hanem az ErbB receptorcsalád egyes tagjainak reaktiválódásával. Mivel tehát több preklinikai módszer együttes alkalmazásával sikerült bebizonyítani, hogy a már a klinikai gyakorlatban is használatos pan-ErbB inhibitor afatinib önmagában, vagy egyéb szerekkel (pl. MEK-inhibitor^{367,369}, vagy KRAS G12C inhibitor) kombinálva, hatékonyan gátolja a KRAS-vezérelt tüdő carcinogenesis, ezért javasolható a pan-ErbB gátlók klinikai vizsgálatban történő tesztelése KRAS mutáns tüdő ADC-kben is.

8.3.2. Immunterápia [18-20]

Tekintettel az immunterápia költséges voltára, különösen nagy hangsúlyt kapnak a betegszelekciót célzó biomarkerek. A #18 vizsgálatban arra kerestük a választ, hogy a rutin HE metszeteken megfigyelhető szöveti jellemzők mutatnak-e összefüggést a PD-1/PD-L1 expresszióval¹¹⁵. Elsőként írtuk le tüdő ADC-ben, hogy a tumor nekrosis szoros pozitív korrelációt mutat a tumorsejtek és az immunsejtek PD-L1, valamint az immunsejtek PD-1 expressziójával. Ez tükrözheti a magasabb tumor grade-del való összefüggést, mivel ismert a tumor nekrosis és grade közötti korreláció. Chang és mtsai hasonló eredményre jutottak tüdő pleomorph carcinomák vizsgálatakor, ahol a

tumorsejtek magas PD-L1 expressziója korrelált a tumor nekrosis jelenlétével, és emellett a TNF α expresszióval is³⁷⁰. A tumor nekrosis és a tumorsejtek PD-L1 expressziós szintje között nem figyeltünk meg direkt, fénymikroszkópos anatómiai kapcsolatot, ugyanakkor a magasabb PD-L1 expresszió egy agresszívebb tumor fenotípusra és így egy magasabb sejtproliferációs szint általi nagyobb nekrosis-készségre utalhat, ahogyan azt egy 2019-es vizsgálatban találták³⁷¹. Hasonlóképpen, pancreas ductalis adenocarcinomában leírták, hogy a TNF α fokozza a PD-L1 expressziót³⁷². Eredményünk harmonizálhat Hartley és mtsai állatkísérletével is, amelyben a TNF α a monocyták PD-L1 expresszióját növelte³⁶⁹. Mivel az immunterápia újabb célpontjai között szerepelnek a TNF receptor család tagjai is, eredményünknek klinikai relevanciája is lehet³⁷³. A hipoxia és a PD-L1 up-reguláció közti összefüggést Samanta és mtsai kimutatták tripla-negatív emlőrák sejtekben³⁷⁴.

Tüdőrákban a citotoxikus kemoterápia PD-L1 expresszióra gyakorolt hatása kissé ellentmondásos. Shin és mtsai fokozott PD-L1 expressziót detektáltak NSCLC betegek jelentős arányában, ugyanakkor mások, köztük saját munkacsoportunk is, primer tüdőrákban a PD-L1 expresszió csökkenéséről számoltak be^{123,375-377}. A kemo-radioterápia hatását a PD-L1 expresszióra csak igen kevesen vizsgálták. Fujimoto és mtsai mind expresszió emelkedést, mind változatlan státuszt, mind pedig expresszió csökkenést megfigyeltek NSCLC konkurráló kemo-irradiációja során³⁷⁸. Ezzel szemben humán tüdőrákban még nem írták le a csak a sugárterápia tumorszövet PD-1/PD-L1 expresszióra gyakorolt hatását.

Napjainkban, 2019-ben, a tumor PD-L1 expressziója a messze leginkább használt biomarker az NSCLC betegek immunterápiára történő kiválasztásakor, ugyanakkor a tumor mutációs terhelés (tumor mutation burden = TMB) egy másik potenciális prediktív marker. A TMB és a PD-L1 expresszió – anti-PD-1 és anti-PD-L1 kezelésre vonatkozó – számos klinikai vizsgálatban egymástól független megjelenést mutatott, így egyes szerzők szerint javasolt szelekciós markerként való együttes alkalmazásuk^{379,380}. Mások, így Wang és mtsai azt találták, hogy egyes daganattípusokban, így pl. tüdő ADC-ben, a magasabb TMB altípusú tumorokban szignifikánsan magasabb volt a PD-L1 expresszió³⁸¹. Lehetséges az is, hogy a TMB a jövőben átveszi a szerepet a betegszelekcióban, vagy a PD-L1 expresszióval kombináltan kerül alkalmazásra, ehhez azonban olyan új kimutatási

módszerekre lesz szükség, amelyek időigénye rövid, és használhatók kisbiopsziás tumormintáknál is³⁸².

A TMB emlőrákban korrelált a Ki-67 proliferációs index-szel³⁸³, ami felveti annak lehetőségét, hogy a magasabb TMB összefügg a nekrosis jelenlétével és vice versa.

Vizsgálatunkban igen szoros korrelációt találtunk a tumorsejtek és az immunsejtek PD-L1 expressziója között, ami összhangban áll Jiang és mtsai eredményével, akik NSCLC esetek 70%-ában azonos PD-L1 IHC státuszt találtak³⁸⁴.

Vizsgálatunk másik fő megfigyelése a szoros negatív összefüggés a daganatok lepidikus terjedési módja és a tumorsejtek PD-L1 expressziója között. Ez az eredmény harmonizál Yeo és mtsai munkájával, akik ugyanolyan anti-PD-L1 antitestet (SP142) alkalmazva, szintén alacsonyabbnak találták az expressziót lepidikus terjedésű ADC-knél, szemben a papilláris és a szolid típusú ADC-kkel³⁸⁵. Fentiekkel összhangban, egy érdekes vizsgálatban, Tokoyawa és mtsai a PD-L1 expresszió és a daganat radiológiai invazivitása közti pozitív összefüggést detektálták 292 operált, I stádiumú ADC-s beteg vékonyréteg CT vizsgálata alapján³⁸⁶. Saruwatari és mtsai ugyancsak leírták, hogy a lepidikus terjedési mintázat összefügg az alacsonyabb PD-L1 expresszióval, azonban ők igen szelektált ázsiai betegpopulációt vizsgáltak, hiszen valamennyi ADC minta EGFR szenitizáló mutáció pozitív volt³⁸⁷. Hasonlóképpen, Kwong és mtsai is demonstrálták a daganatsejtek alacsony PD-L1 expressziója és a lepidikus terjedés közti összefüggést nem-mucinózus ADC-ben, ők azonban nem vizsgálták az immunsejtek PD-1/PD-L1 expresszióját³⁸⁸. Így tehát, mivel a korábbi publikációk nem elemezték az immunsejtek PD-L1 és PD-1 expresszióját az ADC-k lepidikus terjedésével összefüggésben, eredményeink új információkkal szolgálnak és első alkalommal írják le az ezek közti negatív korrelációt.

Vizsgálatunk során nem találtunk korrelációt a tumorok vaszkuláris inváziója és a PD-1/PD-L1 expresszió között, ami ellentétes Yang és mtsai eredményével, akik 163 operált I stádiumú ADC esetében pozitív összefüggést figyeltek meg a tumorsejtek PD-L1 expressziója és az érbetörés között³⁸⁹.

Az elmúlt években a PD-1/PD-L1 expresszió és az ADC-k EGFR/KRAS mutációs státusza közti összefüggést intenzíven tanulmányozták. D’Incecco és mtsai 125 NSCLC – köztük 83 ADC – vizsgálata során azt találták, hogy az immunsejtek PD-1 expressziója szignifikánsan korrelált a dohányzással és a KRAS mutációval, míg a tumorsejtek PD-L1 expressziója az

EGFR mutációval korrelált³⁹⁰. Ezzel ellentétben, Mu és mtsai I stádiumú NSCLC betegeknél nem találtak összefüggést a PD-L1 expresszió és a daganatok EGFR/KRAS/BRAF/ALK státusza között³⁹¹. Hasonlóképpen, Zhang és mtsai sem találtak összefüggést a PD-L1 expresszió és az EGFR/KRAS mutáció között, Yoneshima és mtsai pedig a PD-L1 expresszió és az EGFR/ALK eltérés között^{392,393}. Jiang és mtsai 156 ADC-ben a tumorsejtek PD-L1 expressziója mellett vizsgálták az immunsejtek PD-1/PD-L1 expresszióját is, és nem találtak összefüggést az EGFR/KRAS/ALK/MET és ROS1 onkogén státusszal³⁸⁴. Jelen munkánk során multivariációs analízissel mi sem találtunk összefüggést a daganatok EGFR/KRAS mutációs státusza és a PD-1/PD-L1 expressziók között.

Habár Jiang és mtsai már leírták ADC-ben, hogy a tumorsejtek PD-L1 expressziója összefüggést mutat a férfi nemmel, illetve a dohányzással³⁸⁴, a COPD és a PD-1/PD-L1 expresszió közti összefüggést ők sem elemezték. Munkánk során vizsgáltuk ezt az összefüggést, de nem találtunk korrelációt. A dohányzást illetően pozitív összefüggést észleltünk az immunsejtek PD-1 expressziójával, amit már D’Incecco és mtsai is leírtak³⁹⁰. Velük ellentétben azonban nem találtunk összefüggést a PD-1/PD-L1 expresszió és az életkor, illetve a nem között.

Összegzőképpen elmondható, hogy első alkalommal igazoltuk a tumor nekrosis jelenléte és a tumorsejtek PD-L1 és az immunsejtek PD-1 expressziója közti erős pozitív összefüggést, valamint átfogóan a lepidikus tumor terjedés és a tumorsejtek PD-L1 és az immunsejtek PD-L1 és PD-1 expressziója közti negatív korrelációt. További vizsgálatok, így pl. immunterápiában részesülő betegek részletes klinikopatológiai analízise is, segíthetnek meghatározni ezen megfigyelések klinikai relevanciáját.

A rutin klinikai gyakorlatban tüdőrákban mindezidáig a daganatsejtek PD-L1 expressziója az egyetlen betegszelekciós faktor, és különösen ADC-ben mutat prediktív értéket szemben a laphámrákkal^{394,395}. Számos vizsgálat foglalkozott már a primer tumor PD-L1 expressziójával, azonban keveset tudunk ezen biomarkerről ADC okozta agyi áttétekben. A #19 vizsgálatban agyi metastasectomiából származó 208 szövetmintán tanulmányoztuk a PD-L1 expressziót mind a tumorsejtekben (TC), mind pedig az immunsejtekben (IC). Vizsgáltuk emellett az immunsejtek PD-1 expresszióját, továbbá a peritumorális mononukleáris gyűrű (MR) jelenlétét és az intratumorális immunsejt denzitást⁶¹.

Elsőként mutattuk ki, hogy az immunsejt infiltráció és különösen a peritumorális MR, kedvezően befolyásolja az agyi áttét műtete utáni túlélést. Az immunsejtek jelenlétének igazolása alátámaszthatja az immunterápia alkalmazásának létjogosultságát agyi metasztázisban is. Leírtuk ugyanakkor, hogy az agyi áttétek egy jelentős hányadában nem található immunsejt infiltráció, így vélhetően kedvező immunválasz sem következhet be ezen esetekben. Munkánk egyik fő erőssége, hogy igen homogén betegpopulációt vizsgált, szemben a korábbi közlemények daganattípusra és szövettanra nézve is heterogén kohorszaival.

Tekintettel arra, hogy a primer tumor sebészi eltávolításának, valamint az agyi áttétek számának és a metastasectomiának a túlélés szempontjából igen nagy a jelentősége, a kiértékeléskor ezen paraméterek alapján négy alcsoportot külön is vizsgáltunk. A 2-es alcsoportban, ahol a primer tumort sebészileg eltávolították és a betegek multiplex agyi áttétben szenvedtek, az alacsony PD-1/PD-L1 expresszió szignifikánsan kedvezőbb túléléssel párosult. Ez arra utal, hogy ezekben az esetekben a PD-1/PD-L1 tengely aktívan gátolhatja a tumorelles immunosuppressziót, ezért leginkább az ilyen betegek profitálhatnak az ezt célzó checkpoint inhibitor terápiából.

Pozitív korrelációt tudtunk kimutatni a stromális IC denzitás és az MR jelenléte között, ami az immunsejtek odavonzásának hasonló mechanizmusaira utal az agyi áttét különböző területein. Ugyancsak pozitív korrelációt figyeltünk meg a PD-1 pozitív IC-k és a PD-L1 pozitív TC-k és IC-k mennyisége között, ami a tumorsejtek és az immunsejtek dinamikus kommunikációját jelzi, és alátámasztja azt az elképzelést, hogy a kimerült, PD-1-et expresszáló T-sejtek a mikrokörnyezetben PD-L1 expressziót indukálnak³⁹⁶.

Figyelembe véve az immunválasz növekvő jelentőségét a rákterápiában, fontos tisztázni a szteroid- és a kemoterápiás kezelések hatását az immunsejtek állapotára az agyi áttétekben. Az agyi áttétek műtete előtt alkalmazott szteroid nem gyakorolt szignifikáns hatást sem a stromális immunsejt infiltrációra, sem a peritumorális mononukleáris gyűrűre, ami összhangban van szövettanilag heterogén kohorszokban talált korábbi eredményekkel³⁹⁷⁻⁴⁰⁰. Ez arra utal, hogy a szteroidnak nincs lényegi hatása az IC toborzásra. Egyes kutatók különböző primer tumorok agyi metasztázisaiban úgy találták, hogy a szteroid nem befolyásolja a PD-L1 expressziót^{397,400}. Saját kohorszunkban szteroid kezelésre vonatkozóan mindössze az PD-L1 IC expresszióban, és csak a 10%-os

határértéknél észleltünk negatív összefüggést, ami azt sugallja, hogy a szteroidnak van valamilyes hatása az ADC-k agyi áttéteiben a PD-L1 IC expresszióra, ugyanakkor nem hat a PD-L1 TC és a PD-1 IC expresszióra.

A kemoterápia hatását a PD-1/PD-L1 expresszióra már vizsgálták, azonban az eredmények igen változóak, függően a vizsgált szertől és a sejttípustól⁴⁰¹⁻⁴⁰³. Érdekes módon, jelen vizsgálatunkban nem észleltünk különbséget a PD-1/PD-L1 expresszióban attól függően, hogy a beteg az agyi metastasectomia előtt kapott-e kemoterápiát, ami arra utal, hogy tüdő ADC agyi áttéteiben a szisztémás kemoterápia nem vezet PD-1/PD-L1 expressziós változáshoz.

Elemzésünk során a POPLAR vizsgálatban alkalmazott score rendszert használtuk¹²⁹, mivel ez nemcsak a tumorsejtek, hanem az immunsejtek PD-L1 expresszióját is figyelembe veszi. Az esetek 26,4%-a volt „non-expressors”, tehát sem a TC-k sem az IC-k nem expresszálták a PD-L1-et, így vélhetően ezen betegek kevésbé profitálnának egy anti-PD-1/PD-L1 kezelésből.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy vizsgálatunk elsőként demonstrálta az áttétek körüli peritumorális mononukleáris gyűrű független prognosztikai értékét tüdő ADC agyi áttéteiben. Emellett a masszív stromális immunsejt denzitás is kedvező prognózisra utaló erős tendenciát mutatott. Az előzetes szteroid kezelésnek lehet némi szerepe az immunsejtek PD-L1 expressziójának csökkentésében, azonban azok toborzására nincs hatással. A kemoterápia úgy tűnik, hogy nem befolyásolja a tumorsejtek PD-L1 és az immunsejtek PD-1/PD-L1 expresszióját. Agyi áttétet adó tüdő ADC-s betegek mindezidáig legnagyobb kohorszában tapasztalt eredményeink azt mutatják, hogy a gazdaszervezet immunrendszere jelentős hatással van az agyi áttétek szabályozására, így a modern immunterápiák a betegek egy alcsoportjában segíthetik az immunsejteket a daganat elpusztításában. Pontosabb betegszelekciós módszerek kidolgozásához azonban még további tanulmányok szükségesek.

A #20 vizsgálatunkban elsőként közöltünk PD-L1 és PD-1 expresszióra, valamint tumor asszociált immunsejtekre vonatkozó átfogó eredményeket primer tüdőrákok és azok agyi metasztázisainak összehasonlító vizsgálata alapján¹¹⁶. Emellett elsőként elemeztük a kemo-, radio- és szteroid terápia hatását ezen szöveti biomarkerekre.

Az immunellenőrzőpont-gátlás egyre nagyobb szerephez jut a tüdőrák terápiájában^{404,405}. Habár egyes klinikai vizsgálatok – különösen melanomában és tüdőrákban – agyi áttétes betegek bevonását is engedélyezték⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸, a legtöbb ilyen vizsgálatban kizárási kritérium volt az agyi érintettség^{409,410}.

A *primer tumor* – *agyi áttét* mintapár vizsgálatának klinikai jelentőségét támasztja alá az a tény, hogy az agyi áttétes betegeknek csak egy töredéke kerül műtetre, így a tervezett immunterápia prediktív markerének meghatározásához nemritkán csak a primer tumor szövetmintája áll rendelkezésre. Az immunterápia betegszelekciójára az alábbi négy, FDA-elfogadott anti-PD-L1 antitestet alkalmazzák: SP142, SP263, 22C3 és 28-8, melyek közül az SP142 kiválik a többi közül, mint a legkevésbé szenzitív IHC marker⁴¹¹⁻⁴¹³. Vizsgálatunk során mi az SP142 antitestet használtuk, azonban időközben a 22C3 antitest vált a rutin klinikai gyakorlatban a leginkább elfogadottá, ezért célszerűnek tűnik a jövőben az eredmények validálása ezzel az antitesttel is.

Munkánk során szignifikáns korrelációt találtunk a primer tüdőrákok és azok agyi áttétei között a PD-L1 pozitív tumorsejtek számát illetően. Eredményeink hasonlóak korábbi vizsgálatokhoz, amelyekben a PD-L1 expressziót vetették össze primer NSCLC-k és azok agyi áttétei között, 5%-os határértéknél^{414,415}. Kim és mtsai tüdő ADC-ben magas konkordanciát észleltek a primer és az agyi áttéti tumorsejtek PD-L1 expresszióját illetően 1%-os és 50%-os határértéknél¹²⁶. A klinikai gyakorlatban és a klinikai gyógyszer-vizsgálatokban az alkalmazott antitestektől és az adott immunterápiás szertől függően a PD-L1 expresszió más-más határértékeit alkalmazzák^{416,417}. Így például számos CheckMate vizsgálatban $\geq 1\%$ -os, vagy 5%-os cut-off értéket használtak, míg a pembrolizumab elsővonalban csak a tumorsejtek $\geq 50\%$ PD-L1 IHC pozitivitása esetén volt adható^{405,418}, éppen ezért munkánk során mindhárom cut-off értéket teszteltük.

Az agyi áttétekről azt tartják, hogy csak néhány sejtől származnak^{419,420}, éppen ezért két hipotézis is felmerült, hogy megmagyarázzuk ezt a PD-L1 expresszióra vonatkozó erős konkordanciát. Az első azt feltételezi, hogy az agyi áttétek a primer tumorsejtek egy kis csomójából fejlődnek ki, amelyek – véletlenszerű szelekció révén – tükrözik a PD-L1 pozitív sejtek arányát. A második hipotézis azt feltételezi, hogy az agyi áttétek PD-L1 pozitív sejtjei egy, vagy néhány áttétképző primer tumorsejtből származnak, függetlenül attól, hogy azoknak milyen volt a kezdeti PD-L1 expressziós státusza. Ez utóbbit támasztja

alá az a kísérleti eredmény, amely szerint a sejtpopulációk különböző transzkriptomi állapotokban egyensúlyban vannak, és amikor ezeket a szubpopulációkat izoláljuk, újra ugyanazok az egyensúlyi állapotok jönnek létre minden szubpopulációból⁴²¹.

Fontos volt annak megállapítása, hogy egyes onkoterápiákat követően jelentősen megváltozik-e a PD-L1 pozitív tumorsejtek aránya az agyi áttétekben, ami befolyásolhatná az immunellenőrzőpont-gátlók hatását. Az agyi metastasectomia előtt alkalmazott kemo-, vagy szteroid terápiáknak nem volt hatása a tumorsejtek PD-L1 expressziójára. Nem volt, vagy csak igen korlátozott mértékű volt a korreláció a PD-1/PD-L1 pozitív immunsejtek számát illetően a primer és metasztatikus ADC minták között. Hasonlóképpen, nem volt összefüggés a tumor-asszociált immunsejtek denzitás-változását illetően a primer és áttéti tumorhely között a kemo-, radio-, vagy szteroid terápiák jelenlétében, vagy hiányában. Mindez arra utal, hogy az agyi áttétek a primer tumortól függetlenül alakítják ki saját immunkörnyezetüket. Ez ugyanakkor ellentétben áll azzal, hogy a PD-L1 pozitív tumorsejtek arányát illetően pedig magas volt a korreláció a primer és áttéti tumorok között.

A fentiek alapján elmondható, hogy ADC-ben szoros korrelációt figyeltünk meg a tumorsejtek PD-L1 expressziójában a primer tüdőtumorkok és agyi áttétek között, amit érdemben nem befolyásolt a kemo-, radio- és szteroid terápia. Amennyiben továbbra is a tumorsejt PD-L1 pozitivitása lesz a legfőbb betegszelekciós kritérium, úgy megfigyelésünk racionális alapot nyújthat ahhoz, hogy agyi áttétes ADC-s betegek esetében a primer tumor PD-L1 IHC pozitivitása prediktív marker lehessen, amennyiben nem áll rendelkezésre áttéti szövetminta.

8.4. Tüdőrákok kemoterápiájának hatása egyes szöveti biomarkerek expressziójára [21-23]

A neoadjuváns kemo- és radioterápia hatásosságát főként radiológiai morfológiai jegyek alapján ítélik meg a klinikumban. Junker és mtsai NSCLC betegek vizsgálata során azt találták, hogy a hosszútávú túléléshez elengedhetetlen a komplett tumor reszekció (R0), vagy legalább az, hogy a tumorban az élő daganatsejtek aránya 10% alá csökkenjen⁴²².

A neoadjuváns kemoterápia lehetséges prediktív faktoraként számos biomarkert, így apoptózis- és sejtciklus szabályozó fehérjéket vizsgáltak. Ikuta és mtsai apoptózisra heterogénen érzékeny NSCLC sejtvonalakat alkalmaztak a cisplatin különböző apoptotikus útvonalakra gyakorolt hatásának elemzésére⁴²³. Megállapították, hogy NSCLC sejtekben az antiapoptotikus Bcl-xL és a pro-apoptotikus p53 szükségesek, de nem elegendőek a cisplatin által kiváltott apoptózis elleni rezisztenciához. Filipits és mtsai átfogó tanulmányt végeztek annak megállapítására, hogy a sejtciklus-szabályozók prognosztikai és/vagy prediktív értékűek-e⁴²⁴. Azt a következtetést vonták le, hogy a p27^{Kip1} negatív tumorokban szenvedő NSCLC-s betegeknek a tumor teljes reszekciója után előnyös az adjuváns cisplatin-alapú kemoterápia. Hasonlóképpen, az ERCC1 IHC negativitás túlélési előnnyel járt azon NSCLC-s betegeknek, akik cisplatin-alapú adjuváns kemoterápiát kaptak⁴²⁵.

Számos tanulmány elemezte a kemoterápiák klinikai hatásait nem-kissejtes tüdőrákban mind inoperábilis esetekben, mind pedig neoadjuváns vagy adjuváns kezelésként alkalmazva⁴²⁶⁻⁴³¹. A citotoxikus kezelés következtében a tumorszövetben kialakult molekuláris változások ezzel szemben sokkal kevésbé ismertek. A #21 vizsgálatban a cisplatin-alapú kemoterápiák szöveti biomarkerekre gyakorolt hatását vizsgáltuk pre-kemoterápiás bronchoscopos és poszt-kemoterápiás sebészi biopsziás szövetminták összehasonlítása révén¹²¹. A kisbiopsziás minták sebészi reszekátummal való összehasonlításának megbízhatóságát Meert és mtsai tanulmányozták⁴³². A p53, EGFR, c-erbB-2 és Ki-67 protein expresszió 28 tüdőrákos betegben való elemzése során a konkordanciát 85%-nak találták, és ez alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a kisbiopsziás minták megbízható információval szolgálnak, és segíthetik a terápiás stratégia kidolgozását.

Munkánk során a kemoterápiát követően emelkedett Ki-67 expressziót észleltünk az esetek egyharmadában, ami ellentétes Lang és mtsai megfigyelésével⁴³³. Ők alacsony proliferációs aktivitásra utaló csökkent Ki-67 expressziót, és késői fázisú apoptózisra utaló caspase-3 aktiválódást találtak, ami kifejezettebb volt ADC-ben, összehasonlítva az SCC-vel. Jelen munkánk során mi is igazoltunk szövettani altípus szerinti különbséget. Míg azonban SCC-ben kifejezett volt a kezelés utáni ERCC1 expresszió csökkenés, addig ADC-ben nem volt érdemi változás detektálható.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy bár a kemoterápia bizonyos esetekben növeli a daganat sebészi eltávolíthatóságát, a teljes túlélést nem feltétlenül hosszabbítja meg, mivel maga a kezelés tumorsejt szelekciós hatásokkal is járhat. A platinabázisú kemoterápia agresszívabb fenotípusú tumorsejtek szelekcióját indukálhatja, és befolyásolja egyes prognosztikai és/vagy prediktív értékű szöveti biomarkerek expresszióját. Ennek ismerete befolyással bírhat az NSCLC-s betegek kezelési protokolljainak kialakításakor.

2009-ben végzett fenti munkánk során 17 mintapárban elemeztük a platinabázisú kemoterápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatását. Tekintettel arra, hogy abban az időben intenzíven kutatták az ERCC1 expresszióinak a ciszplatin kezelésre vonatkozó prediktív értékét, bővítettük az esetszámot, és a #22 tanulmányunkban 46 mintapáron végeztünk hasonló felépítésű vizsgálatokat¹²². Az ilyen típusú vizsgálatok kivitelezését nagyban korlátozza a szövettani mintapárok hozzáférhetősége, mivel a kemoterápiás kezelésben részesülő betegek 80%-ánál mindössze bronchoscopos excindátum vagy citológiai minta áll rendelkezésre⁴³⁴. Ismerve a tüdőrák heterogenitását, a kezelés előtti kicsiny szövetminták az IHC kiértékeléskor gyakran korlátozott értékűek. Ugyanakkor munkánk során éppen a kemoterápia utáni, nagyméretű, sebészi biopsziás mintákban észleltünk ERCC1 expresszió csökkenést, ahol lényegesen kisebb a fals negativitás valószínűsége. A csökkenés mértéke SCC-ben kifejezettebb volt, mint ADC-ben. Ez összecseng Choi és mtsai eredményével, akik NSCLC-ben az alacsonyabb ERCC1 expresszió negatív prognosztikai értékét éppen SCC-ben találták kifejezettebbnek⁴³⁵. Habár az alacsony ERCC1 expresszió a daganat platina-szenzitivitására utalhat, feltételezésünk szerint a kemoterápia utáni ERCC1 csökkenés egy tumorsejt-szelekció eredménye, ami agresszívebb biológiai viselkedést mutató daganat megmaradásával jár. Megfigyelésünk hasonlóságot mutat Schneider és mtsai eredményeivel, akik nyelőcsőrák neoadjuváns kemo-radioterápiája után az ERCC1 génexpresszió down-regulációját detektálták, ők azonban nem elemezték szeparáltan a kemoterápiát és a radioterápiát⁴³⁶. Érdekes módon, humán tüdő A549 ADC sejtvonalakban az alacsony dózisú ciszplatin kezelés ERCC1 expressziót indukált⁴³⁷. Mások metasztatikus vastagbélrákban az oxaliplatin-alapú elsővonalbeli kemoterápia után az ERCC1-expresszió fokozódását figyelték meg⁴³⁸.

Az ERCC1 protein expresszió prediktív értéke NSCLC-ben még mindig nem tisztázott. Olausen és mtsai az *International Adjuvant Lung Cancer Trial* 761 sebészileg eltávolított NSCLC mintáin tanulmányozták az ERCC1 expressziót⁴²⁵. Azt találták, hogy az adjuváns kemoterápia – összevetve az obszervációs csoporttal – szignifikánsan megnövelte az ERCC1 IHC negatív betegek túlélését, összehasonlítva az ERCC1 pozitív tumorban szenvedőkkel. Az adjuváns kemoterápiában nem részesültek körében az ERCC1 pozitív tumoros betegek éltek tovább, szemben az ERCC1 negatívokkal. Ezen eredmény alapján az ERCC1 immunpozitivitás egy kedvező prognosztikus, de kedvezőtlen prediktív faktornak tartható. Schneider és mtsai az NSCLC ERCC1 expressziójának interlaboratórium-konkordanciáját értékelték három nagy laboratóriumban, a kereskedelmi forgalomban lévő tesztekkel⁴³⁹. Azt találták, hogy az előzetesen kiválasztott platina-szenzitív és -rezisztens minták vizsgálatakor a három kereskedelmi forgalomban lévő laboratóriumi teszt egyike sem érte el az 50%-nál nagyobb specificitást. Következtetésük szerint az ERCC1 rutin laboratóriumi vizsgálata következetlen és megbízhatatlan, ezért az ERCC1 IHC rutinszerű klinikai alkalmazásának a terápiás döntéshozatalban valószínűleg még nincs itt az ideje. Az a megfigyelésünk, hogy a ciszplatin terápiára ERCC1 pozitív daganatban szenvedő betegek is reagáltak, azzal magyarázható, hogy az ERCC1 csak az egyik tagja egy jóval összetettebb excíziós repair rendszernek^{440,441}. Több excíziós repair marker protein és mRNS expressziójának együttes vizsgálata segíthet megválaszolni a fenti kérdést. Yoon és mtsai egy ERCC1 expresszió és ciszplatin hatás közti érdekes összefüggést írtak le⁴⁴². Azt találták, hogy gyomorrák sejtekben a sunitinib (VEGFR-, KIT- és PDGFR-gátló) potencírozta a ciszplatin aktivitását azáltal, hogy a PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor- α) expressziójának modulálásával csökkenti az ERCC1 expresszióját. Ez egy igen szép példája a szinergista hatásnak, amikor egy régi citotoxikus szert és egy új molekuláris célzott terápiás hatóanyagot kombinálunk. Emlőrákos betegeknél reziduális betegség esetén a Her2 expresszió elvesztését gyakrabban figyelték meg a csak kemoterápiát kapott betegeknél (14/35, 40%), mint a kemoterápiát plusz anti-Her2 kezelést kapottaknál (5/34, 14,7%)⁴⁴³. Ez az eredmény szintén alátámasztja annak szükségességét, hogy vizsgáljuk a citotoxikus kemoterápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatását. Munkánk során platinabázisú

kemoterápiát követően az ERCC1 protein expresszió csökkenését észleltük tüdőrákban, aminek jelentősége lehet a citotoxikus terápia sorrendiségének meghatározásakor.

Tüdőrákban az immunterápia közelmúltbeli térhódítása miatt fontos kérdésként merült fel a citotoxikus kemoterápiáknak az immunterápiák prediktív szöveti markereire gyakorolt hatása is. A #23 tanulmányunkban átfogó elemzésben mutattuk be a platinabázisú neoadjuváns kemoterápia hatását a stromális immunsejtek (IC) denzitására, valamint a tumorsejtek (TC) és IC PD-L1 expressziójára, illetve az IC PD-1 expressziójára tüdőrákban¹²³. A 41 esetből 10-ben a PD-L1 TC expresszió csökkenését észleltük, és csak 3 tumorminta párnál figyeltünk meg növekedést. A csökkenés mértéke csak azon betegeknél volt szignifikáns, akik ciszplatin-gemcitabin kezelésben részesültek. Nem volt szignifikáns különbség az ADC és az SCC esetek között. Az immunsejtekben nem figyeltünk meg érdemi változást a neoadjuváns kemoterápia után. Mindez összecseng Sheng és mtsai eredményével, akik 32 NSCLC, köztük 26 ADC szövetminta párnál, kemoterápiát követően a PD-L1 TC down-regulációját és a PD-L1 IC szignifikáns változásának hiányát figyelték meg³⁷⁵. Ők azonban, ellentétben a mi munkánkkal, nem vizsgálták az immunsejtek denzitását és PD-1 expresszióját. Zhang és mtsai, akik csak a PD-L1 TC expresszióra fókuszáltak, 30 NSCLC betegnél szintén megfigyelték, hogy neoadjuváns kezelés után a PD-L1 TC expressziója csökken, de emellett észleltek expresszió növekedést is³⁷⁷. Vizsgálták a PD-L1 immunopozitivitás és a kemoterápia-rezisztencia korrelációját, és megállapították, hogy a neoadjuváns kemoterápia utáni magas PD-L1 TC expresszió a terápia-rezisztencia és a rossz prognózis előrejelzője lehet NSCLC-ben. Eredményüket in vivo kísérletek is megerősítették. Mindezek alapján feltételezhető, hogy kemoszenzitív NSCLC esetében a kemoterápia szelektíven pusztítja a PD-L1 pozitív daganatsejteket, ami a PD-L1 expresszió csökkenését eredményezi. Ezt a hipotézist látszik megerősíteni az a megfigyelésünk, hogy a neoadjuváns kemoterápiát követően PD-L1 expresszió csökkenést mutató 7 betegből 6 betegnél parciális regresszió volt detektálható.

Az immunterápia új reményt hozott a tüdőrákos betegek számára, azonban a betegszelekció pontos kritériumai még nem kidolgozottak. A tumorsejtek PD-L1 expressziója tűnik a legígéretesebb prediktív markernek például pembrolizumab

kezelésnél, különösen az IHC pozitív tumorsejtek 50% feletti aránya esetén⁴⁴⁴. Emellett intenzíven vizsgálják a PD-L1 TC és IC kombinációjának prediktív értékét is¹²⁹. Az immunterápiát gyakran alkalmazzák másod-, vagy harmadvonalbeli kezelésként, platinabázisú kemoterápiát követően, vagy pedig neoadjuváns és/vagy adjuváns kezeléssel kombinált sebészi tumor reszekció után, a daganat kiújulásakor.

Eredményeink arra utalnak, hogy a PD-L1 TC expresszió a tüdőrákos betegek körülbelül egynegyedében csökken a platinabázisú kemoterápia után, ami a jelenlegi betegszelekciós kritériumok miatt egy ígéretes terápia mellőzésének a veszélyével járhat⁴⁴⁵. Az immunsejtekben ezzel szemben nem figyeltünk meg érdemi változást a neoadjuváns kemoterápia után sem a denzitást, sem pedig a PD-1/PD-L1 expressziót illetően, azonban érdemes megemlíteni, hogy egyes tumorminta párokban ezeknek a paramétereknek a változása párhuzamos volt. Ezek a megfigyelések részben összhangban állnak korábbi eredményeinkkel [#19], amikor összehasonlítottuk tüdő ADC agyi áttéteit előzetes kemoterápiával és anélkül, és nem találtunk korrelációt a kemoterápia alkalmazása és a PD-1/PD-L1 IC, illetve a stromális IC mennyisége között⁶¹. Ezzel szemben egyik legfrissebb közleményünkben [#20] arról számoltunk be, hogy *primer tüdőtumor és agyi áttét* mintapárok vizsgálatakor nem észleltünk szignifikáns PD-L1 expresszió változást azon agyi áttét mintákban sem, ahol előzetesen a beteg kemoterápiás kezelésben részesült. Ennek a – vélhetően csak – látszólagos ellentmondásnak a feloldását adhatja az a tény, hogy amíg a neoadjuváns kemoterápia direktben és nagy dózisban érinti a primer tumor szövetét, addig agyi áttét esetében a vér-agy gát károsodásának mértéke fogja megszabni a platinabázisú kemoterápia agyi áttétszövetbe való bejutásának mértékét⁴⁴⁶. Munkánk során elsőként írtuk le komplexen a PD-1 és PD-L1 expressziót, kiegészítve a stromális immunsejt denzitással NSCLC-ben, platinabázisú neoadjuváns kemoterápia előtt és után. Eredményünk megerősíti, hogy a kemoterápiát követően a betegek nem elhanyagolható arányában csökken a tumorsejtek PD-L1 expressziója. Mivel ez gátolhatja az immunellenőrzőpont-gátló terápia alkalmazhatóságát, ezért a kezelés megkezdése előtt – amennyiben nincs klinikai kontraindikációja – javasolt rebiopszia elvégzése és a PD-L1 expresszió újbóli megítélése.

Eredményeink az immunterápia elsővonalbeli alkalmazását támogatják.

8.5. Epilógus

A jelen dolgozat a PhD fokozat elnyerése óta (1999) eltelt 20 év kutatásainak eredményeit öleli fel. Ez alatt az időszak alatt a tüdőrák diagnosztikájában és terápiájában látványos és kedvező fordulatok következtek be. 15 éve megjelentek az EGFR mutáció prediktív értékét bizonyító publikációk, 5 évvel ezelőtt pedig már az EGFR-TKI rezisztencia mutáció megjelenésekor alkalmazható harmadik-generációs tirozinkináz-inhibitor is hozzáférhetővé vált. Ezzel egyidőben az onkopulmonológiában paradigmaváltás következett be az immunterápiák megjelenése révén. Mindezek a változások nagyban elősegítették a tüdőrák prognosztikai és prediktív markereit célzó transzlációs kutatásokat. Munkánk során igyekeztünk követni a nemzetközi kutatási irányvonalakat, és lépést tartani a nemzetközi színvonallal, ugyanakkor megpróbáltuk kihasználni a hazai tüdőrákos betegek ellátásának sajátosságaiból adódó előnyöket. Gondolok itt elsősorban a centralizált ellátásra, ami nagy beteglétszámú, relatíve homogén vizsgálati kohorszok kialakítását tette lehetővé, és számos esetben biztosította a klinikai utánkövetés feltételeit. Mindemellett fontos kihangsúlyozni a klinikum és a patológiai és molekuláris genetikai laboratóriumi háttér szoros és gyümölcsöző együttműködését. A hazai műhelymunka mellett néhány vizsgálatra rangos nemzetközi kollaborációk keretében kerülhetett sor. A széleskörű szakmai összefogás mellett elengedhetetlenek voltak a pályázati támogatások. Ezek közül kiemelendő a Nemzeti Agykutatási Program támogatása, amely elősegítette egy lendületes kutatócsoport létrejöttét, és emellett anyagi forrásokat is biztosított az inspiráló munkákhoz. Ennek segítségével sikerült kialakítani azokat a szövetarchívumokat, amelyek lehetővé teszik agyi áttétet adó tüdőrákok genomikai elemzését is. Reményeim szerint az eredmények azt bizonyítják, hogy közös gondolkodással és egymást segítő együttműködéssel hazai kutatások révén is elérhetők nemzetközi szintű eredmények. Ismervén a tüdőrák magyarországi epidemiológiai adatait, erre manapság nagy szükség van, és lesz a jövőben is.

9. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Elsők között bizonyítottuk, hogy a TTF-1 protein expresszió vizsgálata alkalmas a primer és áttéti tüdő adenocarcinomák elkülönítésére. [1]
2. Elsőként írtuk le tüdőrákban, illetve annak különböző szövettani altípusaiban a claudin-1, -2, -3, -4 és -7 protein és mRNS expressziót. Az egyes szövettani csoportok közt megfigyelt expressziós különbségek felvetik a claudinok differenciáldiagnosztikai szerepét, egyes claudinok overexpressziója pedig terápiás jelentőségű lehet. Ugyancsak elsőként írtuk le, hogy tüdő laphámrákban a fokozott claudin-1 expresszió kedvező prognózissal társul. [2, 3]
3. Elsőként számoltunk be arról, hogy a centrális tüdő adenocarcinomákban korábban jelennek meg távoli szervi áttétek, továbbá, hogy míg centrális daganatokban a csontáttét, úgy perifériás daganatokban a tüdőáttét a gyakoribb. Kimutattuk emellett, hogy a pleurális áttétek főként az alsó lebenyekből kiinduló daganatokból származnak. Agyi áttétet adó, 575 tüdőrák vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a peritumorális agyödéma adenocarcinomában a legkifejezettebb, ezt követi a laphámrák, majd a kissejtes tüdőrák. *Brain only* metasztázis esetén a primer tüdőrákok gyakrabban perifériás elhelyezkedésűek, és esetükben szignifikánsan hosszabb az agyi áttét megjelenéséig eltelt idő. [4, 5]
4. Igazoltuk, hogy nem-kissejtes tüdőrákban az emelkedett kollagén XVII, CD44v6 és caspase-9, valamint a csökkent β -catenin és CAS protein expresszió szignifikáns kapcsolatot mutat a primer tüdőrák agyi áttétképző potenciáljával. Kimutattuk, hogy a β -catenin vesztés és delokalizáció a rossz prognózis egyváltozós előrejelzője. Igazoltuk, hogy tüdő laphámrákok agyi áttéteiben a csökkent CD44v6 expresszió korrelál a fokozott peritumorális ödémával. Kimutattuk, hogy a p-mTOR, p-S6 és Rictor expresszió magasabb agyi áttétekben, mint primer tüdőrákokban. [6-8]
5. Tüdő adenocarcinomában demonstrálni tudtuk a ciszplatin kezelésnek a daganatra gyakorolt mutagén hatását, és ezen információ felhasználásával, továbbá a primer tumor és a különböző szervi metasztázisok genomszekvenciáinak részletes elemzésével meg tudtuk alkotni a daganatevolúció modelljét. [9]
6. Elsőként közöltünk Közép-Európából EGFR mutáció gyakoriságra és terápiás válaszarányra vonatkozó átfogó eredményeket, és már 2008-ban hangsúlyoztuk, hogy

önmagában az immunhisztokémia nem megfelelő, hanem DNS szekvencia analízissel kell az EGFR státuszt meghatározni. Nagy betegkohorszon kimutattuk, hogy a ritka EGFR mutációk többsége dohányzáshoz kötött, csökkent EGFR-TKI érzékenységgel társul és rövidebb túléléssel jár, mint a klasszikus EGFR mutációk. Tüdő adenocarcinomák szövettani altípusaiban (lepidikus terjedést mutató/nem mutató) igazoltuk, hogy az EGFR mutáció csak a daganatok töredékében vezet az EGFR autofoszforylációjához. Kimutattuk emellett, hogy metodikai módosítások, így például a primer antitest inkubációs idejének megnyújtása, valamint a javasolt proteáz emésztés helyett mikrohullámú sütőben történő antigén feltárás, nagymértékben fokozzák az EGFR immunhisztokémiai reakció szenzitivitását. [10-14]

7. Igazoltuk, hogy a KRAS mutáció altípusának prognosztikai és prediktív jelentősége van. Emellett 500 beteg vizsgálata alapján kimutattuk, hogy a KRAS mutáció gyakoriság tüdő adenocarcinomában metasztázis hely-specifikus variabilitást mutat, csontáttét esetén pedig független, kedvezőtlen prognosztikai faktor. [15-17]
8. Elsőként írtuk le tüdő adenocarcinomában, hogy a tumor nekrosis szoros pozitív korrelációt mutat a tumorsejtek és az immunsejtek PD-L1, valamint az immunsejtek PD-1 expressziójával. 208 agyi áttéti minta vizsgálata során elsőként mutattuk ki, hogy az immunsejt infiltráció és különösen a peritumorális mononukleáris gyűrű jelenléte kedvező túléléssel párosul tüdő adenocarcinomában. Leírtuk továbbá, hogy a primer tumor sebészi eltávolítása és multiplex agyi áttét esetén az alacsony PD-1/PD-L1 expresszió kedvezőbb túléléssel jár. *Primer tumor-agyi áttét* adenocarcinoma mintapárok elemzése alapján elsőként írtuk le, hogy a tumorsejtek PD-L1 expresszióját illetően szoros korreláció figyelhető meg a primer tüdőtumорок és agyi áttéteik között, amit érdemben nem befolyásol a kemo-, radio- és szteroid terápia. [18-20]
9. Kemoterápia előtti és utáni szövetminta párok elemzésével igazoltuk, hogy nem-kissejtes tüdőrákban a platinabázisú kemoterápiát követően csökken az ERCC1 protein expresszió, és ez a csökkenés kifejezettebb laphámrákban. Emellett primer tüdőrákban elsőként írtuk le komplexen a PD-1 és PD-L1 expressziót, kiegészítve a stromális immunsejt denzitással, platinabázisú kemoterápia előtt és után, továbbá megerősítettük, hogy a kemoterápiát követően a betegek nem elhanyagolható arányában csökken a tumorsejtek PD-L1 expressziója, aminek jelentős terápiás konzekvenciája lehet. [21-23]

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálásan köszönöm Mentoromnak, Prof. Schaff Zsuzsanna akadémikus asszonynak a sok segítséget, és hogy pályám kezdete óta irányította és támogatta a kutatómunkámat.

Köszönetet szeretnék mondani a SOTE III. sz. Belgyógyászati Klinika 1979-1981 között a Szabadsághegyen dolgozó Munkatársainak, akiktől a gyógyításba vetett hitet kaptam, és a betegekkel való törődést tanultam, és akik döntő hatással voltak pályaválasztásomra.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet korábbi vezetőinek, Lapis Károly és Szende Béla professzor uraknak, hogy elindítottak a patológusi és a kutatói pályán, és azért is, hogy végül megbocsájtották, hogy klinikus lettem. Köszönettel tartozom a jelenlegi vezetőnek, Matolcsy András professzor úrnak azért, hogy az Intézettel folyamatos szakmai és baráti kapcsolatban maradhattam. A tüdőgyógyász-onkológus pályán köszönöm Strausz János, Magyar Pál és Losonczy György professzor uraknak a biztatást, és Kovács Gábor főigazgató úrnak a bizalmat és a támogatást.

Köszönöm Christian Bréchet professzornak, hogy az 1991-1993 közötti párizsi kutatómunkám során megismerkedhettem – akkor még világviszonylatban is – újdonságnak számító molekuláris biológiai módszerekkel. Köszönöm Nadine Martinet-nek és Jean-Michel Vignaud-nak, hogy Nancyban végzett kutatásaim alapját képezhették PhD értekezésemnek.

Hálásan köszönöm Szállási Zoltánnak, hogy – részben a Nemzeti Agykutatási Program keretében – klinikus tagja lehettem és lehetek rangos hazai és nemzetközi kutatócsoportokat egyesítő Csapatának, amelyből elsősorban Reiniger Lillának, Pipek Orsolyának, Vízkeleti Laurának, Szűts Dávidnak és Csabai Istvánnak mondok köszönetet az egymást segítő, harmonikus közös munkáért.

Az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetből köszönöm a Tumorsebiológiai Osztálynak és vezetőjének, Döme Baláznak a támogató együttműködést, a Patológiai Osztályról pedig Fillinger Jánosnak és Harkó Tündének a nélkülözhetetlen segítséget.

Köszönöm a klinikus Kollégáknak, legfőképpen Rojkó Líviának, Agócs Lászlónak és Bogos Krisztinának a lelkesedést és a közös munka örömét.

Köszönettel tartozom Gőbel Lászlónak a betegek adatbázisainak kialakításában nyújtott pótolhatatlan informatikai segítségéért, valamennyi Orvostudományi Kollégának, Nővérnek és Asszisztensnek az együttműködésért, a Betegeknek pedig az önzetlen támogatásért.

Külön köszönöm az értékes szakmai tanácsokat és a sikeres együttműködést az alábbi Kollégáknak, bár a felsorolás korántsem lehet teljes: Tímár József, Rásó Erzsébet, Kovalszky Ilona, Kopper László, Krenács Tibor, Kiss András professzorok, Pápay Judit, Jäckel Márta, Furák József, Tizslavicz László, Fábián Katalin, Téglási Vanda, Bagó Attila, Peták István, Schwab Richárd, Thomas Klikovits, Hegedűs Balázs és Lohinai Zoltán.

Nagy megtiszteltetés volt számomra együtt dolgozni Charles Swanton londoni és Emilio Casanova bécsi professzorokkal és Munkatársaikkal.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm Szüleimnek, hogy mindvégig támogatták álmaim megvalósítását, és Férjemnek, Czimmermann Tibornak, valamint Dóri lányomnak és Lackó fiamnak, hogy szeretettel és türelemmel segítettek megteremteni és megőrizni az egyensúlyt a szakmai- és a magánélet között.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK BIBLIOGRÁFIAI ADATAI

11.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények [1-23]

1. The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. **Moldvay J**, Jackel M, Bogos K, Soltész I, Agócs L, Kovács G, Schaff Z. *Pathol Oncol Res.* 2004;10(2):85-8.
2. Distinct claudin expression profile in histologic subtypes of lung cancer. **Moldvay J**, Jäckel M, Páska C, Soltész I, Schaff Z, Kiss A. *Lung Cancer.* 2007 Aug;57(2):159-67. Epub 2007 Apr 6.
3. Claudin-1 Protein Expression Is a Good Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer, but only in Squamous Cell Carcinoma Cases. **Moldvay J**, Fábián K, Jäckel M, Németh Z, Bogos K, Furák J, Tiszlavicz L, Fillinger J, Döme B, Schaff Z. *Pathol Oncol Res.* 2017 Jan;23(1):151-156. doi: 10.1007/s12253-016-0115-0. Epub 2016 Sep 29.
4. Primary location of lung adenocarcinoma correlates with metastatic site and sequence – central tumors give rise to early metastases and are associated with bone involvement and decreased survival. Klikovits T, Lohinai Z, Fábián K, Gyulai M, Szilasi M, Varga J, Baranya E, Pipek O, Csabai I, Szállási Z, Tímár J, Hoda MA, Laszlo V, Hegedűs D, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Döme B, **Moldvay J**. *Lung Cancer.* 2018 Dec;126:139-148. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.11.004. Epub 2018 Nov 5.
5. Significance of Primary Tumor Location and Histology for Brain Metastasis Development and Peritumoral Brain Edema in Lung Cancer. Fábián K, Gyulai M, Furák J, Várallyay P, Jäckel M, Bogos K, Döme B, Pápay J, Tímár J, Szállási Z, **Moldvay J**. *Oncology.* 2016;91(5):237-242.
6. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. Papay J, Krenacs T, **Moldvay J**, Stelkovics E, Furak J, Molnar B, Kopper L. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007 Mar;15(1):19-30.
7. Protein expression differences between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma with brain metastasis. Fábián K, Németh Z, Furák J, Tiszlavicz L, Pápay J, Krenács T, Tímár J, **Moldvay J**. *Anticancer Res.* 2014 Oct;34(10):5593-7.
8. Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. Krencz I, Sebestyén A, Fábián K, Márk Á, **Moldvay J**, Khoor A, Kopper L, Pápay J. *Hum Pathol.* 2017 Apr;62:66-73. doi: 10.1016/j.humpath.2016.12.012. Epub 2016 Dec 24.
9. Genomic imprint of mutagenic platinum chemotherapy provides evidence for timing the formation of metastases in a young non-smoking lung cancer patient. Németh E, Krzystanek M, Reiniger L, Glasz T, Csabai I, **Moldvay J**, Szállási Z, Szűts D. *Int J Cancer.* 2019 Jan 29. doi: 10.1002/ijc.32159. Epub 2019 Feb 18.
10. Modern treatment of lung cancer: case 1. Amplification and mutation of the epidermal growth factor receptor in metastatic lung cancer with remission from gefitinib. Schwab R, Pinter F, **Moldvay J**, Papay J, Strausz J, Kopper L, Keri G, Pap A, Petak I, Oreskovich K, Mangel L. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23(30):7736-8.
11. Epidermal growth factor receptor (EGFR) high gene copy number and activating mutations in lung adenocarcinomas are not consistently accompanied by positivity for EGFR protein by standard immunohistochemistry. Pinter F, Papay J, Almasi A, Sapi Z, Szabo E, Kanya M, Tamasi A, Jori B, Varkondi E, **Moldvay J**, Szondy K, Keri G, Dominici M, Conte P, Eckhardt S, Kopper L, Schwab R, Petak I. *J Mol Diagn.* 2008 Mar;10(2):160-8. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070125.
12. Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, Barbai T, Timar J, Kovalszky I, Cserepes M, Rozsas A, Laszlo V, Grusch M, Berger W, Klepetko W, **Moldvay J**, Dome B, Hegedus B. *J Thorac Oncol.* 2015 May;10(5):738-46. doi: 10.1097/JTO.0000000000000492.

13. Protocol modifications influence the result of EGF receptor immunodetection by EGFR pharmDx in paraffin-embedded cancer tissues. Derecskei K, **Moldvay J**, Bogos K, Tímár J. *Pathol Oncol Res.* 2006;12(4):243-6. Epub 2006 Dec 25.
14. EGFR autophosphorylation but not protein score correlates with histologic and molecular subtypes in lung adenocarcinoma. **Moldvay J**, Barbai T, Bogos K, Piurko V, Fillinger J, Popper HH, Tímár J. *Diagn Mol Pathol.* 2013 Dec;22(4):204-9. doi: 10.1097/PDM.0b013e3182936957.
15. Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J, Rozsas A, **Moldvay J**, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. *Eur J Cancer.* 2014 Jul;50(10):1819-28. doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.001. Epub 2014 Apr 22.
16. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. Lohinai Z, Klikovits T, **Moldvay J**, Ostoros G, Raso E, Timar J, Fabian K, Kovalszky I, Kenessey I, Aigner C, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Dome B, Hegedus B. *Sci Rep.* 2017 Jan 4;7:39721. doi: 10.1038/srep39721.
17. Afatinib restrains K-RAS driven lung tumorigenesis. Moll H, Pranz K, Musteanu M, Grabner B, Hruschka N, Mohrher J, Aigner P, Stiedl P, Brcic L, Laszlo V, Schramek D, Moriggl R, Eferl R, **Moldvay J**, Dezso K, Lopez-Casas P, Stoiber D, Hidalgo M, Penninger J, Sibilia M, Győrffy B, Barbacid M, Dome B, Popper H, Casanova-Hevia C. *Sci Transl Med.* 2018 Jun 20;10(446). pii: eaao2301. doi: 10.1126/scitranslmed.aao2301.
18. Lepidic growth pattern and the presence of necrosis correlate with PD-L1 and PD-1 expression in lung adenocarcinoma. Reiniger L, Téglási V, Pipek O, Rojkó L, Glasz T, Vágvolgyi A, Kovalszky I, Gyulai M, Lohinai Z, Rásó E, Tímár J, Döme D, Szállási Z, **Moldvay J**. *Acta Oncol.* 2019 Apr 19:1-8. doi: 10.1080/0284186X.2019.1598575. Epub 2019 Apr 19.
19. Evaluating the significance of density, localization, and PD-1/PD-L1 immunopositivity of mononuclear cells in the clinical course of lung adenocarcinoma patients with brain metastasis. Téglási V, Reiniger L, Fábián K, Pipek O, Csala I, Bagó AG, Várallyai P, Vízkeleti L, Rojkó L, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Swanton C, **Moldvay J**. *Neuro Oncol.* 2017 Aug 1;19(8):1058-1067. doi: 10.1093/neuonc/now309.
20. PD-L1 expression of lung cancer cells, unlike infiltrating immune cells, is stable and unaffected by therapy during brain metastatization. Téglási V, Pipek O, Lózsa R, Berta K, Szüts D, Harkó T, Vadász P, Rojkó L, Döme B, Bagó AG, Tímár J, **Moldvay J**, Szállási Z, Reiniger L. *Clin Lung Cancer.* 2019 Sep;20(5):363-369.e2. doi: 10.1016/j.clcc.2019.05.008. Epub 2019 May 15.
21. Platinum-based chemotherapy in lung cancer affects the expression of certain biomarkers including ERCC1. Pápay J, Sápi Z, Egri G, Gyulai M, Szende B, Losonczy G, Tímár J, **Moldvay J**. *Pathol Oncol Res.* 2009 Sep;15(3):445-50. doi: 10.1007/s12253-009-9155-z.
22. Decreased ERCC1 Expression After Platinum-Based Neoadjuvant Chemotherapy in non-Small Cell Lung Cancer. Podmaniczky E, Fábián K, Pápay J, Puskás R, Gyulai M, Furák J, Tiszlavicz L, Losonczy G, Tímár J, **Moldvay J**. *Pathol Oncol Res.* 2015 Apr;21(2):423-31. doi: 10.1007/s12253-014-9839-x. Epub 2014 Sep 7.
23. Chemotherapy treatment is associated with altered PD-L1 expression in lung cancer patients. Rojkó L, Reiniger L, Téglási V, Fábián K, Pipek O, Vágvolgyi A, Agócs L, Fillinger J, Kajdácsi Z, Tímár J, Döme B, Szállási Z, **Moldvay J**. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Jul;144(7):1219-1226. doi: 10.1007/s00432-018-2642-4. Epub 2018 Apr 19.

11.2. A disszertáció témájában megjelent közlemények

1. Biswas D., Birkbak N.J., Rosenthal R., Hiley C.T., Lim E.L., Papp K., Boeing S., Krzystanek M., Djureinovic D., La Fleur K., Greco M., Döme B., Fillinger J., Brunnström H., Wu Y., Moore D.A., Skrzypski M., Abbosh C., Al Bakir M., Watkins T.B.K., Veeriah S., Wilson G.A., Jamal-Hanjani M., **Moldvay J.**, Botling J., Chinnaiyan A.M., Micke P., Bartek J., Csabai I., Szallasi Z., Herrero J., McGranahan N., Swanton C. on behalf of the TRACERx consortium. A clonal expression biomarker associates with lung cancer mortality. (2019) *NATURE MEDICINE*, 2019 Oct 7. doi: 10.1038/s41591-019-0595-z. [Epub ahead of print]
2. Mohrherr J., Haber M., Breitenacker K., Aigner P., Moritsch S., Voronin V., Eferl R., Moriggl R., Stoiber D., Györfy B., Brcic L., László V., Döme B., **Moldvay J.**, Dezsó K., Bilban M., Popper H., Moll H.P., Casanova E. (2019) JAK-STAT inhibition impairs K-RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER*, 2019 Aug 12. doi: 10.1002/ijc.32624. Epub 2019 Sep 10.
3. Bogos K.*, Kiss Z.*, Gálffy G., Tamási L., Ostoros Gy., Müller V., Urbán L., Bittner N., Sárosi V., Vastag A., Polányi Z., Nagy-Erdei Zs., Vokó Z., Nagy B., Horváth K., Rokszin Gy., Abonyi-Tóth Zs. **Moldvay J.** (2019) Revising Incidence and Mortality of Lung Cancer in Central Europe: Epidemiology Overview From Hungary. *FRONTIERS IN ONCOLOGY*, 2019 Oct 23;9:1051. doi: 10.3389/fonc.2019.01051.
4. Ghimesy A.K., Gellert A., Schlegl E., Hegedus B., Raso E., Barbai T., Timar J., Ostoros G., Megyesfalvi Z., Gieszer B., **Moldvay J.**, Renyi-Vamos F., Lohinai Z., Hoda M.A., Klikovits T., Klepetko W., Laszlo V. Dome B. (2019) KRAS Mutations Predict Response and Outcome in Advanced Lung Adenocarcinoma Patients Receiving First-Line Bevacizumab and Platinum-Based Chemotherapy. *CANCERS (Basel)*, 2019 Oct 9;11(10). pii: E1514. doi: 10.3390/cancers11101514.
5. Lohinai Z., Megyesfalvi Zs., Suda K., Harko T., Ren S., **Moldvay J.**, Rivard C., Dome B., Hirsch FR. (2019) Comparative expression analysis in small cell lung carcinoma reveals neuroendocrine pattern change in primary tumor versus lymph node metastases. *TRANSLATIONAL LUNG CANCER RESEARCH*, doi: 10.21037/tlcr.2019.11.30, *In press*
6. Bogos K., Kiss Z., Gálffy G., Tamási L., Ostoros Gy., Müller V., Urbán L., Bittner N., Sárosi V., Vastag A., Polányi Z., Nagy-Erdei Zs., Vokó Z., Nagy B., Horváth K., Rokszin Gy., Abonyi-Tóth Zs., **Moldvay J.** (2019) Lung Cancer in Hungary. *JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY*, doi: 10.1016/j.jtho.2019.11.001, *In press*
7. Téglási V., **Moldvay J.**, Szállási Z., Reiniger L. (2019) [Possibilities of immune checkpoint inhibitor therapy for patients with metastatic non-small cell lung cancer]. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 2019 Sep 18;63(3):233-238. Epub 2019 Jul 26. Hungarian.
8. Lohinai Z., Bonanno L., Aksarin A., Pavan A., Megyesfalvi Zs., Santa B., Hollosi V., Hegedus B., **Moldvay J.**, Conte P., Ter-Ovanesov M., Bilan E., Dome B., Weiss G.J. (2019) Neutrophil-lymphocyte ratio is prognostic in early stage resected small-cell lung cancer. *PEERJ*, 2019 Jul 29;7:e7232. doi: 10.7717/peerj.7232. eCollection 2019.
9. Fabian K., Puskas R., Kakuk T., Pres L., Fejes D., Szegedi Z., Rojko L., Szallasi Z., Dome B., Pipek O., **Moldvay J.** (2018) Renal Impairment Hampers Bisphosphonate Treatment in a Quarter of Lung Cancer Patients with Bone Metastasis. *BASIC CLINICAL PHARMACOLOGY TOXICOLOGY*, 122(1), 126–132.
10. **Moldvay J.**, Bogos K. (2018) Molekuláris célzott terápia tüdőrákban – Nemzetközi elmélet, hazai gyakorlat. *MEDICINA THORACALIS*, 71(6), 355–365.
11. **Moldvay J.** (2018) A betegszelekció etikai kérdései – Vitaindító. *MEDICINA THORACALIS*, 71(6), 377–380.

12. Bogos K., Sárosi V., Agócs L., Balikó Z., Csada E., Gálffy G., Horváth Á., **Moldvay J.**, Pápai-Székely Zs., Szilasi M., Szondy K., Ostoros G. (2018) Multidiszciplináris team szerepe a tüdőrák ellátásában. *MEDICINA THORACALIS*, 71(5), 295–296.
13. Rich A., Baldwin D., Alfageme I., Beckett P., Berghmans T., Brincat S., Burghuber O., Corlateanu A., Cufer T., Damhuis R., Danila E., Domagala-Kulawik J., Elia S., Gaga M., Goksel T., Grigoriu B., Hillerdal G., Huber R.M., Jakobsen E., Jonsson S., Jovanovic D., Kavcova E., Konsoulova A., Laisaar T., Makitaro R., Mehic B., Milroy R., **Moldvay J.**, Morgan R., Nanushi M., Paesmans M., Putora P.M., Samarzija M., Scherpereel A., Schlessner M., Sculier J.P., Skrickova J., Sotto-Mayor R., Strand T.E., Van Schil P., Blum T. (2018) Achieving Thoracic Oncology data collection in Europe: a precursor study in 35 Countries. *BMC CANCER*, 18(1) 1144.
14. Timar J., Lotz G., Raso E., **Moldvay J.** (2017). Az ALK-pozitív tüdőrák korszerű diagnosztikája. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 61(3), 301–311.
15. Krzystanek M., **Moldvay J.**, Szuts D., Szallasi Z., Eklund A. (2016) A robust prognostic gene expression signature for early stage lung adenocarcinoma. *BIOMARKER RESEARCH*, 4: 4.
16. Lohinai Z., Ostoros G., **Moldvay J.**, Dome B., Hegedus B. (2016) Differences in the Epidemiology of Rare EGFR Mutations in Different Populations. *JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY*, 11(1), e19–e20.
17. Lohinai Z., Dome P., Szilagyi Z., Ostoros G., **Moldvay J.**, Hegedus B., Dome B., Weiss G. (2016) From Bench to Bedside: Attempt to Evaluate Repositioning of Drugs in the Treatment of Metastatic Small Cell Lung Cancer (SCLC). *PLOS ONE*, 11(1):e0144797.
18. **Moldvay J.**, Ostoros G. (2016) Támadás helyett önvédelem - Immunterápia tüdőrákban. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 60(1), 28–33.
19. Puskás R., **Moldvay J.**, Reiniger L., Bagó A., Bajcsay A., Gálffy G. (2016) Ritka EGFR mutációt hordozó tüdő adenocarcinómában szenvedő beteg hosszútávú kezelése. *MEDICINA THORACALIS*, 69(4), 239–242.
20. Lohinai Z., Ostoros G., **Moldvay J.**, Dome B., Hegedus B. (2015) Reply to Rare Versus Artifactual EGFR Mutations. *JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY*, 10(8), e80–e81.
21. **Moldvay J.**, Szallasi Z., Puskas R., Komaromi T., Fabian K., Kovalszky I., Papay J. (2015) Bone metastasis with Histology Different from The Primary Lung Cancer and The Skin Metastasis. *TRANSLATIONAL BIOIMEDICINE*, 6(2).
22. **Moldvay J.**, Rokszin G., Abonyi-Tóth Z., Katona L., Fábíán K., Kovács G. (2015) Lung cancer drug therapy in Hungary - 3-year experience. *ONCOTARGETS AND THERAPY*, 8, 1031–1038.
23. **Moldvay J.** (2015) Az afatinib hatásossága tüdőrák okozta agyi metasztázisokban. *MEDICINA THORACALIS* 68(1), 22–27.
24. Puskás R., **Moldvay J.**, Gálffy G. (2015) Primer adenocarcinoma sikeres kezelése gefitinib-terápiával első vonalban. *MEDICINA THORACALIS*, 68(3), 240–242.
25. **Moldvay J.**, Papay J., Kovalszky I., Balazs G., Puskas R., Losonczy G. (2014) Rebiopszia és ismételt gefitinibkezeléssel elért remisszió tüdőrákban. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 58(2), 133–137.
26. Fábíán K., Furák J., Gyulai M., Jackel M., Várallyay P., Papay J., Losonczy Gy., **Moldvay J.** (2013) Agyi áttétet adó tüdőrákok klinikopatológiai analízise. *MEDICINA THORACALIS*, 66(3), 106–112.
27. **Moldvay J.**, Rokszin G., Abonyi-Tóth Z., Katona L., Kovács G. (2013) A tüdőrák hazai gyógyszeres kezelésének elemzése. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 57(1), 33–38.
28. Fábíán K. **Moldvay J.** (2012) Az agyi áttétek körül kialakuló peritumoralis ödéma jelentősége a tüdőrákban. *MEDICINA THORACALIS*, 65(1), 17–25.

29. **Moldvay J.** (2012) Az ALK+ adenocarcinoma, mint önálló tüdőrák entitás. *ONKOLÓGIA*, 2(5), 305–306.
30. **Moldvay J.** (2012) Klinikopatológia a nem-kissejtes tüdőrák diagnosztikájában és terápiájában: Patológia a klinikumban. *MEDICINA THORACALIS*, 65(2), 107–109.
31. **Moldvay J.,** Peták I. (2012) EGFR-tirozinkináz-inhibitorok alkalmazása tüdőrákban: szenzitivitás és rezisztencia. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 56(1), 38–49.
32. **Moldvay J.** (2012) Személyre szabott kezelés nem-kissejtes tüdőrákban – a diagnosztikától a terápiáig. *ORVOSI HETILAP*, 153(23), 909–916.
33. Ostoros G., Bajcsay A., Balikó Z., Borbély K., Csekeő A., Fillinger J., Gődény M., Horváth Á., Kecskés L., Kopper L., Kovács G., Losonczy Gy., **Moldvay J.**, Molnár F.T., Monostori Zs., Rahóty P., Orosz Zs., Strausz J., Szentirmay Z., Szilágyi I., Szondy K., Tímár J., Tolnay E. (2012) A tüdőrák megelőzésének, diagnosztikájának és kezelésének alapelvei. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 56(2), 114–132.
34. **Moldvay J.,** Pápay J., Puskás R., Furák J., Losonczy G., Matolcsy A. (2011) ERCC1-expresszió vizsgálata platinabázisú kezelésben részesülő tüdőrákos betegekben. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 55(2), 105–109.
35. **Moldvay J.** (2009) A tüdőtumorkok célzott terápiája. *ORVOSKÉPZÉS*, 84(3), 171–178.
36. **Moldvay J.** (2010) Onkopulmonológia háziorvosi szemmel. *MAGYAR CSALÁDORVOSOK LAPJA*, 2010(6), 3–9.
37. **Moldvay J.** (2008) Bronchio-alveolaris carcinoma. *MOTESZ MAGAZIN*, (1), 19–24.
38. **Moldvay J.** (2007) A molekuláris biológia szerepe a tüdőrák elleni harcban. *MEDICINA THORACALIS*, 60(3), 142–149.
39. **Moldvay J.** (2007) Életkor és performance státusz mint prognosztikai faktorok. *MEDICINA THORACALIS*, 60(6), 392–395.
40. **Moldvay J.** (2007) Az egyénre szabott molekulárisan célzott terápia és a kemoterápia költségei tüdőrák esetében. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 51(3), 191–196.
41. **Moldvay J.** (2006) Levél a szerkesztőhöz a *Nem-kissejtes tüdőrákok Her-2 expressziójáról* szóló cikkhez. *MEDICINA THORACALIS*, 59(2), 73–74.
42. Schwab R., Peták I., Pintér F., Szabó E., Kánya M., Tamási A., Várkonyi E., Almási A., Szokolci O., Pápay J., **Moldvay J.**, Kéri Gy., Kopper, L. (2005) Epidermális növekedési factor receptor (EGFR): célpont a tüdő adenocarcinomájának kezelésében. *ORVOSI HETILAP*, 146(46), 2335–2342.
43. **Moldvay J.** (2004) Célba találhat a tüdőrák molekuláris célterápiája? *MEDICINA THORACALIS*, 57(3), 108–110.
44. Kovács G., **Moldvay J.**, Ostoros G., Szondy K., Tóth E. (2001) A gemcitabin (Gemzar) hatásossága és költség-hatékonysága a nem kissejtes tüdőrák kezelésében. *TÉNYEKEN ALAPULÓ ORVOSLÁS – TAO*, 3(Supplement A), 12.
45. **Moldvay J.** (2000) Tumor markerek és prognosztikai faktorok primer hörgőrákban. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 44(3), 195–202.
46. **Moldvay J.,** Scheid P., Wild P., Nabil K., Siat J., Borrelly J., Marie B., Farré G., Labib T., Pottier G., Sesboué R., Bronner C., Vignaud J-M, Martinet Y. Martinet N. (2000) Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. *CLINICAL CANCER RESEARCH*, 6(3), 1125–1134.
47. **Moldvay J.,** Strausz J., Egerváry M., Agócs L., Bocsi J., Schaff Z. (1998) P53 expression in stage I squamous cell lung cancer. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH*, 4(1), 8–13.

11.3. A disszertáció témájában megjelent könyvfejezetek

1. **Moldvay J.** (2013) A nem-kissejtes tüdőrák adjuváns kezelése. In *Bodoky, Gy., Kopper, L. (szerk.) Tüdő- és mediastinalis onkológia*. Semmelweis kiadó, 164–168.
2. **Moldvay J.** (2012) A tüdőcarcinoma epidemiológiája, etiológiája, patológiája, molekuláris biológiája. In: *Magyar, Pál., Losonczy, Gy. (szerk.) A pulmonológia kézikönyve*. Medicina Könyvkiadó, 625–631.
3. **Moldvay J.** (2011) A tüdő daganatai. In *Tulassay, Zs., Matolcsy, A. (szerk.) Az onkológia tankönyve*, Semmelweis Kiadó, 379–389.
4. **Moldvay J.** (2010) A karcinogenezis molekuláris mechanizmusai. In *Kovács Gábor (szerk.) Dohányzás és leszokás*, Medicina Könyvkiadó, 156–162.
5. **Moldvay J., Ostoros G., Szondy K.** (2009) Tüdődaganatok. In *Jeney, A., Kralovánszky, J. (szerk.) Onkofarmakológia*, Medicina Könyvkiadó, 895–914.
6. Kopper L., **Moldvay J.** (2006). A tüdőrák molekuláris jellemzői. In *Kovács, G., Ostoros, Gy., Szondy, K. (szerk.) Tüdőrák a gyakorlatban és a mellhártya mezoteliómája*. Medicina Könyvkiadó, 25–37.
7. **Moldvay J.** (2006) A tüdő daganatos megbetegedései. In: *Magyar, P., Pálffy, L., Bártfai, Z. (szerk.) Egészségügyi szakdolgozók tüdőgyógyászati kézikönyve*. Medicina Könyvkiadó, 305–321.
8. **Moldvay J., Ostoros G., Szondy K.** (2005) Tüdődaganatok. In *Jeney, A., Kralovánszky, J. (szerk.) Onkofarmakológia*, Medicina Könyvkiadó, 845–860.
9. Kopper L., **Moldvay, J** (2004) A tüdőrák molekuláris biológiája. In *Kovács, G., Ostoros, Gy., Szondy, K. (szerk.) Tüdőrák a gyakorlatban és a mellhártya mezoteliómája*. Medicina Könyvkiadó, 23–34.

11.4. Egyéb közlemények

1. Molnar I., Molnar B., Vizkeleti L., Fekete K., Tamas J., Deak P., Szundi C., Székely B., **Moldvay J.**, Vári-Kakas S., Szász M.A., Ács B., Kulka J. Tokes A. (2017) Breast carcinoma subtypes show different patterns of metastatic behavior. *VIRCHOWS ARCHIV*, 470(3), 275–283.
2. **Moldvay J.**, Hegedűs B., Kovács I., Döme B. (2016) A mesothelioma korszerű kezelése. *KLINIKAI ONKOLÓGIA* 3(1), 19–28.
3. Hegedűs B., **Moldvay J.**, Berta J., Lohinai Z., Rozsás A., Cserepes M., Fábíán K., Ostoros G., Tóvári J., Rényi-Vámos F., Tímár J. Döme B. (2015) Szemelvények a Semmelweis Egyetem, az Országos Onkológiai Intézet és az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet együttműködésén alapuló tüdőrák-kutatási programból. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 59(4), 282–285.
4. **Moldvay J.** (2012) Áttéti tüdődaganatok. In *Magyar, P., Losonczy, Gy. (szerk.) A pulmonológia kézikönyve*. Medicina Könyvkiadó, 659–661.
5. **Moldvay J.** (2012) Primer tüdősarcomák, lymphomák, lymphoproliferatív betegségek. In *Magyar, P., Losonczy, Gy. (szerk.) A pulmonológia kézikönyve*. Medicina Könyvkiadó, 654–659.
6. **Moldvay J.** (2011) A mediastinum daganatai. In *Tulassay, Zs., Matolcsy, A. Az onkológia tankönyve*. Semmelweis Kiadó, 390–390.
7. **Moldvay J.** (2011) A mellhártya daganatai. In *Tulassay, Zs., Matolcsy, A. Az onkológia tankönyve*. Semmelweis Kiadó, 389–390.
8. **Moldvay J** (2011) A mellkasi szervek egyéb daganatai. In *Tulassay, Zs., Matolcsy, A. Az onkológia tankönyve*. Semmelweis Kiadó, 390–390.

9. Losonczy G., Máthé C., Müller V., Szondy K., **Moldvay J.** (2010) A cisplatin okozta nefrotoxicitás előfordulása, kockázati tényezői és megelőzése tüdőkarinómás betegekben. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 54(4), 289–296.
10. Bartusek D., **Moldvay J.**, Tímár M., Pápay J., Nahejevszky S., Csomor J., Dolgos J., Losonczy Gy. Gálffy G. (2009) Asztma nyirokcsomó-megnagyobbodással? *MEDICINA THORACALIS*, 62(4), 278–282.
11. **Moldvay J.** (2009) Európai tüdőgyógyász szakvizsga – magyar szemmel. *MEDICINA THORACALIS*, 62(5), 357–358.
12. **Moldvay J.** (2009) Az orvosi pálya választásának motivációi Magyarországon az ezredfordulón. *MEDICINA THORACALIS*, 62(2), 101–107.
13. Pápay J., **Moldvay J.** (2007) Üregárnyék a tüdőben. *LEGE ARTIS MEDICINAE*, 17(8–9), 597.
14. **Moldvay J.** (2007) A nem sürgősségi (tervezhető) beavatkozások feltételrendszere, a bronchosopia előtt kötelezően elvégzendő vizsgálatok. In *Strausz, J. (szerk.) Bronchologia*. Medicina Könyvkiadó, 33–37.
15. **Moldvay J.** (2006) A tiotropium hatása a krónikus obstruktív tüdőbetegség akut exacerbatióira és a légúti áramlásra. *LEGE ARTIS MEDICINAE*, 16(10), 871–873.
16. **Moldvay J.** (2006) Mellkasfájdalom a pulmonológus szemével. *HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE*, 11(10), 998–1004.
17. Kovács G., Dulka E., Márk Z., **Moldvay J.**, Morócz É., Putz Z., Strausz J. (2004) Autofluoreszcens bronchoszkópiával szerzett tapasztalataink. *ORVOSI HETILAP*, 145(28), 1473–1478.
18. Tomcsányi J., Nagy E., Somló M., **Moldvay J.**, Bezzegh A., Bózsik B., Strausz J. (2004) NT-brain natriuretic peptide levels in pleural fluid distinguish between pleural transudates and exudates. *EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE*, 6(6), 753–756.
19. Varga I., Szűcs M. Z., **Moldvay J.**, Jáger M., Szűcs G., Bordás M., Molnár L., Szilasi M., Strausz J. (2004) A bronchoszkópia szerepe a nyelőcsődaganatok kivizsgálásában és kezelésében. *ORVOSI HETILAP*, 145(45), 2285–2288.
20. Hidvégi M., **Moldvay J.**, Lapis K., Ajkay Z. (2003) Fermentált búzacsíra tartalmú készítmény alkalmazásakor javul a tüdőrákos betegek életminősége. *MEDICUS ANONYMUS*, 11(1. különszám), 13–14.
21. **Moldvay J.** (2003) A lassan gyógyuló pneumonia diagnosztikus nehézségei. *ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE*, 10(5), 84–86.
22. **Moldvay J.** (2003) Ritka, malignus tüdődaganat. In *Szende B., Schaff Zs., Zalatnai A. (szerk.) Klinikopatológiai esettanulmányok* Medicina Könyvkiadó, 101–104.
23. **Moldvay J.** (2003). Előrehaladott tüdőrák palliatív kezelése. In *Szende B., Schaff Zs., Zalatnai A. (szerk.) Klinikopatológiai esettanulmányok* Medicina Könyvkiadó, 92–96.
24. **Moldvay J.** (2003) Jóindulatú "csodadaganat." In *Szende B., Schaff Zs., Zalatnai A. (szerk.) Klinikopatológiai esettanulmányok* Medicina Könyvkiadó, 88–91.
25. **Moldvay J.** (2003) Izolált tüdőactinomycosis sikeres gyógyítása. In *Szende B., Schaff Zs., Zalatnai A. (szerk.) Klinikopatológiai esettanulmányok* Medicina Könyvkiadó, 84–87.
26. **Moldvay J.** (2003) Tüdőszűrésen észlelt kiterjedt tüdőelváltozás. In *Szende B., Schaff Zs., Zalatnai A. (szerk.) Klinikopatológiai esettanulmányok* Medicina Könyvkiadó, 79–83.
27. **Moldvay J.** (2003) A Wegener-granulomatosis eredményesen is kezelhető. In *Szende B., Schaff Zs., Zalatnai A. (szerk.) Klinikopatológiai esettanulmányok* Medicina Könyvkiadó, 74–78.
28. **Moldvay J.** (2003) Rapidan progrediáló, fatális kimenetelű pulmonális infiltratio. In *Szende B., Schaff Zs., Zalatnai A. (szerk.) Klinikopatológiai esettanulmányok* Medicina Könyvkiadó, 54–60.
29. **Moldvay, J.** (2002) A COPD okai, rizikótényezői, patológiája és patogenezise. In *Strausz J. (szerk.) Krónikus obstruktív tüdőbetegségek: "A COPD"* 35–49.

30. Adleff V., Rácz K., Szende B., Tóth M., **Moldvay J.**, Varga I., Bezzegh I., Szegedi Zs., Gláz E. (1998) Coexpression of p53 and tissue transglutaminase genes in human normal and pathologic adrenal tissues. *JOURNAL OF SZTEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 66(1–2), 27–33.
31. Kovács G., **Moldvay J.** (1998) A krónikus bronchitis exacerbációjának kezelése, az antibiotikum terápia indikációja. *HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE*, 3(1), 42–45.
32. Rácz K., Adleff V., Bezzegh A., Tóth M., Varga I., Szende B., Moldvay J., Szegedi Zs., Gláz E. (1997) P53 gén expresszió humán mellékvesekéreg daganatokban. *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM*, 50(2), 159–162.
33. Strausz J., Szima B., Pápai Z., Udud K., **Moldvay J.** (1997) A diagnosztikus bronchoszkópia indikációi felnőttkorban. *MEDICINA THORACALIS*, 50(3), 101–107.
34. **Moldvay J.**, Deny P., Pol S., Brechot C., Lamas E. (1995) Hepatitis C vírus RNS kimutatása in situ hibridizációval, fertőzött betegek perifériás vérének mononuclearis sejtjeiben. *ORVOSI HETILAP*, 136(42), 2267–2271.
35. Szima B., Pápai Z., Kis S., Soltész I., Egerváry M., **Moldvay J.**, Strausz J. (1994) Transbronchialis tüdőbiopsiával szerzett tapasztalataink. *ORVOSI HETILAP*, 135(35), 1919–1921.
36. **Moldvay J.**, Deny P., Pol S., Brechot C., Lamas E. (1994) Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization. *BLOOD*, 83(1), 269–273.
37. **Moldvay J.**, Görbe É., Szende B., Papp Z. (1992) Congenital osteogenesis imperfecta associated with arteriopathia calcificans infantum. *ZENTRALBLATT FÜR PATHOLOGIE*, 138, 244–247.
38. **Moldvay J.**, Görbe É., Szende B., Papp Z. (1992) Congenitalis osteogenesis imperfectához társult arteriopathia calcificans infantum. *LEGE ARTIS MEDICINAE*, 2, 344–347.
39. Szende B., Kovacs L., **Moldvay J.**, Timar F., Simon K., Lapis K. (1992) Carrageenan inhibits the regression of carbon tetrachloride-induced collagen accumulation in the liver of rats. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART A - TOXIC/HAZARDOUS SUBSTANCES ENVIRONMENTAL ENGINEERING*, A27(2), 493–503.
40. **Moldvay J.**, Schaff Z., Lapis K. (1991) Hepatocellular carcinoma in Fanconi's anemia treated with androgen and corticosteroid. *ZENTRALBLATT FÜR PATHOLOGIE*, 137(2), 167–170.
41. Szende B., Lapis K., Jeney A., Simon K., Ordog A., **Moldvay J.** (1991) Liver Damaging Effect of Suramin in Normal And Carbon-tetrachloride Treated Rats. *TOXICOLOGIC PATHOLOGY*, 19(3), 266–272.

11.5. Tudománymetriai adatok

Moldvay Judit tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2019.12.13)				
Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk ²	91	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	42	698	768
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	35	14	22
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	2	2	3
összefoglaló közlemény	---	9	3	3
rövid közlemény	---	3	2	12
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	21	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	17	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvrészlet	---	4	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	4	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)	---	108	719	808
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	112	---	719	808

V. További tudományos művek	10	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is	---	4	1	2
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	0	2
Oltalmak (szabadalmak)	---	2	2	2

VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	5	---	2	5
Összes hivatkozás ¹	---	---	724	819
Hirsch index ⁶	14	---	---	---
g index ⁶	29	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Szám	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	37	425
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	19	40
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (1999) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	78	652
Az utolsó 10 év (2009 - 2019) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	57	209
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	141	17,22%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	207
Jelentés, guideline	1	3
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

12. IRODALOMJEGYZÉK

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018;68:394-424.
2. Bogos K, Kiss Z, Gálffy G, Tamási L, Ostoros Gy., Müller V., Urbán L., Bittner N., Sárosi V., Vastag A., Polányi Z., Nagy-Erdei Zs., Vokó Z., Nagy B., Horváth K., Rokszin Gy., Abonyi-Tóth Zs., Moldvay J. Lung Cancer in Hungary. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2019;In press.
3. Bogos K, Kiss Z, Gálffy G, et al. Revising Incidence and Mortality of Lung Cancer in Central Europe: An Epidemiology Review From Hungary. *Frontiers in oncology* 2019;9:1051.
4. A pulmonológiai hálózat 2018. évi epidemiológiai adatai, Korányi Bulletin. 2019. (Accessed 1. szám, 2019, at <http://koranyi.hu/tartalom/bulletin/Evkonyv2019.pdf>.)
5. Kopper L, Moldvay J. A tüdőrák molekuláris jellemzői. In: Kovács G, Ostoros Gy., Szondy K., ed. *Tüdőrák a gyakorlatban és a mellhártya mezoteliómája: Medicina Könyvkiadó; 2006:25-37.*
6. Moldvay J. A karcinogenezis molekuláris mechanizmusai. In: Kovács G, ed. *Dohányzás és leszokás: Medicina Könyvkiadó; 2010:156-62.*
7. Moldvay J. A tüdőcarcinoma epidemiológiája, etiológiája, patológiája, molekuláris biológiája. In: Magyar P, Losonczy Gy., ed. *A pulmonológia kézikönyve: Medicina Könyvkiadó; 2012:625-31.*
8. Moldvay J. A tüdő daganatai. In: Tulassay Z, Matolcsy A., ed. *Az onkológia tankönyve: Semmelweis Kiadó; 2011:379-89.*
9. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2017;28:iv1-iv21.
10. Biswas D, Birkbak NJ, Rosenthal R, et al. A clonal expression biomarker associates with lung cancer mortality. *Nature medicine* 2019.
11. Krzystanek M, Moldvay J, Szuts D, Szallasi Z, Eklund AC. A robust prognostic gene expression signature for early stage lung adenocarcinoma. *Biomarker research* 2016;4:4.
12. Moldvay J. A tüdő daganatos megbetegedései. In: Magyar P, Pálfi L., Bártfai Z., ed. *Egészségügyi szakdolgozók tüdőgyógyászati kézikönyve: Medicina Könyvkiadó; 2006:305-21.*
13. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:1243-60.
14. Reis-Filho JS, Carrilho C, Valenti C, et al. Is TTF1 a good immunohistochemical marker to distinguish primary from metastatic lung adenocarcinomas? *Pathology, research and practice* 2000;196:835-40.
15. Moldvay J, Jackel M, Bogos K, et al. The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Pathology oncology research : POR* 2004;10:85-8.
16. Runkle EA, Mu D. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer letters* 2013;337:41-8.
17. Moldvay J, Jackel M, Paska C, Soltesz I, Schaff Z, Kiss A. Distinct claudin expression profile in histologic subtypes of lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2007;57:159-67.
18. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:1765-76.
19. Miyamoto K, Kusumi T, Sato F, et al. Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 2008;29:71-6.
20. Michl P, Barth C, Buchholz M, et al. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer research* 2003;63:6265-71.
21. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *International journal of cancer* 2009;124:2088-97.
22. Kominsky SL, Argani P, Korz D, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003;22:2021-33.

23. Alikanoglu AS, Gunduz S, Demirpence O, et al. Expression pattern and prognostic significance of claudin 1, 4 and 7 in pancreatic cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2015;16:4387-92.
24. Moldvay J, Fabian K, Jackel M, et al. Claudin-1 Protein Expression Is a Good Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer, but only in Squamous Cell Carcinoma Cases. *Pathology oncology research : POR* 2017;23:151-6.
25. Papay J, Krenacs T, Moldvay J, et al. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 2007;15:19-30.
26. Fabian K, Nemeth Z, Furak J, et al. Protein expression differences between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma with brain metastasis. *Anticancer research* 2014;34:5593-7.
27. Park SY, Kim BH, Kim JH, Lee S, Kang GH. Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2007;131:1561-7.
28. Rajkovic N, Li X, Plataniotis KN, Kanjer K, Radulovic M, Milosevic NT. The Pan-Cytokeratin Staining Intensity and Fractal Computational Analysis of Breast Tumor Malignant Growth Patterns Prognosticate the Occurrence of Distant Metastasis. *Frontiers in oncology* 2018;8:348.
29. Dencic TM, Savin SB, Selemetjev SA, et al. Strong expression of HBME-1 associates with high-risk clinicopathological factors of papillary thyroid carcinoma. *Pathology oncology research : POR* 2015;21:735-42.
30. Ordonez NG. The value of antibodies 44-3A6, SM3, HBME-1, and thrombomodulin in differentiating epithelial pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma: a comparative study with other commonly used antibodies. *The American journal of surgical pathology* 1997;21:1399-408.
31. Yeh YC, Chou TY. Pulmonary neuroendocrine tumors: study of 90 cases focusing on clinicopathological characteristics, immunophenotype, preoperative biopsy, and frozen section diagnoses. *Journal of surgical oncology* 2014;109:280-6.
32. Petrovic M, Baskic D, Bankovic D, Ilic N. Neuroendocrine differentiation as an indicator of chemosensitivity and prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 2011;16:311-20.
33. Xu J, Liu P, Da J, Hao J, Peng W, Sun G. Prognostic value of Ki-67 in stage I non-small-cell lung cancer: A meta-analysis involving 1931 patients. *Pathology, research and practice* 2019;215:855-60.
34. Mishra R, Hanker AB, Garrett JT. Genomic alterations of ERBB receptors in cancer: clinical implications. *Oncotarget* 2017;8:114371-92.
35. Liu L, Li M, Zhang C, et al. Prognostic value and clinicopathologic significance of nm23 in various cancers: A systematic review and meta-analysis. *International journal of surgery (London, England)* 2018;60:257-65.
36. Lee E, Jin D, Lee BB, et al. Negative effect of cyclin D1 overexpression on recurrence-free survival in stage II-IIIa lung adenocarcinoma and its expression modulation by vorinostat in vitro. *BMC cancer* 2015;15:982.
37. Sterlacci W, Fiegl M, Hilbe W, et al. Deregulation of p27 and cyclin D1/D3 control over mitosis is associated with unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer, as determined in 405 operated patients. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2010;5:1325-36.
38. Toffart AC, Timsit JF, Couraud S, et al. Immunohistochemistry evaluation of biomarker expression in non-small cell lung cancer (Pharmacogenoscan study). *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2014;83:182-8.
39. Svajdler M, Mezencev R, Ondic O, Saskova B, Mukensnabl P, Michal M. P16 is a useful supplemental diagnostic marker of pulmonary small cell carcinoma in small biopsies and cytology specimens. *Annals of diagnostic pathology* 2018;33:23-9.
40. Bian C, Li Z, Xu Y, Wang J, Xu L, Shen H. Clinical outcome and expression of mutant P53, P16, and Smad4 in lung adenocarcinoma: a prospective study. *World journal of surgical oncology* 2015;13:128.
41. Krenacs T, Kiszner G, Stelkovics E, et al. Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochemistry and cell biology* 2012;138:653-67.
42. Eom BW, Joo J, Park B, et al. Nomogram Incorporating CD44v6 and Clinicopathological Factors to Predict Lymph Node Metastasis for Early Gastric Cancer. *PloS one* 2016;11:e0159424.

43. Sun BS, Li Y, Zhang ZF, You J, Wang CL. Osteopontin combined with CD44v6, a novel prognostic biomarker in non-small cell lung cancer undergoing curative resection. *The Annals of thoracic surgery* 2013;96:1943-51.
44. Kim H, Yoo SB, Sun P, et al. Alteration of the E-Cadherin/beta-Catenin Complex Is an Independent Poor Prognostic Factor in Lung Adenocarcinoma. *Korean journal of pathology* 2013;47:44-51.
45. Yoo SB, Kim YJ, Kim H, et al. Alteration of the E-cadherin/beta-catenin complex predicts poor response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) treatment. *Annals of surgical oncology* 2013;20 Suppl 3:S545-52.
46. Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Seminars in cell & developmental biology* 2001;12:89-98.
47. Parimon T, Brauer R, Schlesinger SY, et al. Syndecan-1 Controls Lung Tumorigenesis by Regulating miRNAs Packaged in Exosomes. *The American journal of pathology* 2018;188:1094-103.
48. Kopper L. [Apoptosis and tumors]. *Magyar onkologia* 2003;47:123-31.
49. Paul I, Jones JM. Apoptosis block as a barrier to effective therapy in non small cell lung cancer. *World journal of clinical oncology* 2014;5:588-94.
50. Greatens TM, Niehans GA, Rubins JB, et al. Do molecular markers predict survival in non-small-cell lung cancer? *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998;157:1093-7.
51. Nishio M, Koshikawa T, Kuroishi T, et al. Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small-cell lung cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1996;14:497-502.
52. Moldvay J, Scheid P, Wild P, et al. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000;6:1125-34.
53. Moldvay J, Strausz J, Egervary M, Agocs L, Bocsi J, Schaff Z. P53 expression in stage I squamous cell lung cancer. *Pathology oncology research : POR* 1998;4:8-13.
54. Lara-Guerra H, Roth JA. Gene Therapy for Lung Cancer. *Critical reviews in oncogenesis* 2016;21:115-24.
55. Ortolani S, Ciccarese C, Cingarlini S, Tortora G, Massari F. Suppression of mTOR pathway in solid tumors: lessons learned from clinical experience in renal cell carcinoma and neuroendocrine tumors and new perspectives. *Future oncology (London, England)* 2015;11:1809-28.
56. Krencz I, Sebestyen A, Fabian K, et al. Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Human pathology* 2017;62:66-73.
57. Lohinai Z, Megyesfalvi Zs., Suda K., Harko T., Ren S., Moldvay J., Rivard C., Dome B., Hirsch FR. . Comparative expression analysis in small cell lung carcinoma reveals neuroendocrine pattern change in primary tumor versus lymph node metastases. *Translational lung cancer research* 2019;In press.
58. Klikovits T, Lohinai Z, Fabian K, et al. New insights into the impact of primary lung adenocarcinoma location on metastatic sites and sequence: A multicenter cohort study. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2018;126:139-48.
59. Eichler AF, Chung E, Kodack DP, Loeffler JS, Fukumura D, Jain RK. The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nature reviews Clinical oncology* 2011;8:344-56.
60. Fabian K, Gyulai M, Furak J, et al. Significance of Primary Tumor Location and Histology for Brain Metastasis Development and Peritumoral Brain Edema in Lung Cancer. *Oncology* 2016;91:237-42.
61. Teglasi V, Reiniger L, Fabian K, et al. Evaluating the significance of density, localization, and PD-1/PD-L1 immunopositivity of mononuclear cells in the clinical course of lung adenocarcinoma patients with brain metastasis. *Neuro-oncology* 2017;19:1058-67.
62. Onesti CE, Iacono D, Angelini S, et al. Unexpected long survival of brain oligometastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with multimodal treatment: a single-center experience and review of the literature. *Translational lung cancer research* 2016;5:712-9.
63. Nemeth E, Krzystanek M, Reiniger L, et al. The genomic imprint of cancer therapies helps timing the formation of metastases. *International journal of cancer* 2019;145:694-704.
64. Fabian K, Puskas R, Kakuk T, et al. Renal Impairment Hampers Bisphosphonate Treatment in a Quarter of Lung Cancer Patients with Bone Metastasis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2018;122:126-32.
65. Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, et al. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. *Scientific reports* 2017;7:39721.
66. Moldvay J. Célba találhat a tüdőrák molekuláris célterápiája? . *Medicina Thoracalis* 2004;57:108-10.

67. Moldvay J. [Personalized therapy in non-small cell lung cancer: from diagnosis to therapy]. *Orvosi hetilap* 2012;153:909-16.
68. Moldvay J, Petak I. [EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer management: sensitivity and resistance]. *Magyar onkologia* 2012;56:38-49.
69. Moldvay J. Az ALK+ adenocarcinoma, mint önálló tüdőrák entitás. *Onkológia* 2012;2:305-6.
70. Timar J, Lotz G, Raso E, Moldvay J. [Molecular diagnostics of ALK-positive lung cancer]. *Magyar onkologia* 2017;61:301-11.
71. Moldvay J, Papay J, Kovalszky I, Balazs G, Puskas R, Losonczy G. [Gefitinib treatment in lung cancer -- rebiopsy, retreatment, remission]. *Magyar onkologia* 2014;58:133-7.
72. Moldvay J, Bogos, K. . Molekuláris célzott terápia tüdőrákban – Nemzetközi elmélet, hazai gyakorlat. *Medicina Thoracalis* 2018;71:355-65.
73. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* 2004;350:2129-39.
74. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, NY)* 2004;304:1497-500.
75. Schwab R, Pinter F, Moldavay J, et al. Modern treatment of lung cancer: case 1. Amplification and mutation of the epidermal growth factor receptor in metastatic lung cancer with remission from gefitinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:7736-8.
76. Pinter F, Papay J, Almasi A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) high gene copy number and activating mutations in lung adenocarcinomas are not consistently accompanied by positivity for EGFR protein by standard immunohistochemistry. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2008;10:160-8.
77. Derecskei K, Moldvay J, Bogos K, Timar J. Protocol modifications influence the result of EGF receptor immunodetection by EGFR pharmDx in paraffin-embedded cancer tissues. *Pathology oncology research : POR* 2006;12:243-6.
78. Moldvay J. [Financial aspects of targeted therapy of lung cancer as compared to conventional chemotherapy]. *Magyar onkologia* 2007;51:191-6.
79. Schwab R, Petak I, Pinter F, et al. [Epidermal growth factor receptor (EGFR): therapeutic target in the treatment of lung adenocarcinoma]. *Orvosi hetilap* 2005;146:2335-42.
80. Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, et al. Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:738-46.
81. Puskás R, Moldvay, J., Gálffy, G. . Primer adenocarcinoma sikeres kezelése gefitinib-terápiával első vonalban. *Medicina Thoracalis* 2015;68:240-2.
82. Puskás R, Moldvay, J., Reiniger, L., Bagó, A., Bajcsay, A., Gálffy, G. . Ritka EGFR mutációt hordozó tüdő adenocarcinómában szenvedő beteg hosszútávú kezelése. *Medicina Thoracalis* 2016;69:239-42.
83. Moldvay J. Az afatinib hatásossága tüdőrák okozta agyi metasztázisokban. . *Medicina Thoracalis* 2015;68:22-7.
84. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:339-46.
85. Moldvay J, Barbai T, Bogos K, et al. EGFR autophosphorylation but not protein score correlates with histologic and molecular subtypes in lung adenocarcinoma. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 2013;22:204-9.
86. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet (London, England)* 2009;373:1525-31.
87. O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet Oncology* 2011;12:795-805.
88. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19:2240-7.

89. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *The Lancet Oncology* 2012;13:528-38.
90. Goss G, Tsai CM, Shepherd FA, et al. CNS response to osimertinib in patients with T790M-positive advanced NSCLC: pooled data from two phase II trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2018;29:687-93.
91. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2009;6:201-5.
92. Moldvay J. A betegszelekció etikai kérdései – Vitaindító. *Medicina Thoracalis* 2018;71:377-80.
93. Zer A, Ding K, Lee SM, et al. Pooled Analysis of the Prognostic and Predictive Value of KRAS Mutation Status and Mutation Subtype in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2016;11:312-23.
94. Meng D, Yuan M, Li X, et al. Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2013;81:1-10.
95. Zhang Y, Fang W, Yan Y, et al. The efficacy of first-line chemotherapy is associated with KRAS mutation status in patients with advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2015;32:61.
96. Dong X, Zhao X, Hao Y, Wei Y, Yin Q, Du J. Response to first-line chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer according to epidermal growth factor receptor and K-RAS mutation status. *Clinical lung cancer* 2013;14:680-7.
97. Mellema WW, Dingemans AM, Thunnissen E, et al. KRAS mutations in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy have no predictive value. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2013;8:1190-5.
98. Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, et al. Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2014;50:1819-28.
99. Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, et al. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* 1983;304:497-500.
100. Yu HA, Sima CS, Shen R, et al. Prognostic impact of KRAS mutation subtypes in 677 patients with metastatic lung adenocarcinomas. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:431-7.
101. Gunning WT, Kramer PM, Lubet RA, et al. Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:1927-30.
102. Riely GJ, Johnson ML, Medina C, et al. A phase II trial of Salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2011;6:1435-7.
103. Papadimitrakopoulou V, Lee JJ, Wistuba II, et al. The BATTLE-2 Study: A Biomarker-Integrated Targeted Therapy Study in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2016;34:3638-47.
104. Lito P, Solomon M, Li LS, Hansen R, Rosen N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science (New York, NY)* 2016;351:604-8.
105. Janes MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* 2018;172:578-89.e17.
106. Moll HP, Pranz K, Musteanu M, et al. Afatinib restrains K-RAS-driven lung tumorigenesis. *Science translational medicine* 2018;10.
107. Moldvay J, Ostoros G. [Self defense instead of offense - Immunotherapy in lung cancer]. *Magyar onkológia* 2016;60:28-33.
108. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015;33:1974-82.
109. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002;169:5538-45.

110. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* 2015;372:2018-28.
111. Haragan A, Field JK, Davies MPA, Escriu C, Gruver A, Gosney JR. Heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Implications for specimen sampling in predicting treatment response. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2019;134:79-84.
112. Callea M, Albiges L, Gupta M, et al. Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer immunology research* 2015;3:1158-64.
113. Yue C, Jiang Y, Li P, et al. Dynamic change of PD-L1 expression on circulating tumor cells in advanced solid tumor patients undergoing PD-1 blockade therapy. *Oncoimmunology* 2018;7:e1438111.
114. Mahoney KM, Atkins MB. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology (Williston Park, NY)* 2014;28 Suppl 3:39-48.
115. Reiniger L, Teglasi V, Pipek O, et al. Tumor necrosis correlates with PD-L1 and PD-1 expression in lung adenocarcinoma. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 2019;58:1087-94.
116. Teglasi V, Pipek O, Lozsa R, et al. PD-L1 Expression of Lung Cancer Cells, Unlike Infiltrating Immune Cells, Is Stable and Unaffected by Therapy During Brain Metastasis. *Clinical lung cancer* 2019.
117. Kalina I, Oszlászky, Gy. . A célzott terápiák hatékonyságának megítélése képalkotó eljárásokkal. . *Klinikai Onkológia* 2014;1:131-7.
118. Rojkó L. Onkoterápiák szöveti biomarkerekre és laborparaméterekre gyakorolt hatása tüdőrákban – Hazai vizsgálatok. *Medicina Thoracalis* 2019;72:2013-219.
119. Weiss GJ MJ, Dome B, Fabian K, Podmaniczky E, Papay J, Gyulai M, Furak J, Szirtes I, Ai J, McCabe R, Lobello J, Hegedus B. Paradoxical increase in Ki67 with neoadjuvant chemotherapy in NSCLC (abstract P3.06-009). *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2013;8:S1076.
120. Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *The New England journal of medicine* 2007;356:800-8.
121. Papay J, Sapi Z, Egri G, et al. Platinum-based chemotherapy in lung cancer affects the expression of certain biomarkers including ERCC1. *Pathology oncology research : POR* 2009;15:445-50.
122. Podmaniczky E, Fabian K, Papay J, et al. Decreased ERCC1 Expression After Platinum-Based Neoadjuvant Chemotherapy in non-Small Cell Lung Cancer. *Pathology oncology research : POR* 2015;21:423-31.
123. Rojko L, Reiniger L, Teglasi V, et al. Chemotherapy treatment is associated with altered PD-L1 expression in lung cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2018;144:1219-26.
124. Tian T, Ruan M, Yang W, Shui R. Evaluation of the prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers. *Oncotarget* 2016;7:44395-405.
125. Festino L, Botti G, Lorigan P, et al. Cancer Treatment with Anti-PD-1/PD-L1 Agents: Is PD-L1 Expression a Biomarker for Patient Selection? *Drugs* 2016;76:925-45.
126. Kim S, Koh J, Kwon D, et al. Comparative analysis of PD-L1 expression between primary and metastatic pulmonary adenocarcinomas. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2017;75:141-9.
127. Raju S, Joseph R, Sehgal S. Review of checkpoint immunotherapy for the management of non-small cell lung cancer. *ImmunoTargets and therapy* 2018;7:63-75.
128. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage I pulmonary squamous cell carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2016;57:91-103.
129. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2016;387:1837-46.
130. Paska C, Bogi K, Szilak L, et al. Effect of formalin, acetone, and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 2004;13:234-40.
131. Asano H, Toyooka S, Tokumo M, et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:43-8.
132. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:643-55.
133. Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib

- in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:6838-45.
134. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *The New England journal of medicine* 2005;353:133-44.
 135. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24:5034-42.
 136. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2009;25:1754-60.
 137. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research* 2010;20:1297-303.
 138. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nature biotechnology* 2013;31:213-9.
 139. Signatures of mutational processes in human cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures> Accessed on 20 August 2018. 2018.
 140. Rosenthal R, McGranahan N, Herrero J, Taylor BS, Swanton C. DeconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. *Genome biology* 2016;17:31.
 141. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *American journal of human genetics* 2017;100:267-80.
 142. Wang J, Mullighan CG, Easton J, et al. CREST maps somatic structural variation in cancer genomes with base-pair resolution. *Nature methods* 2011;8:652-4.
 143. D. C. Modelling Survival Data in Medical Research London: Chapman & Hall; 1994.
 144. Liu CL, Prapong W, Natkunam Y, et al. Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays. *The American journal of pathology* 2002;161:1557-65.
 145. Boot A, Huang MN, Ng AWT, et al. In-depth characterization of the cisplatin mutational signature in human cell lines and in esophageal and liver tumors. *Genome research* 2018;28:654-65.
 146. Cappuzzo F, Ardizzoni A, Soto-Parra H, et al. Epidermal growth factor receptor targeted therapy by ZD 1839 (Iressa) in patients with brain metastases from non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2003;41:227-31.
 147. Wu JY, Yu CJ, Chang YC, Yang CH, Shih JY, Yang PC. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:3812-21.
 148. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British journal of cancer* 2004;91:355-8.
 149. Teglas V, Pipek O, Loza R, et al. PD-L1 Expression of Lung Cancer Cells, Unlike Infiltrating Immune Cells, Is Stable and Unaffected by Therapy During Brain Metastasis. *Clinical lung cancer* 2019;20:363-9.e2.
 150. Afify AM, al-Khafaji BM. Diagnostic utility of thyroid transcription factor-1 expression in adenocarcinomas presenting in serous fluids. *Acta cytologica* 2002;46:675-8.
 151. Gomez-Fernandez C, Jorda M, Delgado PI, Ganjei-Azar P. Thyroid transcription factor 1: a marker for lung adenocarcinoma in body cavity fluids. *Cancer* 2002;96:289-93.
 152. Jang KY, Kang MJ, Lee DG, Chung MJ. Utility of thyroid transcription factor-1 and cytokeratin 7 and 20 immunostaining in the identification of origin in malignant effusions. *Analytical and quantitative cytology and histology* 2001;23:400-4.
 153. Ng WK, Chow JC, Ng PK. Thyroid transcription factor-1 is highly sensitive and specific in differentiating metastatic pulmonary from extrapulmonary adenocarcinoma in effusion fluid cytology specimens. *Cancer* 2002;96:43-8.
 154. Abutailay AS, Addis BJ, Roche WR. Immunohistochemistry in the distinction between malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma: a critical evaluation of new antibodies. *Journal of clinical pathology* 2002;55:662-8.
 155. Sturm N, Lantuejoul S, Laverriere MH, et al. Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 (34betaE12) expression in basaloid and large-cell neuroendocrine carcinomas of the lung. *Human pathology* 2001;32:918-25.

156. Wu M, Wang B, Gil J, et al. p63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung. *American journal of clinical pathology* 2003;119:696-702.
157. Hecht JL, Pinkus JL, Weinstein LJ, Pinkus GS. The value of thyroid transcription factor-1 in cytologic preparations as a marker for metastatic adenocarcinoma of lung origin. *American journal of clinical pathology* 2001;116:483-8.
158. Goldstein NS, Thomas M. Mucinous and nonmucinous bronchioloalveolar adenocarcinomas have distinct staining patterns with thyroid transcription factor and cytokeratin 20 antibodies. *American journal of clinical pathology* 2001;116:319-25.
159. Lau SK, Desrochers MJ, Luthringer DJ. Expression of thyroid transcription factor-1, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in bronchioloalveolar carcinomas: an immunohistochemical evaluation of 67 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2002;15:538-42.
160. Castro CY, Moran CA, Flieder DG, Suster S. Primary signet ring cell adenocarcinomas of the lung: a clinicopathological study of 15 cases. *Histopathology* 2001;39:397-401.
161. Merchant SH, Amin MB, Tamboli P, et al. Primary signet-ring cell carcinoma of lung: immunohistochemical study and comparison with non-pulmonary signet-ring cell carcinomas. *The American journal of surgical pathology* 2001;25:1515-9.
162. Srodon M, Westra WH. Immunohistochemical staining for thyroid transcription factor-1: a helpful aid in discerning primary site of tumor origin in patients with brain metastases. *Human pathology* 2002;33:642-5.
163. Halasz J, Holczbauer A, Paska C, et al. Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. *Human pathology* 2006;37:555-61.
164. Lee SK, Moon J, Park SW, Song SY, Chung JB, Kang JK. Loss of the tight junction protein claudin 4 correlates with histological growth-pattern and differentiation in advanced gastric adenocarcinoma. *Oncology reports* 2005;13:193-9.
165. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, et al. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Human pathology* 2005;36:886-92.
166. Nichols LS, Ashfaq R, Iacobuzio-Donahue CA. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *American journal of clinical pathology* 2004;121:226-30.
167. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, et al. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:2567-75.
168. Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, et al. Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2005;447:961-8.
169. Tokes AM, Kulka J, Paku S, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast cancer research : BCR* 2005;7:R296-305.
170. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Human pathology* 2005;36:162-9.
171. Morita K, Tsukita S, Miyachi Y. Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *The British journal of dermatology* 2004;151:328-34.
172. Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *The American journal of surgical pathology* 2005;29:179-87.
173. Renshaw AA, Haja J, Lozano RL, Wilbur DC. Distinguishing carcinoid tumor from small cell carcinoma of the lung: correlating cytologic features and performance in the College of American Pathologists Non-Gynecologic Cytology Program. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2005;129:614-8.
174. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer research* 2005;65:9603-6.
175. Michl P, Gress TM. Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Current cancer drug targets* 2004;4:689-702.
176. Ebihara C, Kondoh M, Hasuike N, et al. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2006;316:255-60.

177. Offner S, Hekele A, Teichmann U, et al. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancreatic carcinoma therapy. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 2005;54:431-45.
178. Fritzsche FR, Oelrich B, Johannsen M, et al. Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:7035-42.
179. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2005;18:511-8.
180. Eftang LL, Esbensen Y, Tannaes TM, Blom GP, Bukholm IR, Bukholm G. Up-regulation of CLDN1 in gastric cancer is correlated with reduced survival. *BMC cancer* 2013;13:586.
181. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, et al. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clinical & experimental metastasis* 2011;28:55-63.
182. Kolokytha P, Yiannou P, Keramopoulos D, et al. Claudin-3 and claudin-4: distinct prognostic significance in triple-negative and luminal breast cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 2014;22:125-31.
183. Jung H, Jun KH, Jung JH, Chin HM, Park WB. The expression of claudin-1, claudin-2, claudin-3, and claudin-4 in gastric cancer tissue. *The Journal of surgical research* 2011;167:e185-91.
184. Hsueh C, Chang YS, Tseng NM, et al. Expression pattern and prognostic significance of claudins 1, 4, and 7 in nasopharyngeal carcinoma. *Human pathology* 2010;41:944-50.
185. Kim CJ, Lee JW, Choi JJ, et al. High claudin-7 expression is associated with a poor response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2011;47:918-25.
186. Melchers LJ, Bruine de Bruin L, Schnell U, et al. Lack of claudin-7 is a strong predictor of regional recurrence in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 2013;49:998-1005.
187. Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Danish medical journal* 2012;59:A4444.
188. Snaebjornsson P, Jonasson L, Jonsson T, Moller PH, Theodors A, Jonasson JG. Colon cancer in Iceland--a nationwide comparative study on various pathology parameters with respect to right and left tumor location and patients age. *International journal of cancer* 2010;127:2645-53.
189. Suttie SA, Shaikh I, Mullen R, Amin AI, Daniel T, Yalamarathi S. Outcome of right- and left-sided colonic and rectal cancer following surgical resection. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2011;13:884-9.
190. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:4401-9.
191. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Diseases of the colon and rectum* 2010;53:57-64.
192. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right-versus left-sided colon cancers? *Annals of surgical oncology* 2008;15:2388-94.
193. Brule SY, Jonker DJ, Karapetis CS, et al. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2015;51:1405-14.
194. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Variations in Metastasis Site by Primary Location in Colon Cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2015;19:1522-7.
195. Qiu M, Hu J, Yang D, Cosgrove DP, Xu R. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget* 2015;6:38658-66.
196. Augestad KM, Bakaki PM, Rose J, et al. Metastatic spread pattern after curative colorectal cancer surgery. A retrospective, longitudinal analysis. *Cancer epidemiology* 2015;39:734-44.
197. Ketchedjian A, Daly BD, Fernando HC, et al. Location as an important predictor of lymph node involvement for pulmonary adenocarcinoma. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2006;132:544-8.
198. Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung

- Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:990-1003.
199. Ito M, Yamashita Y, Miyata Y, et al. Prognostic impact of the primary tumor location based on the hilar structures in non-small cell lung cancer with mediastinal lymph node metastasis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2012;76:93-7.
 200. Sun W, Yang X, Liu Y, Yuan Y, Lin D. Primary Tumor Location Is a Useful Predictor for Lymph Node Metastasis and Prognosis in Lung Adenocarcinoma. *Clinical lung cancer* 2017;18:e49-e55.
 201. Moon Y, Lee KY, Sung SW, Park JK. Differing histopathology and prognosis in pulmonary adenocarcinoma at central and peripheral locations. *Journal of thoracic disease* 2016;8:169-77.
 202. Hu P, Wang G, Cao H, Ma H, Sui P, Du J. Haemoptysis as a prognostic factor in lung adenocarcinoma after curative resection. *British journal of cancer* 2013;109:1609-17.
 203. Huang YH, Hsu KH, Tseng JS, et al. Predilection of contralateral upper lung metastasis in upper lobe lung adenocarcinoma patients. *Journal of thoracic disease* 2016;8:86-92.
 204. Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt WE, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2013;24 Suppl 6:vi89-98.
 205. Vansteenkiste J, Crino L, Dooms C, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2014;25:1462-74.
 206. Vilmann P, Frost Clementsen P, Colella S, et al. Combined endobronchial and esophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European Respiratory Society (ERS) and the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2015;48:1-15.
 207. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 6.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 2015;13:515-24.
 208. De Ruyscher D, Wanders R, van Baardwijk A, et al. Radical treatment of non-small-cell lung cancer patients with synchronous oligometastases: long-term results of a prospective phase II trial (Nct01282450). *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2012;7:1547-55.
 209. Tanvetyanon T, Robinson LA, Schell MJ, et al. Outcomes of adrenalectomy for isolated synchronous versus metachronous adrenal metastases in non-small-cell lung cancer: a systematic review and pooled analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:1142-7.
 210. Gray PJ, Mak RH, Yeap BY, et al. Aggressive therapy for patients with non-small cell lung carcinoma and synchronous brain-only oligometastatic disease is associated with long-term survival. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2014;85:239-44.
 211. Eberhardt WE, Mitchell A, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:1515-22.
 212. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2011;6:244-85.
 213. Ujiie H, Kadota K, Chaft JE, et al. Solid Predominant Histologic Subtype in Resected Stage I Lung Adenocarcinoma Is an Independent Predictor of Early, Extrathoracic, Multisite Recurrence and of Poor Postrecurrence Survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015;33:2877-84.
 214. Motono N, Matsui T, Machida Y, Usuda K, Uramoto H. Prognostic significance of histologic subtype in pStage I lung adenocarcinoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2017;34:100.
 215. Park JK, Kim JJ, Moon SW, Lee KY. Lymph node involvement according to lung adenocarcinoma subtypes: lymph node involvement is influenced by lung adenocarcinoma subtypes. *Journal of thoracic disease* 2017;9:3903-10.
 216. Yu Y, Jian H, Shen L, Zhu L, Lu S. Lymph node involvement influenced by lung adenocarcinoma subtypes in tumor size ≤ 3 cm disease: A study of 2268 cases. *European journal of surgical oncology :*

- the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology 2016;42:1714-9.
217. Tseng CH, Chen KC, Hsu KH, et al. EGFR mutation and lobar location of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2016;37:157-62.
 218. Sahmoun AE, Case LD, Santoro TJ, Schwartz GG. Anatomical distribution of small cell lung cancer: effects of lobe and gender on brain metastasis and survival. *Anticancer research* 2005;25:1101-8.
 219. Jamnik S, Uehara C, da Silva VV. Location of lung carcinoma in relation to the smoking habit and gender. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 2006;32:510-4.
 220. Brooks DR, Austin JH, Heelan RT, et al. Influence of type of cigarette on peripheral versus central lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2005;14:576-81.
 221. Malara NM, Sgambato A, Granone P, et al. Biological characterization of central and peripheral primary non small cell lung cancers (NSCLC). *Anticancer research* 1999;19:2249-52.
 222. Wick W, Kuker W. Brain edema in neurooncology: radiological assessment and management. *Onkologie* 2004;27:261-6.
 223. Wu CX, Lin GS, Lin ZX, Zhang JD, Liu SY, Zhou CF. Peritumoral edema shown by MRI predicts poor clinical outcome in glioblastoma. *World journal of surgical oncology* 2015;13:97.
 224. Mantle RE, Lach B, Delgado MR, Baesa S, Belanger G. Predicting the probability of meningioma recurrence based on the quantity of peritumoral brain edema on computerized tomography scanning. *Journal of neurosurgery* 1999;91:375-83.
 225. Subramanian J, Morgensztern D, Goodgame B, et al. Distinctive characteristics of non-small cell lung cancer (NSCLC) in the young: a surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2010;5:23-8.
 226. Moldvay J, Sajb n, M., Strausz, J. Clinicopathologic characteristics of lung cancer in patients 45 years of age or younger *The European respiratory journal* 2003;22:249s.
 227. Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A, et al. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta neuropathologica* 2012;123:205-22.
 228. Robnett TJ, Machtay M, Stevenson JP, Algazy KM, Hahn SM. Factors affecting the risk of brain metastases after definitive chemoradiation for locally advanced non-small-cell lung carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001;19:1344-9.
 229. Ceresoli GL, Reni M, Chiesa G, et al. Brain metastases in locally advanced nonsmall cell lung carcinoma after multimodality treatment: risk factors analysis. *Cancer* 2002;95:605-12.
 230. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer* 2003;3:453-8.
 231. Li N, Zeng ZF, Wang SY, et al. Randomized phase III trial of prophylactic cranial irradiation versus observation in patients with fully resected stage IIIA-N2 nonsmall-cell lung cancer and high risk of cerebral metastases after adjuvant chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015;26:504-9.
 232. Kopfstein L, Christofori G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006;63:449-68.
 233. Kato Y, Hirano T, Yoshida K, et al. Frequent loss of E-cadherin and/or catenins in intrabronchial lesions during carcinogenesis of the bronchial epithelium. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2005;48:323-30.
 234. Awaya H, Takeshima Y, Amatya VJ, et al. Loss of expression of E-cadherin and beta-catenin is associated with progression of pulmonary adenocarcinoma. *Pathology international* 2005;55:14-8.
 235. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2002;36:115-24.
 236. Xu HT, Wang L, Lin D, et al. Abnormal beta-catenin and reduced axin expression are associated with poor differentiation and progression in non-small cell lung cancer. *American journal of clinical pathology* 2006;125:534-41.
 237. Tamura M, Ohta Y, Tsunetsuka Y, et al. Prognostic significance of dysadherin expression in patients with non-small cell lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2005;130:740-5.

238. Yamada T, Endo R, Tsukagoshi K, et al. Aberrant expression of a hemidesmosomal protein, bullous pemphigoid antigen 2, in human squamous cell carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1996;75:589-600.
239. Dohadwala M, Batra RK, Luo J, et al. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:50828-33.
240. Milas I, Komaki R, Hachiya T, et al. Epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase-2, and BAX expression in the primary non-small cell lung cancer and brain metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:1070-6.
241. Toyoshima E, Ohsaki Y, Nishigaki Y, Fujimoto Y, Kohgo Y, Kikuchi K. Expression of syndecan-1 is common in human lung cancers independent of expression of epidermal growth factor receptor. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2001;31:193-202.
242. Shah L, Walter KL, Borczuk AC, et al. Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;101:1632-8.
243. Anttonen A, Leppa S, Ruotsalainen T, Alfthan H, Mattson K, Joensuu H. Pretreatment serum syndecan-1 levels and outcome in small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2003;41:171-7.
244. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:3974-86.
245. Keum JS, Kong G, Yang SC, et al. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *British journal of cancer* 1999;81:127-32.
246. Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *The Journal of pathology* 1999;188:351-60.
247. Zochbauer-Muller S, Gazdar AF, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annual review of physiology* 2002;64:681-708.
248. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *The European respiratory journal* 2001;18:705-19.
249. Au NH, Gown AM, Cheang M, et al. P63 expression in lung carcinoma: a tissue microarray study of 408 cases. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 2004;12:240-7.
250. Hommura F, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, et al. Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers. *British journal of cancer* 1999;81:696-701.
251. Leversha MA, Fielding P, Watson S, Gosney JR, Field JK. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. *The Journal of pathology* 2003;200:610-9.
252. Gessner C, Liebers U, Kuhn H, et al. BAX and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of nonsmall cell lung cancer. *The European respiratory journal* 2002;19:134-40.
253. Jin M, Inoue S, Umemura T, et al. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2001;34:207-18.
254. Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, Gazdar AF. Apoptosis and lung cancer: a review. *Journal of cellular biochemistry* 2003;88:885-98.
255. Volm M, Koomagi R. Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small-cell lung cancer for patient survival. *British journal of cancer* 2000;82:1747-54.
256. Ishida H, Irie K, Itoh T, Furukawa T, Tokunaga O. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 1997;80:1034-45.
257. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *The New England journal of medicine* 1993;329:690-4.
258. Afify AM, Tate S, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Konia T. Expression of CD44s and CD44v6 in lung cancer and their correlation with prognostic factors. *The International journal of biological markers* 2011;26:50-7.

259. Shen WD, Ji Y, Liu PF, et al. Correlation of E-cadherin and CD44v6 expression with clinical pathology in esophageal carcinoma. *Molecular medicine reports* 2012;5:817-21.
260. Chen GG, Lee TW, Xu H, et al. Increased inducible nitric oxide synthase in lung carcinoma of smokers. *Cancer* 2008;112:372-81.
261. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *International journal of molecular sciences* 2019;20.
262. Li L, Liu D, Qiu ZX, Zhao S, Zhang L, Li WM. The prognostic role of mTOR and p-mTOR for survival in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one* 2015;10:e0116771.
263. Trigka EA, Levidou G, Saetta AA, et al. A detailed immunohistochemical analysis of the PI3K/AKT/mTOR pathway in lung cancer: correlation with PIK3CA, AKT1, K-RAS or PTEN mutational status and clinicopathological features. *Oncology reports* 2013;30:623-36.
264. Shin E, Choi CM, Kim HR, Jang SJ, Park YS. Immunohistochemical characterization of the mTOR pathway in stage-I non-small-cell lung carcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2015;89:13-8.
265. Dobashi Y, Suzuki S, Kimura M, et al. Paradigm of kinase-driven pathway downstream of epidermal growth factor receptor/Akt in human lung carcinomas. *Human pathology* 2011;42:214-26.
266. Liu D, Huang Y, Chen B, et al. Activation of mammalian target of rapamycin pathway confers adverse outcome in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2011;117:3763-73.
267. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer research* 2011;71:3246-56.
268. Kwasnicki A, Jeevan D, Braun A, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Involvement of mTOR signaling pathways in regulating growth and dissemination of metastatic brain tumors via EMT. *Anticancer research* 2015;35:689-96.
269. Kato Y, Nishihara H, Yuzawa S, et al. Immunohistochemical molecular gene expression profile of metastatic brain tumor as a potent personalized medicine. *Brain tumor pathology* 2013;30:167-74.
270. Cheng H, Zou Y, Ross JS, et al. RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer discovery* 2015;5:1262-70.
271. Zhang F, Zhang X, Li M, et al. mTOR complex component Rictor interacts with PKCzeta and regulates cancer cell metastasis. *Cancer research* 2010;70:9360-70.
272. Beck JT, Ismail A, Tolomeo C. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: an emerging treatment strategy for squamous cell lung carcinoma. *Cancer treatment reviews* 2014;40:980-9.
273. Ramalingam SS, Owonikoko TK, Behera M, et al. Phase II study of docetaxel in combination with everolimus for second- or third-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2013;8:369-72.
274. Owonikoko TK, Ramalingam SS, Miller DL, et al. A Translational, Pharmacodynamic, and Pharmacokinetic Phase IB Clinical Study of Everolimus in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015;21:1859-68.
275. Sebestyen A, Sticz TB, Mark A, et al. Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas-a tissue microarray study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012;25:1623-8.
276. Li S, Kong Y, Si L, et al. Phosphorylation of mTOR and S6RP predicts the efficacy of everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BMC cancer* 2014;14:376.
277. Duran I, Kortmansky J, Singh D, et al. A phase II clinical and pharmacodynamic study of temsirolimus in advanced neuroendocrine carcinomas. *British journal of cancer* 2006;95:1148-54.
278. Tarhini A, Kotsakis A, Gooding W, et al. Phase II study of everolimus (RAD001) in previously treated small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:5900-7.
279. Szikriszt B, Poti A, Pipek O, et al. A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome biology* 2016;17:99.
280. Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science (New York, NY)* 2016;354:618-22.

281. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 2015;520:353-7.
282. Hoadley KA, Siegel MB, Kanchi KL, et al. Tumor Evolution in Two Patients with Basal-like Breast Cancer: A Retrospective Genomics Study of Multiple Metastases. *PLoS medicine* 2016;13:e1002174.
283. Ulintz PJ, Greenson JK, Wu R, Fearon ER, Hardiman KM. Lymph Node Metastases in Colon Cancer Are Polyclonal. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2018;24:2214-24.
284. Cheung KJ, Padmanaban V, Silvestri V, et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016;113:E854-63.
285. Yatabe Y, Takahashi T, Mitsudomi T. Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer research* 2008;68:2106-11.
286. Griffith M, Miller CA, Griffith OL, et al. Optimizing cancer genome sequencing and analysis. *Cell systems* 2015;1:210-23.
287. Miller CA, White BS, Dees ND, et al. SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS computational biology* 2014;10:e1003665.
288. Deshwar AG, Vembu S, Yung CK, Jang GH, Stein L, Morris Q. PhyloWGS: reconstructing subclonal composition and evolution from whole-genome sequencing of tumors. *Genome biology* 2015;16:35.
289. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 2015;521:489-94.
290. Burrell RA, Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular oncology* 2014;8:1095-111.
291. Favero F, McGranahan N, Salm M, et al. Glioblastoma adaptation traced through decline of an IDH1 clonal driver and macro-evolution of a double-minute chromosome. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015;26:880-7.
292. Miller CA, Gindin Y, Lu C, et al. Aromatase inhibition remodels the clonal architecture of estrogen-receptor-positive breast cancers. *Nature communications* 2016;7:12498.
293. Yeh P, Hunter T, Sinha D, et al. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature communications* 2017;8:14756.
294. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003;21:3798-807.
295. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:13306-11.
296. Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:2493-501.
297. Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:2513-20.
298. Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:6829-37.
299. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:1167-73.
300. Zhou W, Christiani DC. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chinese journal of cancer* 2011;30:287-92.
301. Boch C, Kollmeier J, Roth A, et al. The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ open* 2013;3.

302. Pallis AG, Voutsina A, Kalikaki A, et al. 'Classical' but not 'other' mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer. *British journal of cancer* 2007;97:1560-6.
303. Arcila ME, Nafa K, Chaft JE, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Molecular cancer therapeutics* 2013;12:220-9.
304. Keam B, Kim DW, Park JH, et al. Rare and complex mutations of epidermal growth factor receptor, and efficacy of tyrosine kinase inhibitor in patients with non-small cell lung cancer. *International journal of clinical oncology* 2014;19:594-600.
305. Yang JC, Shih JY, Su WC, et al. Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2012;13:539-48.
306. Kerner GS, Schuurin E, Sietsma J, et al. Common and rare EGFR and KRAS mutations in a Dutch non-small-cell lung cancer population and their clinical outcome. *PloS one* 2013;8:e70346.
307. Smits AJ, Kummer JA, Hinrichs JW, et al. EGFR and KRAS mutations in lung carcinomas in the Dutch population: increased EGFR mutation frequency in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. *Cellular oncology (Dordrecht)* 2012;35:189-96.
308. De Pas T, Toffalorio F, Manzotti M, et al. Activity of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer harboring rare epidermal growth factor receptor mutations. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2011;6:1895-901.
309. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer research* 2004;64:8919-23.
310. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM, et al. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2014;25:126-31.
311. Johnson ML, Sima CS, Chaft J, et al. Association of KRAS and EGFR mutations with survival in patients with advanced lung adenocarcinomas. *Cancer* 2013;119:356-62.
312. Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:1112-21.
313. Torok S, Hegedus B, Laszlo V, et al. Lung cancer in never smokers. *Future oncology (London, England)* 2011;7:1195-211.
314. Nordquist LT, Simon GR, Cantor A, Alberts WM, Bepler G. Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung. *Chest* 2004;126:347-51.
315. Toh CK, Wong EH, Lim WT, et al. The impact of smoking status on the behavior and survival outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer: a retrospective analysis. *Chest* 2004;126:1750-6.
316. Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest* 2004;125:27-37.
317. Lohinai Z, Ostoros G, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. Differences in the Epidemiology of Rare EGFR Mutations in Different Populations. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2016;11:e19-20.
318. Lohinai Z. OG, Moldvay J., Dome B., Hegedus B. . Reply to Rare Versus Artifactual EGFR Mutations. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:e80-e1.
319. Bunn PA, Jr., Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, et al. Biological markers for non-small cell lung cancer patient selection for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:3652-6.
320. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:1803-10.
321. Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, et al. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:5568-77.

322. Robert F, Blumenschein G, Herbst RS, et al. Phase I/IIa study of cetuximab with gemcitabine plus carboplatin in patients with chemotherapy-naïve advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:9089-96.
323. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet Oncology* 2012;13:33-42.
324. Hosokawa S, Toyooka S, Fujiwara Y, et al. Comprehensive analysis of EGFR signaling pathways in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2009;66:107-13.
325. Endoh H, Ishibashi Y, Yamaki E, et al. Immunohistochemical analysis of phosphorylated epidermal growth factor receptor might provide a surrogate marker of EGFR mutation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2009;63:241-6.
326. Sonnweber B, Dlska M, Skvortsov S, Dirnhofer S, Schmid T, Hilbe W. High predictive value of epidermal growth factor receptor phosphorylation but not of EGFRvIII mutation in resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of clinical pathology* 2006;59:255-9.
327. Nakamura Y, Niki T, Goto A, et al. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer science* 2007;98:1006-13.
328. Hijiya N, Miyawaki M, Kawahara K, et al. Phosphorylation status of epidermal growth factor receptor is closely associated with responsiveness to gefitinib in pulmonary adenocarcinoma. *Human pathology* 2008;39:316-23.
329. Mountzios G, Planchard D, Besse B, et al. Mitogen-activated protein kinase activation in lung adenocarcinoma: a comparative study between ever smokers and never smokers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:4096-102.
330. Cappuzzo F, Ligatorio C, Janne PA, et al. Prospective study of gefitinib in epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridization-positive/phospho-Akt-positive or never smoker patients with advanced non-small-cell lung cancer: the ONCOBELL trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:2248-55.
331. Kim YT, Kim TY, Lee DS, et al. Molecular changes of epidermal growth factor receptor (EGFR) and KRAS and their impact on the clinical outcomes in surgically resected adenocarcinoma of the lung. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2008;59:111-8.
332. Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:1472-8.
333. Tsurutani J, Steinberg SM, Ballas M, et al. Prognostic significance of clinical factors and Akt activation in patients with bronchioloalveolar carcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2007;55:115-21.
334. Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 2012;483:100-3.
335. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer discovery* 2012;2:227-35.
336. Benedettini E, Sholl LM, Peyton M, et al. Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis. *The American journal of pathology* 2010;177:415-23.
337. Martin P, Leighl NB, Tsao MS, Shepherd FA. KRAS mutations as prognostic and predictive markers in non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2013;8:530-42.
338. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:5900-9.
339. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:2173-81.

340. Sun JM, Hwang DW, Ahn JS, Ahn MJ, Park K. Prognostic and predictive value of KRAS mutations in advanced non-small cell lung cancer. *PloS one* 2013;8:e64816.
341. Villaruz LC, Socinski MA, Cunningham DE, et al. The prognostic and predictive value of KRAS oncogene substitutions in lung adenocarcinoma. *Cancer* 2013;119:2268-74.
342. Imamura Y, Morikawa T, Liao X, et al. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18:4753-63.
343. Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, et al. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2011;22:235-7.
344. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:5731-4.
345. Husgafvel-Pursiainen K, Hackman P, Ridanpaa M, et al. K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *International journal of cancer* 1993;53:250-6.
346. Kim HR, Ahn JR, Lee JG, et al. The impact of cigarette smoking on the frequency of and qualitative differences in KRAS mutations in Korean patients with lung adenocarcinoma. *Yonsei medical journal* 2013;54:865-74.
347. Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:5892-9.
348. Tsao AS, Liu D, Lee JJ, Spitz M, Hong WK. Smoking affects treatment outcome in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2006;106:2428-36.
349. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:3543-51.
350. Mascaux C, Iannino N, Martin B, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British journal of cancer* 2005;92:131-9.
351. Levy BP, Chioda MD, Herndon D, et al. Molecular Testing for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: How to Implement Evidence-Based Recommendations. *The oncologist* 2015;20:1175-81.
352. Doebele RC, Lu X, Sumey C, et al. Oncogene status predicts patterns of metastatic spread in treatment-naïve nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;118:4502-11.
353. Modest DP, Stintzing S, Laubender RP, et al. Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status. *Anti-cancer drugs* 2011;22:913-8.
354. Bittner N, Baliko Z, Sarosi V, et al. Bone Metastases and the EGFR and KRAS Mutation Status in Lung Adenocarcinoma--The Results of Three Year Retrospective Analysis. *Pathology oncology research : POR* 2015;21:1217-21.
355. Confavreux CB, Girard N, Pialat JB, et al. Mutational profiling of bone metastases from lung adenocarcinoma: results of a prospective study (POUMOS-TEC). *BoneKey reports* 2014;3:580.
356. Yaeger R, Cowell E, Chou JF, et al. RAS mutations affect pattern of metastatic spread and increase propensity for brain metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 2015;121:1195-203.
357. Schweiger T, Hegedus B, Nikolowsky C, et al. EGFR, BRAF and KRAS status in patients undergoing pulmonary metastasectomy from primary colorectal carcinoma: a prospective follow-up study. *Annals of surgical oncology* 2014;21:946-54.
358. Tsunoda A, Iijima T, Tsunoda Y, Nakao K, Miyaki M, Kusano M. Association of K-ras mutations with liver metastases from colorectal carcinoma. *Anticancer research* 2004;24:2471-6.
359. He YY, Zhang XC, Yang JJ, et al. Prognostic significance of genotype and number of metastatic sites in advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer* 2014;15:441-7.
360. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS medicine* 2005;2:e17.
361. Brugger W, Triller N, Blasinska-Morawiec M, et al. Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-

- small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:4113-20.
362. Patricelli MP, Janes MR, Li LS, et al. Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer discovery* 2016;6:316-29.
 363. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology* 2008;9:962-72.
 364. Mao C, Qiu LX, Liao RY, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2010;69:272-8.
 365. Rulli E, Marabese M, Torri V, et al. Value of KRAS as prognostic or predictive marker in NSCLC: results from the TAILOR trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015;26:2079-84.
 366. Jacobsen HJ, Poulsen TT, Dahlman A, et al. Pan-HER, an Antibody Mixture Simultaneously Targeting EGFR, HER2, and HER3, Effectively Overcomes Tumor Heterogeneity and Plasticity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015;21:4110-22.
 367. Kruspig B, Monteverde T, Neidler S, et al. The ERBB network facilitates KRAS-driven lung tumorigenesis. *Science translational medicine* 2018;10.
 368. Kunii R, Jiang S, Hasegawa G, et al. The predominant expression of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1)-negative pulmonary adenocarcinoma. *Histopathology* 2011;58:467-76.
 369. Sun C, Hobor S, Bertotti A, et al. Intrinsic resistance to MEK inhibition in KRAS mutant lung and colon cancer through transcriptional induction of ERBB3. *Cell reports* 2014;7:86-93.
 370. Chang YL, Yang CY, Lin MW, Wu CT, Yang PC. High co-expression of PD-L1 and HIF-1alpha correlates with tumour necrosis in pulmonary pleomorphic carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2016;60:125-35.
 371. Pawelczyk K, Piotrowska A, Ciesielska U, et al. Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers. *International journal of molecular sciences* 2019;20.
 372. Tsukamoto M, Imai K, Ishimoto T, et al. PD-L1 expression enhancement by infiltrating macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha leads to poor pancreatic cancer prognosis. *Cancer science* 2019;110:310-20.
 373. Schaer DA, Hirschhorn-Cymerman D, Wolchok JD. Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer* 2014;2:7.
 374. Samanta D, Park Y, Ni X, et al. Chemotherapy induces enrichment of CD47(+)/CD73(+)/PDL1(+) immune evasive triple-negative breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018;115:E1239-e48.
 375. Sheng J, Fang W, Yu J, et al. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Scientific reports* 2016;6:20090.
 376. Shin J, Chung JH, Kim SH, et al. Effect of Platinum-Based Chemotherapy on PD-L1 Expression on Tumor Cells in Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 2019;51:1086-97.
 377. Zhang P, Ma Y, Lv C, et al. Upregulation of programmed cell death ligand 1 promotes resistance response in non-small-cell lung cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer science* 2016;107:1563-71.
 378. Fujimoto D, Uehara K, Sato Y, et al. Alteration of PD-L1 expression and its prognostic impact after concurrent chemoradiation therapy in non-small cell lung cancer patients. *Scientific reports* 2017;7:11373.
 379. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2019;30:44-56.
 380. Peters S, Gettinger S, Johnson ML, et al. Phase II Trial of Atezolizumab As First-Line or Subsequent Therapy for Patients With Programmed Death-Ligand 1-Selected Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (BIRCH). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2017;35:2781-9.

381. Wang X, Li M. Correlate tumor mutation burden with immune signatures in human cancers. *BMC immunology* 2019;20:4.
382. Evans M, O'Sullivan B, Smith M, Tanriere P. Predictive markers for anti-PD-1/PD-L1 therapy in non-small cell lung cancer-where are we? *Translational lung cancer research* 2018;7:682-90.
383. Xu J, Guo X, Jing M, Sun T. Prediction of tumor mutation burden in breast cancer based on the expression of ER, PR, HER-2, and Ki-67. *OncoTargets and therapy* 2018;11:2269-75.
384. Jiang L, Su X, Zhang T, et al. PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncotarget* 2017;8:26845-57.
385. Yeo MK, Choi SY, Seong IO, Suh KS, Kim JM, Kim KH. Association of PD-L1 expression and PD-L1 gene polymorphism with poor prognosis in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human pathology* 2017;68:103-11.
386. Toyokawa G, Takada K, Okamoto T, et al. Relevance Between Programmed Death Ligand 1 and Radiologic Invasiveness in Pathologic Stage I Lung Adenocarcinoma. *The Annals of thoracic surgery* 2017;103:1750-7.
387. Saruwatari K, Ikemura S, Sekihara K, et al. Aggressive tumor microenvironment of solid predominant lung adenocarcinoma subtype harboring with epidermal growth factor receptor mutations. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2016;91:7-14.
388. Ng Kee Kwong F, Laggner U, McKinney O, Croud J, Rice A, Nicholson AG. Expression of PD-L1 correlates with pleomorphic morphology and histological patterns of non-small-cell lung carcinomas. *Histopathology* 2018;72:1024-32.
389. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2014;50:1361-9.
390. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *British journal of cancer* 2015;112:95-102.
391. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2011;28:682-8.
392. Zhang Y, Wang L, Li Y, et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *OncoTargets and therapy* 2014;7:567-73.
393. Yoneshima Y, Ijichi K, Anai S, et al. PD-L1 expression in lung adenocarcinoma harboring EGFR mutations or ALK rearrangements. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2018;118:36-40.
394. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* 2015;373:1627-39.
395. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* 2015;373:123-35.
396. He J, Hu Y, Hu M, Li B. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Scientific reports* 2015;5:13110.
397. Berghoff AS, Lassmann H, Preusser M, Hoftberger R. Characterization of the inflammatory response to solid cancer metastases in the human brain. *Clinical & experimental metastasis* 2013;30:69-81.
398. Berghoff AS, Fuchs E, Ricken G, et al. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with extent of brain edema and overall survival time in patients with brain metastases. *Oncoimmunology* 2016;5:e1057388.
399. Harter PN, Bernatz S, Scholz A, et al. Distribution and prognostic relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and PD-1/PD-L1 immune checkpoints in human brain metastases. *Oncotarget* 2015;6:40836-49.
400. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in melanoma brain metastases. *Histopathology* 2015;66:289-99.
401. Zhang P, Su DM, Liang M, Fu J. Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis. *Molecular immunology* 2008;45:1470-6.
402. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia* 2014;28:1280-8.

403. Ghebeh H, Lehe C, Barhoush E, et al. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast cancer research : BCR* 2010;12:R48.
404. Assi HI, Kamphorst AO, Moukalled NM, Ramalingam SS. Immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2018;124:248-61.
405. Malhotra J, Jabbour SK, Aisner J. Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research* 2017;6:196-211.
406. Kamath SD, Kumthekar PU. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Central Nervous System (CNS) Metastatic Disease. *Frontiers in oncology* 2018;8:414.
407. Goldberg SB, Gettinger SN, Mahajan A, et al. Pembrolizumab for patients with melanoma or non-small-cell lung cancer and untreated brain metastases: early analysis of a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2016;17:976-83.
408. Dudnik E, Yust-Katz S, Nechushtan H, et al. Intracranial response to nivolumab in NSCLC patients with untreated or progressing CNS metastases. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2016;98:114-7.
409. Schachter J, Ribas A, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet (London, England)* 2017;390:1853-62.
410. McCoach CE, Berge EM, Lu X, Baron AE, Camidge DR. A Brief Report of the Status of Central Nervous System Metastasis Enrollment Criteria for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Clinical Trials: A Review of the ClinicalTrials.gov Trial Registry. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2016;11:407-13.
411. Ancevski Hunter K, Socinski MA, Villaruz LC. PD-L1 Testing in Guiding Patient Selection for PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapy in Lung Cancer. *Molecular diagnosis & therapy* 2018;22:1-10.
412. Hendry S, Byrne DJ, Wright GM, et al. Comparison of Four PD-L1 Immunohistochemical Assays in Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2018;13:367-76.
413. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2016;29:1165-72.
414. Mansfield AS, Aubry MC, Moser JC, et al. Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2016;27:1953-8.
415. Takamori S, Toyokawa G, Okamoto I, et al. Discrepancy in Programmed Cell Death-Ligand 1 Between Primary and Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer research* 2017;37:4223-8.
416. Liu D, Wang S, Bindeman W. Clinical applications of PD-L1 bioassays for cancer immunotherapy. *Journal of hematology & oncology* 2017;10:110.
417. Diggs LP, Hsueh EC. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomarker research* 2017;5:12.
418. Aguiar PN, Jr., Santoro IL, Tadokoro H, et al. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Immunotherapy* 2016;8:479-88.
419. Achrol AS, Rennert RC, Anders C, et al. Brain metastases. *Nature reviews Disease primers* 2019;5:5.
420. de Groot AE, Roy S, Brown JS, Pienta KJ, Amend SR. Revisiting Seed and Soil: Examining the Primary Tumor and Cancer Cell Foraging in Metastasis. *Molecular cancer research : MCR* 2017;15:361-70.
421. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146:633-44.
422. Junker K, Langner K, Klinker F, Bosse U, Thomas M. Grading of tumor regression in non-small cell lung cancer : morphology and prognosis. *Chest* 2001;120:1584-91.
423. Ikuta K, Takemura K, Kihara M, et al. Defects in apoptotic signal transduction in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncology reports* 2005;13:1229-34.
424. Filipits M, Pirker R, Dunant A, et al. Cell cycle regulators and outcome of adjuvant cisplatin-based chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer: the International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:2735-40.
425. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine* 2006;355:983-91.

426. Rigas JR, Kelly K. Current treatment paradigms for locally advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2007;2 Suppl 2:S77-85.
427. Gilligan D, Nicolson M, Smith I, et al. Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NCIC 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review. *Lancet* (London, England) 2007;369:1929-37.
428. de Marinis F, Tedesco B, Treggiari S, et al. Role of induction chemotherapy in resectable N2 non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2007;2:S31-4.
429. Abratt RP, Lee JS, Han JY, et al. Phase II trial of gemcitabine-carboplatin-paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy for operable non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2006;1:135-40.
430. Stinchcombe TE, Socinski MA. The role of induction therapy for resectable non-small cell lung cancer. *Drugs* 2007;67:321-32.
431. De Pauw R, van Meerbeeck JP. Neoadjuvant chemotherapy in the treatment of nonsmall-cell lung cancer. *Current opinion in oncology* 2007;19:92-7.
432. Meert AP, Martin B, Verdebout JM, et al. Correlation of different markers (p53, EGF-R, c-erbB-2, Ki-67) expression in the diagnostic biopsies and the corresponding resected tumors in non-small cell lung cancer. *Lung cancer* (Amsterdam, Netherlands) 2004;44:295-301.
433. Lang DS, Droemann D, Schultz H, et al. A novel human ex vivo model for the analysis of molecular events during lung cancer chemotherapy. *Respiratory research* 2007;8:43.
434. Kerr KM. Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology* 2012;60:531-46.
435. Choi CM, Yang SC, Jo HJ, et al. Proteins involved in DNA damage response pathways and survival of stage I non-small-cell lung cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2012;23:2088-93.
436. Schneider S, Uchida K, Brabender J, et al. Downregulation of TS, DPD, ERCC1, GST-Pi, EGFR, and HER2 gene expression after neoadjuvant three-modality treatment in patients with esophageal cancer. *Journal of the American College of Surgeons* 2005;200:336-44.
437. Xia Y, Hu C, Zhang M, Yang H, Zhou D, Liang S. [Relationship between ERCC1 expression and cisplatin intervention in human lung adenocarcinoma cell lines]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer* 2007;10:362-5.
438. Baba H, Watanabe M, Okabe H, et al. Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer* 2012;107:1950-5.
439. Schneider JG, Farhadfar N, Sivapiragasam A, Geller M, Islam S, Selbs E. Commercial laboratory testing of excision repair cross-complementation group 1 expression in non-small cell lung cancer. *The oncologist* 2014;19:459-65.
440. Pierceall WE, Olaussen KA, Rousseau V, et al. Cisplatin benefit is predicted by immunohistochemical analysis of DNA repair proteins in squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma: theranostic modeling by NSCLC constituent histological subclasses. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2012;23:2245-52.
441. Olaussen KA, Adam J, Vanhecke E, et al. PARP1 impact on DNA repair of platinum adducts: preclinical and clinical read-outs. *Lung cancer* (Amsterdam, Netherlands) 2013;80:216-22.
442. Yoon YK, Im SA, Min A, et al. Sunitinib synergizes the antitumor effect of cisplatin via modulation of ERCC1 expression in models of gastric cancer. *Cancer letters* 2012;321:128-36.
443. Guarneri V, Dieci MV, Barbieri E, et al. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2013;24:2990-4.
444. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* 2016;375:1823-33.
445. Kerr KM, Nicolson MC. Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2016;140:249-54.
446. Yousefi M, Bahrami T, Salmaninejad A, Nosrati R, Ghaffari P, Ghaffari SH. Lung cancer-associated brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options. *Cellular oncology (Dordrecht)* 2017;40:419-41.