

Keringő és szöveti prediktív biomarkerek vizsgálata tüdőrákban

Doktori értekezés

Dr. Rojkó Livia

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Moldvay Judit, DSc, egyetemi magántanár

Hivatalos bírálók: Dr. Czebe Krisztina, PhD, főorvos

Dr. Bilecz Ágnes, PhD, klinikai szakorvos

Komplex vizsgabizottság elnöke: Dr. Losonczy György, DSc, egyetemi tanár

Komplex vizsgabizottság tagjai: Dr. Szász Attila Marcell, PhD,
tudományos főmunkatárs

Dr. Bittner Nóra, PhD, egyetemi docens

Budapest

2022

Tartalomjegyzék

Bevezetés	7
1. A tüdőrák epidemiológiája	8
2. A tüdőrák tünetei, diagnosztikája.....	9
3. A tüdőrák stádiumai	12
4. A tüdőrák terápiája.....	13
4.1 Műtét	14
4.2 Kemoterápia	15
4.3 Sugárterápia.....	16
4.4 Molekuláris célzott terápia.....	17
4.5 Immunterápia	19
4.6 Szupportív terápia	22
5. Biomarkerek tüdőrákban.....	24
5.1 Keringő biomarkerek	24
5.1.1. Likvid biopszia.....	25
5.2 Szöveti biomarkerek.....	25
5.3 Prognosztikai biomarkerek.....	28
5.4 Prediktív biomarkerek.....	30
5.4.1. Kemoterápia prediktív markerei	31
5.4.2. Molekuláris célzott terápia prediktív markerei.....	31
5.4.3. Immunterápia prediktív markerei.....	34
6. Onkoterápiák hatása szöveti biomarkerekre	37
7. A metasztázisképzés helyének jelentősége tüdőrákban.....	38
Célkitűzések	39
Betegek és módszerek	40
1. Betegcsoportok.....	40
1.1 . Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata	40
1.2. Vértkép paraméterek változásának vizsgálata	42

2. Módszerek	43
2.1. Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata	43
2.2. Vértkép paraméterek változásának vizsgálata	45
3. Statisztikai analízis	46
3.1. Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata:	46
4. Etikai engedélyek	47
Eredmények	48
1. Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata	48
1.1. A neoadjuváns kemoterápia hatása a tumorsejtek PD-L1 expressziójára	48
1.2. A neoadjuváns kemoterápia hatása az immunsejtek PD-L1 expressziójára	50
1.3. A neoadjuváns kezelés hatása az immunsejtek PD-1 expressziójára 50	
1.4. A neoadjuváns kezelés hatása az immunsejtek denzitására.....	51
1.5. A különböző szövettani paraméterek változásai közötti összefüggés 51	
2. Vértkép paraméterek változásának vizsgálata	51
2.1. A vértkép paraméterek időbeli változása	52
Megbeszélés	64
1. PD-L1 és PD-1 vizsgálatok neoadjuváns tumorminta párokon.....	64
2. A vértkép eltéréseinek időbeli vizsgálata és prognosztikus jelentősége 66	
Következtetések	71
Összefoglalás	72
Summary	73
Köszönetnyilvánítás	74
Irodalom	80

Rövidítések jegyzéke

ADC: adenocarcinoma

ADSQ: adenosquamosus carcinoma

ALC: absolute lymphocyte count

ALK: anaplastikus lymphoma kináz

ANC: absolute neutrophil count

ANOVA: analysis of variance

APC: antigene presenting cell

ATS: American Thoracic Society

CEA: carcinoembrionalis antigén

CI: confidence interval

COX-2: cyclooxygenáz-2

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

CT: computed tomography

CTLA-4: cytotoxic T cell lymphocyte antigene-4

CYFRA-21: cytokeratin fragment-21

DNS: deoxiribonukleinsav

cfDNS: cell-free DNS

ctDNS: cirkuláló tumor DNS

EBUS: endobronchial ultrasound

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR: epidermal growth factor receptor

EMK: egyedi méltányossági kérelem

EMMI: Emberi Erőforrások Minisztériuma

EML-4: echinoderm microtubule-associated protein-like 4

ERCC1: excision repair cross-complementation group-1

ERS: European Respiratory Society (Európai Tüdőgyógyász Társaság)

FISH: Fluorescence in situ hybridization

FDA: Food and Drug Administration

GCSF: granulocytá colonia stimuláló faktor
Gy: gray
HR: hazard ratio
IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer
KPS: Karnovsky performance status
KRAS: Kirsten Rat Sarcoma vírus onkogénje
KSH: Központi Statisztikai Hivatal
MHC: Major Histocompatibility Complex
MRI: Magnetic Resonance Imaging
NCCN: National Comprehensive Cancer Network
NGS: Next-Generation Sequencing
NK sejtek: natural killer sejtek
NLR: Neutrophil/ lymphocyte ratio
NSCLC: non-small cell lung cancer (nem-kissejtes tüdőrák)
NSE: neuron-specifikus enoláz
OR: odds ratio
OS: overall survival (teljes túlélés)
PCR: polymerase chain reaction
PD-1: programmed cell death protein 1
PD-L1: programmed death-ligand 1
PET: pozitron emission tomography
PFS: progression free survival
PLR: platelet/ lymphocyte ratio
PLT: platelet
PS: performance status
PYI: pack year index (csomagév index)
RATS: Robot-Assisted Thoracic Surgery
RB: retinoblastoma
RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
RTG: Röntgen
RTOG: Radiation Therapy Oncology Group

SCC: squamous cell carcinoma (laphámrák)
SCLC: small cell lung cancer (kissejtes tüdőrák)
TKI: tirozin-kináz inhibitor
TMA: tissue microarray
TMB: tumor mutation burden
TNM: Tumor Node Metastasis (Tumor, lympNode, Metastasis)
TBC: tuberculosis
TPA: tissue-peptide antigen
USA: United States of America
VEGF: vascular endothelial growth factor
UICC: Union for International Cancer Control
VATS: Video-Assisted Thoracic Surgery
WBRT: Whole Brain Radiotherapy
WHO: World Health Organization
WT: wild type (vad típus)

Bevezetés

A GLOBOCAN 2020-as becsült adatai alapján a tüdőrák a 2. leggyakoribb ráktípus az incidenciát tekintve és leggyakoribb okozója a daganatos halálozások becsült éves számának az Amerikai Egyesült Államokban {Ferlay, 2021 #116}. Mindez jelzi, hogy milyen jelentős egészségügyi feladattal állunk szemben, amely részben szűrési kérdéseket vet fel, egészségügyi szervezési munkát igényel, továbbá diagnosztikus kihívásokat és terápiás szükségleteket teremt.

A betegségre jellemző legprecízebb adatokkal azokból az országokból rendelkezünk, ahol kellő figyelemmel és jelentési kötelezettséggel gyűjtik és rendszerezik az információkat. Az információ gyűjtés célja egyértelmű: javítanunk kell a betegség halálozási mutatóin, hiszen a tüdőrák prognózisa jelenleg is meglehetősen rossz, a várható ötéves túlélése mindössze 21% (1, 2). Magyarországon az újonnan felfedezett tüdőrákok (panasszal vagy akár szűréssel felfedezve együttesen) 43%-a IV stádiumba sorolható, ahol egyértelműen a szisztémás, gyógyszeres terápia alkotja a kezelés gerincét (3). A gyógyszeres kezelések bázisát jelenleg is a kombinált kemoterápia jelenti. Sajnálatos módon, jelenleg nem rendelkezünk olyan tumormarkerrel vagy szöveti faktorral, amely a klinikai gyakorlatban alkalmas lenne a betegség monitorozására, segítene a gyors progresszió előrejelzésében, vagy prediktív értékkel bírna az egyes kemoterápiás szereket illetően. Molekuláris célzott terápiára a betegeknek csak egy szelektált csoportja alkalmas, és indikálásának alapfeltétele pozitív prediktív értékkel bíró driver mutáció azonosítása.

Az immunterápia bevezetése paradigmaváltást hozott a tüdődaganatos betegek ellátásában, de ez a kezelési mód sem alkalmazható minden betegnél, és nem minden esetben élvez prioritást az egyéb onkoterápiákkal szemben (4). Az immunterápiás készítmények alkalmazásának sorrendje és kemoterápiával való kombinálása még nem minden részletében evidencia szintű. Mivel nagy a költségvonzata, a terápiás hatékonyságot előre jelző markerek nagy jelentőséggel bírnak. A klinikai gyakorlatban az immunterápia prediktív markereként a PD-L1 (programmed death ligand-1) protein expressziót használják, amelyről azonban ismert, hogy nem a legideálisabb biomarker. A magas PD-L1 expressziót mutató daganatban szenvedők csaknem a fele reagál a kezelésre, ugyanakkor a negatív PD-L1 státusz sem zárja ki az immunterápia

hatásosságát. Az immunterápiák prediktív markereinek további vizsgálata tehát rendkívül nagy jelentőséggel bír mind terápiás hatékonyság, mind pedig költséghatékonyság szempontjából (5).

1. A tüdőrák epidemiológiája

A tüdőrák magyarországi epidemiológiájáról háromféle adatbázisból tájékozódhatunk. A tüdőgondozó hálózatban regisztrált és kivizsgálásra került beteget számából (tüdőgondozói incidencia), a Központi Statisztikai Hivatalban rögzített mortalitási adatokból (KSH mortalitás), valamint a Rákregiszterben rögzített incidencia adatokból.

Habár a Korányi Bulletin 2020-ra vonatkozó beszámolója alapján 2011 óta egy lassú fokozatosan csökken észlelhető a tüdőrák incidenciájában, a Nemzeti Rákregiszterben az incidencia adatok az elmúlt 10 évben stabilan 11000-12000 körüli beteget jeleznek, a KSH mortalitási adatai pedig az elmúlt 10 évre visszamenőleg rendre 8-9000 közötti betegszámról szólnak (3). Mindez jelzi, hogy számottevő változás nem következett be a betegség fontos mutatóit illetően.

A korcsoport megoszlást tekintve a tüdőrák az idősebb korosztályt érinti, és a betegek 2/3-a 60 év feletti. A medián életkor tüdőrákban 68 év körül mozog. A nemek arányát illetően 1980-ban a tüdőrákos eseteknek még csak a 16%-a érintette a nőket, ez a szám 2020-ra már 45%-ra emelkedett (3). Ez a jelentős emelkedés és csaknem kiegyenlített férfi-női arány a dohányzási szokások megváltozásával és a „light” cigaretták térnyerésével magyarázható. Emellett a nemdohányzó, adenocarcinomás nők incidenciájának emelkedése is jelentős, ennek hátterében a passzív dohányzás szerepe, egyéb környezeti rizikófaktorok, úgymint az azbeszt, króm és arzén szennyezés, valamint genetikai tényezők szerepelhetnek (6).

A dohányzás és a tüdőrák kapcsolata jól ismert, a tüdőrákos betegek 85-90%-a dohányzik. A magyar lakosság dohányzási szokásairól és a passzív dohányzásról 2012-ben készült egy kérdőíves felmérés az Országos Egységfejlesztési Intézet szakmai irányításával (7). Ennek eredménye szerint a felnőtt lakosság 27%-a aktív dohányos. 2000 óta a dohányzás a férfiak körében valamelyest csökkent (38%-ról 32%-ra), a nők körében

számottevő változás nem észlelhető (23%). A dohányzás, az iskolai végzettség és az anyagi jólét kapcsolatának vizsgálatakor azt találták, hogy az alacsonyabb végzettségű és kevésbé jó anyagi körülmények között élő férfiak és nők nagyobb arányban dohányoznak. Számos dohányzás-leszoktató módszer ellenére, így pl. nikotinpótló készítmények, pszichoterápia, gyógyszeres terápia, a dohányzásról való leszokás aránya alacsony (max. 35-40%). A dohányzók számának csökkentésére a rendeletileg szabályozott tiltó intézkedések és a dohánytermékek árának emelése sem voltak számottevő hatással (7).

A dohányzásról való leszokás, valamint a tüdőrákos betegek kezelés alatti dohányzásának kérdésköre fontos onkopolmonológiai probléma. A több évtizedes dohányos előzménnyel rendelkező betegek a COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) kialakulásával tartós életminőség-romlást szenvednek, számos társbetegségben szenvedhetnek, úgymint coronaria betegség, érszűkület, osteoporosis vagy depresszió. Emellett bennük egyéb – dohányzással összefüggő – daganatos betegség is kialakulhat, mint pl. szájüregi rák, nyelvcső tumor vagy húgyhólyagrák. Mindezek által csökkenhet az esélyük egy reszekciós tüdőműtét elvégzésére, emellett az onkológiai kezeléseknél és a gyógyszerek megválasztásakor is rizikófaktorként szerepelhetnek ezek az állapotok. A dohányzás abbahagyása egyértelműen kedvező hatású a tüdőtumor műtéti eltávolítását megelőzően vagy a kemoterápia és a sugárkezelés alatt is.

Kevésbé egyértelmű a dohányzás elhagyásának kedvező hatása az immunterápiák vonatkozásában. Dohányosokban magasabb a tumorszövetben a mutációs terhelés (*Tumor Mutation Burden, TMB*), ami egyes vizsgálatok szerint önmagában is kedvező prediktív faktor (8). Ezidáig egyedül az MSD által szponzorált Keynote-024-es vizsgálatban dokumentálták, hogy a pembrolizumabbal végzett immunterápia hatásosabb volt a korábbi dohányosokban a jelenlegi dohányosokkal összehasonlítva (9).

2. A tüdőrák tünetei, diagnosztikája

A tüdőrák az esetek nagy részében tünetmentesen növekszik és ez elsősorban a perifériás daganatokra jellemző. A centrális daganatok korábban okoznak tünetek, amely leggyakrabban köhögés, rekedtség, mellkasi diszkomfort vagy véres köpet formájában jelentkezik. Egyéb szervek érintettsége esetén a légzőszervi panaszokon kívül krónikus fájdalom, ízületi panaszok, bőrtünetek, hasi panaszok és szédülés is megjelenhet.

A tünetek megléte vagy hiánya és a tüdőrák súlyossága között semmilyen egyértelmű összefüggés nem állapítható meg. Szűrés hiányában a betegség panaszmentesen csak akcidentálisan fedezhető fel, míg panasz meglétekor a betegség rendszerint már előrehaladott stádiumú, nem ritkán irreszekábilis. Ezért is fontos a szűrés, valamint olyan biomarkerek keresése, amelyek segíthetik a betegség korai felfedését, illetve a betegség lefolyásának követését.

Egy, az USA-ban végzett – mellkas RTG vizsgálaton alapuló – szűrővizsgálat nem mutatott túlélési előnyt a kontroll populációhoz képest, ezért a National Lung Screening Trial-ben a rizikócsoporthoz tartozók vizsgálata volt a cél. A tanulmányba 55-80 éves kor közötti, jelenleg is dohányzó, vagy 15 éven belül leszokott, legalább 30-PYI dohányos előzménnyel rendelkező 53 454 egyént vontak be és alacsony sugárdózisú (low-dose) mellkas CT-vel szűrték őket (10). A 2011-ben publikált adatok szerint ezzel a módszerrel 20%-os tüdőrák mortalitás csökkenést sikerült elérni.

Hazánkban a tüdőszűrő hálózat kialakítása és működtetése a korábbi évtizedekben a TBC elleni harc részét képezte, majd ennek sikeressége következtében a RTG szűrés fő céljává a tüdőrák korai stádiumban történő felfedezése vált. 2019-ben a szűrt betegek 4%-át emelték ki, amely 57526 esetet jelentett, de ebbe a betegcsoportba a tüdőrákon kívül egyéb betegségek is szerepeltek, úgymint TBC, egyéb gyulladással járó tüdőbetegségek, COPD, intersticiális tüdőbetegség, stb. (3). A kötelező tüdőszűrés megszűnésével 2016-ban Magyarországon is a rizikócsoporthoz tartozók szűrésére tértek át, ami sok további kérdést vet fel. Pilot vizsgálatként, önkéntesek bevonásával az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben elindult low-dose mellkasi CT szűrés eredményei még csak részben ismertek (Hunchest vizsgálat) (11, 12), de ha összevetjük a panasszal, illetve szűréssel felfedezett tüdőrákos betegek stádium megoszlását, akkor a panaszos csoportban 22%, míg a szűréssel felfedezett csoportban 45% volt a reszekálható, vagyis a korai stádiumban lévő panaszmentes tumoros betegek profitáltak leginkább a szűrésből (3). Mindemellett, mindkét csoportban igen magas volt a IV. stádiumban lévő, tehát távoli szervi áttétes betegek száma (panasszal 48%, szűréssel 25%) ami a korábbi betegségfelismerés sürgető igényét veti fel.

A tüdőrák diagnosztikájában kiemelkedő szerepe van a képalkotó vizsgálatoknak, amelyek RTG, CT, MRI és PET-CT vizsgálatok alkalmazását és komplex értékelését

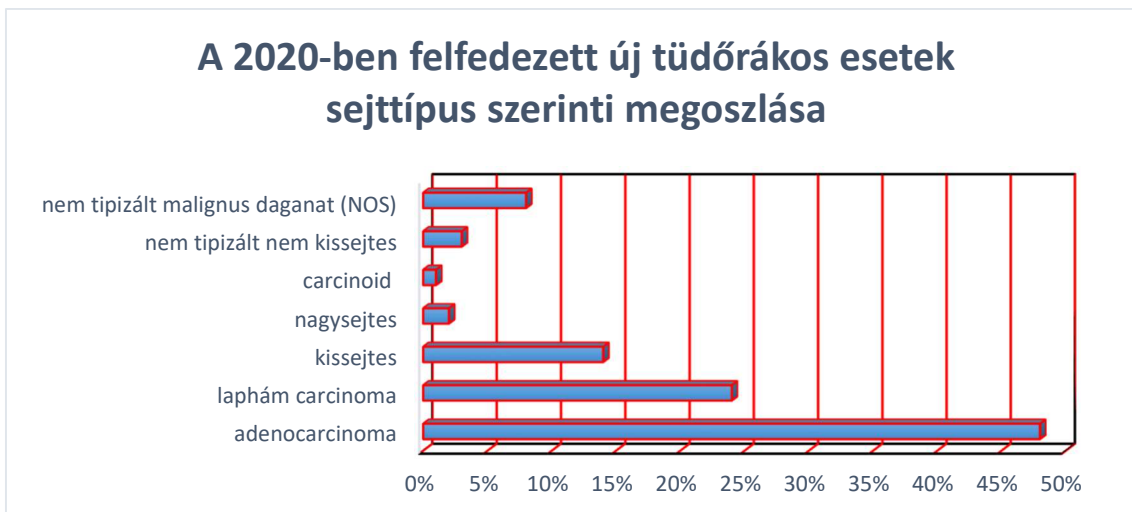
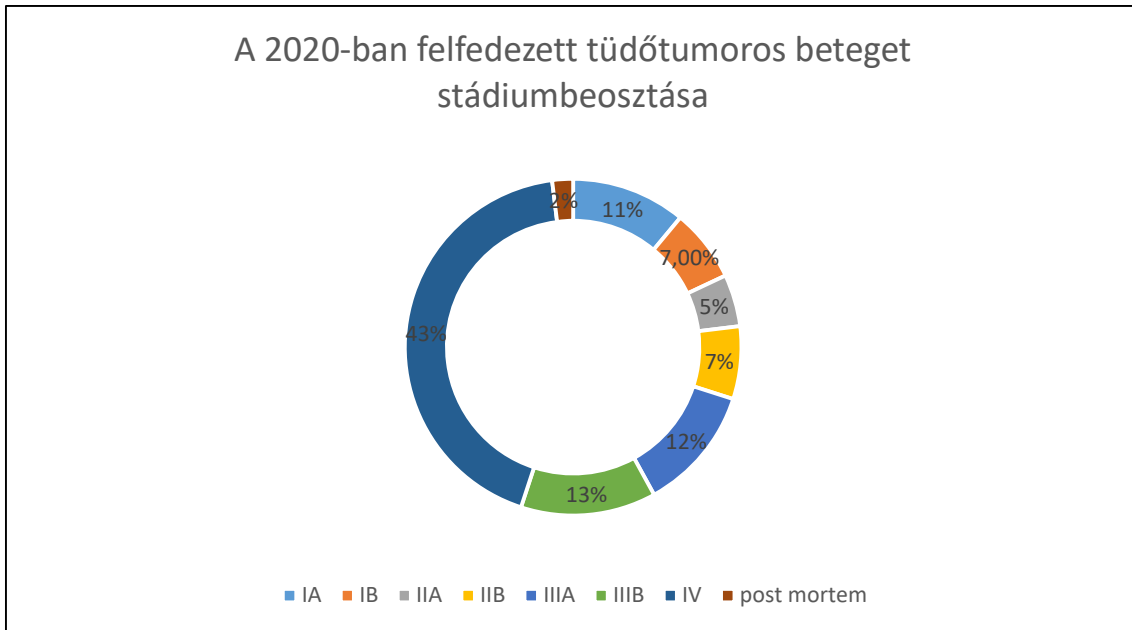
jelenti. A képalkotó vizsgálatokkal a betegség pontos lokalizációját és kiterjedését határozzuk meg, elősegítve ezzel különféle mintavételi eljárások alkalmazását és a stádium meghatározását. A mintavétel történhet endoszkópos, sebészi vagy egyéb biopsziás módszerrel, például aspirációval vagy core biopsziával. A mintavételt RTG- vagy CT-vezérlés segítheti. A mintavételi technikák alkalmazásánál törekedni kell a megfelelő mennyiségű és minőségű szövetminta nyerésére, mivel a továbbiakban ezen alapul a daganat patológiai tipizálása és molekuláris analízise is. Az új terápiák bevezetésével új feladatok generálódtak a mintavételi technikák területén is. Korábban a daganat verifikálásához elegendő volt akár egy citológiai kenet is, amit egy endoszkóposan látható nyálkahártya elváltozásból, vagy RTG képerősítő alatt egy perifériás tüdőelváltozásból nyertünk. A transbronchiális tübiopszia (*TransBronchial Needle Aspiration*, TBNA) a CT által meghatározott és a hörgő falához hozzáfekvéő tumorból, vagy megnagyobbodott nyirokcsomókból teszi lehetővé a mintavételt, de ezeknek a mintáknak a legnagyobb része még vastagabb tü esetén is csak citológiai feldolgozást tesz lehetővé. Malignitást igazoló patológiai lelet esetén a beteg műtethetőségéről, illetve az onkológiai kezelés menetéről is dönteni kell. A diagnosztikában egy további fontos eszköz az endoszkópos ultrahang (*Endoscopic Bronchial UltraSound*, EBUS), amely gyakorlott bronchológus kezében további növeli a mediastinális staging pontosságát. Ennek a vizsgálatnak hátránya, hogy nem helyi érzéstelenítésben, hanem altatásban történik, tehát idő- és személyigényes, emellett költséges az eszköz beszerzése és alkalmazása. A kriobiopszia szintén egy új mintavételi eljárás, amellyel a hagyományos bronchoscopos szövettani mintához képest nagyobb szövettani minta vehető. Endoszkóposan a tumorosan elzárt légút felszabadítására és a RTG képerősítő alatt jól látható perifériás tüdőelváltozások mintavételére is használható. Az esetek legnagyobb részében szedálásban alkalmazzák, éppen ezért idő- és eszközigényes, emellett nagy óvatosságot és endoszkópos jártasságot igényel a mintavétel után potenciálisan jelentkező vérzés elhárítása érdekében.

A korábban használt nomenklatúra szerint, és a klinikai gyakorlatban még jelenleg is, gyakran megkülönböztetünk a tüdőrákon belül nem-kissejtes tüdőrákot (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), amelybe az esetek 80-85%-a tartozik és kissejtes tüdőrákot (*small cell lung cancer*, SCLC), amely 15-20% gyakoriságú. Ez utóbbi alcsoport gyors lefolyású és magas letalitású, betegség; az ötéves túlélés alig éri el az 1%-ot. Az elmúlt években ez

a korábbi elnevezés jelentős mértékben átalakult. Igazolódott, hogy a nem-kissejtes tüdőrákokon belül számos, jelentős mértékben eltérő szövettani altípus található, melyek klinikai megjelenése és kezelése is nagymértékben különbözik. Így a jelenleg érvényben lévő beosztás szerint a tüdőrákoknál – főbb csoportokként – megkülönböztetünk adenocarcinomát (ADC) és laphámrákot (*squamous cell carcinoma*, SCC), melyek korábban az NSCLC kategóriába tartoztak, valamint neuroendocrin carcinomákat. Ide a kissejtes tüdőrákokon kívül a korábban az NSCLC csoportba eső nagysejtes carcinoma, valamint a carcinoid is tartozik (13). Ezen felosztás segítségével a daganatok biológiai jellemzői jobban elkülöníthetők, és ez képezi a további onkoterápia meghatározásának egyik alappilléret.

3. A tüdőrák stádiumai

Napjainkban a tüdőrák stádiumait a 8. verziójú TNM klasszifikáció alapján határozzuk meg (14). Korai (I-IIIa) stádiumban a betegség gyakran tünetmentes, ezért – sajnálatos módon – legtöbbször késői (IIIB-IV) stádiumban kerül felfedezésre. 2021-ben a tüdőtumoros betegeknek mindössze 27%-a volt alkalmas sebészi kezelésre (IA-IIIa) és 29% kapott tüneti terápiát (3). A tünettelen felfedezett betegek között az IA-IIIa stádium összességében 37%, míg a szűréssel felfedezettek között ugyanez a csoport 65%-ot képvisel. A IIIB stádium a tünetes csoportban 13%, míg a szűréssel felfedezett csoportban 10%. A IV stádiumú betegek aránya a panasszal felfedezett csoportban 48%, a szűréssel felfedezett csoportban csak 25% volt. Érdeemes kiemelni, hogy a reszekciós ráta a tünetes csoportban 22%, míg a tünetmentes, szűréssel felfedezett csoportban a duplája, 45% (3).



1. ábra: A tüdő tumoros betegek stádiumbeosztása és szövettani típusainak megoszlása 2020-ban Magyarországon

(a *Korányi Bulletin*, 2021. I. szám adatai alapján (3)).

4. A tüdőrák terápiája

A tüdőrák kezelését az NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) irányelvei foglalják össze, ezenkívül az ESMO guideline-ok is segítik a terápiás stratégia

kidolgozását. Hazánkban tüdőrákban alkalmazott onkoterápiás előírásokat nemzetközileg elfogadott klinikai vizsgálatok eredményei, a szakmai kollégiumok ajánlásai határozzák meg, a finanszírozási kereteket az EMMI (*Emberi Erőforrások Minisztériuma*) rendeletek adják. A kezelés meghatározásának fontos része az onkoteamek kialakítása volt (1/2012 (V.31), ahol komplex onkológiai szemlélettel és a társszakmák képviselőinek – úgymint mellkassebész, sugárterapeuta, radiológus, patológus, tüdőgyógyász, esetenként idegsebész – bevonásával kerül megbeszélésre minden beteg vizsgálati lelete (15).

A kezelés fontos részét képezi a beteg általános állapotának, „performance status”-ának (PS) felmérése. Többféle score rendszer van használatban, így például az ECOG-skála (0-5) (*Eastern Cooperative Oncology Group*), vagy a Karnovsky-pontrendszer (100-0). A kezelés meghatározása a daganat szövettani típusán, molekuláris genetikai jellemzőin, a képalkotó vizsgálatok által meghatározott klinikai stádiumon, a beteg belgyógyászati állapotán, valamint társbetegségein és korábbi gyógyszerelésén alapul(15).

4.1 Műtét

A tüdőrák kezelésének definitív módja a primer tumor sebészi eltávolítása, de erre a betegek csak kb. 20-30%-a alkalmas. A magyarországi adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a tüdőszűrésből a panaszmentesen felfedezett és operációra alkalmas esetek profitálnak leginkább: a szűréssel felfedezett betegpopulációban a reszekciós ráta 45%, míg a panasszal felfedezett csoportban csak 22% (3). A sebészeti beavatkozást megelőzően részletes staging vizsgálatokat kell végezni a lehetséges metasztázisok felkutatására. Ennek része a precíz bronchoscopos vizsgálat, akár endoszkópos ultrahanggal kiegészítve, mert ez utóbbi segíthet a mediasztinális nyirokcsomó érintettség kimutatásában. Fontos emellett PET CT elvégzése is, ami megbívó és tüneteket nem okozó távoli áttéteket igazolhat. A tüdőrák sebészeti ellátásának alapelve, hogy a daganatot a hozzá kapcsolódó nyirokcsomó lánccal egy anatómiai egységben kell eltávolítani. A sebészeti technika fejlődésével a hagyományos lobectomián és pneumonectomián kívül – gondosan szelektált esetekben – segmentectomia és atípusos részreszekció is szóba jöhet. Ez utóbbi műtéti módszerek leginkább az 1 cm körüli átmérőjű, perifériás daganatok eltávolítására alkalmasak. A műtéti szövődmények csökkentése lehetővé vált video-asszisztált műtéti technikák (*Video-Assisted Thoracic Surgery*, VATS) alkalmazásával, ami a posztoperatív sebgyógyulás lerövidítését

eredményezte. 2020-ban a reszekciós tüdőműtétek mennyisége összességében 24%-kal csökkent a 2019. évhez képest. A primer tüdőtumor miatt végzett műtétek megoszlása a következő volt: 60,6% lobectomia, 23,6% ékreszekció, segmentectomia 7%, pulmonectomia 5.8% (16). A legújabb műtéti technika tüdősebészetben is a robotok alkalmazása (*Robot-Assisted Thoracic Surgery*, RATS). Ezzel a technikával az onkológiai irányelvek betartásával, minimálisan invazív módon végezhető el a tumoros tüdőlebeny vagy segment eltávolítása (17, 18). A robotikus és a video-asszociált műtéti technikák összehasonlítása és eredményessége jelenleg is intenzív kutatások tárgya. Alternatív nem sebészi, ugyanakkor műtéttel egyenértékű beavatkozás a perifériás, kisméretű tüdőtumorkok mikrohullámú és radiofrekvenciás ablációja (19).

4.2 Kemoterápia

Tüdőrákban a kemoterápia alkalmazásának több típusa van, aszerint, hogy milyen stádiumú daganatot kezelünk: *neoadjuváns*, *adjuváns*, *konkomittáló* vagy *szekvenciális* kemoterápiás kezelési lehetőségeket különböztetünk meg. A neoadjuváns, preoperatív kezelés egy nagyon szelektált betegcsoportot érint, kb. 1%-a a nem-kissejtes tüdőrákos eseteknek. A kezelés azokra a IIB-III A stádiumú daganatokra vonatkozik, ahol a kiindulási staging vizsgálatok alapján műtéti lehetőség szóba jön, amennyiben 1-3 ciklus kombinációs kemoterápiát követően a daganat megkisebbedése következik be.

Adjuváns kemoterápiás kezelésem a műtéti beavatkozást követően adott 2-4 ciklus platina-bázisú, kettős kombinációjú kemoterápiát értjük, amikor a patológiai staging alapján a betegség a II-III stádiumba sorolható.

Kombinált radio-kemoterápia során a kemoterápia és az irradiáció együttes alkalmazására kerül sor. Ezt a kezelési módot konkomittáló, vagy konkurrens kemoradioterápiának nevezzük. Döntően a IIIA (bulky N2) és a IIIB stádiumú betegségben alkalmazzuk és az ilyen esetekben a kemoterápiát csökkentett dózisban adjuk. Erre a kezelésre csak a nagyon jó általános állapotú, fiatalabb betegek alkalmasak, tekintettel a radiogén- és a hematológiai mellékhatásokra. Amennyiben a kemoterápiát és irradiációt egymást követően alkalmazzuk, szekvenciális kezelésnek nevezzük. A IIIA-IIIB betegcsoportban, amennyiben a beteg a kezelést az irradiációval fejezte be, PD-L1 pozitív daganat esetén

12 hónapig, 2 hetente alkalmazott durvalumab kezeléssel jelentős túlélési előnyt lehetett elérni a PACIFIC vizsgálat szerint (20).

A IV stádiumú nem-kissejtes tüdőrák kezelésében jelentős változás történt az immunterápiás szerek bevezetésével, de még így is a kemoterápia jelenti a kezelés gerincét a metasztatikus, driver mutációt pl. EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), ALK (*Anaplastikus Lymphoma Kináz*) nem hordozó és 50% alatti PD-L1 státuszú betegcsoport elsövonalbeli kezelésében (21). Kettős kombinációjú, platina-bázisú, citotoxikus kemoterápia alkalmazása javasolt, amennyiben ezt a beteg performance státusza lehetővé teszi. Nem-laphámsejtes daganattípusban a kezelés bevacizumabbal kiegészíthető és ebben a szövettani típusban a pemetrexed-carboplatin kezelés hatékonyabbnak bizonyult a gemcitabin-cisplatin kombinációhoz képest. Mind a bevacizumab, mind a pemetrexed tovább alkalmazható fenntartó kezelés formájában, amennyiben a 4-6 ciklusban alkalmazott kombinációs kemoterápia utáni kontroll képalkotó vizsgálatok a betegség stabilizációját, vagy regresszióját igazolják. A másod- és harmadvonalban alkalmazott kemoterápia monoterápia formában történik (22). Laphámrákban 50% alatti PD-L1 státusz esetén szintén a platina-bázisú kettős kombinációjú szerek képezik a standard kezelést, míg másodvonalon PD-L1 meghatározás nélkül alkalmazható a nivolumab és az atezolizumab immunterápia (23).

4.3 Sugárterápia

Sugárkezelés során ionizáló sugárzást alkalmazunk a tumorsejtek elpusztítása és a tumorméret csökkentése céljából. A daganat méretétől és a betegség stádiumától függően kuratív és palliatív célú besugárzást különböztetünk meg. Kisméretű, perifériás elhelyezkedésű tumorok és súlyos társbetegségek együttes előfordulása esetén, szelektált esetekben, a tüdőtumor célzott besugárzása a műtét alternatívája lehet a korai stádiumú, nyirokcsomó érintettséggel nem járó tumorok esetén (IA-IIA) (24). A sugárterápia szisztémás kemoterápiával kombinálva, együttesen vagy szekvenciálisan alkalmazva a IIB-IIIIB stádiumú beteget kezelésének gerincét jelentik. A klinikai vizsgálatok legújabb eredményei alapján a nem-kissejtes tumorokban, PD-L1 pozitívítás esetén, sikeres kemoradioterápiát követően, tehát komplett vagy parciális remisszió vagy stabil betegség igazolásakor további 12 hónapig alkalmazott durvalumab immunterápia további

progressziómentes túléléssel járhat (20). A IV stádiumú, metasztatikus esetekben a sugárkezelésnek sürgősségi indikációja is lehet pl. vena cava superior szindróma esetén dekompresziós céllal, vagy csontmetasztázisok esetén fájdalomcsillapító céllal. Agyi metasztázisok esetén 10x3 Gy koponya besugárzást (WBRT, *Whole Brain RadioTherapy*) alkalmazunk, míg szoliter agyi áttét esetén – idegsebészeti együttműködésben – a daganat célzott besugárzása egy dózisban elvégezhető (25). Ez lényegesen kisebb megterheléssel jár, mint a koponya megnyitásával járó, invazív műtét. A sugárkezelés speciális formája a brachyterápia, ami – pulmonológiai indikációban – a nagylégutak jelentős tumoros elzáródása esetén lokálisan leadott 5-10 Gy irradiációval a légutak átjárhatóságának biztosítását szolgálja (26).

4.4 Molekuláris célzott terápia

A molekuláris célzott kezelés a betegek kb. 20-25%-ában jelent terápiai lehetőséget, elsősorban az adenocarcinoma szövettani típusban. Ezeknek a betegeknek a megtalálása nagy kihívást jelent az onkopulmonológusok számára, mivel a daganat tipizálásához és mutációs státuszának meghatározásához megfelelő mennyiségű és minőségű tumormintára van szükség. A célzott kezelés elsővonalbeli alkalmazása egyértelmű túlélési előnyt jelent a driver mutációt hordozó daganatban szenvedőknél. A célzott kezelések további előnye, hogy a gyógyszerek szájon át szedhetők és mellékhatásprofiljuk kedvezőbb, miáltal jobb a betegek compliance-e.

A leggyakoribb mutáció az **EGFR** szenzitizáló mutáció, amely kb.15% gyakoriságú. Két legfontosabb megjelenési formája az exon 19 deléció, valamint az exon 21 L858R pontmutáció. Ebben a betegcsoportban gefitinib és erlotinib elsővonalbeli alkalmazásával 60-80%-os terápiai választ és 9-13 hónap progressziómentes túlélést lehet elérni, de vannak több évig teljes remisszióban lévő betegek is (27). A kezelés előrehaladtával előbb-utóbb rezisztencia jelenik meg, aminek hátterében legtöbbször az exon 20 T790M mutációja áll. A mutáció kimutatása történhet vérből, likvid vagy folyékony biopszia alkalmazásával, valamint új tumorminta vételével (28).

A tumorból származó genetikai minta a vérben háromféle formában jelenhet meg: 1.) maga a tumorsejt kerül a keringésbe, 2.) a tumorsejtek apoptózisa miatt a széteső sejtekből

DNS- vagy RNS fragmentek kerülnek kis membránnal körülvett vezikulumokba vagy más néven exoszómákba, 3.) önmagukban a tumor DNS fragmentumok cirkulálnak a vérben. Maga a likvid biopszia elnevezés a testfolyadékok, úgymint a vér, nyál, mellkasi folyadék, likvor vagy vizelet vizsgálatára vonatkozik, és a tumorból származó keringő DNS fragmentek (cirkuláló tumor-DNS, ctDNS) elemzésére fejlesztették ki. Az így nyert genetikai információ a tumor reprezentatív markereként használható és bizonyos esetekben a betegség monitorizálására is alkalmas. Tüdőrákban leggyakrabban vérből történik likvid biopsziás vizsgálat és leginkább EGFR-gátló kezelés során fellépő rezisztencia mutáció (pl. T790M) kimutatása céljából alkalmazzák (29).

Igazolt **EGFR T790M** mutáció esetén másodvonalban osimertinib kezelés kezdhető, amely egy harmadik generációs tirozinkináz inhibitor. A standard kemoterápiával való összehasonlítását az AURA klinikai vizsgálatban végezték el, ahol a progressziómentes túlélés, a terápiás válasz, a központi idegrendszeri penetráció és a betegség-kontroll vonatkozásában is előnyösebbnek bizonyult (30). A gefitinibbel és erlotinibbel való összehasonlítás elsővonalban szintén az osimertinib javára mutatott előnyt a progressziómentes túlélésben, és hatékonyságát bizonyították EGFR szentitizáló mutációk meglétekor, T790M mutáció kimutatása nélkül is. Magyarországon finanszírozási okokból jelenleg T790M mutáció esetén csak másod- vagy többedvonalban alkalmazható, vagy igazolt agyi metasztázis esetén és kizárólag egyedi méltányossági kérelem (EMK) alapján.

Az **ALK** génátrendeződés a nem-kissejtes tüdőtumorkok 2-7%-ában fordul elő. Az esetek 95%-ában az ALK gén transzlokálódik a 2-es kromoszómán belül és fuzionál az EML4 génnel. Az elsőgenerációs AK-gátló crizotinib alkalmazását kemoterápia-rezisztens ALK pozitív betegekben a PROFILE vizsgálatok alapján törzskönyvezték (31). A kezelés mellett kb. 1 éven belül bekövetkező progresszió háttérében rezisztencia mutáció (kb. 20%) vagy génamplifikáció (kb 8%), kissejtes tüdőrák transzformáció, vagy egyéb jelátviteli út aktiválódása is állhat. Szelektívebb, második generációs ALK-gátlók kifejlesztésére is sor került, mint például az alectinib, ceritinib, brigatinib, amelyek alkalmazásával szekvenciálisan lehet a betegek kezelését folytatni. A másodvonalas kezelés mellett kb. 50%-ban progrediáló esetekben más rezisztencia mechanizmusok is igazolódtak, ilyen például az ALK G1202R mutáció. Ebben az esetben a crizotinib

hatásossága csekély. A ceritinibbel kapcsolatos törzskönyvezési vizsgálatban (ASCEND-4) a kemoterápia versus ceritinib alkalmazását vették össze elsővonalban, de a gyakori gastrointestinális mellékhatások miatt nem került be a napi gyakorlatba (32). Az ALK pozitív betegek elsővonalbeli kezelésénél az alectinib versus crizotinib összehasonlításakor az alectinib lényegesen hatásosabbnak bizonyult, tekintettel arra, hogy 34,8 hónap PFS-t ért el, szemben a crizotinibnél detektált 10,9 hónappal (32).

ROS1 génátrendeződés a nem-kissejtes tüdőtumorkok 1-2%-ában fordul elő. Az egyetlen törzskönyvezett gyógyszer a crizotinib, amely kombinált ALK/MET/ROS1 tirozinkináz inhibitor és amelyet a PROFILE 1001 vizsgálat eredményei alapján törzskönyveztek (33). A vizsgálat eredményei szerint a terápiás válaszarány 72%, a PFS 19.2 hónap volt. Progresszió esetén az esetek kb. 50%-ában a G2032R mutáció volt azonosítható.

A **BRAF** mutáció előfordulása jól ismert a melanoma malignumban, nem-kissejtes tüdőrákban pedig 2-4% gyakoriságú és leginkább V600E mutáció fordul elő. Áttétes melanoma malignumban a BRAF-gátlók és a MEK-gátlók együttes alkalmazásakor a terápiás hatékonyság növekedését észlelték, így ez a kombináció standard kezeléssé vált ebben a daganattípusban. Nem-kissejtes tüdőrákban a dabrafenib-trametinib kombináció került törzskönyvezésre (34).

4.5 Immunterápia

A tüdőrák kezelésében forradalmi áttörést hoztak az immunellenőrzőpont-gátló gyógyszerek, amelyek a magas immunogén potenciállal bíró daganattípusokban működnek eredményesen. Az immunogén potenciál főként a szomatikus mutációk gyakoriságától függ, amely a melanoma malignumot követően a tüdőtumorkokban a legmagasabb. A magasabb immunogenitás főként a dohányzó betegpopulációra jellemző, és ebben a betegcsoportban az immunterápiás készítmények hatásosabb működése is megfigyelhető. Az immunterápiás készítményekkel kapcsolatos klinikai vizsgálatokat a melanoma malignumban tesztelték először, így a CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigene-4*) ellenes antitest, az ipilimumab kipróbálása is metasztatikus melanomában történt. A CTLA-4, vagy CD 152 az antigénprezentáló sejtek felszínén helyezkedik el, és gátló regulátora a T-sejtek aktiválásának, amelyhez a B7 (1+2) receptorcsoporthoz való

kapcsolódása szükséges. A CTLA-4 ellenes antitest, az ipilimumab egy human CTLA-4 monoklonális antitest (IgG κ), amit kínai hörcsög petefészekben állítottak elő rekombináns DNS technológiával (35).

Az első vizsgálatok egyike paclitaxel-carboplatin +/- ipilimumab nem-kissejtes tüdőrákban igazolta az immunterápia+kemoterápia kombináció alkalmazásának sikerességét, mivel a medián teljes túlélés az immunterápia+kemoterápia karon 12,2 hónap volt, míg a kemoterápiás karon 8,3 hónap. Ez a négyhónapos előny viszont csak akkor érvényesült, ha az ipilimumabot az első 2 kemoterápia után kezdték el adagolni a kezeléshez. Abban a betegcsoportban, ahol a kemoterápia és az ipilimumab a kezdetektől együtt került beadásra, ez a négyhónapos előny nem jelentkezett. Ez az eredmény alátámasztotta azt a megfigyelést, hogy a kemoterápia – és különösen a taxán+platina kettős kombináció – tumor specifikus antigének felszabadítását indítja el, ami a T-sejtek fokozottabb aktivációjához vezet (36).

A T-sejtek aktivációját a PD-L1/PD-1 tengely gátlásával is el lehet érni. Ennek az útvonalnak két ismert és forgalomban lévő PD-1 gátlószere a nivolumab és a pembrolizumab. Az immunterápiás készítményeket először metasztatikus betegekben, másod- és harmadvonalban próbálták ki, mivel preklinikai modellek alapján feltételezték, hogy a kemoterápiával előkezelt tumorban, a széteső tumorsejtekből felszabaduló tumor specifikus antigének fokozzák az immunválaszt. A Checkmate 017-es vizsgálatban a nivolumab hatékonyságát vetették össze docetaxellel, előrehaladott stádiumú, platinabázisú kemoterápiával előkezelt laphámsejtes betegekben (23). Az elsődleges végpont a teljes túlélés (OS) volt. A nivolumab mind az OS, mind pedig a PFS tekintetében felülmúlta a docetaxel hatékonyságát, függetlenül a daganatok PD-L1 státuszától. Az egy- két- és hároméves túlélési arány a nivolumab csoportban 42%, 23% és 16% volt, míg a docetaxel karon 24%, 8% és 6%. Ezzel a vizsgálattal törzskönyvezték a nivolumabot laphámsejtes tumorokban, másodvonalon, 240 mg fix dózisban, 2 heti adagolásban, PD-L1 státusztól függetlenül.

A Checkmate-057-es vizsgálatban a nem-laphámsejtes daganatcsoportban vizsgálták a nivolumab hatékonyságát docetaxellel összehasonlítva, másodvonalon (37). Az egy- két- és hároméves túlélési arányok a nivolumab karon 51%, 29% és 18% volt, míg a docetaxel karon 39%, 16% és 9%.

A pembrolizumab hatékonyságát előrehaladott stádiumú NSCLC-ben, másod- és többedvonalban a Keynote-010-es vizsgálatban vetették össze a docetaxellel (38). Ez egyben egy dóziskereső vizsgálat is volt, ahol a 2 mg/tskg és 10 mg/tskg dózisu pembrolizumab 3 heti adagolását is összevetették a docetaxellel. Ebben a vizsgálatban csak PD-L1 pozitív beteg vettek részt. Az OS a 10 mg/tskg dózisban 17,3 hónap volt, míg a 2 mg/ tskg csoportban 14,9 hónap. Ezen vizsgálat alapján törzkönyvezték a pembrolizumabot PD-L1 pozitív, előrehaladott stádiumú NSCLC-ben másod- vagy többedvonalban.

Az atezolizumab egy PD-L1 inhibitor, amelynek hatékonyságát az OAK vizsgálatban tanulmányozták docetaxellel összehasonlítva másod- és többedvonalban, PD-L1 meghatározás nélkül (39).

A durvalumab egy humán monoklonális IgG1, amely hatékonyságának elemzésére a PACIFIC vizsgálatban került sor. A vizsgálat meglepő eredményekkel szolgált: a résztvevő IIIB stádiumú NSCLC-ben szenvedő betegeket konkomittáló kemoradioterápiával kezelték, majd azokban az esetekben, ahol a kezelés végéig nem alakult ki progresszió, 12 hónapon át fenntartó durvalumab/placebo kezelést adtak. A vizsgálatnak két elsődleges végpontja volt: a PFS és az OS. A vizsgálat – PD-L1 státusztól függetlenül – a durvalumab karon 12 hónap túlélési előnyt hozott a placebohoz képest, de nem volt szignifikáns az OS vonatkozásában (20). Ez a vizsgálati eredmény arra utalt, hogy sugárkezelés hozzáadásával az immunrendszer működése kedvező módon befolyásolható.

Tüdőrákban az immunterápia első vonalban történő alkalmazását a Keynote-024-es vizsgálat eredményei alapozták meg (40). Ebbe a vizsgálatba 50% feletti PD-L1 pozitivitással rendelkező, előrehaladott stádiumú NSCLC-s betegeket lehetett bevonni, ahol előzetesen kizárásra kerültek a driver mutációk és az agyi áttét is. A háromhetes adagolású pembrolizumabnál a PFS 10,3 hónapnak bizonyult a standard kemoterápiánál pedig 6,0 hónap. A medián OS 30 hónap volt az immunterápiás karon és 14,2 a kemoterápiás karon, ezért progresszió esetén, akik kezdetben kemoterápiát kaptak, immunterápiával folytathatták a kezelést. Ebből egy PFS2 eredményt is számoltak, ami 18,3 hónap volt azon a karon, ahol pembrolizumab kezeléssel kezdtek, és 8,4 hónap azoknál, akik a kemoterápiával kezdték a kezelést és csak másodvonalban kaptak

pembrolizumabot. Ez egyértelmű választ adott arra a kérdésre, hogy számít-e a kezelések sorrendisége. 50% feletti PD-L1 pozitivitású daganatban szenvedő betegek esetében az immunterápia elsőként választandó, ha nem állnak fenn kizáró okok.

A fenti eredmények bizonyították, hogy az immunterápia egyértelmű előnyt mutat az előrehaladott stádiumú betegek másod- vagy többedvonalas kezelésében, monoterápiában. Mellékhatásprofilja tolerálható és egy fenntartó kezelés akár 2-3 évig is eredményes lehet. További vizsgálatok szükségesek azonban pontosabb prediktív markerek azonosítása érdekében, továbbá kérdésként merül fel, hogy mely kikknél működhet leginkább első vonalban, kikknél érdemes kemoterápiával kombinálni, továbbá milyen hatása lehet a sugárkezelésnek az immunterápiára. Nem kellően tisztázott az sem, hogy a tumorszövet elemzése mellett milyen klinikopatológiai paraméterek segíthetik elő az eredményesebb betegszelekciót.

4.6 Szupportív terápia

A szupportív terápián mindazon kezelési lehetőségeket értjük, amelyekkel a daganatellenes kezelés okozta mellékhatásokat, valamint a daganatos betegség által előidézett panaszokat enyhítjük. Hörgőtágító, köhögéscsillapító és mukolitikus kezeléssel a légutak tisztulása és átjárhatósága javul, oxigénkezelés alkalmazásával javul a szövetek oxigén felvétele. Nemritkán fontos a tumoros betegek tápláltsági állapotának javítása, hiszen a daganatellenes kezelések étvágytalanságot, émelygést, hányingert, savtúltengést, a nyálképződés zavarát, obstipációt, hasmenést vagy exsiccósist okozhatnak. A táplálékkiegészítő gyógytápszerek alkalmazásával a nyomelem- és vitamintólás biztosított, a tartós sugárkezelés során fellépő nyelőcső irritáció, dysphagia és stomatitis jól kezelhető. Probiotikumok alkalmazásával, valamint a bélbolyhok regenerációját biztosító glutaminkészítmények adásával a megfelelő bélműködés is biztosítható (41).

A daganatos betegek fájdalomcsillapítása a WHO irányelvei alapján történik, lépcsőzetesen haladva a nonszteroid fájdalomcsillapítóktól az opiát tartalmú készítményeken át a morfin-származékok felé (42, 43).

Modern hematológiai készítmények, úgymint granulocita colonia stimuláló faktor (GCSF) és erythropoetin készítmények subcutan adásával a kemoterápia okozta

vérképzőszervi eltérések és a magas letalitású lázas neutropenia kockázata jelentősen csökkenthető.

A szteroidokat széles körben alkalmazzuk a szupportív terápia során. Kevés klinikai tanulmány foglalkozik a szteroidok evidenciaszintű alkalmazásával, viszont alkalmazásuk az 1950-es évek óta különféle indikációkban igen elterjedtté vált (42, 44). A klinikai gyakorlatban végstádiumú daganatos betegségben gyakran alkalmazzuk roborálásra, az anorexia tüneteinek, a krónikus fáradékonyságnak és az étvágytalanságnak a mérséklésére. Hányinger-csillapító hatásuk szintén ismert. Allergiaellenes hatását használjuk a kemoterápiákat megelőző premedikációban, ödémacsökkentő hatása miatt pedig az agyi metasztázisok okozta agynyomásfokozódás kezelésében alkalmazzuk. Emellett segítségükkel a nagylégúti tumoros kompressziót csökkenthetjük, amivel mérsékeljük a nehézlégzést. Gyulladás-csökkentő hatását a csontmetasztázisok okozta fájdalomcsillapításban használjuk ki. Direkt fájdalomcsillapító hatása nincs, ezért a csontmetasztázisok esetében nonszteroidokkal, opiátokkal, biszfosfonátokkal való kombinálását javasolják. Ugyanakkor jól ismert számos nemkívánatos mellékhatása is. Rövid távon vérnyomás-emelkedést, insomniát, pszichózist okozhat, gombás nyálkahártya fertőzés vagy nyálkahártya erosiók révén pedig vérzéseket eredményezhet. Hosszútávon sebgyógyulási zavart, a bőr elvékonyodását, cataracta kialakulását okozhatja, emellett depressziót, tudatzavart, nem kívánatos súlytöbbletet okozhat és gátolja az angiogenezist. Diabetogén hatása, valamint osteroporosist okozó hatása a tartós használat következménye. A szteroidok alkalmazásának kérdése az immunterápiás készítmények bevezetésével került ismét a középpontba, különösen agyi áttét esetén, ahol a peritumorális ödéma csökkentése érdekében gyakran alkalmazzák. A szteroidok gátolják az immunterápiás készítmények hatását, ezért ilyen onkoterápia során alkalmazhatóságuk igen korlátozott. A szteroidok hatását a daganatszövet PD-1 és PD-L1 receptor expressziójára, valamint a daganatot infiltráló immunsejtek denzitására munkacsoportunk több vizsgálatban is tanulmányozta és tüdőrákok agyi áttéteiben elsőként írta le (45, 46).

5. Biomarkerek tüdőrákban

Amikor egy betegségre jellemző markert, vagy jelző molekulát keresünk, több kérdést is érdemes tisztázni. Mire is akarjuk valójában használni: szűrésre, a betegség kiterjedtségének megítélésére, a gyógyszeres kezelés megválasztására vagy a kezelés eredményességének monitorozására?

Tumormarker (biomarker) lehet bármely olyan molekula, amelyet a tumorsejtek termelnek, a karcinogenezis során keletkezik, vagy pedig az egészséges sejtekben genetikai behatásra jön létre. A tumormarkerek csoportosíthatók aszerint, hogy szolubilis sejtermékről (szérum tumormarker) vagy szövettani diagnózisra alkalmas sejtfelszíni markerről (szöveti biomarker) van-e szó. A szöveti biomarkerek tovább osztályozhatók pl. proliferációs markerekre, onkogénekre, tumorszuppresszor génekre, növekedési faktorokra, vaszkularizációs markerekre és gyógyszer rezisztencia faktorokra (47, 48).

5.1 Keringő biomarkerek

A szérum tumormarkerek közül legintenzívebben a CYFRA 21-1 (*cytokeratin fragment 21-1*) (49), az NSE (*neuron specific enolase*) (50, 51), a CEA (*carcinoembryonic antigen*) (52), a TPA (*tissue polypeptide antigen*) és a p53 ellenes antitest vizsgálatára került sor (53). Ezek egyike sem váltotta be azonban a hozzájuk fűzött reményeket, így tüdőrákban a szérum tumormarkereket egyelőre nem használjuk sem a diagnosztikára, a differenciál-diagnosztikára, a betegség progressziójának megítélésére, sem pedig a terápia monitorozására.

Újabb molekulák is látótérbe kerültek, mint potenciális biomarkerek: például az autoantitestek, amelyek az abnormális tumor antigének ellen termelődnek, vagy a komplement fragmentumok, mint pl. a C4d, amely a plazmában mérhető a komplement rendszer aktiválódása esetén (54). A keringő micro RNS-ek (miRNA), valamint a keringő tumor DNS szintén intenzív vizsgálatok tárgya (54).

5.1.1. Likvid biopszia

A hagyományos tumordiagnosztikában elsősorban radiológiai módszerekkel monitorozzuk a tumor megjelenését és méretének változását. Ezt a folyamatot a radiológiai módszerek láthatósági mérethatárai nagyban korlátozzák. Az utóbbi években a likvid biopszia bevezetésével a radiológiai láthatóság megjelenése előtt, a keringésbe került tumor DNS fragmentumok izolálásával jóval korábbi stádiumban információ nyerhetünk a daganatról (55). A tumorból felszabaduló DNS fragmentumokat cirkuláló vagy „cell free” (cf) DNS-nek nevezzük. A nekrozis vagy apoptózis folyamata a cfDNS megjelenését elősegíti, hiszen a sejtek szétesése során a DNS darabokra hullik. A tumor specifikus DNS szakaszok megtalálása igazi kihívás, de ezt követően kis mennyiségű vérből, egy egyszerű vérvétel során a vizsgálat elvégezhető és bármikor ismételhető. Ez a módszer különösen akkor előnyös, ha szövettani mintavétel technikailag vagy a beteg leromlott általános állapota miatt nem kivitelezhető. A tumorra specifikus DNS szakasz megtalálásával a daganatos betegség kialakulása vagy kiújulása jól monitorozható lenne, erre több vizsgálat is történt az utóbbi években emlőrákban, tüdőrákban (56, 57). A likvid biopszia térhódítását nagyban elősegítette az NGS (*Next-Generation Sequencing*) módszer fejlődése, amely kis mennyiségű cfDNS izolálására alkalmas. Egyes ctDNS tesztek alkalmazásával jelenleg magasabb szenzitivitás és specificitás érhető el a tumorból származó antigének monitorozásához képest, mint például a PSA vagy CEA, CA-19-9 esetében (58). A likvid biopsziás tesztek validálása, a felhasznált vér mennyisége, valamint a hamis pozitív eredmények kiküszöbölése után már FDA által elfogadott és a napi gyakorlatban is elérhető tesztek léteznek a colorectalis carcinoma (59), valamint a T790M mutáció monitorozására (60). Tüdőrák esetében egy sikeres műtét vagy jelentős remissziót okozó kezelés után jelentősége van a reziduális betegség monitorozásának. A ctDNS pozitív és negatív betegcsoportok között jelentős túlélésbeli különbség volt kimutatható egy korai stádiumú tüdőrákot vizsgáló munkában (61).

5.2 Szöveti biomarkerek

A szöveti markerek vizsgálata hagyományosan immunhisztokémiai vizsgálatokkal történik monoklonális antitestek segítségével, amelyet vagy formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövettani blokkon, vagy fagyasztott szövetmintán végezhetünk el. A

daganatok molekuláris tipizálása kulcsfontosságúvá vált az utóbbi évtizedben, hiszen ezen alapul a korszerű terápiák kiválasztása. A molekuláris vizsgálatok során kóros génszakaszt vagy génátrendeződést keresünk, amelyeket mutáció analízissel vagy fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH) mutathatunk ki (62).

A szöveti tumormakerek több csoportra oszthatók, így pl. lehetnek proliferációs markerek, onkogének, növekedési faktorok vagy apoptózis markerek.

A proliferációs markerek közül az ERCC-1 (*excision repair cross-complementation group-1*) és a Ki-67 fehérjék kimutatásával kapcsolatban saját munkacsoportunk is beszámolt új eredményekről (47, 48, 63). Az ERCC-1 fehérjének fontos szerepe van a DNS hibák kijavításában és expressziója immunhisztokémiai módszerekkel is vizsgálható. Mivel a kemoterápiák DNS hibák előidézése révén hatnak, alacsony expressziós szint esetén várható a kemoterápiás szer eredményes alkalmazása (63). A tumorsejtek ERCC-1 expressziójának százalékos meghatározásával (0-100%), valamint az expresszió intenzitásának megítélésével (0-3) egy szorzat képezhető (0-300), amely alapján a tumorszövetek összehasonlíthatóvá válnak. Munkacsoportunk ezt a vizsgálatot neoadjuváns kezelés előtti bronchoscopos szövettani mintán és kezelés utáni sebészeti szövettani mintán is elvégezte, és a következő eredményt kapta. Kezdeti ERCC-1 pozitivitas gyakrabban fordult elő laphámrákok esetében, mint adenocarcinomákban. Kemoterápia hatására ERCC-1 markervesztés volt detektálható, ami jóval kifejezettebb volt adenocarcinomákban és nőbetegek esetében. Olyan eset nem fordult elő, hogy a kezdeti ERCC-1 negativitas pozitívvá vált volna. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az ERCC-1 enzim mennyiségének csökkenésével csökken a platina származékok által indukált DNS károsodásokat javító repair rendszer effektivitása, ezáltal a daganat érzékenyebbé válik a platina vegyületek citotoxikus hatásával szemben. Ha a tumorszövetet egy heterogén sejtmasszának tekintjük, ez azt is jelentheti, hogy a kemoterápia hatására agresszívebb sejtklónok szelektálódása jelenhet meg. A fenti vizsgálatban a p53, Bcl-2, Fas-ligand és a Bax-fehérjék meghatározása is megtörtént, de sem a kemoterápia előtti és utáni szövettani mintákban, sem a laphám és adenocarcinomas csoportban nem volt szignifikáns különbség ezen markerek expressziós szintjében vagy az expresszió változásában (63). Ennek a retrospektív vizsgálatnak a legnagyobb kritikája az alacsony betegszám és a bronchoscopos szövettani minta reprezentatív jellegének elfogadása volt. Ugyanakkor elsők között mutatott rá arra, hogy számszerű információt

nyerhetünk szöveti biomarkerek expressziójának kemoterápiát követő változásáról nem-kissejtes tüdőrákban.

A Ki-67 egy olyan fehérjemolekula, amelynek expressziója a sejtciklus késői fázisára esik. Immunhisztokémiai detektálásával a daganatsejtek proliferációs aktivitása mutatható ki. Klinikai jelentősége manapság elsősorban az emlőtumorok és az atípusos carcinoid tumorok agresszivitásának értékelésében van (64). Munkacsoportunk a fent részletezett neoadjuváns betegcsoportban a Ki-67 proliferációs indexet is meghatározta a preoperatív és posztoperatív szövetmintákon (65). Klinikailag relevánsnak a 20%, vagy afeletti különbséget tekintették. A 45 értékelhető mintapárt vizsgálva a preoperatív szövettani mintákon 39%, a sebészeti szövettani mintákon 35% volt az index átlaga. A medián teljes túlélés 29 hónap volt. A RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*) alapján kettéválasztott – kemoterápiára reagáló és nem reagáló – betegeknél a proliferációs index csökkenésében nem volt szignifikáns különbség. Kiemelendő ugyanakkor, hogy 10 beteg esetében a Ki-67 növekedése volt megfigyelhető a műtéti mintákban, és ez a növekedés a laphám carcinomás csoportra volt jellemző. Habár a teljes betegpopulációra vonatkozóan nem volt igazolható szignifikáns különbség a kemoterápia előtti és utáni minták összehasonlításakor, a betegek nem elhanyagolható részében ennek a vizsgálatnak az eredménye is egybecseng az ERCC-1 vizsgálatok eredményével, miszerint a platinabázisú kemoterápia agresszívebb biológiai viselkedésű, magasabb proliferációs potenciállal bíró tumor klónok szelekcióját idézheti elő (66).

Az **onkogének** közül intenzíven vizsgálták a c-MYC mutációját, amely a kissejtes tüdőrákok 80%-ában kimutatható. A KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog*) mutáció a nem-kissejtes tüdőrákok kb. 30%-ában jelen van és rossz prognosztikus tényezőnek számít (67).

Az **apoptózis markerek** a programozott sejthalál mértékére utalnak, amely a daganatképződés során különös jelentőséggel bír. Ha egy sejt genetikai információja károsodik, az apoptózis beindításával a sejt elpusztul, ezáltal a kórosan megváltozott genetikai információ sem íródik tovább. Az apoptózis markerek közül munkacsoportunk a bcl-2 fehérjét tanulmányozta tüdőrákban (48), ami egy anti-apoptotikus funkciójú membrán protein, és aminek expressziós szintje érdemben nem változott citotoxikus kemoterápiát követően (68).

A **tumorszupresszor gének** működése kulcsfontosságú a daganatsejtek elpusztításában. Károsodásuk következtében a daganatsejtek szaporodása és áttétképző hajlama fokozódik. Kissejtes tüdőtumzorokban a retinoblasztoma (RB) gén mutációja csaknem 100%-ban kimutatható. A p53 gén a sejtciklus szabályozásában vesz részt és károsodása a kissejtes tüdőrákok közel 90%-ában, míg a nem-kissejtes tüdőrák 50-70%-ában fordul elő (69).

5.3 Prognosztikai biomarkerek

A prognosztikai faktorok a betegség kezelés nélküli lefolyásának elemzésére szolgálnak. Napjainkban a tüdőtumzorok kezelésének megkezdése előtt a klinikai vagy a patológiai TNM stádiumbeosztás ad támpontot a beteg túlélési esélyeiről. A szöveti prognosztikai faktorok vizsgálatakor leginkább a patogenezisben fontos szerepet játszó fehérjék, gének, illetve epigenetikus tényezők tanulmányozására kerül sor. Számos munkacsoport igyekszik olyan génexpressziós mintázatokat találni, melyek tüdőrák esetében prediktív vagy prognosztikai jelentőséggel bírnak (70). A DNS és RNS szintű vizsgálatokkal szemben a fehérjék kimutatása nemritkán jobban tükrözi a sejtek működését in vivo körülmények között. Ráadásul az immunhisztokémiai reakciók könnyen elvégezhetők archivált tumormintákon, olcsóbbak és kevesebb időt vesznek igénybe a molekuláris genetikai módszereknél, ezáltal lehetőség nyílik nagyobb betegpopulációk vizsgálatára.

A tüdőrák kialakulásában részt vevő géneket intenzíven vizsgálják, ennek ellenére számos kérdés vár még megválaszolásra a daganatos transzformációhoz vezető génhibákkal kapcsolatban. Adenocarcinoma és laphámrák esetén feltételezik a p53, KRAS, P16, RB, MYC továbbá a β -catenin fehérjét kódoló CTNNB1 gén hibáját (71). Neuroendocrin daganatos transzformáció korai szakaszában szerepet játszhat az RB, p53 és MYC gén is, de az SCLC marker ASH1 is (72, 73). Ezen génhibák felelősek lehetnek a malignus transzformációért, ugyanakkor terápiai lehetőségeket hordozhatnak. Tüdőrákban a legismertebb és a klinikai gyakorlat számára legfontosabb molekuláris prediktív markerek az adenocarcinomákban kialakuló EGFR vagy a KRAS génmutáció, illetve az ALK gén transzlokációja. Míg tüdő adenocarcinomákban az EGFR mutáció és

az ALK transzlokáció pozitív prediktív értékkel bír, addig a KRAS génmutáció negatív prediktív értékű az EGFR-TKI (*tirozin-kináz inhibitor*) kezelésekre vonatkozóan.

NSCLC-ben kedvező prognosztikai faktornak tartják többek között a tumor euploiditást, a Bcl-2 fehérje expressziót, az A típusú vércsoport antigén expresszióját, továbbá adenocarcinomák esetén a TTF-1 expressziót (48). Kedvezőtlen prognosztikai faktor a magas kisérdenzitás, a KRAS mutáció, a p53 mutáció, valamint a Ki-67, c-erbB2/her2, EGFR, p21, N-CAM, c-MET, COX-2 (*cyclooxygenase-2*) és az ösztrogén receptor expresszió (74). Singhal és munkatársai összefoglalták azon molekuláris markereket és fehérjéket, amelyek prognosztikai jelentőséggel bírhatnak korai stádiumú NSCLC-ben (75). Elsősorban azon molekulákat vizsgálták, amelyek elsődleges szerepet játszanak a három legfőbb szignáltranszdukciós útvonalban, a sejtciklus szabályozásban, az apoptózisban és az angiogenezisben. Ezek alapján a betegek prognózisa leginkább a cyclin E, cyclin B1, p27, p16, survinin, kollagén XVIII és a VEGF expressziótól függött. Számos széleskörű vizsgálat ellenére azonban eddig csak nagyon kevés biomarkerről bizonyosodott be, hogy a klinikai gyakorlatban is prognosztikai jelentőséggel bír, és közülük egyiket sem használjuk a terápiás döntéshozatal során (76).

Tüdőrákban az onkoterápia szempontjából legnagyobb jelentőségű génhibák az adenocarcinomákban megfigyelhető EGFR és KRAS mutáció, valamint az ALK gén transzlokációja. Doebele és munkatársai terápia naiv nem-laphám típusú, 209 NSCLC beteget hasonlítottak össze metasztatizálási mintázat szerint. A molekuláris mintázat szerinti alcsoportok az alábbiak voltak: EGFR mutáció pozitív, KRAS mutáció pozitív, ALK transzlokáció pozitív, illetve mindhárom génhibára nézve negatív daganatok. Eredményeik alapján a legtöbb szerv érintettségét ALK transzlokáció esetén találták. Emellett a pericardialis, a pleuralis és májjáttét ugyancsak gyakoribb volt ALK pozitivitás esetén a tripla negatív tumorokkal szemben. Hasonlóképpen magasabb volt a májjáttét aránya EGFR mutáció esetén a mutáció nélküli esetekkel összehasonlítva. Az agyi áttétek tekintetében nem találtak különbséget az egyes genetikai eltérések között, valamint nem volt különbség a mutáció pozitív és a tripla negatív esetek között (77).

A tumor növekedésének kulcsfontosságú lépése a saját érhalózat növesztése, amelyet sok más tényező mellett a hypoxia stimulál. A rosszul vascularizált tumor kevésbé érzékeny a sugárkezelésre és a kemoterápiára, továbbá a hypoxia növeli az áttétképződés

valószínűségét is. Magyar munkacsoport írta le az apelin fehérje szerepét, amelynek expressziója pozitív korrelációt mutatott a tumorban lévő mikroerek számával (78). A nagymértékű apelin expresszió rosszabb túléléssel párosult az ötéves követési periódus során. Az eredmények alapján az apelin egy új angiogén faktorként vehető számításba, amely kísérletes daganat modellekben a nyirokerek fokozódását is stimulálta (79).

A megnövekedett proliferációs aktivitás általánosságban rossz prognosztikai tényezőnek tartható. Saját vizsgálatunkban tüdőrákban a proliferáció széles körben alkalmazott markerének, a Ki-67-nek az expressziója magas volt, de nem volt különbség sem az agyi áttétet adó vagy nem adó primer tüdőrákok, sem pedig az agyi áttétek között (74). Berghoff és munkatársai megvizsgálták 230 operált agyi áttéttel rendelkező tüdő nem-kissejtes carcinomás beteg agyi áttétének, valamint 53 beteg primer tüdőtumorának és agyi áttétének Ki-67 expresszióját (80). Eredményeik alapján az átlagos Ki-67 index közel 40% volt, és magasabb volt laphámrák esetén. Nem különbözött viszont a primer tumor és a metasztázis között. Az agyi áttét megjelenéséig eltelt idő nem különbözött a Ki-67 index tekintetében, azonban az alacsonyabb Ki-67 expresszió hosszabb teljes túléléssel párosult és független prognosztikai faktornak bizonyult.

5.4 Prediktív biomarkerek

A prediktív biomarkerek a terápia hatékonyságának előrejelzésére szolgálnak. Tüdőrákban a daganat stádiuma mellett a szövettani típus és adenocarcinómák esetében a molekuláris altípus ad útmutatást a legoptimálisabb kezelés kiválasztásához. A klinikai gyakorlatban háromféle kimenetelre számíthatunk. 1: Ha a daganat jól reagál a kezelésre és a daganat számottevő méretbeli csökkenése következik be, amely radiológiailag jól mérhető. Ekkor részleges vagy teljes remisszió alakul ki. 2: Stabil betegségről akkor beszélünk, ha a daganat méretbeli csökkenése nem számottevő, így a kezelés befejezése után rövid időn belül progresszióra kell számítani. 3: Progresszió esetén a daganat nem reagál a kiválasztott kezelésre, ez esetben a kiválasztott kezelési stratégiát azonnal módosítani kell. Az utóbbi két csoportnál sürgető igénnyel merül fel a terápia sikerességét előre jelző biomarkerek használata.

5.4.1. Kemoterápia prediktív markerei

A citotoxikus kemoterápia alkalmazása során az elpusztuló daganatsejtekből felszabaduló fehérjék, DNS fragmentumok antigéntulajdonsággal bírnak, amelyek mozgósíthatják a szervezet saját daganatölő mechanizmusait az NK-sejtek és egyéb makrofágok által. A kemoterápia annál hatékonyabb, minél gyengébben működnek a tumor DNS repair rendszerei, amelyek hibás DNS kijavításában vesznek részt. Ilyen molekula az ERCC1 és az RRM1, amelyek azonban – a biztató preklinikai eredmények ellenére – egyelőre nem használatosak a napi gyakorlatban.

5.4.2. Molekuláris célzott terápia prediktív markerei

Tüdőrákban a legismertebb és a klinikai gyakorlat számára legfontosabb molekuláris prediktív markerek az adenocarcinomákban kialakuló EGFR és KRAS génmutáció, illetve az ALK gén transzlokációja. Míg tüdő adenocarcinomákban az EGFR mutáció és az ALK transzlokáció pozitív prediktív értékkel bír, addig a KRAS génmutáció negatív prediktív értékű az EGFR gátló kezelésekre vonatkozóan.

Az EGFR az epidermális növekedési faktor tirozin-kináz receptora, amelynek feladata a növekedési faktorok megkötése és az információ továbbítása a jelátviteli utakra. Ez az információ legtöbb esetben a sejt proliferációjához, a sejt migráció fokozásához, továbbá az áttétképződés elősegítéséhez vezet. Az EGFR mutációja tüdőrák sejtekben a receptor kináz domain területén következik be, és „*driver*” (irányító) mutációt jelent. A driver mutáció a daganatos transzformáció létrejöttében vezető szerepet játszik, így a daganatsejtek többségére jellemző egy adott tumorban. Az EGFR mutáció elsősorban az adenocarcinomákban gyakori, legfőképp a nemdohányzó nőknél. Szövetteni szempontból a nem-mucinosus, lepidikus növekedési formát mutató, illetve az acinaris és a papillaris morfológiai altípusú adenocarcinomák esetén kell a leginkább EGFR mutációval számolni [51]. Az ázsiai populációban aránya akár 47% is lehet, míg az európai népességben aránya 15% körül mozog (81). Munkacsoportunk elsőként vizsgálta az EGFR mutáció gyakoriságát a magyar népesség körében, és a mutáció megjelenését 14%-ban határozta meg (82). Az EGFR mutáció pozitív esetek általában jobb prognózissal párosultak. A leggyakoribbak a „*klasszikus*” mutációk, így az EGFR 19-es exon deléciónja és a 21-es exon L858R pontmutációja (81, 83). Ezen génelterések

meglétekor az EGFR receptor tirozin-kináz régióján jó hatásfokkal alkalmazhatók a reverzibilis EGFR tirozin-kináz receptor gátló gefitinib, erlotinib és az irreverzibilisen gátló afatinib. Az általában 9-13 hónapon át tartó kedvező terápiás hatást követően, sajnálatos módon, a betegek többségénél daganatos progresszió lép fel, aminek hátterében EGFR rezisztencia mutációk – például exon 20 T790M pontmutáció – megjelenése áll. Ilyenkor a rezisztencia mutációra is ható EGFR-TKI osimertinib alkalmazandó. Tüdő adenocarcinomákban ritka EGFR mutációk is kimutathatók, amelyek gyakoriságát és terápiás prediktív értékét ugyancsak elemezte munkacsoportunk (84). Vizsgálataink szerint a ritka mutációk elsősorban dohányosokra voltak jellemzőek, rövidebb túlélés volt megfigyelhető és mérsékeltebb volt az EGFR-TKI terápiára adott válasz is (84).

Az EGFR mutáció jelentőségét agyi áttétekben számos vizsgálatban tanulmányozták, és ez a kérdés előtérbe került az EGFR-TKI terápia agyi metasztázisokra gyakorolt hatásával kapcsolatban is. Az agyi áttétekben az EGFR mutáció gyakoriságát kelet-ázsiai tanulmányok 44-63%-ra teszik, hasonlóképpen ahhoz, hogy a primer tumorokban is magas az EGFR mutáció gyakorisága ebben a populációban. Kaukázusi népesség körében csak néhány vizsgálat tesz említést az agyi áttétek EGFR mutációs gyakoriságáról. Ezekben a tanulmányokban csak 0-2% közötti incidenciát találtak, amely alacsonyabb a primer tumorok 10-15%-os incidenciájához képest (85). Más vizsgálatban az agyi áttétekben gyakoribb előfordulást találtak, mint a hozzá tartozó primer tumorban. Szoliter agyi áttét elsősorban az EGFR vad típusra, míg a leptomeningialis áttétek az EGFR mutáns daganatokra voltak jellemzők(86). Heon és munkatársai szerint a központi idegrendszeri progresszió a mutáció altípusától függ. Kimutatták, hogy EGFR exon 19 deléció esetén gyakrabban alakultak ki agyi áttétek az L858R pontmutációval szemben (87). Sekine és munkatársai az agyi áttétek radiomorphologiai jegyeit vizsgálták meg a mutációk függvényében. Eredményeik szerint exon 19 deléció esetén több, kisebb méretű, keskenyebb peritumorális ödémával rendelkező áttét volt kimutatható, amelyek leginkább az igen ritka, miliaris megjelenésű metasztázisokhoz hasonlítottak [58]. Egy szelektált betegeket vizsgáló tanulmányban az EGFR tirozin-kináz gátlókra adott terápiás válasz központi idegrendszeri érintettség esetén 70-89% volt (85).

Tüdőrakban az EGFR-KRAS jelátviteli rendszer másik fontos tagja a KRAS onkogén. Az általa termelt fehérje az EGFR tirozin-kináz receptor által közvetített növekedési faktor mediálta szignáltranszdukciós útvonal „down-stream” eleme, ennek következtében

az EGFR gén mutációja és a KRAS gén mutációja általában kizárja egymást. A KRAS mutációt számos tumorban vizsgálták, és több esetben prognosztikai szereppel bír; így például colorectalis és pancreas carcinomákban (84). Kaukázusi betegekben a KRAS mutáció gyakorisága tüdő adenocarcinómában közel 30%-nak bizonyult. A tanulmányok többsége tüdőrák esetén a KRAS mutációt rossz prognosztikai faktornak tartja, de ezzel ellentétes eredmények is napvilágot láttak (83). Munkacsoportunk a KRAS mutáció prediktív értékét vizsgálta előrehaladott adenocarcinómában szenvedő betegek platinabázisú kemoterápiára adott válasza függvényében (84). A vizsgálat egyik erőssége, hogy külön elemzi a 12-es és 13-as kodonon bekövetkező KRAS mutációkat, továbbá a 12-es kodon mutációk altípusait. Összességében a KRAS mutáció nem befolyásolta a túlélést vagy a kemoterápiás választ, azonban a 12 kodon G12V mutáció altípus gyakrabban volt kimutatható nemdohányzóknál, kedvezőbb kemoterápiás választ mutatott, és jelenléte esetén hosszabb volt a teljes túlélés (84).

A tüdőrák esetén a harmadik leggyakoribb molekuláris eltérés az ALK gén transzlokációja és fúziója az EML4 (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) gén amino-terminális részletéhez. Az EML4-ALK fúziós gén létrejöttének eredményeként az állandó aktivációba kerülő sejtproliferációs kaskád miatt ezen daganatok nemritkán agresszívebb fenotípussal és magasabb recidíva aránnyal rendelkeznek (88). Az ALK transzlokáció az NSCLC esetek 2-8%-ában jelenik meg. Az ALK pozitív tüdőrákok gyakrabban kerülnek előrehaladott stádiumban felfedezésre és többször járnak multiplex távoli áttétekkel, mint a többi NSCLC tumor (77, 88). Az ALK transzlokáció pozitív esetekben indikált tirozin-kináz receptor blokkoló gyógyszerek közül elsőként a crizotinibet alkalmazták, az újabb generációs szerek közül kiemelendő a ceritinib, az alectinib, a lorlatinib és a brigatinib. Ezen kezelések hatására akár egyéves progressziómentes túlélés is megfigyelhető, és jelentős teljes túlélési előnyt is el lehet érni a hagyományos kemoterápiával szemben (89).

Az ALK transzlokációval rendelkező betegek 15-35%-ában már diagnóziskor agyi áttét mutatható ki. Egyes tanulmányok szerint elsővonalbeli, célzott crizotinib kezelés vagy kemoterápia alkalmazása során az agyi áttét incidenciája 60%-ra nőtt (88, 89), amit magyarázhat a crizotinib alacsony központi idegrendszeri penetrációja is (77, 90). Johung és munkatársai vizsgáltak 90 beteget, akik agyi áttétet adott, ALK transzlokáció pozitív tüdőrákban szenvedtek. Eredményeik szerint a betegek 30%-ánál már a tüdőrák

felfedezésekor agyi áttét volt kimutatható, a betegek több mint felénél négynél is több áttéti góccal. Az agyi áttét megjelenésekor 69%-ban más szervekben is volt már távoli metasztázis. Ennek ellenére a betegek medián teljes túlélése 49,5 hónap volt. Azon betegeknél volt megfigyelhető jobb prognózis, akiknek nem volt extracranialis áttétük, jó volt a performance státuszuk és nem részesültek az agyi áttét megjelenése előtt célzott terápiában (90).

5.4.3. Immunterápia prediktív markerei

Az immunrendszer és a tumorsejtek találkozása egy összetett, soktényezős folyamat. Az adaptív vagy szerzett immunitás egyes részletei már jól ismertek: humorális és celluláris immunválaszra oszthatók. A humorális immunválasz során tumor specifikus antigének ellen antitest képződés indul meg a B-sejtek által, ezek szerepe és biológiai jelentősége egyelőre nem kellően tisztázott. A celluláris immunválasz során T-sejt aktiváció következik be az antigén prezentáló sejtek (APC) által. A T-sejtek és az APC összekapcsolódása következtében kialakuló T-sejt aktiváció több receptor egyidejű stimulusának következménye. Az összekapcsolódó ligandok stimuláló és gátló funkciókat közvetítenek a T-sejtek működésében. Az APC sejtek felszínén található PD-L1 és PD-L2 kapcsolódik össze a T-sejtek felszínén lévő PD-1 molekulával, amely egy gátló szignált jelent, továbbá az APC felszínén a CD 80 és CD86 alkotta B7 kapcsolódik össze a T-sejtek felszínén található CTLA-4 molekulával, szintén gátló szignálként. A stimulációs szignálok egyik legfontosabbja az MHC I és a T-sejt receptor összekapcsolódása, amelyet az OX40L-OX40 receptorok összekapcsolódása kísér. Ebben a rendszerben bármely szereplő működési zavara oka lehet a daganatellenes immunitás működésképtelenségének vagy elégtelenségének (91).

Az immunterápia bevezetése forradalmasította a tüdőrák kezelését. Míg a driver mutációk kimutatásával elérhető célzott kezelések a nemdohányzó tüdőtumoros betegcsoportban adnak jelentős túlélési előnyt, addig az immunterápia a dohányzással összefüggő daganatok esetén mutathat aktivitást. Ez utóbbinak oka valószínűleg a daganat magas mutációs terhelésében keresendő, aminek következtében a daganat könnyebben felismerhetővé válik az immunrendszer számára.

Jelenleg intenzív kutatások tárgya, hogy hogyan lehetne még precízebben körvonalazni azt a daganatos betegpopulációt, amelyben az immunterápia a leghatásosabban működik. A daganatsejtek PD-L1 receptor státuszán túlmenően a figyelem középpontjába került a tumor mutációs terhelés és a daganatot körülvevő stroma vizsgálata, ahol az immunsejtek jelenléte szintén befolyásolhatja a daganatellenes kezelések működését és prognosztikai jelentőséggel is bír. Egyes tumorokban, például az emlőtumorok és vastagbél tumorok esetében „immunscore” alkalmazása a TNM klasszifikáció prognosztikus erejével összemérhető jelentőségű. Az immunsejtek életkorral való csökkenő tendenciáját figyelték meg, amelyet immunöregedésnek (immunosenescence) nevezünk.

A **PD-L1** (*programmed cell death ligand-1*) protein egy intenzíven vizsgált fehérje, amely a tumorsejtek, a T és B lymphocyták, valamint a dendritikus sejtek és makrofágok felszínén vagy azok citoplazmájában helyezkedik el. A PD-1 receptor elsősorban az immunsejtek felszínén található, a PD-L1-gyel és/vagy PD-L2-vel összekapcsolódva a T-sejtek aktiválódását gátolja. Kapcsolódásuknak kostimulációs faktorai ismertek, úgymint a CTLA-4 és B7 receptor kötődése(91).

A PD-L1 fehérje expresszió meghatározása szövettani mintából történik, azonban az elmúlt években többféle metodikai probléma is adódott a vizsgálatok standardizációját és kiértékelését illetően. Az egyes immunterápiás gyógyszerek esetében eltérő immunhisztokémiai technológiák és protokollok alkalmazására került sor, emellett a vizsgálatokat gyakran limitálja a szövettani minta kicsinysége, ami nem reprezentálja kellőképpen a teljes daganatot. A PD-L1-expresszió ráadásul dinamikusan változhat, így különbség lehet egy primer tumor és annak metasztázisa között, és nem kellően ismert a PD-L1-expresszió esetleges változása kemoterápia hatására. Újabban a solubilis vagy keringő PD-L1 státusz mérése is fókuszba került, amely valószínűleg a perifériás neutrophil sejtekből származik, és preklinikai eredmények alapján nem korrelál a szöveti PD-L1 szinttel. Emelkedését a progresszív daganatos betegségben észlelték és pozitív összefüggést találtak neutrophil leukocyta/lymphocyta arány változásával (92).

A **tumor mutációs terhelés (TMB)** a daganatban létrejött szomatikus mutációk számát mutatja meg. Magasabb értéke esetén magasabb a daganat antigenitása, ami által az immunrendszer számára könnyebben felismerhetővé válik. A TMB meghatározásának aranystandard módszere a teljes exom szekvenálás, de az NGS technológia használatával

értéke szintén jól becsülhető és ez a módszer olcsóbb (93). Az egyes tumor típusok TMB terhelése eltérő, legmagasabb értékeket a melanoma és a kissejtes tüdőrák esetében találtak (94). Több klinikai vizsgálat is független prediktív faktorként értékeli, amelynek a PD-L1 expresszióhoz hasonló értéke lehet (95). Egy többféle szolid tumort tartalmazó, 5000 feletti betegszámú vizsgálatban a 20% feletti TMB értékkel rendelkező betegek túlélését egyértelműen hosszabbnak találták (96). Egyes vizsgálatok szerint az immunterápia alkalmazásából az egyidejűen magas TMB és PD-L1 expressziós értékkel rendelkező daganatban szenvedők profitálhatnak leginkább (95). Ezzel ellentmondó eredményeket publikált egy másik kutatócsoport, ahol 136 nem kissejtes tüdőrákos beteg vérmintáit vizsgálták (97). A keringő ctDNA TMB értékének meghatározásával azt találták, hogy az immunterápiát kapó betegcsoportban a progressziómentes túlélés és a teljes túlélés is alacsonyabb volt a magas TMB-vel rendelkező betegek esetében. Egyelőre a TMB értékek metodikai finomítása és standardizálása zajlik.

A **tumor infiltráló lymphocyták** nagy száma és a gazdag gyulladásos környezet a magas mutációs rátájú, agresszívebb daganatokra jellemző. A daganat stromájában T és B lymphocyták, makrofágok, antigénprezentáló sejtek és egyéb gyulladásos sejtelemek helyezkednek el. Emellett itt található a daganat táplálásáért felelős, intenzíven burjánzó érhalózat és különféle kötőszöveti sejtelemek. Ezek denzitása változó lehet az egyes szolid daganatok esetében és prognosztikus jelentőséggel bírhat. Egyes daganattípusokban immunoscore rendszert alkalmaznak, így például a vastagbélrákok esetében ez a marker a CD3+ és CD8+ sejtpopuláció jellemzésére szolgál.

A **tumor nekrozis** jelenléte gyakran kerül leírásra a patológiai leletekben. Ez a tumorsejtek csoportos elhalását jelenti a sejtfal feloldódásával, amit rendszerint intenzív gyulladásos reakció kísér. A nekrozis meglétének vagy hiányának ismerete mind a mai napig nem rendelkezik terápiás konzekvenciával.

A **lymphocytaszám és thrombocytaszám eltérései a vérképben.** Az onkológiai gyakorlatban a betegek kezeléséhez gyakori vérvételek társulnak, ennek célja többféle lehet: például a kezeléshez való alkalmasság megállapítása, a megfelelő vese- és májfunkció, valamint a vérkép ellenőrzése. Emellett vérből történik az onkológiai kezelések mellékhatásainak monitorozása, továbbá egyéb készítmények (transzfúzió, GCSF, erythropoietin) adásának elbírálása. A vérképben látható értékek prognosztikai

jelentőséggel is bírhatnak, hiszen a metasztatikus daganatos esetekben alkalmazott citotoxikus készítmények hatására károsodhat a csontvelő tartós anaemiát és/vagy lymphopeniát eredményezve. Az alacsony lymphocytaszámmal rendelkező, már kemoterápiával előkezelt a betegekben a tumorsejtek környezetében kialakuló gyulladásos reakciók eltérnek. Egyes vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy metasztatikus NSCLC-ben a magas akut neutrophil leukocytaszámmal (ANC) rendelkező betegek kevésbé fognak reagálni az immunkezelésre, mint alacsony ANC esetén. Ily módon a neutrophil/lymphocyta arány (NLR) és a thrombocyta/lymphocyta arány (PLR) erős prognosztikai markerek lehetnek, és emelkedésük rosszabb túléléssel, alacsonyabb terápiás válaszaránnyal járhat pl. NSCLC-ben nivolumab alkalmazása esetén (98).

A thrombocyták jelenleg ismert funkciói jóval túlmutatnak a véralvadásban betöltött szerepükön, funkciójuk jól ismert az immunregulációban, a tumorok növekedésében és a tumorsejtek közötti kommunikációban. A magas thrombocytaszám összefügg a tumor metasztatikus hajlamával és csökkent túléléssel jár.

Tekintettel arra, hogy a személyre szabott kezelések kiválasztásánál egyre szélesebb körben hozzáférhető az innovatív készítmények, az egyes terápiák sorrendiségének megválasztásában, továbbá kombinációk kiválasztásában jelentősége lehet egyéb patológiai jellemzőknek is. Egyes preklinikai vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy kemoterápia hatására nő a tumorsejtek neoepitóp és PD-L1 expressziós szintje, ami azt sugallhatja, hogy a kemoterápiával előkezelt betegcsoportban másod-, vagy többedvonalban alkalmazott immunterápia hatásosabb lehet. Arra vonatkozóan, hogy a daganat stromájában lévő immunsejtek (lymphocyták, plazmasejtek és egyéb mononukleáris sejtek), denzitása hogyan változik az onkológiai kezeléseket követően, korábban nem közöltek eredményeket.

6. Onkoterápiák hatása szöveti biomarkerekre

A különféle onkológiai kezelések sorrendisége szigorú protokoll alapján szabályozott, de az új terápiás ajánlások alapján az immunterápia csaknem minden beteg kezelésébe beilleszthető. Az immunterápiás szerek hatásosságát első körben az előrehaladott stádiumú betegeken tanulmányozták többedvonalban. Ennek kapcsán

felmerül az a kérdés, hogy a kemoterápiával és sugárkezeléssel többszörösen előkezelt tumorszövet mennyire hordozza a kiindulási szövettani minta tulajdonságait, továbbá, hogy hogyan változik a sejtfelszíni markerek intenzitása, vagy van-e egyáltalán változás a tumor stromájában lévő immunsejtek számában és intenzitásában, ugyanis ennek jelentősége lehet a későbbi kezelések indikálásban (99, 100). A daganatot körülvevő stroma és az immunsejtek közötti kommunikáció szintén intenzív kutatások tárgya (101).

A kemoterápiával előkezelt, majd sebészeti reszekción átesett betegcsoportban változatos a tumorsejtek felszínén mért PD-L1 szint változás, ennek iránya az alkalmazott kemoterápia milyenségétől is függésben lehet (102).

Az immunkezelés alkalmazásából a klinikai vizsgálatok során eleve kizárták az autoimmun betegségben szenvedőket, akik akár tartós szteroid kezelésben vagy egyéb más immunszuppresszív kezelésben részesültek, továbbá az agyi metasztázisos betegeket. Az immunkezeléssel szerzett egyre nagyobb klinikai tapasztalat alapján körvonalazódott, hogy a stabil állapotú, aktív tünetekkel nem rendelkező autoimmun betegek és agyi metasztázisos betegek is kezelhetők immunterápiával a mellékhatások éber monitorozásával (103).

7. A metasztázisképzés helyének jelentősége tüdőrákban

A tüdőrák klinikai viselkedésében és a metasztázisképzés helyének szervi megjelenésében különbségeket találunk az egyes betegcsoportokban. A centrális és perifériás elhelyezkedésű tüdőtumороk eltérő viselkedése jól ismert: a centrális tumороk hamarabb képeznek metasztázisokat, prognózisuk rosszabb (104). Munkacsoportunk vizsgálta és elemezte öt magyar klinikai centrum 1126 primer tüdő adenocarcinómában szenvedő betegének adatait (84). Gyakoribbnak találták a jobb oldali tumороkat, a bal oldalihoz képest (60% vs. 40%). A tüdő-, mellhártya- és mellékvese áttétek hamarabb, míg az agyi áttétek később jelentek meg. Centrális tüdőtumороk esetében a csontáttétek megjelenése gyakoribb volt, míg a perifériás tumороknál a pulmonális áttétek jelentek meg először (104).

Célkitűzések

Munkánk során célkitűzéseink két vizsgálat köré csoportosultak.

Az **I. számú vizsgálat** során a platinabázisú citotoxikus kemoterápia hatását kívántuk elemezni tüdőrákok főbb szövettani altípusaiban. Ennek kapcsán az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A platinabázisú kemoterápia befolyásolja-e a PD-L1/PD-1 expressziót tüdőrákban?
2. Változik-e a daganatos stroma immunsejt denzitása a kemoterápia alkalmazását követően?
3. Van-e jelentősége az alkalmazott kemoterápia összetételének a vizsgált paraméterek változásában?

A **II. számú vizsgálat** során a perifériás vér főbb összetevőit, így az abszolút lymphocyta számot (ALC), az abszolút neutrophil leukocyta számot (ANC) és a thrombocyta számot (PLT) kívántuk vizsgálni a daganatos progresszió során tüdőrákok főbb szöveti altípusaiban, különös tekintettel az agyi áttétek és a csontáttétek megjelenésekor mérhető értékekre. Ezen vizsgálat kapcsán kérdéseink az alábbiak voltak:

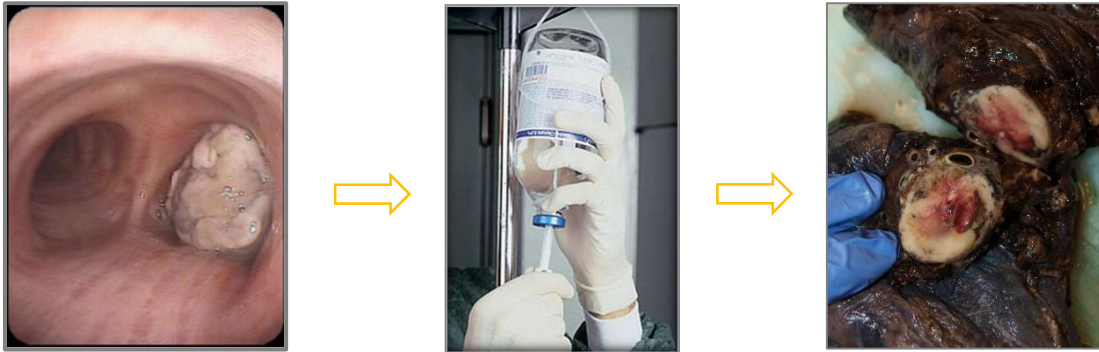
1. A tüdődaganatos betegnél a rutin klinikai gyakorlatban vizsgált vérkép paraméterek hogyan változnak a betegség progressziója során?
2. A vizsgált vérkép paraméterek hány %-a esik a kóros tartományba a daganat diagnosztizálásakor, az agyi- és/vagy csontáttét megjelenésekor, valamint a betegség utolsó fázisában?
3. Van-e jelentősége a vizsgált vérkép paraméterek változásának a tüdőrákos betegek immunterápiájára vonatkozóan?

Betegek és módszerek

1. Betegcsoportok

1.1 . Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata

A vizsgálat tervét a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra

A neoadjuváns kemoterápia hatását elemző vizsgálat felépítése. A tüdőrák bronchoscopos mintából történő diagnosztizálása után a beteg neoadjuváns kemoterápiás kezelésben részesül, majd ezt követően kerül sor a daganatos tüdőterület sebészi eltávolítására (saját ábra)(105)

Vizsgálatunk során 41 tüdő tumoros beteg archivált bronchoscopos és sebészeti szövettani mintapárját tanulmányoztuk. Mind a bronchoscopos, mind pedig a sebészi FFPE (formalin fixált, paraffinba ágyazott) blokkok az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetből származtak. A bronchoscopos mintavétellel nyert szövetmintákat helyi érzéstelenítésben, fiberoscopia, vagy pedig altatásban, merevcsőves bronchoscopia során vettük excissorral. A tumorokat a nemzetközileg elfogadott guideline-ok alapján osztályoztuk (IASLC/ATS/ERS). A tumorok hisztológiai besorolása alapján 20 adenocarcinoma (ADC), 15 laphámcarcinoma (SCC), 1 mucoepidermoid carcinoma (MEC), 1 adenosquamosus carcinoma (ADSQ) és 4 kissejtes tüdő tumor (SCLC) került elemzésre. A betegek onkológiai kezelése a helyi onkológiai bizottság által jóváhagyott terápiás javaslat alapján történt. A betegek a daganat sebészi reszekciója előtt 2-4 ciklus neoadjuváns kemoterápiát kaptak. Az alkalmazott kemoterápiákat három csoportra osztottuk: 1. gemcitabin-cisplatin, 2. paclitaxel-carboplatin, 3. egyéb összetételű kemoterápia. A beteg életkori sajátosságait, dohányzási szokásait, az alkalmazott neoadjuváns kemoterápiára adott radiológiai választ, valamint a sebészeti reszekátumok patológiai stádiumbeosztását az I. táblázat foglalja össze.

I. táblázat

A vizsgált betegek főbb klinikopatológiai jellemzői

BETEGJELLEMZŐK	BETEGSZÁM (N=41)	BETEGSZÁM %
ÉLETKOR (év)		
medián (\pm SD)	58 (\pm 6)	
megoszlás	41-69	
NEM		
férfi	24	58.5
nő	17	41.5
DOHÁNYZÁS		
soha nem dohányzott	3	7.3
jelenleg is dohányzik	34	82.9
leszokott (\geq 1 éve)	3	7.3
ismeretlen	1	2.4
SZÖVETTAN		
adenocarcinoma	20	48.8
laphámcarcinoma	15	36.6
mucoepidermoid cc.	1	2.4
adenosquamosus cc.	1	2.4
kissejtes cc.	4	9.8
PATOLÓGIAI STÁDIUM		
IA	4	9.8
IB	12	23.2
IIA	4	9.8
IIB	6	14.6
IIIA	3	31.7
ismeretlen	2	4.9
NEOADJUVÁNS TERÁPIA		
cisplatin-gemcitabin	16	39
carboplatin-paclitaxel	16	39
más kombináció	9	22
TERÁPIÁS VÁLASZ		
PR (partial response)	28	68.3
SD (stable disease)	6	14.6
PD (progressive disease)	3	7.3
ismeretlen	4	9.8

1.2. Vérékép paraméterek változásának vizsgálata

Ebben a vizsgálatban 986 tüdőrákos beteg laborparamétereit elemeztük retrospektív módon. Valamennyiük betegségét az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben diagnosztizálták, onkológiai ellátásukra pedig 2000-2016 között került sor. Közülük 818-an szenvedtek agyi- és/vagy csontáttétben. A fennmaradó 168 esetben, vagy csak egyéb szervet érintő távoli áttét volt kimutatható (n=78), vagy pedig a betegnél a betegség lefolyása során nem alakult ki távoli áttét (n=90).

A bevonási kritériumok alapján a vizsgálatba olyan betegek kerülhettek be, akiknek citológiailag vagy hisztológiailag igazolt adenocarcinoma (ADC), lahámcarcinoma (SCC), kissejtes tüdőrák (SCLC), nagysejtes neuroendokrin carcinoma (LCNEC) vagy nagysejtes tüdőrák (LCC) daganata volt, és akiknek az alábbi klinikai adatai is rendelkezésre álltak: életkor, nem, dohányzási előzmény, társbetegségek, a tumor lokalizációja, a tumor felfedezésének ideje, valamint vérekép leletek a betegség lefolyásának meghatározott időpillanataiban. A kezdetben agyi metasztatizáló betegek közül 38-nál alakult ki a későbbiekben csontáttét, míg a csontáttétes betegek közül 85-nél fejlődött ki később agyi áttét. Az utánkövetés során a betegek 96%-a elhunyt.

A betegek kezelése az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet onkológiai bizottságának döntése alapján történt, amelyet az aktuálisan érvényben lévő nemzetközi és hazai onkológiai irányelvek és a magyar finanszírozási protokoll határoztak meg. A reszekciós tüdőműtéten átesett betegeknél a műtétek fajtája lehetett segmentectomia, lobectomia vagy pneumonectomia. A sebészeti beavatkozáson átesett operált tüdőtümoros betegek pTNM stádiuma rögzítésre került, a postoperatív onkoterápiát a daganat patológiai stádiuma és szövettani altípusa határozta meg.

Inoperabilitás esetén az ADC-s és SCC-s betegek platinabázisú, kombinált kemoterápiás kezelésben részesültek, az EGFR mutáns vagy ALK transzlokált daganatban szenvedők pedig EGFR-TKI vagy ALK-TKI kezelést kaptak. Az SCLC-s betegek döntő többsége platinum-etoposid, vagy cyclophosphamide-epirubicin-vincristin terápiában részesült elsővonalis kezelésként. A csontáttétes betegek biszfoszfonát kezelést kaptak, az agyi áttétben szenvedőknél pedig metastasectomiára, stereotaxiás irradiációra vagy teljes agyi besugárzásra (WBRT, *Whole Brain RadioTherapy*) került sor.

Az adatbázis zárása 2019. január 10-én történt.

A vizsgálatba bevont betegek jellemzőit a II. táblázatban tüntettük fel.

II. táblázat

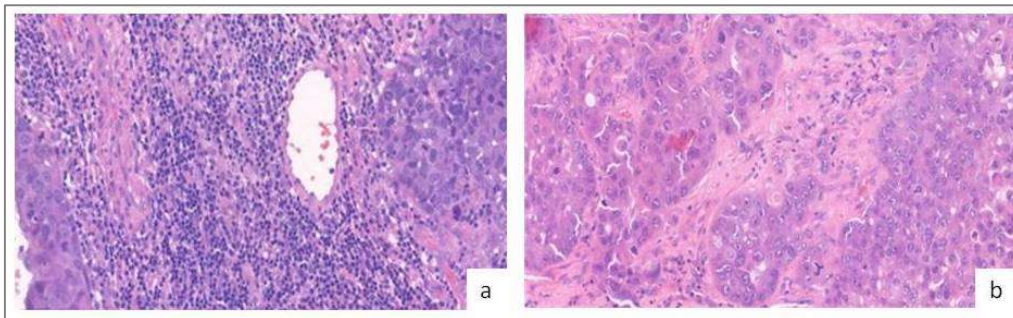
A vizsgált betegek főbb klinikopatológiai jellemzői

All patients		Brain metastasis	Bone metastasis	Other type of distant metastasis	No distant metastasis
		Count (n)			
Gender	Female	179	192	32	32
	Male	173	274	46	58
Age	<65	197	216	37	42
	≥65	155	250	41	48
Smoking	Non-smoker	36	49	11	5
	Ex-smoker	75	100	33	40
	Smoker	207	187	26	33
	Unknown	34	130	8	12
Histology	Adenocarcinoma	254	281	55	47
	Squamous cell carcinoma	47	110	18	38
	SCLC	50	70	5	5
	Other (LCNEC, LCC)	1	5	0	0
		Median OS (weeks)			
Survival	From date of primary tumor	63.8	66.4	168.0	165.0
	From date of metastasis	21.0	31.2	-	-

2. Módszerek

2.1. Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata

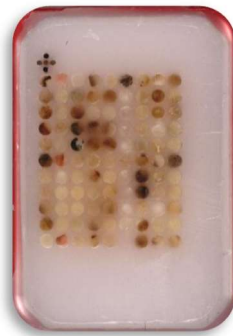
Ebben a vizsgálatban a szövettani minták elemzése az alábbi szempontok alapján történt: vizsgáltuk a tumorsejtek PD-L1 expresszióját, a stromális immunsejtek PD-L1 és PD-1 expresszióját, valamint a daganatos stroma immunsejt denzitását. A stromális immunsejtek denzitásának meghatározása hematoxilin-eozinnal festett kenetek elemzése alapján történt, amelyet két egymástól független patológus végzett. Attól függően, hogy a tumor infiltráló immunsejtek a stroma $\geq 20\%$ -át vagy $< 20\%$ -át foglalták el, két csoportra osztottuk a daganatokat (3. ábra).



3. ábra

Tüdő ADC-ben az immunsejtek (a) a stroma $\geq 20\%$ -ában, (b) $< 20\%$ -ában vannak jelen. HEx200 TMA (*tissue microarray*) készítés (saját ábra)(105)

A bronchoscopos FFPE szövettani mintákból 3 μm -es metszetek, a sebészeti reszekátum FFPE blokkjaiból TMA készült. 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 3, egyenként 2 milliméter átmérőjű reprezentatív szövethengert (core) helyeztünk át a befogadó (recipiens) blokkba. Rendszerint 70 core-t tartalmazó recipiens blokkot használtunk (4. ábra). Az orientáció megkönnyítése céljából, továbbá az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz kontroll szövetként normál tonsilla mintából helyeztünk el 1-1 core-t minden TMA blokkban. Az elkészült TMA blokkokból 3 μm vastagságú metszetek készültek.



4.ábra

70 tumormintát tartalmazó tissue microarray (TMA) recipiens blokk (saját ábra)(105)

PD-L1/PD-1 immunhisztokémia

A deparaffinálást és a szövetek fixálását követően antigén feltárás és a peroxidáz blokkolás történt. A primer antitestekkel 30 perces inkubálást végeztünk szobahőn, majd a secunder antitest került a metszetekre. A PD-L1 festéshez SP142-es klónt (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.

A tumorsejtekben (TC) a PD-L1, valamint az immunsejtekben (IC) a PD-L1 és a PD-1 immunpozitivitást szemikvantitatív módszerrel határoztuk meg. A tumorsejtek esetében 1%, 5%, 10%, 50%, az immunsejtek esetében 1%, 5%, 10% határértékeket alkalmaztunk. A tumorsejtek PD-L1 expressziójának elemzésére alkalmaztunk egy második pontozási rendszert is annak érdekében, hogy a magasabb PD-L1 expressziójú tartományban is észleljük a szignifikáns változásokat. Ennek megfelelően az alábbi kategóriákat hoztuk létre: kevesebb, mint 1%, 1-5%, 6-10%, 11-20%, 21-30%, 31-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90%, 91-100%.

2.2. Vérékép paraméterek változásának vizsgálata

A vizsgálat során azokat a teljes vérkép leleteket használtuk, amelyek a rutin betegellátás részeként kerülnek alkalmazásra a klinikai gyakorlatban. Három időpillanatban elemeztük a laborleleteket: a tüdőrák diagnosztizálásakor, a csont- vagy agyi metasztázis felfedezésekor, valamint a halált megelőzően vagy a legutolsó regisztrált kórházi vizit alkalmával. A betegek 96%-a elhunyt az utánkövetés során. A vérből rögzítésre került a fehérvérsejtszám (WBC), abszolút neutrophil szám (ANC), abszolút lymphocyta szám (ALC) és a thrombocyta szám (PLT). Normálértékeknek a következő minimum és maximum értékeket tekintettük: WBC: 4,6-10,2 G/L, ANC: 2,0-6,9 G/L, ALC: 0,6-3,4 G/L, PLT: 142-424 G/L. A vérkép paraméterek mellett kiszámolásra került a thrombocyta/lymphocyta arány (PLR) és a neutrophil/lymphocyta arány (NLR) is. Azok a betegek, akiknél posztoperatív komplikáció (akut fertőzés, szepszis) lépett fel, továbbá a nagy dózisú szteroid kezelésben részesült betegek kizárásra kerültek a vizsgálatból. A klinikopatológiai adatok, úgymint a nem, a daganat kezdeti TNM stádiuma, a tumor elhelyezkedése és szövettani típusa, a dohányzási előzmények, a fontosabb társbetegségek, továbbá a teljes túlélés és az agyi áttét/csontáttét felfedezése utáni túlélés is rögzítésre került. A műtéten átesett betegek patológiai TNM stádiuma a UICC (*Union for International Cancer Control*) 7. kiadása alapján került meghatározásra. Az agyi- és a csont metasztázisok diagnózisának megállapítása CT, MRI és PET CT vizsgálat alapján történt.

3. Statisztikai analízis

3.1. Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata

A vizsgálatunk legfontosabb célja a különböző paraméterek abszolútértékének kemoterápiára bekövetkező irányváltozásának meghatározása volt, növekedésük esetében +1, csökkenésük esetében -1, míg változatlanság esetén 0 értéket adtunk. Mivel a vizsgált paraméterek meghatározása szemikvantitatív módon történt, ezért csak elég nagy változás esetén módosult az adott kategória besorolása. A változások középértékét T-teszttel vizsgáltuk, null hipotézisünk az volt, hogy a kemoterápia nem befolyásolja a vizsgált változókat. A változási irányok közötti korrelációt a Spearman R-érték kiszámításával határoztuk meg a megfelelő adathalmazokra. Az elemzés során a szignifikancia szintet $\alpha=0,05$ értékre állítottuk be. A viszonylag alacsony esetszám miatt bonferroni korrekciók nem kerültek alkalmazásra, így minden bemutatott eredményt inkább erős tendenciának kell tekinteni, mint szignifikáns összefüggésnek.

Valamennyi statisztikai analízist a Python rendszerben végeztük a SciPy szoftvercsomagjával.

3.2. Vérték paraméterek változásának vizsgálata

A vizsgálat statisztikai analízisét a PASW Statistics 23.0 package (SPSS INC., Chicago, IL, USA) programmal végeztük. Az adatok megoszlásának ellenőrzése a Kolmogorov-Smirnov normalitás teszttel történt. A vérték értékek hosszmetzeti analízisét a nonparametrikus Friedmann és Wilcoxon-rank teszttel végeztük. A Kхи-négyzet próbát a nominális változók közötti összefüggésekre használtuk. Az egyváltozós túlélési analízisre a Kaplan-Meier diagrammot és a két változós log-rank tesztet használtuk. A számszerű adatok medián vagy középértéket mutatnak, a teljes túlélés esetében a medián érték confidencia intervalluma (CI) 95%. A kétváltozós p értékek esetében a kevesebb, mint 0,05 értéket tartottuk statisztikailag szignifikánsnak.

4. Etikai engedélyek

Az archivált szövettani blokkok felhasználásához az alábbi etikai engedélyekkel rendelkezünk: „Tüdőtumorok prognosztikai és prediktív faktorainak vizsgálata” (ETT-TUKEB, 510/2013, 86/2015, 241/2016.

A vizsgálatok elvégzését az alábbi pályázatok támogatták:

Magyar Innovációs és Technológiai Alap: KTIA_NAP_13-2014-0021, NAP2-2017-1.2.1.-NKP-0002

OTKA-PD115792, OTKA-K116151, OTKA-K112371, OTKA-K129065

Eredmények

1. Neoadjuváns kemoterápia hatásának vizsgálata

1.1. A neoadjuváns kemoterápia hatása a tumorsejtek PD-L1 expressziójára

A teljes betegpopulációt tekintve a 41 betegből 9 beteg esetében (22%) észleltünk csökkenést, 3 beteg esetében (7,3%) növekedést és 29 beteg esetében (70,7%) nem találtunk változást a tumorsejtek PD-L1 expressziója tekintetében a neoadjuváns kemoterápia hatására ($p=0.083$). A vizsgálat eredményeit a III. táblázatban foglaltuk össze.

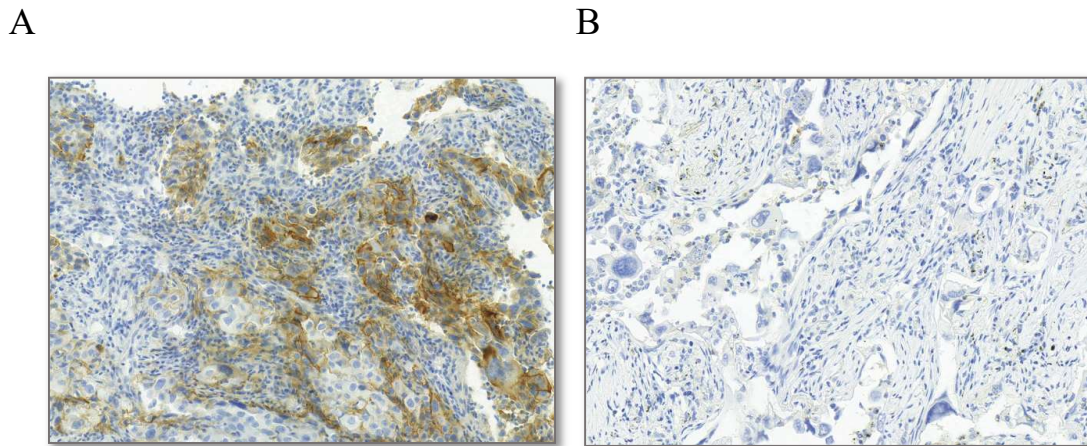
A részletesebb scoring rendszer alkalmazásával a tumorsejtek PD-L1 expresszióját illetően 10 betegnél (24,4%) észleltünk csökkent, míg 3 beteg esetében (7,3%) növekvő expressziót és 28 beteg esetében (68,3%) nem láttunk változást. A legmarkánsabb csökkenést egy adenocarcinómában szenvedő betegnél figyelhettük meg, ahol 70%-os PD-L1 pozitivitást mutatott a tumor a kemoterápiás kezelést megelőző bronchoscopos mintában, majd 3 ciklus paclitaxel-carboplatin kemoterápia után kevesebb, mint 1 %-ra csökkent a tumorsejtek PD-L1 expressziós szintje (5. ábra). A tumorsejtek PD-L1 expressziójának csökkenése csak azon betegek csoportjában volt szignifikáns, akik gemcitabin-cisplatin kombinációjú kemoterápiát kaptak ($p=0,02$), és ez az összefüggés a klasszikus és a részletes score rendszer alkalmazásakor is megfigyelhető volt. A paclitaxel-carboplatin kombinációjú kemoterápiát kapó betegek csoportjában ilyen összefüggés – statisztikailag szignifikáns módon – nem volt megfigyelhető.

A szövettani alcsoportok (adenocarcinoma/laphámrák) és a nemek (férfi/nő) vonatkozásában nem észleltünk szignifikáns változást a tumorsejtek PD-L1 expressziójában neoadjuváns kemoterápiát követően.

III. táblázat

A neoadjuváns kemoterápia hatása a tumorsejtek PD-L1, az immunsejtek PD-L1/PD-1 expressziójára, valamint a stromális immunsejt denzitásra szinkódolva

* Az 1. oszlop a TC PD-L1 expressziójának változását mutatja az 1, 5, 10,50% score rendszer alkalmazásával



5. ábra

A tumorsejtek PD-L1 szintjének jelentős csökkenése tüdő ADC-ben

A: PD-L1 TC: 70%, B: PD-L1 TC: <1% (saját ábra)(105)

1.2. A neoadjuváns kemoterápia hatása az immunsejtek PD-L1 expressziójára

A teljes betegpopulációt tekintve 10 beteg esetében (24,4%) észleltünk növekedést, 8 beteg esetében (19,5%) csökkenést, 23 beteg esetében (56,1%) pedig változatlan immunsejt PD-L1 expressziót találtunk, ami összességében azt jelenti, hogy a kemoterápiának nem volt szignifikáns hatása az immunsejtek PD-L1 expressziójára ($p=0,643$) (III. táblázat). A főbb szövettani alcsoportok (adenocarcinómák/laphámrákok) esetében sem láttunk különbséget a PD-L1 szintek változásában. Sem a kemoterápiák összetételét, sem pedig egyéb klinikopatológiai jellemzőket illetően nem figyeltünk meg szignifikáns változást.

1.3. A neoadjuváns kezelés hatása az immunsejtek PD-1 expressziójára

A teljes betegpopulációt tekintve 12 betegnél (29,3) nőtt, 16 betegnél (39%) csökkent és 13 betegnél (31,7%) nem változott az immunsejtek PD-1 expressziója a neoadjuváns kemoterápiát követően, azonban ezek a változások nem voltak szignifikánsak ($p=0,456$) (III. táblázat). Hasonlóképpen nem észleltünk szignifikáns összefüggést sem az adenocarcinómáknál ($p=0,577$), sem pedig a laphámrákoknál

($p=1,000$). A leggyakoribb kemoterápia altípusok sem mutattak szignifikáns összefüggést: gemcitabin-cisplatin ($p=0,383$), paclitaxel-carboplatin ($p=0,136$).

1.4. A neoadjuváns kezelés hatása az immunsejtek denzitására

A 41 mintapárból 38 betegnek volt értékelhető szövettani mintája a stromális immunsejtek értékeléséhez. 4 beteg esetében (10,5%) növekedést, 6 beteg esetében (15,8%) csökkenést, 28 beteg esetében (73,7%) pedig változatlan státuszt észleltünk (III. táblázat). Az eredmények alapján a neoadjuváns kemoterápia nem befolyásolja szignifikánsan a stromális immunsejtek denzitását ($p=0,534$). Az adenocarcinomás ($p=0,331$) és a laphámrákos ($p=0,671$) alcsoportban sem volt szignifikáns összefüggés kimutatható, hasonlóképpen a kemoterápiás alcsoportokhoz (gemcitabin-cisplatin: $p=0,67$, paclitaxel-carboplatin: $p=1,000$). Nem észleltünk összefüggést az egyéb klinikopatológiai alcsoportok elemzésekor sem.

1.5. A különböző szövettani paraméterek változásai közötti összefüggés

Az egyes szövettani paraméterek – 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.

2. Vértkép paraméterek változásának vizsgálata

A vizsgálati csoportban szereplő 818 betegből 352 betegnek (43%) volt agyi áttéte és 466 betegnek (57%) csontáttéte. Kiemelendő, hogy az agyi áttétes csoportban 38 betegnek később csontmetasztázisa lett, 85 betegnek a csontáttétes csoportban pedig a

későbbiekben agyi metasztázisa alakult ki. A férfiakban a csontáttét volt a gyakoribb, míg a nőkben az agyi áttét ($p=0,006$). A csontáttét a 65 év vagy a feletti korcsoportban, míg az agyi áttét a 65 év alatti korcsoportban bizonyult gyakoribbnak ($p=0,006$).

2.1. A vérkép paraméterek időbeli változása

A hosszmetszeti követés során a vizsgálandó vérkép paramétereit rögzítettük a tüdőrák diagnózisának felállításakor, az agyi- vagy a csontáttét kialakulásakor, továbbá a halál időpontja előtt, vagy az utolsó vizit során. A follow up periódus során a betegek 96%-a elhunyt. A IV. táblázatban a vérkép paraméterek, valamint az neutrophil/lymphocyta arány (NLR) és a thrombocyta/lymphocyta arány (PLR) láthatók az elemzés három időpillanatában a vizsgálati csoportban és a kontroll csoportban (IV. táblázat).

IV. táblázat

Vérkép paraméterek változása a daganatos progresszió során

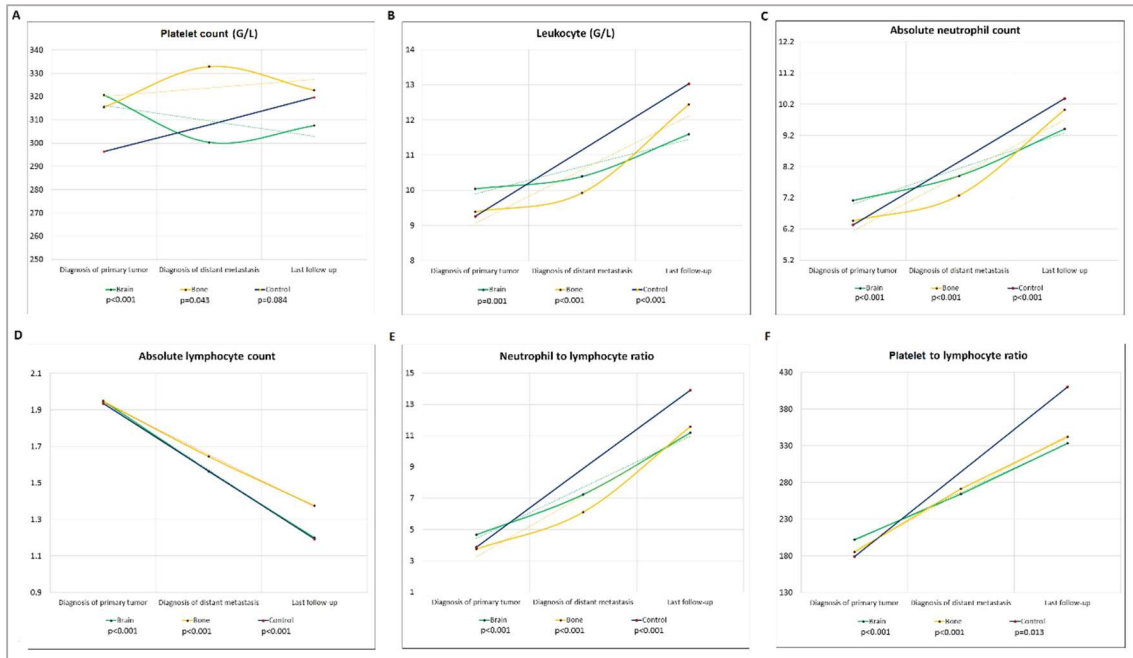
CBC parameter		Diagnosis of primary tumor	Diagnosis of metastasis Mean (m)	Last follow-up before death
Brain metastasis	Platelet count (G/L)	317.04	298.77	307.53
	Leukocytes (G/L)	10.03	10.34	11.61
	Absolute neutrophil count	7.1	7.83	9.42
	Absolute lymphocyte count	1.94	1.56	1.19
	NLR	4.56	7.05	11.27
	PLR	197.3	259.75	335.43
Bone metastasis	Platelet count (G/L)	317.22	335.24	322.95
	Leukocytes (G/L)	9.35	9.97	12.43
	Absolute neutrophil count	6.44	7.33	10.01
	Absolute lymphocyte count	1.93	1.64	1.37
	NLR	3.78	6.1	11.54
	PLR	186.45	269.53	341.99
Other type of distant metastasis	Platelet count (G/L)	292.34	-	311.66
	Leukocytes (G/L)	9.59	-	11.77
	Absolute neutrophil count	6.57	-	9.68
	Absolute lymphocyte count	1.99	-	1.08
	NLR	4	-	13.45
	PLR	172.47	-	404.64
No distant metastasis	Platelet count (G/L)	299.95	-	327.72
	Leukocytes (G/L)	8.97	-	14.01
	Absolute neutrophil count	6.13	-	11.59
	Absolute lymphocyte count	1.88	-	1.29
	NLR	3.74	-	14.33
	PLR	184.63	-	415.36

CBC = teljes vérkép, NLR = neutrophil-to-lymphocyta ratio, PLR = platelet-to-lymphocyta ratio, G/L = giga/liter

A teljes vérkép paraméterek, mint a leukocyta szám (6. ábra B) és az abszolút neutrophil szám (6. ábra C) folyamatosan és szignifikánsan növekedtek a longitudinális analízis során, függetlenül a távoli áttét helyétől, ugyanakkor az abszolút lymphocyta szám (6. ábra D) folyamatosan és szignifikánsan csökkenő átlagértéket mutatott ($p < 0,001$).

Ami az átlag thrombocyta értékeket illeti (6. ábra A), szignifikáns változást figyelhettünk meg a daganatos progresszió során a vizsgálati populáció mindkét alcsoportjában (agyi áttét: $p < 0,001$; csontáttét: $p = 0,043$), ezzel szemben a kontrollcsoportban a változás nem volt szignifikáns ($p = 0,084$). Az agyi áttétes betegeknél a thrombocyta szint változása egy csökkenő-emelkedő tendenciát mutatott (320,71 G/L vs. 300,21 G/L vs. 307,47 G/L), míg a csontáttétes betegeknél ez a tendencia emelkedő-csökkenő volt (315,47 G/L vs. 332,92 G/L vs. 322,75 G/L). A neutrophil/lymphocyta arány és a thrombocyta/lymphocyta arány

vizsgálatakor mindkét paraméter esetében szignifikáns növekedést figyelhettünk meg ($p < 0,001$) (6. ábra E és F).



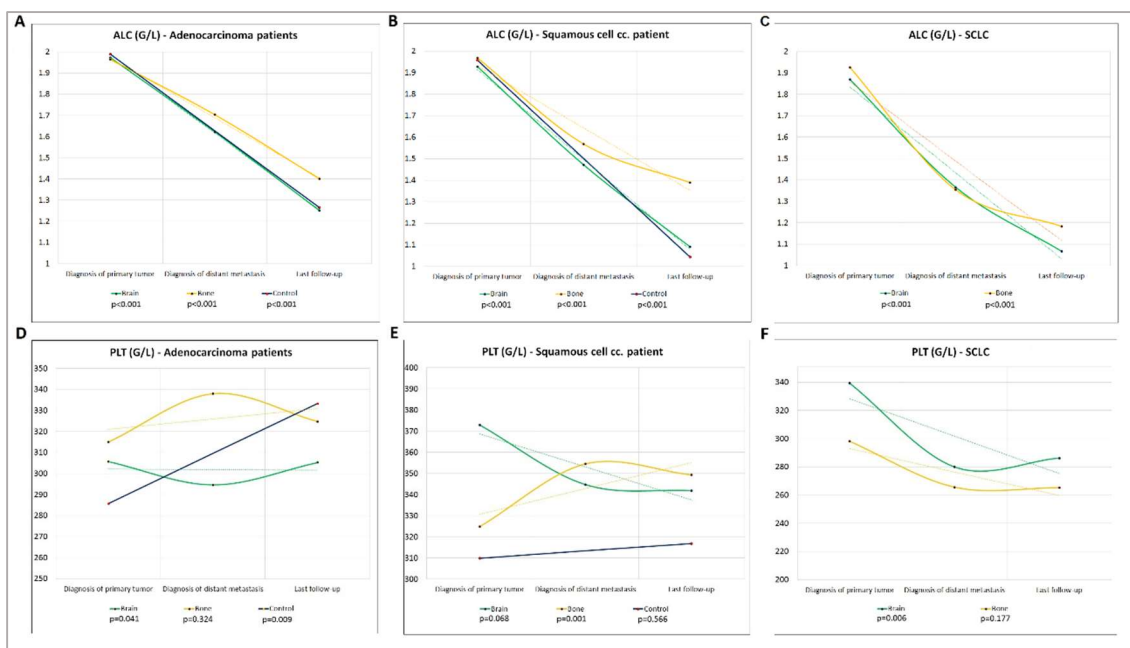
6. ábra

Az abszolút vérkép paraméterek (A-D), valamint a neutrophil/lymphocyta arány (E) és a thrombocyta/lymphocyta arány (F) longitudinális elemzése a vizsgálat 3 időpillanatában

A: thrombocyta szám, B: leukocyta szám, C: abszolút neutrophil szám, D: abszolút lymphocyta szám, E: neutrophil/lymphocyta arány, F: thrombocyta/lymphocyta arány (zöld=agyi áttét, sárga=csontáttét, kék=kontrollcsoport) (saját ábra)(106)

Érdekes módon, amikor az ADC, SCC és SCLC eseteket külön elemeztük, hasonló eredményeket találtunk az abszolút lymphocyta szám vonatkozásában (7. ábra A-C), azonban a thrombocyta számot illetően a szövettani altípusok között különbségek voltak megfigyelhetők (7. ábra D-F). Amint az megfigyelhető, az abszolút lymphocyta szám valamennyi szövettani altípusnál és metasztázis típusnál szignifikáns csökkenést mutatott. Ezzel szemben a thrombocyta szám longitudinális elemzésekor szignifikáns *csökkenő-emelkedő* értékeket észleltünk az agyi áttétben szenvedő ADC-s betegeknél ($p=0,041$) és nem-szignifikáns *csökkenő-emelkedő* értékeket a csontáttétes ADC-s

betegeknél ($p=0,324$). Ezzel szemben az SCC-s betegeknél agyi áttét jelenlétekor nem-szignifikáns *csökkenő-kissé emelkedő* értékeket, míg csontáttét esetében szignifikáns *emelkedő-csökkenő* értékeket találtunk ($p=0,001$). Érdekes módon SCLC-ben mind agyi, mind pedig csontáttét esetében *csökkenő-kissé emelkedő* thrombocyta értékek voltak detektálhatók ($p=0,006$ és $p=0,177$).

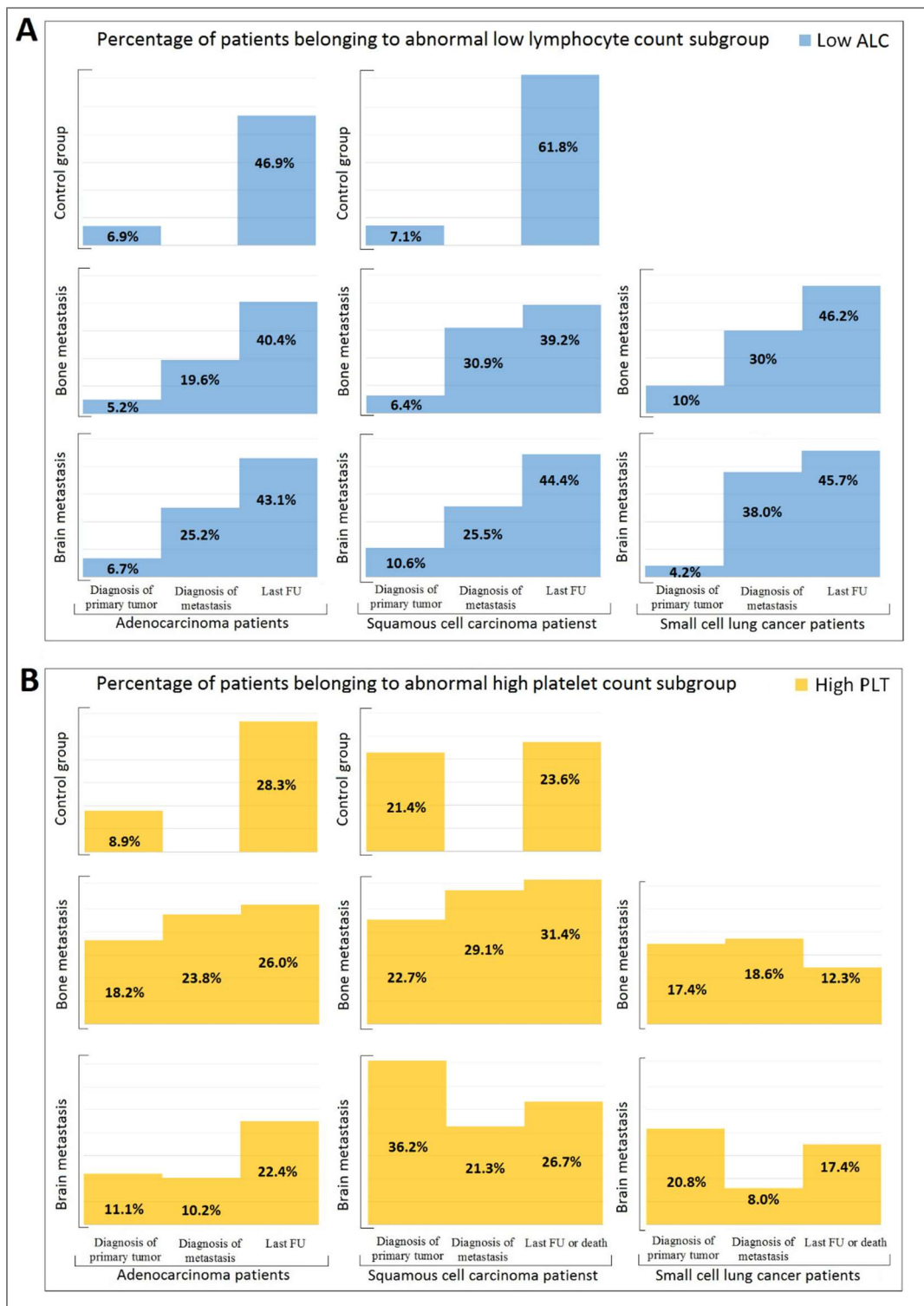


7. ábra

Az abszolút lymphocyta szám (ALC) és a thrombocyta szám (PLT) longitudinális elemzése a főbb szövettani típusok esetében

A: ALC ADC-ben, B: ALC SCC-ben, C: ALC SCLC-ben, D: PLT ADC-ben, E: PLT SCC-ben, F: PLT SCLC-ben (zöld=agyi áttét, sárga=csontáttét, kék=kontrollcsoport) (saját ábra)(106)

A longitudinális analízis utolsó lépéseként a vérkép paraméterek klinikai relevanciájának vizsgálata érdekében a betegeket az abszolút lymphocyta szám és a thrombocyta szám referencia értékei alapján csoportosítottuk (8. ábra és V. táblázat).



8. ábra

Az alacsony abszolút lymphocyta szám (ALC) (A) és a magas thrombocyta szám (PLT) (B) alapján a kóros tartományba kerülő betegek aránya a vizsgált főbb szövettani altípusok (ADC, SCC, SCLC) esetében, agyi áttét (brain metastasis), csontáttét (bone metastasis) és kontrollcsoport (control group) felosztásban (saját ábra)(106)

V. táblázat

Az abszolút lymphocytaszámot (ALC) és a thrombocytaszámot (PLT) illetően a kórosan alacsony, normál és abnormálisan magas alcsoportokba tartozó betegek százalékos aránya a betegség progressziójának különböző időpontjaiban (FU: follow up)

Patients	Absolute lymphocyte count ^a				Platelet count ^b			
	PLT reference groups	Diagnosis of primary tumor	Diagnosis of metastasis	Last FU	ALC reference group	Diagnosis of primary tumor	Diagnosis of metastasis	Last FU
ADC patients	Low ALC ^c	6.7%	25.2%	43.1%	Low PLT ^f	1.2%	2.8%	8.1%
	Normal ALC ^d	90.1%	71.7%	55.5%	Normal PLT ^g	87.7%	87%	69.5%
	High ALC ^e	3.2%	3.1%	1.4%	High PLT ^h	11.1%	10.2%	22.4%
	Low ALC ^c	5.2%	19.6%	40.4%	Low PLT ^f	0.7%	2.8%	7.5%
	Normal ALC ^d	93.3%	78.6%	58.4%	Normal PLT ^g	81.1%	73.3%	66.5%
SCC patients	High ALC ^e	1.5%	1.8%	1.2%	High PLT ^h	18.2%	23.8%	26%
	Low ALC ^c	6.9%	-	46.9%	Low PLT ^f	3%	-	10.1%
	Normal ALC ^d	91.1%	-	52.1%	Normal PLT ^g	88.1%	-	61.6%
	High ALC ^e	2%	-	1%	High PLT ^h	8.9%	-	28.3%
	Low ALC ^c	10.6%	25.5%	44.4%	Low PLT ^f	4.3%	6.4%	6.7%
SCLC patients	Normal ALC ^d	89.4%	74.5%	55.6%	Normal PLT ^g	59.6%	72.3%	66.7%
	High ALC ^e	0%	0%	0%	High PLT ^h	36.2%	21.3%	26.7%
	Low ALC ^c	6.4%	30.9%	39.2%	Low PLT ^f	0.9%	0.9%	2.9%
	Normal ALC ^d	91.8%	66.4%	57.9%	Normal PLT ^g	76.4%	70%	65.7%
	High ALC ^e	1.8%	2.7%	2.9%	High PLT ^h	22.7%	29.1%	31.4%
Control group ⁱ	Low ALC ^c	7.1%	-	61.8%	Low PLT ^f	5.4%	-	5.5%
	Normal ALC ^d	91.1%	-	36.4%	Normal PLT ^g	73.2%	-	70.9%
	High ALC ^e	1.8%	-	1.8%	High PLT ^h	21.4%	-	23.6%
	Low ALC ^c	4.2%	38%	45.7%	Low PLT ^f	2.1%	0%	10.9%
	Normal ALC ^d	95.8%	60%	54.3%	Normal PLT ^g	77.1%	92%	71.7%
Control group ⁱ	High ALC ^e	0%	2%	0%	High PLT ^h	20.8%	8%	17.4%
	Low ALC ^c	10%	30%	46%	Low PLT ^f	4.3%	8.6%	13.8%
	Normal ALC ^d	88.6%	70%	53%	Normal PLT ^g	78.3%	72.9%	73.8%
	High ALC ^e	1.4%	0%	0%	High PLT ^h	17.4%	18.6%	12.3%

a: A PLT szerint az egyes alcsoportokba tartozó betegek aránya, b: Az ALC szerint az egyes alcsoportokba tartozó betegek aránya, c: ALC% < 1:0 G/L, d: ALC% 1:0-4:0 G/L e: ALC% > 4:0 G/L, f: PLT < 142 G/L, g: PLT 142-424 G/L, h: PLT > 424 G/L, i: A kontroll csoportba olyan betegek tartoztak, akik vagy nem szenvedtek agyi- és csontáttétben, vagy semmilyen távoli áttétük nem volt.

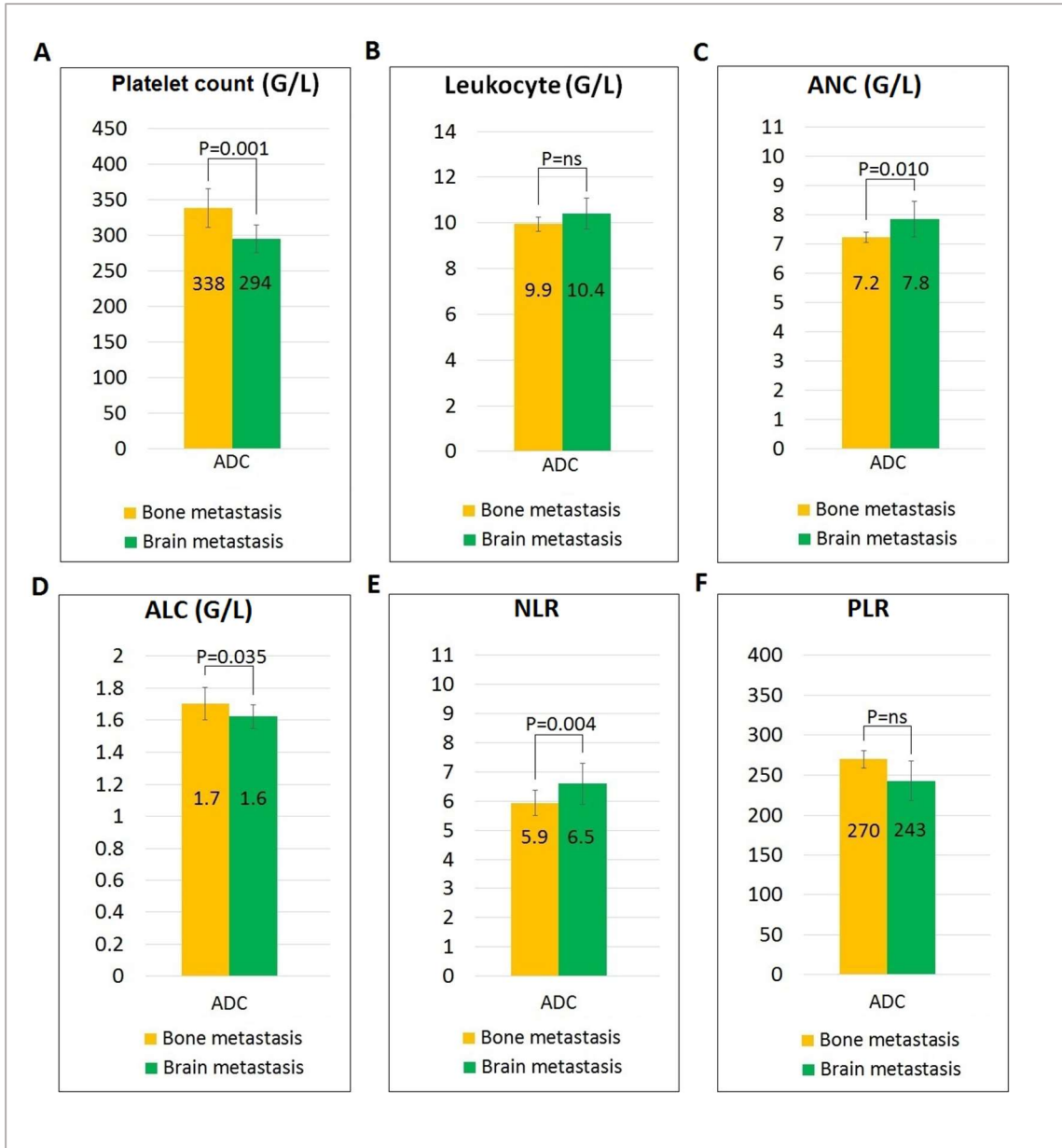
Eszerint a kórosan alacsony lymphocita számú csoportba tartozók aránya folyamatosan növekedett a betegség lefolyása során, függetlenül a daganat szövettani altípusától vagy a távoli áttét fajtájától. Ezzel szemben a kórosan magas thrombocyta számú csoportba

tartozók aránya folyamatosan emelkedett az ADC-s betegeknél és csökkent az SCLC-ben szenvedőknél.

2.2. Vértkép paraméterek változása agyi- és csontáttét esetén

Amint azt a 9. ábra mutatja, az áttét megjelenésekor szignifikáns különbségeket figyelhettünk meg az agyi áttétes és a csontáttétes betegek között a thrombocyta számot ($p=0,001$), az abszolút neutrophil számot ($p=0,010$), az abszolút lymphocyta számot ($p=0,035$) és a neutrophil/lymphocyta arányt illetően ($p=0,004$).

Emellett egy jól látható, de statisztikailag nem szignifikáns különbség volt tapasztalható az SCC csoportban a neutrophil/lymphocyta arányt illetően (csontáttét: 6,2 vs. agyi áttét: 9,0) és a thrombocyta/lymphocyta arányt illetően (csontáttét: 282 vs. agyi áttét: 327). Az egyéb paraméterek vonatkozásában nem találtunk szignifikáns összefüggést egyik szövettani altípusban sem.



9. ábra

A csontáttétes (sárga) és az agyi áttétes (zöld) ADC betegek adatainak elemzése az áttét megjelenésének idején

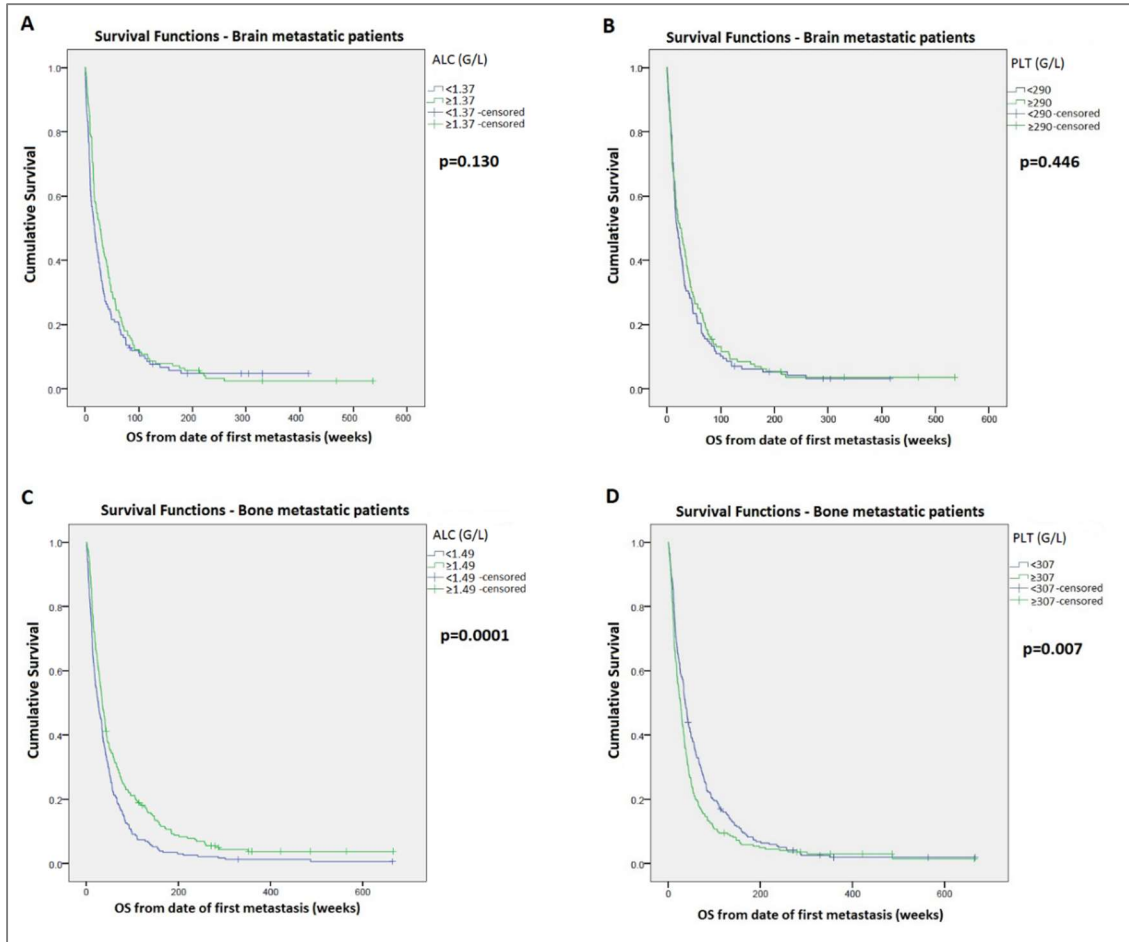
A: thrombocytaszám, B: leukocytaszám, C: abszolút neutrophil szám, D: abszolút lymphocytaszám, E: neutrophil/lymphocytarány, F: thrombocyt/lymphocytarány (saját ábra)(106)

2.3. A túlélés vizsgálata agyi- és csontáttét esetén

A 10. ábra az áttét megjelenése utáni teljes túlélést (OS) mutatja agyi áttétes és csontáttétes betegeknél az abszolút lymphocita szám és a thrombocita szám függvényében (10. ábra A-D).

Ami a lymphocita számot illeti, ahogyan várható volt, a magasabb értékkel ($ALC \geq 1.37$ G/L) rendelkező betegek csoportjában agyi áttét meglétekor bár nem szignifikánsan, de jól láthatóan hosszabb medián OS volt megfigyelhető (28 vs. 17,7 hét; $p=0,130$) (10. ábra A), míg csontáttét esetében a különbség már szignifikánsnak bizonyult (35 vs. 25,7 hét; $p=0,0001$) (10. ábra C).

Ami a thrombocita számot illeti, az agyi áttétes csoportban az áttét megjelenésekor mért thrombocita szám nem mutatott szignifikáns összefüggést az áttét utáni teljes túléléssel (medián OS: 18,7 vs. 24,2 hét, $p=0,446$) (10. ábra B). Ezzel szemben a csontáttétes betegeknél az OS szignifikánsan hosszabb volt azoknál, akiknél a thrombocita szám alacsony volt (vs. magas thrombocita szám; medián OS: 36,5 vs. 26,1 hét; $p=0,007$) (10. ábra D).



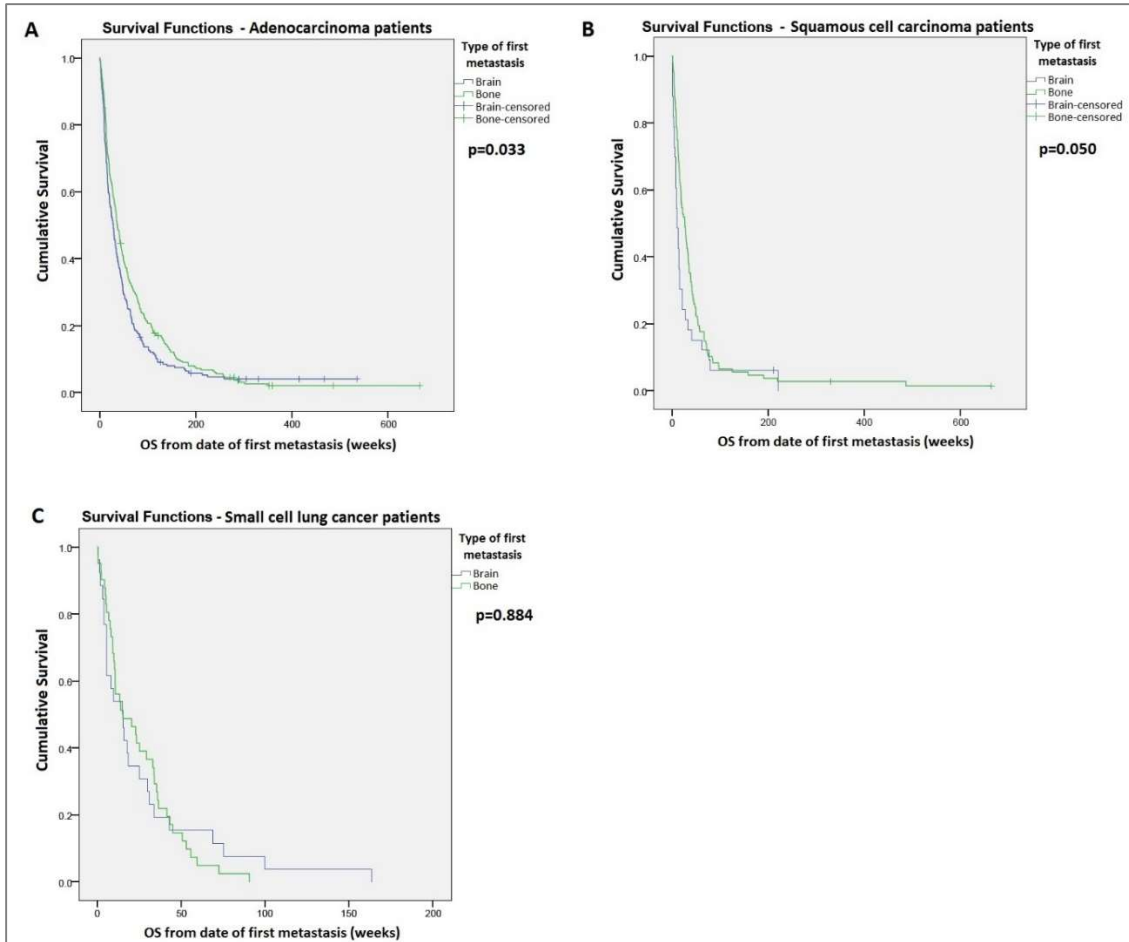
10. ábra

Az áttétek megjelenése utáni teljes túlélés (OS) agyi áttétes és csontáttétes betegeknél az abszolút lymphocytaszám (ALC) és a thrombocytaszám (PLT) függvényében

A: ALC agyi áttétben, B: PLT agyi áttétben, C: ALC csontáttétben, D: PLT csontáttétben

(saját ábra)(106)

Az egyes szövettani altípusokban a betegek áttét utáni teljes túlélését a távoli (agyi/csont) áttét fajtájának függvényében a 11. ábra szemlélteti. Látható, hogy mindössze az ADC-s betegeknél figyelhető meg egy gyenge összefüggés. Az agyi áttétben szenvedők némileg kedvezőbb áttét utáni teljes túlélést mutatnak, összehasonlítva a csontáttétes populációval (p=0,033) (11. ábra A).



11. ábra

Az agyi vagy csontáttét utáni teljes túlélés az egyes szövettani altípusokban az áttét fajtájától függően.

A: ADC, B: SCC, C: SCLC

(saját ábra)(106)

Megbeszélés

1. PD-L1 és PD-1 vizsgálatok neoadjuváns tumorminta párokon

Vizsgálatunkban áttekintést adunk a tumorsejtek PD-L1 expressziójának változásáról, a stromális immunsejtek denzitásának változásáról, valamint PD-1 és PD-L1 expressziós szintjük változásáról platinabázisú neoadjuváns kemoterápia után. A 41 tumorpárból álló mintacsoportban 10 esetben a tumorsejtek PD-L1 csökkenését, 3 esetben növekedést láttuk. Ezek az eredmények egybecsengenek Sheng és munkatársai által közölt eredményekkel, ahol 32 NSCLC tumorpárt, ebből 26 adenocarcinomát vizsgáltak (107). Hasonlóan az általunk talált eredményekhez ők is dominálón a PD-L1 szint csökkenését észlelték a tumorsejteken, és nem észleltek változást a stromális immunsejtek PD-L1 expresszióban a kemoterápiát követően. Ők nem vizsgálták viszont a stromális immunsejteket és a PD-1 szint expressziójának változását az immunsejteken. Zhang és munkatársai szintén csak a tumorsejtek PD-L1 expressziójára fókuszáltak, és a 30 betegből álló NSCLC mintapáron általában csökkenő PD-L1 expressziót írtak le neoadjuváns kemoterápiát követően, de néhány esetben ők is találtak megnövekedett PD-L1 expressziót (108). Magyarázatuk szerint a kemoterápiára való rezisztencia és a növekedést mutató PD-L1 szint összefügg egymással. Szerintük a tumorsejtek PD-L1 szintjének növekedése a tumorsejteken kemoterápiát követően a kemorezisztencia indikátora és rossz prognosztikus jelnek tekinthető. Eredményeiket *in vivo* kísérletekkel is alátámasztották. Ezen a vonalon tovább gondolkodva a kemoszenzitivitás viszont azt is jelentheti, hogy a kemoterápia szelektíven pusztítja a PD-L1 pozitív tumorsejteket, ezáltal csökkenti a PD-L1 expressziót. A saját vizsgálatunkban az a 9 beteg, akinél csökkenő PD-L1 szintet észleltünk a kemoterápia után, 8 esetben parciális remissziót mutatott klinikailag, viszont a növekvő PD-L1 szintet mutató 3 esetben a klinikum szintén parciális regressziót jelzett.

A bronchoscopos szövettani minták mérete miatt mindig is vita tárgya volt, hogy valójában reprezentálják-e az egész tumort és összehasonlíthatók-e a sebészeti szövettani reszekátumokkal. Meert és munkatársai kutatták a bronchoscopos minták összehasonlíthatóságát ugyanazon minták sebészeti megfelelőjével a biomarkerek expressziója vonatkozásában. 28 tüdő tumoros mintapáron immunhisztokémiával vizsgálták a p53, EGFR, c-erbB-2 és Ki-67 proteinek expresszióját, és 85% egyezést

találtak a bronchoscopos és sebészeti mintákon, amiből azt a következtetést vonták le, hogy az endoszkópos minták megbízható és összehasonlítható eredményeket adnak a tumor egészére vonatkozóan (109).

A másik fontos kérdés a tüdőtumrok biomarker kutatásaiban a tumor heterogenitása. Munari és munkatársai kis biopsziás mintákban, például core biopsziás tüdőtumros anyagokon vizsgálták a PD-L1 expresszió megbízhatóságát (110). Ők 20% és 7.9%-os eltérést találtak az $\geq 1\%$ és $\geq 50\%$ feletti expressziós tartományban, ami óvatosságra int, amikor a nemkissejtes tüdőtumros betegek egy-egy mintáját értékeljük az immunterápiára való alkalmasság tekintetében. Ajánlásuk szerint legalább 4 biopsziás minta szükséges, a tumrok helyes értékeléséhez. A saját eredményeinket is figyelembe véve, az egymintás értékelés alapján extrém óvatosság szükséges a tumor biológiai és klinikai viselkedésének megítélésre. A minták még komplexebb értékeléséhez és a statisztikai megbízhatóság növeléséhez egyidejűleg több helyről történő mintavétel lenne szükséges akár bronchoscoposan, akár a transthoracalis tübiopsziával, amit elég nehéz kivitelezni a gyakorlatban.

Az immunterápia alkalmazása egy új terápiás lehetőség a tüdőtumros betegek számára, de a szelektív kritériumok egyelőre nem kellően kidolgozottak. A tumorsejtek 50% feletti PD-L1 expressziója a pembrolizumab kezelés jó prediktora (40). Emellett a tumorsejtek és immunsejtek PD-L1 expressziója együttesen szintén egy prediktív marker lehet, amely intenzív kutatások tárgya (111). Az immunterápiát ezidáig döntően másod- vagy harmadvonalbeli kezelésként használták platinabázisú kemoterápia után, vagy pedig sebészeti reszekciót követően kiújult tumrok esetében.

Az immunterápia ígéretesnek tűnik a kissejtes tüdőtumrok kezelésében is, ahol az elmúlt 10 évben nem törzskönyveztek új hatóanyagot a betegség kezelésére. Ismeretes ugyanakkor, hogy kissejtes tüdőrákban rendkívül alacsony a daganatsejtek PD-L1 expressziója (112). Saját anyagunkban mind a 4 kissejtes tüdőtumros beteg mintája 1% alatti PD-L1 pozitivitást mutatott és változatlan maradt a neoadjuváns kemoterápia utáni sebészi szövetmintában.

A tumorsejtek PD-L1 szint változásában különbségeket észleltünk a kemoterápiák összetételét illetően. A gemcitabin-cisplatin csoportban szignifikáns csökkenést találtunk, míg ez nem volt megfigyelhető a paclitaxel-carboplatin csoportban, ami jelzi, hogy a kemoterápia összetétele hatással lehet a PD-L1 szint változására. A gemcitabin-cisplatin

csoportban nem találtunk olyan tumorpárt, ahol a kemoterápia utáni PD-L1 szint nőtt volna a tumorsejteken, míg a paclitaxel-carboplatin csoportban 16-ból 3 esetben nőtt a tumorsejtek PD-L1 expressziója. Ez utóbbi megfigyelés megegyezik Peng munkacsoportjának eredményével, aki egér modellben petefészekrák sejtvonalakat tanulmányozott és szintén a PD-L1 szint emelkedését észlelte paclitaxel-carboplatin kezelést követően, de az ő vizsgálataiban a gemcitabin monoterápia is PD-L1 szint emelkedést okozott (113). Humán pancreas sejtvonalakon a protein expresszió és a mRNA expresszió felerősödését észlelték paclitaxel vagy gemcitabin kezelést követően (114).

Vizsgálatainkban a tumorsejtek PD-L1 expressziója a platinabázisú kemoterápiát követően a betegek közel egynegyedében csökken, ami jelenleg a legfontosabb szelekciós biomarker az immunterápia alkalmazására.

Hasonló trendeket nem láttunk az immunsejtek PD-L1 és PD-1 expressziójának változásában sem az immunsejtek mennyiségének változásában a neoadjuváns kezelést követően. Ezek a megfigyelések egyeznek a munkacsoportunknak közelmúltban közölt eredményeivel, amelyben primer tüdő adenocarcinoma és agyi metasztázis tumorpárokat vizsgáltunk kemoterápiával vagy anélkül, és semmilyen összefüggést nem találtunk az immunsejtek PD-1 expressziója, a stromális immunsejtek mennyisége és a kemoterápia alkalmazása között (45).

Összefoglalva, ez az első vizsgálat, amelyben együttesen került elemzésre a PD-L1 és PD-1 expresszió, valamint a stromális immunsejtek denzitása tüdőrákban kemoterápia előtt és után. Eredményeink arra utalnak, hogy a platinabázisú kemoterápia hatására megváltozhat és akár csökkenhet is a tumorsejtek PD-L1 szintje a betegek egy nem elhanyagolható hányadában, ugyanakkor nem változik meg érdemben az immunsejtek denzitása és PD-1 expressziója. Eredményeink alapján kemoterápia csökkenhet az immunterápia alkalmazásának lehetősége, ezért a terápiás döntések előtt rebiopszia és a PD-L1 immunhisztokémiai eredmények újraértékelése javasolt.

2. A vérkép eltéréseinek időbeli vizsgálata és prognosztikus jelentősége

A kiterjedt csont és agyi metasztázissal rendelkező tüdőtumoros betegek túlélése jelenleg is szerény, a medián túlélési adatok kevesebb, mint egy évet mutatnak. Az új terápiás lehetőségek, úgymint a célzott molekuláris kezelések, vagy az immunterápia

térnyerésével a betegek egy jelentős része reményt kapott a hosszabb túlélésre, a tüdőrák krónikus betegséggé való minősítésére. A legfontosabb kérdés a betegség azon fenotípusának kiválasztása, hogy melyik beteg milyen kezelésre fog leginkább reagálni, és hogyan illeszthető ebbe a sorrendbe az immunterápia. Számos rutin vérkép paraméterről, mint a legkönnyebben elérhető és vizsgálható értékről, úgymint a PLT, ALC és ANC felmerült, hogy biomarkerként is használható lehetne az immunterápiára való válaszadás megítélése szempontjából, de ezidáig egyetlen hosszmetzeti vizsgálat sem történt, ahol ezeket a paramétereket a daganat progressziójának vonatkozásában vizsgálták volna (115-117). Keresztmetzeti vizsgáltunkban a kvalitatív vérkép alkotóelemeit vizsgáltuk a tüdőrák diagnózisának felállításakor, a csont és agyi metasztázisok kialakulásakor, valamint az utolsó elérhető viziten vagy a halál előtt.

Először az agyi és csontáttétek előfordulásával járó klinikopatológiai eltéréseket elemeztük és azt találtuk, hogy az agyi áttétek kialakulása gyakoribb a nők között, míg a csontáttétek a férfiak között. Ezidáig az egyéb szervi metasztázisok és a nemek között az irodalom nem talált szignifikáns összefüggést. Más szerzők a szervi áttétek nemi meghatározottságának hátterében hormonális folyamatokat feltételeznek, mindenesetre a saját eredményeink egybehangzóak más irodalmi adatokkal az életkori megoszlás és a metasztázisok terjedésének vonatkozásában is, mely szerint a fiatalabb női populációban gyakoribbak az agyi áttétek, míg az idősebb férfiakban a csontmetasztázisok (118-121). Az egyik lehetséges magyarázat szerint az agyi áttétképzés feltétele a cerebrovasculáris angiogén mikrokörnyezet megléte, amely fiatalabb életkorban jobb körülményeket teremt az agyi metasztázisok kialakulásának, míg idősebb korban a csontállomány állapota a csontmetasztázisok terjedésének kedvez (121-125).

A következő lépésben a kvalitatív vérkép hosszmetzeti változását elemeztük daganatos progresszió és metasztázis képzés során és az összes vizsgált érték szignifikáns változását találtuk a vizsgálati csoportban. A PLT szétváló trendjét találtunk a csont és agyi metasztázisok vonatkozásában a szövettani alcsoportokkal összevetve. Az agyi metasztázisos alcsoportban *leszálló-felszálló*, míg ezzel ellentétes *felszálló-leszálló* trendet találtunk a csontmetasztázisos alcsoportban. Az átlag PLT szintek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak az adenocarcinomás csontmetasztázisos csoportban és nem szignifikánsan, de a laphámumos csontmetasztázisos csoportban is magasabb értékeket mértünk az agyi metasztázisos betegekhez képest. Ezek az eredmények

egybecsengenek azzal az ázsiai vizsgálattal, ahol kínai betegpopulációban vizsgálták és szintén leírták a primer tüdőrák és csontmetasztázis összefüggését a thrombocytosisal (101, 126, 127). A thrombocytosis önmagában egy paraneopláziás szindrómaként is jellemezhető, amely az aktivált és megnövekedett thrombocytaszám útján elősegíti a tumor angiogenezisét, a tumor terjedését, ezáltal rossz prognosztikus jelnek tekinthető (126). A thrombocytaszám növekedése és a csontmetasztázisok keletkezése közötti összefüggés nem egyértelmű.

A thrombocytá aggregátumok képzésének gátlása a csontmetasztázisok progresszióját gátolja (128). Ennek egyik lehetséges magyarázata az, hogy csontmetasztázisok kialakulásában remodelling folyamatok vesznek részt, ahol citokinek és növekedési faktorok felszabadulása is jelen van, és a thrombocyták aggregációja szerepet játszhat a csontmetasztázisok kialakulásában (129). Érdekes módon a kissejtes tumoros betegcsoportban az átlag PLT szám magasabb volt az agyi metastázisos betegekben, de ez az eltérés nem volt szignifikáns. Ez lehet a kis betegszám következménye is, valamint annak is betudható, hogy a thrombocytosis csak egy meghatározott csontmetasztázis típusal jár együtt (például osteoblasztos, osteolitikus, vagy kevert), de a csontmetasztázisok típusáról nincs információnk (129). A normális PLT értékhatárokat alapul véve az abnormálisan magas csoportba az adenocarcinomás betegek tartoztak, esetükben minden mérési pontnál folyamatos növekedést észleltünk, míg folyamatos csökkenést a kissejtes csoportban. Más daganattípusokban is találtak összefüggést a magas thrombocytaszámmal, például emlőrákban, pancreas carcinomában, míg a kissejtes csoportban talált nem magasabb PLT értékek a relatíve gyors progresszió, vagy a rövid OS következményei lehetnek (130, 131). A WBC és az ANC átlagértékei minden mérési pontnál folyamatos növekedést mutattak a hisztológiai típustól függetlenül az agyi metastázisos NSCLC csoportokban, amelynek háttérében felmerülhet az agyi áttét során gyakran alkalmazott steroid terápia oki szerepe.

Preklinikai metastatikus emlőrákos egér modellekben szintén leírták már a WBC, az ANC és a PLT szintek változását (132). Saját vizsgálatunkban a hosszmetzeti értékelés során az ALC szint szignifikáns csökkenését észleltük a betegek mindegyik alsocsoportjában a hisztopatológiai státusztól és a metastázis fajtájától függetlenül. A lymphocyták prominens szerepet játszanak a tumor immunológiában, fontos antitumor hatásuk van és gátolják a tumorsejtek progresszióját (101, 131, 133). Az alacsony

lymphocytaszint rossz prognosztikai faktor jellegét számos tumorban, így melanomában, gyomor-, emlő és vastagbél tumorban is leírták már (131, 133).

Elemzésünk végén a PLT és az ALC prognosztikus értékek meghatározását végeztük a metasztázis időpontjának kialakulásában. Az agyi metasztázisos alcsoportban a magas PLT szám szignifikánsan rövidebb OS-t jelentett az alacsony PLT szintű betegekhez képest, míg az alacsony ALC szignifikánsan alacsonyabb OS-t jelentett a metasztázis fajtájától függetlenül. Érdekes módon a csontmetasztázisos alcsoportban semmilyen szignifikáns összefüggés nem volt a PLT szintek és az OS között. Mindezek egybecsengenek azokkal a korábbi vizsgálatokkal, amelyekben mind a PLT, mind pedig az ALC prognosztikus értékét vetették fel különféle tumortípusokban (131, 133). A metasztázisos fajtájára vetítve a túlélési adatokat, az adenocarcinomás csontmetasztázisos betegek szignifikánsan tovább éltek, mint az agyi metasztázisos betegtársaik.

Vizsgálati eredményeink klinikai fontosságát alátámasztja, hogy ilyen betegszámú homogén betegcsoportban ezidáig még nem közöltek hosszmetseti vizsgálati eredményeket a vérkép paramétereinek változásáról agyi- és csontmetasztázissal bíró tüdő tumoros betegeken. Az immunterápia bevezetésével az immunellenőrzőpont gátlók (*immune checkpoint inhibitors*) alkalmazásával számos, eddig nehezen kezelhető daganattípusban példátlanul jó terápiás választ lehetett elérni, de jelenleg sem tisztázott, hogy pontosan mely beteg fenotípusban várható a legkedvezőbb eredmény (134). Az immunterápiát főként előrehaladott stádiumú, vagy metasztatikus tüdő tumorban alkalmazzák, és ezekben az esetekben is csak a betegek kis hányada reagál jól a kezelésre (135). A thrombocytákból felszabaduló citokinek elősegítik a tumor növekedését, aggregátumaik a tumorsejtekkel összekapcsolódva elbújtatják az immunsejtek elől a sejtfelszíni antigéneket, tehát szerepük az immunrendszer gátlásában negatívan befolyásolja az immunterápiára való válaszadást (116). Ennek fényében előrehaladott stádiumú, agyi metasztázisos vagy és csontmetasztázisos tüdő tumoros betegeken a magas PLT érték szerény immunterápiás eredményeket vetíthet elő. A csont- és agyi metasztázis esetében szétváló PLT trendek jelzésértékkel bírnak arra vonatkozóan, hogy a két betegcsoport esetében más betegjellemzőket is kell keresni a terápia megválasztásához. Mindezeket az is alátámasztja, hogy a folyamatosan csökkenő ALC és felszálló ANC az immunkezelés működése ellen szól. Az anti-PD-1 antitestek

működése T lymphocytá dependens aktivitást feltételez, ezért a PD-1 gátlók működése lymphopeniás betegeken kevésbé hatásos. Emellett a magas ANC is alacsony immunterápiás válaszadással jár együtt, amelynek legvalószínűbb oka a tumorsejtekhez társuló intenzív gyulladásos reakció. Mindezeket összesítve a PLT, az ALC és az ANC trendek ill. egyes esetekben a szignifikáns változások agyi- és csontmetasztázisos tüdő tumoros betegeknél alacsony immunterápiás válaszadási arányt feltételeznek. Az a tény, hogy az alcsoportokon belül divergáló trendeket észleltünk egy-egy vérkép paraméter vonatkozásában arra utalnak, hogy az új terápiás stratégiák alkalmazhatóságának megítélésénél egyéb tényezőket is érdemes figyelembe venni.

Vizsgálatainknak több korlátja is van; egyrészt ez egy retrospektív vizsgálat volt, ezért az eredmények elemzése is korlátozott. Másrészt nincs információnk a csontáttétek milyenségéről (oszteoblasztos, oszteolitikus, kevert) és a primer tumorok egyéb genetikai hátteréről (EGFR, KRAS, ALK, stb. státusz). Nem vizsgáltuk ezen kívül a társbetegségeket, amelyek közül számos betegségnek van hatása a vérkép paraméterekre, úgymint reumatoid arthritis, egyéb autoimmun folyamatok, fertőzések, coronaria betegség). Tekintettel arra, hogy a betegszám magas és relatíve hosszú ideig követtük a betegpopulációt, számos kezelési mód befolyásolhatta a kimenetelt, ezáltal a túlélést. Ezen túlmenően a csontmetasztázisok diagnosztikájában a 2000-es évek elején a csontszcintigráfia vagy a PET CT nem volt standard vizsgálati módszer, így a beválasztott betegek egy részénél a kisméretű vagy tünetmentes csontmetasztázisok nem kerülhettek felismerésre, ennek megfelelően az eredmények értékelése óvatosságot igényel.

Összefoglalva, ez a vizsgálat egy nagy homogén agyi- és csontmetasztázisos tüdő tumoros betegcsoporton elemezte a vérkép paraméterek hosszmetzeti változását. A PLT és az ANC növekedést mutató trendje, ezzel egyidőben az ALC csökkenő volta az immunterápia másod- és harmadvonalas alkalmazásának alacsony eredményességét sugallja és az elsővonalban történő alkalmazást favorizálja. Eredményeinkkel reméljük, hogy közelebb jutunk a csont- és agyi metastázisban szenvedő tüdő tumoros betegek kezelési stratégiájának finomításához az immunterápia alkalmazásának vonatkozásában. A tumor indukálta thrombocytosis, leukocytosis, és lymphopenia prognosztikai és prediktív szerepének pontosabb körvonalazása még további széleskörű vizsgálatok elvégzését teszi szükségessé.

Következtetések

I. Vizsgálat

1. Eredményeink arra utalnak, hogy a betegek *számottevő* részében csökken a tumorsejtek PD-L1 expressziója kemoterápia után.
2. Szignifikánsan nem változik a daganatos stroma immunsejt denzitása és azok PD-1 expressziója a neoadjuváns kezelés után.
3. Jelentősége lehet az alkalmazott kemoterápia összetételének, mivel csak a gemcitabin-cisplatin csoportban volt megfigyelhető a PD-L1 szint csökkenés a tumorsejtekben.

II. Vizsgálat

1. Megállapítottuk, hogy a daganatos progresszió során a thrombocyta szám és a neutrophil leukocyta szám nem mutat szignifikáns változást, ugyanakkor folyamatosan és szignifikánsan csökken a perifériás lymphocyta szám, szövettani típustól függetlenül.
2. A betegség előrehaladásával, a metastasisok megjelenésével, illetve az utolsó kontroll során egyre nagyobb százalékban esik az alacsony tartományba a lymphocyta szám minden szövettani típusban.
3. Eredményeink arra utalnak, hogy a tüdőtumrok progressziója során kialakult lymphocytaszám csökkenésnek jelentősége lehet az immunterápia időbeliségének és sorrendiségének meghatározásában.

Összefoglalás

Az elmúlt évtizedekben a tüdőrák diagnosztikájában megfigyelt látványos fejlődés ennek ellenére a daganatok több mint fele előrehaladott stádiumban kerül felfedezésre. Ilyen esetekben a szisztémás onkoterápia legfőbb pillérei a kemoterápia, a molekuláris célzott terápia és az immunterápia. Tüdőrákban az immunterápia bevezetése túlszárnyalta a korábbi hagyományos terápiákkal elért túlélési eredményeket. Annak ellenére, hogy esetében több biomarker kapcsán is felmerült annak prediktív értéke, a jelenlegi gyakorlatban csak a tumorszövet PD-L1 protein expresszióját alkalmazzák.

A jelen dolgozatban két kutatómunka eredménye kerül ismertetésre, melyek fő célja keringő és szöveti biomarkerek tanulmányozása volt tüdőrákban.

Az első vizsgálat során a platinabázisú citotoxikus kemoterápia hatását vizsgáltuk a daganatszövet PD-L1 és PD-1 expressziójára és a stromális immunsejt denzitásra. A vizsgálat egyik fontos üzenete a stromális immunsejtek számának stabilitása, és az immunsejtek PD-1 expressziójának változatlansága volt. Megállapítottuk emellett, hogy a tüdő adenocarcinomák közel egynegyedében csökken a tumorsejtek PD-L1 expressziója, aminek terápiás konzekvenciája lehet. A tumorsejtek felszínén észlelt szignifikáns PD-L1 expresszió csökkenés csak a gemcitabin-cisplatin kemoterápiás csoportban volt észlelhető, azonban ez a megfigyelés alátámasztja, hogy az onkológiai kezelések sorrendiségének és összetételének van szerepe a tumorsejtek PD-L1 expressziójának változásában.

A másik vizsgálat során tüdőrákok főbb szövettani altípusaiban elemeztük a perifériás vér paramétereinek változását a daganatos progresszió során, különös tekintettel az agyi áttét és a csontáttét megjelenésekor megfigyelt paraméterekre. Megállapítottuk, hogy a daganatos progresszió során a thrombocyta szám és a neutrophil leukocyta szám nem mutat szignifikáns változást. Ezzel szemben folyamatosan és szignifikánsan csökken a perifériás lymphocyta szám, amely megfigyelés az immunterápiák minél korábbi stádiumban történő alkalmazását támogatja.

Eredményeink arra utalnak, hogy egyes laboratóriumi és histopathológiai paramétereknek jelentősége lehet az immunterápia időbeliségének meghatározásában.

Summary

We have observed spectacular advances in the diagnosis of lung cancer in recent decades, yet more than half of the tumors are discovered at an advanced stage. In such patients the main pillars of systemic oncotherapy are chemotherapy, molecular targeted therapy, and immunotherapy. The introduction of immunotherapy in the treatment of lung cancer has surpassed survival results as compared with previous conventional therapies. Despite the predictive value of certain biomarkers in immunotherapy, only the PD-L1 expression of the tumor tissue is used in current clinical practice.

In the present dissertation the results of two research projects are presented with the main aim to study circulating and tissue biomarkers in lung cancer.

In the first study, we examined the effect of platinum-based cytotoxic chemotherapy on the expression of PD-L1 and PD-1, as well as on the stromal immune cell density in tumor tissue. An important message of the study was the stability of the number of stromal immune cells and the unchanged expression of PD-1 in immune cells. In addition, we found that nearly a quarter of lung adenocarcinomas have decreased expression of PD-L1 in tumor cells, which may have therapeutic consequences. The significant decrease in PD-L1 expression observed on the surface of tumor cells was observed only in the gemcitabine-cisplatin chemotherapy group, however, this observation confirms that the sequence and composition of oncology treatments play a role in altering PD-L1 expression in tumor cells.

In the other study, we analyzed changes in peripheral blood parameters during cancer progression in major histological subtypes of lung cancer, particularly those observed at the onset of cerebral metastasis and bone metastasis. We found that there was no significant change in platelet count and neutrophil leukocyte count during tumor progression. In contrast, peripheral lymphocyte counts are steadily and significantly declining, an observation that supports the use of immunotherapies at the earliest possible stage.

Our results suggest that certain laboratory and histopathological parameters may be important in determining the timing of immunotherapy.

Köszönetnyilvánítás

PhD munkám során több intézet munkájában és számos projektben aktívan vehettem részt. Szeretnék köszönetet mondani mindezért témavezetőmnek és mentoromnak, Prof. Dr. Moldvay Juditnak, aki az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben segítette munkámat. Köszönöm az Intézet korábbi vezetőjének, Dr. Kovács Gábornak, jelenlegi főigazgatójának Dr. Bogos Krisztinának és a Bronchologiai Osztály vezetőjének, Dr. Markóczy Zsoltnak a támogatását.

Köszönettel tartozom, hogy a Nemzeti Agykutatási Program munkájában részt vehettem, és így együtt dolgozhattam Dr. Szállási Zoltánnal, Dr. Reiniger Lillával, Dr. Téglási Vandával, Prof. Dr. Tímár Józseffel, Dr. Bagó Attilával és Dr. Pipek Orsolyával.

A tumormintákért, a szövettani blokkokért, továbbá az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott segítségért köszönettel tartozom az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet Mellkassebészeti Osztályán Prof. Dr. Vadász Pálnak és Munkatársainak, a Patológiai Osztályon Dr. Fillinger Jánosnak és Munkatársainak, valamint az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetből Dr. Bagó Attilának, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből pedig Dr. Reiniger Lillának.

Köszönöm megtisztelő együttműködését és segítségét Dr. Döme Baláznak és Dr. Harkó Tündének.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm a férjem, Jáger Gyula és szüleim kitartó támogatását.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapját képező közlemények

1.

Rojkó L, Reiniger L, Téglási V, Fábán K, Pipek O, Vágvölgyi A, Agócs L, Fillinger J, Kajdácsi Z, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Moldvay J.

Chemotherapy treatment is associated with altered PD-L1 expression in lung cancer patients.

JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY. 2018 144:(7) pp. 1219-1226.

IF: 3,34

2.

Rojko L, Megyesfalvi Z, Czibula E, Reiniger L, Teglassi V, Szegedi Z, Szallasi Z, Dome B, Moldvay J.

Longitudinal analysis of complete blood count parameters in advanced-stage lung cancer patients.

THORACIC CANCER. 2020 Nov;11(11):3193-3204.

IF: 3,50

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

1.

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.

PD-L1 Expression of Lung Cancer Cells, Unlike Infiltrating Immune Cells, Is Stable and Unaffected by Therapy During Brain Metastasis.

CLIN LUNG CANCER. 2019 Sep;20(5):363-369.e2.

2.

Rojkó L.

Onkoterápiák szöveti biomarkerekre és laborparaméterekre gyakorolt hatása tüdőrákban
– Hazai vizsgálatok

MEDICINA THORACALIS 2019;72:2013-219.

3.

Reiniger L, Téglási V, Pipek O, **Rojkó L.** Glasz T, Vágvölgyi A, Kovalszky I, Gyulai M,
Lohinai Z, Rásó E, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Moldvay J.

Tumor necrosis correlates with PD-L1 and PD-1 expression in lung adenocarcinoma.

ACTA ONCOL. 2019 Aug;58(8):1087-1094.

4.

Fabian K, Puskas R, Kakuk T, Pres L, Fejes D, Szegedi Z, **Rojko L.** Szallasi Z, Dome B,
Pipek O, Moldvay J

Renal Impairment Hampers Bisphosphonate Treatment in a Quarter of Lung Cancer
Patients with Bone Metastasis

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY. 2018 Jan;122(1):126-
132.

5.

Kerpel-Frónius A, Monostori Zs, Solymosi D, Markóczy Zs, **Rojkó L.** Kovács G.

Kezdeti tapasztalok a Hunchest-alacsony dóziséű CT szűrési programmal

ORV HETIL. 2018 Oct;159(43):1741-46.

6.

Teglasi V, Reiniger L, Fabian K, Pipek O, Csala I, Bago AG, Varallyai P, Vizkeleti L, **Roiko L**, Timar J, Dome B, Szallasi Z, Swanton C, Moldvay J.

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 Aug 1;19(8):1058-1067.

7.

Kerpel-Frónius A, Monostori Zs, Kovács G, Ostoros Gy, Horváth I, Solymosi D, Pipek O, Szatmári F, Kovács A, Markóczy Zs, **Roikó L**, Rényi-Vámos F, Hoetzeneker K, Bogos K, Megyesfalvi Zs, Döme B.

Nationwide lung cancer screening with low-dose computed tomography: implementation and first results of the HUNCHEST screening program

EUR RADIOL. 2022 March 5;

Egyéb közlemények

1.

Sándor GO, Soós AÁ, Lőrincz P, **Roikó L**, Harkó T, Bogyó L, Tölgyes T, Bursics A, Buzás EI, Moldvay J, Wiener Z.

Wnt Activity and Cell Proliferation Are Coupled to Extracellular Vesicle Release in Multiple Organoid Models.

FRONT CELL DEV BIOL. 2021 Jun 24;9:670825.

2.

Rojkó Livia, Markóczy Zsolt

Adenoid cisztikus karcinóma – terápiás modalitások egy eset kapcsán

SpringMed Orvosi Esettanulmányok Onkopulmonológia (szerk. Szalai Zsuzsanna, Gálffy Gabriella) 71-75.

Springmed, 2017

3.

Rózsás A, Berta J, **Rojkó L**, Horváth LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, László V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Török S, Klepetko W, Rényi-Vámos F, Hegedűs B, Döme B, Tóvári J.

Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma.

PLOS ONE. 2013 Oct 14;8(10):e77459. doi: 10.1371/journal.pone.0077459. eCollection 2013.

4.

Agócs L, Lévy B, Kocsis Á, Szabó G, Gamal EM, **Rojkó L**, Sándor J, Wéber G.

The treatment of Aspergillus empyema using open thoraco-myoplasty with the preservation of lung function – case report.

MAGY SEB. 2013 Oct;66(5):274-6. doi: 10.1556/MaSeb.66.2013.5.8. Hungarian.

5.

Rojkó Livia

Endoszkópos tüdőterefogat csökkentés (könyv részlet)

Bronchológia, szerk: Dr. Strausz János, 118-123.o.

Medicina Kiadó, 2007

6.

Rojkó Livia

Pontiac-láz és légiósbetegség

MEDICAL TRIBUNE 2005.07.07. szám 13., 2005

7.

Rojkó Livia, Zsiray Miklós, Soltész Ibolya, Pitlik Ervin

Szokatlan megjelenésű sarcoidosisok és sarcoid-like reakciók

MEDICINA THORACALIS LVIII/4. szám 108-112., 2005

8.

Rojkó Livia

Legionellosis

LAM 2004; 14(1) szám 40-44., 2004

9.

Rojkó Livia

Legionellosis

HIPPOCRATES IV/1. szám 8-13., 2002

Irodalom

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021.
2. Bogos K KZ, Gálffy G, Tamási L, Ostoros Gy, Muller V, Urban L, Bittner N, Sérosi V, Vastag A, Polányi Z, Nagy-Erdei Zs, Vokó Z, Nagy B, Rokszin Gy, Abonyi-Tóth Zs, Moldvay J. A tüdőrák hazai epidemiológiai adatai új megközelítésben. *Magyar Onkológia*. 2020;64:175-181.
3. Bogos K OG. Tüdőrák. *Korányi Bulletin*. 2021;1.:30-39.
4. Steven A, Fisher SA, Robinson BW. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*. 2016;21(5):821-833.
5. Ostoros G. A tüdőrák immunterápiája. *Immun-onkológia*. 2016.;1.(1.):6-9.
6. Torok S, Hegedus B, Laszlo V, Hoda MA, Ghanim B, Berger W. Lung cancer in never smokers. *Future Oncol*. 2011;7(10):1195-1211.
7. Bakacs M BE, Bodrogi J, Demjén T, Joó T, Vámos M, Vokó Z, Vitrai J. A dohányzás társadalmi terhei Magyarországon. In: Intézet OE, editor. 2012.
8. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-128.
9. Norum J, Nieder C. Tobacco smoking and cessation and PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): a review of the literature. *ESMO Open*. 2018;3(6):e000406.
10. Bach PB. Reduced lung-cancer mortality with CT screening. *N Engl J Med*. 2011;365(21):2036; author reply 7-8.
11. Kerpel-Fronius A, Monostori, Zs., Solymosi, D., Markóczy, Zs., Rojkó, L., Kovács, G. Kezdeti tapasztalatok a HUNCHEST-alacsony dózisu CT-tüdőrákszűrési pilotprogrammal. *Orvosi Hetilap*. 2018.;159.(43.):1741-1746.
12. Kerpel-Fronius A, Monostori Z, Kovacs G, Ostoros G, Horvath I, Solymosi D. Nationwide lung cancer screening with low-dose computed tomography: implementation and first results of the HUNCHEST screening program. *Eur Radiol*. 2022.
13. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol*. 2017;7:193.

14. Chassagnon G, Bennani S, Revel MP. [New TNM classification of non-small cell lung cancer]. *Rev Pneumol Clin.* 2017;73(1):34-39.
15. Bogos K, Sárosi, V., Agócs, L., Balikó, Z., Csada, E., Gálffy, G., Horváth, Á., Moldvay, J., Pápai Székely, Zs., Szilasi, M., Szondy, K., Ostoros, Gy. Multidiszciplináris team szerepe a tüdőrák ellátásban. *Medicina Thoracalis.* 2018.;71.(5.):295-296.
16. Rényi-Vámos F. Országos mellkassebészeti adatok 2019.évről. *Korányi Bulletin.* 2020;1.(2020):47-49.
17. Cheufou D, Baldes N, Lechner S, Möller T, Steinert M, Bölükbas S. [Robot-Assisted Lung Surgery]. *Zentralbl Chir.* 2021;146(S 01):S26-s30.
18. Hu X, Wang M. Efficacy and Safety of Robot-assisted Thoracic Surgery (RATS) Compare with Video-assisted Thoracoscopic Surgery (VATS) for Lung Lobectomy in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2019;22(3):169-178.
19. Futácsi B, Bánsághi, Z. Tüdőtumorok mikrohullámú és rádiófrekvenciás ablációi. *Medicina Thoracalis.* 2020;73.:140-147.
20. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2017;377(20):1919-1929.
21. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021;19(3):254-266.
22. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237.
23. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-135.
24. Jánvári ZL, Bajcsay, A., Polgár, Cs. Sztereotaxiás sugárterápia-új lehetőség az I. stádiumú tüdőrák és a tüdőáttétek kezelésében. *Medicina Thoracalis.* 2018.;71.(4.):241-248.
25. Specht HM, Combs SE. Stereotactic radiosurgery of brain metastases. *J Neurosurg Sci.* 2016;60(3):357-366.

26. Hennequin C, Bleichner O, Trédaniel J, Maylin C. [Endobronchial brachytherapy: technique and indications]. *Cancer Radiother.* 2003;7(1):33-41.
27. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304(5676):1497-1500.
28. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2019;121(9):725-737.
29. Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol.* 2019;63(6):449-455.
30. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(2):113-125.
31. Wu YL, Lu S, Lu Y, Zhou J, Shi YK, Sriuranpong V. Results of PROFILE 1029, a Phase III Comparison of First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in East Asian Patients with ALK-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2018;13(10):1539-1548.
32. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, Wu YL, Paz-Ares L, Wolf J. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2017;389(10072):917-929.
33. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, Kim DW, Camidge DR, Solomon BJ. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol.* 2019;30(7):1121-1126.
34. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1307-1316.
35. Drysdale E, Peng Y, Nguyen P, Baetz T, Hanna TP. A population-based study of the treatment effect of first-line ipilimumab for metastatic or unresectable melanoma. *Melanoma Res.* 2019;29(6):635-642.

36. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2046-2054.
37. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639.
38. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540-1550.
39. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10066):255-265.
40. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-1833.
41. Bowden J, Fenning S, Marron B, Macpherson C, Boyce S, Wardrope V. Best supportive care in advanced lung cancer-more than a label? *Bmj*. 2018;363:k5017.
42. Wood H, Dickman A, Star A, Boland JW. Updates in palliative care - overview and recent advancements in the pharmacological management of cancer pain. *Clin Med (Lond)*. 2018;18(1):17-22.
43. Anekar AA, Cascella M. WHO Analgesic Ladder. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
44. Wooldridge JE, Anderson CM, Perry MC. Corticosteroids in advanced cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2001;15(2):225-234; discussion 34-36.
45. Téglási V, Reiniger L, Fábíán K, Pipek O, Csala I, Bagó AG. 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 Oncol*. 2017;19(8):1058-1067.

46. Vanda Téglási OP, Rita Lózsa, Kinga Berta, Dávid Szüts, Tünde Harkó, Pál Vadász, Livia Rojkó, Balázs Döme, Attila G. Bagó, József Tímár, Judit Moldvay, Zoltán Szállási, Lilla Reininger. 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(5):363-369.
47. Moldvay J. Tumormarkerek és prognosztikai faktorok primer tüdőrákban *Magyar Onkológia*. 2000.;44.(3.):195-202.
48. Moldvay J, Scheid P, Wild P, Nabil K, Siat J, Borrelly J. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6(3):1125-1134.
49. Song KS, Nimse SB, Warkad SD, Oh AC, Kim T, Hong YJ. Quantification of CYFRA 21-1 and a CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex for detection of early stage lung cancer. *Chem Commun (Camb)*. 2019;55(68):10060-10063.
50. Wang L, Cao L, Jiang R, Huang D. Prognostic Significance of Combined Biomarkers in Small Cell Lung Cancer. *Clin Lab*. 2020;66(9).
51. Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Adv Clin Chem*. 2006;42:1-41.
52. Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer*. 2012;76(2):138-143.
53. Campling BG, el-Deiry WS. Clinical implications of p53 mutations in lung cancer. *Methods Mol Med*. 2003;75:53-77.
54. Seijo LM, Peled N, Ajona D, Boeri M, Field JK, Sozzi G. Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements, Promises, and Challenges. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):343-357.
55. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*. 2019;13(1):34.
56. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223-238.
57. Tangvarasittichai O, Jaiwang W, Tangvarasittichai S. The plasma DNA concentration as a potential breast cancer screening marker. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):55-58.

58. Donaldson J, Park BH. Circulating Tumor DNA: Measurement and Clinical Utility. *Annu Rev Med.* 2018;69:223-234.
59. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut.* 2014;63(2):317-325.
60. Mohan A, Mittal S. Liquid biopsy for T790M mutation detection: A ray of hope? *Lung India.* 2020;37(1):1-2.
61. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature.* 2017;545(7655):446-451.
62. Duffy MJ, O'Byrne K. Tissue and Blood Biomarkers in Lung Cancer: A Review. *Adv Clin Chem.* 2018;86:1-21.
63. Moldvay J PJ, Puskás R, Furák J, Losonczy Gy, Matolcsy A. ERCC1-expresszió vizsgálata platinabázisú kezelésben részesülő tüdőrákos betegekben. *Magyar Onkológia.* 2011;55:105-109.
64. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1566-1572.
65. G.J.Weiss JM, B. Döme, K. Fábíán, E. Podmaniczky, J.Pápay, M. Gyulai, J. Furák, I. Szirtes, J.Ai, R. McCabe, B.Hegedűs. Ki67 proliferation index score paradoxical increase after neoadjuvant therapy in resected NSCLC. 3rd AACR-IASLC Joint Conference on Molecular Origins of Lung Cancer 2014-01-06 San Diego 2014.
66. Podmaniczky E, Fábíán K, Pápay J, Puskás R, Gyulai M, Furák J. Decreased ERCC1 Expression After Platinum-Based Neoadjuvant Chemotherapy in non-Small Cell Lung Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(2):423-431.
67. Rygaard K, Slebos RJ, Spang-Thomsen M. Radiosensitivity of small-cell lung cancer xenografts compared with activity of c-myc, N-myc, L-myc, c-raf-1 and K-ras proto-oncogenes. *Int J Cancer.* 1991;49(2):279-284.
68. Porebska I, Wyrodek E, Kosacka M, Adamiak J, Jankowska R, Harłodzińska-Szmyrka A. Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer. *In Vivo.* 2006;20(5):599-604.
69. Wadowska K, Bil-Lula I, Trembecki Ł, Śliwińska-Mossoń M. Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13).

70. Krzystanek M, Moldvay J, Szüts D, Szallasi Z, Eklund AC. A robust prognostic gene expression signature for early stage lung adenocarcinoma. *Biomark Res.* 2016;4:4.
71. Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer.* 2008;123(1):1-7.
72. Girard L, Zöchbauer-Müller S, Virmani AK, Gazdar AF, Minna JD. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res.* 2000;60(17):4894-4906.
73. Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Horio Y, Takahashi T. ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Res.* 2005;65(23):10680-10685.
74. Papay J, Krenacs T, Moldvay J, Stelkovic E, Furak J, Molnar B. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15(1):19-30.
75. 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. *Clin Cancer Res.* 2005;11(11):3974-3986.
76. Zhou X, Cai L, Liu J, Hua X, Zhang Y, Zhao H. Analyzing EGFR mutations and their association with clinicopathological characteristics and prognosis of patients with lung adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2018;16(1):362-370.
77. Doebele RC, Lu X, Sumey C, Maxson DA, Weickhardt AJ, Oton AB. Oncogene status predicts patterns of metastatic spread in treatment-naive nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2012;118(18):4502-4511.
78. Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H. Apelin Expression in Human Non-small Cell Lung Cancer: Role in Angiogenesis and Prognosis. *Journal of Thoracic Oncology.* 2010;5(8):1120-1129.
79. Berta J, Hoda MA, Laszlo V, Rozsas A, Garay T, Torok S. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget.* 2014;5(12):4426-4437.
80. Berghoff AS, Ilhan-Mutlu A, Wöhrer A, Hackl M, Widhalm G, Hainfellner JA. Prognostic significance of Ki67 proliferation index, HIF1 alpha index and microvascular density in patients with non-small cell lung cancer brain metastases. *Strahlenther Onkol.* 2014;190(7):676-685.

81. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res*. 2015;5(9):2892-2911.
82. Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, Barbai T. Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2015;10(5):738-746.
83. Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, Ostoros G, Raso E, Timar J. 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(1):39721.
84. Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J. Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: A retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *European Journal of Cancer*. 2014;50(10):1819-1828.
85. Burel-Vandenbos F, Ambrosetti D, Coutts M, Pedeutour F. EGFR mutation status in brain metastases of non-small cell lung carcinoma. *J Neurooncol*. 2013;111(1):1-10.
86. Eichler AF, Kahle KT, Wang DL, Joshi VA, Willers H, Engelman JA. EGFR mutation status and survival after diagnosis of brain metastasis in nonsmall cell lung cancer. *Neuro-Oncology*. 2010;12(11):1193-1199.
87. Heon S, Yeap BY, Britt GJ, Costa DB, Rabin MS, Jackman DM. Development of central nervous system metastases in patients with advanced non-small cell lung cancer and somatic EGFR mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5873-5882.
88. Guérin A, Sasane M, Zhang J, Culver KW, Dea K, Nitulescu R. Brain metastases in patients with ALK+ non-small cell lung cancer: clinical symptoms, treatment patterns and economic burden. *J Med Econ*. 2015;18(4):312-322.
89. Toyokawa G, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y. Insights into brain metastasis in patients with ALK+ lung cancer: is the brain truly a sanctuary? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2015;34(4):797-805.
90. Johung KL, Yeh N, Desai NB, Williams TM, Lautenschlaeger T, Arvold ND. Extended Survival and Prognostic Factors for Patients With ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Brain Metastasis. *J Clin Oncol*. 2016;34(2):123-129.

91. Tímár J, Ladányi A. A daganatok immunterápiájának prediktív markerei, a PD-L1-meghatározás gyakorlati kérdései. *Magyar Onkológia*. 2017;61:158-166.
92. So Yeon Oh SK, Bhumsuk Keam, Tae Min Kim, Dong-Wan Kim, Dae Seong Heo. Soluble PD-L1: a predictive and prognostic biomarker in patients with advanced cancer who received immune checkpoint blockade treatment. 2021;
93. McNamara MG, Jacobs T, Lamarca A, Hubner RA, Valle JW, Amir E. Impact of high tumor mutational burden in solid tumors and challenges for biomarker application. *Cancer Treat Rev*. 2020;89:102084.
94. Fumet JD, Truntzer C, Yarchoan M, Ghiringhelli F. Tumour mutational burden as a biomarker for immunotherapy: Current data and emerging concepts. *Eur J Cancer*. 2020;131:40-50.
95. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Annals of Oncology*. 2019;30(1):44-56.
96. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*. 2019;51(2):202-206.
97. Chae YK, Davis AA, Agte S, Pan A, Simon NI, Iams WT. Clinical Implications of Circulating Tumor DNA Tumor Mutational Burden (ctDNA TMB) in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. 2019;24(6):820-828.
98. Parikh K, Kumar A, Ahmed J, Anwar A, Puccio C, Chun H. Peripheral monocytes and neutrophils predict response to immune checkpoint inhibitors in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(9):1365-1370.
99. Remark R, Lupo A, Alifano M, Biton J, Ouakrim H, Stefani A. Immune contexture and histological response after neoadjuvant chemotherapy predict clinical outcome of lung cancer patients. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1255394.
100. Song Z, Yu X, Zhang Y. Altered expression of programmed death-ligand 1 after neo-adjuvant chemotherapy in patients with lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer*. 2016;99:166-171.

101. Feng F, Zheng G, Wang Q, Liu S, Liu Z, Xu G. Low lymphocyte count and high monocyte count predicts poor prognosis of gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 2018;18(1):148.
102. Fournel L, Wu Z, Stadler N, Damotte D, Lococo F, Boulle G. Cisplatin increases PD-L1 expression and optimizes immune check-point blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2019;464:5-14.
103. Cohen JV, Kluger HM. Systemic Immunotherapy for the Treatment of Brain Metastases. *Frontiers in Oncology.* 2016;6(49).
104. Klikovits T, Lohinai Z, Fábíán K, Gyulai M, Szilasi M, Varga J. New insights into the impact of primary lung adenocarcinoma location on metastatic sites and sequence: A multicenter cohort study. *Lung Cancer.* 2018;126:139-148.
105. Rojkó L, Reiniger L, Téglási V, Fábíán K, Pipek O, Vágvölgyi A, Agócs L, Fillinger J, Kajdácsi, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Moldvay J. Chemotherapy treatment is associated with altered PD-L1 expression in lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018;144(7):1219-1226.
106. Rojko L, Megyesfalvi Z, Czibula E, Reiniger L, Teglas V, Szegedi Z, Szállási Z, Döme B, Moldvay J. Longitudinal analysis of complete blood count parameters in advanced-stage lung cancer patients. *Thorac Cancer.* 2020;11(11):3193-204.
107. Sheng J, Fang W, Yu J, Chen N, Zhan J, Ma Y. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2016;6:20090.
108. Zhang P, Ma Y, Lv C, Huang M, Li M, Dong B. Upregulation of programmed cell death ligand 1 promotes resistance response in non-small-cell lung cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer Sci.* 2016;107(11):1563-1571.
109. Meert AP, Martin B, Verdebout JM, Paesmans M, Berghmans T, Ninane V. 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.* 2004;44(3):295-301.
110. Munari E, Zamboni G, Marconi M, Sommaggio M, Brunelli M, Martignoni G. PD-L1 expression heterogeneity in non-small cell lung cancer: evaluation of small biopsies reliability. *Oncotarget.* 2017;8(52):90123-90131.

111. Spira AI, Park K, Mazières J, Vansteenkiste JF, Rittmeyer A, Ballinger M. Efficacy, safety and predictive biomarker results from a randomized phase II study comparing MPDL3280A vs docetaxel in 2L/3L NSCLC (POPLAR). *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(15_suppl):8010-.
112. Li Q, Yuan D, Ma C, Liu Y, Ma L, Lv T. A new hope: the immunotherapy in small cell lung cancer. *Neoplasma*. 2016;63(3):342-350.
113. Peng J, Hamanishi J, Matsumura N, Abiko K, Murat K, Baba T. Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor- κ B to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2015;75(23):5034-5045.
114. Doi T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Mizushima K, Yasuda T. The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2017;37(3):1545-1554.
115. Tamiya M, Tamiya A, Inoue T, Kimura M, Kunimasa K, Nakahama K. Metastatic site as a predictor of nivolumab efficacy in patients with advanced non-small cell lung cancer: A retrospective multicenter trial. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192227.
116. Kanikarla-Marie P, Lam M, Sorokin AV, Overman MJ, Kopetz S, Menter DG. Platelet Metabolism and Other Targeted Drugs; Potential Impact on Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*. 2018;8(107).
117. Qin H, Wang F, Liu H, Zeng Z, Wang S, Pan X. New advances in immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res*. 2018;10(8):2234-2245.
118. Farach-Carson MC, Lin SH, Nalty T, Satcher RL. Sex Differences and Bone Metastases of Breast, Lung, and Prostate Cancers: Do Bone Homing Cancers Favor Feminized Bone Marrow? *Front Oncol*. 2017;7:163.
119. Saha A, Ghosh SK, Roy C, Choudhury KB, Chakrabarty B, Sarkar R. Demographic and clinical profile of patients with brain metastases: A retrospective study. *Asian J Neurosurg*. 2013;8(3):157-161.
120. Cho YJ, Cho YM, Kim SH, Shin KH, Jung ST, Kim HS. Clinical analysis of patients with skeletal metastasis of lung cancer. *BMC Cancer*. 2019;19(1):303.
121. Zhou Y, Yu QF, Peng AF, Tong WL, Liu JM, Liu ZL. The risk factors of bone metastases in patients with lung cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):8970.

122. An N, Jing W, Wang H, Li J, Liu Y, Yu J. Risk factors for brain metastases in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Med.* 2018;7(12):6357-6364.
123. Aebi M. Spinal metastasis in the elderly. *Eur Spine J.* 2003;12 Suppl 2(Suppl 2):S202-213.
124. Kimura T. Multidisciplinary Approach for Bone Metastasis: A Review. *Cancers (Basel).* 2018;10(6).
125. Wu YP, Chen WS, Xu SJ, Zhang N. Osteoporosis as a potential contributor to the bone metastases. *Med Hypotheses.* 2010;75(6):514-516.
126. Cho Y, Park S, Byun HK, Lee CG, Cho J, Hong MH. Impact of Treatment-Related Lymphopenia on Immunotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019;105(5):1065-1073.
127. Quigley DA, Kristensen V. Predicting prognosis and therapeutic response from interactions between lymphocytes and tumor cells. *Mol Oncol.* 2015;9(10):2054-2062.
128. Leblanc R, Peyruchaud O. The role of platelets and megakaryocytes in bone metastasis. *J Bone Oncol.* 2016;5(3):109-111.
129. Zhang W, Yu C, Huang B, Zhou FL, Huang HD, Li Q. Correlation between bone metastasis and thrombocytosis in pulmonary adenocarcinoma patients. *Oncol Lett.* 2015;9(2):762-768.
130. Lal I, Dittus K, Holmes CE. Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2013;15(4):207.
131. Chen S, Na N, Jian Z. Pretreatment platelet count as a prognostic factor in patients with pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2018;11:59-65.
132. Wang C, Chen YG, Gao JL, Lyu GY, Su J, Zhang QI. Low local blood perfusion, high white blood cell and high platelet count are associated with primary tumor growth and lung metastasis in a 4T1 mouse breast cancer metastasis model. *Oncol Lett.* 2015;10(2):754-760.
133. Ji Y, Sheng L, Du X, Qiu G, Su D. Elevated platelet count is a strong predictor of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer patients. *Platelets.* 2015;26(2):138-142.

134. Spencer KR, Wang J, Silk AW, Ganesan S, Kaufman HL, Mehnert JM. Biomarkers for Immunotherapy: Current Developments and Challenges. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:e493-503.
135. Gridelli C, Ascierto PA, Grossi F, Baldini E, Favaretto A, Garassino MC. Second-line Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Non-oncogene Addicted: New Treatment Algorithm in the Era of Novel Immunotherapy. *Curr Clin Pharmacol*. 2018;13(2):76-84.