

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2754.**

**PÁSZTOR-CSIZMARIK ANITA**

**Urológia**  
című program

Programvezető: Dr. Nyirády Péter, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szarvas Tibor, tudományos főmunkatárs

# Az enzalutamid rezisztencia prediktív markereinek azonosítása prosztatatarákban

Doktori értekezés

**Pásztor-Csizmarik Anita**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. habil. Szarvas Tibor, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Beöthe Tamás, Ph.D., főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság

Elnök: Dr. Ács Nándor, Ph.D., egyetemi tanár

Tagjai: Dr. Papp Gergő, Ph.D., tudományos munkatárs  
Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Budapest  
2022

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	5
1. Bevezetés .....	9
1.1. A prosztatatarák epidemiológiája, etiológiája .....	9
1.2. A prosztatatarák molekuláris altípusai és leggyakrabban sérült jelátviteli útvonalai	10
1.3. A prosztatatarák klinikai tünetei, diagnosztikája, patológiája.....	14
1.4. A prosztatatarák kezelésének alapelvei .....	17
1.4.1. Szervre lokalizált prosztatatarák kezelése.....	17
1.4.2. Előrehaladott prosztatatarák kezelése .....	18
1.4.2.1 Hormon-érzékeny prosztatatarák kezelése.....	18
1.4.2.2 Kasztráció-rezisztens prosztatatarák kezelése .....	19
1.5. A metasztatikus, kasztráció-rezisztens prosztatatarák rezisztencia mechanizmusai	21
1.6. A neuroendokrin transz-differenciáció prostatadaganatokban .....	25
2. Célkitűzés .....	27
3. Módszerek .....	28
3.1. Enzalutamid-szenzitív és rezisztens prosztatatarákos sejtvonalpárok tenyésztése	28
3.2. Sejtvonalpárok komparatív proteomikai analízise tömegspektroszkópiás módszerrel .....	28
3.2.1. Minta előkészítés.....	29
3.2.2. LC-MS/MS mérési paraméterek .....	29
3.3. Proteomikai adatok feldolgozása.....	30
3.3.1. Kandidáns fehérjék kiválasztásának módszerei .....	30
3.3.1.1. Fehérjék rangsorolása.....	30
3.3.1.2. Szekretálódó fehérjék kiválasztása .....	31
3.3.1.3. Összehasonlító analízis .....	31
3.3.2. Gén ontológiai (GO) és KEGG útvonal analízis.....	31

3.4. A kiválasztott fehérjék szérumszintjének meghatározása .....	32
3.4.1. Szérum minták gyűjtése .....	32
3.4.2 Betegcsoportok.....	33
3.4.3. ALCAM, IDH1, AGR2 és NDRG1 szérumszintjének meghatározása.....	33
3.4.4. CGA, PSA és NSE szérumszintjének meghatározása .....	34
3.5. Az ALCAM génexpresszió <i>in silico</i> vizsgálata.....	34
3.6. Sejtmodelles, funkcionális vizsgálatok.....	34
3.6.1. RNS izolálás.....	34
3.6.2. Fehérje izolálás.....	35
3.6.3. Valós idejű kvantitatív PCR.....	35
3.6.4. Western blot .....	36
3.6.5. Sejtéletképességi vizsgálatok .....	37
3.6.6. Géncsendesítés siRNS transzfekcióval .....	38
3.7 Statisztikai kiértékelés.....	38
4. Eredmények .....	40
4.1 Az ENZA rezisztenciával összefüggést mutató fehérjék azonosításával foglalkozó kutatásunk eredményei .....	40
4.1.1 A proteomikai vizsgálatok eredményei.....	40
4.1.2 A proteomikai eredmények bioinformatikai kiértékelése .....	41
4.1.2.1 A fehérjék rangsorolása alapján történő kiválasztás eredményei .....	41
4.1.2.2 Szekretált fehérjék kiválasztásának eredményei.....	42
4.1.2.3 Összehasonlító analízis alapján történő kiválasztás eredményei .....	42
4.1.3 GO elemzés és KEGG útvonal analízis eredményei.....	42
4.1.3 ELISA vizsgálatok eredményei.....	45
4.1.3.1 Betegkohort alapadatok.....	45
4.1.3.2 A vizsgált fehérjék összefüggése a klinikopatológiai paraméterekkel .....	45

4.1.3.3 A vizsgált paraméterek összefüggései a betegek teljes túlélésével.....	49
4.1.4 Az ALCAM expressziójának <i>in silico</i> vizsgálata .....	53
4.1.5. Sejtmodelles, funkcionális vizsgálatok eredményei .....	55
4.1.5.1 Az ALCAM gén- és fehérjeexpressziója a sejtvonalakban.....	55
4.1.5.2 Enzalutamid dózis-hatás görbe .....	56
4.1.5.3 Géncsendesítés ellenőrzése .....	56
4.1.5.4 Sejtviabilitás-változás mérése géncsendesítés hatására .....	57
4.2A CGA, NSE és a PSA szérumszintjének meghatározása lokális sebészi (RPE) és szisztémás (ENZA/ABI, DOC) kezelésen átesett PC betegek mintáiban .....	58
4.2.1. Betegkarakterisztika.....	58
4.2.2A CGA, NSE és a PSA kezelés előtti szérumszintjeinek összehasonlítása a különböző kezelési csoportok között.....	59
4.2.3. A CGA, NSE és a PSA kezelés előtti szérumszintjeinek összefüggései a klinikopatológiai paraméterekkel .....	60
4.2.4. A vizsgált paraméterek összefüggései a teljes túléléssel .....	65
4.2.5. A vizsgált paraméterek kezelés alatti változásainak prognosztikus értéke	69
5. Megbeszélés .....	72
6. Következtetések.....	83
7. Összefoglalás.....	84
8. Summary.....	85
9. Irodalomjegyzék.....	86
10. Saját publikációk jegyzéke .....	100
11. Köszönetnyilvánítás .....	104

**Rövidítések jegyzéke**

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i>
ABI	Abirateron
ADT	Androgén deprivációs terápia
AGR2	<i>Anterior Gradient 2</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ALCAM	<i>Activated leukocyte adhesion molecule</i>
APA	Apalutamid
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AR	Androgén receptor
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
BRCA	<i>Breast cancer antigen</i>
BSA	Borjú szérum albumin (Bovine serum albumin)
CDK4/6	<i>Cyclin dependent kinase 4/6</i>
CDK12	<i>Cyclin dependent kinase 12</i>
cDNS	Komplementer dezoxiribonukleinsav
CGA	Chromogranin A
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CI	Konfidencia intervallum
CRPC	Kasztráció-rezisztens prosztatarák
CT	Computer tomográfia
Ct	Küszöb ciklus ( <i>threshold cycle</i> )
CTC	Keringő tumorsejt ( <i>circulating tumor cell</i> )
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1</i>
CYP17A1	<i>Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1</i>
ddPCR	digitális droplet PCR
DHT	5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron

DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DOC	Docetaxel
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ELISA	Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ENZA	Enzalutamid
ERG	<i>ETS transcription factor ERG</i>
ETS	<i>Erythroblast transformation-specific</i>
FBS	Fötális borjú savó ( <i>fetal bovine serum</i> )
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FOXA1	<i>Forkhead box A1</i>
FOXY-5	<i>5-Methoxy-N,N-diisopropyltryptamine</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GO	Gén Ontológia ( <i>Gene Ontology</i> )
GR	Glükokortikoid receptor
GWAS	Genomszintű asszociációs elemzés
HOXB13	<i>Homeobox B13</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HR	Kockázati arány ( <i>hazard ratio</i> )
HSPC	Hormon-érzékeny prosztaták
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>
IL	Interleukin
ISUP	Nemzetközi Urológiai Patológiai Társaság ( <i>International Society of Urological Pathology</i> )
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC-MS/MS	Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria ( <i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i> )
LHRH	Luteinizáló hormon-felszabadító hormon ( <i>Luteinizing hormone-releasing hormone</i> )
MDR	<i>Multidrug resistance</i>

MIC-1	<i>Macrophage inhibitory cytokine 1</i>
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MMP	Mátrix metalloproteináz
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MRI	Mágneses rezonancia képalkotás ( <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MSI	Mikroszatellita instabilitás
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>
NCOR1,2	<i>Nuclear receptor corepressor 1,2</i>
NED	Neuroendokrin differenciáció
NFDM	Zsírmentes száraz tej ( <i>Non-fat dried milk</i> )
NSE	Neuron-specifikus enoláz
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	Foszfát puffer ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PC	Prosztatarák ( <i>prostate cancer</i> )
PCR	Polimeráz láncreakció
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i>
PI3KCA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PI3KCB	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Beta</i>
PSA	prosztata specifikus antigén
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RB1	Retinoblasztóma 1
RDV	Rektális digitális vizsgálat
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumours</i>
RNS	Ribonukleinsav
RPE	Radikális prosztatektómia ( <i>radical prostatectomy</i> )
SDC1	<i>Syndecan-1</i>
siRNS	kis interferáló ribonukleinsav ( <i>small interfering ribonucleic acid</i> )
SNP	Egy pontos nukleotid polimorfizmus



SPOP	<i>Speckle type BTB/POZ protein</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline + Tween 20</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane serine protease 2</i>
TNM	Tumor Nyirokcsomó Metasztázis ( <i>Tumor Node Metastasis</i> )
TP53	<i>Tumor Protein 53</i>
UICC	Union for International Cancer Control's
YKL-40	<i>Chitinase-3-like protein 1</i>
WHO	Egészségügyi Világszervezet ( <i>World Health Organisation</i> )

## 1. Bevezetés

### 1.1. A prosztatatarák epidemiológiája, etiológiája

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2020-as adatai alapján a prosztatatarák (PC) a tüdődaganatot követően a második leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés a férfiak körében. A világon évente mintegy 1.400.000 új, PC-os eset fedeznek fel és körülbelül 375.000 férfi halálát okozza ez a daganat (1). Magyarországon évente körülbelül 4.500 újonnan felfedezett beteg mellett, hozzávetőlegesen 1.200 férfi halálát okozza a PC (2).

A PC egy igen heterogén betegség, incidenciája eltérő a világ egyes régióiban. A PC-ot leggyakrabban Nyugat- és Észak-Európában, a Karib-térségben, Ausztráliában, Új-Zélandon, Észak-Amerikában és Dél-Afrikában diagnosztizálják, míg legritkábban Ázsiában és Észak-Afrikában (1). A PC-hoz köthető mortalitás ettől eltérő képet mutat, a legtöbb PC okozta halálozás Közép-Afrikában és a Karib-térségben fordul elő (1).

A PC kialakulásáért felelőssé tehető pontos okok jelenleg nem tisztázottak. Mivel a PC egy multifaktoriális betegség, ezért az öröklött genetikai elváltozások mellett számos környezeti tényező is közre játszhat a tumor kialakulásában. Rizikófaktorai közé tartozik az életkor, az etnikum, pozitív családi halmozódás, genetikai faktorok, metabolikus szindróma, az elhízás, a dohányzás és az alkohol fogyasztás (3).

Az egyik legjelentősebb hajlamosító tényező a daganat kialakulása szempontjából az életkor. A PC az idősebb férfiak tumoros megbetegedése, előfordulása 40 év alatt igen ritka, 65 év felett pedig a leggyakoribb (4). Az életkor mellett a különböző etnikai csoportokba való tartozás is befolyásolja a betegség incidenciáját. PC leggyakoribb előfordulással, legnagyobb mortalitási aránnyal és legagresszívabb formában az afroamerikai férfiak körében fordul elő, amely mögött a betegség genetikai háttere állhat (5).

A PC esetében is megfigyelhető az örökletes forma így a daganat családi halmozódása; a betegek ~5 – 10%-ában feltételezhetően öröklött genetikai faktorok vagy prosztatatarákra hajlamosító gének hibája miatt alakul ki a daganat. A családi halmozódás esetén az édesapa és fiútestvér érintettsége esetén a PC kialakulásának kockázata 5,5-szörös (6). A daganat kialakulásának rizikóját tovább fokozza, ha több családtagnál is előfordult tumoros megbetegedés (7). Az örökletes formáért leginkább a DNS-

hibajavításban részt vevő gének, így a *BRCA2* és az *ATM* csírvonalbeli mutációi tehetők felelőssé (8, 9). Továbbá az elmúlt években végzett genomszintű asszociációs elemzések (GWAS) segítségével sikerült több, mint 180 olyan egyedi nukleotid polimorfizmust (SNP) azonosítani, amelyek a betegség kialakulása szempontjából rizikó gének számítanak. Közülük a *HOXB13* gén egy nukleotidot érintő polimorfizmusa (G84E) fordult elő leggyakrabban a betegeknél (10).

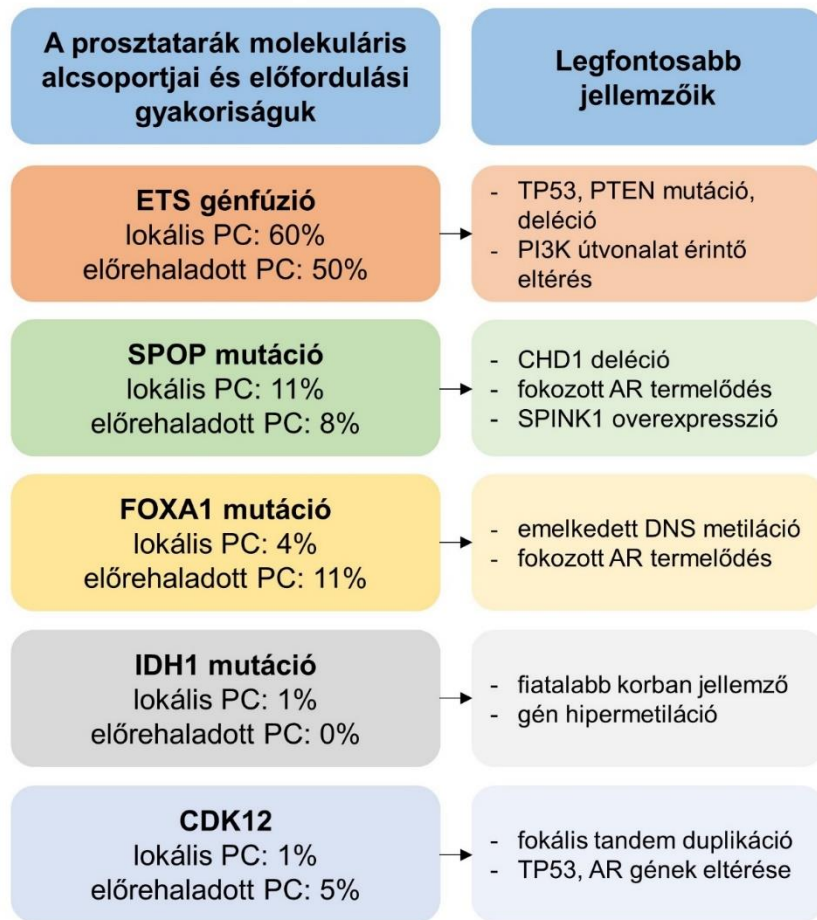
A PC kialakulását nagymértékben befolyásolhatják különböző életmódbeli tényezők hatásai. Az egészségtelen életmód, a táplálkozás, az alkohol és a dohányzás, valamint a mozgásszegény életmód is hozzájárulhat a PC kialakulásához (5). Táplálkozás szempontjából a túlzott vörös hús, telített zsírsavak, valamint a feldolgozott élelmiszerek fogyasztása számít rizikófaktornak. Ugyanakkor jelenleg nem ismert olyan diéta vagy étrend, amely hatékonyan alkalmazható lehetne a megelőzésben (3, 5). Számos egyéb daganattípusnál, így a PC esetében is kimutatták, hogy az elhízás és az ezzel járó megemelkedett testtömeg index összefüggésben lehet a tumor kialakulásával. Egy metaanalízis eredménye alapján már 5 kg/m<sup>2</sup> testtömeg index emelkedés 21%-kal megnöveli a biokémiai kiújulás esélyét (11). A PC kialakulásában szerepet játszhat a metabolikus szindróma is, amely összefüggést mutat a daganat agresszivitásával is (12). A túlzott alkoholfogyasztás és a dohányzás is nagymértékben hozzájárul a PC kialakulásához. Egy 2010-es tanulmány alapján szignifikáns kapcsolat van az elszívott cigaretták száma és a PC kialakulása között. Továbbá, az erős dohányos férfiak ~ 30%-kal nagyobb eséllyel haláloznak el PC-ban, mint a nem dohányzó férfiak (13). Azonban fontos megemlíteni a sportolás jótékony hatását is. A PC esetében kimutatták, hogy a rendszeresen sportoló betegeknek jobb gyógyulási és túlélési esélyeik vannak (14).

## **1.2. A prosztaták molekuláris altípusai és leggyakrabban sérült jelátviteli útvonalai**

A PC mind klinikai, mind biológiai viselkedését tekintve egy igen heterogén betegség, melynek hátterében nagy valószínűséggel a prosztatadaganatok eltérő molekuláris háttere állhat. Az elmúlt években a molekuláris biológiai módszerek robbanásszerű fejlődésének köszönhetően lehetővé vált a daganatok teljes genetikai, epigenetikai, proteomikai, valamint transzkriptomikai hátterének felfedezése. Nemrégiben a lokális és metasztatikus prosztaták esetében is végeztek ilyen átfogó

kutatásokat, melyekkel azonosították azokat a genetikai eltéréseket, amelyek alapján a PC egymástól jól elkülöníthető molekuláris alcsoportokba sorolható. Továbbá ezekkel a vizsgálatokkal azonosították azokat a legfontosabb jelátviteli utakat, melyek szerepet játszhatnak a tumorok kialakulásában és progressziójában (15-17).

A PC molekuláris alcsoportokba való beosztása a több mint 300 lokális és 150 metasztatikus prosztatatarák mintát vizsgáló TCGA (The Cancer Genome Atlas) tanulmány alapján történt. A beosztás alapján a legnagyobb alcsoportot az ETS transzkripciós faktorokat érintő mutációkkal rendelkező tumorok alkotják, melyek az esetek körülbelül 50% -át teszik ki. Az ETS transzkripciós faktor családon belül a leggyakrabban érintett gén az *ERG*, ami a *TMPRSS2* génnel alkothat fúziós mutánst, melynek hatására az ERG androgén szabályozás alá kerülve képes az általa szabályozott gének fokozott expressziójával serkenteni a tumor növekedését. Azonban a bőséges információ ellenére az *ERG* mutációt hordozó tumorok prognosztikai jelentősége máig vitatott és további aktív kutatás tárgyát képezi (17, 18). A további eseteket négy alcsoportba sorolhatjuk be, melyek a *SPOP*, a *FOXA1*, az *IDH1* és a *CDK12* gének eltérései alapján különíthetők el (15-17). A PC molekuláris alcsoportbeosztását és előfordulási gyakoriságát, valamint az alcsoportok legfontosabb jellemzőit az 1.ábra foglalja össze.



**1. ábra** – A PC molekuláris alcsoportjai és előfordulási gyakoriságuk (17).

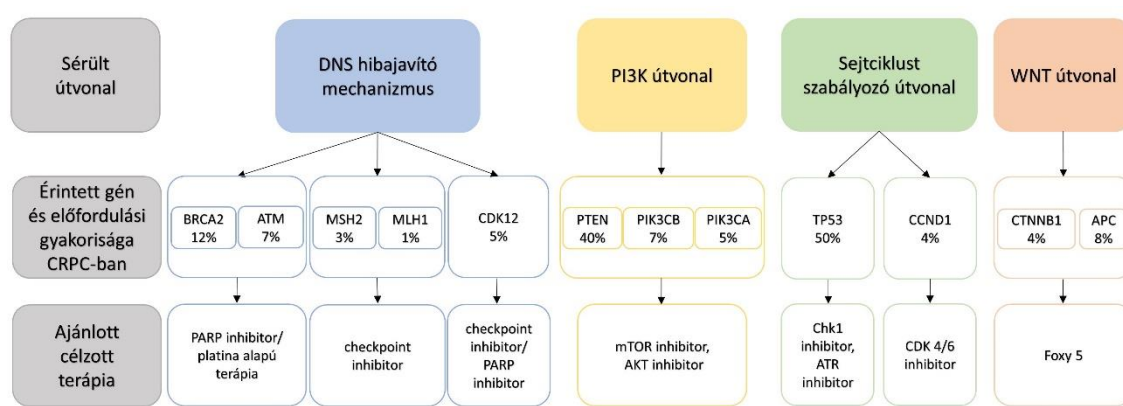
A genetikai eltérések közül mind lokális, mind előrehaladott PC esetén érintett az androgén receptor (AR) jelpálya. Míg lokális PC esetében csak 1-2%-ban sérült az AR, addig metasztatikus PC-nál az AR mutációi, amplifikációja már körülbelül 60%-ban fordulnak elő. A jelpálya további tagjainak a *FOXA1*, *SPOP*, *NCOR1* és *NCOR2* eltérései viszont mind a lokális (~5%), mind pedig az előrehaladott (~11%) PC-ban megfigyelhetők (15-17). A metasztatikus PC-ban leggyakrabban előforduló genetikai eltéréseket és célzott terápiás lehetőségeiket a 2.ábra foglalja össze.

A második leggyakrabban sérült útvonal a PI3K szignálút, melynek fokozott aktivitása mögött a *PTEN* eltérései állnak, mely primer PC esetén ~15%-ban, metasztatikus betegeknél ~40%-ban sérült. A *PTEN* eltérései mellett metasztatikus PC esetén gyakoriak a *PI3KCA* és *PI3KCB* gének mutációi is (15-17).

A sejtciklus szabályozásában résztvevő gének, mint a *TP53*, a *RBI*, ciklinek és ciklin-dependens kinázok is gyakran érintettek a PC kialakulásában. A *TP53* gén eltérései lokális PC esetében 8%-ban, míg előrehaladott stádiumban 50%-ban érintett (15-17).

A metasztatikus PC esetén figyelhető meg leggyakrabban a Wnt-szignálút eltérései, melyek közül az *APC* és *CTNNB1* gének érintettsége 8% és 4% (15-17).

Mind lokális, mind metasztatikus PC esetében jellemzőek a DNS hibajavító rendszer génjeinek sérülései, mely lokális PC-k esetében körülbelül 19%-ban, míg metasztatikus PC esetében 23%-ban sérül. Terápiás szempontból közülük a *BRCA2* és *ATM* hibái emelhetők ki. A PC esetében ritkán megfigyelhető a mismatch repair (MMR) gének hibája is, közülük az *MLH1* és az *MSH2* gének sérülnek a leggyakrabban. Továbbá, a *CDK12* gén biallélikus elvesztése egy új csoportját képezi a PC-nak (15-17).



**2. ábra** – A kasztráció-rezisztens prosztatarákban (CRPC) leggyakrabban előforduló genetikai eltérések és ajánlott célzott terápiás lehetőségeik (17).

A PC betegek optimális terápiájának megválasztása érdekében ezen mutációk azonosítása a jövőben várhatóan lényeges szemponttá válik. Egyre nagyobb számban tesztelnek olyan célzott terápiás készítményeket, melyek az adott tumor molekuláris eltéréseit célozzák. Ilyen, már ma is elérhető célzott terápiás szer a poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP)-inhibitor, mely a *BRCA* vagy egyéb homológ rekombinációban részt vevő gén hibája esetén alkalmazható (19, 20). A PI3K útvonal sérülései esetén hatékony terápiás szerek lehetnek a különböző mTOR, AKT és PI3K $\beta$  inhibitorok, a sejtciklus szabályozásában részt vevő gének sérülése esetén a CDK4/6 inhibitorok, míg a Wnt-útvonal génjeinek eltérése esetén a Foxy-5 molekula. Ezen inhibitorok többsége még klinikai tesztelés alatt áll, de sikeres alkalmazásuk további fontos előrelépést jelenthet a PC kezelésében (17, 21, 22).

### 1.3. A prosztatatarák klinikai tünetei, diagnosztikája, patológiája

A PC tünetei a daganat kiterjedésének mértékétől függenek. A korai, lokális kiterjedésű prosztatadaganatok tünetmentesek vagy nem specifikus tüneteket okoznak, ebből adódóan leggyakrabban szűrés során fedezik fel a daganatot. Előrehaladott stádiumban a PC leggyakrabban a csontokba ad áttétet, így csontfájdalom vagy csonttörés esetén derül fény a betegségre. A lokálisan előrehaladott vagy áttétet adó daganatoknál a vizeletürítési zavarok, vérszegénység, alsó végtagi vizenyő és uraemia hívhatja fel a figyelmet a PC-ra (3, 4).

A PC diagnózisának legegyszerűbb módja a fizikális vizsgálat. Mivel a PC több mint kétharmada a prosztata perifériás zónájában található, így a tumor a rektális digitális vizsgálat (RDV) során jól kitapintható. Prosztatatumor esetén a prosztata porckemény és/vagy porckemény göbök találhatóak benne. Azonban fontos megemlíteni, hogy a daganatok jelentős része nem kitapintható (3, 4).

A daganatos elváltozást transrectalis ultrahang segítségével is igazolhatjuk. A vizsgálat érzékenysége magas, tehát már kis méretű elváltozást is detektál, azonban fajlagossága alacsony, ami azt jelenti, hogy más elváltozásoknak is, mint pl. gyulladás tumorhoz hasonló echoképe van. A vizsgálat elvégzése elengedhetetlen a pontos biopsziavételhez (3, 4).

A fizikális vizsgálat mellett a szérum PSA (prosztata specifikus antigén) meghatározása is kulcsfontosságú a diagnózis felállításához. A PSA egy olyan glikoprotein, amelyet a prosztataszövet sejtjei termelnek, annak érdekében, hogy elfolyósítsa az ondóváladékot segítve ezzel a hímivarsejtek könnyebb mozgását. A PSA vizsgálatot először a PC követésére, majd rutinszerű szűrésére hagyta jóvá 1994-ben az FDA (Food and Drug Administration) (23). Azonban fontos szempont, hogy a PSA nem tumor specifikus marker, szérumszintje megemelkedhet jóindulatú prosztata-megnagyobbodás (BPH) és gyulladás esetén is (3). A rutinszerű PSA vizsgálat bevezetésével ugrásszerűen megnőtt a PC-vel diagnosztizált betegek száma, ugyanakkor a szűrés bevezetése a PC túldiagnosztizálását és túlkezelését eredményezte. Ennek magyarázata, hogy a szűréssel felfedezésre kerültek azok a daganatok, amelyek alacsony malignitásúak és jó prognózisúak, és amelyek a betegek életkilátásait nagy valószínűséggel nem befolyásolták volna, azonban a kezelés szövődményei jelentősen rontották a betegek életminőségét (24). Mivel a PSA szérum koncentrációja összefügg a

beteg életkorával és a prosztatata tömegével, ezért egyéb kiegészítő vizsgálatok is segíthetik a diagnózis felállítását. A PSA két formában található meg a véráramban, fehérjéhez kötötten (kötött PSA) és szabad (fPSA) formában. A teljes PSA értéket (tPSA) a két érték együttesen alkotja. A fPSA/tPSA hányadosa kockázatbecslésre szolgálhat, a 16% alatti érték daganat jelenlétére utalhat (3). Segítségül szolgálhat továbbá a PSA-denzitás meghatározása, mely során a PSA értékét osztjuk el a prosztatata térfogatával. Minél magasabb a kapott érték, annál valószínűbb a tumor jelenléte. Figyelembe kell venni továbbá a korszpecifikus PSA értéket, valamint a PSA változásának dinamikáját is. Ez utóbbira használható a PSA duplázódási idő, mely annak az időnek a hosszát adja meg, ami alatt a PSA érték a duplájára nő (3). Azoknál a személyeknél, akiknél a PC diagnózisa nem egyértelmű (például a PSA érték 4 és 10 ng/ml közé esik és az RDV vizsgálat negatív eredményt mutat) alkalmas módszer lehet a malignitás eldöntésére a Prostate Health Index (PHI) meghatározása. Kiszámításához a (-2)pro-PSA értékének meghatározására van szükség. A (-2)pro-PSA a PSA érési folyamata során keletkező trunkált PSA. A PHI kiszámításához a (-2)pro-PSA/szabad PSA $\times\sqrt{\text{teljes PSA}}$  képletet használandó. A PHI szoros összefüggést mutat a PC agresszivitásával, amit az is mutat, hogy a magasabb PHI értékek magasabb Gleason-pontszámmal mutatnak összefüggést (25).

Ha a rektális digitális vizsgálat és az emelkedett PSA szint felveti a tumor gyanúját, azt minden esetben szövettani vizsgálatokkal kell kivizsgálni. Olyan – főként idős és/vagy egyéb súlyos betegségben szenvedő - betegek esetén, amikor a várható élettartam a 10-15 évet nem éri el, a beavatkozás mérlegelendő. A biopsziát ultrahang vezérléssel végbélen vagy gáton át végzik el. A vizsgálat során a prosztatata mindkét lebenyéből 6-6 mintát vesznek. A leghatékonyabb módszer a PC diagnosztizálására a multiparametriás MR vizsgálat. A fúziós biopszia során a MR képet az ultrahang képére vetítik, így a tumorgyanús régió pontosabban célozható (3).

A prosztatata epithelialis daganatainak körülbelül 90-95%-a szövettanilag a klasszikus, acinaris adenocarcinoma csoportjába tartozik. A daganatok jellemzően a prosztatata perifériás zónájában indulnak ki és porckemény tapintásúak (3). Előfordulhatnak azonban intraductalis, ductalis, urothelsejtes, laphám és basalsejtes carcinomák is. Az adenocarciomák gyakran keveredhetnek neuroendokrin sejtekkel is, de



megkülönböztetünk egy igen ritka, de rossz prognózisú csoportját a PC-nak, a tisztán neuroendokrin (vagy kissejtes) carcinomát (3, 26, 27).

Tumorgyanú esetén, vastagtű biopsziás mintavételre kerül sor. A szövettani vizsgálat során a patológus meghatározza a tumor grade (differenciáció) értékét, amely fontos támpontként szolgál a klinikai döntéshozatalban. A PC differenciáltsági fokának meghatározására a Gleason-pontszám szolgál, amely két, egyenként 1 – 5 közötti értékű Gleason-grade összegéből áll és jól korrelál a daganat prognózisával (3, 27). A Gleason-gradet a tumoros mirigyek szerkezete határozza meg, a leginkább differenciált sejtek egyes, míg a legkevésbé differenciált sejtek ötös számot kapnak. Túbiopsziás minta esetén a Gleason-score a legnagyobb területet elfoglaló és a legrosszabbul differenciált sejtek összegéből adódik, míg prostatectomiás preparátum esetén a két legnagyobb területet elfoglaló daganat gradejének összegéből áll (3, 27). 2014-ben bevezették az ISUP (International Society of Urological Pathology) grade értékelést is, mely a Gleason-score alapján osztja be a daganatokat 1-5 közötti csoportba (28). Az ISUP grade előnye, hogy bevezetésével összevethető a PC differenciáltsága egyéb daganatokkal, valamint jól elkülöníthetővé váltak egymástól a Gleason-score 3+4 és 4+3 daganatok (1.táblázat) (28).

**1. táblázat** – A PC szövettani besorolására szolgáló ISUP grade és Gleason-score rendszer, valamint azok jellemzői (3, 29).

ISUP Grade	Gleason-score	A tumoros mirigyek felépítése
1	2-6	Csak különálló, jól formált mirigyek
2	7 (3+4)	Nagyrészt jól formált mirigyek, de kis területen rosszul formált/fuzionált/kribriform mirigyek
3	7 (4+3)	Legtöbb területen rosszul formált/fuzionált/kribriform mirigyek, de előfordul kis területen jól formált mirigy
4	8 (3+5)	- Nagyrészt rosszul formált/fuzionált/kribriform mirigyek vagy - Nagyrészt jól formált mirigyek és kis területen mirigyképző hajlam hiánya vagy - Nagyrészt mirigyképző hajlam hiánya és kis területen jól formált mirigyek
5	9-10	Nincs mirigyképző hajlam. Jellemző a sejtcsoportok vagy egyes sejtek infiltrációja. Mirigynekrozis

A daganat kiterjedésének megállapítására 2017-ben bevezetett UICC (Union for International Cancer Control's) TNM klasszifikáció szolgál, ahol a T a tumor stádiumát adja meg, az N a nyirokcsomó áttét, az M pedig a távoli áttét jelenlétét mutatja (2.táblázat) (3, 29).

**2. táblázat – A PC TNM klasszifikációja (3, 29).**

<b>T - Primer daganat</b>	
T1	
T1a	Incidentálisan felfedezett daganat a reszekált minta (TURP) 5%-ában vagy kisebb területen
T1b	Incidentálisan felfedezett daganat a reszekált minta (TURP) több, mint 5%-ában
T1c	Az emelkedett PSA érték miatt végzett vastagtű biopsziás mintában felfedezett daganat
T2	Prosztatára korlátozódó daganat
T2a	A daganat az egyik lebeny 50%-át vagy annak kisebb részét érinti
T2b	A daganat az egyik lebeny több, mint 50%-át érinti
T2c	Mindkét lebenyt érintő tumor
T3	Extraprosztatikus tumorterjedés
T3a	A tumor extrakapszuláris terjedést mutat, vagy a húgyhólyagnyakat infiltrálja mikroszkópos kiterjedésben
T3b	A daganat infiltrálja a vesicula seminalist
T4	A daganat átterjedt a szomszédos szervekre
<b>N - Nyirokcsomó metasztázis</b>	
N0	Nincs nyirokcsomó metasztázis
N1	Regionális nyirokcsomó metasztázis
<b>M - Távoli metasztázis</b>	
M0	Nincs távoli metasztázis
M1a	Nem regionális nyirokcsomó metasztázis
M1b	Csont metasztázis
M1c	Egyéb távoli metasztázis

**1.4. A prosztatatarák kezelésének alapelvei****1.4.1. Szervre lokalizált prosztatatarák kezelése**

Ha a PC szövettanilag és klinikailag igazoltan szervre lokalizált vagy lokálisan előrehaladott a kezelése 3 módon történhet: aktív követéssel, sugárkezeléssel vagy radikális prosztataeltávolítással (RPE) (3, 30). A megfelelő ellátás megválasztását onkoteamnek kell eldöntenie, mely során figyelembe veszik a tumor stádiumát, szövettani megjelenését, a PSA koncentrációját, a beteg életkorát és általános állapotát, várható élettartalmát és a társbetegségeket is (3). A PC rizikó csoportokba való sorolását a 3. táblázat foglalja össze.

**3. táblázat – A PC rizikóbesorolásának szempontjai (3, 29).**

<b>Szervre lokalizált daganat</b>			<b>Lokálisan előrehaladott daganat</b>
<b>Alacsony rizikó</b>	<b>Közepes rizikó</b>		<b>Magas rizikó</b>
PSA < 10 ng/ml	PSA 10-20 ng/ml	PSA > 20 ng/ml	bármilyen PSA érték
és Gleason-score < 7	vagy Gleason-score 7	vagy Gleason-score > 7	bármilyen Gleason-score és
(ISUP Grade 1)	(ISUP Grade 2/3)	(ISUP Grade 4/5)	ISUP Grade
és cT1-2a	vagy cT2b	vagy cT2c	cT3-T4 vagy N+

Az aktív követést a legalacsonyabb rizikójú PC-os betegek esetén választják, akiknél a PC progressziója nyomon követhető rendszeres PSA szint ellenőrzéssel és ismételt biopsziás mintavétellel (3, 30).

Az RPE során a prosztatát a tokjával, az ondóhólyaggal, valamint a kismedencei nyirokcsomókkal együtt távolítják el. A műtétet abban az esetben végzik el, ha a beteg várható életkilátásai meghaladják a 10 évet és nem szenved egyéb súlyos társbetegségben (31). Az RPE szinte teljes gyógyulást eredményez, a műtét utáni 10 éves túlélés 90-95%-ot is eléri, azonban az esetlegesen bekövetkező súlyos szövődményeivel is számolni kell, melyek az inkontinencia, a potenciazavar és az anastomosis szűkület. A műtét elvégezhető retropubicusan, nyíltan, laparoszkoóposan és robot-asszisztált laparoszkoópos módon is. A további kezelést a műtét során eltávolított prosztata szövettani vizsgálatával kapott eredmény, valamint a mérhető PSA szint határozza meg. Ha az RPE után a PSA szintje nagyobb, mint 0,2 ng/ml és a PSA szintje növekszik, azt jelzi, hogy tumorszövet maradt vissza a műtét után. Továbbá a recidíva ellenőrzése céljából a műtét után 3 havonta szükséges a PSA szint monitorozása. Posztoperatív sugárkezelés akkor indokolt, ha a szövettani vizsgálat szerint a tumor a prosztata tokján tovább terjedt (pT3) vagy nyirokcsomó metasztázis igazolt (pN1), illetve ha a sebészi szél pozitív (3, 4).

A szervre lokalizált PC esetén az RPE alternatívája a kuratív dózisú sugárkezelés lehet. A sugárkezelés történhet teleterápiával, brachiterápiával és a kettő kombinációjával. Sugárkezelés után a betegek 10 éves túlélése 70-90%-os. Mellékhatásként előfordulhat gyakori vizezés, sürgető vizelési inger, inkontinencia, húgycsőhegesedés (3).

## **1.4.2. Előrehaladott prosztaták kezelése**

### **1.4.2.1 Hormon-érzékeny prosztaták kezelése**

Mivel a PC egy hormonfüggő betegség, ezért az előrehaladott PC standard kezelése az androgén deprivációs terápia (ADT). A terápia célja a szérum tesztoszteron szint kasztrációs szintre való lecsökkentése, mely a betegek nagy részénél PSA szint csökkenést okoz és ideiglenesen megállítja a tumor növekedését. A tesztoszteronszint csökkentése ritkábban történhet sebészi kasztráció útján, valamint gyógyszeres úton is LHRH (luteinizáló hormon-releasing hormon) agonisták és antagonisták alkalmazásával

(3). Azonban jellemzően 2-3 év után a betegség átlép a kasztráció rezisztens stádiumban, amely azt jelenti, hogy folyamatos ADT alkalmazása és kasztrációs szintű szérumszoros tesztoszteron szint (<1,7 nmol/l) mellett biokémiai vagy radiológiai progresszió következik be. Ezt az állapotot kasztráció-rezisztens prosztataráknak (CRPC) nevezzük. Biokémiai progresszió alatt azt értjük, ha 3 egymást követő, legalább egy hét kihagyással mért PSA szintekben emelkedést tapasztalunk, amelyből két érték a kezelés alatt mért legalacsonyabb PSA koncentrációhoz (nadír) képest 50%-os emelkedést mutat. Radiológiai progresszió alatt pedig azt értjük, ha a beteg ismert csontléziója kiterjedtebbé válik vagy legalább két új elváltozás jelenik meg a csontscanen, illetve ha a RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) kritérium szerint 2 cm-nél nagyobb nyirokcsomó metasztázist vagy lágyszövet metasztázist detektálnak (29). A CRPC felléphet metasztázis nélkül és tünetet nem okozó, illetve tünetekkel járó metasztázissal is (32).

A legújabb vizsgálatok eredményei szerint a metasztatikus hormonérzékeny PC kezelésére az ADT mellett négy szer alkalmazható; a docetaxel (DOC), az abirateron (ABI), az enzalutamid (ENZA) és az apalutamid (APA), melyek célja a CRPC stádium elérésének késleltetése (32).

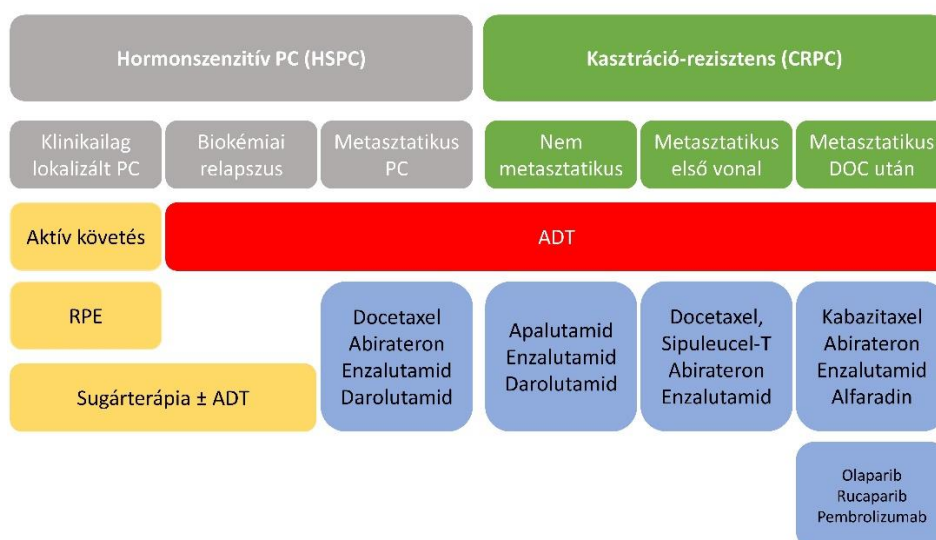
#### 1.4.2.2 Kasztráció-rezisztens prosztatarák kezelése

CRPC kezelése esetén megkülönböztetjük a metasztatikus, valamint a nem metasztatikus (nm) CRPC-t. A nmCRPC kezelésének célja a képalkotó vizsgálatokkal kimutatható metasztázisok megjelenéséig eltelt idő megnyújtása. Ebben a stádiumban a szoros kontroll mellett az ADT adása volt az elfogadott gyakorlat egészen 2018-ig, majd az FDA 3 szer, az APA, az ENZA és a darolutamid alkalmazását is engedélyezte a SPARTAN, PROSPER és ARAMIS klinikai vizsgálatok eredményei alapján (3.ábra) (32-35).

A metasztatikus (m) CRPC kezelésében nagy előrelépést jelentett a DOC kemoterápia megjelenése, melyet 2004-ben a TAX 327 és a SWOG-99-16 III-as fázisú klinikai vizsgálat eredményei alapján törzskönyvezték (36, 37). A DOC kemoterápiát több, mint egy évtizedig szinte egyedüli szisztémás kezelésként használták az mCRPC betegek kezelésében és máig is az egyik gyakran használt elsővonalbeli kezelésnek számít. Azonban 2010-től a terápiás paletta 7 új készítménnyel bővült. Elsőként a Sipuleucel-T immunterápiás vakcinát engedélyezte mCRPC-ben szenvedő betegeknek az

FDA (38), majd 2010 júniusában DOC terápiára nem reagáló betegek számára elérhetővé vált másodvonalban alkalmazva a kabazitaxel terápia (39). Ezután megjelent két új-generációs androgén támadáspontú kezelés az ABI és ENZA. Az ABI-t 2011-ben a COU-AA-301-es klinikai vizsgálat, az ENZA-t pedig 2012-ben az AFFIRM fázis III. vizsgálat alapján törzskönyvezték, olyan betegeknek, akik DOC kemoterápia alatt vagy után progrediáltak (40, 41). Később mindkét készítmény elsővonalban való alkalmazása is engedélyezte az FDA (42, 43). Ezen készítmények mellett elérhetővé vált továbbá egy alfa sugárzó izotóp az alfaradint, melyet a csontmetasztázisok kezelésére fejlesztettek ki (44). 2017-ben az FDA engedélyezte a pembrolizumab alkalmazását minden olyan betegnél, akik inoperábilis vagy metasztatikus daganatban szenvednek, és akiknek a tumora mikroszatellita-instabilitást (MSI) vagy mismatch repair deficienciát hordoz, valamint a korábban legalább egy gyógyszeres terápiára progresszióval reagáltak (45). Továbbá, 2020-ban két PARP-inhibitor, az olaparib és rucaparib is törzskönyvezésre került *BRCA1* vagy *BRCA2* mutációval rendelkező PC betegek számára másod- vagy későbbi vonalban alkalmazva (19, 20).

Az öröndetes módon bővülő gyógyszeres lehetőségek különösen megnehezítik az optimális terápia és a terápiás sorrend megválasztását nagy kihívás elé állítva a klinikusokat és betegeket. Az optimális terápia megválasztását tovább nehezíti, hogy jelenleg nem állnak rendelkezésre olyan molekuláris markerek, melyek támpontként szolgálhatnának a terápiák helyes megválasztásában. A PC különböző stádiumaiban elérhető kezeléseket a 3. ábra foglalja össze.



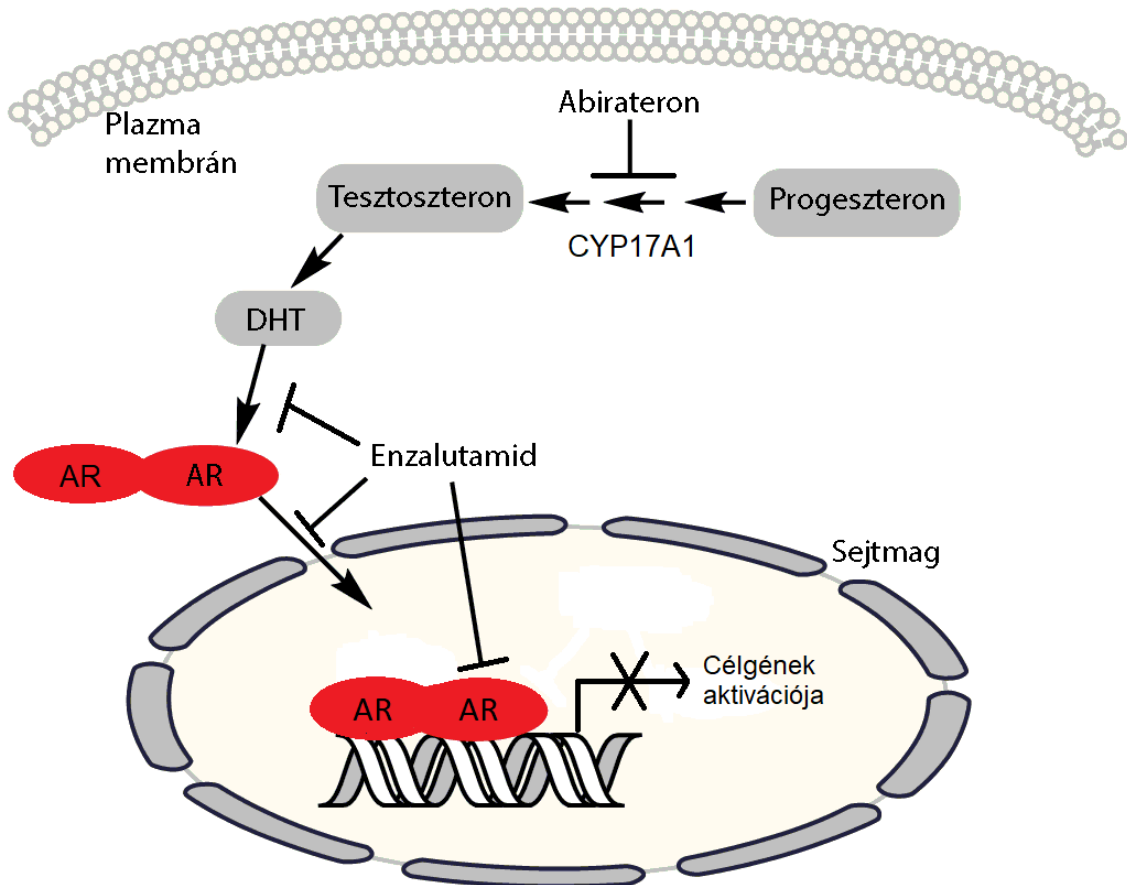
**3. ábra** – A PC különböző stádiumaiban elérhető kezeléseket (szerkesztve) (32).

### **1.5. A metasztatikus, kasztráció-rezisztens prosztatarák rezisztencia mechanizmusai**

A kutatócsoportunk a három jelenleg leggyakrabban használt elsővonalbeli terápia (ENZA, ABI, DOC) hatékonyságát előrejelző markerek azonosítását tűzte ki céljául, ezért jelen értekezésben az ehhez kapcsolódó rezisztencia mechanizmusok kerülnek bemutatásra.

A DOC a taxán vegyületek családjába tartozó olyan kemoterápiás szer, mely hatását a mikrotubulusok gátlásán keresztül fejt ki, ami az osztódó tumorsejtek mitózisban történő fennakadását okozza, ezáltal a sejtciklus leáll és a sejtek apoptózis következtében elpusztulnak (46). Az irodalomban a DOC rezisztencia hátterében leggyakrabban pumpafehérjék fokozott aktivitását írták le (47). Megfigyelték, hogy DOC rezisztencia esetén az ABCB1 pumpafehérjék száma megnő a tumorsejtek membránján, így azok képesek lesznek a DOC molekulákat a tumorsejtekből kipumpálni, így csökkentve a DOC terápia hatásfokát (48). A kemoterápia rezisztencia kialakulásában szerepet játszhatnak továbbá különböző citokin molekulák, mint az IL-4, IL-6 és MIC-1 emelkedett aktivitása is (49). Továbbá, számos a munkacsoportunk által vizsgált szérumból kimutatható biomarker alkalmas lehet a terápia rezisztencia előrejelzésére, ilyenek az YKL-40, MMP-7, SDC-1 és a CD44 fehérjék, melyek emelkedett szérum koncentrációja a DOC-kezelt betegek rövidebb túlélésével korrelált (50-53).

Az ENZA és ABI hatóanyagok az új-generációs antiandrogén támadáspontú terápiaik közé tartoznak. Az ENZA hatását tekintve egy androgén receptor (AR) antagonistája, mely hármassal rendelkezik; egyrészt gátolja a receptor-ligand kötődés létrejöttét, másrészt gátolja a receptor-ligand transzlokációját a sejtmagba és gátolja az AR DNS-hez való kötődését, ezáltal a transzkripció során átíródó gének fehérjetermékeinek létrejöttét (4.ábra) (47, 54). Az ABI egy enzim blokkoló szer, mely szelektíven gátolja a CYP17A1 enzimet, ami az endogén tesztoszteron szint csökkenését eredményezi (4.ábra). Az ENZA és ABI rezisztencia hátterében állhatnak AR-hoz köthető és AR-tól független rezisztencia mechanizmusok is (47, 54).



**4.ábra** – Az ABI és ENZA kezelés hatásmechanizmusának szemléltetése. Fiziológias körülmények között az AR ligandkötő doménjéhez bekötődő 5- $\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT) hatására a receptor konformáció változáson megy keresztül, dimerizálódik és a sejtmagba transzlokálódik, ahol a DNS-hez kötődve koaktivátorok jelenlétében az androgén által aktivált gének átíródását indukálja. Az ABI szelektíven gátolja a CYP17A1 enzimet, melynek hatására csökken az endogén tesztoszteron szint. Ennek hatására a tesztoszteron nem képes átalakulni DHT-ná. Az ENZA pedig három oldalról is gátolja az útvonalat; egyrészt megakadályozza a receptor-ligand kötődés létrejöttét, másrészt gátolja a receptor-ligand transzlokációját a sejtmagba, valamint megakadályozza az AR DNS-hez való hozzákötődését, ezáltal a transzkripció létrejöttét (17).

Az *AR* eltérései, így a fokozott termelődése, a ligandkötő régióban létrejövő mutációk és az *AR* splice variáns jelenléte szignifikáns összefüggést mutatnak az ENZA és ABI-kezelt betegek rosszabb terápiára adott válaszával. Az *AR* amplifikációja és ezáltal fokozott termelődése az elsővonalban ENZA és ABI-kezelt betegek körülbelül

15%-ánál, míg a másod vagy későbbi vonalban új-generációs antiandrogén terápiát kapó betegek körülbelül 25-50%-ánál mutatható ki és jelenléte összefüggést mutat a rosszabb terápiára adott válasszal (54). Az AR ligandkötő régiójában létrejövő pontmutációk is szerepet játszhatnak a rezisztencia kialakulásában. A mutációk az elsővonalon ABI-t és ENZA-t kapó betegek ~20%-ban, a másod vagy későbbi vonalban kapó betegek 30-40%-ban van jelen a kezelés megkezdése előtt (47, 54). Terápiás szempontból a két mutáció F876L és a T878A kiemelt fontossága igazolódott. Az F876L mutáció jelenléte esetén az ENZA inverz módon gátlás helyett aktiválja az AR-t. Érdekesség azonban, hogy az ilyen mutációt hordozó daganatok érzékenyek egyéb AR-antagonistákra, mint pl. a bicalutamidra is, valamint a ciklin-dependens kináz (CDK4/6) inhibitorokra is érzékenyen reagálnak (55). A T878A mutáció jelenléte esetén az AR érzékennyé válik olyan endogén és gyógyszermolekula hatására is, amelyek a mutációt nem hordozó AR-okat nem képesek aktiválni, ez pedig a PC progressziójához vezethet (56). Az elmúlt években számos közlemény igazolta az AR-V7 jelenléte és az antiandrogén terápiák csökkent hatékonysága közötti kapcsolatot. Az AR-V7 az AR mRNS-ének egy olyan ún. splice variánsa, mely egy olyan csonkolt AR fehérjét kódol, amelynek hiányzik a ligandkötő doménje, de ennek ellenére is folyamatosan aktív. Az AR-V7 kimutatása történhet tumormintából, vérből és sejtmentes RNS-ből immunhisztokémiával, digitális droplet PCR-rel vagy real-time PCR-rel. Az AR-V7 a betegek 10-30%-ban van jelen és több tanulmány eredménye alapján jelenléte prediktív értékkel bír az ENZA és ABI terápiák kapcsán (47, 54). Az első közlemény, mely az AR-V7 prediktív értékét vizsgálta 62 mCRPC beteg keringő tumorsejtjének AR-V7 tartalmát vizsgálta ddPCR segítségével. A betegek 29%-nál találtak AR-V7 pozitív tumorsejteket és náluk szignifikánsan rövidebb progresszió-mentes túlélés, valamint rosszabb PSA-válasz volt megfigyelhető ABI és ENZA kezelés során az AR-V7 negatív esetekhez képest (57). Egy másik tanulmányban immunhisztokémiai vizsgálattal mutatták ki a keringő tumorsejtek AR-V7 tartalmának ABI és ENZA kezelésre vonatkozó prediktív értékét. A módszer előnye, hogy nemcsak az AR-V7 fehérje jelenlétét és mennyiségét tudja kimutatni, de az AR-V7 sejten belüli lokalizációját is, aminek további jelentősége van a kezelés hatékonyságára nézve (58).

Az ENZA és ABI rezisztencia létrejöhet AR független módon is. A glükokortikoid receptor (GR) aktivációja vagy fokozott expressziója is részt vehet a rezisztencia

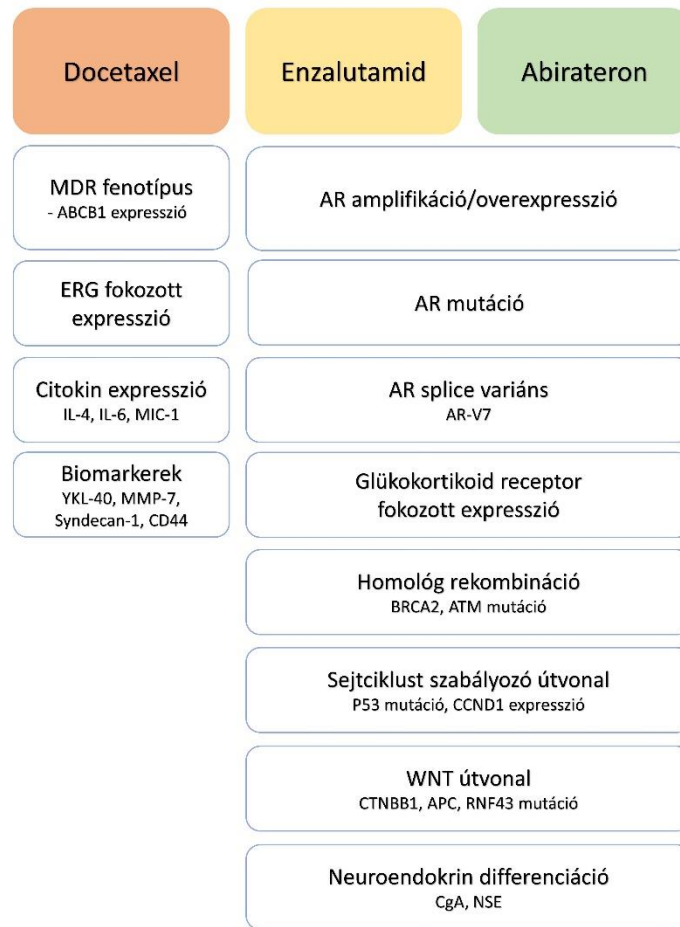


kialakításában. *Arora és mtsai.* vizsgálata alapján ENZA kezelés hatására a GR aktiváció képes kikerülni a gátolt AR jelátviteli utat és képes aktiválni azokat a géneket, melyeket egy aktív AR aktiválna, ezzel pedig elősegíti a tumor progresszióját (59). Továbbá, egy másik közleményben azt találták, hogy a GR emelkedett expressziója az ENZA és ABI terápia eredményeként jön létre és fokozott expressziója összefüggésben van az antiandrogén terápia elleni rezisztencia kialakulásával (60).

A sejtciklus szabályozásában részt vevő *TP53* és a *ciklin D1* gének, valamint a Wnt útvonal génjeinek eltérései is összefüggésbe hozhatók az ABI és ENZA elleni rezisztencia kialakulásával (47, 54). Jelenleg számos klinikai vizsgálat folyik olyan célzott kezelések alkalmazására, amelyek szelektíven gátolnák az ilyen hibás géneket PC-ban (47, 54).

A DNS hibajavító rendszer génjeinek, főleg a *BRCA2* és *ATM* gének esetében szerepe lehet az ENZA és ABI rezisztencia kialakulásában. Egy 202 mCRPC beteget vizsgáló prospektív tanulmány alapján, ahol a betegek ENZA és ABI kezelést kaptak elsővonalban, 14 betegnek volt *BRCA2* vagy *ATM* mutációja és ezeknél a betegeknél figyelték meg a legrosszabb választ a terápiára (61). Azonban a *BRCA2* és *ATM* mutációt hordozó betegek jobban reagálnak a PARP inhibitor és platina alapú terápiaakra, mely a molekuláris vizsgálatok jelentőségére mutat rá a terápiás szekvenciák megválasztásában (19, 20, 62, 63).

A DOC, ENZA és ABI ellen létrejövő rezisztenciáért felelős mechanizmusokat az 5.ábra szemlélteti.



**5.ábra** – A mCRPC kezelésére 3 leggyakrabban használt terápia ellen kialakuló rezisztencia mechanizmusok és azonosított biomarkerek (47).

### 1.6. A neuroendokrin transz-differenciáció prosztatadaganatokban

A tisztán neuroendokrin, vagy kissejtes daganat a PC igen ritka szövettani megjelenésű formája, mely az esetek kevesebb, mint 1%-át teszi ki. Azonban a prosztata adenocarcinoma esetében is megtalálhatóak az elszórta elhelyezkedő neuroendokrin differenciációt mutató (NED) tumorsejtek (64). Közös jellemzőjük, hogy az adenocarcinomákkal ellentétben nem termelnek PSA-t, azonban agresszív növekedésűek és az antiandrogén terápiákkal szemben rezisztenciát mutatnak (65, 66), így az ADT alkalmazásának hatására kissejtes daganatokként viselkednek és a kasztráció-rezisztens stádiumban a daganatok már nagyszámban tartalmaznak neuroendokrin tumorrészeket (67). Ezeket a daganatokat összefoglaló néven terápia által kiváltott kissejtes neuroendokrin PC-nak nevezzük, magát a szelekciós folyamatot pedig „neuroendokrin transz-differenciáció”-

nak, mely egy menekülőút vonal a tumorsejteknek az antiandrogén terápiákkal szemben (68). A klinikai gyakorlatban a neuroendokrin differenciáltságot mutató tumorsejtek kimutatása biopsziás mintából történhet. Azonban mivel a terápiaváltások során az ismételt biopsziás mintavétel ritkán megoldható, így nagy szükség van olyan vérből kimutatható markerekre, melyek bevethetők lennének a terápiás döntéshozatalban, valamint a terápia monitorozásában. A neuroendokrin differenciáció szérumszintjei közé tartozik a chromogranin A (CGA) és a neuron-specifikus enoláz (NSE), mely markerek emelkedett szintje az anti-androgén (ENZA, ABI) és a DOC terápia csökkent hatékonyságával mutat összefüggést (69-75). *Conteduca és mtsai.* vizsgálata alapján a CGA emelkedett szérumszintje és az AR amplifikációja együttesen az ENZA- és ABI-kezelt mCRPC betegek rövidebb túlélésével mutatott összefüggést (71). Továbbá egy másik tanulmányban, Heck és munkacsoportja a CGA és NSE szérumszintjének vizsgálata során összefüggést talált a kezelés előtti magas neuroendokrin szérumszint értékek és az ABI-kezelt betegek rövidebb teljes és progresszió-mentes túlélésével (74). A DOC rezisztencia esetén, *in vitro* vizsgálatok alapján a neuroendokrin tumor fenotípus jelenléte a DOC kezelés csökkent hatékonyságával mutatott összefüggést (66). Ugyanakkor két tanulmány ezzel ellentétben nem talált összefüggést a CGA és a NSE szérumszintjei és a DOC terápiára adott kedvezőtlenebb válasz között (75, 76).

## 2. Célkitűzés

Kutatómunkám célja az mCRPC kezelésére használt egyik antiandrogén terápia az ENZA elleni rezisztencia molekuláris alapjainak feltérképezése, valamint prediktív biomarkereinek azonosítása, melyhez az alábbi célokat tűztük ki:

1, A szakirodalom által eddig ismertté vált, a prosztaták kialakulásáért felelős molekuláris markerek és főbb jelátviteli utak feldolgozása és összefoglalása. Továbbá, az antiandrogén terápiák (ENZA és ABI) elleni rezisztenciában szerepet játszó ismert mechanizmusok irodalmi összefoglalása.

2, ENZA-érzékeny (LAPC4, DUCAP) és -rezisztens (LAPC4-ER, DUCAP-ER) PC sejtek proteomikai vizsgálata komparatív folyadékkromatográfiához kötött tömegspektroszkópiás módszerrel.

3, Az eredményekből bioinformatikai módszerekkel kiválasztott legígéretesebb fehérjék szérumkoncentrációinak meghatározása ENZA-kezelt mCRPC betegek szérum mintáiban. A fehérjék prediktív értékének meghatározása, melyhez a betegek klinikopatológiai és követési adatait használtuk fel. Továbbá az egyik kiválasztott fehérje, az ALCAM szérum koncentrációját meghatároztuk ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek mintáiban is.

4, A legígéretesebb fehérje génexpressziós vizsgálata *in silico* adatelemzéssel nyílt hozzáférésű adatbázisok felhasználásával.

5, A legígéretesebb fehérje rezisztenciában betöltött esetleges funkcionális szerepének vizsgálata *in vitro* sejtmodellben. A funkcionális vizsgálatok során a kiválasztott fehérje expresszióját siRNS technikával csendesítettük és ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a sejtek életképességének változását.

6, Neuroendokrin szérum markerek (CGA és NSE) prognosztikus és prediktív értékének meghatározása egyrészt a lokális PC-os betegek, továbbá ENZA-, ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek mintáiban.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Enzalutamid-szenzitív és rezisztens prosztatárakos sejtvonalpárok tenyésztése

Kutatásunkhoz ENZA érzékeny (LAPC4, DUCAP) és rezisztens (LAPC4-ER, DUCAP-ER) PC sejtvonal párokat használtunk fel, melyeket az Innsbrucki Egyetem Urológiai Klinikájának Kutatólaboratóriumából Dr. Martin Pühr bocsájtott rendelkezésünkre (77). A terápia rezisztens sejtvonalakat több hónapig tartó, lépésről-lépésre emelkedő dózisú ENZA kezeléssel tenyésztették ki. A kezelés során minden passzáláskor kisselektálódnak azok a sejtek, melyek érzékenyek az ENZA kezelésre ezáltal csak az ENZA-ra rezisztens szubpopuláció maradt fenn. Ezzel a szelekciós folyamattal olyan ENZA-rezisztens sejteket sikerült létrehozni, melyek életképeseknek bizonyultak 8 nM ENZA koncentráció (fenntartó ENZA dózis) mellett is.

A sejteket 37°C-os inkubátorban 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció és magas páratartalom mellett tartottuk fent. A sejtvonalakat tenyésztéséhez RPMI-1640 médiumot használtunk, melyhez 10% FBS-t (fötális borjú savó, Biowest; S181B) 1% penicillin-streptomycin antibiotikumot (Lonza, 17-602E) és 1% Glutamax-ot (Thermo Fisher Scientific) adtunk. A LAPC4 sejtvonal tenyésztéséhez további 1 nM dihidrotesztoszteronra (DHT) volt szükség. Az ENZA rezisztens sejtek fenntartásához további 8 nM ENZA-t (Medchem) adtunk a médiumhoz. A tenyésztés során a médiumot 48-72 óránként cseréltük le, valamint 70-80%-os konfluencia elérésekor passzáltuk a sejteket.

#### 3.2. Sejtvonalpárok komparatív proteomikai analízise tömegspektroszkópiás módszerrel

Az ENZA érzékeny (LAPC4, DUCAP) és ENZA rezisztens (LAPC4-ER, DUCAP-ER) sejtek mennyiségi és minőségi fehérjekészletének összehasonlítására a Bochumi Egyetem Proteomikai Centrumában folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektroszkópiás módszer (LC-MS/MS) alkalmazásával komparatív proteomikai analízist végeztünk. Ezzel a módszerrel sikerült azonosítanunk azokat a fehérjéket, melyek eltérő mennyiségben termelődnek a sejtvonalpárok ENZA érzékeny és rezisztens variánsaiban.

A vizsgálat során először a mérendő komponens (fehérje) elválasztás történt meg folyadékkromatográfiával, majd a szétválasztott peptideket a rendszer a tömegspektrométerbe juttatta át. A tömegspektrometriai mérés során a peptideket egy ionforrás ionizálta, majd a tömeganalizátor tömeg/töltés ( $m/z$ ) alapján szétválasztotta, majd detektálta. A kapott tömegspektrumon az ionok intenzitása a peptidek mennyiségére, míg a tömeg a peptid tulajdonságára utal.

### 3.2.1. Minta előkészítés

A proteomikai vizsgálatokhoz 6 db technikai párhuzamost használtunk fel minden egyes sejtvonalból, melyhez párhuzamosonként 2 millió sejtet növesztettünk fel T75 sejtenyésztőedényben. A sejtekről ~80%-os konfluencia elérésekor szívtuk le a médiumot, majd a sejteket PBS-sel (foszfát puffer) mostuk és proteáz alkalmazása nélkül sejtkaparó segítségével szedtük fel a tenyésztőedény aljáról. A sejt pelletet centrifuga csövekbe helyeztük, majd 100g fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk 4°C-on. A felülúszó eltávolítása után a mintákat -80°C-on tároltuk. A sejt pelleteteket szárazjégen küldtük el a Bochumi Egyetem Orvosi Proteomikai Centrumába.

### 3.2.2. LC-MS/MS mérési paraméterek

A sejtlízis eléréséhez a pelleteteket 30  $\mu$ l 50 mM-os ammónium bikarbonátot és 0,1%-os *RapiGestSF surfactant* reagenst tartalmazó oldatban vették fel. A minták fehérjekoncentrációját Bradford módszerrel határozták meg, majd 4  $\mu$ g fehérjéhez 5 nM ditiotretiolot adtak és inkubálták a mintákat 30 percig 60°C-on. Ezután 15 nM jódiacetaminos alkilálást végeztek szobahőmérsékleten, 30 percig, fényvédett körülmények között. Az így lizált fehérjéket egy éjszakás 37 °C-on történő tripszines emésztésnek vetették alá. Másnap a mintákhoz 0,5% trifluoecetsavat adtak, majd centrifugálták 10 percig 16.000g fordulatszámon. Ezután vákuumcentrifugában kiszárították a mintákat, majd 0,1%-os trifluoecetsavban oldották fel a pelletet.

A mérést *LTQ Orbitrap Elite* (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) berendezéshez kapcsolt *Ultimate 3000 RSLCnano* folyadékkromatográfiás rendszer segítségével (Dionex, Idstein, Németország) végezték. A fehérjék beazonosítása Proteome Discoverer v.1.4 (Thermo Fisher Scientific) szoftverrel történt. A

tömegspektrumot a Mascot 2.5 szoftver (Matrix Science, London, Egyesült Királyság) segítségével vetették össze a UniProtKB/Swiss-Prot adatbázissal. A szignifikancia szint meghatározásához független, kétmintás t-próbát alkalmaztak.

### **3.3. Proteomikai adatok feldolgozása**

A proteomikai vizsgálatunk azonosította azokat a rezisztencia kialakításában potenciálisan résztvevő fehérjéket, amelyek eltérő mértékben expresszálódnak az ENZA-érzékeny és rezisztens sejtvonalakban. Ezután kiválasztottuk a fehérjelistából azokat a fehérjéket, melyeket továbbiakban részletesebb analízisnek vetettünk alá.

#### **3.3.1. Kandidáns fehérjék kiválasztásának módszerei**

A nyers proteomikai adatlistából első körben előzetes szűrési kritériumrendszert felállítva azokat a fehérjéket választottuk ki, amelyek statisztikailag szignifikáns eltérést mutattak ( $p$ -érték  $\leq 0,05$ ) és legalább 2 egyedi peptid (unique peptide) alapján voltak beazonosíthatók. Az így leszűkített fehérjelistát azután további három módszerrel szűrtük, annak érdekében, hogy kiválasszuk a legígéretesebb biomarkereket.

##### **3.3.1.1. Fehérjék rangsorolása**

Az első szűrési módszerünk során egy pontozási rendszert állítottunk fel, melynek során rangsoroltuk a fehérjéket az alábbi szempontok alapján: a proteomikai vizsgálatunk által kapott expressziós változás (fold change) mértéke, valamint a STRING adatbázisban a fehérje a hozzá tartozó hálózatokban betöltött központi szerepe és funkcionális hálózatokban történő beágyazottságának mértéke (élek száma). A STRING adatbázis segítségével megvizsgálhattuk, hogy a felülregulálódott fehérjék közül melyek azok a fehérjék, amelyek több fehérjével kapcsolatban állnak, feltételezve, hogy azok a fehérjék, amelyek több kapcsolatot alakítanak ki, nagyobb eséllyel játszhatnak szerepet a rezisztencia kialakításában és szabályozásában. Figyelembe vettük továbbá, hogy a fehérjének a szakirodalomban más tumorok esetében van-e leírt prognosztikus vagy prediktív értéke, valamint további fontos szempont volt, hogy a későbbi szérumban vizsgálatok elvégzésének érdekében kereskedelmi szempontból elérhető-e megbízható ELISA kit, valamint a funkcionális vizsgálatok elvégzéséhez elérhető-e specifikus

inhibitor. Ezek alapján a szempontok alapján pontoztuk a listánkban szereplő fehérjéket úgy, hogy az 1 a legkevesebb, míg a 3 a legtöbb egyezést jelentette.

### **3.3.1.2. Szekretálódó fehérjék kiválasztása**

A második szűrési módszer során a proteomikai vizsgálatunkkal azonosított fehérjékből a potenciálisan szekretálódó fehérjéket választottuk ki, melyet a Debreceni Egyetem Humángenetikai Tanszékének kutatócsoportjával (laborvezető: Prof. Takács László) kollaborációban végeztünk. Ennél a szűrési módszernél olyan bioinformatikai módszert alkalmaztunk, mely prediktív programokat (SignalP 4.1, SecretomeP 2.0, TargetP 1.1, TMHMM 2.0), valamint nyílt hozzáférésű adatbázisokat (Uniprot, Human Protein Atlas, NCBI, ExoCarta) használ a fehérjék lokalizációjának előrejelzésére. Ezzel a módszerrel azonosíthatóak azok a fehérjék, melyek szekretálódnak, tehát a véráramba kerülve szintjük nagy valószínűséggel mérhető a betegek szérum mintáiban.

### **3.3.1.3. Összehasonlító analízis**

A harmadik kiértékelési módszer során irodalomkutatást végeztünk annak érdekében, hogy más kutatócsoportok ENZA érzékeny és rezisztens sejtvonalakon történt proteom és transzkriptom szintű összehasonlító vizsgálatait felkutassuk és eredményeinket azok eredményeivel összevessük. Az irodalomkutatásunk mindössze egy 2018-ban megjelent transzkriptom szintű vizsgálatot talált, melynek eredményeit saját azonosított fehérjelistánkkal vetettük össze az egyezések felkutatása érdekében (78).

### **3.3.2. Gén ontológai (GO) és KEGG útvonal analízis**

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a LAPC4 és DUCAP sejtvonalak és rezisztens párjaiknak proteomikai analízisével azonosított, a rezisztens sejtekben eltérő expressziót mutató fehérjék milyen sejt szintű biológiai folyamatokban vesznek részt GO elemzést és KEGG útvonal analízist végeztünk, melyhez a STRING adatbázist használtuk. A vizsgálathoz a sejtvonalakban a statisztikailag szignifikánsan felül- és alulexpresszállódó fehérjéket használtuk fel.



### **3.4. A kiválasztott fehérjék szérumszintjének meghatározása**

#### **3.4.1. Szérum minták gyűjtése**

Vizsgálatainkhoz ENZA-, ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek szérum mintáit használtuk fel. A felhasznált szérum minták gyűjtése a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján és a Bécsi Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikáján, a betegek belegegyezésével történt. A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján történő mintagyűjtést a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága a TUKEB (RKEB) 256/2014 és 55-1/2014 számok alatt engedélyezte. A Bécsi Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikája a szérum mintákat az ECS 1986/2017 számú engedély alapján gyűjtötték. Az ENZA- és ABI-kezelt betegektől a kezelés megkezdése előtt (alapvonalis minta) és a kezelés megkezdése utáni 3. hónapban gyűjtünk szérum mintát, míg a DOC terápia esetén a kezelés kezdete előtt, valamint minden terápiás ciklus első napján veszünk szérum mintát.

A vérvétel után a csöveket 30-60 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd 10 percig 1500 x g fordulatszámon centrifugáltuk. Ezután a szérum mintákat laborkóddal ellátott csövekbe pipettáztuk és fagyasztódobozokban -80 °C-on felhasználásig tároltuk.

A kapott eredmények kiértékeléséhez szükségünk volt a betegek túlélési, valamint klinikopatológiai adataikra. A túlélési adatokat a Belügyminisztérium Személyi Nyilvántartási Hivatalától kértük ki, a klinikai és patológiai adatokat pedig a klinikánkon gyűjtött minták esetében a MedSol egészségügyi dokumentációs rendszerből kerestük ki, a Bécsi Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikájáról származó minták esetében pedig kollaborációs partnerünk bocsájtotta rendelkezésünkre. A betegek anonimizált adatait statisztikai kiértékelésre alkalmas programokban (Microsoft Excel, IBM SPSS) tároljuk. A kiértékeléshez az alábbi adatokat használtuk fel: életkor, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) státusz, fájdalom megléte, elsődleges lokális terápia típusa (sebészi- vagy sugárterápia), csont-, lágyszövet- és nyirokcsomó áttét jelenléte a kezelés megkezdése előtt, PSA koncentráció a kezelés megkezdése előtt és a kezelés alatt, PSA válasz. A PSA válasz megítéléséhez a Prostate Cancer Clinical Trials Working Group Criteria (PCWG) II iránymutatását követtük, ami a kezelés időtartama alatti PSA szint a kezelés előtti értékhez viszonyított legalább 50%-os csökkenését tekinti pozitív PSA válasznak.

### 3.4.2 Betegcsoportok

Az ELISA vizsgálatokhoz kiválasztott fehérjék, valamint a CGA és NSE szérumszintjét 3 eltérő betegszámú csoporton határoztuk meg.

Az első betegcsoport esetében a proteomikai vizsgálatunk kiértékelése során kiválasztott 4 fehérje (ALCAM, AGR2, IDH1 és NDRG1) szérumszintjét 72 ENZA-kezelt mCRPC beteg alapvonalán, valamint 64 kezelés megkezdése utáni 3. hónapban vett szérumszintjében határoztuk meg. A szérumszintjeiket 2013 és 2016 között gyűjtöttük olyan mCRPC betegektől, akik első vagy későbbi vonalban kaptak ENZA kezelést.

Mivel az első betegcsoport esetében azt találtuk, hogy a magasabb ALCAM szérumszintjeik összefüggésbe vannak az ENZA kezelt betegek rosszabb túlélésével, ezért megmértük az ALCAM szérumszintjét további 101 ABI- és 100 DOC-kezelt mCRPC beteg alapvonalán (kezelés előtti) szérumszintjében. Továbbá, 39 ABI-kezelt és 40 DOC-kezelt beteg esetében a 3. hónapban vett szérumszintjeiket is meghatároztuk. Az ABI esetében a szérumszintjeiket 2008 és 2015 között, míg a DOC esetében a szérumszintjeiket 2013 és 2019 között gyűjtöttük olyan betegektől, akik első vagy későbbi vonalban kaptak ABI vagy DOC kezelést.

A harmadik betegcsoport esetében három részre osztottuk a csoportunkat és a szérumszintjeiket CGA, PSA és NSE szintjét meghatároztuk egyrészt RPE-n átesett lokális PC betegek műtét előtti, valamint DOC- és ABI/ENZA-kezelt mCRPC betegektől szérumszintjében is. A vizsgálatokhoz 157 RPE előtti szérumszintjeiket használtuk fel, melyeket Urológiai Klinikán 2013 és 2018 között operált betegektől gyűjtöttünk. A DOC-kezelt betegek esetében 95 férfi 2013 és 2018 között gyűjtött kezelés előtti szérumszintjeiket használtuk fel. Továbbá a 2., 3., 4., 5. és 6. kezelési ciklusok gyűjtött szérumszintjeiket is rendelkezésünkre álltak 73, 67, 56, 54 és 47 beteg esetében. Az ABI/ENZA kezelésekkel kapcsolatban összesen 143 kezelés előtti szérumszintjeiket állt rendelkezésünkre olyan mCRPC betegektől, akik 2011 and 2018 között első vagy későbbi vonalban kaptak ENZA és ABI terápiát. Továbbá, 93 beteg esetében a kezelés megkezdése utáni 3. hónapban gyűjtött szérumszintjeiket is rendelkezésünkre álltak.

### 3.4.3. ALCAM, IDH1, AGR2 és NDRG1 szérumszintjének meghatározása

Az ALCAM fehérje szérumszintjének meghatározása DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, USA, DY656) segítségével történt a gyártó által előírt protokollnak

megfelelően. Az IDH1, AGR2 és NDRG1 fehérjék szérumszintjének meghatározásához szendvics ELISA kitéket használtunk (Cloud Clone Corp, USA, SEC285Hu, SEH839Hu; Aviva System Biology Corp, San Diego, USA, OKEH02359). A méréseket a gyártó utasításainak betartásával végeztük. Az ELISA kitéket Multiscan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific) segítségével olvastuk le 450 nm hullámhosszon. A fehérjék szérumszintjének meghatározását követően az eredményeket összevetettük a betegek klinikopatológiai és túlélési adataival.

#### **3.4.4. CGA, PSA és NSE szérumszintjének meghatározása**

A CGA, PSA és NSE szérumszintjét homogén szendvics fluoroimmun esszével határoztuk meg, melyhez a B·R·A·H·M·S KRYPTOR® automata berendezését (B·R·A·H·M·S GmbH, part of Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf/Berlin, Germany) használtuk. A kapott szérumszintjeiket a mérés után a betegek klinikopatológiai és túlélési adataival vetettük össze.

#### **3.5. Az ALCAM génexpresszió *in silico* vizsgálata**

Az *in silico* génexpressziós vizsgálathoz a TNMplot (<http://www.tnmplot.hu>) és a cBioPortal adatbázisokat használtuk (<https://www.cbioportal.org>). A TNMplot adatbázis segítségével vetettük össze az ALCAM expresszióját különböző tumortípusok és normál szöveti párjaik között, valamint összehasonlítottuk az ALCAM mRNS szöveti expresszióját normál prosztatata, lokális prosztatata daganat és prosztatarák metasztázis minták között (79). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az ALCAM expressziójának összefüggését a klinikopatológiai és túlélési adatokkal, 266 mCRPC beteg mRNS expressziós és klinikai adatait töltöttük le a TCGA adatbázisból a cBioPortal segítségével (80, 81).

#### **3.6. Sejtmodelles, funkcionális vizsgálatok**

##### **3.6.1. RNS izolálás**

Az ENZA érzékeny és rezisztens sejtekből történő RNS izolálásához az *RNeasy Plus Kit-tet* (Qiagen; 74134) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A kapott RNS minták koncentrációit és tisztaságát NanoDrop készülékkel és *Qubit 4 Fluorometer*

(Invitrogen; Q33238) segítségével határoztuk meg. Az izolált RNS mintákat -80°C-on tároltuk.

### 3.6.2. Fehérje izolálás

A sejtekből történő teljes fehérjeállomány izolálásához sejtlízis technikát alkalmaztunk. Első lépésként a 80%-os konfluenciát elért sejtekről leöntöttük a médiumot, majd kétszer mostuk jéghideg (4°C) PBS-sel a sejtek felületét. Ezután RIPA puffert adtunk a sejtekhez, mely 1:100 hígításban tartalmazott proteáz és foszfatáz inhibitorot (*Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, ThermoFisher Scientific; 78440). A sejteket 10 percig jégen állni hagytuk, majd sejtkeparó segítségével szedtük fel a flaskák aljáról. Ezután a lizált fehérje elegyet centrifuga csövekbe átpipettázva alaposan szuszpendáltuk és vortexeltük, majd 15 percig jégen inkubáltuk. Inkubálás után a csöveket 15 percig, 4°C-on, 15.000g fordulatszámon centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszót, mely a sejtlizátumot tartalmazza átpipettáztuk egy újabb csőbe és felhasználásig -80°C-on tároltuk. A sejtlizátumok fehérjekoncentrációjának meghatározásához BCA módszert használtunk (*Pierce BCA Protein Assay Kit*; Thermo Scientific; 23227).

### 3.6.3. Valós idejű kvantitatív PCR

Az ENZA érzékeny és rezisztens sejtek génexpresszióját valós idejű kvantitatív reverz transzkriptáz kvantitatív real-time PCR (RT-qPCR) technikával határoztuk meg, melyhez *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems; 4376600) berendezést használtunk. A vizsgálathoz először a sejtekből izolált RNS-t cDNS-sé írtuk át, melyhez *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (ThermoFisher Scientific; 4368814) használtunk. Az így átírt cDNS mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A RT-qPCR során a 96-lyukú *MicroAmp Fast Optical Reaction Plate* (Applied Biosystems; 4366932) egyes reakciócsöveibe az alábbi összetételű reakcióelegyet mértünk be:

- 10 µl *TaqMan Universal Master Mix II* (Applied Biosystems; 4440044)
- 1 µl *TaqMan Gene Expression Assay*-t (primer)  
(Applied Biosystems; 4331182)
- 3 µl 100 ng/µl koncentrációjú cDNS minta

- 6 µl PCR tisztaságú víz

Minden minta esetében 3 biológiai és 3 technikai párhuzamost alkalmaztunk. Belső kontrollként a *HPRT1* háztartási gént használtunk, valamint pozitív és negatív kontroll mintát. A felhasznált *TaqMan Gene Expression Assay*-k pontos beazonosítására a 4. táblázat szolgál.

**4. táblázat** - A rt-qPCR reakciókhoz felhasznált TaqMan Gene Expression Assay-k.

Gén neve	Assay ID	Jelölő festék
ALCAM	Hs00977641_m1	FAM-MGB
IDH1	Hs00271858_m1	
AGR2	Hs00356521_m1	
HPRT	Hs02800695_m1	

Az 5. táblázatban jelölt ciklusszámmal és hőmérsékleten szerint zajlottak a PCR reakciók.

**5. táblázat** – A RT-qPCR reakció lépései és hőprofilja.

	Hőmérséklet	Idő	
UNG inkubáció	50 C°	2 perc	
Polimeráz aktiváció	95 C°	10 perc	
PCR	Denaturálás	95 C°	15 mp
(40 ciklus)	Anneálás/extenzió	60 C°	1 perc

**3.6.4. Western blot**

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a fehérjeexpresszió mértékét Western blot analízist alkalmaztunk. A vizsgálathoz előkészített fehérjemintákból 20 µg-ot vittünk fel a 4-12 %-os géltre (*Bolt 4-12% Bis-Tris Plus Gel, Invitrogen; NW04120BOX*) és elektroforézis segítségével választottuk szét a fehérjéket. Az elektroforézishez 1x MES-SDS (Invitrogen, B0002) elektroforézis puffert használtunk, a reakció 200V feszültségen 22 percig tartott. Ezután a gélt száraz blottoló (*iBlot 2 Gel Transfer Device, Invitrogen; IB21001*) segítségével nitrocellulóz membránra (*iBlot 2 Transfer Stack, Invitrogen; IB23001*) blottoltuk. A blottolást az alábbi feszültségen végeztük el: 20V - 1 percig, 23V – 4 percig, 25V – 2 percig.

Ezután a membránt az antitest specifikációját figyelembe véve 5% NFDm/TBST (NFDm – zsírintes száraz tej) vagy 5% BSA/TBST (BSA – borjú szérum albumin)

pufferben inkubáltuk legalább 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezután az elsődleges antitesttel inkubáltuk a membránt egy éjszakán át 4°C-on, majd a membránt alapos TBST-vel való mosást követően a másodlagos antitesttel inkubáltuk egy órán át, szobahőmérsékleten. Belső kontrollként anti-GAPDH háztartási gént használtunk. A felhasznált antitestek adatait a 6. táblázat tartalmazza. A másodlagos antitesttel való blokkolás, majd alapos mosást követően az előhíváshoz SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate-ot használtunk (Thermo Scientific; 34577). Az előhívásnál a membránt 3-5 percig inkubáltuk, majd iBright Imaging System (Invitrogen; A32748) segítségével készítettünk digitális felvételt.

#### 6. táblázat – A Western blot vizsgálatokhoz felhasznált antitestek és jellemzőik

Antitest	Gyártó	Katalógusszám	Klonalitás	Antitest koncentráció	Puffer	Molekulásúly (kDa)
anti-ALCAM	Abcam	ab109215	monoklonális (nyúl)	1:10000	5% NFD/MTBST	100-105
anti-GAPDH	Abcam	ab8245	monoklonális (egér)	1:6000	5% BSA/TBST	36-40
anti-nyúl	Abcam	ab6721	poliklonális (kecske)	1:7500		
anti-egér	Abcam	ab6789	poliklonális (kecske)	1:7500		

#### 3.6.5. Sejtéletképességi vizsgálatok

A sejtéletképességi vizsgálatunk célja volt, hogy meghatározzuk az ENZA érzékeny és rezisztens sejtek ENZA hatóanyaggal szemben mutatott IC<sub>50</sub> értéket. Az IC<sub>50</sub> érték azt a koncentrációt jelöli, mely hatására a kezelt sejtpopuláció 50%-a elpusztul. A vizsgálatokhoz elsőként 2500 sejtet ültettünk ki a 96-os sejtenyésző lemez megfelelő lyukaiba, majd 24 órás inkubáció után eltávolítottuk a médiumot és 100 µl ENZA-t is tartalmazó médiumot adtunk a sejtekhez. A sejtekről 3 nap múlva lecseréltük a médiumot és friss, kezelőoldatot is tartalmazó médiumot adtunk a sejtekhez. A vizsgálatokhoz minden vizsgált kondíció esetében 4 párhuzamost használtunk (technikai párhuzamos). A negatív kontroll esetében a sejtek nem részesültek kezelésben, továbbá oldószeres kontrollt is használtunk, mely 0,1% DMSO-t (dimetil-szulfoxid) tartalmazott. Azokhoz a lyukakhoz, amelyekbe nem ültettünk ki sejteket, 100-100 µl PBS-t adtunk, a médium evaporációjának csökkentése érdekében. A kezelés kezdetétől eltelt 6. napon a sejtekhez 10-10 µl WST-1 reagenst (CELLPRO-RO, Roche) adtunk, melyet 4 órás 37°C-on történő inkubáció követett. A lyukak optikai denzitását spektrofotométer segítségével 450 nm-en mértük le 690 nm-es háttérkorrekció mellett. Kísérleteinket legalább háromszor ismételtük meg (biológiai párhuzamosok).

### 3.6.6. Géncsendesítés siRNS transzfekcióval

Az *ALCAM* gén expressziójának csendesítését az ENZA érzékeny és rezisztens sejtekben specifikus siRNS molekula médiumba való transzfektálásával értük el. Az siRNS-et (Dharmacon; *ALCAM*: L-004574-00-0005), mely liofizált formában érkezett, 1x-es siRNS pufferben (Dharmacon, Cat. No: B-002000UB100) oldottuk fel. Negatív kontroll esetében nem-célzó (*non-targeting control pool on-target plus*) siRNS-rel (Dharmacon; D-0018101005) transzfektáltuk a sejteket.

A csendesítéshez 200.000 sejtet 6 lyukú sejttenyésztő lemezekre ültettük ki antibiotikum mentes médiumban. Amikor a sejtek elérték a 70-80%-os konfluenciát, lecseréltük a médiumot és 1750 µl friss antibiotikum mentes médiumot és 250 µl siRNS-t tartalmazó transzfekciós elegyet adtunk a sejtekhez.

A transzfekciós elegy összetétele reakciónként:

- 40 pmol siRNS
- 7 µl *Lipofectamine RNAiMAX* transzfekciós reagens (Invitrogen; 13778150)
- 250 µl Opti-MEM médium (Gibco; 319850070)

A transzfekciós elegyet összemérés után 10 percre szobahőmérsékleten inkubáltuk, annak érdekében, hogy kialakuljon a siRNS-lipid komplex. A sejteket 8-24 órán át inkubáltuk a transzfekciós eleggyel, majd friss, antibiotikum mentes médiumot adtunk a sejtekhez. A továbbiakban a transzfektált sejteken a 3.6.5. alfejezetben leírtak szerinti sejtleletképeségi vizsgálatokat végeztünk. A géncsendesítés ellenőrzése érdekében a párhuzamosan tenyésztett sejtekből 48-72 órán belül fehérjét lizáltunk, majd a géncsendesítés hatékonyságáról Western blot módszerrel győződünk meg.

### 3.7 Statisztikai kiértékelés

A statisztikai kiértékelést SPSS 23.0 program segítségével végeztük el. A mért szérumszintek és a különböző klinikopatológiai faktorok közötti kapcsolatot Mann-Whitney U-teszttel (Wilcoxon rank-sum teszt) határoztuk meg. A szérumszintek és a betegek túlélése közötti kapcsolat kiértékeléséhez Kaplan-Meier görbét, long-rank tesztet és Cox-univariancia analízist alkalmaztunk. Az univariancia analízis során a túléléssel szignifikáns változókat multivariancia analízisben

vizsgáltuk tovább. Az ALCAM hosszútávú túlélést jelző képességének szenzitivitását és specifitását ROC-görbe (Receiver Operating Characteristic plot) analízis segítségével értékeltük ki. Így határoztuk meg azt a koncentráció értéket (cut-off), amely segíthet elkülöníteni a magas és alacsony rizikójú betegeket a túlélés szempontjából.

Az RT-qPCR vizsgálatunk kiértékelését Microsoft Excel szoftver segítségével végeztük, mely során a célgének relatív expresszióját  $\Delta\Delta C_t$  számítási módszerrel határoztuk meg. Normalizáláshoz *HPRT1* belső kontroll gént használtunk.

A Western blot vizsgálataink kiértékeléséhez ImageJ szoftvert használtunk, mely során denzitometriálást végeztünk a fehérje expresszió kvantifikálására.

A WST-1 életképességi tesztek kiértékeléséhez első lépésben a nyers abszorbancia értékekből levontuk a háttér értékeket, majd kivontuk a háttérkorrekció értékeket. Ezután a kezeléenkénti 4 technikai párhuzamos értékének átlagát és szórását határoztuk meg, majd a relatív életképesség meghatározásához a kezeletlen sejtek átlagos abszorbancia értékéhez viszonyítottunk.



## 4. Eredmények

### 4.1 Az ENZA rezisztenciával összefüggést mutató fehérjék azonosításával foglalkozó kutatásunk eredményei

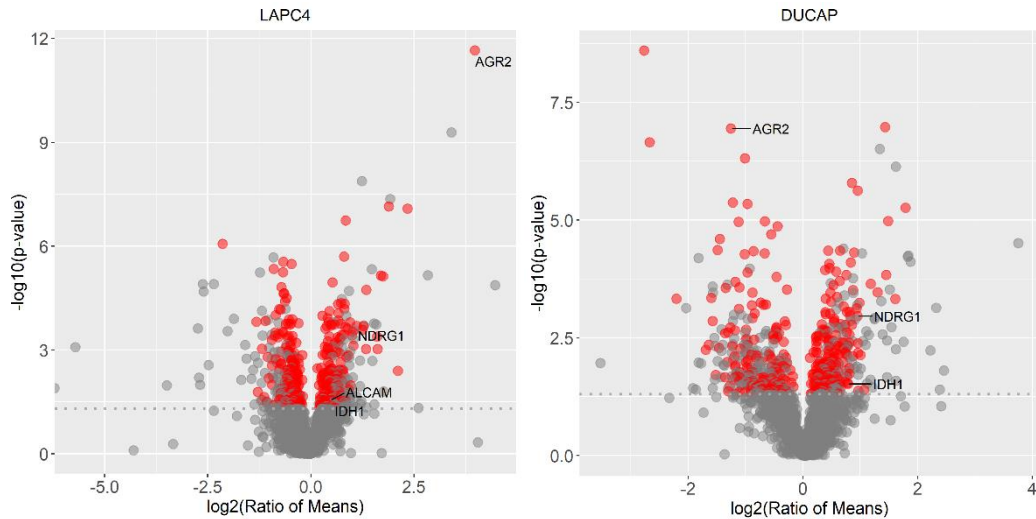
#### 4.1.1 A proteomikai vizsgálatok eredményei

Az ENZA-érzékeny (LAPC4, DUCAP) és -rezisztens (LAPC4-ER, DUCAP-ER) sejtvonalakon végzett teljes fehérjeanalízis vizsgálatunkhoz LC-MS/MS módszert alkalmaztunk. A vizsgálatot a Bochumi Ruhr Egyetem Orvosi Proteomikai Központjában dolgozó kollaborációs partnereink végezték el. A tömegspektroszkópiával kapott eredményeket excel táblázat formájában bocsájtották rendelkezésünkre, mely tartalmazta az azonosított fehérjék UniProt azonosítóját, a gén nevét, az egyes fehérjéket azonosító egyedi peptidek számát, a tömegspektrométer által mért abszolút abundancia értékét, továbbá az expressziós változás mértékét és a szignifikancia értékét. A proteomikai vizsgálat a LAPC4 és LAPC4-ER sejtvonalpár esetében összesen 2303 fehérjét, míg a DUCAP és DUCAP-ER sejtvonalpár esetében 2483 fehérjét azonosított (7. táblázat).

**7. táblázat** - A proteomikai vizsgálat által azonosított fehérjék száma és eloszlása sejtvonalpáronként.

	Összes azonosított fehérje	Legalább 2 egyedi peptid alapján azonosított fehérje	Szignifikánsan legalább 2x felülexpresszáldott fehérje az ER sejtekben	Szignifikánsan legalább 2x downregulálódott fehérje az ER sejtekben
LAPC4 LAPC4-ER	2 303	1 467	197	188
DUCAP DUCAP-ER	2 483	1 567	193	153

A kapott fehérjék közül azokat tekintettük potenciálisan a rezisztenciában részt vevő fehérjéknek, amelyeket legalább 2 egyedi peptid azonosított és szignifikánsan, legalább kétszeres mértékben mutattak eltérést egymáshoz képest az egyes sejtvonal párokban. Ennek megfelelően a felülexpresszáldott fehérjék száma a LAPC4-ER sejtekben 197, míg a DUCAP-ER sejtekben 193 volt. A LAPC4 és DUCAP PC sejteken végzett proteomikai vizsgálatok eredményeinek szemléltetésére *Volcano-plot* ábrákat használtunk (6.ábra).



**6. ábra** – A LAPC4 vs LAPC4-ER és DUCAP vs DUCAP-ER sejtek proteomikai analizisével kapott eredmények ábrázolása *Volcano-plot* diagramon. Az ábrán minden egyes pont egy-egy fehérjét jelöl. A vízszintes szaggatott vonal felett helyezkednek el szignifikáns változást ( $p$ -érték  $\leq 0,05$ ) mutató fehérjék, míg a legalább kétszeres expressziós változást mutató fehérjék a vulkán kráterétől függőleges irányba helyezkednek el (balra a rezisztensben csökkent, míg jobbra a rezisztensben emelkedett expressziót mutató fehérjék találhatóak).

#### 4.1.2 A proteomikai eredmények bioinformatikai kiértékelése

A 390 szignifikánsan felülexpresszáldó fehérje közül bioinformatikai szűrési módszerekkel választottuk ki azokat, melyek részt vehetnek a rezisztencia kialakulásában, valamint potenciális biomarkerként alkalmazhatóak lehetnek a klinikumban. Ennek érdekében 3 szűrési módszert alkalmaztunk, melyek a 3.3.1 fejezetben kerültek bemutatásra.

##### 4.1.2.1 A fehérjék rangsorolása alapján történő kiválasztás eredményei

Az első szűrési módszerünkkel pontoztuk a fehérjelistánkat a 3.3.1.1 fejezetben leírtak szerint. A pontozási szempontokat figyelembe véve az alábbi fehérjéket választottuk ki: AGR2 (anterior gradient protein 2), NDRG1 (N-myc downregulated gene 1) és az ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule) (8. táblázat).

## 8. táblázat – A proteomikai vizsgálat alapján felülregulálódó fehérjék pontozás szerinti kiválasztása

Fehérje	Sejtvonal	Fold change mértéke	ELISA kit elérhetősége?	Inhibitor elérhetősége?	Élek száma pont	Fold change pont	Prognosztikus /prediktív érték pont	Pontszám
AGR2	LAPC4 ER	15,79	igen	igen	0	3	2	5
NDRG1	LAPC4 ER	2,00	igen	nem	1	0	2	3
ALCAM	LAPC4 ER	1,39	igen	nem	0	1	2	3

### 4.1.2.2 Szekretált fehérjék kiválasztásának eredményei

A második kiválasztási módszerrel az ENZA-rezisztens sejtekben szignifikánsan felülexpresszáldó fehérjék közül a szekretált, így a szérumban nagy valószínűséggel jelenlevő fehérjéket választottuk ki. A szekretált fehérjék kiválasztásában a Debreceni Egyetem Humán genetikai Tanszék munkatársai által kifejlesztett predikciós algoritmus az alábbi 5 szekretálódó fehérjét azonosította: AGR2, PFKP, APOD, ALCAM, DYNLT3. A fehérjék közül az AGR2 és ALCAM fehérjéket választottuk ki a további vizsgálatokra, mert az ő esetükben volt elérhető ELISA kit.

### 4.1.2.3 Összehasonlító analízis alapján történő kiválasztás eredményei

A harmadik szűrési módszerünkkel összehasonlítottuk a proteomikai vizsgálattal kapott fehérje listánkat *Qian és mtsai.* által ENZA-rezisztens és érzékeny sejteken végzett génexpressziós eredményeivel. Az összehasonlító analízis alapján az alábbi 7 fehérjét találtunk: GALK2, PTGR1, SCIN, IDH1, AHCY, THOP1, SF3B5. Ezek a fehérjék szignifikánsan emelkedett expressziót mutattak mind a saját, mind *Qian és mtsai.* vizsgálatában. Közülük a további szérumvizsgálatokra az IDH1 fehérjét választottuk ki.

### 4.1.3 GO elemzés és KEGG útvonal analízis eredményei

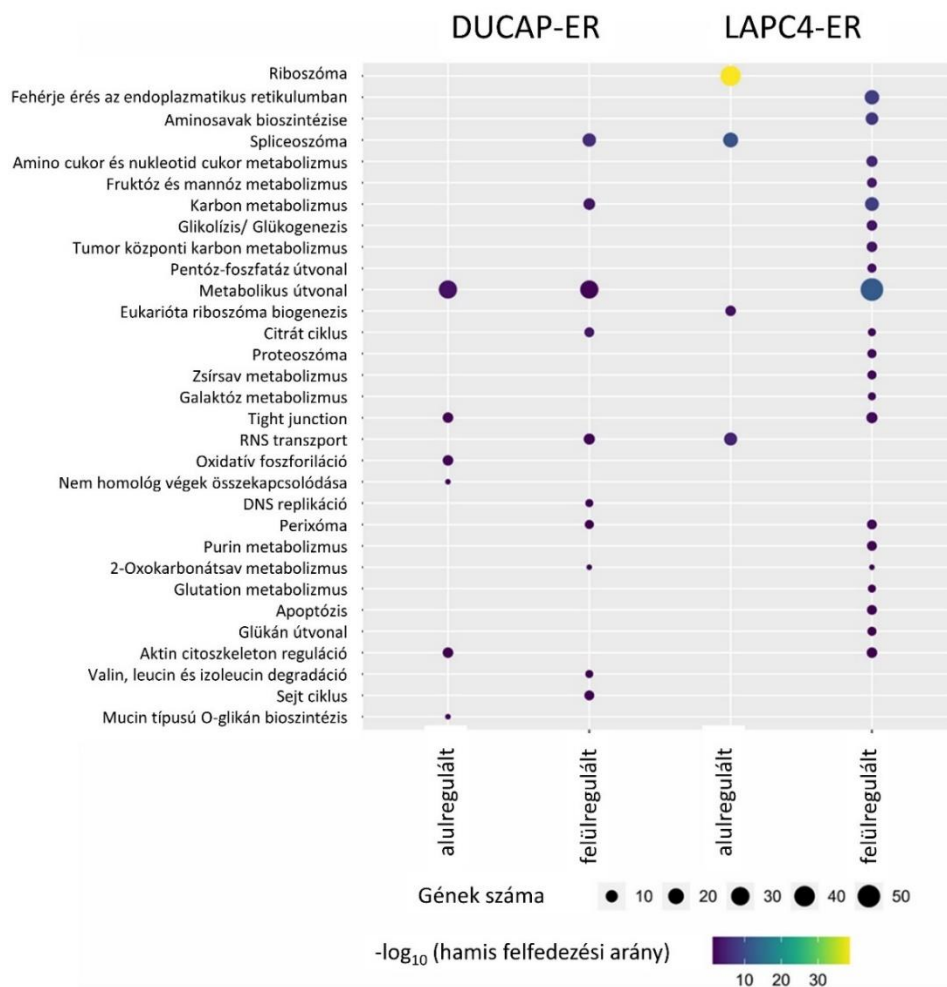
A GO és KEGG analízis során a sejtvonalakban szignifikánsan eltérő expressziót mutató fehérjéket a 3.3.2. alfejezetben leírtaknak megfelelően vizsgáltuk. A GO elemzés során arra voltunk kíváncsiak, hogy a rezisztens sejtvonalakban melyek azok a sejszintű funkcionális folyamatok, amelyek domináns módon érintettek lehetnek a rezisztencia kialakulásában. Az analízis alapján a LAPC4-ER sejtvonalban mind a felülregulációt,

mind pedig az alulregulációt mutató fehérjék, míg a DUCAP-ER sejtvonalon esetében a felülregulált fehérjék vesznek részt a legtöbb vizsgált funkcionális folyamatban (7.ábra). A DUCAP-ER sejtvonalonban felülregulálódott fehérjék legnagyobb mértékben a metabolikus folyamatokban, a génexpresszió szabályozásában, továbbá a sejt felépítéséhez és RNS éréshez szükséges folyamatokban vesznek részt. Míg a LAPC4-ER sejtvonalon esetében szintén domináns a metabolizmushoz, a bioszintézishez és az RNS éréshez kapcsolódó folyamatok érintettsége, de ezek mellett a felülregulációt mutató fehérjék a katabolikus folyamatokban és a fehérjék lokalizációját irányító folyamatokban vesznek részt domináns módon.



**7. ábra** – A LAPC4-ER és DUCAP-ER sejtvonalakban alul- és felülregulációt mutató fehérjék GO vizsgálata. A pontok mérete a fehérjék számát, a pontok színe pedig a szignifikancia mértékét jelöli.

A KEGG útvonal vizsgálat a GO analízis kiegészítését eredményezte (8.ábra). Az analízis alapján a LAPC4-ER sejtvonaltalban felülexpresszált fehérjék vesznek részt a legtöbb biológiai útvonalban, többek között különböző metabolikus folyamatokban, mint például a karbon és aminosav metabolizmus. Azonban a DUCAP-ER sejtek esetén mind a felül, mind az alulregulálódott fehérjéknél megfigyelhetjük a metabolikus útvonalakban való aktivitást. Továbbá, megfigyelhető, hogy az ENZA rezisztens sejtekben felülexpresszáldó fehérjék a DNS replikációjához és az RNS éréséhez kapcsolódó útvonalakban mutatnak nagyobb aktivitást, amely megegyezik a GO analízis eredményével (8.ábra).



**8. ábra** – A LAPC4-ER és DUCAP-ER sejtvonaltalban alul- és felülregulációt mutató fehérjék KEGG módszer szerinti vizsgálata. A pontok mérete a fehérjék számát, a pontok színe pedig a szignifikancia mértékét jelöli.

### 4.1.3 ELISA vizsgálatok eredményei

#### 4.1.3.1 Betegkohort alapadatok

Az ELISA vizsgálatokhoz felhasznált beteg csoportok alapadatait a 9. táblázat foglalja össze. Az ENZA-kezelt mCRPC betegek medián életkora 73 év (tartomány: 56-89), a kezelés előtti medián PSA szint 65,5 ng/ml volt. Csont- 61, nyirokcsomó- 16, lágyrész metasztázisa 6 betegnek volt. Kutatásunk elsődleges végpontjának a teljes túlélést tekintettük. A vizsgálatba bevont betegek közül 48 (66%) halálozott el a mérés idejében. A medián követési idő 19 hónap volt.

Az ABI-kezelt mCRPC betegek medián életkora 71 év (tartomány: 54-90), kezelés előtti medián PSA értékük 65,3 ng/ml volt. Csont- 89, nyirokcsomó- 12, lágyrész metasztázisa 8 betegnek volt. A kutatásunkba bevont betegek közül 69 (68%) hunyt el. A medián követési idő 21 hónap volt.

A DOC-kezelt mCRPC betegek medián életkora 70 év (tartomány: 43-86), kezelés előtti medián PSA értékük 88,8 ng/ml volt. Csont- 94, nyirokcsomó- 38, lágyrész metasztázisa 13 betegnek volt. A vizsgálatba bevont DOC-kezelt férfiak közül 78 (78%) hunyt el. A medián követési idő 23 hónap volt.

#### 4.1.3.2 A vizsgált fehérjék szérumszintjeinek összefüggése a klinikopatológiai paraméterekkel

Nem találtunk szignifikáns összefüggést a vizsgált markerek szérumszintje és a betegek életkora, a korábbi terápiája között (10. és 11. táblázat). Az ENZA-kezelt esetében magasabb szérumszintű ALCAM koncentrációkat mértünk azoknál a betegeknél, akiknek a kezelés alatt a PSA értékük nem érte el a legalább 30%-os csökkenést (10.táblázat). Azoknál az ABI-kezelt betegeknél, akiknek a kezelés megkezdésekor fájdalmuk volt, valamint metasztázissal rendelkeztek szignifikánsan magasabb ALCAM szérumszintet detektáltunk ( $p=0,013$ ,  $p=0,047$ ). Továbbá, mind a DOC- és mind az ABI-kezelt betegcsoport esetén szignifikánsan magasabb ALCAM szérumszintet mértünk azoknál a betegeknél, akiknek az ECOG státusz szerint rosszabb általános állapotuk volt ( $p=0,015$ ,  $p=0,007$ ) (10.táblázat). Az ENZA-kezelt betegcsoport esetén, az IDH1 szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb volt a csont metasztázissal diagnosztizált

betegek esetében ( $p=0,033$ ), míg az ARG2 szintje a lágyrész metasztázissal diagnosztizált betegek esetén volt alacsonyabb ( $p=0,010$ ). Az NDRG1 fehérje esetében szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt detektáltunk azoknál a betegeknél, akik nem adtak PSA választ az ENZA kezelésre ( $p=0,011$ ) (11. táblázat).

**9. táblázat - Az ENZA-, ABI- és DOC-kezelt betegek klinikopatológiai adatai**

PS – performance status, RPE – radikális prosztata eltávolítás

	ENZA	ABI	DOC
Betegek száma	72	101	100
Medián életkor (tartomány)	73 (56-89)	71 (54 - 90)	70 (43 - 86)
PSA (medián, ng/ml)	69,48 (0,23 - 8422)	65,30 (0,10 - 6785.0)	88,77 (3,20 - 6115,41)
ECOG PS (%)			
0	49 (68)	57 (56)	65 (65)
1	10 (14)	16 (16)	26 (26)
2	4 (6)	0	9 (9)
ismeretlen	9 (12)	28 (28)	0
Fájdalom			
igen	19 (26)	36 (35)	-
nem	46 (64)	50 (50)	-
ismeretlen	7 (10)	15 (15)	100 (100)
Metasztázis			
csont	61 (85)	89 (89)	94 (94)
nyirokcsomó (>2cm)	16 (22)	12 (12)	38 (38)
lágyrész	5 (7)	9 (9)	13 (13)
Korábbi lokális terápia			
RPE	29 (40)	48 (48)	18 (18)
radiáció	17 (24)	21 (21)	12 (12)
PSA válasz (%)			
>30	50 (69)	73 (73)	55 (55)
>50	47 (65)	65 (65)	45 (45)
>90	26 (36)	33 (33)	26 (26)
Elhunyt betegek száma	48 (66)	69 (69)	78 (78)
Teljes túlélés (medián)	19,9	21,6	22,9

**10. táblázat – Az ENZA-, ABI- és DOC-kezelt betegek klinikopatológiai paramétereit és az ALCAM szérumszintjeit közötti összefüggéseket.**

RPE – radikális prosztata eltávolítás PS – performance status

	ENZA			ABI			DOC		
	n	ALCAM szérumszintje (ng/ml) medián (tartomány)	P	n	ALCAM szérumszintje (ng/ml) medián (tartomány)	P	n	ALCAM szérumszintje (ng/ml) medián (tartomány)	P
	72			101			100		
<b>Életkor (évek)</b>									
≤ 72	35	136,1 (82,3 - 400,0)	0,673	56	121,4 (45,2 - 389,2)	0,83	54	120,7 (51,9 - 400,0)	0,582
> 72	37	123,6 (0 - 400,0)		45	120,5 (55,1 - 400,0)		46	113,0 (47,2 - 219,8)	
<b>Korábbi terápia</b>									
nem	28	133,7 (82,5 - 400,0)	0,677	34	131,9 (55,1 - 400,0)	0,556	71	129,0 (51,9 - 400,0)	0,099
igen	44	127,4 (0 - 400,0)		67	119,9 (45,2 - 389,2)		29	107,4 (47,2 - 219,8)	
<b>Korábbi RPE</b>									
nem	43	119,5 (82,5 - 400,0)	0,209	53	118,1 (45,2 - 400,0)	0,801	82	114,2 (51,9 - 400,0)	0,333
igen	29	146,3 (0 - 400,0)		48	122,3 (49,6 - 389,2)		18	118,9 (47,2 - 242,8)	
<b>Korábbi radiáció</b>									
nem	55	140,2 (0 - 400,0)	0,101	80	122,7 (49,6 - 400,0)	0,569	88	126,7 (47,2 - 400,0)	0,110
igen	17	117,1 (84,8 - 256,1)		21	117,1 (45,2 - 389,2)		12	93,8 (64,9 - 219,8)	
<b>Terápia</b>									
Első vonal	15	117,0 (82,3 - 400,0)	0,261	38	131,9 (45,2 - 400,0)	0,572	97	113,9 (47,2 - 400,0)	0,564
2. vagy későbbi ismeretlen	57 0	136,1 (0 - 400,0)		60 3	118,8 (49,6 - 389,2)		3 0	135,0 (60,5 - 400,0)	
<b>ECOG PS</b>									
0	49	132,3 (0 - 400,0)	0,785	57	115,1 (45,2 - 389,2)	<b>0,007</b>	65	107,0 (47,2 - 315,9)	<b>0,015</b>
1-2 ismeretlen	14 9	122,4 (83,04 - 367,9)		16 28	144,2 (56,8 - 400,0)		35 0	135,0 (60,4 - 400,0)	
<b>Fájdalom</b>									
nem	46	122,4 (0 - 400,0)	0,075	50	115,9 (45,2 - 389,2)	<b>0,013</b>	-	-	-
igen ismeretlen	19 7	153,9 (83,5 - 400,0)		36 15	135,8 (56,8 - 400,0)		- -	- -	
<b>Nyirokcsomó státusz</b>									
N -	56	131,9 (0 - 400,0)	0,813	85	121,2 (45,2 - 400,0)	0,919	62	113,0 (47,2 - 400,0)	0,867
N + ismeretlen	16 0	124,350 ( 92,2 - 256,1)		15 1	118,1 (95,4 - 198,8)		38	126,7 (51,8 - 400,0)	
<b>Lágyrész metasztázis</b>									
nem	67	128,0 (0 - 400,0)	0,450	90	120,3 (45,2 - 400,0)	0,817	87	111,2 (47,2 - 219,8)	0,056
igen ismeretlen	5 0	114,2 (83,5 - 153,9)		9 2	136,4 (75,1 - 386,8)		13	153,7 (67,9 - 242,8)	
<b>Csont metasztázis</b>									
nem	11	114,6 (88,0 - 171,4)	0,133	11	114,4 (56,8 - 138,9)	0,062	6	100,9 (64,9 - 219,8)	0,384
igen ismeretlen	61 0	136,1 (0 - 400,0)		89 1	122,6 (45,2 - 400,0)		94 0	116,1 (47,2 - 400,0)	
<b>PSA válasz</b>									
igen	60	121,1 (0 - 400,0)	0,133	87	119,9 (45,2 - 400,0)	0,284	15	107,4 (60,5 - 343,8)	0,597
nem ismeretlen	12 0	148,9 (90,6 - 203,1)		14 0	126,3 (67,3 - 233,8)		71 14	117,8 (47,2 - 400,0)	
> 30%	50	121,9 (0 - 400,0)	<b>0,045</b>	73	119,9 (45,2 - 400,0)	0,322	55	104,8 (57,6 - 400,0)	0,910
< 30% ismeretlen	22 0	147,6 (68,3 - 400,0)		28 0	121,8 (55,1 - 400,0)		31 14	129,0 (47,2 - 400,0)	
> 50%	47	118,3 (0 - 400,0)	0,083	65	122,2 (45,2 - 400,0)	0,972	45	107,8 (57,6 - 400,0)	0,551
< 50% ismeretlen	25 0	146,3 (68,3 - 400,0)		36 0	118,8 (55,1 - 286,0)		41 14	126,5 (47,2 - 400,0)	
> 90%	26	117,1 (82,3 - 400,0)	0,253	33	122,2 (52,9 - 361,0)	0,834	26	107,2 (57,6 - 400,0)	0,683
< 90% ismeretlen	46 0	143,3 (0 - 400,0)		68 0	120,2 (45,2 - 400,0)		60 14	137,4 (47,2 - 400,0)	
<b>teljes kohort</b>	72	127,8 (0 - 400,0)		101	120,5 (45,2 - 400,0)		100	114,2 (47,2 - 400,0)	



**11. táblázat – Az ENZA-kezelt betegek klinikopatológiai paramétereit és az AGR2, IDH1 és NDRG1 fehérjék szérumszintjei közötti összefüggéseket.**

RPE – radikális prosztata eltávolítás PS – performance status

	n	AGR2 szérumszint (pg/ml) medián (tartomány)	P	IDH1 szérumszint (ng/ml) medián (tartomány)	P	NDRG1 szérumszint (ng/ml) medián (tartomány)	P
<b>Életkor (évek)</b>							
≤ 72	35	411,1 (27,4 - 2962,0)	0,168	2641,0 (1430,0 - 7406,0)	0,870	28 530,0 (6985,0 - 55 290,0)	0,390
> 72	37	483,2 (64,6 - 1825,0)		2791,0 (1411,0 - 4571,0)		25 410,0 (7762,0 - 67 270,0)	
<b>Korábbi terápia</b>							
nem	28	449,5 (44,9 - 1825,0)	0,890	2537,5 (1430,0 - 7406,0)	0,234	28 370,0 (11 290,0 - 67 270,0)	0,229
igen	44	424,8 (27,4 - 2962,0)		2835,0 (1411,0 - 4410,0)		24 870,0 (6985,0 - 55 290,0)	
<b>Korábbi RPE</b>							
nem	43	435,4 (44,9 - 2962,0)	0,986	2685,0 (1430,0 - 7406,0)	0,744	25 830,0 (8848,0 - 67 270,0)	0,428
igen	29	496,2 (27,4 - 1468,0)		2703,0 (1411,0 - 4410,0)		25 060,0 (6985,0 - 46 510,0)	
<b>Korábbi radiáció</b>							
nem	55	456,6 (27,4 - 1825,0)	0,995	2609,0 (1411,0 - 7406,0)	0,323	27 580,0 (6985,0 - 67 270,0)	0,533
igen	17	414,1 (163,1 - 2962,0)		3008,0 (1713,0 - 3669,0)		24 690,0 (8848,0 - 55 290,0)	
<b>Terápia</b>							
Első vonal	15	592,8 (168,7 - 2962,0)	0,092	2791,0 (1660,0 - 4571,0)	0,906	21 190,0 (8596,0 - 56 700)	0,138
2. v. későbbi ismeretlen	57	411,1 (27,4 - 1538,0)		2641,0 (1411,0 - 7406,0)		27 785,0 (6985,0 - 67 270,0)	
0	0						
<b>ECOG PS</b>							
0	49	496,7 (27,38 - 2962,0)	0,498	2791,0 (1411,0 - 7406,0)	0,869	25 965,0 (6985,0 - 67 270,0)	0,307
1-2	14	402,7 (163,1 - 1538,0)		2559,0 (1660,0 - 3784,0)		21 890,0 (8848,0 - 55 290,0)	
ismeretlen	9						
<b>Fájdalom</b>							
nem	46	412,6 (27,4 - 2962,0)	0,299	2615,5 (1411,0 - 7406,0)	0,341	26 640,0 (6985,0 - 67 270,0)	0,196
igen	19	681,5 (64,6 - 1538,0)		2899,0 (1436,0 - 4387,0)		19 705,0 (9773,0 - 46 260,0)	
ismeretlen	7						
<b>Nyirokcsomó státusz</b>							
N -	56	439,2 (27,4 - 2962,0)	0,978	2587,5 (1430,0 - 7406,0)	0,607	25 620,0 (6985,0 - 67 270,0)	0,529
N +	16	435,4 (111,4 - 1468,0)		2927,0 (1411,0 - 3474,0)		25 935,0 (13910,0 - 55 290,0)	
ismeretlen	0						
<b>Lágyrész met.</b>							
nem	67	447,7 (27,4 - 2962,0)	<b>0,010</b>	2703,0 (1411,0 - 7406,0)	0,915	25 770,0 (6985,0 - 67 270,0)	1,000
igen	5	111,4 (64,6 - 496,2)		2609,0 (1749,0 - 3865,0)		26 100,0 (11000,0 - 46 260,0)	
ismeretlen	0						
<b>Csont metasztázis</b>							
nem	11	892,8 (111,4 - 2962,0)	0,568	3009,0 (2054,0 - 4571,0)	<b>0,033</b>	24 200,0 (8596,0 - 56 700,0)	0,657
igen	61	435,9 (27,4 - 1538,0)		2599,0 (1411,0 - 7406,0)		26 640,0 (6985,0 - 67 270,0)	
ismeretlen	0						
<b>PSA válasz</b>							
igen	60	588,2 (27,4 - 1468,0)	0,311	2663,0 (1430,0 - 7406,0)	0,546	28 125,0 (8596,0 - 67 270,0)	<b>0,023</b>
nem	12	412,6 (37,7 - 2962,0)		2838,5 (1411,0 - 3784,0)		21 755,0 (6985,0 - 35 050,0)	
ismeretlen	0						
> 30%	50	452,2 (27,4 - 1468,0)	1,000	2587,5 (1430,0 - 7406,0)	0,092	27 315,0 (8848,0 - 67 270,0)	0,379
< 30%	22	435,7 (44,9 - 2962,0)		2941,0 (1411,0 - 4410,0)		23 335,0 (6985,0 - 55 290,0)	
ismeretlen	0						
> 50%	47	456,6 (27,4 - 1468,0)	0,709	2566,0 (1430,0 - 7406,0)	0,097	26 640,0 (8848,0 - 67 270,0)	0,704
< 50%	25	435,4 (44,9 - 2962,0)		2874,0 (1411,0 - 4410,0)		24 380,0 (6985,0 - 55 290,0)	
ismeretlen	0						
> 90%	26	331,8 (44,9 - 2962,0)	0,432	2625,0 (1430,0 - 7406,0)	0,325	25 410,0 (8848,0 - 67 270,0)	0,686
< 90%	46	463,0 (27,4 - 1825,0)		2798,5 (1411,0 - 4571,0)		27 580,0 (6985,0 - 56 700,0)	
ismeretlen	0						
<b>teljes kohort</b>	<b>72</b>	<b>439,15 (27,4 - 2962,0)</b>		<b>2694,0 (1411,0 - 7406,0)</b>		<b>25 800,0 (6985,0 - 67 270,0)</b>	

#### 4.1.3.3 A vizsgált paraméterek összefüggései a betegek teljes túlélésével

A vizsgált markerek és a klinikopatológiai paraméterek teljes túléléssel való kapcsolatának vizsgálatára Cox-univariancia analízist használtunk, melynek eredményeit a 12. táblázat tartalmazza.

A kezelés megkezdése előtti szérumszintek optimális határértékének (cut-off) azt a koncentrációt tekintettük, amely a legmagasabb specificitással és szenzitivitással képes előre jelezni a halálozást. Az optimális cut-off érték meghatározásához ún. ROC (receiver operating characteristics) analízist használtunk. Így az ALCAM esetén az ENZA-kezelt betegek esetében 146,6 ng/ml, az ABI-kezelt betegek esetében 143,1 ng/ml, a DOC-kezelt betegek esetében pedig a 127,95 ng/ml szérumszint bizonyult a legkedvezőbb határértéknek.

Az ENZA-kezelt betegcsoportban a lágyszövet- és csontmetasztázisok jelenléte szignifikáns összefüggést mutatott a betegek rövidebb túlélésével ( $p=0,004$ ,  $p=0,047$ ). Azok a betegek, akik másod vagy annál későbbi vonalban kapták az ENZA kezelést szignifikánsan rövidebb túlélést mutattak ( $p=0,021$ ). Továbbá, a kezelés előtti emelkedett PSA és ALCAM koncentrációk a betegek rövidebb túlélésével korreláltak ( $p<0,001$ ,  $p=0,018$  és  $p=0,002$ ). Azokat az értékeket, amelyek az univariancia analízis alapján szignifikánsnak bizonyultak, multivariancia analízisben vizsgáltuk tovább. Ezek alapján a csontmetasztázisok jelenléte, a kezelés előtti magas PSA és ALCAM ( $>146,6$  ng/ml) koncentrációk egymástól független prognosztikus faktornak bizonyultak a túlélés tekintetében ( $p=0,023$ ,  $p=0,001$  és  $p=0,041$ ) (13. táblázat).

Az ABI-kezelt betegek esetében a magasabb ECOG pontszámmal mért általános állapot, a magas kezelés előtti PSA és ALCAM szérumszintek szignifikáns összefüggést mutattak a betegek rövidebb túlélésével ( $p<0,001$ ,  $p=0,003$ ,  $p<0,001$ ). Multivariancia analízissel vizsgálva a kezelés előtti magas ALCAM koncentrációk ( $>143,1$  ng/ml) és a rossz ECOG státusz a túlélés független prognosztikai faktorának bizonyult (13. táblázat).

A DOC-kezelt betegek esetében a kezelés előtti magas PSA szint és a betegek rosszabb ECOG státusza bizonyult független prognosztikus faktornak a túlélés tekintetében (13. táblázat). Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns összefüggést a betegek túlélése és az ALCAM szérumszintek között (12. táblázat).

**12. táblázat** – Az ENZA-, ABI- és DOC-kezelt betegek univariancia analízise.

Nycs – nyirokcsomó, RPE – radikális prosztata eltávolítás

\*ENZA csoport: medián (ng/ml) PSA: 69,45, ALCAM: 127,8 / ALCAM ROC cut-off (ng/ml): 146,6

\*ABI csoport: medián (ng/ml) PSA: 65,3, ALCAM: 120,5 / ALCAM ROC cut-off (ng/ml): 143,1

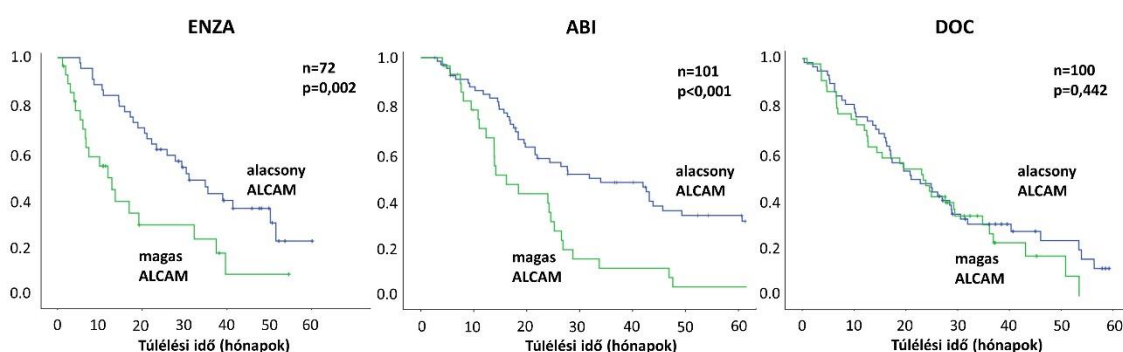
\*DOC csoport: medián (ng/ml) PSA: 93,85, ALCAM: 114,2 / ALCAM ROC cut-off (ng/ml): 127,95

Változók		ENZA			ABI			DOC		
		Teljes túlélés			Teljes túlélés			Teljes túlélés		
		HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Kor	>72 év	1,038	0,589 - 1,837	0,898	1,612	0,984 - 2,641	0,058	1,204	0,768 - 1,886	0,419
ECOG	2	1,357	0,638 - 2,886	0,428	3,970	2,070 - 7,614	<b>&lt;0,001</b>	2,128	1,349 - 3,357	<b>0,001</b>
Lágyrész met.	igen	3,511	1,017 - 12,122	<b>0,047</b>	1,731	0,788 - 3,803	0,171	1,567	0,860 - 2,856	0,143
Nyirokcsomó met.	igen	0,622	0,290 - 1,330	0,221	1,627	0,864 - 3,131	0,145	0,942	0,592 - 1,498	0,800
Csont met.	igen	5,796	1,773 - 18,945	<b>0,004</b>	2,050	0,821 - 5,116	0,124	1,260	0,396 - 4,011	0,696
Korábbi RPE	igen	0,779	0,512 - 1,651	0,919	0,775	0,481 - 1,250	0,296	1,144	0,648 - 2,017	0,643
Korábbi radiáció	igen	0,661	0,329 - 1,328	0,245	0,667	0,369 - 1,242	0,208	1,280	0,636 - 2,577	0,489
Terápiás vonal	2. v. későbbi	2,769	1,169 - 6,559	<b>0,021</b>	0,962	0,590 - 1,571	0,878	0,975	0,238 - 3,990	0,972
PSA medián	*	3,696	2,036 - 6,709	<b>&lt;0,001</b>	2,520	1,532 - 4,144	<b>&lt;0,001</b>	1,618	1,022 - 2,563	<b>0,040</b>
PSA válasz	igen	0,608	0,291 - 1,269	0,185	1,071	0,512 - 2,240	0,856	0,262	0,142 - 0,485	<b>&lt;0,001</b>
PSA válasz	>30%	0,740	0,385 - 1,419	0,364	0,560	0,317 - 0,990	<b>0,046</b>	0,467	0,286 - 0,764	<b>0,002</b>
PSA válasz	>50%	0,735	0,394 - 1,373	0,335	0,555	0,327 - 0,943	<b>0,029</b>	0,521	0,319 - 0,852	<b>0,009</b>
PSA válasz	>90%	0,471	0,255 - 0,870	<b>0,016</b>	0,623	0,375 - 1,036	0,068	0,561	0,318 - 0,989	<b>0,046</b>
ALCAM medián	*	2,002	1,124 - 3,564	<b>0,018</b>	2,093	1,291 - 3,395	<b>0,003</b>	1,483	0,940 - 2,341	0,091
ALCAM (ROC)	*	2,449	1,390 - 4,491	<b>0,002</b>	2,516	1,523 - 4,157	<b>&lt;0,001</b>	1,415	0,897 - 2,231	0,136
AGR2 medián	> 439,15 pg/ml	0,818	0,463 - 1,444	0,488	-	-	-	-	-	-
IDH1 medián	> 269,0 ng/ml	0,816	0,416 - 1,442	0,484	-	-	-	-	-	-
NDRG1 medián	> 25800,0 ng/ml	1,083	0,609 - 1,926	0,786	-	-	-	-	-	-

**13. táblázat** – Az ENZA-, ABI- és DOC-kezelt betegek multivariancia analízise.

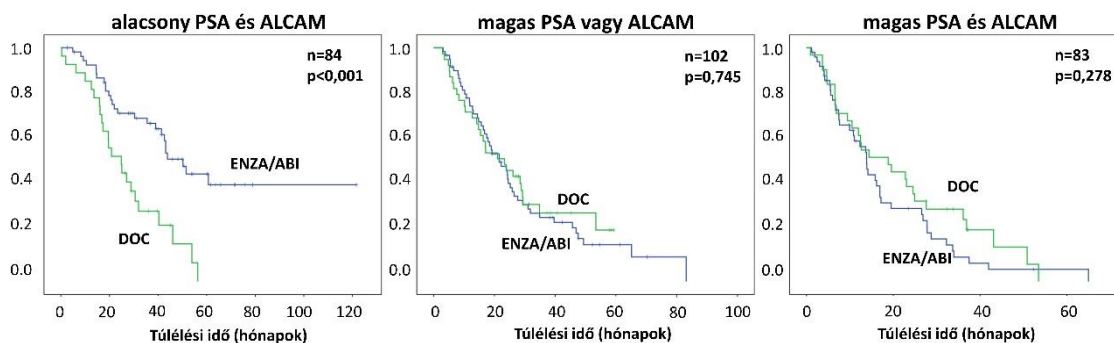
ENZA csoport	Teljes túlélés		
	HR	95% CI	P
Csont metasztázis	4,332	1,230 - 15,264	<b>0,023</b>
PSA (medián) >69,45 ng/ml	2,928	1,558 - 5,502	<b>0,001</b>
ENZA terápia (2 v. későbbi)	1,021	0,396 - 2,702	0,996
ALCAM (medián) >127,8 ng/ml	1,410	0,759 - 2,620	0,277
ALCAM (ROC) >146,6 ng/ml	1,905	1,027 - 3,536	<b>0,041</b>
ABI csoport	Teljes túlélés		
	HR	95% CI	P
ECOG (2)	2,307	1,112 - 4,786	<b>0,025</b>
PSA (medián) >76,6 ng/ml	1,700	0,831 - 3,477	0,146
ALCAM (medián) >120,5 ng/ml	1,538	0,801 - 2,955	0,196
ALCAM (ROC) >143,1 ng/ml	2,102	1,078 - 4,099	<b>0,029</b>
DOC csoport	Teljes túlélés		
	HR	95% CI	P
ECOG (2)	1,811	1,076 - 3,046	<b>0,025</b>
PSA (medián) > 88,02 ng/ml	1,258	0,750 - 2,109	0,384

A Kaplan-Meier görbe alapján az ENZA- és ABI-kezelt betegek esetén a magas kezelés előtti ALCAM koncentrációk (>146,6 and >143,1 ng/ml, ROC görbe alapján) szignifikáns összefüggést mutattak a betegek rövidebb túlélésével ( $p=0,002$ ,  $p<0,001$ ) (9.ábra). Az ENZA-kezelt betegek esetén azoknál a betegeknek, akiknek a kezelés előtt emelkedett ALCAM koncentrációjuk volt a 2 éves túlélés kb. 30%, míg azoknak a betegeknek, akiknek a kezelés előtt alacsony volt az ALCAM koncentrációjuk a 2 éves túlélés kb. 65% volt. A Kaplan-Meier túlélés analízis alapján az ABI-kezelt betegek esetében is hasonló 2 éves túlélési eredményeket kaptunk. Azoknak az ABI-kezelt betegeknek a 2 éves túlélése, akiknek a kezelés előtt emelkedett ALCAM koncentrációjuk volt kb. 40% körül alakult, míg azoknál a betegeknek, akiknek a kezelés előtt alacsony volt az ALCAM koncentrációjuk a 2 éves túlélés kedvezőbben, kb. 65% körül alakult.



**9. ábra** – Az ENZA-, ABI- és DOC-kezelt betegek ALCAM túlélés analízise Kaplan-Meier görbén bemutatva. Az ENZA- és ABI-kezelt csoport esetén a kezelés előtti magas ALCAM koncentrációk (>146,6 és >143,1 ng/ml) a betegek rövidebb túlélésével korrelált. A DOC-kezelt betegek esetén nem találtunk összefüggést a betegek túlélése és az ALCAM szérumkoncentráció között.

Továbbá, ha a betegeket a kezelés előtti ALCAM és PSA koncentrációjuk alapján csoportokba osztottuk és túlélésüket az adott csoporton belül a kapott terápiák szerint ábrázoltuk (ENZA/ABI és DOC) akkor azt találtuk, hogy az alacsony PSA és ALCAM csoportban az ENZA- vagy ABI-kezelt betegek jobb túlélést mutattak a DOC kezelést kapókhoz képest ( $p<0,001$ ). Ugyanakkor a többi marker csoportban nem mutatkozott eltérés a különböző kezeléseket kapó betegek között (10.ábra).



**10. ábra** – Az egyes biomarker csoportokban a különböző kezelést kapó betegek (DOC vs ABI/ENZA) túlélései eltérően alakultak.

Összefoglalva, szérumbizsgálataink alapján az ALCAM egy olyan prognosztikus marker, mely alkalmas lehet az ENZA és ABI rezisztens betegek kezelés megkezdése előtti felismerésére, így segíthet a betegek számára a leginkább megfelelő terápia megválasztásában. A kezelés megkezdése előtt már magas ALCAM szérumszintű betegek számára a DOC terápia megfelelő alternatíva lehet, mivel vizsgálataink alapján az ALCAM szérumszintjének meghatározása DOC terápia esetén nem prognosztikus értékű.

#### 4.1.3.4 Az ALCAM koncentráció kezelés alatti változásainak összefüggései

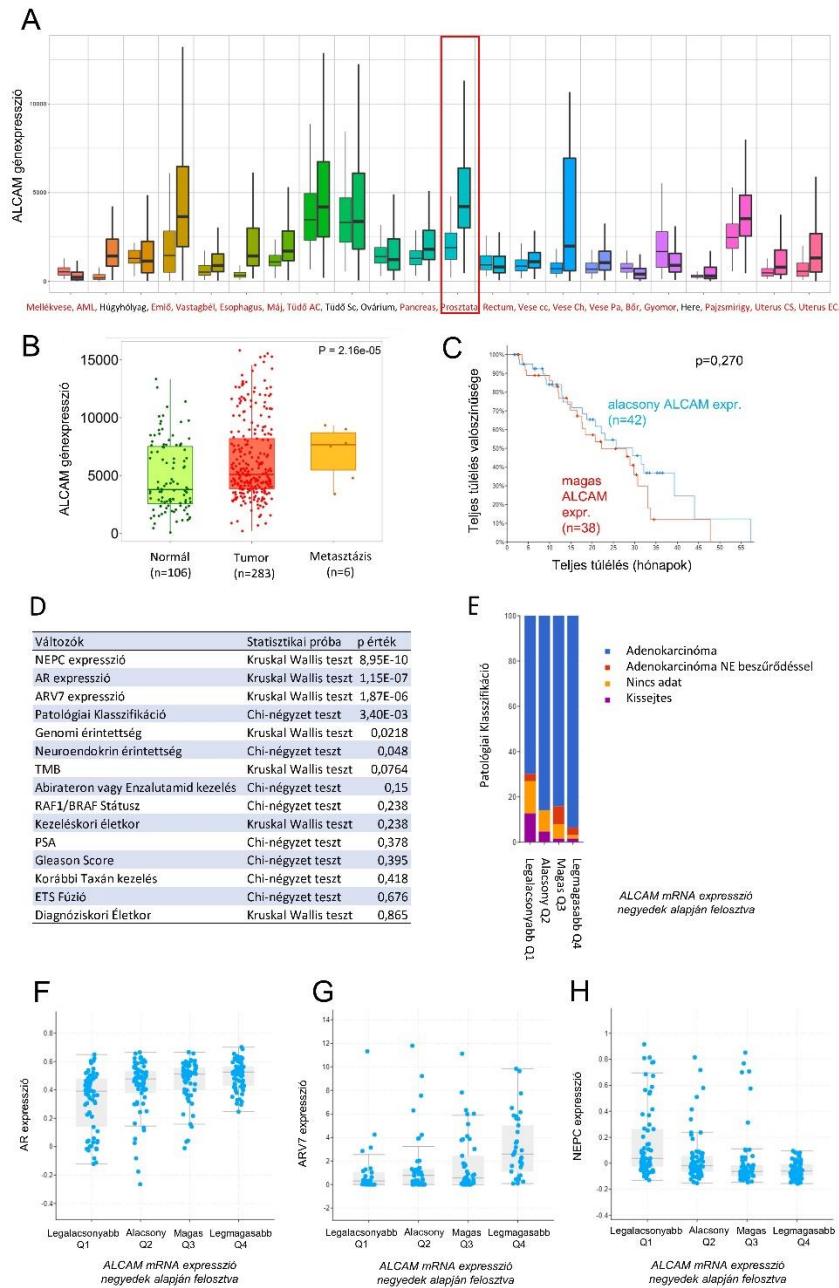
Megvizsgáltuk az ALCAM szérumkoncentrációjának változását a terápia megkezdése után 3. hónapban vett mintákban és három határérték használatával értékeltük ki az ALCAM változás és a túlélés közötti összefüggéseket; (1) a terápia alatti bármilyen mértékű ALCAM koncentráció növekedést emelkedésnek vettünk, (2) a legalább 30%-os és (3) a legalább 50%-os emelkedést vettük növekedésnek. Azt találtuk, hogy a terápia alatt legalább 30%-kal emelkedő ALCAM koncentráció a rövidebb túléléssel mutat összefüggést mindhárom kezelés (DOC, ENZA, ABI) esetében (p=0,011, p=0,022 és p=0,030).

**14. táblázat** – Az ENZA-, ABI- és DOC-kezelt betegek ALCAM koncentrációjának univariancia túlélés analízise a kezelés megkezdése után vett 3. havi mintákban (a kezelés előtti szinthez képest bármely, valamint legalább 30% és 50%-os emelkedés esetén).

ENZA csoport	ALCAM	HR	95% CI		p
	<b>emelkedés mértéke</b>		<b>Teljes csoport</b>		
3. hónap	emelkedett	1,238	0,664	2,308	0,502
	>30%	2,842	1,226	6,585	<b>0,015</b>
	>50%	2,403	0,926	6,238	0,072
ABI csoport	ALCAM	HR	95% CI		p
	<b>emelkedés mértéke</b>		<b>Teljes csoport</b>		
3. hónap	emelkedett	1,809	0,875	3,744	0,110
	>30%	2,710	1,114	6,595	<b>0,028</b>
	>50%	3,338	0,974	11,780	0,055
DOC csoport	ALCAM	HR	95% CI		p
	<b>emelkedés mértéke</b>		<b>Teljes csoport</b>		
3. hónap	emelkedett	1,214	0,586	2,515	0,601
	>30%	2,224	1,062	4,661	<b>0,034</b>
	>50%	1,851	0,642	5,341	0,254

#### 4.1.4 Az ALCAM expressziójának *in silico* vizsgálata

Annak érdekében, hogy az ALCAM expresszióját különböző tumor típusokban egymással és normál szöveti párjaikkal összevessük a TNMplot adatbázist használtunk. A vizsgálat alapján szignifikánsan emelkedett ALCAM génexpresszió figyelhető meg emlő-, tüdő-, vese-, pajzsmirigy- és prosztatacarcinoma esetén a normál szövetekhez képest. A normál szövethez képest legnagyobb expresszió emelkedést az emlő- és a prosztatatumor esetén találtuk (11/A.ábra). Továbbá, a TNMplot adatbázis alapján szignifikánsan magasabb génexpresszió figyelhető meg a metasztatikus PC mintákban a nem metasztatikus esetekhez képest (11/B.ábra). Az ALCAM mRNS expressziójának a klinikopatológiai és túlélési adatokkal való összefüggéseinek a vizsgálatára a TCGA adatbázist használtunk, mely 266 metasztatikus PC beteg klinikai és génexpressziós adatait tartalmazza. Nem találtunk szignifikáns összefüggést az ALCAM expressziója és az mCRPC betegek teljes túlélése között (11/C.ábra). Ugyanakkor a magasabb ALCAM mRNS expresszió értékek szignifikánsan magasabb AR, valamint AR-V7 génexpresszióval mutattak összefüggést (11/F/G.ábra). Ezzel a magasabb ALCAM génexpresszióval alacsonyabb neuroendokrin (NEPC) génexpresszió korrelált (11/H.ábra).



**11. ábra** – ALCAM génexpresszió *in silico* vizsgálata (A) ALCAM expresszió vizsgálata normál és tumoros mintákban a TNMplot adatbázis alapján. Szignifikáns különbségeket pirossal jelöltük  $p < 0,05$ . (B) ALCAM expresszió normál, tumor és metasztatikus PC mintákban. (C) ALCAM génexpresszió összefüggése a túléléssel a TCGA adatbázis alapján (D) ALCAM mRNS expresszió összefüggése a betegek klinikai adataival a cBioPortal adatbázis alapján (E) ALCAM génexpresszió összefüggése a PC patológiai klasszifikációjával (F) ALCAM expresszió szignifikáns összefüggést mutat a magasabb AR és (G) AR-V7 expresszióval (H) Magasabb ALCAM génexpresszió összefüggésben van az alacsonyabb NEPC expresszióval.

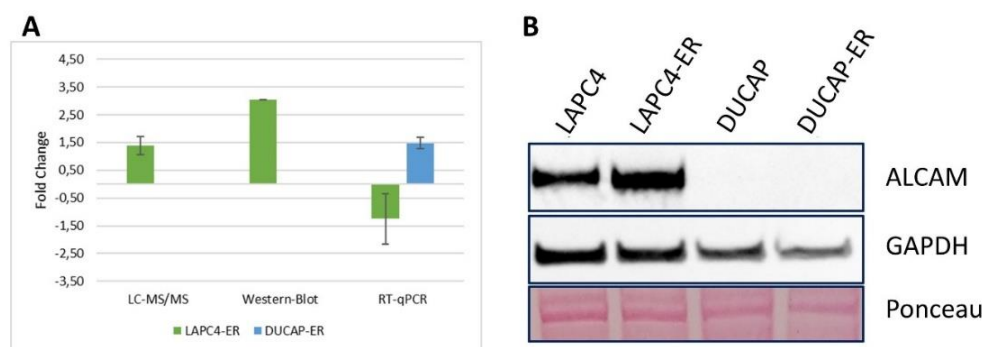
#### 4.1.5. Sejtmodelles, funkcionális vizsgálatok eredményei

A szérumban ELISA vizsgálatok eredményei alapján az ALCAM fehérjén végeztük el a funkcionális kísérleteinket. Annak érdekében, hogy a proteomikai vizsgálatunk eredményeit validáljuk, megvizsgáltuk az ALCAM gén és fehérjeexpressziós szintjét mindkét ENZA rezisztens és érzékeny sejtvonalpárban. Ezután meghatároztuk a LAPC4 és LAPC4-ER sejtvonalak IC<sub>50</sub> értékét, melyhez WST-1 sejtviabilitási módszert alkalmaztunk. Ezt követően az ALCAM fehérje expresszióját siRNS transzfekcióval csendesítettük és WST-1 módszerrel követtük a sejtek életképességének változását. A géncsendesítés sikerességéről Western blot vizsgálattal győződünk meg.

##### 4.1.5.1 Az ALCAM gén- és fehérjeexpressziója a sejtvonalakban

Az ENZA érzékeny és rezisztens sejtvonalpárokban az ALCAM gén- és fehérjeexpressziójának vizsgálatához RT-qPCR és Western blot technikát alkalmaztunk.

Az ALCAM fehérjét a LAPC4 és a LAPC4-ER sejtek proteomikai vizsgálata alapján választottuk ki, melynek megnövekedett expresszióját a rezisztens sejtek fehérjeexpressziós vizsgálatával is sikerült alátámasztanunk (12.ábra). A proteomikai vizsgálatunk szerint az ALCAM fehérjeexpressziója a LAPC4-ER sejtekben 1,39-szeresre, a Western blot vizsgálat alapján pedig 3,05-szörösére nőtt, míg a DUCAP sejtvonal esetében az ALCAM fehérje expresszióját csak mRNS szinten tudtuk detektálni (11.ábra).



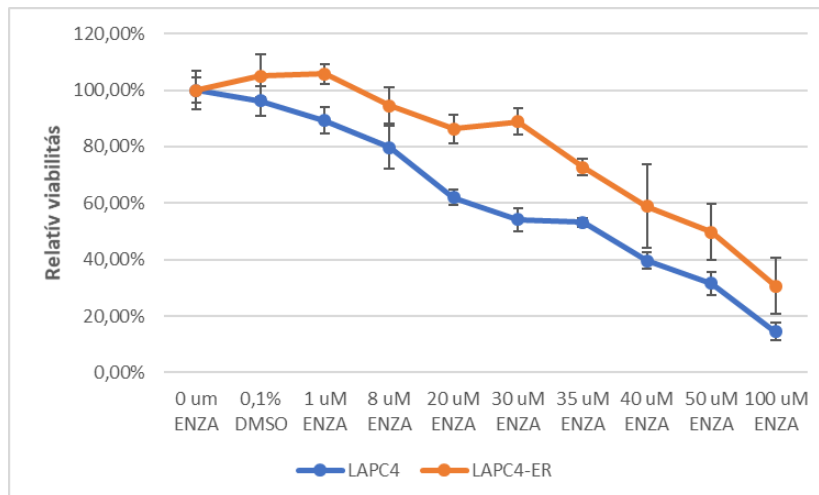
**12.ábra** – Az ALCAM gén- és fehérjeexpressziójának validációs vizsgálatai a LAPC4 vs LAPC4-ER és DUCAP vs DUCAP-ER sejtvonalpáron (A). Az ALCAM fehérje mért expressziójának Western blot analízise a vizsgált sejtvonalakban. Belső kontrollként Ponceau festést és GAPDH háztartási gént használtunk (B).



Mivel az ALCAM fehérje kizárólag a LAPC4 és LAPC4-ER sejtvonalpárban mutatott eltérő expressziót, így a géncsendesítési vizsgálatokat csak ezen a sejtvonalpáron végeztük el.

#### 4.1.5.2 Enzalutamid dózis-hatás görbe

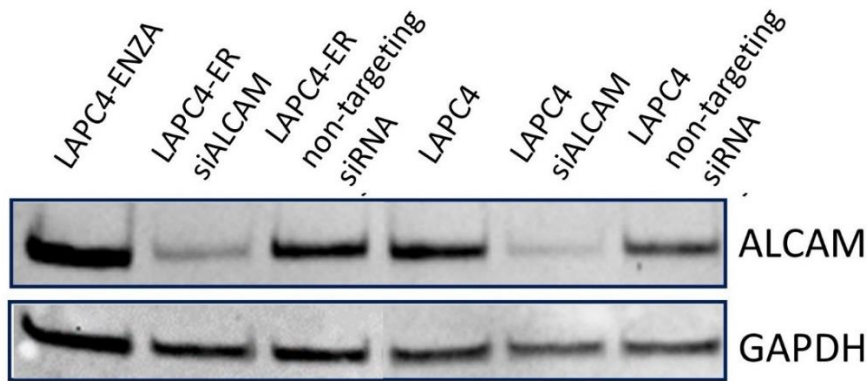
A LAPC4 és LAPC4-ER sejtvonalak ENZA-ra vonatkoztatott IC<sub>50</sub> dózisának meghatározásához a sejtvonalakat 6 napig kezeltük eltérő mennyiségű ENZA dózissal. A 6 napig tartó ENZA-kezelés mellett mért IC<sub>50</sub> értékek a LAPC4 sejtvonal esetében 35  $\mu$ M, míg a LAPC4-ER sejtvonal esetében 45  $\mu$ M voltak (13.ábra). Így a további siRNS csendesítéssel történő funkcionális vizsgálatainkhoz az itt kapott IC<sub>50</sub> értékekkel kezeltük a sejteket.



**13. ábra** – A 6 napig tartó ENZA kezelés dózis-hatás görbéjének meghatározása WST-1 módszerrel a LAPC4 és LAPC4-ER sejtvonalpárok esetén.

#### 4.1.5.3 Géncsendesítés ellenőrzése

Az siRNS transzfekcióval végzett géncsendesítés sikerességét minden kísérlet alkalmával Western blot módszerrel ellenőriztük le. A Western blot vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy a géncsendesítés minden kísérlet esetében legalább 90%-kal csendesítette az ALCAM fehérje kifejeződését a nem csendesített LAPC4-ER és LAPC4 sejtekhez képest, miközben a nem-célzó (non-targeting) siRNS-sel való transzfekció nem befolyásolta az ALCAM expresszióját (14. ábra).

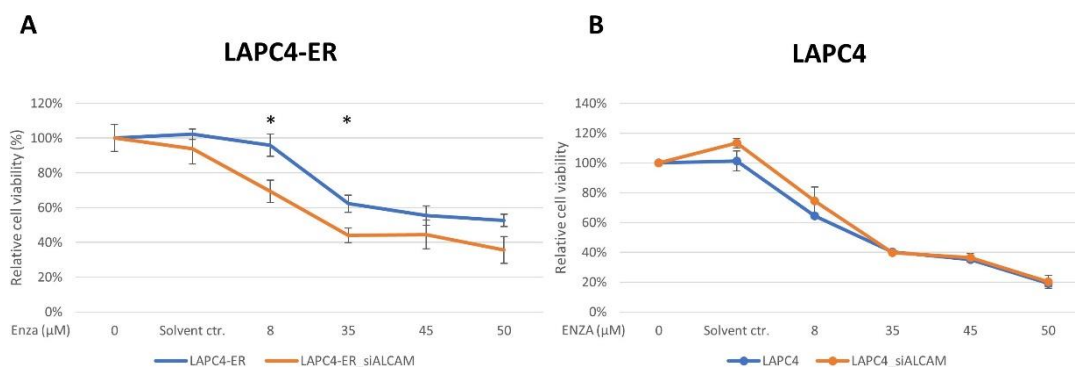


**14.ábra** – Az ALCAM siRNS transzfekcióval való géncsendesítésének ellenőrzése Western blot technikával a LAPC4-ER és LAPC4 sejtekben. A nem-célzó (non-targeting) siRNS-sel való transzfekció a denzitometriás kiértékelés szerint nem befolyásolta az ALCAM kifejeződését.

#### 4.1.5.4 Sejtviabilitás-változás mérése géncsendesítés hatására

Az ALCAM fehérje siRNS-sel történő géncsendesítését követően megvizsgáltuk a sejtek életképességének változását különböző ENZA dózisok mellett. Ennek során a korábbiakban leírtak szerint 6 napig kezeltük az siRNS-sel csendesített és a kontroll sejteket is.

Az ALCAM fehérje kifejeződését a LAPC4 és a LAPC4-ER sejtvonalban is gátoltuk. A LAPC4-ER sejtvonal esetében látható, hogy a csendesítés hatására a sejtek életképessége az ENZA kezelés hatására szignifikáns mértékben csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva (15/A ábra), míg a LAPC4 sejtvonal esetében látható, hogy a csendesítés hatására nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a géncsendesítésnek alávetett sejtek életképessége és a kontroll sejtek életképessége között (15/B ábra).



**15.ábra** – Az ALCAM csendesítésnek alávetett LAPC4-ER (A), illetve LAPC4 (B) sejtek életképessége a 6 napos ENZA-kezelést követően. Az ALCAM csendesített LAPC4-ER esetében a 8 és 35μM ENZA kezelés hatására szignifikánsan csökkent a sejtek életképessége.

## 4.2 A CGA, NSE és a PSA szérumszintjének meghatározása lokális sebészi (RPE) és szisztémás (ENZA/ABI, DOC) kezelésen átesett PC betegek mintáiban

### 4.2.1. Betegkarakterisztika

Az RPE műtéten átesett PC betegek, valamint az ENZA/ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek alapadatait a 15. táblázat tartalmazza.

Az RPE-n átesett lokális PC-ban szenvedő 157 beteg medián életkora 66 év (tartomány: 44-78), a műtét előtti medián PSA koncentráció pedig 11,8 ng/ml volt. A műtét után 88 beteg esetében a sebészi szél pozitívnak bizonyult, valamint 27 betegnél találtak nyirokcsomó érintettséget. A megfigyelési idő alatt 16 beteg esetében történt PSA progresszió.

Az ENZA/ABI-kezelést kapó összesen 143 mCRPC beteg medián életkora 73 év (tartomány: 55-93), a medián kezelés előtti PSA 61,0 ng/ml volt. A megfigyelési idő alatt (19 hónap) 99 beteg (65%) halálozott el.

A 95 DOC-kezelésbe részesült mCRPC beteg medián életkora 71 év (tartomány: 44-86), a kezelés előtti PSA 88,8 ng/ml volt. A betegek 56%-a (53 beteg) halálozott el a megfigyelési idő alatt (13 hónap).

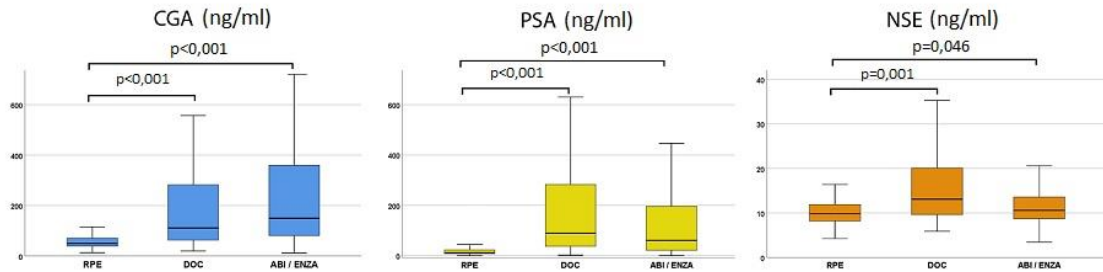
**15. táblázat** – A RPE műtéten átesett PC betegek és az ENZA/ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek klinikai adatai. Nycs – nyirokcsomó, PS – performance status

RPE		ENZA/ABI		DOC
Betegek száma	157	Betegek száma	143	95
Életkor	66 (47-78)	Életkor	73 (55-93)	71 (44-86)
PSA (ng/ml)	11,8 (0,3-180)	PSA (ng/ml)	61 (0,1-11810)	89 (1,5-6155)
Stádium		ECOG PS	0	57
pT2	82		1	28
pT3	73		2	9
pT4	2	ismeretlen	30	1
ISUP grade		Metasztázis		
1 (Gleason ≤ 6)	12	csont	123	89
2 (Gleason 3+4)	34	nyirokcsomó (>2cm)	17	37
3 (Gleason 4+3)	31	lágyszövet	10	15
4 (Gleason 8)	17	Korábbi lokális terápia		
5 (Gleason 9-10)	33	RPE	57	18
ismeretlen	30	radiáció	24	12
Sebészi szél		Terápiás vonal	Első	48
negatív	68		2.	61
pozitív	88		3.	21
ismeretlen	1		4.	7
Nyirokcsomó státusz		ismeretlen	6	0
Nycs -	130	Elhunyt betegek száma	99	53
Nycs +	27	Teljes túlélés (medián)	19	13

**4.2.2 A CGA, NSE és a PSA kezelés előtti szérumszintjeinek összehasonlítása a különböző kezelési csoportok között**

A kasztráció-rezisztens betegcsoportok (ENZA/ABI, DOC) esetén, mindhárom vizsgált marker szérumszintje szignifikánsan magasabb volt a lokális, hormonérzékeny és RPE műtéten átesett betegcsoportéhoz képest ( $p < 0,001$ ) (16-18. táblázat, 15. ábra). A lokális és hormonérzékeny (RPE) csoportban a CGA szérumszintje a harmada (50,4 ng/ml) volt a mCRPC csoporténak (140,4 ng/ml). A legmagasabb kezelés előtti CGA szintet a kasztráció-rezisztens ENZA/ABI-kezelt mCRPC betegcsoport esetén mértük. A PSA szérumszint vizsgálata esetén hasonló eredményeket kaptunk, a kezelés előtti PSA koncentráció szignifikánsan magasabb volt mind a kemoterápiával (DOC) kezelt, mind a ENZA/ABI-kezelt betegek esetén, a RPE-n átesett PC betegekhez képest ( $p > 0,001$ ). A CRPC betegcsoportok között összehasonlítva, a DOC-kezelt betegekben mértünk magasabb PSA koncentrációt (88,8 ng/ml).

Az NSE esetében is szignifikánsan alacsonyabb szérumszintet a hormonérzékeny és lokális (RPE) betegcsoportban mértünk a mCRPC csoportokhoz (ENZA/ABI, DOC) képest ( $p=0,001$ ) (16-18. táblázat, 16. ábra).



**16.ábra** – A hormon érzékeny, RPE műtéten átesett PC betegek és a ENZA/ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek CGA, NSE és PSA szérumszintjeinek Box-plot ábrázolása.

#### 4.2.3. A CGA, NSE és a PSA kezelés előtti szérumszintjeinek összefüggései a klinikopatológiai paraméterekkel

A radikális műtéten (RPE) átesett betegek esetében, a műtét előtti PSA szint szignifikáns összefüggést mutatott az előrehaladottabb tumor stádiummal (pT3-4), a magasabb ISUP grade-del (ISUP>3), a nyirokcsomó érintettséggel, a műtét utáni magasabb PSA szinttel (>0,2 ng/ml), valamint a pozitív sebészi széllal (16. táblázat). A műtét előtti magasabb CGA koncentrációk szignifikáns összefüggést mutattak az alacsonyabb ISUP grade-del, ugyanakkor a tumor stádium esetében nem találtunk szignifikáns összefüggést (16. táblázat).

Továbbá, a műtét előtti NSE koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak azoknál a betegeknél, akiknek a műtét követően a PSA értékük 0,2 ng/ml alá csökkent (16. táblázat).

**16. táblázat – A RPE műtéten átesett PC betegek klinikopatológiai paramétereit és a CGA, PSA és NSE fehérjék szérumszintjei közötti összefüggések.**

	RPE csoport						
	n	CGA ng/ml	P	PSA ng/ml	P	NSE ng/ml	P
		medián (tartomány)		medián (tartomány)		medián (tartomány)	
<b>Életkor</b>							
≤ 65 év	77	47,60 (18,24-392,39)	0,081	11,77 (0,40-180,40)	0,520	10,08 (4,66 - 53,83)	0,861
> 65 év	80	55,66 (13,78 - 2849,39)		11,78 (0,34 - 96,10)		9,52 (4,25 - 69,57)	
<b>Stádium</b>							
pT2	82	48,63 (16,70 - 392,39)		9,25 (0,34 - 70,26)		9,80 (4,66 - 69,57)	
pT3	73	57,29 (13,78 - 2849,39)		14,96 (0,40 - 180,40)		9,79 (4,25 - 58,83)	
pT4	2	50,48 (43,48- 57,48)		65,43 (52,61 - 78,25)		10,80 (10,36 - 11,24)	
pT2	82	48,63 (16,70 - 392,39)	0,847	9,25 (0,34 - 70,26)	<b>&lt;0,001</b>	9,80 (4,66 - 69,57)	0,596
pT3- pT4	75	57,29 (13,78 - 2849,39)		15,01 (0,40 - 36,24)		9,88 (4,25 - 53,83)	
<b>ISUP grade</b>							
1 (Gleason ≤ 6)	12	64,95 (44,39 - 296,98)		6,50 (0,59 - 42,76)		9,25 (7,59 - 14,53)	
2 (Gleason 3+4)	34	54,15 (27,00 - 174,82)		9,93 (0,62 - 29,16)		9,25 (5,29 - 47,68)	
3 (Gleason 4+3)	31	49,16 (21,79 - 2849,39)		10,35 (3,13 - 54,46)		10,12 (4,25 - 30,07)	
4 (Gleason 8)	17	46,15 (21,43 - 212,91)		11,80 (0,40 - 76,91)		10,24 (7,33 - 14,88)	
5 (Gleason 9-10)	33	44,07 (13,78 - 107,95)		27,82 (0,63 - 180,40)		9,86 (6,10 - 53,83)	
ISUP (1-3)	77	53,73 (21,79 - 2849,39)	<b>0,026</b>	9,93 (0,59 - 54,46)	<b>&lt;0,001</b>	9,72 (4,25 - 47,68)	0,682
ISUP (4-5)	50	45,11 (13,78 - 212,91)		24,43 (0,40 - 180,40)		9,88 (6,10 - 53,83)	
ismeretlen	30						
<b>Sebészi szél</b>							
negatív	68	48,58 (20,59 - 2849,39)	0,798	9,20 (0,40 - 180,40)	<b>0,005</b>	9,60 (5,29 - 69,57)	0,881
pozitív	88	54,57 (13,78 - 392,39)		13,90 (0,34 - 180,06)		9,89 (4,25 - 53,83)	
ismeretlen	1						
<b>Nyirokcsomó státusz</b>							
N -	130	49,89 (13,78 - 392,39)	0,620	10,47 (0,34 - 70,26)	<b>&lt;0,001</b>	10,05 (4,66 - 69,57)	0,148
N +	27	57,14 (18,24 - 2849,39)		17,64 (2,83 - 180,40)		9,48 (4,25 - 30,07)	
<b>PSA érték</b>							
< 10 ng/ml	65	53,64 (13,78 - 2849,39)	0,312			10,10 (5,29 - 69,57)	0,269
≥ 10 ng/ml	91	48,12 (18,24 - 225,11)				9,54 (4,25 - 53,83)	
ismeretlen PSA	1						
<b>PSA csökkenés (&lt;0.2 ng/ml)</b>							
nem	42	44,73 (18,24 - 225,11)	0,245	20,21 (3,07 - 180,47)	<b>&lt;0,001</b>	8,99 (4,66 - 16,28)	<b>0,003</b>
igen	102	52,99 (13,78 - 2849,39)		9,65 (0,34 - 70,26)		10,40 (4,25 - 69,57)	
ismeretlen	13						
<b>PSA progresszió (&gt;0.2 ng/ml)</b>							
nincs PSA csökkenés	42	44,73 (18,24 - 225,11)	0,444	20,21 (3,07 - 180,47)	<b>0,001</b>	8,99 (4,66 - 16,28)	<b>0,018</b>
PSA csökkent & PSA progresszió	16	48,07 (13,78 - 94,75)	0,068	8,38 (0,34 - 54,46)	0,168	11,86 (4,25 - 53,83)	0,278
PSA csökkent & nincs PSA prgresszió	79	57,51 (21,43 - 2849,39)		9,93 (0,59 - 70,26)		10,12 (5,29 - 69,57)	
ismeretlen	20						
Teljes kohort	157	50,36 (13,78 - 2849,39)		11,78 (0,34 - 180,40)		9,88 (4,25 - 69,57)	

Az ENZA/ABI csoport esetén, alacsonyabb PSA értéket detektáltunk azoknál a betegeknél, akik a kezelés megkezdése előtt lokális terápiában (radiáció vagy RPE) részesültek ( $p < 0,001$ ). Továbbá a csont metasztázissal rendelkező betegek esetében is magasabb PSA értéket mértünk ( $p = 0,004$ ). A CGA szérumszintje az idősebb betegek esetében volt magasabb ( $p = 0,008$ ), viszont azoknál a betegeknél, akik lokális terápiában

részesültek alacsonyabb CGA szinteket detektáltunk ( $p=0,013$ ). Továbbá, azoknál a betegeknél, akiknek az ECOG státusz szerint rosszabb általános állapotuk volt, magasabb CGA szinteket mértünk ( $p=0,021$ ) (17.táblázat).

A DOC csoport esetén mind a CGA, mind a PSA szintek alacsonyabbak voltak azoknál a betegeknél, akik a kezelés megkezdése előtt radiációban vagy RPE részesültek, bár ezek az összefüggések nem érték el a szignifikanciahatárt ( $p=0,073$  és  $p=0,064$ ). Továbbá, a CGA szérum szintje magasabb volt az idősebb betegek esetén ( $p=0,021$ ) (18. táblázat).

**17. táblázat - Az ENZA/ABI-kezelt betegek klinikopatológiai paramétereit és a CGA, PSA és NSE fehérjék szérumkoncentrációi közötti összefüggések.**

RPE – radikális prosztata eltávolítás, PS – performance status, met – metasztázis

	ABI / ENZA csoport						
	n	CGA ng/ml	P	PSA ng/ml	P	NSE ng/ml	P
		medián (tartomány)		medián (tartomány)		medián (tartomány)	
<b>Életkor (évek)</b>							
≤ 72	70	121,59 (17,08 - 6885,51)	<b>0,008</b>	58,78 (0,07 - 11810)	0,851	10,02 (4,97 - 133,61)	0,811
> 72	73	200,07 (11,98 - 1944,27)		63,29 (0,17 - 4139,55)		10,88 (3,48 - 29,32)	
<b>Korábbi terápia</b>							
nem	64	186,47 (17,08 - 1944,27)	0,101	128,76 (0,17 - 11810)	<b>&lt;0,00</b>	10,60 (5,69 - 133,61)	0,462
igen	79	139,99 (11,98 - 6885,51)		39,64 (0,07 - 4139,55)		10,49 (3,48 - 69,62)	
<b>Korábbi RPE</b>							
nem	86	188,16 (17,08 - 1944,27)	<b>0,013</b>	83,67 (0,17 - 11810)	<b>0,003</b>	10,54 (3,48 - 133,61)	0,613
igen	57	119,40 (11,98 - 6885,51)		44,35 (0,07 - 4139,55)		10,90 (4,97 - 69,62)	
<b>Korábbi radiáció</b>							
nem	118	145,25 (11,98 - 6885,51)	0,334	69,60 (0,07 - 11810)	0,244	10,83 (4,97 - 133,61)	0,184
igen	25	206,46 (30,54 - 1429,09)		38,81 (2,94 - 771,09)		9,85 (3,48 - 29,32)	
<b>Terápia</b>							
Első vonal	48	190,11 (11,98 - 6885,51)	0,888	39,43 (1,69 - 1003,48)	0,078	10,16 (5,69 - 40,17)	0,932
2. v. későbbi	90	146,55 (32,64 - 1944,27)		80,95 (0,07 - 11810)		10,82 (3,48 - 133,61)	
ismeretlen	5						
<b>ECOG PS</b>							
0	90	132,13 (11,98 - 1944,27)	<b>0,021</b>	49,64 (0,65 - 11810)	0,668	10,01 (3,48 - 133,61)	0,315
1-2	23	294,80 (17,08 - 1633,04)		62,17 (0,07 - 1721,36)		11,60 (5,69 - 69,62)	
ismeretlen	30						
<b>Nyirokcsomó met.</b>							
N -	112	168,42 (11,98 - 1944,27)	0,864	50,60 (0,17 - 11810)	0,476	10,33 (3,48 - 133,61)	0,502
N +	29	136,29 (19,56 - 6885,51)		80,95 (0,07 - 771,09)		11,57 (4,97 - 69,61)	
ismeretlen	2						
<b>Lágyrész met.</b>							
nem	131	149,93 (11,98 - 6885,51)	0,702	64,41 (0,17 - 11810)	0,071	10,28 (3,48 - 133,61)	0,054
igen	10	151,36 (54,25 - 870,95)		37,11 (0,07 - 119,94)		13,39 (7,23 - 69,62)	
ismeretlen	2						
<b>Csont met.</b>							
nem	18	116,30 (11,98 - 1109,25)	0,526	26,88 (2,16 - 189,84)	<b>0,004</b>	9,80 (5,88 - 17,06)	0,198
igen	123	159,45 (17,08 - 6885,51)		69,60 (0,07 - 11810)		10,83 (3,28 - 133,61)	
ismeretlen	2						
<b>PSA válasz</b>							
igen	120	149,30 (57,96 - 1429,09)	0,922	90,73 (2,16 - 1645,31)	0,905	11,60 (3,48 - 133,61)	0,582
nem	22	148,26 (11,98 - 6885,51)		62,17 (0,07 - 11810)		10,54 (4,97 - 69,62)	
ismeretlen	1						
> 30%	106	142,45 (11,98 - 6885,51)	0,830	68,67 (2,16 - 1645,31)	0,499	11,57 (3,48 - 133,61)	0,248
< 30%	37	156,75 (17,08 - 1944,27)		58,78 (0,07 - 11810)		10,28 (4,97 - 69,62)	
ismeretlen	1						
> 50%	96	142,45 (11,98 - 6885,51)	0,993	76,17 (0,65 - 1645,31)	0,601	10,98 (3,48 - 133,61)	0,338
< 50%	47	156,75 (17,08 - 1944,27)		56,54 (0,07 - 11810)		10,46 (4,97 - 69,62)	
ismeretlen	1						
> 90%	45	163,56 (11,98 - 6885,51)	0,308	65,08 (0,17 - 11810)	0,416	10,96 (3,48 - 133,61)	0,117
< 90%	97	140,83 (19,56 - 1944,27)		48,26 (0,07 - 1721,36)		9,63 (4,97 - 69,62)	
ismeretlen	1						
<b>teljes kohort</b>	143	149,93 (11,98 - 6885,51)		60,97 (0,07 - 11810)		10,60 (3,48 - 133,61)	



**18. táblázat – A DOC-kezelt betegek klinikopatológiai paramétereit és a CGA, PSA és NSE fehérjék szérumszintjei közötti összefüggések.**

RPE – radikális prosztata eltávolítás, PS – performance status, met - metasztázis

	DOC csoport						
	n	CGA ng/ml medián (tartomány)	P	PSA ng/ml medián (tartomány)	P	NSE ng/ml medián (tartomány)	P
<b>Életkor (évek)</b>							
≤ 72	55	98,13 (20,44 - 5735,25)	<b>0,021</b>	88,58 (1,64 - 4224,6)	0,756	13,20 (5,88 - 105,51)	0,984
> 72	40	173,10 (41,07 - 1427,28)		99,99 (2,98 - 8824,96)		12,67 (5,88 - 78,30)	
<b>Korábbi terápia</b>							
nem	65	144,02 (30,83 - 5370,65)	0,073	114,15 (1,64 - 8824,96)	0,064	13,44 (5,88 - 78,30)	0,835
igen	30	91,36 (20,44 - 5735,25)		74,26 (2,55 - 347,38)		12,34 (6,58 - 105,51)	
<b>Korábbi RPE</b>							
nem	77	113,97 (30,83 - 5370,65)	0,537	97,38 (1,64 - 8824,96)	0,110	12,61 (5,88 - 78,30)	0,080
igen	18	105,41 (20,44 - 5735,25)		66,18 (2,55 - 347,38)		13,95 (9,22 - 105,51)	
<b>Korábbi radiáció</b>							
nem	83	119,59 (20,44 - 5735,25)	0,075	91,65 (1,64 - 8824,96)	0,462	13,44 (5,88 - 105,51)	0,092
igen	12	72,01 (36,00 - 485,23)		81,06 (5,09 - 273,29)		10,17 (6,58 - 42,83)	
<b>Terápia</b>							
Első vonal	95	111,11 (20,44 - 5735,25)		89,35 (1,64 - 8824,96)	0,543	13,10 (5,88 - 78,30)	0,339
2. v. későbbi ismeretlen	0	-		44,23 (42,45 - 128,98)		23,16 (9,22 - 105,51)	
<b>ECOG PS</b>							
0	85	111,11 (20,44 - 5735,25)	0,206	88,79 (1,64 - 8824,96)	0,847	13,16 (5,88 - 105,51)	0,519
1-2	9	155,63 (63,38 - 1718,57)		92,58 (7,89 - 1891,50)		11,00 (8,11 - 27,51)	
ismeretlen	1						
<b>Nyirokcsomó met.</b>							
N -	58	109,57 (36,00 - 5370,65)	0,691	124,10 (1,64 - 7312,04)	0,524	12,50 (5,88 - 78,30)	0,060
N +	37	119,59 (20,44 - 5735,25)		51,59 (2,55 - 8824,96)		13,11 (6,68 - 105,51)	
ismeretlen	0						
<b>Lágyrész met.</b>							
nem	80	112,54 (20,44 - 5735,25)	0,822	87,77 (1,64 - 8824,96)	0,704	13,11 (5,88 - 105,51)	0,339
igen	15	108,39 (24,42 - 1399,54)		128,14 (5,09 - 2125,30)		14,75 (6,68 - 67,95)	
ismeretlen	0						
<b>Csont met.</b>							
nem	5	119,59 (62,66 - 164,60)	0,635	89,35 (26,23 - 213,22)	0,945	9,52 (5,88 - 23,24)	0,293
igen	90	109,75 (20,44 - 5735,25)		88,22 (1,64 - 8824,96)		13,11 (5,88 - 105,51)	
ismeretlen	0						
<b>PSA válasz</b>							
igen	66	108,2 (20,44 - 5735,25)	0,535	87,32 (1,64 - 8824,96)	0,413	12,99 (5,88 - 105,51)	0,552
nem	14	93,18 (32,92 - 1718,57)		160,35 (5,09 - 2581,29)		16,03 (8,11 - 35,30)	
ismeretlen	15						
> 30%	49	100,14 (20,44 - 5735,25)	0,755	87,09 (1,64 - 2125,30)	0,330	13,11 (5,88 - 105,51)	0,588
< 30%	33	132,83 (24,42 - 5370,65)		116,53 (5,09 - 8824,96)		12,23 (7,38 - 78,30)	
ismeretlen	13						
> 50%	42	90,68 (20,44 - 1399,54)	0,075	76,19 (1,64 - 2125,30)	0,199	13,91 (7,38 - 105,51)	0,164
< 50%	40	149,86 (32,92 - 5735,25)		111,76 (5,09 - 8824,87)		12,75 (5,88 - 67,95)	
ismeretlen	13						
> 90%	24	97,34 (20,44 - 1399,10)	0,189	66,18 (1,64 - 512,24)	0,118	12,75 (5,88 - 67,95)	0,481
< 90%	58	119,59 (32,92 - 5735,25)		93,94 (4,20 - 8824,96)		13,58 (6,57 - 105,51)	
ismeretlen	13						
<b>teljes kohort</b>	95	111,11 (20,44 - 5735,25)		88,79 (1,64 - 8824,96)		13,11 (5,88 - 105,51)	

#### 4.2.4. A vizsgált paraméterek összefüggései a teljes túléléssel

A vizsgált markerek szérumszintjének és a klinikopatológiai paramétereknek a teljes túléléssel való kapcsolatának vizsgálatára Cox-univariancia analízist használtunk. Az univariancia analízis eredményeit a 19. és 20. táblázat tartalmazza.

A kezelés megkezdése előtti CGA, PSA és NSE szérumszintek prognosztikus értékének vizsgálata során, fontos kiválasztanunk azt az optimális határértéket (cut-off), amely a legmagasabb specificitással és szenzitivitással képes előrejelezni az adott vizsgálati végpontot (jelen esetben a halálozást). Az optimális cut-off érték meghatározásához a 4.1.3.3 fejezetben leírtakhoz hasonlóan az ROC (receiver operating characteristics) analízist használtuk. Az ENZA/ABI-kezelt betegcsoport esetében a ROC görbe alapján az optimális cut-off érték a CGA esetében 81,2 ng/ml, az NSE esetében pedig 10,2 ng/ml volt. A DOC-kezelt betegcsoport esetében a CGA és NSE optimális cut-off értéke 168,0 ng/ml és 10,8 ng/ml volt. Mindhárom betegcsoport esetében használtuk a normál tartomány felső 95%-át is határértékként (ULN cut-off), melyek a CGA esetén 101,9 ng/ml, az NSE esetében 12,7 ng/ml volt. Továbbá, egy korábban *Heck és mtsai.* által közölt releváns határértéket (BJU cut-off) is használtunk a túlélés analízisek elvégzésénél, melyek a CGA és NSE esetében 85 ng/ml és 19 ng/ml voltak (74).

Mivel a RPE-n átesett betegek esetében a műtét utáni várható túlélés több, mint 10 év ezért, ha az elsődleges végpontként a teljes túlélést szeretnénk megadni, akkor hosszabb követési időre lenne szükségünk, mint amennyi rendelkezésünkre állt. Ezért ezen betegcsoport esetén végpontként a PSA-progresszió-mentes túlélést (PSA-PFS) választottuk. A RPE-n átesett betegek esetében összefüggést találtunk a tumor stádiuma (pT3-4) ( $p=0,008$ ), a pozitív sebészi szél ( $p=0,042$ ) és a rövidebb PSA-PFS között. Továbbá, a magasabb ISUP grade ( $>3$ ) ( $p=0,086$ ) és a kezelés előtti emelkedett PSA szint ( $>11,8$  ng/ml) is összefüggést mutatott a rövid PSA-PFS-sel, de ez az összefüggés nem érte el a szignifikancia szintet. Azokat a paramétereket, melyek az univariancia analízis alapján szignifikáns összefüggést mutattak a PSA-PFS-sel, multivariancia analízissel is megvizsgáltuk. Ez alapján, a malignus elváltozás stádiuma (pT3-4) és a műtét előtti emelkedett PSA szintek bizonyultak egymástól független prognosztikus faktornak a PSA-PFS tekintetében (21. táblázat). A RPE-n átesett lokális PC betegek esetén sem a műtét előtti CGA és NSE szérumszintek koncentrációk, sem azok műtét utáni változásai nem mutattak szignifikáns összefüggést a PSA-PFS-sel (19. táblázat).

Az ENZA/ABI-kezelt mCRPC betegek esetén szignifikáns összefüggést találtunk a rosszabb általános állapot (ECOG), a csont metasztázisok jelenléte, a kezelés előtti emelkedett PSA, CGA és NSE koncentrációk és a rövidebb teljes túlélés között. A legerősebb összefüggést a túléléssel akkor kaptuk, ha a kezelés előtti emelkedett CGA (>85,0 ng/ml) és NSE (>19,0 ng/ml) szintjeit egymással kombináltuk (20. táblázat, 17. ábra). Multivariancia analízissel vizsgálva a kezelés előtti emelkedett CGA ( $p=0,047$ ; ROC cut-off alapján) szint a túlélés tekintetében független prognosztikus faktornak bizonyult (21. táblázat).

A DOC kezelt betegcsoport esetén szignifikáns korrelációt találtunk a rövidebb teljes túlélés és a rosszabb ECOG szerinti általános állapot (>1), a PSA válasz és a magas kezelés előtti CGA (>111 ng/ml [medián cut-off]; >168,2 ng/ml [ROC cut-off]) között (20. táblázat, 13. ábra). Multivariancia analízissel vizsgálva a kezelés előtti emelkedett CGA (>168 ng/ml) bizonyult független prognosztikus faktornak a túlélés tekintetében (21.táblázat).

#### 19. táblázat – A RPE-n átesett PC betegek univariancia analízise.

Nycs – nyirokcsomó

\*medián (ng/ml) PSA: 11,8, CGA: 50,5, NSE: 9,9

\*BJU cut-off (ng/ml) CGA: 85,0 NSE: 19,0

\*ULN cut-off (ng/ml) CGA: 101,9 NSE: 12,7

Változók		RPE		
		PSA-PFS		p
		HR	95% CI	
Életkor	>65 év	0,853	0,320 - 2,276	0,751
Stádium	pT3-pT4	4,239	1,467 - 12,251	<b>0,008</b>
ISUP Grade	ISUP (4-5)	2,603	0,873 - 7,758	0,086
Sebészi szél	pozitív	3,234	1,042 - 10,037	<b>0,042</b>
Nycs státusz	pozitív	1,374	0,312 - 6,054	0,675
PSA	≥10 ng/ml	0,78	0,282 - 2,157	0,633
PSA medián	*	0,289	0,081 - 1,026	0,055
CGA medián	*	0,774	0,275 - 2,000	0,554
CGA (BJU cut-off)	*	0,363	0,048 - 2,755	0,327
CGA (ULN cut-off)	*	0,044	0,000 - 185,18	0,463
NSE (medián)	*	1,888	0,422 - 8,448	0,406
NSE (ULN cut-off)	*	1,968	0,669 - 5,790	0,219
CGA/NSE BJU scr.	1-2	1,065	0,300 - 3,784	0,922
CGA változás 2.nap	>20% emel.	1,132	0,144 - 8,899	0,906
CGA változás 7.nap	>20% emel.	0,480	0,135 - 1,708	0,257
CGA változás 20.nap	>20% emel.	0,895	0,104 - 7,738	0,920
NSE változás 2.nap	emelkedett	1,679	0,540 - 5,221	0,371
NSE változás 7.nap	emelkedett	0,244	0,030 - 1,985	0,187
NSE változás 20.nap	emelkedett	0,21	0,038 - 1,160	0,074
NSE változás 2.nap	>20% emel.	1,008	0,476 - 2,134	0,983
NSE változás 7.nap	>20% emel.	0,553	0,177 - 1,724	0,307
NSE változás 20.nap	>20% emel.	0,681	0,204 - 2,275	0,532

**20. táblázat** – Az ENZA/ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek univariancia

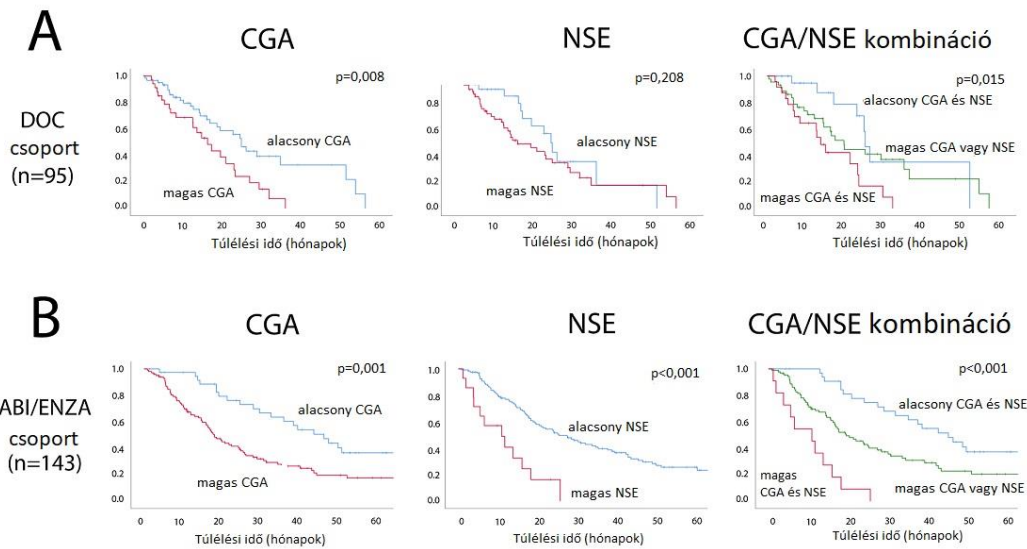
analízise. RPE - radikális prosztata eltávolítás

\*ABI/ENZA csoport: ROC cut-off (ng/ml): CGA: 81,29, NSE:10,22 / medián cut-off (ng/ml): PSA: 76,6, CGA: 150,00, NSE: 10,59

\*DOC csoport: medián (ng/ml) PSA: 88,8, CGA: 111,11, NSE: 13,11 / ROC cut-off (ng/ml): CGA: 168,02, NSE:10,82

\*BJU cut-off (ng/ml): CGA: 85,0 NSE: 19,0 / ULN cut-off (ng/ml): CGA: 101,9, NSE: 12,7

Változók		DOC			ENZA/ABI		
		Teljes túlélés			Teljes túlélés		
		HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Életkor	>72 év	1,374	0,774 - 2,441	0,278	1,425	0,946 - 2,147	0,090
ECOG	2	1,713	1,057 - 2,776	<b>0,029</b>	2,922	1,675 - 5,096	<b>&lt;0,001</b>
Lágyrész met.	pozitív	1,213	0,587 - 2,505	0,603	1,735	0,837 - 3,595	0,138
Nyirokcsomó met.	pozitív	0,964	0,547 - 1,698	0,899	1,000	0,574 - 1,740	0,999
Csont met.	pozitív	0,861	0,208 - 3,561	0,836	3,367	1,467 - 7,729	<b>0,004</b>
RPE	pozitív	0,950	0,485 - 1,860	0,881	0,785	0,518 - 1,190	0,254
Radiáció	pozitív	1,473	0,573 - 3,785	0,421	0,572	0,324 - 1,011	0,055
Terápiás vonal	2. v. későbbi	0,937	0,128 - 6,870	0,949	1,031	0,672 - 1,581	0,890
PSA medián	*	1,739	0,982 - 3,080	0,058	2,751	1,800 - 4,203	<b>&lt;0,001</b>
PSA válasz	igen	0,291	0,144 - 0,590	<b>0,001</b>	0,652	0,380 - 1,120	0,121
PSA válasz	>30%	0,490	0,263 - 0,913	<b>0,025</b>	0,689	0,429 - 1,107	0,124
PSA válasz	>50%	0,422	0,222 - 0,805	<b>0,009</b>	0,663	0,428 - 1,027	0,066
PSA válasz	>90%	0,434	0,182 - 1,035	0,060	0,540	0,344 - 0,849	<b>0,008</b>
CGA medián	*	1,832	1,043 - 3,219	<b>0,035</b>	1,905	1,252 - 2,900	<b>0,003</b>
CGA (BJU cut-off)	*	1,399	0,760 - 2,575	0,281	2,270	1,374 - 3,748	<b>0,001</b>
CGA (ULN cut-off)	*	1,678	0,949 - 2,965	0,075	1,709	1,093 - 2,671	<b>0,019</b>
CGA (ROC cut-off)	*	2,121	1,212 - 3,710	<b>0,008</b>	2,266	1,359 - 3,779	<b>0,002</b>
NSE medián	*	1,376	0,783 - 2,418	0,268	1,580	1,046 - 2,387	<b>0,030</b>
NSE (BJU cut-off)	*	1,274	0,680 - 2,387	0,449	3,457	1,839 - 6,500	<b>&lt;0,001</b>
NSE (ULN cut-off)	*	1,312	0,746 - 2,306	0,346	1,374	0,884 - 2,138	0,158
NSE (ROC cut-off)	*	1,491	0,801 - 2,777	0,208	1,646	1,089 - 2,490	<b>0,018</b>
CGA/NSE BJU scr.	1 vagy 2	1,342	0,666 - 2,705	0,411	2,316	1,387 - 3,868	<b>0,001</b>
CGA/NSE BJU scr.	2	1,424	0,708 - 2,862	0,321	4,216	2,188 - 8,121	<b>&lt;0,001</b>



**17.ábra** – A CGA és NSE szérumszintek Kaplan-Meier túlélés analízise. (A) A DOC-kezelt betegek esetén a kezelés előtti magas CGA szintek szignifikáns összefüggést mutatnak a rövidebb túléléssel. (B) Az ENZA/ABI-kezelt betegek esetén a kezelés előtti emelkedett CGA és NSE szintek szignifikáns összefüggést mutatnak a betegek rövidebb túlélésével, továbbá a CGA és NSE értékek kombinációja egy még pontosabb elválasztást tesz lehetővé.

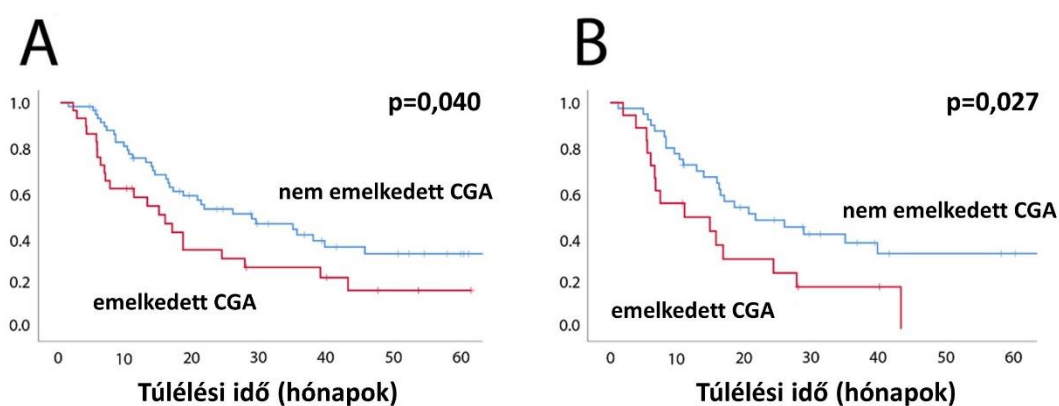
**21. táblázat** – A RPE műtéten átesett PC betegek, valamint az ENZA/ABI- és DOC-kezelt mCRPC betegek multivariancia analízise.

RPE csoport	PSA-PFS		
	HR	95% CI	P
Stádium (pT3-4)	4,379	1,459 - 13,141	<b>0,008</b>
Sebészi szél (pozitív)	3,021	0,951 - 9,598	0,061
PSA (medián) >11,80 ng/ml	0,248	0,069 - 0,890	<b>0,032</b>
<b>ENZA/ABI csoport</b>			
	HR	95% CI	P
Csont metasztázis	2,090	0,734 - 5,949	0,167
PSA (medián) >76,6 ng/ml	2,113	1,199 - 3,723	<b>0,010</b>
LDH >240 U/l	2,229	1,203 - 4,132	<b>0,011</b>
AP >129 U/l	1,555	0,856 - 2,823	0,147
ECOG (2)	1,570	0,477 - 5,171	0,458
CGA (BJU) > 85,00 ng/ml	1,836	0,983 - 3,428	0,056
NSE (BJU) > 19,00 ng/ml	1,984	0,880 - 4,473	0,099
CGA (ROC) > 81,29 ng/ml	1,926	1,009 - 3,677	<b>0,047</b>
NSE (ROC) > 10,22 ng/ml	1,239	0,727 - 2,112	0,431
CGA/NSE (BJU) 0 vs 12*	1,903	1,032 - 3,510	<b>0,039</b>
CGA/NSE (BJU) 01 vs 2**	2,754	1,225 - 6,191	<b>0,014</b>
<b>DOC csoport</b>			
	HR	95% CI	P
ECOG (2)	1,507	0,925 - 2,455	0,099
PSA (medián) >88,80 ng/ml	1,619	0,906 - 2,894	0,104
CGA (medián) >111,11 ng/ml	1,692	0,948 - 3,020	0,075
CGA (ROC) >168,20 ng/ml	1,842	1,025 - 3,311	<b>0,041</b>

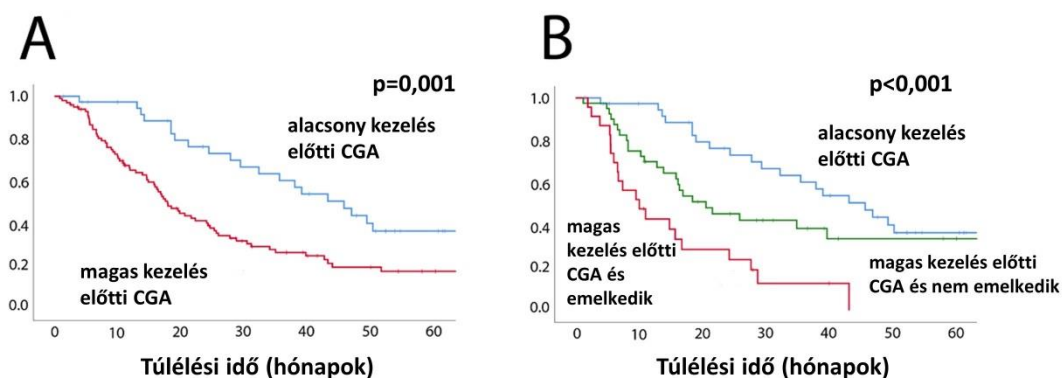
#### 4.2.5. A vizsgált paraméterek kezelés alatti változásainak prognosztikus értéke

Az RPE műtéten átesett betegek esetén a CGA és NSE szérumszintjeinek változásait megvizsgáltuk a műtét utáni 2., 7. és 21. napon vett mintákban. Ezután besoroltuk a betegeket aszerint, hogy a vizsgált markerek szérumszintje emelkedett-e (bármilyen mértékű emelkedés), valamint legalább 20%-os emelkedést mutat-e a műtét előtti szérumszintekhez képest. Ezt a beosztást használva az RPE csoportban nem találtunk összefüggést a markerek szérumszintjének változása és a PSA-PFS között (19. táblázat).

Az ENZA/ABI-kezelt betegcsoport esetén megvizsgáltuk a CGA és NSE szérumszintjének változásait a kezelés megkezdése utáni 3. hónapban vett mintákban is és három határérték alkalmazásával értékeltük ki az emelkedést a 4.1.3.4 alfejezetben leírtaknak megfelelően. Ezután elvégeztük a túlélés analízist az egész csoportra, valamint külön azokra a betegekre is, akiknek a kezelés előtti szérumszint CGA és NSE értékei is emelkedettek voltak (CGA [ $>101,9$  ng/ml] és NSE [ $>12,7$  ng/ml]). Az egész csoporton elvégzett kiértékelés alapján azon betegek túlélése szignifikánsan rövidebb volt, akiknél a kezelés alatt legalább 50%-kal emelkedett a CGA koncentráció ( $p=0,040$ ) (18. ábra). Továbbá, ez a korreláció sokkal egyértelműbb volt abban a betegcsoportban, ahol már a kezelés előtt is emelkedett CGA koncentrációt mértünk ( $p=0,019$ ;  $p=0,027$ ) (18. ábra). A fentiek eredmények alapján három ENZA/ABI kezelés alatti prognózisukban eltérő rizikócsoportot érdemes elkülöníteni; 1) az alacsony kockázati csoportba tartozó (alacsony kezelés előtti CGA szint) betegek egy éves túlélés valószínűsége 95%, 2) a közepes kockázati csoportba tartozó (magas kezelés előtti CGA érték, ami azonban nem emelkedik a terápia alatt) betegek egy éves túlélés valószínűsége 70%, míg a 3) magas kockázati csoportba tartozó (emelkedett kezelés előtti CGA szint, és további emelkedés a terápia alatt) betegek egy éves túlélési valószínűsége már csak 43% volt. Az itt részletezett CGA változásokhoz hasonló prognosztikus értéket az NSE esetében nem tudtunk megfigyelni (22. táblázat) (19. ábra).



**18. ábra** – Az ENZA/ABI-kezelt mCRPC betegek Kaplan-Meier túlélés analízise a 3. havi követéses CGA szérumszintek függvényében. (A) Az egész csoportot vizsgálva a CGA legalább 50%-os emelkedése a terápia megkezdése után vett 3. havi mintában szignifikáns összefüggést mutat a rövidebb túléléssel. (B) Azoknál a betegeknél, akiknél a CGA érték a kezelés előtt emelkedett volt (>101,9 ng/ml) és a terápia során tovább növekedett szignifikánsan rövidebb túlélést kaptunk.



**19. ábra** – Az ENZA/ABI-kezelt mCRPC betegek Kaplan-Meier túlélés analízise. (A) A kezelés előtti emelkedett CGA koncentrációk a betegek rövidebb túlélésével mutatott szignifikáns összefüggést. (B) A magas kezelés előtti CGA érték és annak kezelés alatti emelkedése a betegek rövidebb túlélésével mutatott szignifikáns összefüggést.

A DOC-kezelt betegeknél is megvizsgáltuk a kezelés megkezdése utáni 2., 3. és 6. hónapban vett mintákban a CGA és NSE változásai és a túlélés közötti kapcsolatot az egész csoportban, valamint külön azokban az alcsoportokban is ahol a kezelés előtti mintákban emelkedett CGA (>101,9 ng/ml) és NSE (>19,0 ng/ml) szinteket találtunk. Ezen vizsgálat esetében is három határérték (cut-off) segítségével értékeltük ki az

emelkedés és túlélés közötti összefüggést. Azonban a DOC csoportban nem találtunk az ENZA/ABI csoportéhoz hasonló összefüggéseket, ami arra utal, hogy a fenti két marker csak az ENZA/ABI kezelés hatékonyságát képes előrejelezni, ami ezen markerek terápiaprediktív értékére utal (22. táblázat).

**21. táblázat** –Az ENZA/ABI- és DOC-kezelt betegcsoportok Cox univariancia túlélés analízise a CGA és NSE szérumszintek kezelés alatti változásainak függvényében.

emelkedés mértéke	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	
<b>ENZA/ABI csoport - CGA</b>		<b>Egész csoport</b>		<b>kezelés előtti emelkedett CGA csoport</b>			
3. hónap emelkedett	0,826	0,579 1,179	0,294	0,924	0,490 1,742	0,808	
>20%	1,494	0,884 2,526	0,133	2,131	1,126 4,033	<b>0,019</b>	
>50%	1,759	1,027 3,011	<b>0,039</b>	2,083	1,087 3,988	<b>0,026</b>	
<b>ENZA/ABI csoport - NSE</b>		<b>Egész csoport</b>		<b>kezelés előtti emelkedett NSE csoport</b>			
3. hónap emelkedett	1,468	0,867 0,512	0,596	0,701	0,255 1,925	0,490	
>20%	2,067	1,171 0,663	0,585	1,167	0,392 3,475	0,780	
>50%	2,243	1,061 0,501	0,877	4,349	0,932 20,276	0,061	
<b>DOC csoport - CGA</b>		<b>Egész csoport</b>		<b>kezelés előtti emelkedett CGA csoport</b>			
2. hónap emelkedett	1,465	0,733 2,925	0,279	1,974	0,858 4,537	0,109	
>20%	1,081	1 1,709	0,736	1,271	0,736 2,194	0,388	
>50%	1,695	0,770 3,729	0,189	1,265	0,461 3,469	0,647	
3. hónap emelkedett	1,360	0,639 2,892	0,424	1,825	0,717 4,644	0,206	
>20%	0,931	0,563 1,539	0,782	1,067	0,596 1,911	0,825	
>50%	0,729	0,274 1,943	0,528	0,774	0,224 2,671	0,685	
6. hónap emelkedett	0,785	0,339 1,820	0,574	0,698	0,215 2,262	0,549	
>20%	1,045	0,640 1,708	0,856	1,068	0,550 2,071	0,845	
>50%	0,765	0,405 1,443	0,409	0,937	0,428 2,052	0,872	
<b>DOC csoport - NSE</b>		<b>Egész csoport</b>		<b>kezelés előtti emelkedett NSE csoport</b>			
2. hónap emelkedett	0,955	0,482 1,894	0,896	0,898	0,359 2,248	0,819	
>20%	0,877	0,588 1,309	0,523	0,906	0,551 1,490	0,697	
>50%	1,069	0,607 1,884	0,815	1,026	0,553 1,903	0,934	
3. hónap emelkedett	1,248	0,592 2,632	0,559	1,443	0,511 4,072	0,487	
>20%	1,092	0,695 1,713	0,701	1,540	0,801 2,958	0,194	
>50%	1,247	0,662 2,349	0,493	2,099	0,730 6,033	0,168	
6. hónap emelkedett	0,868	0,352 2,144	0,760	1,269	0,331 4,860	0,727	
>20%	1,037	0,615 1,748	0,890	1,334	0,665 2,672	0,416	
>50%	1,112	0,554 2,233	0,764	1,158	0,531 2,530	0,711	



## 5. Megbeszélés

Jelen értekezésben a metasztatikus kasztráció-rezisztens prosztaták kezelésére szolgáló egyik új-generációs antiandrogén terápia, az ENZA elleni rezisztenciát előrejelezni képes, illetve az abban résztvevő fehérje markerek azonosítását tűztük ki célul. Ehhez ENZA érzékeny, illetve arra rezisztens PC sejtvonalpárok teljes proteom analízisét végeztük el folyadékromatográfiához kapcsolt tandem tömegspektroszkópiás módszerrel. Ezzel a vizsgálattal megkaptuk azokat a fehérjéket, melyek eltérő mennyiségben termelődnek az ENZA-érzékeny és rezisztens sejtvonalpárokban. Az így kapott nagyszámú fehérjéből három bioinformatikai módszer segítségével, különböző szempontok figyelembevételével választottuk ki a négy legígéretesebb fehérjét (ALCAM, AGR2, IDH1, NDRG1). A kiválasztott fehérjék szérumszintjét ENZA, ABI és DOC terápiának alávetett mCRPC betegek kezelés előtti szérumszintjeiben határoztuk meg ELISA vizsgálattal, a kapott eredményeket pedig összevetettük a betegek klinikopatológiai adataival, PSA válaszaival és túlélésével. Szérumszintvizsgálataink alapján az ALCAM fehérje kezelés előtti emelkedett koncentrációja összefüggést mutatott az ENZA-kezelt betegek rövidebb túlélésével. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az ALCAM fehérje ENZA rezisztenciában betöltött szerepét, funkcionális *in vitro* vizsgálatokat végeztünk. Az ALCAM fehérje expressziójának lecsendesítése ENZA rezisztens (LAPC4-ER) sejtekben az ENZA iránti érzékenység növekedését váltotta ki. Ezzel összhangban az ABI és ENZA terápiának alávetett mCRPC betegek kezelés előtti szérumszintjeiben az emelkedett ALCAM koncentrációk a betegek rövidebb túlélésével mutattak szignifikáns összefüggést. Ugyanakkor a DOC terápia esetében nem találtunk hasonló összefüggést (82).

Azért, hogy pontosabb képet kapjunk a PC molekuláris hátteréről, valamint az mCRPC-ben leggyakrabban alkalmazott terápiák elleni rezisztencia mechanizmusairól részletes irodalomkutatót végeztünk, melynek során összegyűjtöttük a PC kialakulásában és progressziójában szerepet játszó legfontosabb jelátviteli utakat és genetikai markereket (17). Továbbá, két összefoglaló közleményben mutattuk be az antiandrogén terápiák elleni rezisztenciában szerepet játszó rezisztencia mechanizmusokat (47, 54). Az áttekintés során világossá vált, hogy az egyes gyógyszerekkel kapcsolatos rezisztencia kialakulásáért többféle rezisztencia mechanizmus - mint pl. az AR eltérései, a GR túlzott termelődése, neuroendokrin transz-

differenciáció, a BRCA1/2 mutációk, valamint a PI3K és a WNT útvonalak eltérései – is felelőssé tehető. A mai klinikai gyakorlatban nem állnak rendelkezésre olyan biomarkerek, amelyek segítséget nyújtanának annak eldöntésében, hogy melyik beteg számára melyik terápia lenne a leghatékonyabb választás. Ezért kutatásunk egyik célja az volt, hogy olyan szérumból meghatározható markereket azonosítsunk, melyek képesek előrejelezni az ENZA kezelés elleni rezisztenciát és így hozzájárulhatnak a leghatékonyabb gyógyszer kiválasztásához. Kutatócsoportunk a közelmúltban DOC-érzékeny és -rezisztens sejtvonalpárok proteomikai összehasonlításával, majd az eredmények hipotézismentes módon történő feldolgozásával új biomarkereket – a CD44 és NAMPT fehérjéket – azonosította, amellyel meggyőződünk arról, hogy ez a módszer alkalmas a biomarkerek azonosítására (53).

Az ENZA rezisztens sejtekben szignifikánsan emelkedett expressziót mutató fehérjék közül a fehérjék rangsorolásán alapuló bioinformatikai módszerünk segítségével választottuk ki az NDRG1 fehérjét. Az NDRG1 fontos szerepet játszik többek között a sejtek növekedésében, differenciációjában és szignáltranszdukciós folyamataiban. Sokrétű fiziológiai funkciója mellett, az NDRG1 fehérje tumorszupresszor szerepét is bizonyították számos tumortípusban, többek között PC-ban is. Ugyanakkor egyes tanulmányok az NDRG1 fehérje protoonkogén szerepéről is beszámoltak (83). Az NDRG1 terápia rezisztenciában betöltött szerepéről több tanulmány is született. Hepatocelluláris carcinoma (HCC) sejteken végzett *in vitro* kísérletek alapján az NDRG1 fehérje gátlása a hipoxiás HCC sejtek doxorubicin érzékenységét és a retinsav rezisztens sejtek apoptózisát idézte elő, mely az NDRG1 a doxorubicin és retinsav rezisztencia kialakulásában betöltött funkcionális szerepére utal (84). Továbbá, neuroblasztóma sejteken végzett életképességi vizsgálatok alapján, az NDRG1 fehérje mesterséges túltermeltetése multidrog rezisztencia kialakulásához vezetett (85). Az NDRG1 fehérje ENZA rezisztenciában betöltött esetleges szerepéről eddig mindössze egy tanulmány számolt be. *Zheng és mtsai.* olyan gének és szignálútvonalak feltérképezését tűzték ki célul, amelyek szerepet játszhatnak az ENZA rezisztencia kialakulásában (86). Ehhez a GEO (Gene Expression Omnibus) adatbázisból ENZA érzékeny és rezisztens PC sejteken végezett vizsgálatok eredményein végeztek átfogó bioinformatikai analízist, melynek eredményeképpen 12 kulcs gént azonosítottak, melyek közülük az egyik az *NDRG1* volt (86). Az általunk végzett proteomikai vizsgálatok alapján az NDRG1 fehérje

szignifikánsan emelkedett expressziót mutatott az ENZA rezisztens LAPC4-ER sejtekben, ugyanakkor az ENZA-kezelt mCRPC betegek mintáin végzett ELISA vizsgálatok nem találtak összefüggést az NDRG1 szérumkoncentrációi és a betegek túlélése között (82). Ezek alapján az NDRG1 nem alkalmas az ENZA kezelés hatékonyságának előrejelzésére. Ugyanakkor, további vizsgálatok hiányában az NDRG1 szerepe az ENZA rezisztenciában továbbra is tisztázatlan marad.

A második szelekciós bioinformatikai módszerünk alkalmazásával az ENZA-rezisztens sejtekben emelkedett expressziót mutató fehérjék közül a potenciálisan szekretálódó, tehát a vérben nagy valószínűséggel kiválasztódó és ezáltal a szérumban mérhető fehérjéket azonosítottuk. Ennek eredményeképpen az AGR2 és ALCAM fehérjéket választottuk ki szérum ELISA vizsgálatokra. Az AGR2 fehérje a diszulfid izomeráz gén család tagja, mely aktiváló szerepet tölt be a sejt migrációban, a sejt növekedésben, differenciációban és az angiogenezisben (87). Számos tumortípusban, mint például emlő vagy tüdő daganat esetében az AGR2 fokozott expressziója összefüggést mutatott a betegek rosszabb prognózisával (88). prosztaták esetén *Zhang és mtsai.* kimutatták, hogy az AGR2 egy androgén befolyás alatt álló szekretálódó fehérje (89). Továbbá, immunhisztokémiai vizsgálataik, prosztata adenocarcinómában erősebb AGR2 expressziót detektáltak a benignus prosztata mintákhoz képest, ami arra enged következtetni, hogy az AGR2 részt vehet a PC malignus transzformációjában (89). Az AGR2 fehérje PC terápia rezisztenciában betöltött szerepét két tanulmány is vizsgálta. Az AGR2 DOC rezisztenciában betöltött szerepéről *Zhao és mtsai.* számoltak be, akik tömegspektroszkópos vizsgálattal hasonlították össze a PC3 és DOC-rezisztens sejtvonal párjának fehérjekészletét. Eredményeik alapján az AGR2 mutatta az egyik legnagyobb mértékű expresszió-csökkenést a DOC rezisztens sejtekben. Továbbá, a fehérje siRNS-sel való csendesítése DOC rezisztenciát idézett elő az addig terápia érzékeny PC3 sejtekben, ami arra enged következtetni, hogy az AGR2 elvesztése hozzájárul a DOC elleni rezisztencia kialakulásához (90). Ezzel szemben *Tang és mtsai.* eredményei szerint az AGR2 fehérje expressziójának letörése az ENZA iránti érzékenység növekedésével járt együtt (91). A fenti ellentmondást tükrözték az általunk elvégzett proteomikai analízis eredményei is, ugyanis az AGR2 fehérje a LAPC4-ER rezisztens sejtekben az egyik legmagasabb (15,8-szoros) overexpressziót mutató fehérje volt, ugyanakkor a DUCAP-ER sejtekben szignifikáns alulregulációt mutatott. Továbbá, a szérum ELISA vizsgálatok

alapján nem találtunk szignifikáns összefüggést az ENZA-kezelt betegek túlélése és az AGR2 szérumszintjei között (82).

A harmadik kiválasztási módszerünkkel összehasonlítottuk a proteomikai vizsgálatunkkal kapott ENZA rezisztens sejtekben emelkedett expressziót mutató fehérjék listáját *Qian és mtsai.* által hasonlóan ENZA rezisztens sejteken végzett teljes génextpressziós analízis eredményeivel (78). *Qian* és *mtsai.* integratív analízist végeztek transzkriptomikai adatbázisokból nyert génextpressziós adatokon annak érdekében, hogy azonosítsák azokat a géneket, amelyek alul- vagy felülregulációt mutatnak ENZA rezisztencia esetén. Analízisünkkel 703 alul- és 581 felülregulálódott gént azonosítottak az ENZA rezisztens sejtvonalakban. Összehasonlítva az általuk közölt génlistát a saját adatainkkal összesen 9 egyező fehérjét találtunk. A 9 fehérje közül az IDH1 fehérjét választottuk ki további szérum ELISA vizsgálatokra. Az IDH1 fehérje egy olyan metabolikus enzim, mely az izocitrát 2-oxoglutaráttá való átalakításában vesz részt. Az IDH1 PC-ban való szerepéről keveset tudunk. Azonban a TCGA vizsgálat alapján az *IDH1* mutációval rendelkező lokális PC tumorok egy külön molekuláris alcsoportot képeznek. Továbbá, a TCGA vizsgálat eredményei alapján, az *IDH1* mutáció leggyakrabban fiatalabb férfiak tumoraiban fordul elő és gyakran DNS hipermetilációval is együtt jár (16). Egy másik tanulmányban *Gonthier és mtsai.* azt találták, hogy az IDH1 génextpressziója a PC proliferációja során emelkedik meg, továbbá lehetséges funkcionális szerepét is bizonyították PC-ban, ugyanis a gén PC sejtekben történő kiütése csökkent proliferációval járt együtt (92). Ugyanakkor az IDH1 ENZA rezisztenciában betöltött szerepét eddig még nem vizsgálták. Az általunk végzett ENZA-kezelt mCRPC betegek szérum vizsgálata során azt találtuk, hogy az IDH1 fehérje szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb volt a csont metasztázissal diagnosztizált betegek esetén. Azonban nem találtunk szignifikáns összefüggést a betegek túlélése és az IDH1 szérumkoncentrációja között (82).

Az ALCAM fehérjét egyszerre két bioinformatikai módszer segítségével - a fehérjék pontozásával és a szekretálódó fehérjék azonosításával - is sikerült kiválasztanunk. Az ALCAM másik nevén CD166 fehérje egy 100-105 kDa méretű transzmembrán glikoprotein, mely az immunglobulin család tagja. Az ALCAM egy olyan adhéziós molekula, mely képes heterofil kapcsolatot kialakítani a CD6 molekulával, azonban homofil dimerként egy másik ALCAM molekulával összekapcsolódva is képes

funkcióját ellátni. Az ALCAM részt vesz a T-sejtek aktivációjában, angiogenezisben, gyulladási folyamatokban, a tumorsejtek migrációjában és inváziójában, továbbá egyes terápiák elleni rezisztenciában is (93). Számos tumortípusban, többek között hasnyálmirigy és vastagbél daganatban bizonyították, hogy az ALCAM megnövekedett expressziója a betegek rosszabb túlélésével mutat szignifikáns összefüggést (94, 95). Azonban más tumortípusokban, mint például emlő és ovárium daganat esetében éppen a fentivel ellenkező összefüggéseket írtak le; az ALCAM csökkent expressziója a betegek rosszabb túlélésével volt összefüggésben (96, 97). prosztaták esetén is egymásnak ellentmondó eredményeket találtunk az irodalomban. *Kristiansen és mtsai.* vizsgálatai szerint az ALCAM az alacsonyabb malignitású prosztata tumorokban mutatott erősebb expressziót az előrehaladottabb tumorokhoz képest (98). Ezzel összhangban egy másik tanulmány is arról számolt be, hogy az ALCAM a kedvezőbb stádiumú betegek mintáiban mutatott erőteljesebb membrán expressziót, továbbá a kezelést követő biokémiai kiújulás is később következett be ezeknél a betegeknél (99). Ezzel szemben azonban két másik tanulmány is azt találta, hogy az ALCAM emelkedett expressziója éppen a rosszabb túléléssel mutat összefüggést. Az egyik tanulmányban azt találták, hogy az ALCAM citoplazmatikus expressziója összefüggést mutatott az RPE utáni rövidebb PSA-relapszus mentes túléléssel (100). A másik tanulmány alapján a metasztázissal rendelkező PC betegeknél emelkedett ALCAM génexpresszió volt megfigyelhető és ez az emelkedett expresszió a betegek rövidebb túlélésével mutatott összefüggést (101). Ez arra utal, hogy nem csak az ALCAM expressziójának emelkedése, hanem a sejten belüli lokalizációja is fontos szerepet tölthet be a PC progressziójában. Továbbá, az ALCAM emelkedett szérumkoncentrációja is szerepet játszhat a PC progressziójában. *Sander és mtsai.* 239 PC beteg szérummintáit vizsgálva azt találta, hogy a magasabb szérum ALCAM koncentráció szignifikáns összefüggést mutat a magasabb Gleason pontszámmal, T-stádiummal és PSA szinttel (102).

A TCGA adatbázisból letöltött mCRPC mintákon végzett *in silico* génexpressziós analízisünk igen érdekes összefüggést talált az ALCAM génexpressziója és neuroendokrin differenciációban (NEPC) részt vevő gének expressziója között. A vizsgálatunk alapján fordított kapcsolat van az ALCAM és a NEPC gének expressziója között, ami arra utal, hogy az ALCAM terápiarezisztenciában betöltött szerepe független a neuroendokrin transz-differenciációtól. Mivel ismert, hogy a neuroendokrin transz-

differentiáció szerepet játszik a PC androgén támadáspontú kezelésekkel szembeni rezisztenciájában, ezért az ALCAM valószínűleg egy ettől eltérő rezisztencia mechanizmusban játszhat szerepet. Ezért feltételezhető, hogy az ALCAM neuroendokrin szérum markerekkel kombinációban alkalmazva alkalmas lehet az ENZA és ABI rezisztens betegek hatékonyabb elkülönítésére (103). Ugyanakkor *in silico* vizsgálatunk szerint a magasabb ALCAM expresszió szignifikáns összefüggést mutat a magasabb AR expresszióval, mely azt sugallja, hogy összefüggés lehet az ALCAM és az AR jelátviteli útvonal között. Ez a megfigyelés összefüggésben van egy korábban tripla negatív emlőrákban talált eredménnyel, mely szerint a magasabb ALCAM szöveti expresszió a magasabb AR expresszióval mutatott szignifikáns összefüggést (104). Továbbá, ugyancsak szignifikáns összefüggést találtunk a magas ALCAM expresszió és AR-V7 jelenléte között, ezért felmerül a kérdés, hogy a két marker ugyanazon mechanizmus alapján rezisztenssé váló daganatokat azonosítja-e. Ennek eldöntésére azonban a jelen tanulmányban nem volt lehetőségünk (82).

Az ALCAM terápia rezisztenciában betöltött szerepéről eddig kevés információ vált ismertté. Emlődaganatos betegek mintáinak immunhisztokémiai vizsgálata során azt találták, hogy a tamoxifen kezelésre nem reagáló betegek mintáiban erősebb ALCAM expresszió volt megfigyelhető, azokhoz a betegekhez képest, akik jól reagáltak a kezelésre. Továbbá, *in vitro* sejtkultúras kísérletek eredményei arra utaltak, hogy az ALCAM kiütésének hatására a tamoxifen rezisztens sejtek életképessége csökkent, amit egy másik független vizsgálat is igazolt (105, 106).

Az irodalom alapján az ALCAM ENZA rezisztenciában betöltött szerepét eddig még nem vizsgálták. Proteomikai analízisünk az ENZA rezisztenciában potenciálisan szerepet játszó fehérjeként és biomarkerként azonosította az ALCAM fehérjét, a LAPC4-ER sejtvonalban. Az ALCAM koncentrációját ENZA-kezelt betegek szérum mintáiban megvizsgálva, a kezelés előtti emelkedett ALCAM szintek a rövidebb túlélés független prognosztikus faktorának bizonyultak. Továbbá, az ALCAM koncentrációjának a terápia során történő emelkedése ugyancsak összefüggést mutatott a rosszabb túléléssel. Ezek alapján az ALCAM szérum markerként segíthet az ENZA-rezisztens betegek azonosításában és ezáltal hozzájárulhat a megfelelő terápia megválasztásában, valamint alkalmas lehet a terápia monitorozására is. Annak érdekében, hogy az ALCAM prognosztikus értékét elválasszuk annak esetleges prediktív értékétől, megvizsgáltuk

annak kezelés előtti szérum szintjeit a mCRPC-ben elsővonalba ugyancsak gyakran alkalmazott két további terápiával (ABI és DOC) kapcsolatban is. Szérum mintákon elvégzett kísérleteinkkel azt találtuk, hogy a kezelés előtt emelkedett ALCAM koncentrációk az ABI-kezelt betegek esetén is összefüggést mutattak a rövidebb túléléssel, azonban a DOC-kezelt betegek esetében nem találtunk ehhez hasonló korrelációt. Ez arra utal, hogy az ALCAM egy olyan biomarker, amely alkalmas lehet az antiandrogén terápiák gyengébb hatékonyságát előrejelezni és így segítséget nyújthat a kezelőorvosoknak a beteg számára a megfelelő terápia megválasztásában (82).

Abban az esetben, ha egy marker a túlélés tekintetében prognosztikus értékű, még nem feltétlenül vesz részt funkcionálisan a rezisztencia kialakításában. Erre az egyik legalkalmasabb példa a PSA, mely ugyan egy prognosztikus értékű marker, azonban a PC progressziójában mai tudásunk szerint nem játszik szerepet. Ezért a prognosztikus markerek funkcionális vizsgálatára van szükség annak eldöntésére, hogy az csak okozata vagy pedig befolyásoló tényezője a progressziónak vagy a gyógyszer rezisztenciának. Ezért *in vitro* vizsgálatokat végeztünk annak eldöntésére, hogy az ALCAM részt vesz-e az ENZA rezisztencia kialakításában és ha igen, akkor expressziójának gátlása hatással van-e a terápia rezisztenciára. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az ALCAM gátlása jelentősen növelte a rezisztens PC sejtek ENZA iránti érzékenységet. Ezen az eredmények alapján felmerül az ALCAM terápiás célpontként történő alkalmazhatóságának lehetősége is (82).

Az ENZA rezisztenciát előrejelző markerek azonosítását célzó kutatásom mellett a neuroendokrin szérum markerek, a CGA és a NSE prognosztikai értékét több PC betegcsoportban is megvizsgáltam. Egyrészt korai, lokális stádiumú és hormonérzékeny PC-os betegekben, másrészt különböző szisztémás kezeléseket (ENZA, ABI, DOC) kapó mCRPC betegcsoportokban. A CGA és az NSE általános neuroendokrin markerek, melyek mind szövetben, mind pedig szérumban kimutathatóak. A PC esetében ismert az ún. neuroendokrin differenciáció jelensége, melyet más néven „terápia indukálta neuroendokrin transz-differenciációnak” is neveznek, ami arra utal, hogy az túlnyomó többségében adenocarcinoma típusú sejtekből álló PC daganatok hormonális támadáspontú kezelésekre hatására kisselektálódnak és neuroendokrin (kissejtes) daganatokhoz hasonló morfológiát és molekuláris sajátosságokat vesznek fel. Ez a jelenség együtt jár a daganat fokozott agresszivitásával és terápia rezisztenciájával. Ezek az

ismeretek vetették fel a CGA és az NSE, mint neuroendokrin szérumszintek markereit alkalmazását prosztata daganatban egyrészt, mint a tumorprogresszióval potenciálisan korreláló szérumszintek markereit, másrészt mint a szisztémás terápia elleni rezisztencia előrejelzésére alkalmas jelzőmolekulák.

Eredményeink azt mutatták, hogy a hormonérzékeny (RPE) csoportba képest az ADT kezelésen átesett, kasztráció-rezisztens PC betegek esetében (DOC, ABI ENZA kohortok) szignifikánsan magasabb CGA és NSE szérumszintek mérhetők. Ez az eredmény pedig alátámasztja a neuroendokrin transz-differenciáció hormonális támadáspontú kezelésekre történő kifejlődő CRPC stádiumban.

Lokális PC esetében a neuroendokrin szérumszintek vizsgálatával több kutatócsoport is foglalkozott, azonban a CGA prognosztikus értékéről a betegségnek ebben a korai stádiumában egymásnak ellentmondó eredmények születtek. Egy tanulmány azoknál a betegeknél detektált magas CGA szérumszinteket, akiknek a RPE pillanatában a tumor már extrakapszuláris terjedést mutatott (107). Egy másik tanulmány pedig az RPE előtti emelkedett CGA érték és a rövidebb PSA relapszus-mentes túlélés között talált szignifikáns összefüggést (108). Ezzel ellentétben *De Nunzio* eredményei alapján a szérumszintek meghatározása nem alkalmas a magasabb malignitású lokális prosztata daganatokat jobb prognózisú PC-től történő elkülönítésére (109). Ez utóbbi eredményekkel összhangban, munkacsoportunk korábbi eredményei is azt mutatták, hogy a lokális PC esetében a műtét előtti szérumszintek önmagukban nem alkalmasak a prognosztikus rizikóbecslés javítására (110). Mostani kutatásunk egy az előzőtől független betegkohorton szintén azt mutatta, hogy a CGA és az NSE szérumszintjei nincsenek szoros összefüggésben az RPE kezelésnek alávetett betegek progresszió-mentes túlélésével.

Az mCRPC betegek kezelésére jelenleg a három leggyakrabban használt terápia a DOC, az ABI és az ENZA. Közülük a DOC terápia használatát leghosszabb ideje és ismert, hogy erre a kezelésre a betegek körül-belül fele reagál számottevő PSA csökkenéssel (111). A DOC rezisztencia legismertebb oka a transzmembrán ABCB pumpafehérjék fokozott aktivitása és a citokin molekulák fokozott termelődés áll (47). A CGA és az NSE prediktív értékét DOC terápia esetében ezidáig mindössze két kutatás vizsgálta. *Sarkar és mtsai.* tanulmánya nem talált szignifikáns összefüggést a plazma CGA koncentráció és a DOC terápia hatékonysága között (75). Hasonlóképpen *von*



*Hardenberg* és munkacsoportja sem találta prognosztikus értékűnek sem a CGA, sem pedig az NSE szérumszintjét DOC kezelésnek alávetett betegek esetében. Továbbá, a DOC kezelés alatt kis mértékben emelkedő CGA szérumszintjét és változatlan NSE szinteket detektáltak (112). Ezzel szemben, az általunk végzett vizsgálatok szignifikáns összefüggést találtak a DOC-kezelés alatt mCRPC betegek rövidtávú túlélése és a kezelés megkezdése előtti szérumszintek között. Továbbá, hasonlóan a *von Hardenberg* által közölt eredményekhez, a mi vizsgálatunk is azt találták, hogy a CGA szérumszintje kis mértékben emelkedik a DOC terápia alatt, ugyanakkor az NSE szintje nem változik a kezelés folyamán.

Az antiandrogén terápia ellen kialakuló rezisztencia hátterében a neuroendokrin transz-differenciáció is fontos tényező lehet. Ezért a neuroendokrin szérumszintek kezelése előtti szintjei prediktív markerként szolgálhatnak a PC-ben használt szisztémás terápia hatékonyságának előrejelzésére. A neuroendokrin szérumszintek közül a CGA és az NSE tekintetében állnak rendelkezésre ABI és ENZA kezeléssel kapcsolatos tanulmányok. A CGA prediktív értékét öt tanulmány vizsgálta, melyek alapján a kezelés előtti emelkedett CGA érték szignifikáns összefüggést mutatott a betegek ENZA és ABI kezelés alatt rövidtávú teljes és progresszió-mentes túlélésével (69-72, 113). Az ötből két tanulmány vizsgálta a CGA és az NSE kombinációjának prediktív értékét. Mindkét tanulmány a kezelés előtti emelkedett CGA és NSE szérumszintek és az ABI és ENZA kezelésnek alávetett betegek rövidtávú teljes és progresszió-mentes túlélése közötti szignifikáns összefüggést igazolta (73, 74). A rendelkezésre álló vizsgálatok alapján azonban az NSE önmagában nem képes előrejelezni az ABI és ENZA terápia hatékonyságát. Az általunk elvégzett vizsgálat alapján mind a CGA, mind pedig az NSE kezelés előtti emelkedett szérumszintje az ABI és ENZA kezelt betegek rosszabb túlélésével mutatott szignifikáns összefüggést. A kiértékelést elvégeztük a *Heck és mtsai.* által közzétett módon is, úgy hogy a két szérumszintet az ott használt koncentráció értékeknél (cut-off) dichotomizáltuk és kombináltuk. Erre az adott lehetőséget, hogy ugyanazt a mérési platformot használtuk, mint ez a munkacsoport, így eredményeink közvetlenül is összevethetők (74). Eredményeink alapján elmondható, hogy a kezelés előtti emelkedett CGA és NSE kombinációja független prediktív markernek bizonyult a túlélés tekintetében, így sikerült a *Heck és mtsai.* által közölt kiértékelési módszert egy független betegkohorton validálni. A terápia alatt kialakuló ún. szerzett rezisztencia

vizsgálata céljából a neuroendokrin szérummarkerek kezelés alatti szérumszintjeit is meghatároztuk. Eredményeink alapján a CGA szérumszintjének a kezelés előtti mintához képest legalább 50%-os emelkedése szignifikáns összefüggést mutatott az ABI és ENZA-kezelt betegek rövidebb túlélésével. Továbbá, a legrosszabb a prognózist azon betegek esetében találtuk, akik CGA szintjei az ENZA vagy ABI kezelésük előtt is emelkedettek voltak és a kezelés során tovább emelkedtek. Ez azt sugallja, hogy ezeknél a betegeknél a már kezelés előtt fennállt a neuroendokrin transz-differenciáció jelensége, mely az ABI és ENZA kezelés során tovább fokozódott a neuroendokrin szérumszintek további emelkedését vonva maga után. Ezért eredményeink alapján a kezelés előtti és kezelés során mért CGA szintek alapján az ABI és ENZA-kezelt betegeket érdemes lehet kockázati csoportokba sorolni. Ennek megfelelően az alacsony kockázati csoportba tartoznak azok a betegek, akiknek a kezelés előtt mért CGA szérum koncentrációjuk alacsony értéket mutat. Közepes kockázati csoportba azok a betegek tartoznak, akiknek a kezelés előtt vett CGA szérum értékük magas, de nem emelkedik a terápia folyamán, míg magas kockázati csoportba soroljuk azokat a betegeket, akiknek a terápia kezdetén magas CGA szintet mutatnak, ami a kezelés alatt tovább emelkedik.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CGA egy olyan szérum biomarker, mely segítséget nyújthat az mCRPC betegek számára történő terápia kiválasztásában és alkalmas lehet az ENZA és az ABI terápiák monitorozására is. Eredményeink szerint a magas CGA/NSE szérumkoncentrációval rendelkező betegek esetében inkább a DOC kezeléssel, míg az alacsony CGA/NSE koncentrációjú betegeknél inkább az ENZA vagy az ABI kezeléssel érhető el hosszabb túlélés.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a terápia érzékeny és rezisztens sejtvonalpárok fehérjekészletének vizsgálata, majd a kapott eredmények bioinformatikai módszerekkel való feldolgozása alkalmas módszer lehet a terápia rezisztenciában részt vevő biomarkerek és potenciális gyógyszer-célpontok feltérképezésére. Továbbá a CGA szérumszintjének meghatározása hatékony módja lehet az ENZA/ABI kezelésre nem reagáló betegek korai azonosításának. Azonban fontos figyelembe vennünk, hogy a rezisztencia kialakulása valószínűleg nem köthető egyetlen folyamathoz, hanem inkább több, egymástól részben független mechanizmus is kialakíthatja. Ezért az ALCAM és CGA/NSE szérumvizsgálatokat érdemes lenne további, a rezisztenciával összefüggésbe hozott markerekkel (AR státusz, BRCA2 mutáció) együtt, kombinációban vizsgálni. A

legpontosabb terápiapredikciót ezért valószínűleg egy különböző mechanizmusokat lefedő biomarker panel összeállításával lehet elérni. Kutatócsoportunk a továbbiakban egy ilyen kombinációs marker panel összeállításán és független betegkohorton történő validálásán fog dolgozni.

## 6. Következtetések

1. Az ENZA érzékeny és rezisztens sejtvonalpárok proteomikai összehasonlító vizsgálatával, majd az eredmények hipotézismentes módon történő bioinformatikai kiértékelésével elsőként azonosítottuk az ALCAM fehérjét, mint a prosztaták ENZA rezisztenciájában potenciálisan szerepet játszó fehérjét és biomarkert.
2. Az ENZA-kezelt mCRPC betegek szérum mintáinak vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy a kezelés előtti emelkedett ALCAM szintek az ENZA terápia alatti rövidebb túlélés független prognosztikus faktorának bizonyultak.
3. Az ALCAM szérum vizsgálatainkat kiterjesztettük az mCRPC-ben leggyakrabban alkalmazott további két kezelésre (ABI és DOC), mely vizsgálatok során azt találtuk, hogy az ALCAM kezelés előtti szérumszintje összefüggést mutat az ABI-kezelt betegek rövidebb túlélésével, ugyanakkor a DOC-kezelt betegek esetében nem találtunk hasonló összefüggést.
4. Eredményeink alapján elsőként sikerült kimutatnunk, hogy az ALCAM fehérje a szisztémás kezelés megkezdése előtt mért szérumszintjének meghatározása hozzásegíthet az ENZA és ABI-rezisztens mCRPC betegek azonosításához, így hozzájárulva a hatékonyabb elsővonalbeli terápia kiválasztásához.
5. Funkcionális, *in vitro* vizsgálataink során sikerült kimutatnunk az ALCAM fehérje ENZA rezisztenciában betöltött funkcionális szerepét, mely az ALCAM lehetséges terápiás célpontkénti alkalmazását is felveti.
6. A neuroendokrin szérum markerek prognosztikai értékének vizsgálata során sikerült a CGA prediktív értékét validálnunk saját független betegcsoportunkon, mely eredmények klinikai szempontból fontos információt szolgáltatnak az ENZA és az ENZA/ABI terápiák közötti terápiás döntés optimalizálásához. Továbbá sikerült kimutatnunk, hogy a CGA emelkedése az ENZA/ABI terápia során a kezelés monitorozására is használható, ami segíthet a terápiaváltás szükséges időpontjának megválasztásában.

## 7. Összefoglalás

Az antiandrogének közé tartozó ENZA egy olyan elsővonalban alkalmazható szer, mely szignifikánsan javítja az mCRPC betegek túlélését. Azonban ennél a kezelésnél is megfigyelhető a kezdeti, valamint a terápia során fellépő rezisztencia, melyekért felelős mechanizmusok jelenleg még csak részben ismertek. Továbbá, nem állnak rendelkezésre olyan a mai rutinban elérhető biomarkerek, melyek a betegek számára a megfelelő terápia megválasztásában segítenének. Kutatásunk célja olyan prediktív markerek azonosítása volt, melyek részt vehetnek az ENZA terápia elleni rezisztencia kialakításában és amelyek segítségével szolgálhatnak a kezelésre nem reagáló betegek azonosításában.

Az ENZA rezisztencia prediktív markereinek azonosításával foglalkozó kutatásunk során ENZA-érzékeny és rezisztens PC sejtvonalpárokat vizsgáltunk tömegspektrometria módszerrel, majd a nagyszámú azonosított fehérje közül bioinformatikai módszerekkel választottunk ki 4 fehérjét, melyek koncentrációját ENZA-kezelt mCRPC betegek szérummintáiban határoztuk meg ELISA módszerrel. Vizsgálataink alapján az ALCAM fehérje mutatott szignifikáns összefüggést az ENZA-kezelt betegek kedvezőtlenebb túlélésével, így a fehérjét további funkcionális vizsgálatoknak, siRNS gátlásnak vetettük alá és figyeltük a sejtek életképességének változását. Az ALCAM csendesítésének hatására a LAPC4-ER sejtvonala ENZA érzékenysége növekedett. Továbbá, meghatároztuk az ALCAM fehérje prediktív értékét az ABI és DOC terápia esetében is. Vizsgálatunk alapján az ALCAM az ABI-kezelt mCRPC betegek rövidebb túlélésével mutatott szignifikáns összefüggést, ugyanakkor a DOC terápia esetében nem bizonyult prognosztikus markernek.

Kutatásom során a CGA és NSE prognosztikai értékét is megvizsgáltuk a lokális PC és mCRPC betegek esetében is. Eredményeink alapján kasztráció-rezisztens stádiumban szignifikánsan magasabb CGA és NSE szérumszintek figyelhetők meg a hormonérzékeny lokális PC stádiumhoz képest, mely az ADT kezelés alatti neuroendokrin transz-differenciáció kifejlődésére utal. Továbbá, a kezelés előtti emelkedett CGA koncentrációk és azok terápia során történő további emelkedése az ABI és ENZA-kezelt betegek igen rossz túlélésével mutatott összefüggést.

Reményeink szerint a dolgozatomban bemutatott eredményeink, egy nagyobb betegkohorton való validálás után bekerülhetnek a klinikai gyakorlatba, hozzájárulva a terápiás döntéshozatal javításához.

## 8. Summary

ENZA is a first-line next-generation antiandrogen treatment, which has been demonstrated to significantly prolong survival of mCRPC patients. Baseline and also acquired resistance to ENZA has been observed, however their molecular mechanisms are still poorly understood. Moreover, there are no available biomarkers for the clinical-decision making, which may be able to predict the efficacy of ENZA therapy. Our study aim was to identify predictive markers and potential therapeutic targets, which are involved in treatment resistance and may be able to select patients who would benefit from ENZA therapy.

Comparative proteome analyses were performed on ENZA-sensitive vs. resistant PC cell lines. Differently expressed proteins were listed and further selections were performed by using different bioinformatics approaches in order to select the four most promising candidate markers for further analyses. Selected proteins were determined in the pre-treatment serum samples of 72 ENZA-treated mCRPC patients by using the ELISA method. High ALCAM serum levels were significantly associated with poor patients' survival, therefore this protein was assessed in further *in vitro* functional experiments. ALCAM expression was silenced using siRNA-transfection and cell viability was parallely monitored. Due to ALCAM silencing the viability of LAPCE-ER cells were significantly decreased under ENZA treatment, suggesting its involvement in ENZA-resistance. As ALCAM was the only serum protein to be associated with survival in ENZA-treated patients, its serum levels were determined also in ABI- and DOC-treated mCRPC patients. Our analyses revealed serum ALCAM as a predictor of OS in androgen signaling inhibitor-treated men but not in DOC chemotherapy-treated patients.

In addition, during my PhD research, we assessed the predictive role of neuroendocrine serum markers in hormone naïve PC and mCRPC patients' samples. Higher serum CGA and NSE levels in mCRPC compared to hormone naïve PC support the presence of neuroendocrine transdifferentiation under androgen-deprivation therapy. Moreover, our results revealed the poorest prognosis in patients with high baseline CGA levels who experienced further CGA increase during ABI and ENZA treatment.

Our results after validation in a larger independent cohort may be incorporated into clinical decision-making, thus contributing to the prediction of therapy resistance of mCRPC patients.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71: 209-249.
2. Kasler M, Otto S, Kenessey I. (2017) A rákmorbiditás és -mortalitás jelenlegi helyzete a Nemzeti Rákregiszter tükrében [The current situation of cancer morbidity and mortality in the light of the National Cancer Registry]. *Orv Hetil*, 158: 84-89.
3. Nyirády P, Bajory Z, Flaskó T, Szántó Á. *Urológia – Orvostanhallgatók, szakorvosjelöltek és szakorvosok számára*. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest, 2019: 273-295.
4. Romics I (szerk.). *Az urológia tankönyve*. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest, 2010: 20, 33-66.
5. Rawla P. (2019) Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*, 10: 63-89.
6. Stewart RW, Lizama S, Peairs K, Sateia HF, Choi Y. (2017) Screening for prostate cancer. *Semin Oncol*, 44: 47-56.
7. Chen YC, Page JH, Chen R, Giovannucci E. (2008) Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *Prostate*, 68: 1582-1591.
8. Mateo J, Boysen G, Barbieri CE, Bryant HE, Castro E, Nelson PS, Olmos D, Pritchard CC, Rubin MA, de Bono JS. (2017) DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. *Eur Urol*, 71: 417-425.
9. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, Garofalo A, Gulati R, Carreira S, Eeles R, Elemento O, Rubin MA, Robinson D, Lonigro R, Hussain M, Chinnaiyan A, Vinson J, Filipenko J, Garraway L, Taplin ME, AlDubayan S, Han GC, Beightol M, Morrissey C, Nghiem B, Cheng HH, Montgomery B, Walsh T, Casadei S, Berger M, Zhang L, Zehir A, Vijai J, Scher HI, Sawyers C, Schultz N, Kantoff PW, Solit D, Robson M, Van Allen EM, Offit K, de Bono J, Nelson PS. (2016) Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 375: 443-453.

10. Benafif S, Kote-Jarai Z, Eeles RA, Consortium P. (2018) A Review of Prostate Cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 27: 845-857.
11. Cao Y, Ma J. (2011) Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4: 486-501.
12. Gacci M, Russo GI, De Nunzio C, Sebastianelli A, Salvi M, Vignozzi L, Tubaro A, Morgia G, Serni S. (2017) Meta-analysis of metabolic syndrome and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 20: 146-155.
13. Huncharek M, Haddock KS, Reid R, Kupelnick B. (2010) Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *Am J Public Health*, 100: 693-701.
14. Kenfield SA, Stampfer MJ, Giovannucci E, Chan JM. (2011) Physical activity and survival after prostate cancer diagnosis in the health professionals follow-up study. *J Clin Oncol*, 29: 726-732.
15. Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW, Culig Z, Gronberg H, Luo J, Visakorpi T, Rubin MA. (2013) The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol*, 64: 567-576.
16. Cancer Genome Atlas Research N. (2015) The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, 163: 1011-1025.
17. Szarvas T, Csizmarik A, Szucs M, Nyirady P. (2019) A prosztatarák molekuláris altípusai és célzott terápia kilátásai [Molecular subtypes and perspectives of targeted therapies in prostate cancer]. *Orv Hetil*, 160: 252-263.
18. Acs B, Szarvas T, Szekely N, Nyirady P, Szasz AM. (2015) Current State of ERG as Biomarker in Prostatic Adenocarcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*, 15: 643-651.
19. Abida W, Patnaik A, Campbell D, Shapiro J, Bryce AH, McDermott R, Sautois B, Vogelzang NJ, Bambury RM, Voog E, Zhang J, Piulats JM, Ryan CJ, Merseburger AS, Daugaard G, Heidenreich A, Fizazi K, Higano CS, Krieger LE, Sternberg CN, Watkins SP, Despain D, Simmons AD, Loehr A, Dowson M, Golsorkhi T, Chowdhury S, investigators T. (2020) Rucaparib in Men With Metastatic



- Castration-Resistant Prostate Cancer Harboring a BRCA1 or BRCA2 Gene Alteration. *J Clin Oncol*, 38: 3763-3772.
20. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, Chi KN, Sartor O, Agarwal N, Olmos D, Thiery-Vuillemin A, Twardowski P, Mehra N, Goessl C, Kang J, Burgents J, Wu W, Kohlmann A, Adelman CA, Hussain M. (2020) Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 382: 2091-2102.
  21. de Bono JS, De Giorgi U, Rodrigues DN, Massard C, Bracarda S, Font A, Arranz Arija JA, Shih KC, Radavoi GD, Xu N, Chan WY, Ma H, Gendreau S, Riisnaes R, Patel PH, Maslyar DJ, Jinga V. (2019) Randomized Phase II Study Evaluating Akt Blockade with Ipatasertib, in Combination with Abiraterone, in Patients with Metastatic Prostate Cancer with and without PTEN Loss. *Clin Cancer Res*, 25: 928-936.
  22. Jimeno A, Gordon M, Chugh R, Messersmith W, Mendelson D, Dupont J, Stagg R, Kapoun AM, Xu L, Uttamsingh S, Brachmann RK, Smith DC. (2017) A First-in-Human Phase I Study of the Anticancer Stem Cell Agent Ipafricept (OMP-54F28), a Decoy Receptor for Wnt Ligands, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 23: 7490-7497.
  23. Filella X, Foj L. (2016) Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int J Mol Sci*, 17: 1784.
  24. Etzioni R, Penson DF, Legler JM, di Tommaso D, Boer R, Gann PH, Feuer EJ. (2002) Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst*, 94: 981-990.
  25. Nagy B, Bhattoa Harjit P, Kappelmayer J. (2019) A prosztatárak laboratóriumi diagnosztikája: honnan hová tartunk? [Routine laboratory diagnostics of prostate cancer: Past, present and the future]. *Magy Onkol*, 63: 16-25.
  26. Conteduca V, Oromendia C, Eng KW, Bareja R, Sigouros M, Molina A, Faltas BM, Sboner A, Mosquera JM, Elemento O, Nanus DM, Tagawa ST, Ballman KV, Beltran H. (2019) Clinical features of neuroendocrine prostate cancer. *Eur J Cancer*, 121: 7-18.
  27. Humphrey PA. (2017) Histopathology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7: a030411.

28. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, Grading C. (2016) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 40: 244-252.
29. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, Fanti S, Fossati N, Gandaglia G, Gillessen S, Grivas N, Grummet J, Henry AM, van der Kwast TH, Lam TB, Lardas M, Liew M, Mason MD, Moris L, Oprea-Lager DE, van der Poel HG, Rouviere O, Schoots IG, Tilki D, Wiegel T, Willemsse PM, Cornford P. (2021) EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*, 79: 243-262.
30. Litwin MS, Tan HJ. (2017) The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, 317: 2532-2542.
31. Nyirady P. (2019) A prosztatatarák sebészi kezelése [Surgical treatment of prostate cancer]. *Magy Onkol*, 63: 26-31.
32. Maraz A, Geczi L, Biro K, Varga L, Kuronya Z. (2020) Terápiás szekvenciák az előrehaladott/ áttétes prosztatadaganatok gyógyszeres kezelésében [Therapeutic sequences in the treatment of advanced/metastatic prostate cancer]. *Magy Onkol*, 64: 263-272.
33. Fizazi K, Shore N, Tammela TL, Ulys A, Vjaters E, Polyakov S, Jievaltas M, Luz M, Alekseev B, Kuss I, Kappeler C, Snapir A, Sarapohja T, Smith MR, Investigators A. (2019) Darolutamide in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 380: 1235-1246.
34. Hussain M, Fizazi K, Saad F, Rathenborg P, Shore N, Ferreira U, Ivashchenko P, Demirhan E, Modelska K, Phung, Krivoshik A, Sternberg CN. (2018) Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 378: 2465-2474.
35. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, Olmos D, Mainwaring PN, Lee JY, Uemura H, De Porre P, Smith AA, Brookman-May SD, Li S, Zhang K, Rooney B, Lopez-Gitlitz A, Small EJ. (2021) Apalutamide and Overall Survival in Prostate Cancer. *Eur Urol*, 79: 150-158.

36. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. (2004) Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*, 351: 1513-1520.
37. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA, Investigators TAX. (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*, 351: 1502-1512.
38. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF, Investigators IS. (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363: 411-422.
39. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO, Investigators T. (2010) Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet*, 376: 1147-1154.
40. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB, Jr., Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Flechon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI, Investigators C-A-. (2011) Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 364: 1995-2005.
41. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Flechon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, Hirmand M, Selby B, Seely L, de Bono JS, Investigators A. (2012) Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*, 367: 1187-1197.
42. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, Iversen P, Bhattacharya S, Carles J, Chowdhury S, Davis ID, de Bono JS, Evans CP, Fizazi K, Joshua AM, Kim CS, Kimura G, Mainwaring P, Mansbach H, Miller K, Noonberg SB, Perabo F, Phung D, Saad F, Scher HI, Taplin ME, Venner PM,

- Tombal B, Investigators P. (2014) Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med*, 371: 424-433.
43. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PF, Sternberg CN, Miller K, Logothetis CJ, Shore ND, Small EJ, Carles J, Flaig TW, Taplin ME, Higano CS, de Souza P, de Bono JS, Griffin TW, De Porre P, Yu MK, Park YC, Li J, Kheoh T, Naini V, Molina A, Rathkopf DE, Investigators C-A-. (2015) Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naive men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*, 16: 152-160.
  44. Sartor O, Coleman R, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fossa SD, Chodacki A, Wiechno P, Logue J, Widmark A, Johannessen DC, Hoskin P, James ND, Solberg A, Syndikus I, Vogelzang NJ, O'Bryan-Tear CG, Shan M, Bruland OS, Parker C. (2014) Effect of radium-223 dichloride on symptomatic skeletal events in patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases: results from a phase 3, double-blind, randomised trial. *Lancet Oncol*, 15: 738-746.
  45. Abida W, Cheng ML, Armenia J, Middha S, Autio KA, Vargas HA, Rathkopf D, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, Carbone E, Barnett ES, Hullings M, Hechtman JF, Zehir A, Shia J, Jonsson P, Stadler ZK, Srinivasan P, Laudone VP, Reuter V, Wolchok JD, Socci ND, Taylor BS, Berger MF, Kantoff PW, Sawyers CL, Schultz N, Solit DB, Gopalan A, Scher HI. (2019) Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. *JAMA Oncol*, 5: 471-478.
  46. Jordan MA, Wilson L. (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 4: 253-265.
  47. Szarvas T, Csizmarik A, Nagy N, Keresztes D, Varadi M, Kuronya Z, Riesz P, Nyirady P. (2020) Az áttétes kasztrációrezisztens prosztatatarák gyógyszerrezisztenciájának molekuláris vonatkozásai [Molecular underpinnings of systemic treatment resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer]. *Orv Hetil*, 161: 813-820.
  48. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 219-234.

49. Mahon KL, Lin HM, Castillo L, Lee BY, Lee-Ng M, Chatfield MD, Chiam K, Breit SN, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, Boyer MJ, Stockler MR, Daly RJ, Henshall SM, Horvath LG. (2015) Cytokine profiling of docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*, 112: 1340-1348.
50. Darr C, Krafft U, Hadaschik B, Tschirdewahn S, Sevcenco S, Csizmarik A, Nyirady P, Kuronya Z, Reis H, Maj-Hes A, Shariat SF, Kramer G, Szarvas T. (2018) The Role of YKL-40 in Predicting Resistance to Docetaxel Chemotherapy in Prostate Cancer. *Urol Int*, 101: 65-73.
51. Szarvas T, Sevcenco S, Modos O, Keresztes D, Nyirady P, Csizmarik A, Ristl R, Puhr M, Hoffmann MJ, Niedworok C, Hadaschik B, Maj-Hes A, Shariat SF, Kramer G. (2018) Matrix metalloproteinase 7, soluble Fas and Fas ligand serum levels for predicting docetaxel resistance and survival in castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*, 122: 695-704.
52. Szarvas T, Sevcenco S, Modos O, Keresztes D, Nyirady P, Kubik A, Romics M, Kovalszky I, Reis H, Hadaschik B, Shariat SF, Kramer G. (2018) Circulating syndecan-1 is associated with chemotherapy-resistance in castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*, 36: 312 e9- e15.
53. Keresztes D, Csizmarik A, Nagy N, Modos O, Fazekas T, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Puhr M, Sevcenco S, Kramer G, Shariat S, Kuronya Z, Takacs L, Tornyi I, Lazar J, Hadaschik B, Laszik A, Szucs M, Nyirady P, Szarvas T. (2022) Comparative proteome analysis identified CD44 as a possible serum marker for docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. *J Cell Mol Med*, 26: 1332-1337.
54. Csizmarik A, Hadaschik B, Kramer G, Nyirady P, Szarvas T. (2021) Mechanisms and markers of resistance to androgen signaling inhibitors in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*, 39: 728.e13-.e24.
55. Korpál M, Korn JM, Gao X, Rakiec DP, Ruddy DA, Doshi S, Yuan J, Kovats SG, Kim S, Cooke VG, Monahan JE, Stegmeier F, Roberts TM, Sellers WR, Zhou W, Zhu P. (2013) An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (enzalutamide). *Cancer Discov*, 3: 1030-1043.
56. Chen EJ, Sowalsky AG, Gao S, Cai C, Voznesensky O, Schaefer R, Loda M, True LD, Ye H, Troncoso P, Lis RL, Kantoff PW, Montgomery RB, Nelson PS, Bubley GJ, Balk SP, Taplin ME. (2015) Abiraterone treatment in castration-resistant

- prostate cancer selects for progesterone responsive mutant androgen receptors. *Clin Cancer Res*, 21: 1273-1280.
57. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubber B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, De Marzo AM, Isaacs JT, Isaacs WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J. (2014) AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 371: 1028-1038.
  58. Scher HI, Lu D, Schreiber NA, Louw J, Graf RP, Vargas HA, Johnson A, Jendrisak A, Bambury R, Danila D, McLaughlin B, Wahl J, Greene SB, Heller G, Marrinucci D, Fleisher M, Dittamore R. (2016) Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*, 2: 1441-1449.
  59. Arora VK, Schenkein E, Murali R, Subudhi SK, Wongvipat J, Balbas MD, Shah N, Cai L, Efstathiou E, Logothetis C, Zheng D, Sawyers CL. (2013) Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell*, 155: 1309-1322.
  60. Pühr M, Hofer J, Eigentler A, Ploner C, Handle F, Schaefer G, Kroon J, Leo A, Heidegger I, Eder I, Culig Z, Van der Pluijm G, Klocker H. (2018) The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. *Clin Cancer Res*, 24: 927-938.
  61. Annala M, Vandekerckhove G, Khalaf D, Taavitsainen S, Beja K, Warner EW, Sunderland K, Kollmannsberger C, Eigl BJ, Finch D, Oja CD, Vergidis J, Zulfiqar M, Azad AA, Nykter M, Gleave ME, Wyatt AW, Chi KN. (2018) Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Discov*, 8: 444-457.
  62. Cheng HH, Pritchard CC, Boyd T, Nelson PS, Montgomery B. (2016) Biallelic Inactivation of BRCA2 in Platinum-sensitive Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*, 69: 992-995.
  63. Nagy ND, Fazekas T, Baghy K, Papp G, Csizmarik A, Szucs M, Nyirady P, Szarvas T. (2021) A karboplatin-kemoterápia hatékonysága egy áttétes, kasztrációrezisztens, BRCA2-mutáció-pozitív prosztatarákos betegben [Efficacy of

- carboplatin chemotherapy in a metastatic, castration-resistant BRCA2 mutation positive prostate cancer patient]. *Orv Hetil*, 162: 1004-1008.
64. Sun Y, Niu J, Huang J. (2009) Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res*, 1: 148-162.
  65. Terry S, Beltran H. (2014) The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Front Oncol*, 4: 60.
  66. Terry S, Maille P, Baaddi H, Kheuang L, Soyeux P, Nicolaiew N, Ceraline J, Firlej V, Beltran H, Allory Y, de la Taille A, Vacherot F. (2013) Cross modulation between the androgen receptor axis and protocadherin-PC in mediating neuroendocrine transdifferentiation and therapeutic resistance of prostate cancer. *Neoplasia*, 15: 761-772.
  67. Dang Q, Li L, Xie H, He D, Chen J, Song W, Chang LS, Chang HC, Yeh S, Chang C. (2015) Anti-androgen enzalutamide enhances prostate cancer neuroendocrine (NE) differentiation via altering the infiltrated mast cells --> androgen receptor (AR) --> miRNA32 signals. *Mol Oncol*, 9: 1241-1251.
  68. Beltran H, Tagawa ST, Park K, MacDonald T, Milowsky MI, Mosquera JM, Rubin MA, Nanus DM. (2012) Challenges in recognizing treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *J Clin Oncol*, 30: e386-389.
  69. Burgio SL, Conteduca V, Menna C, Carretta E, Rossi L, Bianchi E, Kopf B, Fabbri F, Amadori D, De Giorgi U. (2014) Chromogranin A predicts outcome in prostate cancer patients treated with abiraterone. *Endocr Relat Cancer*, 21: 487-493.
  70. Conteduca V, Burgio SL, Menna C, Carretta E, Rossi L, Bianchi E, Masini C, Amadori D, De Giorgi U. (2014) Chromogranin A is a potential prognostic marker in prostate cancer patients treated with enzalutamide. *Prostate*, 74: 1691-1696.
  71. Conteduca V, Scarpi E, Salvi S, Casadio V, Lolli C, Gurioli G, Schepisi G, Wetterskog D, Farolfi A, Menna C, De Lisi D, Burgio SL, Beltran H, Attard G, De Giorgi U. (2018) Plasma androgen receptor and serum chromogranin A in advanced prostate cancer. *Sci Rep*, 8: 15442.
  72. Dong B, Fan L, Wang Y, Chi C, Ma X, Wang R, Cai W, Shao X, Pan J, Zhu Y, Shanguan X, Xin Z, Hu J, Xie S, Kang X, Zhou L, Xue W. (2017) Influence of abiraterone acetate on neuroendocrine differentiation in chemotherapy-naive metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate*, 77: 1373-1380.

73. Fan L, Wang Y, Chi C, Pan J, Xun S, Xin Z, Hu J, Zhou L, Dong B, Xue W. (2017) Chromogranin A and neurone-specific enolase variations during the first 3 months of abiraterone therapy predict outcomes in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*, 120: 226-232.
74. Heck MM, Thaler MA, Schmid SC, Seitz AK, Tauber R, Kubler H, Maurer T, Thalgott M, Hatzichristodoulou G, Hoppner M, Nawroth R, Lupp PB, Gschwend JE, Retz M. (2017) Chromogranin A and neurone-specific enolase serum levels as predictors of treatment outcome in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer undergoing abiraterone therapy. *BJU Int*, 119: 30-37.
75. Sarkar D, Singh SK, Mandal AK, Agarwal MM, Mete UK, Kumar S, Mavuduru RS, Prasad R. (2010) Plasma chromogranin A: clinical implications in patients with castrate resistant prostate cancer receiving docetaxel chemotherapy. *Cancer Biomark*, 8: 81-87.
76. von Hardenberg J, Schwartz M, Werner T, Fuxius S, Muller M, Bolenz C, Weiss C, Heinrich E. (2016) Influence of abiraterone acetate on circulating neuromediators in chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer. *Prostate*, 76: 613-619.
77. Hoefer J, Akbor M, Handle F, Ofer P, Puhr M, Parson W, Culig Z, Klocker H, Heidegger I. (2016) Critical role of androgen receptor level in prostate cancer cell resistance to new generation antiandrogen enzalutamide. *Oncotarget*, 7: 59781-59794.
78. Qian S, Xia J, Liu H, Zhang Y, Zhang L, Yu Y. (2018) Integrative transcriptome analysis identifies genes and pathways associated with enzalutamide resistance of prostate cancer. *Aging Male*, 21: 231-237.
79. Bartha A, Gyorffy B. (2021) TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. *Int J Mol Sci*, 22: 2622.
80. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*, 2: 401-404.
81. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. (2013) Integrative analysis



- of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6: p11.
82. Csizmarik A, Keresztes D, Nagy N, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Puhr M, Tornyi I, Lazar J, Takacs L, Kramer G, Sevcenco S, Maj-Hes A, Juranyi Z, Hadaschik B, Nyirady P, Szarvas T. (2022) Proteome profiling of enzalutamide-resistant cell lines and serum analysis identified ALCAM as marker of resistance in castration-resistant prostate cancer. *Int J Cancer*, 151: 1405-1419.
  83. Park KC, Paluncic J, Kovacevic Z, Richardson DR. (2020) Pharmacological targeting and the diverse functions of the metastasis suppressor, NDRG1, in cancer. *Free Radic Biol Med*, 157: 154-175.
  84. Jung EU, Yoon JH, Lee YJ, Lee JH, Kim BH, Yu SJ, Myung SJ, Kim YJ, Lee HS. (2010) Hypoxia and retinoic acid-inducible NDRG1 expression is responsible for doxorubicin and retinoic acid resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*, 298: 9-15.
  85. Zhang D, Jia J, Zhao G, Yue M, Yang H, Wang J. (2015) NDRG1 promotes the multidrug resistance of neuroblastoma cells with upregulated expression of drug resistant proteins. *Biomed Pharmacother*, 76: 46-51.
  86. Zheng L, Dou X, Ma X, Qu W, Tang X. (2020) Identification of Potential Key Genes and Pathways in Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer Cell Lines: A Bioinformatics Analysis with Data from the Gene Expression Omnibus (GEO) Database. *Biomed Res Int*, 2020: 8341097.
  87. Garri C, Howell S, Tiemann K, Tiffany A, Jalali-Yazdi F, Alba MM, Katz JE, Takahashi TT, Landgraf R, Gross ME, Roberts RW, Kani K. (2018) Identification, characterization and application of a new peptide against anterior gradient homolog 2 (AGR2). *Oncotarget*, 9: 27363-27379.
  88. Tian SB, Tao KX, Hu J, Liu ZB, Ding XL, Chu YN, Cui JY, Shuai XM, Gao JB, Cai KL, Wang JL, Wang GB, Wang L, Wang Z. (2017) The prognostic value of AGR2 expression in solid tumours: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 7: 15500.
  89. Zhang JS, Gong A, Cheville JC, Smith DI, Young CY. (2005) AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 43: 249-259.

90. Zhao L, Lee BY, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, Boyer MJ, Stockler MR, Kaplan W, Breit SN, Sutherland RL, Henshall SM, Horvath LG. (2009) Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Res*, 69: 7696-7703.
91. Tang D, He J, Dai Y, Geng X, Leng Q, Jiang H, Sun R, Xu S. (2021) Targeting KDM1B-dependent miR-215-AR-AGR2-axis promotes sensitivity to enzalutamide-resistant prostate cancer. *Cancer Gene Ther*, 29: 543-557.
92. Gonthier K, Poluri RTK, Weidmann C, Tadros M, Audet-Walsh E. (2019) Reprogramming of Isocitrate Dehydrogenases Expression and Activity by the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res*, 17: 1699-1709.
93. Darvishi B, Boroumandieh S, Majidzadeh AK, Salehi M, Jafari F, Farahmand L. (2020) The role of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in cancer progression, invasion, metastasis and recurrence: A novel cancer stem cell marker and tumor-specific prognostic marker. *Exp Mol Pathol*, 115: 104443.
94. Kahlert C, Weber H, Mogler C, Bergmann F, Schirmacher P, Kenngott HG, Mattered U, Mollberg N, Rahbari NN, Hinz U, Koch M, Aigner M, Weitz J. (2009) Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse. *Br J Cancer*, 101: 457-464.
95. Weichert W, Knosel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. (2004) ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol*, 57: 1160-1164.
96. King JA, Ofori-Acquah SF, Stevens T, Al-Mehdi AB, Fodstad O, Jiang WG. (2004) Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res*, 6: R478-487.
97. Mezzanzanica D, Fabbi M, Bagnoli M, Staurengo S, Losa M, Ballardore E, Alberti P, Lusa L, Ditto A, Ferrini S, Pierotti MA, Barbareschi M, Pilotti S, Canevari S. (2008) Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 14: 1726-1733.

98. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Stephan C, Weissbach L, Loy V, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. (2003) ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. *Prostate*, 54: 34-43.
99. Minner S, Kraetzig F, Tachezy M, Kilic E, Graefen M, Wilczak W, Bokemeyer C, Huland H, Sauter G, Schlomm T. (2011) Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostate-specific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol*, 42: 1946-1952.
100. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. (2005) Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol*, 205: 359-376.
101. Hansen AG, Arnold SA, Jiang M, Palmer TD, Ketova T, Merkel A, Pickup M, Samaras S, Shyr Y, Moses HL, Hayward SW, Sterling JA, Zijlstra A. (2014) ALCAM/CD166 is a TGF-beta-responsive marker and functional regulator of prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res*, 74: 1404-1415.
102. Sanders AJ, Owen S, Morgan LD, Ruge F, Collins RJ, Ye L, Mason MD, Jiang WG. (2019) Importance of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in prostate cancer progression and metastatic dissemination. *Oncotarget*, 10: 6362-6377.
103. Szarvas T, Csizmarik A, Fazekas T, Huttli A, Nyirady P, Hadaschik B, Grunwald V, Pullen L, Juranyi Z, Kocsis Z, Shariat SF, Sevcenco S, Maj-Hes A, Kramer G. (2021) Comprehensive analysis of serum chromogranin A and neuron-specific enolase levels in localized and castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*, 127: 44-55.
104. Castaneda CA, Castillo M, Enciso JA, Enciso N, Bernabe LA, Sanchez J, Guerra H, Chavez C, Landa-Baella M, De-La-Cruz M, Villa-Robles M, Tello K, Gomez HL. (2019) Role of undifferentiation markers and androgen receptor expression in triple-negative breast cancer. *Breast J*, 25: 1316-1319.
105. Chen MJ, Cheng YM, Chen CC, Chen YC, Shen CJ. (2017) MiR-148a and miR-152 reduce tamoxifen resistance in ER+ breast cancer via downregulating ALCAM. *Biochem Biophys Res Commun*, 483: 840-846.

106. Darvishi B, Salehi M, Boroumandieh S, Majidzadeh AK, Jalili N, Moradi-Kalbolandi S, Farahmand L. (2020) Dual in vitro invasion/migration suppressing and tamoxifen response modulating effects of a recombinant anti-ALCAM scFv on breast cancer cells. *Cell Biochem Funct*, 38: 651-659.
107. Sciarra A, Voria G, Monti S, Mazzone L, Mariotti G, Pozza M, D'Eramo G, Silverio FD. (2004) Clinical understaging in patients with prostate adenocarcinoma submitted to radical prostatectomy: predictive value of serum chromogranin A. *Prostate*, 58: 421-428.
108. Alessandro S, Vincenzo G, Maria AG, Stefano S, Alessandro G, Salvatore M, Vincenzo T, Franco DS. (2007) Chromogranin A and biochemical progression-free survival in prostate adenocarcinomas submitted to radical prostatectomy. *Endocr Relat Cancer*, 14: 625-632.
109. De Nunzio C, Albisinni S, Presicce F, Lombardo R, Cancrini F, Tubaro A. (2014) Serum levels of chromogranin A are not predictive of high-grade, poorly differentiated prostate cancer: results from an Italian biopsy cohort. *Urol Oncol*, 32: 80-84.
110. Niedworok C, Tschirdewahn S, Reis H, Lehmann N, Szucs M, Nyirady P, Romics I, Rubben H, Szarvas T. (2017) Serum Chromogranin A as a Complementary Marker for the Prediction of Prostate Cancer-Specific Survival. *Pathol Oncol Res*, 23: 643-650.
111. Buttigliero C, Tucci M, Bertaglia V, Vignani F, Bironzo P, Di Maio M, Scagliotti GV. (2015) Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev*, 41: 884-892.
112. J VONH, Schwartz M, Werner T, Fuxius S, Muller M, Frangenheim T, Bolenz C, Weiss C, Heinrich E. (2017) Prospective Evaluation of Neuromediator Dynamics in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients During Docetaxel. *Anticancer Res*, 37: 5117-5124.
113. Giridhar KV, Sanhueza C, Hillman DW, Alkhateeb H, Carlson R, Tan W, Costello BA, Quevedo F, Pagliaro L, Kohli M. (2018) Serum chromogranin-A-based prognosis in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 21: 431-437.

**10. Saját publikációk jegyzéke****A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:**

1. Csizmarik A, Keresztes D, Nagy N, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Puhr M, Tornyi I, Lázár J, Takács L, Kramer G, Sevcenco S, Maj-Hes A, Jurányi Zsolt, Hadaschik B, Nyirády P, Szarvas T. Proteome profiling of enzalutamide-resistant cell lines and serum analysis identified ALCAM as marker of resistance in castration-resistant prostate cancer. *Int J Cancer*. 2022; Online ahead of print  
**IF:7,316**
2. Szarvas T, Csizmarik A, Fazekas T, Hüttl A, Nyirády P, Hadaschik B, Grünwald V, Püllen L, Jurányi Z, Kocsis Z, Shariat SF, Sevcenco S, Maj-Hes A, Kramer G. Comprehensive analysis of serum chromogranin A and neuron-specific enolase levels in localized and castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*. 2021; 127: 44-55.  
**IF:5,969**
3. Csizmarik A, Hadaschik B, Kramer G, Nyirády P, Szarvas T. Mechanisms and markers of resistance to androgen signaling inhibitors in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*. 2021; 39: 728.e13-728.e24.  
**IF:2,954**
4. Szarvas T, Csizmarik A, Nagy N, Keresztes D, Váradi M, Küronya Z, Riesz P, Nyirády P. Az áttétes kasztrációrezisztens prosztatarák gyógyszer-rezisztenciájának molekuláris vonatkozásai [Molecular underpinnings of systemic treatment resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer]. *Orv Hetil*. 2020; 161: 813-820.  
**IF:0,540**
5. Szarvas T, Csizmarik A, Szűcs M, Nyirády P. A prosztatarák molekuláris altípusai és célzott terápiás kilátásai [Molecular subtypes and perspectives of targeted therapies in prostate cancer]. *Orv Hetil*. 2019; 160: 252-263.  
**IF:0,497**

**A disszertációtól független saját közlemények:**

6. Kovács PT, Mayer T, Csizmarik A, Váradi M, Oláh C, Széles Á, Tschirdewahn S, Krafft U, Hadaschik B, Nyirády P, Riesz P, Szarvas T. Elevated Pre-Treatment Serum MMP-7 Levels Are Associated with the Presence of Metastasis and Poor Survival in Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Biomedicines*. 2022; 10: 698.

**IF:4,757**

7. Keresztes D, Csizmarik A, Nagy N, Módos O, Fazekas T, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Pühr M, Sevcenco S, Kramer G, Shariat S, Küronya Z, Takács L, Tornyi I, Lázár J, Hadaschik B, Lászik A, Szűcs M, Nyirády P, Szarvas T. Comparative proteome analysis identified CD44 as a possible serum marker for docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. *J Cell Mol Med*. 2022; 26: 1332-1337.

**IF:5,295**

8. Nagy ND, Fazekas T, Baghy K, Papp G, Csizmarik A, Szűcs M, Nyirády P, Szarvas T. A karboplatin-kemoterápia hatékonysága egy áttétes, kasztrációrezisztens, BRCA2-mutáció-pozitív prosztatarákos betegben [Efficacy of carboplatin chemotherapy in a metastatic, castration-resistant BRCA2 mutation positive prostate cancer patient]. *Orv Hetil*. 2021; 162: 1004-1008.

**IF:0,707**

9. Krafft U, Olah C, Reis H, Kesch C, Darr C, Grünwald V, Tschirdewahn S, Hadaschik B, Horvath O, Kenessey I, Nyirady P, Varadi M, Modos O, Csizmarik A, Szarvas T. High Serum PD-L1 Levels Are Associated with Poor Survival in Urothelial Cancer Patients Treated with Chemotherapy and Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 2548.

**IF:6,575**

10. Szarvas T, Csizmarik A, Váradi M, Fazekas T, Hüttl A, Nyirády P, Hadaschik B, Grünwald V, Tschirdewahn S, Shariat SF, Sevcenco S, Maj-Hes A, Kramer G. The prognostic value of serum MMP-7 levels in prostate cancer patients who received docetaxel, abiraterone, or enzalutamide therapy. *Urol Oncol*. 2021; 39: 296.e11-296.e19.

**IF:2,954**

11. Fazekas T, Szarvas T, Csizmarik A, Hadaschik B, Nyirády P. Correction to: COVID-19 research: promising tracks leading to uro-oncology. *Int Urol Nephrol*. 2020; 52: 995-997.
12. Szarvas T, Hoffmann MJ, Olah C, Szekely E, Kiss A, Hess J, Tschirdewahn S, Hadaschik B, Grotheer V, Nyirady P, Csizmarik A, Varadi M, Reis H. MMP-7 Serum and Tissue Levels Are Associated with Poor Survival in Platinum-Treated Bladder Cancer Patients. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 11: 48.  
**IF:3,706**
13. Olah C, Tschirdewahn S, Hoffmann MJ, Krafft U, Hadaschik B, Nyirady P, Szendrői A, Módos O, Csizmarik A, Kovalszky I, Reis H, Szarvas T. Soluble Syndecan-1 Levels Are Associated with Survival in Platinum-Treated Bladder Cancer Patients. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10: 864.  
**IF:3,706**
14. Nagy N, Reis H, Hadaschik B, Niedworok C, Módos O, Szendrői A, Bíró K, Hager T, Herold T, Ablat J, Black PC, Okon K, Tolkach Y, Csizmarik A, Oláh C, Keresztes D, Bremmer F, Gaisa NT, Kriegsmann J, Kovalszky I, Kiss A, Tímár J, Szász MA, Rink M, Fisch M, Nyirády P, Szarvas T. Prevalence of APC and PTEN Alterations in Urachal Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2020; 26:2773-2781.  
**IF:3,201**
15. Szarvas T, Jardin-Watelet B, Bourgoïn N, Hoffmann MJ, Nyirády P, Oláh C, Széll T, Csizmarik A, Hadaschik B, Reis H. High-soluble CGA levels are associated with poor survival in bladder cancer. *Endocr Connect*. 2019; 8: 625-633.  
**IF:2,592**
16. Szarvas T, Sevcenco S, Módos O, Keresztes D, Nyirády P, Csizmarik A, Ristl R, Pühr M, Hoffmann MJ, Niedworok C, Hadaschik B, Maj-Hes A, Shariat SF, Kramer G. Matrix metalloproteinase 7, soluble Fas and Fas ligand serum levels for predicting docetaxel resistance and survival in castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*. 2018; 122: 695-704.  
**IF:4,524**
17. Darr C, Krafft U, Hadaschik B, Tschirdewahn S, Sevcenco S, Csizmarik A, Nyirady P, Küronya Z, Reis H, Maj-Hes A, Shariat SF, Kramer G, Szarvas T. The Role of

YKL-40 in Predicting Resistance to Docetaxel Chemotherapy in Prostate Cancer.  
Urol Int. 2018; 101: 65-73.

**IF:1,698**



## 11. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni köszönetemet a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika igazgatójának, Nyirády Péter Professzor Úrnak, hogy helyet biztosított nekem a Klinikán és hogy lehetőséget teremtett rá, hogy a tudományos munkámat egy újonnan felújított kutatólaborban végezhettem el.

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Prof. Szarvas Tibornak, aki az első pillanatoktól kezdve ösztönzött és felismerte, hogy alkalmas vagyok a tudományos pályára. Segítségével megtanultam nem csak a kutatási munkámhoz szükséges módszerek helyes használatát, a kapott eredmények statisztikai kiértékelését, de a Klinikán folyó mintagyűjtés irányítását és a kutató labor több tevékenységének mindennapi vezetését is. Továbbá lehetőséget biztosított számomra, hogy a saját doktori kutatási munkám mellett számos más kutatási projektben részt vehessek, mellyel hasznos szakmai tapasztalatot gyűjthettem. Ezek mellett megtanított színvonalas cikket írni, lehetőséget adott, hogy hazai és nemzetközi konferenciákon is kipróbálhassam magam és nem utolsósorban ösztönzött rá, hogy eredményeimet összegezve kutatási pályázatokat is adjak be, melyek eredményeként kétszer volt szerencsém Új Nemzeti Kiválósági Program pályázatot elnyerni.

Hálásan köszönöm az UroOnkológiai Labor volt és jelenlegi Ph.D. hallgatóinak a segítségét és hozzájárulásukat a doktori munkám elvégzéséhez. Nagyon hálás vagyok Habina-Nagy Nikolettnek, hogy mindenben mellettem állt és sokszor tartotta bennem a lelket a nehéz pillanatokba. Nagyon örülök, hogy egy ilyen kedves, jószívű, segítőkész és igazán jó kolléganővel együtt indulhattam el a Ph.D képzés útján. A konferenciákra és vizsgákra való közös felkészülések, valamint a közös munkák összekovácsoltak minket és sok olyan örök emléket hagytak maguk után, amit remélem sose felejték el. Nagyon hálás vagyok, hogy a munka mellett igazi barátság is kialakult közöttünk. Szeretném megköszönni továbbá Keresztes Dávidnak a szakmai segítségét és hasznos tanácsait, valamint Hermann-Váradai Melindának a vidám perceket, melyek feldobták a mindennapi labormunkát.

Köszönöm továbbá az Urológiai Klinikán működő Uroonkológiai Centrum vezetőjének, Dr. Szűcs Miklós főorvos úrnak, valamint Fazekas Tünde és Dobos Beáta ápolóknak, hogy a segítségükkel összegyűjtött szérummintákon sikerült elvégezni a dolgozatomban bemutatott kísérleteket, így járulva hozzá munkám sikeréhez.

Köszönettel tartozom továbbá a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Szövettenyésztő Laboratórium vezetőjének Dr. Sebestyén Annának, a lehetőséget, hogy a sejteken végzett kísérleteket az általa vezetett laborban végezhettem el, valamint Ph.D. hallgatójának Dankó Titanillának a sok sok szakmai segítséget, valamint a hasznos beszélgetéseket.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Kovalszky Ilonának, hogy az általa vezetett Molekuláris Patológia Laboratóriumban helyet biztosított számomra, hogy kísérleteimet elvégezhessem. Továbbá hálával tartozom Dr. Reszegi Andreának, Egedi Krisztinának és Császár Krisztinának a segítőkészségükért.

Szeretném megköszönni a kollaborációs partnereinknek is a szakmai segítséget, melyek nélkül a dolgozatom nem készülhetett volna el. Hálás vagyok Dr. Martin Puhnak (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Urológiai Klinika), hogy rendelkezésünkre bocsátotta az általuk tenyésztett enzalutamid-érzékeny és -rezisztens prosztatárakos sejtvonalpárokat. Köszönöm továbbá Dr. Thilo Brachtnak (Bochumi Ruhr Egyetem Orvosi Proteomikai Központ) a sejtvonalak proteomikai elemzését, valamint a KEGG és GO vizsgálatok elvégzését. Köszönöm továbbá Prof. Gero Kramernek, hogy az általa kezelt enzalutamid és abirateron kezelt mCRPC betegek szérummintáit rendelkezésünkre bocsátotta, továbbá kollégáinak Dr. Agnieszka May-Hesnek és Dr. Sabina Sevcenconak a klinikai adatok kigyűjtését. Köszönet illeti Prof. Takács Lászlót és munkacsoportját, Dr. Lázár Józsefet és Tornyai Ilonát (Debreceni Egyetem Humánagenetikai Tanszék), hogy a bioinformatikai módszereikkel segítettek a proteomikai adatainkból a szekretált fehérjéket kiválasztani.

Köszönet illeti továbbá a barátnőimet, Kalcsó Viktóriát, Szalóki Nikolettát, Galambos Andrásné és Ácsné Bezdán Andreát, akik mindvégig mellettem álltak és segítettek mikor úgy éreztem, hogy nehéz akadályok elé kerültem. Ösztönzésükkel mindent meg tudtam valósítani, amit szerettem volna.

Legnagyobb hálával tartozom a családomnak, akik lehetőséget biztosítottak arra, hogy megvalósítsam az álmaimat. Szüleimnek, akik támogatása nélkül nem sikerült volna eljutnom idáig, testvéremnek, aki mindig büszkén állt mellettem. És szeretném megköszönni a férjemnek Árpinak, hogy mindvégig mellettem volt és támogatott, hogy sikerüljön elvégezni a doktori tanulmányaimat. Hálával tartozom neki amiért kitartó lelkesedéssel hallgatta a konferenciákra írt előadásaimat és amiért tartotta bennem a lelket és elhitette velem, hogy mindenre képes vagyok.