

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem
Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskola

**KERINGŐ EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK VIZSGÁLATA
AZ AGYDAGANATOK DIAGNÓZISÁNAK ÉS PROGNÓZISÁNAK
ELŐSEGÍTÉSE ÉRDEKÉBEN**

Tézis füzet

Dobra Gabriella

Témavezető:

Dr. Buzás Krisztina

Szeged,

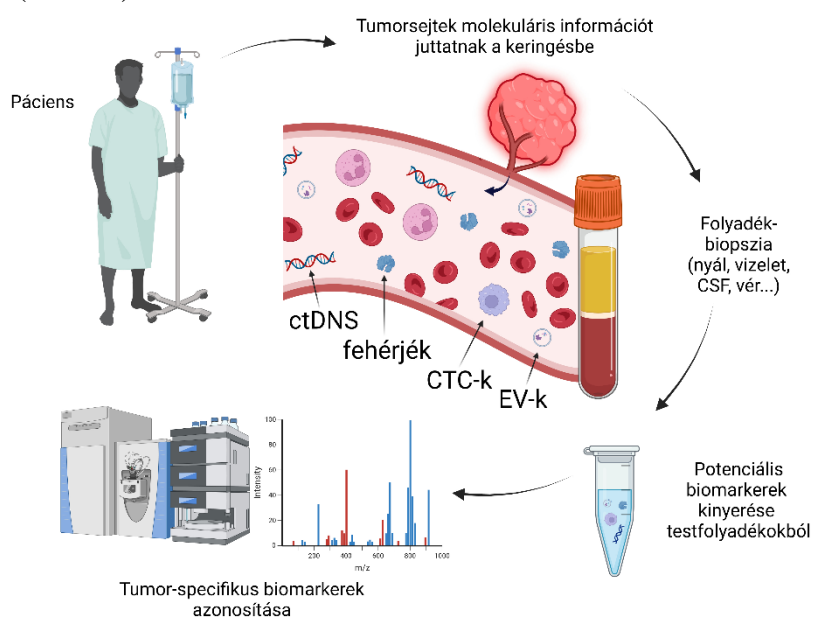
2024

Bevezetés

A központi idegrendszeri (KIR) daganatok diagnosztizálási lehetőségei

A KIR tumoros betegek vizsgálatakor a komputertomográfiát (CT) és a mágneses rezonancia képalkotást (MRI) használják a betegség állapotának meghatározására és a kezelések hatásosságának értékelésére. Azonban ezeknek a technikáknak ismert korlátai vannak. A tumorprofil meghatározásának egy másik elfogadott módszere a szöveti biopszia, ami viszont invazív sebészeti beavatkozást igényel a tumorminta beszerzéséhez. A magas szövődmenyek kockázat mellett hátrányai közé tartozik, hogy a heterogén vagy nehezen hozzáférhető tumorokból nehéz mintát venni. Továbbá az áttétképződés esetén többszörös mintavételre lehet szükség, valamint ezzel a módszerrel nem lehetséges a tumorválasz vagy a visszaesés nyomon követése. Ezek a kihívások további nehézségeket okozhatnak, különösen, ha a daganat a koponyán belül helyezkedik el.

Ezen hiányosságok miatt a tudományos figyelem a testnedvek molekuláris vizsgálata, azaz a folyadék-biopszia felé fordult. Minden egyes sejt, beleértve a daganatos sejteket is, molekuláris információkat bocsát ki a keringésbe, amelyek felhalmozódnak a vizeletben, az agy-gerincvelői folyadékban, a nyálban és a vérben, így ezek a testnedvek a tumor-asszociált molekulák gazdag forrásául szolgálhatnak. A folyadék-biopszia magában foglalja a tumorról összefüggő anyagok, például a keringő tumor-DNS (ctDNS), a keringő tumorsejtek (CTC), a keringő tumorfehérjék és a tumorból vagy más forrásból származó extracelluláris vezikulumok (EV) azonosításának és mérésének folyamatát. Ezeknek az anyagoknak az azonosítása kulcsfontosságú lehet a betegellátásban. (1. ábra)



1. ábra. A folyadék-biopszia sematikus ábrázolása.

Rövidítések: ctDNS: keringő tumor-DNS, CTC: keringő tumorsejtek, fehérjék: tumorfehérjék, EV: extracelluláris vezikulumok, CSF: agy-gerincvelői folyadék.

Véleményünk szerint az extracelluláris vezikulák (EV-k) kiemelkednek a folyadékbiopsziás célpontok közül, mivel előnyös tulajdonságuk, hogy képesek bejutni a keringési rendszerbe, valamint változatos és diagnosztikailag jelentős molekuláris tartalmat hordoznak. Az EV-k nanométeres nagyságrendűek, a sejtek jelentős mennyiségben bocsátják ki őket, stabilak minden testfolyadékban, és képesek átjutni a vér-agy gáton (BBB). Ezek az értékes jellemzők teszik őket az agydaganatok folyadékbiopsziás vizsgálatának ideális célpontjaivá.

Az extracelluláris vezikulák és szerepük a tumordiagnosztikában

Az extracelluláris vezikulák kifejezést a Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (ISEV) „a sejtől természetes módon felszabaduló, lipid kettősréteggel körülhatárolt és szaporodni nem képes, azaz funkcionális sejtmagot nem tartalmazó részecskék” gyűjtőfogalmaként hagyta jóvá. Az EV-k reprodukálják a donorsejtek citoszolikus környezetét, tartalmazva bőséges DNS-t, RNS-t, fehérjéket és egyéb analitokat, miközben külsőre is erősen hasonlítanak a donorsejtekre.

Az elmúlt évtizedek során az EV-k intenzív kutatások fókuszába kerültek, amelyek a biológiai jellemzőiket, fiziológiai funkcióikat és a sejtek öregedésében, az immunitásban, valamint a sejtek közötti kommunikációban betöltött szerepüket vizsgálják. A tumorbiológiában az EV-eket alaposan tanulmányozták, és megállapították, hogy fontos szerepet játszanak a betegség különböző aspektusaiban, beleértve a tumor növekedését, fejlődését, invázióját, a gyulladásos válaszokat, immunszuppressziót, az epiteliális-mezenchimális átmenetet, angiogenezist és a premetasztatikus niche kialakulását, továbbá az immunmodulációt, a tumorprogressziót és a terápiás rezisztenciát.

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a kisméretű extracelluláris vezikulák (sEV-k) számos olyan információt hordoznak, amelyek felhasználhatók a daganatok diagnosztizálásában és prognosztikai értékelésében. Bár számos tanulmány a nukleinsavtartalomra koncentrál, az EV-proteom is egyre nagyobb figyelmet kap a rákdiagnosztikában. Tekintettel a sejtek által termelt fehérjék változatosságára, amely az időtől és a stressztől függően változik, úgy tűnik, hogy nem a genetikai anyag vizsgálata, hanem a proteomikai vizsgálatok kínálják azt a megközelítést, amely a legalkalmasabb a tumorszövet komplexitásának és a daganatok evolúciójának megértéséhez.

MMP-k a tumorprogresszióban

Bizonyos agresszív agydaganatok, mint a glioblasztóma kezelésének eredménytelensége, a rosszindulatú sejtek inváziójával magyarázható, amely során a tumorsejtek a környező egészséges szövetekbe vándorolnak, így a tumor teljes eltávolítása jelentős kihívást jelent a neuro-onkológusok számára.

A tumorinváziót elsősorban az extracelluláris mátrix (ECM) molekulái, mint a brevikán, kadherin, fibronectin, neurokán, verzikán, tenascin-C és a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) segítik elő, így az ECM jelentősen hozzájárul a tumor progressziójához.

Az MMP-k, cinkfüggő endopeptidázok, létfontosságú szerepet töltenek be az ECM komponenseinek, például a kollagéneknek a lebontásával, amely kulcsfontosságú számos fiziológiai folyamatban, mint a sebgyógyulás, az embrionális fejlődés és a szöveti struktúra átalakítása. Ezenkívül az MMP-k lehetővé teszik a rákos sejtek számára, hogy áttörjék a bazális membránt, megkönnyítve az áttétképződést és elősegítve a rákos sejtek vándorlását és invázióját. Emellett részt vesznek az angiogenezisben is, amely elengedhetetlen a tumor növekedéséhez, mivel biztosítja a terjeszkedéshez szükséges vérellátást. Az MMP-k így a tumorigenezis kulcsszereplőivé válnak, bár valószínűleg több más fehérje is részt vesz a tumor progressziójában. Ezeknek a tumor-asszociált molekuláknak a folyadék-biopsziás azonosítása értékes lehet az agydaganatos betegek diagnosztikájában és monitorozásában.

A kutatás indoklása

A nem invazív diagnosztikai módszerek kiemelkedő jelentőséggel bírnak, különösen a KIR daganatoknál, mivel minimális terhet és kockázatot rónak a betegekre, könnyedén ismételhetők, költséghatékonyak, magas információtartalmúak és könnyen elérhetők. Számos tanulmány tárgyalja az agydaganatok, főleg a gliomák szöveteinek gén- vagy fehérjeexpressziós elemzését, amelyek lehetővé teszik a vérbe kiválasztott biomarkerek azonosítását. Ennek ellenére a klinikai gyakorlatban nincs jelenleg megbízható keringő fehérje biomarker a KIR daganatok számára.

Az agydaganatok megbízható szérumbiomarkereinek keresése eddig nem járt sikerrel, ha az csak egy vagy néhány fehérjén alapult. Egy lehetséges megoldás 10-20 biomarker-jelölt azonosítása és egy fehérjepanel létrehozása lehet, amely a KIR betegségekre jellemző ujjlenyomatként használható fel.

Egy további kihívás, hogy a potenciális biomarker-jelölteket nehéz észlelni alacsony vérbeli koncentrációjuk és az abundáns szérumbiomarkerek zavaró jelenléte miatt. Emiatt a mintákat meg kell tisztítani, hogy a potenciális biomarker-jelöltek koncentrációja elérje a kimutatási határt. Ezt a biomarker-dúsítást sEV-k izolálásával is el lehet érni, azonban össze kell hasonlítani a két mintatípust (teljes szérum és szérumból sEV) annak meghatározására, hogy melyik a legalkalmasabb a betegcsoportok differenciálására.

Mivel az EV tartalma változik a betegség előrehaladtával, az sEV-k prognosztikai felhasználásának lehetősége is fontos kérdés. Ezért meg kell vizsgálni, hogy a betegcsoportok közötti legjelentősebb különbségeket mutató fehérjék közül valamelyik alkalmas-e prognosztikai markernek.

Célok

Célunk a központi idegrendszeri daganatok folyadék-biopszián alapuló diagnózisának, prognózisának és monitorozásának elősegítése volt, keringő fehérje markerek azonosításával, felhasználva a betegekből származó szérumot (későbbiekben teljes szérum) és a szérumból származó extracelluláris vezikulákat (később szérum sEV-ként említve).

Ennek érdekében elvégeztük a teljes szérum és a szérum sEV fehérjetartalmának átfogó mennyiségi és minőségi elemzését LC-MS, ELISA és összehasonlító statisztikai analízisek segítségével. A KIR betegségekben szenvedő betegek négy csoportját vizsgáltuk (glioblasztóma, nem kissejtes tüdőrák agyi metasztázisa, meningeóma és kontroll csoportként ágyéki porckorongsérves betegek), összesen 222 beteg szérummintáját elemezve ebben a proteomikai vizsgálatban.

A következő célokat tűztük ki:

1. A négy betegcsoport teljes szérumának és szérum sEV-jének fehérjetartalmának összehasonlítása, és nem-invazív fehérje biomarkerek azonosítása olyan célzott fehérjepanelek létrehozásával, amelyek alkalmasak a KIR daganatok osztályozására;
2. A két mintatípus proteomjának és a létrehozott fehérjepanelek összehasonlítása abban a tekintetben, hogy milyen mértékben alkalmasak a tumorer osztályozására és a betegség biológiai jellemzésére;
3. A két mintatípus osztályozási képességében fennálló különbségek mögöttes okainak feltárása;
4. A betegcsoportok megkülönböztetéséhez legalkalmasabb sEV-fehérje, azaz egy biomarker-jelölt kiválasztása;
5. A biomarker-jelölt koncentrációját befolyásoló tényezők, mint a nem, életkor és a beteg klinikai kórtörténet, vizsgálata;
6. A kiválasztott fehérje klinikai relevanciájának meghatározása, mint prognosztikus biomarker.

Anyagok és módszerek

Betegcsoportok

A Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján kezelt 222 beteg vérmintáit elemeztük. A mintákat primer glioblastoma multiforme (GBM), meningeóma (M) és nem kissejtes tüdőrák agyi áttétjei (BM) esetében gyűjtöttük. A kontrollcsoportban (CTRL) azok a betegek szerepeltek, akik ágyéki porckorongsérvel rendelkeztek, de náluk nem diagnosztizáltak daganatot.

A vérmintákat a Debreceni Idegsebészeti Klinika Agydaganat- és Szövetbankja tárolta, a Nemzeti Kutatási Etikai Bizottság előírásainak megfelelően. Minden résztvevő beteg beleegyezését adta a vizsgálathoz. A kutatást a Helsinki Nyilatkozat előírásai szerint, valamint két etikai bizottság jóváhagyásával végeztük, amelyet a 51450-2/2015/EKU (0411/15) és 121/2019-SZTE számú dokumentumok rögzítenek.

A szérumminták előkészítése

A vérmintákat BD Vacutainer SST II Advance csövekbe (Becton, Dickinson and Company) gyűjtöttük, legalább 1 órán át szobahőmérsékleten hagytuk alvadni, majd 20 percen keresztül $3000 \times g$ -n, $10^\circ C$ -on centrifugáltuk.

sEV izolálás és jellemzés

Az sEV-ket differenciál centrifugálással izoláltuk (30 perc, $10\,000 \times g$, $4^\circ C$; majd 70 perc, $100\,000 \times g$, $4^\circ C$). Az sEV-k morfológiáját atomerő-mikroszkópiával (Asylum MFP-3D) és transzmissziós elektronmikroszkópiával (Tecnai G2 20 X-Twin típusú készülék) tanulmányoztuk. A részecskék méreteloszlását nanorészecske-követő technikával (NanoSight NS300) elemeztük. Az sEV-k jelenlétét Western blot analízissel (XCell SureLock Mini-Cell System, Alix, CD81, CD5L és calnexin markerekkel) igazoltuk. A szérumból származó sEV-k felszínén expresszálandó fehérjéket gyöngyalapú multiplex EV-analízissel áramlási citometriával (MACSPlex Exosome Kit, human, Miltenyi Biotec) jellemeztük.

Proteomikai elemzés folyadékkromatográfiás tömegspektrometria (LC-MS) segítségével

96 teljes szérummintát és 96 szérum sEV mintát elemeztünk LC-MS segítségével (nanoAcquity UPLC, Waters ACQUITY UPLC M-Class Peptide C18 oszlop; Q Exactive Plus quadrupol-orbitrap hibrid MS). Minden csoportból 24 mintát vizsgáltunk, és ezeket hatos csoportokba (poolokba) rendeztük. A kvantitatív méréseket DIA üzemmódban végeztük, és az analízist az Encyclopedia 0.81 programban hajtottuk végre.

MMP-9 analízis enzimhez kötött immunszorbens teszttel (ELISA)

A 222 szérumból származó sEV-minta MMP-9 tartalmát a LEGEND MAX Human MMP-9 ELISA Kit segítségével mértük meg, a gyártó utasításait követve. Egyedi sEV izolátumokat elemeztünk, és az abszorbanciát egy Multiskan RC mikrolemez olvasóval mértük.

Az LC-MS és ELISA adatok statisztikai elemzése

A kiugró minták vizsgálatához Pearson-féle korrelációs elemzést alkalmaztunk. A szennyező fehérjéket és a hiányzó értékeket kizártuk az elemzésbe vett MS adatokból. Az adatokat logaritmikus transzformációval kezeltük, és a fehérjeintenzitások átlagos különbségének mérésére a Cohen d hatásméretet használtuk ($\text{Cohen } d \geq 2$). Páros ROC-analízist végeztünk azon fehérjék azonosítására, amelyek képesek egy csoportot egy másiktól elválasztani ($\text{AUC} = 1$). A változók számának csökkentésére főkomponens-elemzést (PCA) végeztünk k-közép klaszterizálással. Welch-próbát használtunk az sEV-mintákban szignifikánsan feldúsult vagy lecsökkent fehérjék azonosítására. A statisztikai elemzéseket R (3.6 verzió), Python (3.8 verzió) és MaxQuant Perseus programokkal végeztük. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. A vizualizációkhoz a GraphPad Prism 8 programot használtuk.

Az MMP-9 szintjét a szérumból származó sEV fehérjetartalmára normalizáltuk, ami azt jelenti, hogy az MMP-9 koncentrációját (ng/ml) minden minta esetében elosztottuk az adott sEV-vel dúsított izolátum fehérjekoncentrációjával (ng/ml). Az eredményeket milliomod részben (ppm) rögzítettük, így adva meg a betegek egyedi MMP-9 értékeit. Az elemzett csoportokból a kiugró értékeket a ROUT módszerrel zártuk ki, és ellenőriztük a normális eloszlást és a varianciák homogenitását (Shapiro-Wilk, F és Brown-Forsythe tesztekkel). Az MMP-9 ppm koncentrációit Welch-próbával, páros t-próbával és egyutas ANOVA-val hasonlítottuk össze. A lineáris regressziós elemzéseket logaritmizált adatsorokon végeztük. Az MMP-9 ppm diagnosztikai potenciálját ROC-elemzéssel értékeltük. Kaplan-Meier elemzéseket alkalmaztunk a különböző csoportok teljes túlélési arányainak összehasonlítására. Az elemzésekhez a GraphPad Prism 8.3.4 programot használtuk.

LC-MS adatok in silico elemzése

Az LC-MS-ből származó fehérjeadatokat az Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen Bioinformatics) segítségével elemeztük.

Az adatok elérhetősége

Kísérleteink összes releváns adatát benyújtottuk az EV-TRACK tudásbázisba. EV-TRACK ID: EV200080 és EV230005.

Új eredmények

A központi idegrendszert érintő betegségben szenvedő négy betegcsoport (glioblasztóma, nem kissejtes tüdőrák agyi metasztázisa, meningeóma és ágyéki porckorongsér) átfogó mennyiségi és minőségi elemzéséből a teljes szérum és a szérum sEV fehérjetartalmának összehasonlításával a következő következtetéseket vonhatjuk le:

1. Egy 10-20 fehérjéből álló panel képes pontosan megkülönböztetni a KIR daganatokat

A feladatunk az volt, hogy azonosítsuk a négy betegcsoport közötti különbségeket azzal a céllal, hogy feltárjuk a KIR daganatokhoz kapcsolódó jellegzetes fehérjeprofilokat. A >2 vagy $<0,5$ intenzitásarányt és a Cohen-féle d hatásnagyságának ≥ 2 -es határértékét alkalmazva megvizsgáltuk, hogy mely fehérjék mutatnak jelentős intenzitáskülönbséget, és melyek képesek legalább egy csoportot elkülöníteni a többtől a ROC elemzés alapján. Továbbá, a k-közép klaszterizálás és a PCA segítségével összehasonlítottuk, hogy a két különböző mintatípus alkalmas-e a vizsgált KIR daganatok elkülönítésére.

Első lépésként a GBM, BM, M és CTRL csoportokból származó teljes szérum- és sEV-mintákon végeztünk proteomikai elemzéseket LC-MS segítségével. Az egyes csoportok egyedi mintáit hatos csoportokba rendeztük, hogy csökkentsük az egyedi eltéréseket, minimalizáljuk a minták számát, lerövidítsük az LC-MS mérések idejét és csökkentsük az anyagszükségletet. A DIA módban létrehozott spektrumkönyvtár segítségével 311 fehérjét azonosítottunk. A Pearson-féle korrelációs elemzések alapján egy sEV kontrollmintát ki kellett zárni a további elemzésekből. A nem megbízható és hiányzó értékekkel rendelkező fehérjéket kizárva összesen 262 fehérje maradt az elemzésben.

Az alapadatok feldolgozását követően a teljes szérum mintákban 41 fehérjét és az sEV-mintákban 45 fehérjét azonosítottunk. A daganat- és CTRL csoportok összehasonlításán túl értékeltük az egyes daganatcsoportok közötti különbségeket is. A klinikailag releváns előfordulási gyakoriság figyelembevételével, a Cohen-féle d hatásnagyság-elemzést alkalmazva, 10 teljes szérum és 21 sEV fehérjét azonosítottunk, amelyek meghaladták a $d \geq 2$ határértéket.

A ROC-elemzésekben az AUC = 1 mérőszámot adtuk meg kiválasztási kritériumként. A ROC analízis végeredményeként 10 teljes szérum fehérjét (MMP-9, HSPB1, CASP14, HBG1, IGHG4, DEFA1, VWF, HNRNPA1, S100A8, TLN1) és 17 sEV fehérjét (MMP-9, HSPB1, CASP14, HBG1, FGB, GGCT, PF4, S100A7, FN1, ANPEP, FLG2, HSPA8, IGLL1, MMRN1, S100A14, SBSN, SPRR2E) kaptunk. Ezekkel a fehérjékkel volt legeredményesebb a daganatcsoportokba tartozó minták beazonosítása. A teljes szérum és a szérum sEV panelben négy szignifikánsan megváltozott fehérje, nevezetesen az MMP-9, a CASP14, a HBG1 és a HSPB1 volt közös.

A legjobb osztályozási eredményeket a 10-tagú szérumpanel és a 17-tagú sEV panel adta. A paneleket alkotó fehérjék számát nem lehet tovább csökkenteni anélkül, hogy ez az osztályozási hatékonyság csökkenéséhez vezetne.

2. A szérum sEV fehérjetartalma alkalmasabb a KIR daganatok osztályozására mint a teljes szérum fehérjetartalma.

A fehérjék kiválasztása után PCA-t és k-közép klaszterizálást alkalmaztunk. A teljes szérum esetében a PCA biplot három inhomogén vagy hiányos klasztert eredményezett, amelyek számított homogenitási és teljességi pontszámai 0,56, illetve 0,73 voltak. Ezzel szemben az sEV minták klaszterizálása homogén és teljes klasztereket hozott létre, ahol a homogenitási és teljességi pontszámok 1,0 értékre adódtak. A PCA elemzések és a k-közép klaszterizálás eredményei jelentős mértékben eltértek a teljes szérum és az sEV minták esetében, a csoportok szétválasztásában az utóbbiak bizonyultak hatékonyabbnak.

Következésképpen, a KIR daganatok megkülönböztetésének pontossága javítható a szérum sEV fehérjepanel használatával a teljes szérumminták elemzésével szemben.

3. A teljes szérum és a szérum sEV-k fehérjetartalma közötti mennyiségi és minőségi különbségek befolyásolhatják azt, hogy milyen mértékben alkalmazhatók biomarkerek forrásaiként.

Páros összehasonlítást alkalmaztunk az sEV-minták és a teljes szérumminták között annak érdekében, hogy azonosítsuk azokat a fehérjéket, amelyek jelentősen feldúsultak vagy lecsökkentek az sEV-mintákban. Az sEV-mintákban 65 fehérjét találtunk szignifikánsan feldúsultnak, míg 129 fehérje intenzitása szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult.

Az sEV marker panel tizenhét fehérjéje közül hat mutatott szignifikánsan magasabb szintet az sEV-mintákban, míg a specifikus szérum panel tíz fehérjéjéből öt nagyobb mennyiségben fordult elő a teljes szérummintákban.

A módszerek fejezetben részletezett karakterizálás során megerősítést nyertünk az sEV-k jelenlétére. Azonban az sEV és a teljes szérumszámjainak közötti mennyiségi különbségek a lipoprotein- és szérumszámjainak lehetséges jelenlétére is utalnak. Az apolipoproteinek szintje csökkent az sEV-vel dúsított mintákban, viszont nem sikerült teljesen kiküszöbölni ezt a frakciót. Ugyanakkor a jól ismert, nagy mennyiségben előforduló szérumszámjainak, mint például az albumin, domináltak az sEV-vel dúsított minták szérumszámjainakban is. A nem szövetspecifikus (ITGA2B, ITGB3, LGALS3BP), hámsejt-eredetű (CD5L) és vérlemezkékkel kapcsolatos (STOM, TSPAN9) EV marker szérumszámjainak feldúsulása megerősítette az sEV feldúsulást, amit az sEV/szérumszámjainak átlagos aránya 26,58 is tükröz.

Az sEV-minták és a teljes szérumszámjainak összehasonlítása rámutatott, hogy a két mintatípus szérumszámjainakban lévő mennyiségi különbségek befolyásolhatják a mintatípusok alkalmazhatóságát arra, hogy biomarkereket szolgáltatassanak a KIR daganatok monitorozásához. Eredményeink azt sugallják, hogy az sEV-vel dúsított minták fokozott hatékonysága mögött nem a specifikus szérumszámjainak gyakoriságának abszolút növekedése áll, hanem azok aránybeli változásai.

A kapott proteomikai adatok biológiai hátterének megértéséhez IPA analízist alkalmaztunk. A teljes szérumszámjainak és az sEV adatokra külön-külön elvégzett „Core Analyses” elemzések minden egyes betegcsoport számára a szignifikánsan befolyásolt „Diseases and Functions” listáját eredményezte. A 'Comparison Analysis' segítségével létrehozott heatmap-ek bemutatták a releváns szisztémás és tumorról kapcsolatos funkciókat, valamint az aktivált és gátolt immunfunkciókat. A teljes szérumszámjainak esetében a szignifikánsan befolyásolt funkciók nagy része a KIR betegségekhez és az aktív immunregulációs folyamatokhoz kapcsolódik, de a betegcsoportok között nem mutatkozott egyértelmű elkülönülés. Ezzel szemben az sEV alapú proteomikai heatmap-eken az M csoport elkülönült a rosszindulatú daganatos csoportoktól, ahol a tumorprogresszióval kapcsolatos funkciók jelentősen erősödtek, illetve az aktivált immunfunkciók domináltak a gátoltak felett.

Mivel a panel tagjai egyenként nem voltak alkalmasak a szétválasztásra és nem tudtunk hozzájuk releváns biológiai funkciót egyenként rendelni, ezért megpróbáltuk meghatározni az azonosított szérumszámjainak panelek közös biológiai szerepét. A program segítségével két olyan network-öt dolgoztunk ki, amelyek a teljes szérumszámjainak és a szérumszámjainak sEV adatok alapján azonosított 10 és 17 kiválasztott szérumszámjainak tartalmazzák. A „Grow tool” segítségével a tíz leginkább befolyásolt „Diseases and Functions” kerültek integrálásra a hálózat-elemzésekbe. A teljes szérumszámjainak network-je esetében kilenc különböző „Diseases and Functions” került azonosításra, amelyek között szerepelt például a vírusfertőzés, az apoptózis, a nekrozis, a fagociták és a myeloid sejtek mozgása, és csak egy volt közvetlenül a tumorokhoz kapcsolódó.

Ezzel szemben az sEV hálózaton azonosított első tíz befolyásolt betegség mindegyike tumorról kapcsolatos volt, ami arra utal, hogy ezek a fehérjék potenciálisan részt vesznek a rákos megbetegedések patofiziológiájában.

Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a biológiai háttér is szerepet játszhat abban, hogy az sEV-minták hatékonyabban képesek megkülönböztetni a KIR daganatokat.

4. A szérumban EV-k proteomja közül a vezikuláris MMP-9 mutatta a legnagyobb potenciált a betegcsoportok megkülönböztetésére.

LC-MS méréseink (96 betegre vonatkozóan) statisztikai elemzésének eredményeképpen létrehoztunk egy 17-tagú sEV fehérjepanelt, amely 100%-os hatékonysággal volt képes elkülöníteni a négy csoportot.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a 17 sEV-fehérje közül melyik a legalkalmasabb a betegcsoportok megkülönböztetésére. Az MS adatok ROC-elemzése alapján a mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) fehérjét azonosítottuk mint a leginkább hatékonyat, $p = 0,0065$ és multi ROC AUC=0,86 értékekkel.

5. A vezikuláris MMP-9-szint független a nemtől és az életkortól, de szignifikáns különbség van az eredeti és a kiújult daganat esetében, valamint abban az esetben is, ha a beteg a mintavétel idején már kapott terápiát.

ELISA-méréseket végeztünk 222 beteg szérumban sEV mintáján. A nagy mintaszám lehetővé tette az MMP-9 szintjét befolyásoló tényezők analizését, és alkalmas volt arra, hogy vizsgáljuk, van-e mérhető, szignifikáns különbség az sEV MMP-9 szintjében a különböző betegségekkel és a betegek túlélési kimenetelével összefüggésben. Az MMP-9 intenzitás (LC-MS) helyett a szérumban sEV MMP-9 koncentrációjának (ELISA) mérése lehetővé tette a klinikumban szükséges határértékek, valamint a teszt specifitásának és szenzitivitásának meghatározását.

Az MMP-9 szintet az sEV minták teljes fehérjetartalmára normalizáltuk, ami azt jelenti, hogy az MMP-9 koncentrációt (ng/ml) minden egyes minta esetében elosztottuk az adott sEV-vel dúsított izolátum fehérjekoncentrációjával (ng/ml). Az elemzések eredményeit milliomodrészben (ppm) jegyeztük fel, meghatározva a betegek MMP-9 egyedi értékeit.

Az életkor és nem szerinti elemzéseket a CTRL csoportban végeztük el. A korrelációs elemzés kimutatta, hogy nincs egyértelmű kapcsolat az életkor és az MMP-9 szintek között, és nincs szignifikáns különbség a férfi és női betegek között.

A sebészi reszekció hatását a szérumban sEV MMP-9 szintjére a GBM és a BM csoportokban vizsgáltuk. Az MMP-9 szintek a primer GBM betegek esetében hasonlóak voltak a sebészi reszekció előtt és után ($p = 0,1843$, fold change = 15%), míg a BM

minták a reszekciót követően jelentős emelkedést mutattak ($p = 0,0065$, fold change = 209%).

A preoperatív GBM minták további vizsgálata a szérumban sEV MMP-9 szintje alapján egyértelmű különbséget talált az eredeti tumor és a recidíva között, olyan módon, hogy a recidíva átlagosan alacsonyabb MMP-9 szintet mutatott.

Az alkalmazott terápia hatásának meghatározása érdekében az MMP-9 szinteket aszerint is összehasonlítottuk, hogy a GBM betegek a mintavétel időpontjában kaptak-e kezelést, vagy sem. Eredményünk arra utal, hogy a terápia csökkentheti a keringő sEV-k MMP-9 szintjét.

Összefoglalva, a betegség típusán kívül a sebészi reszekció, a kiújulás és a kezelés is befolyásolhatja a szérumban sEV MMP-9 szintjét. Ezen eredmények miatt minden további elemzést kizárólag a sebészi reszekció és a terápia beadása előtt nyert mintákon végeztünk el.

6. A malignus és a benignus KIR daganatok, valamint a malignus tumorok és a kontrollcsoportok vezikuláris MMP-9-tartalma között szignifikáns különbségek vannak, és az MMP-9-szint prognosztikai értékkel bír a glioblasztómás betegek túlélésére vonatkozóan.

További statisztikai elemzéseket végeztünk annak megállapítására, hogy van-e különbség az egyes betegcsoportok vezikuláris MMP-9 szintjei között.

Első lépésként Welch-tesztet alkalmaztunk a kontrollcsoport és az összes daganatos beteg összehasonlítására. A ROC-elemzés alapján a két csoport szignifikánsan megkülönböztethető volt egy 16 MMP-9 ppm határértéket használva, 74%-os szenzitivitással, 61%-os specificitással és 0,70-es AUC-értékkel.

A daganatos betegeket ezután M, GBM és BM csoportba osztottuk, és azt láttuk, hogy a különbségek továbbra is szignifikánsak a kontroll és a rosszindulatú daganatok, valamint a jó- és rosszindulatú daganatok között. Így a kontroll-malignus tumor összehasonlítások esetében (a kontroll-benignus összehasonlítások rovására) megnövekedett specificitási és szenzitivitási értékeket, illetve megnövekedett AUC értékeket eredményezett.

Az utolsó lépésben a betegeket a szövettani eltérések alapján további alcsoportokba osztottuk. Az alcsoport-elemzés során megkülönböztettünk elsődleges és másodlagos GBM-et, I. és II. grádusú meningeómás betegeket, valamint adenokarcinómás és carcinoma planocellulare-s betegek agyi áttéteit. Az MMP-9 koncentrációkban szignifikáns különbségeket mutató betegcsoportok összehasonlítása során az AUC értékek egészen 0,77-ig emelkedtek.

Adataink azt mutatták, hogy a malignus, de nem a benignus agydaganatos betegek a szérumban sEV MMP-9-szintje alapján megkülönböztethetők a kontrollcsoportbeli betegektől, és a szérumban sEV MMP-9-szintje pozitív korrelációt mutat a tumor agresszivitásával.

A betegcsoportok összehasonlítása után célunk annak meghatározása volt, hogy a vezikuláris MMP-9-szint korrelál-e a betegség progressziójával/betegek túlélésével. A szérumban sEV MMP-9-szint prognosztikai értékének felmérése érdekében 27 GBM-beteg preoperatív szérumban sEV elemeztük. A vizsgálatban résztvevő betegek a mintavétel idején semmilyen kezelést nem kaptak.

A vezikuláris MMP-9-szint prognosztikai értékének feltárása érdekében az alanyokat három csoportba osztottuk a túlélési idő alapján (rövid, közép- és hosszútávú túlélés) 0-2, 3-8 és 10-23 hónapos határértékeket használva. A hosszútávú túlélés szignifikánsan alacsonyabb MMP-9-szinthez társult a másik két csoport MMP-9-szintjéhez képest. Ezek a különbségek 28 MMP-9 ppm küszöbértéknél magas specificitást és szenzitivitást mutattak (80-89%-os), illetve a ROC-elemzések 0,83-0,87-es AUC-értékei lehetővé tették e túlélési csoportok hatékony megkülönböztetését.

Eredményeink arra utalnak, hogy a szérumban sEV MMP-9-szintje és a betegek túlélése között összefüggés van, ezért elvégeztünk egy második elemzést, amelyben a másik irányból közelítettük meg a kérdést, az MMP-9-szintekhez társítottuk a túlélési időt. Az MMP-9-szintek túlélést befolyásoló mértékének meghatározásához a betegeket - a korábban megállapított 28 ppm küszöbértéket használva - két csoportra osztottuk. A Kaplan-Meier-diagram alapján az alacsony MMP-9-szintű (<28 ppm) betegeknél szignifikáns túlélési előny mutatkozott (HR 2,401, 95%CI 1,095-5,261, $p = 0,0063$), ami a medián túlélés nyolc hónapos növekedését jelentette.

Korábban megállapítottuk, hogy a túlélés valószínűsége az életkorral is csökken, ezért a vizsgálatot 65 éves határértékkel megismételtük. A Kaplan-Meier diagramm szerint a 65 év alatti betegeknél a medián túlélés öt hónappal nőtt (HR 2,037, 95%CI 0,8524-4,869, $p = 0,0340$). Fontos megjegyezni, hogy mivel az életkor és az MMP-9-szint függetlenek egymástól, a szérumban sEV MMP-9-szintje életkortól függetlenül befolyásolhatja a túlélést.

Összefoglalva a főbb eredményeket, a sebészi reszekció és a terápia beadása előtt vett minták elemzése negatív korrelációt mutatott a magasabb MMP-9-szint és a túlélés között, a hosszú távú (10-23 hónapos) túlélés pedig alacsony MMP-9-szintekkel (<28 ppm) társult.

Kivonatolva, a szérumban sEV magas MMP-9-szintje negatív prognosztikai marker lehet a glioblasztómás betegek teljes túlélésére vonatkozóan.

Megbeszélés

A szérumból izolált kisméretű extracelluláris vezikulák jelerősítőként szolgálhatnak a KIR daganatok monitorozásában.

A kutatás célja az volt, hogy azonosítsuk azokat a fehérjemarkereket, amelyek szükségesek a KIR daganatok folyadék-biopszián alapuló diagnosztizálásához, prognózisához és követéséhez, teljes szérumot és szérum sEV-eket. A leggyakoribb KIR daganatokat lefedve összesen 222 szérummintát elemeztünk GBM, BM, M és CTRL betegekből. A szérummintákból differenciál centrifugálással izoláltuk a részecskéket, az izolált sEV-eket atomerő-mikroszkópiával (AFM), transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) és nanorészecske-követő analízissel (NTA) jellemeztük, valamint az sEV markereket Western blot analízissel vizsgáltuk (CD81, Alix, CD5L és calnexin). Mivel az analitikai eredmények megfelelő értelmezéséhez szükséges az izolálás hatékonyságának kvantitatív meghatározása, részletesen leírtuk az sEV-marker fehérjék átlagos arányát az sEV/szérum mintákban, bemutattuk a megmaradt szennyeződések (nagy abundanciájú szérumfehérjék és lipoproteinek), valamint a kísérleteink összes releváns adatát beküldtük az EV-TRACK tudásbázisba.

A négy betegcsoport közötti különbségek azonosításával célunk az volt, hogy feltárjuk a KIR daganatokhoz kapcsolódó jellegzetes fehérjeprofilokat. A >2 vagy $<0,5$ intenzitásarányt, a Cohen d hatásnagyságot (≥ 2) és a ROC-analízisből származó AUC = 1 értéket kiválasztási kritériumként használva megvizsgáltuk, hogy mely fehérjék képesek legalább egy csoportot elkülöníteni a többitől. Vizsgálatunk igazolta, hogy hatékonyabb egy fehérjepanel alkalmazása, mint az egyedi biomarker fehérjéké. A 17-tagú sEV fehérjepanelt használva nemcsak a daganatos és a kontroll betegek között, hanem a négy különböző betegcsoport között is képesek voltunk különbséget tenni, ezzel utat mutatva egy általános KIR biomarker panel létrehozása felé.

A fehérjék kiválasztását követően PCA-t és k-közép klaszterizálást alkalmaztunk a létrehozott fehérjepanel daganatosztályozási potenciáljának összehasonlítására. Vizsgálatunk kimutatta, hogy a szérum sEV fehérjepanel alkalmasabb a különböző KIR daganattípusok megkülönböztetésére, mint a teljes szérum fehérjepanelje.

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a szérum sEV fehérjéi megbízható biomarkerek lehetnek a rákdiagnosztikában és a daganattípusok pontos meghatározásában. A teljes szérum és a szérum sEV fehérjék biomarkerként való hatékonyságának összehasonlítása még újdonságot jelent. Tudomásunk szerint a mi csoportunk az első, amely kvantitatív módon hasonlította össze a teljes szérum és szérum sEV fehérjéinek proteomját, eredményeink pedig megerősítik az sEV-k fontosságát a KIR daganatok azonosításában és kiemelik, hogy ezek hatékonyabbak a daganatok csoportosításában, mint a teljes szérum.

A proteomikai adatok statisztikai és IPA-elemzése alapján rámutattunk, hogy a mennyiségi változások és a biológiai háttér is fontos szerepet játszanak abban, hogy az sEV-minták hatékonyabban tudják megkülönböztetni a KIR daganatokat.

Egyfelől az sEV-dúsítás növelte az sEV mintákban eredendően magasabb koncentrációban jelenlevő fehérjék relatív abundanciáját, és csökkentette a nem a célbetegségekre specifikus forrásokból felszabaduló, nem informatív fehérjefrakció leárnyékoló hatását. Ez a növekedett jel-zaj arány előnyös volt az értékes fehérjék LC-MS-sel történő mennyiségi meghatározásának szempontjából.

Másfelől az IPA-elemzés rávilágított, hogy az sEV proteom-alapú heatmap-eken számos olyan tumorprogresszióval kapcsolatos funkció jelentősen aktiválódott, mint például az angiogenezis, a tumorsejtek proliferációja és migrációja. Az IPA heatmap-ek és hálózat-elemzések azt mutatták, hogy az sEV-minták proteomja a teljes szérummal összehasonlítva specifikusabb információt nyújthat a tumor sajátosságairól és a betegségekre adott immunválaszról az egyes betegcsoportokban.

Anderson és munkatársai szerint a szérum sEV a dagantra vonatkozó biomolekuláris információk kettős forrása, mivel tartalmazza a rákos sejtekből származó, valamint a tumorspecifikus immunválasz során felszabaduló molekulákat. Ez azt sugallja, hogy a különböző betegcsoportokból származó szérumvezikulákban észlelt, szérumfehérjétől eltérő fehérje-mintázatok nem csak a tumorra jellemző folyamatokat tükrözhetik, hanem az ezekkel összefüggő immunválaszokat is.

A szérum sEV MMP-9-szintje az agydaganatok prognosztikai markereként használható.

A meghatározott sEV panelből az MMP-9 bizonyult a legalkalmasabb fehérjének a betegcsoportok elkülönítésében. Tudomásunk szerint mi voltunk az elsők, akik összehasonlító elemzéseket végeztek a szérum sEV MMP-9-tartalmáról. ELISA vizsgálatot végeztünk 222 egyedi szérum sEV-mintán, és az eredményeket a betegek nemével, életkorával és kórtörténetével hasonlítottuk össze. Mivel a keringő vezikulák MMP-9 tartalmát illetően nincs korábbi kutatás az irodalomban, eredményeinket csak a vérminták analíziséből származó adatokkal tudjuk összevetni.

Több tanulmány is foglalkozik a szérum MMP-9-tartalmának klinikai relevanciájával kapcsolatban a gyulladásos állapotokban és különböző rákos megbetegedésekben, mint például az emlő-, petefészek-, vastagbél-, tüdő-, hólyagrák és melanoma. KIR daganatok esetében viszont kevés szérum MMP-9 vizsgálatot publikáltak, ezek pedig ellentmondásos eredményekkel zárultak. Hormingo és társai megállapították, hogy az YKL-40 és az MMP-9 szintjei követhetőek a betegek szérumban, és segítenek az aktív betegség hiányának megerősítésében glioblasztómában. Öt évvel később azonban ugyanaz a kutatócsoport (Iwamoto és munkatársai) egy hosszú távú prospektív tanulmányban nem tudták megerősíteni ezeket az eredményeket. Ezzel ellentétben, Ricci és társai megállapították, hogy a szérum MMP-9 szintje jelentősen magasabb a magas grádusú gliómás, az alacsony és magas grádusú meningeómás, valamint az áttétes mintáknál, összehasonlítva az egészséges kontrollokkal. Az utóbbi kutatás eredményei összecsengenek az általunk végzett sEV-alapú vizsgálatokkal.

A szakirodalom alapján nincs egyetértés arra vonatkozóan, hogy mely tényezők hatással lehetnek a szérumban lévő MMP-9 szintjére. Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy a szérumban lévő sEV minták esetében nem mutatkozott egyértelmű összefüggés az életkor és az MMP-9 szintek között, továbbá nem találtunk jelentős különbséget a férfi és női betegek vezikuláris MMP-9 szintjei között. Az is kiderült, hogy a szérumban lévő sEV-k MMP-9 szintje nem változott jelentősen a sebészeti reszekciót megelőzően és azt követően a primer GBM betegek körében, míg a BM minták esetében a reszekció után jelentős növekedést figyeltünk meg az MMP-9 szintekben. Amikor a kezelés hatását vizsgáltuk, a GBM betegeknél a mintavétel idején alkalmazott terápiát vetettük össze azzal az időszakkal, amikor nem kaptak kezelést, és arra a következtetésre jutottunk, hogy a terápia csökkenteni tudja a keringő sEV-k MMP-9 szintjét. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a vezikuláris MMP-9 szinteket nem csak a betegség maga, hanem más tényezők is befolyásolhatják, ezért az összehasonlító elemzéseknél nem csupán a nemet és az életkort, hanem más változókat is, mint például a sebészeti beavatkozásokat és az alkalmazott terápiát, érdemes figyelembe venni.

Vizsgálataink során jelentős eltéréseket figyelhetünk meg rosszindulatú és a jóindulatú KIR daganatok, valamint a rosszindulatú tumor és a kontrollcsoport vezikuláris MMP-9-tartalma között. Más szóval, az agresszívabb tumorok sEV-jeiben magasabb volt az sEV minták MMP-9 szintje. Bár eredményeink közvetettek, mi voltunk az elsők, akik ezt a jelenséget vezikuláris szinten vizsgáltuk. Több olyan tanulmány is létezik, amely a tumorszövetek elemzése során kimutatta az MMP-9 szintek és a tumor agresszivitása közötti összefüggést. Az agresszív tumorok magasabb MMP-9 szintje, a jóindulatú daganatokhoz képest, az MMP-9 tumor növekedését és terjedését elősegítő szerepét tükrözi. Az sEV-ken végzett kutatásaink ugyanerre a következtetésre vezettek bennünket. Azonban az sEV-ken végzett vizsgálatok előnye, hogy a szérumban lévő vezikulák MMP-9 szintjének méréséhez csupán egy egyszerű vérvételre van szükség, elkerülve az invazív, a koponyán keresztüli szöveti biopszia szükségességét. Ez a módszer jelentős előnyt kínál a betegbarát diagnosztika és a daganatok jellemzésének területén, lehetővé téve a tumorok agresszivitásának megértését minimálisan invazív módon.

A kutatásunk során kimutattuk, hogy a magasabb MMP-9 szint és a hosszabb túlélés között negatív korreláció áll fenn. A vizsgált csoportban a hosszú távú (10-23 hónapos) túlélés esetében alacsonyabb MMP-9 szinteket találtunk. Emellett sikerült egy 28 ppm-es küszöbértéket meghatározni, amely segítségével előrejelezhető a betegek túlélési esélye. Eredményeink azt sugallják, hogy a szérumban lévő sEV-kből származó magas MMP-9 szintek negatív prognosztikai markerek lehetnek a glioblasztómás betegek túlélési valószínűsége szempontjából. A központi idegrendszeri daganatokban az MMP-9 szintje és a túlélési idő közötti összefüggést vizsgáló tanulmányok száma korlátozott, és az eredmények gyakran ellentmondásosak. Azonban Jiguet-Jiglaire és munkatársai megfigyelései, amelyek szerint a plazmában mért csökkent MMP-9 szintek összefüggésben állnak a jobb általános túléléssel, összecsengenek a mi szérumban lévő sEV-alapú megállapításainkkal.

Következtetések

Az összehasonlító proteomikai elemzésünk rávilágított arra, hogy az sEV-minták potenciálisan alkalmasabbak a tumor-asszociált molekuláris mintázatok vizsgálatára, mint a teljes szérumminták. Az sEV-mintákban a releváns molekulák magasabb koncentrációban találhatóak, és kevesebb a nem kapcsolódó, zavaró jellegű "zaj", ami tisztább és pontosabb analitikai eredményeket eredményez.

A kutatásunk során az is kiderült, hogy a daganatok megkülönböztetéséhez nem elegendő egyetlen molekulára támaszkodni; egy jól megválasztott fehérjepanel szükséges a pontos differenciáláshoz.

Az *in silico* elemzések, amelyek a teljes szérum és az sEV-minták proteomját hasonlították össze, azt mutatták, hogy az sEV-alapú jellegzetes fehérjeprofilok biológiai háttere szorosabban kapcsolódik a daganattípusokhoz, mint a teljes szérum fehérjeprofiljai. Az sEV-kben dúsított minták így egy olyan biomarker-forrást jelenthetnek, amelyek a releváns információkat kiemelve teszik lehetővé a daganatok pontosabb karakterizálását, beleértve azok immunválaszaival kapcsolatos információkat is.

Ez a felfedezés alátámasztja az sEV-alapú analízisek potenciális előnyeit a teljes szérummintákkal szemben, különösen a KIR daganatok diagnosztikájában és prognosztikájában. Az eredményeink szerint az sEV-ken alapuló analízis bevezetése a klinikai gyakorlatba új lehetőségeket nyithat meg a daganatok korai felismerésére, monitorozására és a betegek túlélési esélyeinek javítására.

Ez a megközelítés különösen fontos a glioblasztómás betegek esetében, ahol az MRI-vizsgálatok korlátai és az alacsony túlélési arányok miatt sürgősen szükség van új biomarkerekre. Az sEV-kből származó vezikuláris MMP-9 mint potenciális prognosztikai marker felvázolása tovább erősíti az sEV-analízis klinikai relevanciáját a GBM és más KIR daganatok prognózisában.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Buzás Krisztinának, amiért meghívott a csoportjába és felismerte bennem a tudományos munkavégzés iránti lelkesedést és képességeket. Mély hálával tartozom a sorsnak, amiért tíz év után, egyetemi éveinket követően, egy játszótéren ismét összehozott minket. Így jutottam el odáig, hogy halljak Krisztina és kutatócsoportja izgalmas és jelentős munkájáról. Hálás vagyok ezért a páratlan lehetőségért, Krisztina témavezetéséért és azért a kiváló tudományos légkörért, amit kutatócsoportjában megteremtett.

Köszönetem kiterjed kollégáimra is, Harmati Máriára, Gyukity-Sebestyén Edinára, Bukva Mátyásra, Pintér Lillára és Böröczky Tímeára. Hálás vagyok nekik a segítségükért és határtalan támogatásukért, valamint azért, hogy olyan sokat tanulhattam tőlük. Számos közös kutatási projekt és tapasztalat fűz össze minket, nélkülük a cikkek és a PhD értekezés megírása nem valósulhatott volna meg.

Hálámat fejezem ki Dr. Széll Márta professzor asszonynak is, amiért felvett az Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskola Mikrobiológia, Antimikrobiális immunitás Programjába.

Köszönetet mondok Horváth Péternek, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetének és a Lendület Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport vezetőjének a projektemhez nyújtott infrastrukturális támogatásért.

Hálás vagyok együttműködő partnereinknek, a tudományterületükön kiemelkedő szakértőknek, szakmai segítségükért. Köszönetet mondok Klekner Álmosnak, hogy bizalmat szavazott kutatócsoportunknak és értékes klinikai mintákat biztosított számunkra, valamint tanácsokkal látott el minket. Hálás vagyok Szabó Zoltánnak is, aki lelkesen vállalta azt a kihívást, hogy foglalkozzon egy számára eddig ismeretlen mintatípussal, az extracelluláris vezikulákkal, valamint azért, mert a tömegspektrometriás méréseket nagy gondossággal és szakértelemmel végezte el.

Nagyra értékelem az anyagi támogatást is, melynek köszönhetően a Nemzeti Agykutatási Program NAP 2.0, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, GINOP-2.2.1-15-2017-00052, OTKA-K143255 és TKP-2021-EGA-09 keretében végezhettem kutatásomat.

Külön hálával tartozom szüleimnek szeretetükért és támogatásukért. Mindig tudtam, hogy bíznak bennem és a legjobbat akarják nekem.

Végül, de nem utolsósorban, a legmélyebb hálámat szeretném kifejezni férjemnek és három csodálatos gyermekemnek. Türelmesen és támogatóan álltak mellettem ezen az úton, remélhetőleg az én kitartásom is inspirációt jelent számukra.

Az értekezés a következő publikációkon alapul:

- I. **Dobra, G.**; Bukva, M.; Szabo, Z.; Bruszel, B.; Harmati, M.; Gyukity-Sebestyen, E.; Jenei, A.; Szucs, M.; Horvath, P.; Biro, T.; et al. Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 5359, doi:10.3390/ijms21155359.

IF: 5,924; Q1

- II. **Dobra, G.**; Gyukity-Sebestyén, E.; Bukva, M.; Harmati, M.; Nagy, V.; Szabó, Z.; Pankotai, T.; Klekner, Á.; Buzás, K. MMP-9 as Prognostic Marker for Brain Tumors: A Comparative Study on Serum-Derived Small Extracellular Vesicles. *Cancers* 2023, 15, 712, doi:10.3390/cancers15030712.

IF: 5,064; Q1

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb publikációk:

- III. Bukva, M.; **Dobra, G.**; Gomez-Perez, J.; Koos, K.; Harmati, M.; Gyukity-Sebestyen, E.; Biro, T.; Jenei, A.; Kormondi, S.; Horvath, P.; et al. Raman Spectral Signatures of Serum-Derived Extracellular Vesicle-Enriched Isolates May Support the Diagnosis of CNS Tumors. *Cancers* 2021, 13, 1407, doi:10.3390/cancers13061407.

IF: 6,575; Q1