

36. OTDK Biológia szekció

Plazmából izolált extracelluláris vezikulák Raman
spektroszkópiai vizsgálata tumordiagnosztikai célból

Nagy Valentina

Biológus MSc

3. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémia Intézet

Témavezető: Dr. Gyukity-Sebestyén Edina, tudományos munkatárs

Belső konzulens: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina, tanszékvezető,
egyetemi docens



2023.

Tartalom

1. BEVEZETÉS	2
1.1. Tumordiagnosztika	2
1.2. Folyadékbiopszia	3
1.3. Extracelluláris vezikulák	4
1.4. Komplex molekuláris mintázatok vizsgálata Raman spektrometriával	6
1.5. Raman spektroszkópiai adatok analízise	7
2. CÉLKITŰZÉS.....	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	9
3.1. Minták.....	9
3.2. Vérminták előkészítése, sEV izolálás.....	10
3.3. sEV karakterizálás	10
3.3.1. Áramlási citometria.....	10
3.3.2. Western blot.....	10
3.3.3. Nanorészecske követő analízis	11
3.4. Raman spektroszkópia.....	11
3.5. Adatok elemzése.....	12
3.5.1. Spektrumok alapvonal korrekciója	12
3.5.2. Kiugró értékek azonosítása	12
3.5.3. Klasszifikáció.....	12
3.5.4. Vizualizáció	13
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	14
4.1. Az izolátumok mutatják az sEV-kre jellemző karakterjegyeket.	14
4.2. A plazmából izolált sEV-k Raman spektruma által a betegcsoportok jobban elkülöníthetők, mint a teljes plazma Raman spektrumának vizsgálatával.	16
4.3. A tumoros betegek mintái jól elkülöníthetők a kontroll mintáktól.	17
4.4. Az algoritmus különbséget tesz a primer agyi daganat és az agyi metasztázis között..	18
4.5. Az SVM modellel történő klasszifikáció alapján a vizsgált betegcsoportok magas szenzitivitással és specificitással különböztethetők meg a kontrolltól.	19
4.6. A klasszifikáló modell által talált különbség nem az algoritmus túltanulásának eredménye.....	21
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	23
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	25
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	26
8. FÜGGELÉK.....	32

1. BEVEZETÉS

1.1. Tumordiagnosztika

A központi idegrendszeri (KIR) tumorok korai diagnosztizálása és terápiája jelentős nehézséget jelent az onkológiai kutatások terén. A tumorok késői diagnosztizálása lényegesen csökkenti a betegség kezelésének hatékonyságát, így a betegek túlélési esélyeit is.

A KIR daganatok nagy része az agyban fejlődik ki. A tumor eltávolítása és biopszia vétele nagy szaktudást igényel, valamint a vér-agy gát szelektív áteresztőképessége miatt a gyógyszeres kezelés is nehézségekbe ütközik. Továbbá az egyedi fejlődési, genetikai, epigenetikai és mikrokörnyezeti sajátosságai miatt, az agyi tumorok gyakran rezisztensek a konvencionális, de még az új fejlesztésű gyógyszerekre is (Aldape és mtsai., 2019).

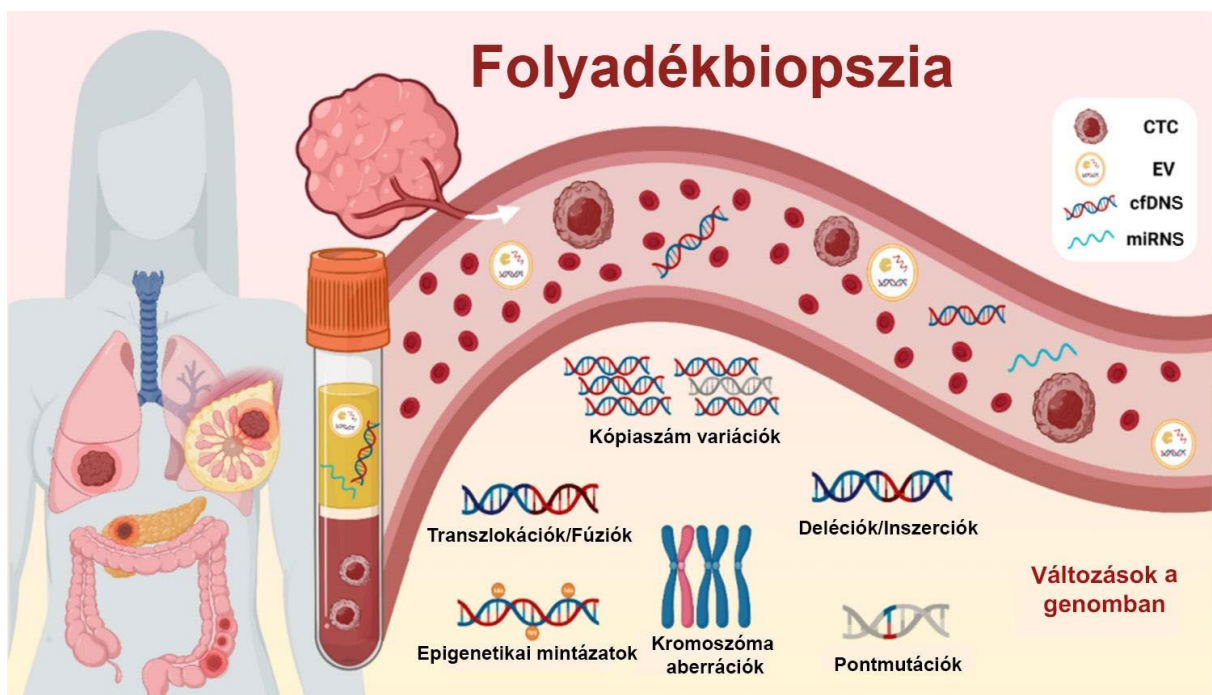
A tumor korai diagnosztizálása javíthatja a terápiák hatékonyságát, ezáltal a betegek túlélési esélyeit. A kisebb tumorokat méretük miatt könnyebb és biztonságosabb sebészeti úton eltávolítani. Valamint a genetikai heterogenitásuk is kisebb, ezáltal érzékenyebbek a sugárkezelésre és a kemoterápiára. A nagyobb méretű tumorok esetén megnő az esély a kiújulásra és a terápiával szembeni rezisztenciára is (Figuerola & Carter, 2018).

Jelenleg a KIR tumorok diagnosztikájára képalkotó eljárásokat (mágnesesrezonancia-képalkotás (MRI), komputertomográfia (CT)) és agyszövet biopsziát alkalmaznak. Az MRI technológia csak a nagyobb méretű tumorok diagnosztizálására használható és kevés prognosztikus értékkel szolgál az újra kiújuló daganatokról (Garden & Campbell, 2016; Herholz és mtsai., 2012). Az agyszövet biopszia egy invazív módszer, mely jelentős kockázatokkal jár a betegre nézve (bevérzés, neurológiai funkciók károsodása). Továbbá az agyi tumorok egy része nehezen hozzáférhető, létfontosságú agyi területeket érint, így a sebészeti mintavétel nagy szakmai felkészültséget igényel (Peca és mtsai., 2009).

A diagnosztikai nehézségek miatt a rosszindulatú KIR tumorokat gyakran már csak a komolyabb tünetek (paralízis, rohamok) megjelenése után detektálják (Figuerola & Carter, 2018). Ezen tumorok esetében a késői diagnosztizálás és a terápiás nehézségek miatt az 1 éves relatív túlélés 56,6%-ra, míg az 5 éves relatív túlélés 32,1%-ra tehető (Barnholtz-Sloan és mtsai., 2018).

1.2. Folyadékbiopszia

A folyadékbiopszia jelentős előnyökkel rendelkezik a hagyományos diagnosztikai módszerekkel szemben, mivel egy minimálisan invazív, biztonságosabb, gyorsabb és olcsóbb módot kínál a rosszindulatú daganatos betegségek diagnosztizálására és nyomon követésére (Marrugo-Ramírez és mtsai., 2018). Folyadékbiopszia során legtöbbször a vérből vesznek mintát, amelyben a tumoros szövetből származó különböző fehérjék, nukleinsavak, tumorsejtek, tumor DNS (circulating tumor DNS, ctDNS) és extracelluláris vezikulák (EV-k) keringenek (1. ábra), (Merdalimova és mtsai., 2019). A vérből kimutatható tumor eredetű fehérjéket már a klinikumban is használják a diagnózis kiegészítéseként. Ilyen fehérje biomarker például a prosztata specifikus antigén (PSA), melyet prosztatatarák szűrésre használnak vagy a cancer antigén 125 (CA-125), melyet a petefészekrák diagnosztizálásában alkalmaznak (Duffy, 2001). A vérből izolálható fehérje biomarkerek azonban önmagukban nem rendelkeznek elég szenzitivitással a tumorok korai diagnosztizálásához (Duffy, 2001).



1. ábra: Folyadékbiopszia. A perifériás vér különböző tumoros eredetű komponenseket tartalmaz, melyek izolálhatóak és analizálhatóak (CTC: keringő tumorsejt, EV: extracelluláris vezikula, cfDNA: sejtmentes DNS, miRNA: mikroRNA) (Palacín-Aliana és mtsai., 2021).

A közelmúltban a keringő tumorsejtek, a keringő tumor DNS és az extracelluláris vezikulák azonosítása és számszerűsítése különös figyelmet kapott a tumordiagnosztikai kutatásokban. A

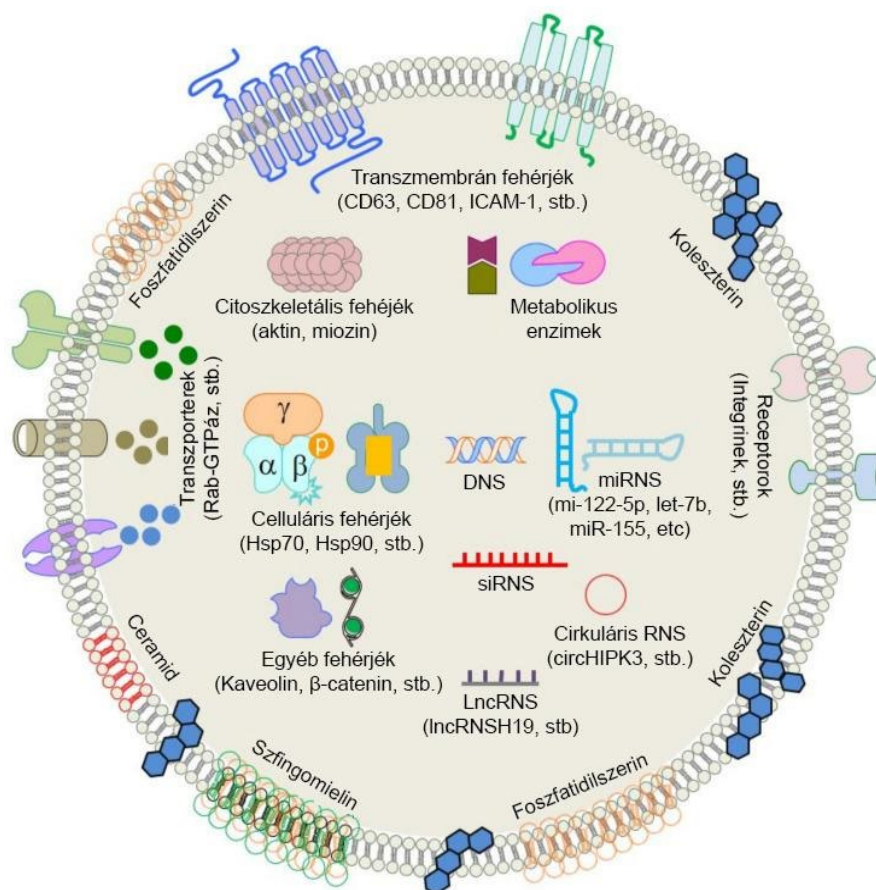
keringő tumorsejtek izolálást követően sejtenyészetben fenntarthatóak, így könnyen vizsgálhatóak, fenotípusos és genotípusos elemzésre is használhatóak. Azonban ezen sejteknek nagy a heterogenitása és kicsi a koncentrációja a perifériás vérben (1-10 sejt/10mL). Ebből kifolyólag a keringő tumorsejtek analízise egyelőre nem egy egységes, univerzális és megbízható módszer a tumorok korai diagnosztizálására. A tumoros betegek vérében jelen lévő keringő tumor DNS analízise nagyobb szenzitivitással jellemezhető módszer, mint a keringő tumorsejtek vizsgálata. A keringő tumor DNS izolálásával könnyen hozzáférhető a beteg genomja, mely segíthet a megfelelő terápia kiválasztásában és a terápia hatékonyságának monitorozásában. Azonban a keringő tumor DNS-nek rövid féléletideje van a vérben, illetve interferálhat a sejtmentes DNS-sel, ami nem tumor eredetű. Továbbá a keringő tumor DNS is kis koncentrációban fordul elő a perifériás vérben (25 kópia/mL), mely megnehezíti a kimutatását a tumor korai szakaszában (Merdalimova és mtsai., 2019).

A keringő tumorsejtek és a keringő tumor DNS analízise további kutatások során hatékony módszerekké válhatnak, azonban az előbb említett nehézségek miatt nehezen alkalmazhatóak a tumor kezdeti stádiumának detektálására, így a korai diagnosztikára. Ebből a szempontból viszont a szintén vérből izolálható EV-k analízise egy innovatív és ígéretes módszer lehet. Az EV-k analízise megoldhatná a legfontosabb problémákat a szenzitivitás, specificitás és megbízhatóság kérdésében (Merdalimova és mtsai., 2019).

1.3. Extracelluláris vezikulák

Az EV-k sejtek által szekretált partikulumok, melyek kettős lipid réteggel rendelkeznek és önálló replikációra képtelenek (Théry és mtsai., 2018). Az EV-ket sokáig a keletkezésük alapján osztották 3 csoportba: sejthalál során keletkező apoptotikus testeket, a plazmamembránról lefűződő mikrovezikulumokat és az endoszomális útvonalon keletkező exoszómákat különítették el. Az exoszómák a plazmamembrán és a multivezikuláris testek fúziójával szekretálódnak az extracelluláris térbe (Yáñez-Mó és mtsai., 2015). A Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság útmutatója, a MISEV2018 konszenzus alapján azonban a vezikulákat pontosabb a méretük és denzitásuk alapján csoportosítani. Így megkülönböztetünk a) „small EV”-ket (sEV) amiknek a mérete, az izolálás módszerétől függően lehet például 100 nm vagy 200 nm alatti, illetve b) „large” (lEV) / „medium” (mEV) EV-ket, melyek 200 nm-nél nagyobbak (Théry és mtsai., 2018). Az előbb említett exoszómák az új kategorizálás alapján az sEV csoporthoz tartoznak, így a dolgozatban ezt az elnevezést használom.

Minden sejtünk bocsát ki sEV-ket, fiziológias és patológias körülmények között egyaránt. Az sEV-k a különböző testnedvekbe szekretálódnak (pl. nyálba, vérbe, cerebrospinális folyadékba, anyatejbe) és ott stabilan fenn is maradnak (Yáñez-Mó és mtsai., 2015). Régen azt gondolták, hogy a vezikuláknak a sejt-törlemék eltávolításában van szerepük, mára azonban már bebizonyították, hogy legfontosabb funkciójuk a sejt-sejt közötti kommunikáció megvalósításában van. A vezikulák különböző fehérjét (tetraspaninok, szignálmolekulák), nukleinsavakat (hosszú nem kódoló RNS, miRNS, mRNS, DNS), kis metabolitokat (cukor, aminosav, vitamin) és lipideket (koleszterin, ceramid, foszfatidil-szerin) szállítanak (2. ábra) (Harmati és mtsai., 2021). Az EV-k molekuláris ujjlenyomata információt szolgáltat a donorsejt típusáról és állapotáról. Az EV-mediált sejt-sejt közötti kommunikáció a fiziológias homeosztázis fenntartásában elengedhetetlen, azonban patológias körülmények között negatív hatásai is lehetnek (Harmati és mtsai., 2019).



2. ábra: Kisméretű extracelluláris vezikula (sEV) összetétele (Forrás: Jan és mtsai., 2021).

Az onkológiai kutatásokban az sEV-k egyre nagyobb teret kapnak. A vezikulák szerepet játszanak a tumor proliferációban, a metasztázis képzésben, megváltoztatják a tumor

mikrokörnyezetét, illetve az immunrendszer tumorellenes működését is befolyásolhatják (Gyukity-Sebestyén és mtsai., 2019; Rincón-Riveros és mtsai., 2021). Több tanulmány is kimutatta, hogy a tumoros betegek vérében az sEV-k száma szignifikánsan magasabb szintet mutatott az egészséges donorokhoz képest (Whiteside, 2008). A biomarker kutatás terén az sEV-k analízisének számos előnye lehet a teljes vérszérum vizsgálatához képest. A tumor eredetű fehérjék és egyéb molekulák a vezikulákban feldúsulnak, így a kisebb mennyiségben jelen lévő molekulákat nem takarják ki a vérben nagyobb koncentrációban jelen lévő, nagyobb méretű fehérjék (pl: albumin, immunglobulinok) (Dobra és mtsai., 2020). Az sEV-k stabilak, hosszú ideig tárolhatóak. A kettős lipid réteg által a vezikulák tartalma védett az enzimatis hasításoktól (Abels & Breakefield, 2016). Az sEV-k képesek átjutni a vér-agy-gáton, ami fontos szempont a központi idegrendszeri tumorok diagnosztikájában (Saint-Pol és mtsai., 2020). Mivel a vezikulák molekuláris mintázata (lipid, fehérje, RNS, DNS, metabolit tartalma) tükrözi az azt kibocsátó sejtet és annak fiziológiás állapotát (Harmati és mtsai., 2021), lehetőség van betegségre specifikus sEV mintázatok azonosítására (Bukva és mtsai., 2021).

1.4. Komplex molekuláris mintázatok vizsgálata Raman spektrometriával

A korábbi biomarker kutatások nagyrészt arra törekedtek, hogy egy adott betegségre jellemző egy-két nukleinsav vagy fehérje típusú biomarkert azonosítsanak. Ezek azonban nem bizonyultak elég specifikusnak vagy szenzitívnek ahhoz, hogy önmagukban diagnosztikai markerként szolgáljanak (Figueroa & Carter, 2018; Linhares és mtsai., 2020).

Mivel az sEV-k koncentrálik a betegség-specifikus molekulákat, jól tükrözik az emberi test patofiziológiai sajátosságait, így a vérmintákból izolált sEV-k teljes molekuláris összetételének elemzése megoldást jelenthet a biomarker kutatásban felmerülő nehézségek leküzdésére (Bukva és mtsai., 2021). Az sEV-k komplex molekuláris mintázatának analízisére a Raman-spektroszkópia egy új, ígéretes módszer. A Raman-spektroszkópia előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy kis térfogatú minta is elegendő, mely a mérés során nem roncsolódik, így egy mérés többször is megismételhető. A mintát előzetesen nem szükséges jelölni, így minimális előkészületet igényel (Gualerzi és mtsai., 2017; Merdalimova és mtsai., 2019).

A mérés során a mintát egy monokromatikus lézerrel megvilágítjuk és a szórt fotonokat detektáljuk. Az esetek túlnyomó többségében a szórt foton hullámhossza megegyezik a gerjesztő lézersugár hullámhosszával, ezt a folyamatot Rayleigh-szórásnak nevezzük. A beeső fotonok kis része azonban a közeg molekuláinak rezgési vagy forgási energiáját

megváltoztatják, aminek eredményeképpen a szórt fotonok hullámhossza megváltozik. Ezt a folyamatot Raman-szórásnak nevezzük. A fotonok hullámhossz változása arányos a kémiai összetétellel, így kifejezetten a minta kémiai összetételére utal (Bumrah & Sharma, 2016; Pence & Mahadevan-Jansen, 2016).

Az izolátumok Raman spektruma tükrözi az sEV-k komplex molekuláris mintázatát, így nem szükséges egy-egy specifikus fehérje, nukleinsav vagy lipid biomarker azonosítása. A legújabb vizsgálatok szerint a különböző mintatípusok teljes molekuláris összetételének Raman-spektroszkópiai elemzése alkalmas lehet klinikai diagnosztikai módszerek kifejlesztésére (Bukva és mtsai., 2021; Harris és mtsai., 2009).

1.5. Raman spektroszkópiai adatok analízise

A biológiai minták Raman spektroszkópiai adatai a különböző omikai módszerekhez képest kiemelkedő komplexitással és kiterjedéssel rendelkeznek, mely miatt a konvencionális statisztikai módszerekkel történő elemzésük a legtöbb esetben nem megoldható.

A spektroszkópiai adatok elemzésében egyre nagyobb teret nyernek az olyan gépi tanulási módszerek, melyek a rendelkezésre álló adatok alapján klasszifikáló modelleket készítenek annak érdekében, hogy a különböző csoportokba tartozó mintákat megkülönböztessék egymástól a rendelkezésre álló spektrumok alapján (Tang és mtsai., 2021).

A tanulmányunkban alkalmazott tartóvektor mechanizmusként (support vector machine, SVM) ismert algoritmus az egyik legrobosztusabb módszer, melyet napjainkban alkalmaznak, és számos esetben bizonyította hatékonyságát a spektroszkópiai adatok feldolgozása során (Li és mtsai., 2022).

Az SVM módszer a felügyelt gépi tanulási módszerek közé tartozik, tehát a klasszifikáló modell létrehozása során az algoritmus előzetes információkkal rendelkezik arról, hogy a megkülönböztetni kívánt megfigyeléseink melyik csoportba tartoznak. Emiatt a modell felépítése mindig egy tanító halmazon történik, majd a felállított modell pontosságát egy teszt halmazon ellenőrzik (Uddin és mtsai., 2019).

2. CÉLKITŰZÉS

A tumordiagnosztikai kutatások egyik fő iránya a nem-invazív, folyadékbiopszia alapú diagnosztikai módszerek fejlesztése. A különböző testfolyadékokban, így a vérben is megtalálható kis extracelluláris vezikulák (sEV) egyre nagyobb teret kapnak a tumordiagnosztikai kutatásokban. Az sEV-k molekuláris mintázatainak összehasonlító analízisére a Raman spektrumok gépi tanulási módszerrel való elemzése egy új, ígéretes módszer lehet.

Kutatásunk célja megvizsgálni, hogy a különböző tumoros betegek vérplazmájából izolált sEV-k Raman spektruma alapján elkülöníthetők-e a vizsgált betegcsoportok. A munkánk során nem kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa, glioblastoma multiforme, meningeoma, végbél daganat és melanóma betegcsoportokkal dolgoztunk.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Minták

Kutatásunk során összesen 85 plazma mintát vizsgáltunk. A vérmintákat a Szegedi Tudományegyetem (SZTE) Onkoterápiás Klinikáról, az SZTE Sebészeti Klinikáról, az SZTE Idegsebészeti Klinikáról és a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáról kaptuk. A vizsgált betegcsoportok a nem kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa (BM), glioblastoma multiforme (GBM), meningeoma (M), végbél daganat (R) és melanóma (Me) voltak (1. táblázat). A mintavétel minden esetben az operáció előtt történt. Kontrollként olyan lumbális porckorongsérvben szenvedő betegek vérmintáit használtuk fel, akiknek nem volt igazolt daganatos betegsége a vérvétel időpontjában. A betegek Tájékoztatót és Beleegyező nyilatkozatot írtak alá, a kutatást a Regionális Humán Orvosbiológiai Tudományos és Kutatásetikai Bizottság hagyta jóvá. A vizsgálatokat a 35/2021-SZTE IKEB számú etikai engedélyek birtokában végeztük el.

1. táblázat: Betegcsoportok adatai. (BM: nem kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa, GBM: glioblastoma multiforme, M: meningeoma, R: végbél daganat, Me: melanóma, CTRL: kontroll).

Betegcsoport	Betegek száma	Életkor		Nem	
		Átlag	Medián	Férfi (%)	Nő (%)
BM	19	67,32	65	11 (57,89)	8 (42,11)
GBM	24	57,33	59,5	12 (50,00)	12 (50,00)
M	6	51,83	51,5	3 (50,00)	3 (50,00)
R	17	72,73	74	11 (64,71)	6 (35,29)
Me*	4				
CTRL	15	49,80	48	9 (60,00)	6 (40,00)

* Kutatásunk jelen fázisában a jelölt betegcsoportról nem áll rendelkezésünkre elég adat.

3.2. Vérminták előkészítése, sEV izolálás

A BD Vacutainer K3-EDTA csövekbe gyűjtött vérmintákat a levételtől számítva 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Majd 2500 g-vel kétszer 15 percig centrifugáltuk az alakos elemektől való mentesítés céljából. Az így kapott vérlemezke-mentes plazmát (platelet-free plasma, PFP) aliquotokra osztottuk és a vezikula izolálásig -80 °C-on tároltuk.

Az izolálás során a mintákat partikula mentesített, Ca^{2+} , Mg^{2+} mentes DPBS pufferben (Lonza) hígítottuk 1:1 arányban (2x1 ml plazma mintához 2x1 ml DPBS), majd centrifugáltuk 10000 g, 4 °C, 30 perc beállítások mellett, hogy a nagyobb vezikulák leülepedjenek. A felülúszót tovább hígítottuk DPBS-ben 1:1 arányban. Az sEV izoláláshoz 100000 g, 4 °C, 1 órát centrifugáltuk a mintákat (T-1270 szögrotor, polikarbonát csövek, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A pelletet 100 µl DPBS-ben szuszpendáltuk fel, a későbbi felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.3. sEV karakterizálás

3.3.1. Áramlási citometria

A 100 µl DPBS-ben (Lonza) felszuszpendált izolátumokat 60 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk az alábbi ellenanyagokkal: FITC konjugált anti-human CD63 10x hígításban (ImmunoTools) és APC konjugált anti-human CD9 10x hígításban (ImmunoTools).

A mérésekhez Cytoflex S négy lézeres műszert használtunk, közepes (30 µl /perc) mintaáramlási sebesség beállítással. A gerjesztéshez 488 nm hullámhosszúságú kék és 638 nm hullámhosszú piros lézert alkalmaztunk. A műszer FSC detektora által mért fényszórási adatokat a vezikulaméret becslésére, míg az SCC detektor által kapott adatokat a partikulák összetettségének/granuláltságának becslésére használtuk. A CD63-FITC fluoreszcens jelét 525/40 BP filteren keresztül a CD9-APC fluoreszcens jelét 660/10 BP filteren keresztül detektáltuk. Az így nyert adatokat CytExpert 2.4.0.28 szoftverrel értékeltük ki.

3.3.2. Western blot

A Western blot analízis előtt a betegcsoportok mintáit pooloztuk. Pozitív kontrollként HCT116 sejtlizátumot használtunk. Az izolátumok fehérjetartalmát előzetesen megmértük Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific) segítségével, majd a géltre egységesen 30 µg fehérjét vittünk fel minden mintából. A mintákat 4x mintapufferben (NuPAGE®, ThermoFisher)

szuszpendáltuk fel, majd 96 °C-on inkubáltuk 10 percig. A fehérjéket 4-12%-os Bis-Tris, illetve 3-8%-os Tris-Acetate akrilamid gélen (ThermoFisher) méret szerint elválasztottuk, majd PVDF membránra (Merck) blottoltuk. A membránt 5%-os tejporral blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Az anti-calnexin antitestet (nyúl poliklonális antitest, Millipore) 1:10000 arányban, az anti-ApoB antitestet (egér monoklonális, Santa Cruz) 1:500 arányban hígítottuk 1%-os tejport tartalmazó TBST-ben. A membránt az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. A másodlagos, anti-nyúl IgG-HRP (kecske poliklonális antitest, R&D) antitestet 1:1000 arányban, az anti-egér IgG-HRP (kecske poliklonális antitest, Advansta) antitestet 1:40000 arányban hígítottuk 1%-os tejport tartalmazó TBST pufferben. A membránt a másodlagos antitesttel 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A mosások 3x10 perces ciklusban zajlottak TBST-vel. A HRP enzimaktivitás láthatóvá tételéhez ECL reagenst (Advansta) használtuk. A kemilumineszcens jeleket a LI-COR ODYSSEY® Fc műszerrel detektáltuk, majd Odyssey 1.2 szoftverrel elemeztük 30 másodperces és 5 perces előhívásokat alkalmazva.

3.3.3. Nanorészecske követő analízis

A NanoSight méréshez a mintákat partikula mentes DPBS-ben hígítottuk. A mérést 532 nm tartományban végeztük el a NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) segítségével. Minden mintát ugyanazon beállítások mellett három 60 másodperces videóval rögzítettünk (Camera level: 16, Threshold: 4, 25 °C, 30-80 particle per frame).

3.4. Raman spektroszkópia

Az sEV-k Raman spektrumának felvételéhez Senterra II mikroszkópot (Bruker) használtunk visszaszórásos elrendezésben. A mintákat kalcium-fluorid szubsztrátra cseppentettük, majd szobahőmérsékleten, levegőn 1 órát szárítottuk a mérések előtt. Minden minta ugyanazon beállítások mellett lett lemérve, melyeket előzetes kísérletek alapján határoztunk meg (a gerjesztő lézer hullámhossza 532 nm, a lézer teljesítmény 12,5 mW, az integrációs idő 30 másodperc, a spektrum felbontása 1,5 cm⁻¹). A spektrumot 50x optikai objektív gyűjtötte (Olympus).

A leírt elrendezés hozzávetőlegesen egy 15 µm lézerfoltot képez a besugárzás során a mintákon, mely a Raman-spektrumok mintavételi területe. A levegőn szárított minta átlagosan 4 mm átmérőjű, így a Raman mikroszkóp kezelője finoman beállíthatja a mintavételi folt helyzetét,

elkerülve a duplikációt. Minden mintáról 5 spektrum felvétel készült. Az analízisekhez a 801 cm^{-1} és $3100,5\text{ cm}^{-1}$ közötti spektrum tartományt használtuk fel.

3.5. Adatok elemzése

Az adatok elemzéséhez az Orange data mining 3.32 szoftvert használtuk.

3.5.1. Spektrumok alapvonal korrekciója

Az analízis további lépéseit megelőzően a teljes adatsort logaritmizáltuk ($\log_2$) a linearitás és a szórás csökkentésének érdekében.

A logaritmizált adatsort ezt követően alapvonal korrekciónak vetettük alá aszimmetrikus legkisebb négyzetes simítást alkalmazva (asymmetric least square smoothing), melynek célja a valódi jel elkülönítése a háttérzajtól úgy, hogy a korrekció a jelet a lehető legnagyobb mértékben érintetlenül hagyja.

3.5.2. Kiugró értékek azonosítása

A transzformált spektrumok közül a lokális kiugró értékek (local outlier factor) módszerét használva távolítottuk el az atipikus spektrumokat. A módszer előnye, hogy a felügyelet nélküli gépi tanulási módszerek közé tartozik, melynek köszönhetően az algoritmus nem vette figyelembe a tumorok típusát a kiugró értékek azonosításakor.

3.5.3. Klasszifikáció

A klasszifikációs folyamatok során a különböző csoportokat páronként hasonlítottuk össze. A spektrumok különböző betegcsoportba történő klasszifikációját az SVM segítségével végeztük el. Az algoritmus a változók által kifeszített térben megkísérel egy hipersíkot kialakítani, mely elválasztja a különböző betegcsoportba tartozó mintákat egymástól. Egy ilyen módon megalkotott hipersík tekinthető egy klasszifikációs modellnek.

A modellek felépítése előtt az adatsort öt egyenlő részre osztottuk (ötszörös keresztvalidáció, 5-fold cross validation). Az adathalmaz $\frac{4}{5}$ -e tanítóhalmazként szolgált, melyet használva az algoritmus felállította a klasszifikációs hipersíkot/modellt. Ezt követően az algoritmus a fennmaradó $\frac{1}{5}$ részbe tartozó mintákat klasszifikálta attól függően, hogy a tanítóhalmazon felállított hipersíktól milyen irányban helyezkedtek el. A folyamat addig ismétlődött, amíg minden $\frac{1}{5}$ rész nem szerepelt teszhalmazként.

A modell szenzitivitását (valós pozitív arány) és specificitását (valós negatív arány) ezt követően átlagolva adtuk meg, és konfúziós mátrixként ábrázoltuk.

A gépi tanulási algoritmusok egyes esetekben hajlamosak túltanulni (overfitting) a klasszifikációs modell felállítása során. A túltanulás eredményeként az algoritmus olyan csoportok között is jelentős különbségeket találhat, ahol valójában nincs.

Ennek tesztelése érdekében a CTRL csoportot véletlenszerű mintaválogatási módszerrel kétfelé osztottuk, és ellenőriztük a szenzitivitás, specificitás értékeket. Abban az esetben, ha az algoritmus nem hajlamos a vizsgált adatsorunkon a túltanulásra, a szenzitivitás és specificitás értékek 50% körül alakulnak.

3.5.4. Vizualizáció

Az összehasonlított csoportok közötti különbséget vizuálisan főkomponens analízist (PCA) és FreeViz algoritmust alkalmazva jelenítettük meg.

A PCA a dimenzió redukciós módszerek közé tartozik, mely egy több változóval rendelkező adathalmazt alakít át lineáris transzformáció segítségével az eredetnél kevesebb változót tartalmazó adatsorrá. Vagyis az eredetileg megfigyelt változókat korrelációjuk alapján kevesebb számú főkomponens változóvá (PC) vonja össze; mindezt úgy, hogy a dimenziók redukciója után a lehető legtöbb információ megőrződjön. Ennek köszönhetően a több dimenziós adathalmazok 2 dimenzióban is megjeleníthetővé válhatnak.

A FreeViz algoritmus szintén egy dimenzióredukciós módszer, mely képes a többváltozós adathalmazokat 2 dimenziós térben megjeleníteni. A FreeViz egy optimalizált algoritmusnak tekinthető más dimenzióredukciós módszerekhez képest, ugyanis törekszik a különböző csoportokat térben elválasztva ábrázolni a rendelkezésre álló adatokat felhasználva.

A megjelenítés során a különböző változókat súlyozva veszi figyelembe, melynek köszönhetően azonosíthatók a betegcsoportokra jellemző hullámszámok.

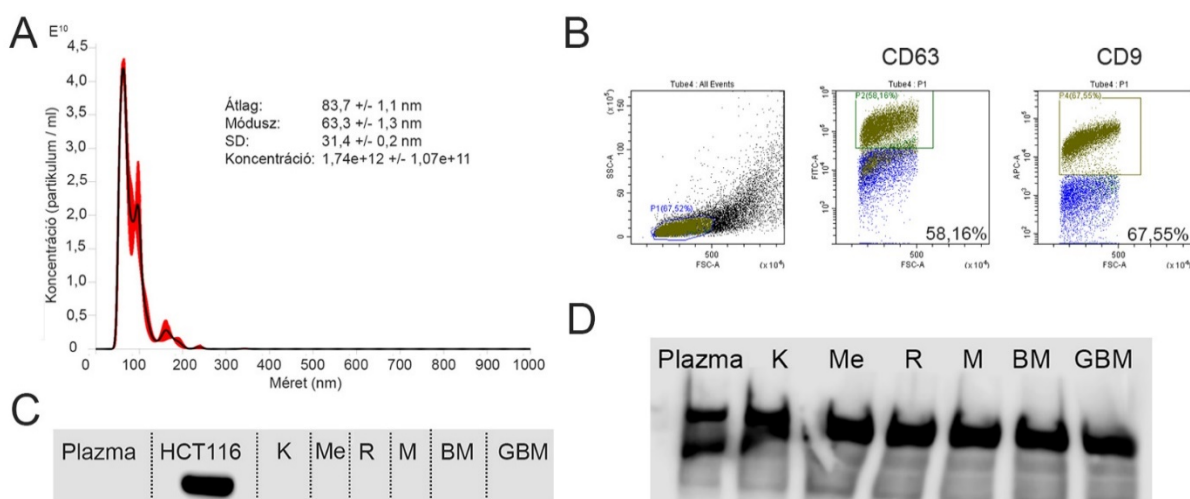
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Kutatásunk során összesen 85 plazmából preparált, sEV mintát vizsgáltunk meg, melyek hat betegcsoporttól származtak: nem kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa (BM), glioblastoma multiforme (GBM), meningeoma (M), végbél daganat (R), melanóma (Me) és lumbális porckorongsér, mint tumormentes kontroll (CTRL). A plazma mintákból az sEV-ket differenciál centrifugálással izoláltuk, majd Western blot, fluoreszcens áramlási citometria és nanorészecskék mozgását követő analizáló (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) módszerekkel karakterizáltuk. A vezikulák komplex molekuláris mintázatát Raman spektroszkópiával mértünk le. A mért Raman spektrumok analíziséhez Support Vector Machine (SVM) algoritmust használtunk. Az analízisek során a minták párhuzamos méréseit használtuk fel, nem a spektrumok átlagát. Erre azért volt szükség, hogy az SVM algoritmusához kellő adat álljon rendelkezésre. A klasszifikáció hatékonyságának jellemzésére specificitás, szenzitivitás és klasszifikációs hatékonyság (CA) értékeket használtunk. A specificitás megmutatja, hogy a kontroll csoport hány százalékát diagnosztizáljuk helyesen, a szenzitivitás pedig megadja, hogy a tumoros csoport hány százalékát diagnosztizáljuk helyesen. Az ábrákon a klasszifikációs eredményeket szórásdiagramon és konfúziós mátrixban tüntettük fel.

4.1. Az izolátumok mutatják az sEV-kre jellemző karakterjegyeket.

Az izolátumok jellemzése a Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (International Society for Extracellular Vesicles - ISEV) 2018-as ajánlása (MISEV) szerint történt (Théry és mtsai., 2018). Az sEV-k karakterizálásához nanorészecske követő analízist, Western blotot és áramlási citometria módszereket alkalmaztunk.

Az izolátumok vezikula tartalmának méret és koncentráció szerinti eloszlását nanorészecske követő analízissel, NanoSight NS300 készülékkel vizsgáltuk. A vezikulák átlagos mérete 70-90 nm volt, a koncentráció nagyságrendileg 10^{11} és 10^{12} partikulum / ml volt, a minta típusától függően (3.A ábra). Az sEV-re jellemző CD63 és CD9 tetraspaninok jelenlétét fluoreszcens áramlási citometria módszerrel vizsgáltuk, amely kimutatta, hogy az izolált partikulák 58,16%-a pozitív a CD63, míg 67,55%-a pozitív a CD9 markerekre (3.B ábra). Az sEV izolátumok lipoprotein szennyezettségét és a calnexint, mint negatív vezikula markert Western blot analízissel vizsgáltuk. Az ábrán jól látszik, hogy a calnexin a pozitív kontrollal (HCT116 sejt izolátum) ellentétben nem mutatható ki a vezikula izolátumokban (3.C ábra). A lipoproteinek jelölésére használt apoB azonban minden vezikula izolátumban erős jelet adott (3.D ábra).



3. ábra: Az sEV karakterizálás eredményei. A) Reprezentatív NanoSight analízis a vezikulák méretének és koncentrációjának meghatározásához. Az ábrán a standard error értékeket tüntettük fel. B) CD63 és CD9 tetraspaninok kimutatása áramlási citometriai módszerrel. C) Western blot analízis a Calnexin negatív vezikula markerre. D) Western blot analízis az izolátumokban lévő apoB szennyeződésekre (P: Protein marker, Plazma, HCT116 sejt lizátum, K: kontroll, Me: melanóma, R: végbél daganat, M: meningeoma, BM: nem kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa, GBM: glioblastoma multiforme). E¹⁰

A vérmintából izolált sEV-k esetén gyakori és jól ismert kihívás, hogy a vezikulákkal együtt fehérjeaggregátumok és lipoproteinek is izolálódnak. Jelenleg vérpalzmából/szérumból teljesen tiszta sEV izolátumok preparálása az általunk használt eljárással nem előállítható (Wernerné Sódar, 2018). A mintáink jellemzése alapján az izolátumok tisztasága megfelelő. Kutatásunk célja, hogy a standard sEV izolálási protokollt alkalmazva az izolátumok Raman spektrumai között különbséget tudjunk tenni.

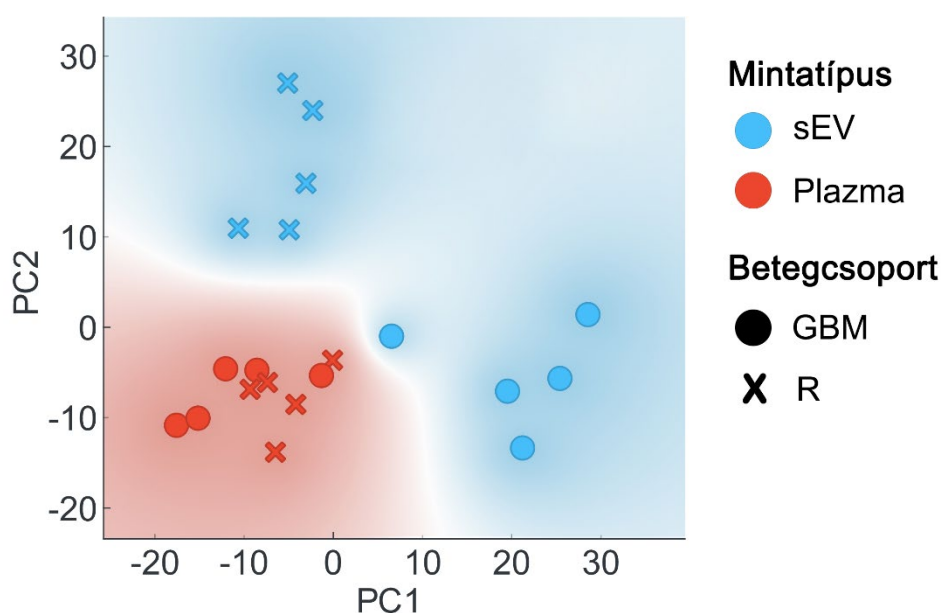
Egy tanulmányban olyan Raman spektrális jeleket írtak le, amelyek 95%-os biztonsággal meg tudták különböztetni az EV-ket a lipoproteinektől (Enciso-Martinez és mtsai., 2020). Az 1004 cm⁻¹ hullámszám nagy intenzitást mutatott az EV-kben, de a lipoproteinekben nem volt jelen. Továbbá a 2811-3023 cm⁻¹ spektrumtartományban az EV-k nagyobb intenzitást mutattak 2900 cm⁻¹ hullámszám után ("a CH régió fehérje komponense") a lipoproteinek spektrumához képest, ahol a 2900 cm⁻¹ hullámszám előtti régió ("a CH régió lipidkomponense") bizonyult a legjelentősebbnek. Az általunk vizsgált izolátumok Raman spektrumaiban az EV-kre jellemző hullámszámok mutattak nagyobb intenzitást.

A karakterizálási eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az plazmából izolált partikulumok minimum 67,55%-ban sEV-k. A dolgozat további részében a vezikulákat és kisebb mértékben lipoproteineket is tartalmazó izolátumokra az sEV izolátum elnevezést használok.

4.2. A plazmából izolált sEV-k Raman spektruma által a betegcsoportok jobban elkülöníthetők, mint a teljes plazma Raman spektrumának vizsgálatával.

Kutatócsoportunk egy korábbi munkájában kimutatta, hogy a vizsgált betegcsoportok pontosabban elkülöníthetők egymástól az sEV-k proteomikai mintázata alapján, mint a teljes szérum proteomikai vizsgálatával (Dobra és mtsai., 2020).

Jelen kutatásunk kezdetén kis elemszámot felhasználva megvizsgáltuk, hogy a betegcsoportok elkülönítésére a teljes plazma vagy a plazmából izolált sEV-k Raman spektruma az alkalmasabb. Eredményeink alapján a betegcsoportok pontosabban elkülöníthetők egymástól az sEV-k spektrumának vizsgálatával, mint a teljes plazma spektrumának analízisével (4. ábra).



4. ábra: Két betegcsoport elkülönítése PCA ábrán a teljes plazma, illetve a plazmából izolált sEV-k Raman spektrumának vizsgálatával (GBM: glioblastoma multiforme, R: végbél daganat).

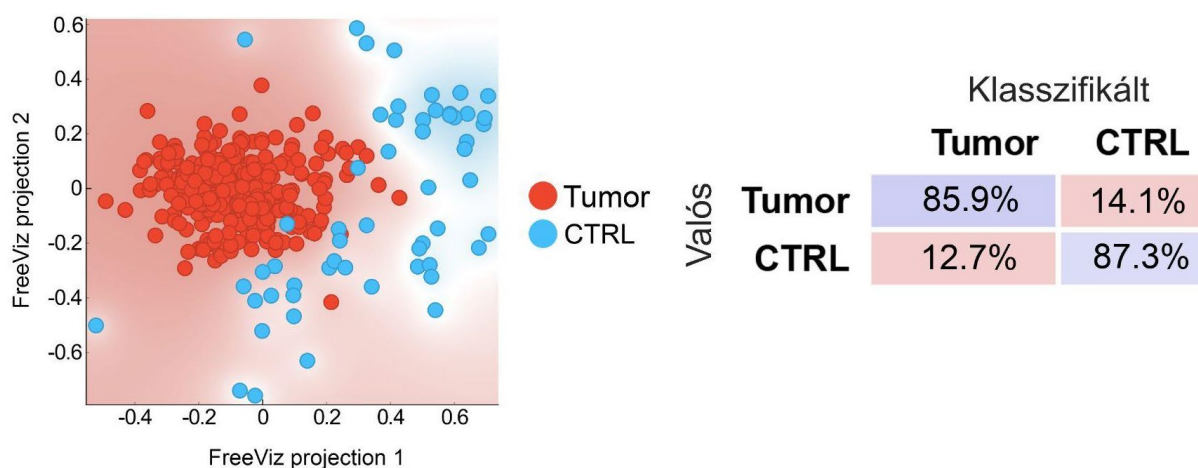
Ennek háttérében az állhat, hogy a teljes vérplazma jelentős százalékát gyakori előfordulású, nagyméretű fehérjék alkotják (albumin, immunglobulinok) (Dobra és mtsai., 2020). Ezáltal a nagy mennyiségben jelen lévő fehérjék ronthatják az analízisek szenzitivitást, ugyanis a mérések során elnyomhatják az alacsonyabb koncentrációban jelen lévő molekulák jeleit.

A vezikulákban azonban ezek a specifikus molekulák feldúsulnak, védettek az enzimatis hasításokkal szemben, ezáltal jobban vizsgálhatóak (Abels & Breakefield, 2016).

4.3. A tumoros betegek mintái jól elkülöníthetők a kontroll mintáktól.

Az előkísérleteink eredményei alapján a továbbiakban a plazmából preparált sEV minták Raman spektrumait vizsgáltuk (1. Függelék). Analíziseink során az atipikus spektrumok kizárása után 382 spektrumot használtunk fel.

Az első analízis során az összes tumoros csoportot együtt vizsgáltuk. Arra kerestük a választ, hogy létezik-e egy univerzális sEV mintázat, amiben a tumoros betegek alapvetően különböznek a kontroll csoporttól. Eredményül azt kaptuk, hogy a két csoport 85,9%-os szenzitivitással és 87,3%-os specificitással különíthető el egymástól (5. ábra). A klasszifikációs hatékonyság 86,6%-nak adódott. A tumoros minták Raman spektrumuk alapján egy halmazba térképeződtek, a kontroll mintáktól jól elkülöníthetőnek bizonyultak.



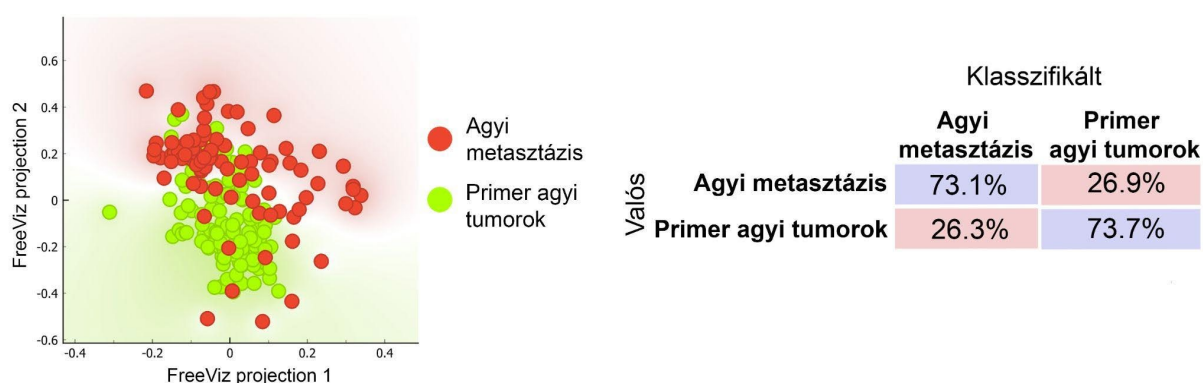
5. ábra: Tumoros és kontroll minták összehasonlítása. A csoportok közötti különbségeket FreeViz ábra (balra) és konfúziós mátrix (jobbra) mutatja be. A konfúziós mátrix a klasszifikáló modell eredményeit foglalja össze; bal felső cellájában a specificitás, jobb alsó cellájában a szenzitivitás olvasható (CTRL: kontroll, Tumor: nem kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa, glioblastoma multiforme, meningeoma, végbél daganat, melanóma).

Egy univerzális tumor marker hatalmas jelentőségű lenne a klinikumban, ugyanis általa lehetőség nyílna a tumoros betegségek egyszerűbb szűrésére, ezáltal a halálos kimenetelű daganatos megbetegedések számának csökkentésére (Duffy, 2015). Jelen adataink alapján az sEV izolátumok Raman spektrumának vizsgálatával közelebb kerülhetünk e cél eléréséhez.

4.4. Az algoritmus különbséget tesz a primer agyi daganat és az agyi metasztázis között.

Az analízis alapján a tumoros betegekből izolált sEV-k karakterisztikus molekuláris mintázattal rendelkeztek, mely alapján elkülönültek a tumoros megbetegedésben nem szenvedő betegektől. A betegcsoportok közül rendelkezésünkre álltak primer agyi (GBM, M) és agyi metasztatikus (BM) minták is. Megvizsgáltuk, hogy az SVM algoritmus segítségével elkülöníthető-e a két csoport egymástól.

Az eredmények alapján a primer agyi és agyi metasztatikus tumorok 73,1%-os szenzitivitással és 73,7%-os specificitással különböztethetők meg, ha a primer agyi tumorokat tekintjük célcsoportnak (6. ábra). A klasszifikációs hatékonyság 73,4 %-nak adódott.



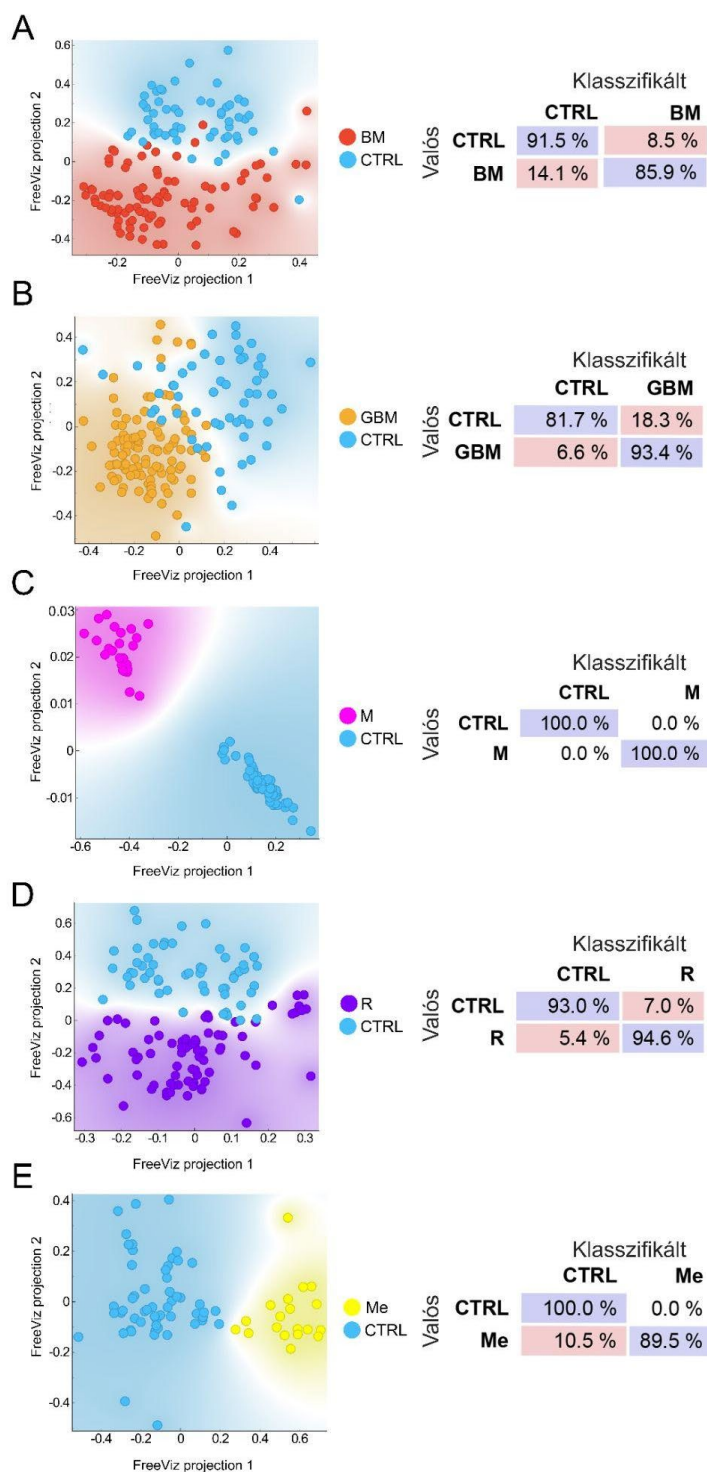
6. ábra: Primer agyi és agyi metasztatikus tumorok összehasonlítása. A csoportok közötti különbségeket FreeViz ábra (balra) és konfúziós mátrix (jobbra) mutatja be. A konfúziós mátrix a klasszifikáló modell eredményeit foglalja össze. Az egyes cellákban látható számértékek a sikeres klasszifikáció százalékos arányát jelzik az adott csoportban.

Egyes tanulmányok kiemelték, hogy a különböző rosszindulatú daganatok (pl: BM és GBM) differenciáldiagnosztikája hagyományos képalkotó diagnosztikai módszerekkel nagy technikai kihívást jelent (Neska-Matuszewska és mtsai., 2018). Eredményeink alapján az sEV-k Raman spektrumának analízise egy hatékony módszerré válhatna a primer agyi tumorok és a metasztatikus agyi tumorok megkülönböztetésére. Azonban eredményeink megerősítéséhez egyértelműen szükséges további primer és metasztatikus agydaganat típusok összehasonlítása.

4.5. Az SVM modellel történő klasszifikáció alapján a vizsgált betegcsoportok magas szenzitivitással és specificitással különböztethetők meg a kontrolltól.

A módszer szenzitívnek bizonyult nem csak a tumoros és nem-tumoros betegek közötti különbségek detektálására, de a primer agyi daganatok és az agyi metasztázis megkülönböztetésére is. Felmerült a kérdés, hogy a betegcsoportok önállóan is rendelkeznek-e a kontrolltól különböző, specifikus molekuláris mintázattal. A kérdés megválaszolására a különböző tumortípusokat egyesével hasonlítottuk össze a kontroll mintákkal. Eredményül azt kaptuk, hogy a BM csoport 91,5% specificitással és 85,9%-os szenzitivitással különböztethető meg a kontrolltól (7.A ábra). A klasszifikációs hatékonyság 88,7%-nak adódott. A GBM-CTRL összehasonlításnál 81,7%-os specificitás és 93,4%-os szenzitivitás értéket kaptunk (7.B ábra). A klasszifikációs hatékonyság ebben az esetben 87,55%-nak mutatkozott. Az SVM modell a meningeomával rendelkező betegcsoportot 100%-os specificitással és 100%-os szenzitivitással el tudta különíteni a kontroll csoporttól, így a klasszifikációs hatékonyság elérte a 100%-ot (7.C ábra).

A nem agyi tumorok közül a végbél daganatos betegeket 93%-os specificitással és 94,6%-os szenzitivitással tudtuk megkülönböztetni a kontroll csoporttól (7.D ábra). A klasszifikációs hatékonyság 93,8% volt. A melanóma és kontroll összehasonlításnál 100%-os specificitás és 89,5%-os szenzitivitás értékeket kaptunk (7.E ábra). A klasszifikációs hatékonyság értéke itt is magas, 95,75% lett.



7. ábra: A különböző tumortípusok összehasonlítása a kontroll mintákkal. A csoportok közötti különbségeket FreeViz ábrák segítségével (balra) és konfúziós mátrixokkal (jobbra) mutatjuk be mind az 5 összehasonlítás esetében. A konfúziós mátrixok a klasszifikáló modell eredményeit foglalja össze; bal felső cellájában a specificitás, jobb alsó cellájában a szenzitivitás olvasható. A) BM és CTRL összehasonlítása. B) GBM és CTRL összehasonlítása. C) M és CTRL összehasonlítása. D) R és CTRL összehasonlítása. E) Me és CTRL összehasonlítása. (BM: nem kisesejtű tüdődaganat agyi metasztatizása, GBM: glioblastoma multiforme, M: meningeoma, R: végbél daganat, Me: melanóma, CTRL: kontroll).

Ezen eredmények alapján az izolátumok Raman spektrumának vizsgálatával az egyedi tumoros betegcsoportok is jól elkülöníthetőnek mutatkoztak a kontroll mintáktól.

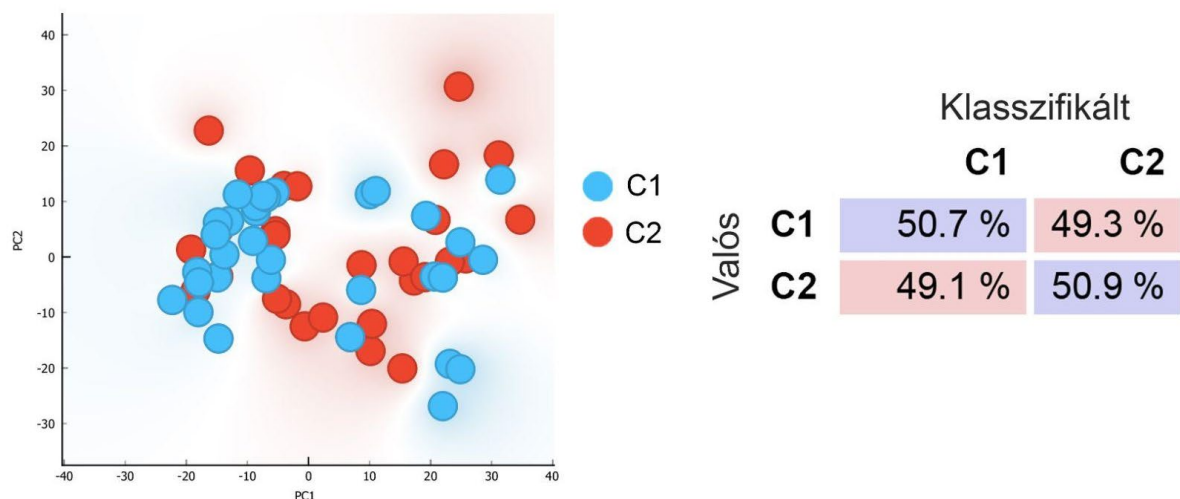
A folyadékbiopszia alapú tumordiagnosztikai kutatások egyik fő célja olyan biomarkerek azonosítása, melyek nagy szenzitivitással és specificitással képesek elkülöníteni a különböző tumor típusokat a kontroll csoporttól. A National Cancer Institute honlapján megtalálhatóak a klinikumban használt tumormarkerek (National Cancer Institute, 2021). Jelenleg a GBM-nak, BM-nak és M-nak nincs a klinikumban használt betegsége specifikus biomarkere. A melanóma (pl.: laktát dehidrogenáz, C-kit/CD117) és a végbél daganat biomarkereit (pl.: CEA, keringő epithel tumorsejtek, DPD és KRAS gének mutációja, UGT1A1*28 homozigóta variánsa) nagyrészt a tumor terápia megválasztására és a terápiára adott válasz monitorozására használják.

A klinikumban használt tumor markerek között nagyobb számmal vannak jelen prognosztikai markerek. Ezen okból nagy szükség van új, magas szenzitivitással és specificitással jellemezhető diagnosztikai markerekre. Eredményeink alapján a plazmából izolált sEV-k komplex molekuláris mintázatának Raman spektroszkópiai vizsgálata alkalmas lehetne erre a célra.

4.6. A klasszifikáló modell által talált különbség nem az algoritmus túltanulásának eredménye.

Negatív kontrollként megvizsgáltuk, hogy az SVM algoritmus a kontroll csoport Raman spektrumai között tesz-e különbséget. Ennek érdekében a kontroll csoportba tartozó spektrumokat véletlenszerű mintavételezéssel két külön csoportba osztottuk (C1 és C2 csoport), majd SVM algoritmussal vizsgáltuk.

Ahogy az ábrán is látható (8. ábra), a modell nem különítette el a kontroll minták spektrumait. Ennek alapján elmondható, hogy a különböző csoportok között azonosított különbség valós és nem az algoritmus túltanulásából adódik.



8. ábra: A kontroll csoporton belüli különbségeket FreeViz ábra (balra) és konfúziós mátrix (jobbra) mutatja be. A konfúziós mátrix a klasszifikáló modell eredményeit foglalja össze; bal felső cellájában a specificitás, jobb alsó cellájában a szenzitivitás olvasható (C1: kontroll csoport egyik fele, C2: kontroll csoport másik fele).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az onkológiai kutatások egyik fő iránya olyan módszerek fejlesztése, melyek lehetővé teszik a tumorok korai diagnosztizálását. A hagyományos tumordiagnosztikai módszerek alternatívájaként előtérbe került a nem-invazív, folyadékbiopszia alapú diagnosztikai módszerek kutatása. Folyadékbiopszia során legtöbbször a vérből vesznek mintát, melyben a tumorszövet eredetű különböző fehérjék, nukleinsavak, tumorsejtek és extracelluláris vezikulák keringenek. Az sEV-k legfontosabb feladata a sejt-sejt közötti kommunikáció megvalósítása, melyet horizontális lipid, fehérje és RNS transzfer által érnek el. A legtöbb biomarker kutatás fókuszában az adott betegségre specifikus egy-két nukleinsav vagy fehérje molekula áll. Azonban egy-két molekula nem bizonyult elég specifikusnak és szenzitívnek ahhoz, hogy önmagában diagnosztikai marker lehessen. Az sEV-k komplex molekuláris tartalma tükrözi az azt kibocsátó sejt állapotát és mikrokörnyezetét. Ezáltal a vezikulák analízisével lehetőség nyílt tumor specifikus molekuláris mintázatok vizsgálatára, mely megoldás lehet a biomarker kutatásban felmerülő problémák megoldására. A vezikulák molekuláris összetétele jól vizsgálható Raman spektroszkópiával, mely a vezikula kutatások területén egy kevésbé ismert spektroszkópiai módszer.

Kutatásunk során megvizsgáltuk, hogy az sEV izolátumok Raman spektruma alapján el tudjuk-e különíteni a vizsgált betegcsoportokat egymástól. Munkánk során 85 plazma mintát vizsgáltunk meg, hat betegcsoportból: nem kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa, glioblastoma multiforme, meningeoma, végbél daganat, melanóma és lumbális porckorongsér, mint tumormentes kontroll. Az sEV-ket differenciál szűréssel és ultracentrifugálással izoláltuk, majd Western blot, áramlási citometria és NanoSight módszerekkel karakterizáltuk. Az izolátumok Raman spektrumának analíziséhez SVM módszert használtunk.

A karakterizálás során megállapítottuk, hogy az izolátumok tisztasága megfelelő, átlagosan 67,55%-os, az sEV-k mellett más, azonos méretű partikulumokat (például fehérjeaggregátumokat, lipoproteineket) is tartalmaztak. Az izolátumok Raman spektrumának analízisével a vizsgált betegcsoportok jól elkülöníthetőnek bizonyultak. Az EV-kre jellemző Raman spektrum hullámszámai (1004 cm^{-1} , $2900\text{--}3023\text{ cm}^{-1}$) a mintáinkban nagyobb intenzitást mutattak a lipoproteinek hullámszámaihoz képest ($2811\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$).

Az SVM modellel való klasszifikáció alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált betegcsoportok 85-100%-os szenzitivitással és 81-100%-os specificitással különböztethetőek meg. A klasszifikáció átlagos hatékonysága 92,96% volt. A kontroll csoport elválaszthatónak bizonyult az összes tumortípustól összevonva, illetve a daganatos csoportokat külön-külön kezelve is. A klasszifikációs modell segítségével a primer agyi és az agyi metasztatikus tumorok között is különbséget tudtunk tenni. Eredményeink alapján, a vérplazmából nyert sEV izolátumok Raman spektroszkópiai elemzése ígéretes módszer lehet a különböző daganatos betegségek diagnosztizálására.

További terveink között szerepel az adatbázis bővítése új mintákkal. Ezenkívül szeretnénk megvizsgálni, hogy az sEV-k Raman spektrumának analízise alkalmas módszer-e a betegség lefolyásának nyomon követésére. A kutatásunk fő célja, az itt leírt módszer továbbfejlesztése klinikai tumordiagnosztikai alkalmazásra. Továbbá szeretnénk azt is megvizsgálni, hogy a betegségre specifikus molekuláris mintázatokat szállító sEV-k hogyan hatnak a mind a sejtes mind a humorális immunválaszban meghatározó szerepet játszó B sejtekre. Az itt leírt kutatásunkban felhasznált betegcsoportokból izolált vezikulákkal szeretnénk kezelni B sejteket. Kíváncsiak vagyunk arra, hogy az eltérő tumortípusok vezikuláit a B sejtek milyen módon veszik fel és ezáltal hogyan befolyásolhatják a B sejtek működését.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Gyukity-Sebestyén Edinának a szakmai segítséget és hogy bármilyen kérdéssel bizalommal fordulhattam hozzá.

Köszönettel tartozom Dr. Buzás Krisztinának, hogy csoportjában lehetőséget biztosított számomra a TDK dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönöm Bukva Mátyásnak, hogy megtanította az adatok elemzéséhez használt módszereket.

Köszönet illeti Böröczky Tímeát, Dobra Gabriellát, Harmati Máriát és Pintér Lillát szakmai és technikai segítségükért.

Szeretném megköszönni a kutatásban résztvevő klinikusoknak, hogy vizsgálatainkhoz mintákat biztosítottak. Illetve köszönöm Yasmin Ranjous-nak a Raman spektroszkópiás mérések során nyújtott segítséget.

Nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és Schütz Oszkárnak a sok segítséget és támogatást, melyek hozzájárultak a dolgozatom elkészültéhez.

A kutatást az alábbi pályázatokból finanszíroztuk:

SZTE Szent-Györgyi Albert Kutatási Alap (2021), TKP2021-EGA09, OTKA-K143255, ÚNKP-22-2 Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap, Új Nemzeti Kiválósági Program

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Aldape, K., Brindle, K. M., Chesler, L., Chopra, R., Gajjar, A., Gilbert, M. R., Gottardo, N., Gutmann, D. H., Hargrave, D., Holland, E. C., Jones, D. T. W., Joyce, J. A., Kearns, P., Kieran, M. W., Mellinghoff, I. K., Merchant, M., Pfister, S. M., Pollard, S. M., Ramaswamy, V., ... Gilbertson, R. J. (2019). Challenges to curing primary brain tumours. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(8), 509–520. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0177-5>
- Barnholtz-Sloan, J. S., Ostrom, Q. T., & Cote, D. (2018). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*, 36(3), 395–419. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.04.001>
- Bukva, M., Dobra, G., Gomez-Perez, J., Koos, K., Harmati, M., Gyukity-Sebestyen, E., Biro, T., Jenei, A., Kormondi, S., Horvath, P., Konya, Z., Klekner, A., & Buzas, K. (2021). Raman Spectral Signatures of Serum-Derived Extracellular Vesicle-Enriched Isolates May Support the Diagnosis of CNS Tumors. *Cancers*, 13(6), 1407. <https://doi.org/10.3390/cancers13061407>
- Bumrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>
- Dobra, G., Bukva, M., Szabo, Z., Bruszel, B., Harmati, M., Gyukity-Sebestyen, E., Jenei, A., Szucs, M., Horvath, P., Biro, T., Klekner, A., & Buzas, K. (2020). Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of

- CNS Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5359.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155359>
- Duffy, M. J. (2001). Clinical Uses of Tumor Markers: A Critical Review. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(3), 225–262.
<https://doi.org/10.1080/20014091084218>
- Duffy, M. J. (2015). Use of Biomarkers in Screening for Cancer. In R. Scatena (Szerk.), *Advances in Cancer Biomarkers* (Köt. 867, o. 27–39). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_3
- Enciso-Martinez, A., Van Der Pol, E., Hau, C. M., Nieuwland, R., Van Leeuwen, T. G., Terstappen, L. W. M. M., & Otto, C. (2020). Label-free identification and chemical characterisation of single extracellular vesicles and lipoproteins by synchronous Rayleigh and Raman scattering. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1730134.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1730134>
- Figuerola, J. M., & Carter, B. S. (2018). Detection of glioblastoma in biofluids. *Journal of Neurosurgery*, 129(2), 334–340. <https://doi.org/10.3171/2017.3.JNS162280>
- Garden, G. A., & Campbell, B. M. (2016). Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia*, 64(10), 1755–1771. <https://doi.org/10.1002/glia.22998>
- Gualerzi, A., Niada, S., Giannasi, C., Picciolini, S., Morasso, C., Vanna, R., Rossella, V., Masserini, M., Bedoni, M., Ciceri, F., Bernardo, M. E., Brini, A. T., & Gramatica, F. (2017). Raman spectroscopy uncovers biochemical tissue-related features of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells. *Scientific Reports*, 7(1), 9820.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10448-1>
- Gyukity-Sebestyén, E., Harmati, M., Dobra, G., Németh, I. B., Mihály, J., Zvara, Á., Hunyadi-Gulyás, É., Katona, R., Nagy, I., Horváth, P., Bálint, Á., Szkalitsity, Á., Kovács, M., Pankotai, T., Borsos, B., Erdélyi, M., Szegletes, Z., Veréb, Z. J., Buzás,

- E. I., ... Buzás, K. (2019). Melanoma-Derived Exosomes Induce PD-1 Overexpression and Tumor Progression via Mesenchymal Stem Cell Oncogenic Reprogramming. *Frontiers in Immunology*, 10, 2459. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02459>
- Harmati, M., Bukva, M., Böröczky, T., Buzás, K., & Gyukity-Sebestyén, E. (2021). The role of the metabolite cargo of extracellular vesicles in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 40(4), 1203–1221. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-10014-2>
- Harmati, M., Gyukity-Sebestyén, E., Dobra, G., Janovak, L., Dekany, I., Saydam, O., Hunyadi-Gulyas, E., Nagy, I., Farkas, A., Pankotai, T., Ujfaludi, Z., Horvath, P., Piccinini, F., Kovacs, M., Biro, T., & Buzas, K. (2019). Small extracellular vesicles convey the stress-induced adaptive responses of melanoma cells. *Scientific Reports*, 9(1), 15329. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51778-6>
- Harris, A. T., Lungari, A., Needham, C. J., Smith, S. L., Lones, M. A., Fisher, S. E., Yang, X. B., Cooper, N., Kirkham, J., Smith, D. A., Martin-Hirsch, D. P., & High, A. S. (2009). Potential for Raman spectroscopy to provide cancer screening using a peripheral blood sample. *Head & Neck Oncology*, 1(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-1-34>
- Herholz, K., Langen, K.-J., Schiepers, C., & Mountz, J. M. (2012). Brain Tumors. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42(6), 356–370. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2012.06.001>
- Jan, A. T., Rahman, S., Badierah, R., Lee, E. J., Mattar, E. H., Redwan, E. M., & Choi, I. (2021). Expedition into Exosome Biology: A Perspective of Progress from Discovery to Therapeutic Development. *Cancers*, 13(5), 1157. <https://doi.org/10.3390/cancers13051157>

- Li, J., Li, Y., Li, P., Zhang, Y., Du, L., Wang, Y., Zhang, C., & Wang, C. (2022). Exosome detection via surface-enhanced Raman spectroscopy for cancer diagnosis. *Acta Biomaterialia*, 144, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.036>
- Linhares, P., Carvalho, B., Vaz, R., & Costa, B. M. (2020). Glioblastoma: Is There Any Blood Biomarker with True Clinical Relevance? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5809. <https://doi.org/10.3390/ijms21165809>
- Marrugo-Ramírez, Mir, M., & Samitier, J. (2018). Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2877. <https://doi.org/10.3390/ijms19102877>
- Merdalimova, A., Chernyshev, V., Nozdriukhin, D., Rudakovskaya, P., Gorin, D., & Yashchenok, A. (2019). Identification and Analysis of Exosomes by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Applied Sciences*, 9(6), 1135. <https://doi.org/10.3390/app9061135>
- National Cancer Institute. (2021). *Tumor Markers in Common Use*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-list?fbclid=IwAR3zzweQPiyuyvsUpdMn2kkVkj2ME1JpOnsWlPzs-hXesRcgdk0eMsEmgw>
- Neska-Matuszewska, M., Bladowska, J., Sasiadek, M., & Zimny, A. (2018). Differentiation of glioblastoma multiforme, metastases and primary central nervous system lymphomas using multiparametric perfusion and diffusion MR imaging of a tumor core and a peritumoral zone—Searching for a practical approach. *PLOS ONE*, 13(1), e0191341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191341>
- Palacín-Aliana, I., García-Romero, N., Asensi-Puig, A., Carrión-Navarro, J., González-Rumayor, V., & Ayuso-Sacido, Á. (2021). Clinical Utility of Liquid Biopsy-Based

- Actionable Mutations Detected via ddPCR. *Biomedicines*, 9(8), 906.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9080906>
- Peca, C., Pacelli, R., Elefante, A., Del Basso De Caro, M. L., Vergara, P., Mariniello, G., Giamundo, A., & Maiuri, F. (2009). Early clinical and neuroradiological worsening after radiotherapy and concomitant temozolomide in patients with glioblastoma: Tumour progression or radionecrosis? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 111(4), 331–334. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2008.11.003>
- Pence, I., & Mahadevan-Jansen, A. (2016). Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 45(7), 1958–1979.
<https://doi.org/10.1039/C5CS00581G>
- Rincón-Riveros, A., Lopez, L., Villegas, E. V., & Antonia Rodriguez, J. (2021). Regulation of Antitumor Immune Responses by Exosomes Derived from Tumor and Immune Cells. *Cancers*, 13(4), 847. <https://doi.org/10.3390/cancers13040847>
- Saint-Pol, J., Gosselet, F., Duban-Deweir, S., Pottiez, G., & Karamanos, Y. (2020). Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells*, 9(4), 851.
<https://doi.org/10.3390/cells9040851>
- Tang, J.-W., Liu, Q.-H., Yin, X.-C., Pan, Y.-C., Wen, P.-B., Liu, X., Kang, X.-X., Gu, B., Zhu, Z.-B., & Wang, L. (2021). Comparative Analysis of Machine Learning Algorithms on Surface Enhanced Raman Spectra of Clinical Staphylococcus Species. *Frontiers in Microbiology*, 12, 696921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696921>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International

Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750.

<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

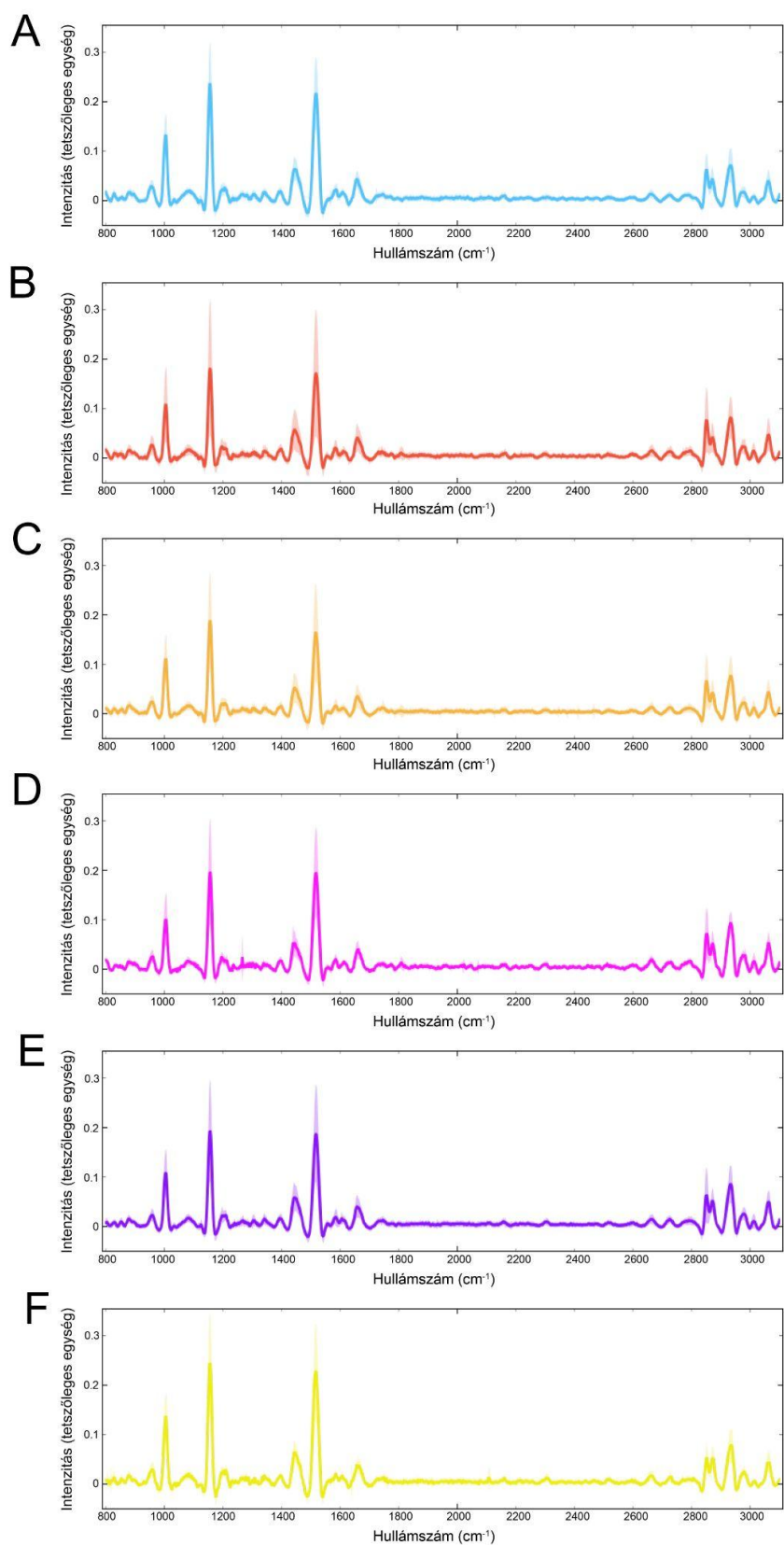
Uddin, S., Khan, A., Hossain, M. E., & Moni, M. A. (2019). Comparing different supervised machine learning algorithms for disease prediction. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 19(1), 281. <https://doi.org/10.1186/s12911-019-1004-8>

Wernerné Sódar, B. (2018). Az extracelluláris vezikulák analízisét és izolálását befolyásoló lipoproteinek vizsgálata. *Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola*.

Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904–5912. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

8. FÜGGELÉK



1. függelék: A betegcsoportok Raman spektrumainak átlaga. A) kontroll B) nem-kissejtes tüdődaganat agyi metasztázisa C) glioblastoma multiforme D) meningeoma E) végbél daganat F) melanóma (A hibasáv az átlag körüli szórást jelöli minden esetben.)