

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3167.

BENKE MÁRTON MILÁN

**Viscéláris megbetegedések intervenciós, sebészeti és a hasüregi szervek
transzplantációja
című program**

Programvezető: Dr. Szijártó Attila, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szücs Ákos, egyetemi docens

A hasnyálmirigy daganatok korai diagnosztikájának új lehetőségei

Doktori értekezés

Dr. Benke Márton Milán

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Operatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: dr. Szücs Ákos PhD, med. habil., egyetemi docens
Hivatalos bírálók: Dr. Budai András Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Bursics Attila Ph.D., osztályvezető főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. István Gábor Ph.D., med. habil, egyetemi docens
Tagok: dr. Keszthelyi Attila Ph.D., egyetemi docens
dr. Dede Kristóf Ph.D., főorvos

Budapest
2025

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	8
1.1 Pancreas Ductalis Adenocarcinoma	8
1.1.1 Jelentősége	8
1.1.2 Patológia.....	8
1.1.3 Kezelése	9
1.2 Pancreas cisztózus neopláziák.....	11
1.2.1 Jelentőségük	11
1.2.2 Epidemiológia	12
1.2.3 Patológia.....	13
1.2.4 Kezelése	14
1.3 Diagnosztika.....	15
1.3.1 Képalkotó eljárások.....	15
1.3.2 Endoscopia	17
1.3.3 CA 19-9	19
1.3.4 Extracelluláris vezikulák	20
2. CÉLKITŰZÉSEK	22
2.1 CA 19-9 vizsgálata	22
2.2 Humán pancreas nedv vizsgálata	22
2.3 Pancreas cisztózus neopláziák vizsgálata.....	22
3. MÓDSZEREK	23
3.1 A preoperatív serum CA 19-9 szint és a PDAC operabilitása összefüggésének vizsgálata metaanalízis segítségével	23
3.1.1 Regisztráció.....	23
3.1.2 Keresés és alkalmazhatóság	23
3.1.3 Beválogatás és alkalmazhatóság	23
3.1.4 Releváns adatok összegyűjtése a beválogatott publikációkból	24
3.1.5 Az elfogultság kockázatának értékelése.....	25
3.1.6 Statisztikai elemzés	25
3.2 Extracelluláris vezikulák azonosítása és karakterizálása humán pancreas nedvből....	27
3.2.1 Betegek és mintagyűjtés.....	27
3.2.2 Sejtvonalak	28
3.2.3 EV izolálás	28

3.2.4	TRPS (Tunable resistive pulse sensing - állítható ellenálláson alapuló pulzusérzékelés) mérések	29
3.2.5	Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM).....	30
3.2.6	Extracelluláris vezikulák áramlási citometriával történő vizsgálata	30
3.2.7	Az EV készítmények fehérje és lipid meghatározása.....	33
3.2.8	Statisztikai elemzés	33
3.3	Pancreas cisztafolyadékból izolált extracelluláris vezikula mikro-RNS tartalom alapján különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók a hasnyálmirigy cisztás elváltozásokkal rendelkező betegek.....	33
3.3.1	Betegek.....	33
3.3.2	Humán hasnyálmirigy cisztafolyadék minták	34
3.3.3	NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)	38
3.3.4	EV-k detektálása antitestbevonatú mikrogyöngyökkel és áramlási citometriával	39
3.3.5	Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM).....	39
3.3.6	MiRNS analízis	39
3.3.7	Statisztikai elemzés	41
4.	EREDMÉNYEK	42
4.1	A preoperatív szérum CA 19-9 szint és a PDAC reszekabilitása összefüggésének vizsgálata.....	42
4.1.1	Keresési eredmények.....	42
4.1.2	A preoperatív szérum CA 19-9 szint a sebészi reszekabilitás előrejelzésében....	43
4.1.3	Az Elfogultsági Kockázat vizsgálatának eredménye	45
4.2	Extracelluláris vezikulák azonosítása és proteomikus karakterizálás humán pancreas nedvből.....	46
4.2.1	A humán pancreas nedv minták tartalmaznak extracelluláris vezikulákat	46
4.2.2	Az extracelluláris vezikulák vizsgálata tömegspektrometria módszerrel.....	49
4.2.3	Potenciális markerként használható extracelluláris vezikulák detektálása áramlási citometria módszerrel.....	55
4.3	Pancreas cisztafolyadékból izolált extracelluláris vezikula mikro-RNS tartalom alapján különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók a hasnyálmirigy cisztás elváltozásokkal rendelkező betegek.....	57
4.3.1	A pszeudociszta és PCN cisztafolyadék CD63+ extracelluláris vezikulákat tartalmaz	57
4.3.2	A miR-200b nagyon mennyiségben van jelen M-PCN cisztafolyadékból származó EV-ben mint a non-M-PCN mintákban.....	59
4.3.3	Nincsen összefüggés az EV-k száma, a diagnózis, vagy a PCN típusa között....	65

4.3.4	Az EV-k miR-200b tartalmának szintje elkülöníti egymástól a M-PCN és a non-M-PCN eredetű pancreas cisztákat a megerősítő kohorszban (validation cohort).....	66
4.3.5	A pancreas cisztákból nyert folyadék teljes miR-200b tartalma potenciálisan alkalmas lehet M-PCN-ek és non-M-PCN elkülönítésére.....	71
4.3.6	A miR-200b szintje a legközelebbi összefüggést az EUS eredményekkel mutatja	74
5.	MEGBESZÉLÉS.....	76
5.1.	Preoperatív szérum CA 19-9 szint és PDAC operabilitása közötti összefüggésvizsgálata metaanalízis segítségével	76
5.2.	Extracelluláris vezikulák azonosítása és proteomikus karakterizálás humán pancreas nedvből.....	80
5.3.	MiR-200b szint segítségével a PCN-ben szenvedő betegek különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók	85
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	92
6.1.	A preoperatív szérum CA 19-9 szint és a PDAC sebészi reszekabilitásának összefüggésének vizsgálata eredményei alapján levont következtetések.....	92
6.2.	Az intraoperatív nyert pancreasnedvből és vérből izolált extracelluláris vezikula markerek vizsgálata során nyert eredmények alapján levont következtetések.....	92
6.3.	Az endoscopos ultrahang vizsgálattal nyert cisztafolyadékból izolált EV tartalom elemzésének eredményei alapján levont következtetések.....	93
7.	ÖSSZEFOGLALÁS, SUMMARY	94
7.1	Összefoglalás.....	94
7.2	Summary	95
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	96
9.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	112
9.1.	Az értekezés témájában megjelent közlemények.....	112
9.2.	Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények	113
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	117

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A-AC	Ampulláris-Adenocarcinoma- Vater papilla adenocarcinoma
Ab/AM	Antibiotikus/Antimikrobiális adalékok
AGA	American Gastroenterological Association
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALP	Alkaline Phosphatase- alkalikus foszfatáz
ATM	Ataxia Telangiectasia Szindróma
AUC	Area Under Curve- görbe alatti terület
BRPC	Borderline Resectable Pancreatic Cancer- Borderline reszekálabilis pancreas tumor
CA 19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Carcino Embryonális Antigén
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CI	Confidence Interval- konfidencia intervallum
cNET	Cisztás Neuroendokrin Tumor
CP	Krónikus Pancreatitis
CT	Computed Tomography- komputertomográfia
Ct	Cycle threshold- ciklusküszöb
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
ERCP	Endoscopic Cholangiopancreatography- Endoszkópos Kolangiopancreatográfia
ETT- TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága
EUS	Endoscopic UltraSound- Endoszkópos ultrahang
EV	Extracelluláris Vezikulák
FAP	Familiáris Adenomatózus Polipózis
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluoreszcein-Izotiocianát

FN	False Negative- álnegatív
FNA	Fine Needle Aspiration - vékonytű aspirációs (mintavétel)
FNB	Fine Needle Biopsy – vastagtű biopszia, szövetmitnavétel
FOLFIRINOX	Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan és Leucovorin kombinációját használó kemoterápiás kezelés
FP	False Positive- Álpozitív
GEA	Gasztroentero-anasztomosis
GIST	Gasztrointestinális Stromális Tumor
HGD	High Grade Dysplasia- magas fokú diszplázia
IAP	International Association of Pancreatology
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPMN	Intraductalis Papillaris Mucinosus Neoplázia
ITPN	Intraduktális Tubulo-Papilláris Neoplázia
LAPC	Locally Advanced Pancreatic Cancer- Lokálisan előrehaladott pancreas tumor
LDH	Laktát Dehidrogenáz
LGD	Low Grade Dysplasia- Alacsony fokú diszplázia
MCN	Mucinózus Cisztózus Neoplázia
miRNS	micro-Ribonukleinsav
M-PCN	Mucinózus (besorolású) Pancreas Cisztózus Neoplázia
MR	Mágneses Rezonancia (képalkotás)
MRCP	Magnetic Resonance Cholangiopancreatography- Mágneses Rezonancia kolangiopancreatográfia
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NET	Neuroendokrin Tumor
NPV	Negative Predictive Value- negatív prediktív érték
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis- nanorészecske nyomkövető analízis
OR	Odds Ratio
PanIN	Pancreas Intraepitheliális Neoplázia
PBS	Phosphate Buffer Saline- foszfáttal puffertolt sóoldat
PCN	Pancreas Cisztózus Neoplázia

PDAC	Pancreas Ductalis Adenocarcinoma
PDNET	Poorly Differentiated Neuroendocrine Tumor- rosszul differenciált neuroendokrin tumor
PET-CT	Positron Emission Tomography–Computed Tomography - pozitronemissziós tomográfia- komputertomográfia
PFA	Paraformaldehid
PPPD	Pylorus Preserving PancreaticoDuodenectomy- pilórusmegtartásos pancreatoduodenectomia
PPV	Positive Predictive Value- pozitív prediktív érték
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
PROBAST	PredictionModel Risk of BiasAssessment Tool
PROSPERO	Prospective Register of Systematic Reviews
RNS	Ribonukleinsav
ROB	Risk Of Bias- elfogultsági kockázat
ROC	Receiver Operating Characteristics (curve)- hatásfokmérő karakterisztika görbe
SCN	Szerózus Cisztózus Neoplázia
S-PCN	Szerózus (besorolású) Pancreas Cisztózus Neoplázia
SPN	Szolid Pszudopapilláris Neoplázia
SROC	Summary Receiver Operating Characteristics- szummációs hatásfokmérő karakterisztika görbe
TEM	Transzmissziós ElektronMikroszkópia
TN	True Negative- valós negatív
TP	True Positive- valós pozitív
TRPS	Tuneable Resistive Pulse Sensing
vHL	von Hippel-Lindau
WDNET	Well Differentiated Neuroendokrin Tumor- jól differenciált neuroendokrin tumor
WHO	World Health Organisation
WMD	Weighed Mean Difference- súlyozott átlagos eltérés

1. BEVEZETÉS

1.1 Pancreas Ductalis Adenocarcinoma

1.1.1 Jelentősége

A pancreas ductalis adenocarcinoma (PDAC) az összes hasnyálmirigy daganat 90%-át teszi ki és ez rendelkezik a legrosszabb prognózissal (4). Minden erőfeszítés ellenére napjainkban is 10% alatti az 5 éves túlélési arány (5). Az egyetlen kuratív opció a műtéti reszekció. Sajnos még a nagy betegszámmal dolgozó centrumokban is a betegek kevesebb, mint 20%-ának van reszekálabilis primer betegsége a diagnózis idejében. A kezdetben operábilisnak gondolt betegek több mint 20%-ánál a műtéti exploráció során derül ki távoli metasztázis megléte, vagy a betegség lokális előrehaladottsága (6).

A prognózis továbbra is rendkívül rossz, annak ellenére, hogy egyre szélesebb körű ismeretekkel rendelkezünk a PDAC-ról és már jó ideje léteznek hasnyálmirigy betegségekre specializálódott centrumok, és egyre újabb és jobb diagnosztikai, kezelési módszereket dolgoznak ki (7).

1.1.2 Patológia

A PDAC epithelialis eredetű tumor, amely az exocrin pancreas mirigy kivezető csöveinek hámsejtjeiből alakul ki. (8). Jelen tudásunk szerint a PDAC kialakulásához hosszú időre van szükség, amely alatt az ép ductus hám fokozatosan átalakul át pre-cancerózus állapotúvá, amit pancreatikus intraepithelialis neoplasiának hívunk (PanIN), amely kezeletlenül PDAC-á alakul idővel (8). Genetikai szinten a PDAC jól karakterizált tumorfajta, ennek ellenére nem teljesen tisztázottak a tumor agresszív természetének molekuláris okai. Jelen pillanatban az az elgondolás, hogy a PanIN agresszív tumorrá alakulása összefügg az onkogének és tumor supresszor gének mutációival (9). A tumor egyre agresszívebb viselkedését a mutációk fokozatos felhalmozódásával magyarázzák. (9). A K-ras onkogén mutációja az egyik legkorábbi és leggyakoribb mutáció, jelen van az esetek 90%-ban. A Her-2/neu onkogén aktivációja és a p16, p13, SMAD4 tumor szupresszor gének funkcióvesztéses mutációja szintén gyakori eltérés. Fokozódó genetikai variabilitást mutatnak az előrehaladott PanIn léziók, egyre gyorsabban proliferálnak és végül képessé válnak metasztázis kialakítására (10). A PDAC pathofiziológiája bonyolult, többlépcsős genetikai eltérésekkel jellemezhető. A rákmegelőző állapotban a PanIN-ok halmozódó genetikai károsodásokat szenvednek,

amelyek onkogének beindításáért és a PDAC kezdeményezéséért és fenntartásáért felelnek, ideértve a KRAS, CDKN2A, TP53 és SMAD4 géneket (11). A KRAS variánsok a PDAC kialakulásának korai szakaszában (alacsony fokú PanIN-ok) jelentkeznek és a PDAC-vel diagnosztizált egyének 90-92%-ában megtalálhatóak. Ahogy a PanIN-1A, majd PanIN-1B PanIn-2 majd PanIN-3-á alakul, további alterációk jelennek meg a CDKN2A, TP53 és/vagy SMAD4 génekben (11). Ezen genomikus változások összessége hozzájárul a tumor szupresszor mechanizmusok sokoldalú hibáihoz, amelyek diszregulált növekedési markereket és gyulladást eredményeznek. Ezek kulcsfontosságúak a PDAC esetében. Továbbá, a PDAC-k 10-15%-a génszerkezeti genomikus eltérésekkel kapcsolatos SWI/SNF kromatin átrendező gén variációkat szerez átalakulása során (12). A PDAC molekuláris patológiai és osztályozási terén történt legújabb fejlesztések hatással voltak a klinikai gyakorlatra (13). Egy példa erre a PDAC "bazális jellegű" és "klasszikus" típusra való felosztása az RNS transzkripció analízisek alapján (14). A PDAC klasszikus altípusát magasabb differenciációs szint, fibrózis és gyulladás jellemezi, míg a bazális jellegű altípus rosszabb klinikai kimenetelhez és differenciációvesztéshez társul. Az egész genom szerkezetelemzés betekintést nyújtott a genom instabilitásába és annak kapcsolatába a DNS-karbantartó génekkel (BRCA1/2 és PALB2). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a platina alapú terápia és a poli (ADP-riboz) polimeráz inhibitorok hatékonyak lehetnek azoknál a betegeknél, akiknél BRCA1/2 és PALB2 patogén variánsok fordulnak elő (12). 2010 óta tudjuk, hogy legalább egy évtized telik el a driver mutáció kialakulása és az első, még nem metasztatikus tumorsejt kialakulása között. Ezek alapján egy széles időablak áll rendelkezésünkre a tumor korai stádiumában való kimutatására (15). Éppen ezért lenne hasznos egy hatékony korai biomarker.

1.1.3 Kezelése

A pancreas daganattal kezelt betegek esetében a terápia gold-standardja a tumor sebészi eltávolítása, és egyben ez az egyetlen módszer, amely esélyt adhat a beteg gyógyulására (16). Mindenfajta ismert kemo- és radioterápia adjuváns, neoadjuváns vagy palliatív, vagy kiegészítő célt szolgál, gyógyításra önmagában nem alkalmas. Jelenlegi tudásunk szerint az egyetlen módja a pancreas tumorokhoz köthető halálozás csökkentésének egy

korai diagnosztikai eljárás lenne (17). Más kuratív terápiás lehetőség nincsen. Sajnos a hasnyálmirigy daganatos betegeknél a nagy centrumokban is csak 10-20%-ban reszekálabilis a tumor. Pancreas tumor esetén nincsen értelme a palliatív reszekciónak. Abban az esetben, ha nincsen lehetőség a tumor radikális eltávolítására, a műtét nem növeli a betegek túlélését (8). Pancreasfej tumor esetén a Whipple-műtét (pancreato-duodenectomy), vagy annak valamilyen módosítása az egyetlen műtéti lehetőség (18). Az eredeti Whipple-műtét során eltávolításra kerül a pancreasfej, a duodenum, az epehólyag, a distalis epeút és a gyomor antrális része is. Ma már a pylorus-megtartásos reszekció hasonlóan elfogadott a gyakorlatban (pylorus preserving pancreaticoduodenectomy, vagy PPPD), ahol az antrum megmarad, a duodenum átvágása pedig a pylorus alatt 2cm-el történik-, meghagyva a sphincter funkcióját (19). A pancreastest és -farok daganatainál – azokban a ritka esetekben, mikor felfedezésükkor resecabilisak – distális pancreas reszekció és splenectomy hajtható végre az a. és v. lienalis eltávolításával együtt (20). Az in situ Vater-papilla tumorok esetében is PPPD a megfelelő műtéti eljárás. Annak ellenére, hogy szóba jön a lokális kimetszés (ampullectomia), a recidíva arány ezeknek a betegeknél az esetében nagyon magas. Ezért csak onkológiai kompromisszummal javasolt, ha a PPPD a beteg általános állapota, teherbíró képessége vagy kísérőbetegségei miatt kontraindikált (21). A műtéti terv nagymértékben függ a daganat elhelyezkedésétől és kapcsolatától az epeutakkal és a vascularis képletekkel. Általában a hasnyálmirigy fejében és a processus uncinatus lévő daganatok esetén indikált a hasnyálmirigyfej reszekciója, míg a testben és a farokban elhelyezkedő daganatok esetén a distális pancreas reszekció az optimális megoldás. Az érinvázió esetén érreszekció és rekonstrukció is szükséges lehet. Rosszindulatú daganatos betegség miatt történő pancreas műtétek során végzett vénás reszekció széles körben elfogadott és alkalmazott technika. A vénás reszekcióval végzett műtétek morbiditási és túlélési adatai hasonlóak a vénás reszekció nélküli pancreato-duodenectomy adataival (22). Az artériás reszekciók aránya is megnövekedett, a PDAC-s betegek műtétei során, azonban szigorúan véve az irodalmi adatok alapján nincsen jelentős előnye. Figyelembe véve a magasabb morbiditási és mortalitási rátát, valamint hasonló túlélést a standard pancreatectomiához képest, az artériás reszekciót csak kiemelten kiválasztott betegeknél, lehetőség szerint regrediáló, vagy onkológiailag stabil betegség esetén szabad elvégezni. (23). A hasnyálmirigyfej reszekciója esetén magas a morbiditás, a leggyakoribb

korai szövődmény a késleltetett gyomorürülés (10%) és a hasnyálmirigynedv-fistula (13%) (24). A legjobb eredményeket azok a sebészek érik el, akik évente több mint 20 hasnyálmirigyfejtés-reszekciót végeznek és nagy esetszámot operáló centrumban dolgoznak (25). A PDAC miatt indikált reszekciós műtétet csak akkor szabad elvégezni, ha ez kivitelezhető ép reszekciós szélekkel. Az en-bloc reszekció és a vena portae rendszer esetlegesen infiltrált területének reszekciója, valamint rekonstrukciója lehetővé teszi az ép szélekkel történő eltávolítását a daganatnak (26). A jelenlegi multidiszciplináris kezelési paradigmák magukban foglalják a műtetre való felkészülést támogató ellátás korai integrációját, a prehabilitációs stratégiákat fizioterápiával, foglalkozásterápiával (műtét előtt), dietetikai tanácsadást és speciális étrend felépítését (beleértve a hasnyálmirigy enzim kiegészítést), előre tervezett gondozást, valamint a betegek visszajelzései által működő eredményalapú visszajelző-rendszert a betegek életminősége javítása céljából (27).

1.2 Pancreas cisztózus neopláziák

1.2.1 Jelentőségük

A hasnyálmirigy cisztás daganatai (PCN) a hasnyálmirigy-ciszták heterogén csoportja, amely magában foglalja az intraduktális papilláris mucinózus neoplazákat (IPMN), a mucinózus cisztás neopláziákat (MCN), a szerózus cisztás neopláziákat (SCN) és más ritkább daganatokat, mint a szolid pseudopapilláris neopláziákat és a cisztás neuroendokrin tumorokat (cNET), amelyek mindegyike változatos klinikai, radiológiai és patológiai jellemzőket mutat (28). Ezek a cisztatípusok együttesen a PCN-ek 90%-át képezik, a leggyakoribb altípusuk az IPMN (29). Az invazív hasnyálmirigyrákká való progresszió lehetősége miatt a premalignus PCN-ben szenvedő betegeket rutinszerűen monitorozzák. Elsődleges cél a rosszindulatú daganatok megelőzése és a szükségtelen műtétek elkerülése. A műtéti reszekció mindenképpen indokoltnak tekinthető high grade dysplasia, vagy invazív daganat esetén. Jelenleg három guideline terjedt el széleskörben, amelyek általánosságban adnak ajánlásokat PCN-ek kezelésére a malignizálódási kockázatuk alapján. Ezek az iránymutatások a következők: az American Gastroenterological Association (AGA) guideline (30), az International Association of Pancreatology (IAP) guideline (31) és a „European Study Group on Cystic Tumours of

the Pancreas” által 2018-ban publikált guideline (32). Mivel a rutin keresztmetszeti képalkotás során egyre több PCN-t fedeznek fel incidentálisan, a PCN-ben szenvedő betegek optimális utánkövetése egyre gyakoribb klinikai problémává válik, ami rávilágít arra, hogy egyensúlyba kell hozni a malignussá fajulás esélyének megelőzését a sebészi túlkezelés kockázatával. A PCN-ek mucinózus (IPMN vagy MCN) vagy nem mucinózus (SCN, SPN és cNET) fő kategóriákba sorolhatók (30).

1.2.2 Epidemiológia

Az egyre növekvő mennyiségű, jó minőségű keresztmetszeti képalkotó vizsgálatok gyakoribb használata, valamint az egészséges egyének megelőző egészségügyi szűrővizsgálatokon –beleértve a teljes test MRI-t is – való részvételének trendje növelte a PCN-ek felfedezésének gyakoriságát. A PCN-ek gyakorisága jelentősen változik az alkalmazott képalkotó eljárás típusától és az egyes tanulmányokban leírtak között is. Míg a transabdominális ultrahang csak az esetek 0,21%-ában mutatja ki a PCN-eket (32), a CT-vizsgálat csak az esetek 2,6%-ban mutatja ki a PCN-eket (33) és az MR vagy MRCP az esetek 2,4-49,1%-ban mutatja ki a PCN-eket (34). A PCN-ek 50%-ára boncolás során derül fény (35). Az életkor növekedése erősen korrelál a PCN jelenlétével (36). Ezenkívül ok-okozati összefüggés van a diabetes mellitus és az IPMN között (OR 1,79, 95% CI 1,08–2,98), amennyiben az IPMN-ben szenvedő egyének 10-45%-a cukorbetegségben szenved (37). A krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő egyéneknél fokozott az IPMN kockázata (38). A PCN különböző típusai közötti különbségtétel alapvető fontosságú, mivel a PCN malignitási potenciálja a típusok között különbözik. A cisztózus neuroendokrin tumorok (cNET) rosszindulatúak (39), az SCN többnyire jóindulatú, míg az IPMN, az MCN valamint az SPN premalignus elváltozásnak tekintendők és szorosmegfigyelést vagy műtéti reszekciót igényelnek (31). A PCN malignizálódási kockázatát főként sebészeti betegcsoportokból állapították meg. Az IPMN, MCN és SPN rosszindulatú daganatos megbetegedésének longitudinális kockázatával kapcsolatos információk korlátozottak a PCN természetes történetéről szóló retrospektív tanulmányok hiánya miatt. Az oldalági IPMN-ben szenvedő műtéten átesett betegek végleges szövettani vizsgálata 11-30%-ban előrehaladott (high grade dyspláziát vagy invazív rákot) tumort igazolt (40). Az előrehaladott daganat kockázatát IPMN-ben elsősorban a Wirsung vezeték érintettsége növeli, átlagosan 62%-os gyakorisággal (36-

100%) a reszekált mintákban (41). Ezen túlmenően, az IPMN-ben szenvedő betegeknél nagyobb a kockázata (1–8%) a hagyományos pancreas ductalis adenocarcinoma (PDAC) kialakulásának a hasnyálmirigy más részén (42). Az MCN-ben szenvedő betegeknél az előrehaladott betegség kockázata 10-39% (43).

1.2.3 Patológia

A PCN-ek uniloculáris vagy multiloculáris üregképződést jelentő daganatos vagy nem-daganatos tumorhoz hasonló elváltozások a hasnyálmirigyben (39). A PCN-et vagy mucinózus (IPMN vagy MCN) vagy nem-mucinózus cisztás daganatokként (SCN, SPN és cNET) osztályozzák (39). A mucinózus PCN-t az endoderma eredetű hengeres epithelium béleli, míg a nem mucinózus PCN-t egyszerű köbhámsejes epithelium béleli. Az emésztőrendszer daganatainak WHO-osztályozása kétlépcsős rendszert javasol a PCN-ben előforduló diszplázia besorolására: alacsony fokú diszplázia („low grade dysplasia”), magas fokú diszplázia („high grade dysplasia”). Az LGD-ben a neoplasztikus sejtek minimális pleomorfizmust mutatnak és a mitózis ritka. Az HGD-t jellegzetes szerkezeti és citológiai atípiá, valamint jelentős mitotikus aktivitás jellemzi (39). A diszplázia fokát a daganat legmagasabb fokú gócnak kell meghatározni, függetlenül annak méretétől. Az IPMN-t a sejtes morfológia alapján is osztályozhatjuk: gastrikus-, intestinális vagy pancreatobiliáris típus. Osztályozható az IPMN a pancreas ductus rendszerében való elhelyezkedése alapján is mellékági („branch duct type”), főági („main duct type”) és kevert („mixed type) alapján is (39). Az IPMN általában több altípust tartalmaz, és javasolt a domináns altípus és/vagy a legnagyobb diszplázia fokát mutató altípus használata. Az IPMN-ek legfeljebb 15%-a olyan átfedő jellemzőket mutat, amelyeket nem lehet egyik meghatározott altípusba sorolni, és ezeket "kevert" típusként lehet besorolni, kiegészítő magyarázattal (44). Morfológiai és anatómiai elhelyezkedés mellett mucin termelésük, CDX2 expressziójuk és citokeratin expressziójuk alapján is csoportosíthatók. A WHO klasszifikációja alapján a gastrikus, pancreatobiliáris és intestinális altípusnál is megfigyelhető a CK7, CK8, CK18 és CK19 citokeratinok expressziója, azonban CK20 expressziót csak az intestinális altípus mutat. MUC1 expresszió csak a pancreatobiliáris altípusnál figyelhető meg, MUC2 csak az intestinális típusnál, míg MUC5AC mindhárom altípusnál expresszált marker. MUC6 markerre a gastrikus és pancreatobiliáris típusok pozitívak. CDX2 marker csak az intestinális altípusnál van jelen (39).

1.2.4 Kezelése

1.2.4.1 Követés

Bár a hasnyálmirigy ciszták hosszútávú követésének hasznossága nem bizonyított, az IPMN és MCN esetében évekig tart, amíg invazív rákká alakulnak, így a követés lehetőséget nyújt a korai felismerésre és szükség esetén sebészi ellátásra. A hasnyálmirigy ciszták követése ezért javasolt a sebészi ellátásra alkalmas betegek esetén, akik tünetmentesek és a követett PCN nem mutat aggasztó jeleket (31). A követés kivitelezéséhez a legjobb módszer nem bizonyított, ezért a irányelvek különböznek abban, hogy milyen modalitást kell használni (45, 46). Abban azonban egyetértenek, hogy a malignizálódás kockázata mellett figyelembe kell venni a beteg életkorát és társbetegségeit. Az aggodalomra okot adó jellemzők hiányában, amelyek növelt felügyeletet vagy további értékelést indokolnának, az IPMN felügyeleti időközét a ciszta mérete határozza meg az IAP irányelve szerint (31). A több lokalizációjú IPMN esetén a kontrollok közti időköz az legnagyobb IPMN méretének alapján kell meghatározásra kerüljön. Az IAPTól (31) eltérően az AGA (30) és az European (32) irányelvek a kontrollok közti időt az IPMN méretétől függetlenül határozzák meg.

1.2.4.2 Sebészi ellátás

Minden irányelv azt javasolja, hogy a hasnyálmirigy ciszták sebészeti reszekcióját csak tapasztalt sebészek végezzék magas betegszámmal dolgozó központokban, multidiszciplináris hasnyálmirigysebészeti munkacsoport konzultációja után (31, 32, 47). Különböző sebészeti eljárások állnak rendelkezésre a hasnyálmirigy ciszták kezelésére. A hasnyálmirigy fejében vagy a processus uncinatusban található ciszták esetén a standard műtét a pancreasfej reszekció, míg a testben vagy farokban lévő ciszták esetén általában distalis pancreas reszekciót végeznek. A hagyományos parciális pancreatoduodenectomy során eltávolítják a hasnyálmirigy fejét, a duodenumot, a vékonybelek egy részét, az epevezetékét, az epehólyagot és részleges gyomorreszekciót (pylorus megtartásos műtét esetén nem) hajtanak végre, nyitott vagy minimálisan invazív megközelítéssel (48, 49). A distalis hasnyálmirigy-műtét során a hasnyálmirigy testét és farokrészét távolítják el a vena mesenterica superior bal oldalán, nyitott vagy minimálisan invazív megközelítéssel (50).

A műtéti reszekció a hasnyálmirigy ciszták esetén 20-40% perioperatív morbiditással és 1-3% mortalitással jár a pancreatoduodenectomy esetén (51). A hasnyálmirigy ciszták műtéti eltávolítására vonatkozó nemzetközi irányelvek eltérnek egymástól. Az 2015-ös AGA (30) és a 2017-es IAP (31) irányelvek azt javasolják, hogy az összes MCN esetén történjen meg a műtéti eltávolítás mérettől függetlenül, míg az 2018-as European (32) guideline csak a 40 mm átmérőnél nagyobb méretű MCN-ek esetében javasolja a műtéti eltávolítást, tünetek (például pancreatitis vagy sárgaság) vagy aggasztó jelek jelenléte esetén. Az MCN-nel kapcsolatban az előrehaladott daganat preoperatív kockázati tényezőire vonatkozó adatok korábban korlátozottak voltak. A retrospektív tanulmányok és a szisztematikus áttekintő tanulmányok azt mutatják, hogy a tünetmentes vagy aggasztó jelek nélküli kis méretű MCN-ek esetén biztonságos lehet az utánkötés keresztmetszeti képkészítéssel, mivel alacsony a malignizálódás kockázata (52-54). Ezek az adatok az utolsó IAP guideline közzététele után jelentek meg. Ezért követik sok helyen az MCN konzervatív kezelésére vonatkozó európai irányelv tanácsát (32).

1.3 Diagnosztika

1.3.1 Képkészítő eljárások

Az AJCC (American Joint Committee on Cancer) által meghatározott daganat, nyirokcsomó és áttét besorolást használják a prognózis felmérésére (55). A kezelés tervezéséhez minden esetben meghatározandó, hogy reszekábilis PDAC, borderline reszekábilis PDAC (BRPC) vagy helyileg előrehaladott PDAC (LAPC) áll-e fenn. A lokalizált betegség esetén is a reszekabilitás széles spektrumával kell számolnunk: ide tartozik a reszekábilis, borderline reszekábilis és a lokálisan előrehaladott betegség is. A lokalizált betegség esetén a további kezelési terv meghatározását multidiszciplináris munkacsoport végzi, amelyben részt vesz sebész, onkológus, radiológus és esetlegesen sugárterapeuta is. Többféle reszekabilitási osztályozást használnak: a daganatok általában reszekábilisnak tekintendők, ha nincsen távoli áttét és lokálisan minimális, vagy semennyire nem érintkezik a környezetében elhelyezkedő vasculáris képletekkel (56). Vénák érintettsége, infiltrációja, vagy az artériák kisebb, mint 180°-os érintettsége esetén borderline reszekábilis daganatról beszélünk. Egyre nagyobb az érdeklődés a

sugárkezeléssel vagy anélkül végzett neoadjuváns szisztémás terápia alkalmazása iránt borderline és primeren reszekábilis PDAC esetén (57). Az International Association of Pancreatology (IAP) 20. konferenciáján 2016-ban a borderline reszekabilitást PDAC esetén három szempont szerint határozták meg: anatómiai, biológiai és kondicionális szempontok szerint. Az anatómiai faktorok közé tartozik az arteria mesenterica superior, vagy a truncus coeliacus érintettsége 180° -nál kisebb mértékben, annak szűkítése vagy deformálása nélkül, az arteria hepatica communis érintettsége annak deformálása vagy ezzel párhuzamosan jelen levő arteria hepatica propria vagy truncus coeliacus érintettség nélkül. Anatómiai szempontból borderline reszekábilisnak minősül a daganat, ha érintkezik a vena mesenterica superiorral vagy a vena portae-val- akár ezek deformálása vagy elzárása mellett is- ha nem terjed túl a duodenum alsó határán. A biológiai borderline reszekabilitást meghatározó tényezői közé tartoznak az anatómiai kritériumok alapján potenciálisan reszekálható tumorok, ahol a klinikai leletek alapján felmerül a gyanúja (de nem igazolt) távoli áttétek meglétének, valamint azok az esetek, amelyekben biopsziával igazolt, vagy PET-CT képeken felmerült regionális nyirokcsomó metastasisok vannak jelen. Biológiai borderline reszekabilitást jelent ezenkívül a szérum CA19-9 500 U/ml feletti értéke is. A kondicionális borderline reszekabilitás a beteg általános állapotára és műtéti teherbíróképességét veszi figyelembe, ez alapján ebből a szempontból borderline reszekábilisnak minősül a betegség olyan betegeknél, akik Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) státusza a 2-est eléri. Bármelyik kritérium önmagában, vagy több együtt teljesül, a daganat borderline reszekábilisnak minősül ezen konszenszenzus iránymutatása alapján (58). Távoli kis metasztázisok fennállásának gyanúja esetén ezek lokalizációjára a PET-CT használható, bár a rutin diagnosztikáinak nem része, elsősorban onkológiai kezelés melletti utánkövetésre használatos. Ez információval szolgál a tumoros progresszióról, a nyirokcsomó érintettségéről, valamint a nagyobb távoli metasztázisok meglétéről. Az MR is szóba jöhet, mint vizsgálati módszer, de a korlátozott elérhetősége miatt a CT előnyt élvez vele szemben. A lokális kiterjedés meghatározására a nagyobb felbontóképesség miatt szintén a CT vizsgálat a leginkább alkalmas modalitás. Ha nincsen specifikus kontraindikáció, a reszekabilitás meghatározására hasi CT felvételt használnak. A megfelelő protokoll szerint végzett vizsgálattal az esetek 90%-ban jól prediktálja a tumor lokális reszekabilitását (59).

A legtöbb PCN véletlen kerül felismerésre mellékletként más okból készült CT képeken. Mivel a CT vizsgálat csak 40-81%-os szenzitivitással tudja elkülöníteni a jó és rosszindulatú, vagy rosszindulatú potenciállal rendelkező PCN-eket (47), a diagnózis elősegítése céljából kiegészítéseként gyakran végeznek mágneses rezonancia (MR) és mágneses rezonancia cholangiopancreatográfiát (MRCP) vizsgálatokat (60). Általában szükség van kombinált képalkotó módszerre, mivel ennek lényegesen nagyobb a pontossága (5).

1.3.2 Endoscopia

A betegnél fellépő icterus esetén gyakran az endoszkópos retrográd cholangiopancreatographia (ERCP) az első diagnosztikus lépés, de csak akkor, ha van terápiás indikációja is, például az epeúti elfolyás megoldása céljából végzett stent behelyezés. Ennek a vizsgálatnak a segítségével láthatjuk a Wirsung vezeték jellegzetes tumor általi beszűkülését vagy obstrukcióját [69], valamint ERCP beavatkozás segítségével úgynevezett kefecytológiai mintavétel is kivitelezhető, ami, ha sikeres, igazolhatja esetleges malignitás jelenlétét. A pancreas tumorra jellemző a kettős vezeték jel, amikor a tumor a ductus coleduchust és a Wirsung-vezeték jellegzetes módon beszűkíti. [69] Icterus miatti preoperatív ERCP és stent behelyezés szignifikánsan növeli a komplikációk arányát az ERCP nélkül végzett direkt műtéti ellátáshoz képest pancreas feji térfoglalással bíró betegek esetében [70] Egy másik vizsgálati lehetőség a mágneses rezonancia cholangiopancreatographia (MRCP), amely gyorsan fejlődő noninvazív vizsgálati modalitás. Az eddigi vizsgálatok alapján, ahol hasnyálmirigy tumorok diagnosztikájára használták, 84%-os volt a szenzitivitása és 97% a specifitása [71]. Az endoszkópos ultrahang (EUS) egy másik rendkívül fontos diagnosztikai módszer, amelyet olyan esetekben javasolnak, amikor a CT és MR képeken a diagnózis nem egyértelmű, vagy ahol a radiológiai vagy klinikai jellemzők rosszindulatú potenciálra utalnak. A másik előnye az, hogy a vizsgálat során mintavételre is van lehetőség malignitás gyanúját mutató elváltozásból (61). Endoscopos ultrahang vizsgálat során lehetőség van a cisztafolyadékából vékonytű aspiráció segítségével (FNA) mintát venni és citológiai vizsgálatra küldeni. Ennek a citológiai vizsgálatnak PCN-ek esetén a

szenzitivitása 63%, a specificitása 88%. bár mutathat némi variabilitást más összefoglaló közleményekben (62). Van lehetőség endoscopos ultrahang vezérelt vastagtű biopszia elvégzésére is (EUS-FNB), ez azonban sokszor nehezen kivitelezhető, amennyiben nincsen fali megvastagodás, vagy szolid komponense a pancreas cisztózus térfoglalásnak, amiből a mintát veszik. Azokban az esetekben amikor ez sikeres, azonban egy tanulmány arról számol be, hogy 72,7%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást értek el ezekben az esetekben (63). A képalkotó diagnosztikus eljárások között a konvencionális percután ultrahang vizsgálat tumorspecifikus szenzitivitása nagyon alacsony, azonban az endoszkópos ultrahang vizsgálatot egyre szélesebb körben használják az ERCP alternatívájaként. Ennek a szenzitivitása 95%, és lehetőséget biztosít szövet, vagy cisztafolyadék mintavételre is [72]. A cisztás elváltozásokból származó folyadékmintákból számos különböző vizsgálat végezhető. A karcinoembrionális antigén (CEA) szint meghatározás, citológiai vizsgálat is végezhető. Nagula S és munkatársai tanulmánya szerint a ciszta folyadékminták 192 ng/ml feletti CEA-szintje mucinózus jellegű elváltozásokra utalhat, 75%-os szenzitivitással és 83,6%-os specificitással [75]. Pancreas ciszta folyadékból tumormarkereken és citológiai vizsgálaton kívül elvégezhető cisztafolyadék-glükóz, valamint amiláz szint vizsgálata is. Az 50 mg/dl alatti cisztafolyadék glükóz szint 88%-os szenzitivitással és 78%-os specificitással jelzi mucinosus ciszta jelenlétét. [77] A pancreas cisztafolyadék amiláz tartalma hasznos lehet pseudociszta eredet kizárására PCN-es betegek vizsgálata során. A 250 NE/l-nél kisebb ciszta-folyadék amiláz szint 98%-os specificitást mutat a vizsgált ciszta pseudociszta eredetének kizárására, azonban szenzitivitása csak 44%. [78] PCN cisztafolyadékból ritkábban ugyan mindezekon kívül még többek között cisztafolyadék DNS és citokin vizsgálatot. A cisztafolyadék DNS vizsgálata során igazolt KRAS-mutáció megléte 95%-os specificitással valamint 45%-os szenzitivitással jelezte a ciszta mucinózus dignitását (64). A PCN cisztafolyadék citokin és proszttaglandin vizsgálata kimutatta, hogy IPMN-ek esetében az esetlegesen jelen lévő diszplázia mértékével csökken a CD8+ sejtek száma és növekszik a T-helper sejtek száma (65).

1.3.3 CA 19-9

A 19-9 szénhidrát-antigént (CA 19-9), egy úgynevezett szialo gangliozyd, 1979-ben Koprowski és munkatársai fedezték fel az SW1116 vastagbélrák sejtvonalban (66). A CA 19-9 analógja, a disialil Lewis a (di-sLea) szintézise során keletkezik, amelyhez további szíálsav szerkezet kapcsolódik. A gyomor-bél traktus nyálkahártyája di-sLea-t tartalmaz, amely ligandumként működik az immunsejtek számára. A karcinogenezis korai szakaszában a 2-6 szialiltranszferáz enzimmé átalakuló gén epigenetikai elnémítása gátolja a disialil Lewis-a termelődését. Következésképpen a szialil Lewis a (sLea), más néven CA 19-9, rendellenesen termelődik, és felhalmozódik a szervezetben (67). A Lewis (α - β +) és Lewis (α + β -) azok a vércsoportok, amelyek Lewis vércsoport-antigénnel rendelkeznek és szorosan kapcsolódnak a CA 19-9 bioparaméterhez. A CA 19-9 korlátozottan alkalmazható az (α - β -) vércsoportú populációban, mivel ezekben az egyénekben hiányzik az 1,4 fukozil-transzferáz enzim, amely elengedhetetlen az antigénképzéshez. Mivel ez a csoport a teljes populáció 10%-át teszi ki, a CA 19-9 diagnosztikai biomarkerként betöltött szerepének általános elismerése korlátozott (68). A CA 19-9 szintetizálódhat glikolipidként (amelyben a ceramid komponens beépül a sejtmembránok lipid kettős rétegébe) vagy glikoproteinként (legjellemzőbb O-kapcsolt mucinokhoz). A CA 19-9 számos különböző típusú gyomor-bélrendszeri rákban kifejeződik, így a rák szérumindikátoraként szolgálhat (69). Köztudott, hogy a rosszindulatú transzformáció során a sejtfelszíni glikánok jelentős változásokon mennek keresztül. Ez a glikozilációs változás a rosszindulatú daganatba való átmenet ismertetőjele. A rosszindulatú sejtek számos módon megváltoztatják glikánjaikat, leggyakrabban terminális láncuk módosításával. A PDAC sejtvonalakban és szövetekben a Lewis antigének, nevezetesen a szialil Lewis x és a kapcsolódó antigének túlzott expresszióját észlelték. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hasnyálmirigy-daganatok daganatindikátorok, sLex-et tartalmazó glikoproteinek szabadulnak fel a véráramba (70). Feltételezik, hogy a hematogén metasztázis szorosan összefügg az sLea és sLex determinánsokkal, amelyek szerepet játszanak a rákos sejtek glikánközvetített tapadásával az ér endotéliumához. A sejtdhéziós út blokkolására szolgáló terápiás alkalmazások gátolhatják a hematogén metasztázisokat (71). Az in vivo bizonyítékok alátámasztják azt a hipotézist, hogy amikor az sLe-x/a struktúrák túltermelődnek a rákos

sejtekben, ezek elősegítik a keringő rákos sejtek kötődését az endothelsejtek szelektinjével, ezáltal elősegítve a metasztázisok kialakulását. Az E- és P-szelektinekről kimutatták, hogy jelentős szerepet játszanak a hasnyálmirigyráksejtek peritoneális terjesztésében (72). A CA 19-9 marker medián szenzitivitása a PDAC diagnózisára vonatkoztatva 79%, a medián specificitása 82% (73). Ezáltal a klinikai gyakorlatban nem diagnosztikai, hanem főként prognosztikai jelentőséggel bír azáltal, hogy rendkívül hatásosan jelzi az esetleges recidívákat a tumor sebészi eltávolítása után (74).

1.3.4 Extracelluláris vezikulák

Minden erőfeszítés ellenére, a pancreas ductalis adenocarcinoma prognózisa gyakorlatilag semmit sem javult az elmúlt években. Jelenlegi tudomásunk szerint legalább egy évtized telik el a driver mutáció kialakulása és az első, még nem metastatikus tumorsejt kialakulása között [70]. Ezek alapján egy széles időablak áll rendelkezésünkre a tumor korai stádiumában való kimutatására. Ezzel lehetőségünk nyílna a korán metastatizáló pancreas daganat korai áttéteinek megelőzésére és a daganat jelenlegi igen rossz prognózisának javítására [61]. PCN-ek esetén ezek hosszútávú követésének hasznossága nem bizonyított, az IPMN és MCN esetében évekig tart, amíg invazív rákká alakulnak, így a követés lehetőséget nyújt a korai felismerésre és szükség esetén sebészi ellátásra. [33] Az extracelluláris vezikulák foszfolipid kettősréteg által határolt szubcelluláris részecskék. Belsejükben különböző egyedi fehérjéket és nukleinsavakat szállítanak és védenek meg a lebomlástól. Az extracelluláris vezikulák kiválasztására az emberi test összes sejtje képes, és nagy mennyiségben megtalálhatók minden testnedvünkben. Mindez alapján felvetődik, hogy az extracelluláris vezikulákat a jövőben biomarkerként lehessen használni különböző kórképek, például a pancreas daganatok korai diagnosztikájában. Az extracelluláris vezikulák (EV-k) a legtöbb, ha nem minden sejt által kiválasztott nanostruktúrák (75) a biogenezis és a méretek alapján különböző altípusokba sorolhatók, beleértve a „kis”, „közepes” és „nagy” extracelluláris vezikulákat (76). Mivel az egyes EV-alpopulációkra nem állnak rendelkezésre meghatározott molekuláris markerek, itt az EV-frakciókra mérettartományuk szerint hivatkozunk (kis, közepes méretű és nagy EV-k 50-150 nm, 100-1000 nm és >1 µm átmérőjűek), hasonlóan a Thery C. munkacsoportja által leírtakhoz (76). Méretük és morfológiájukon kívül

jellegzetes felszíni markereik alapján is azonosíthatók, úgy mint a felszíni CD63 és CD81 tetraspapnin fehérjék, amik segítségével igazolható az izolált mintákban a jelenlétük (77).

Az EV-k kutatása során kiderült, hogy fontos molekuláris rakományokat szállítanak, beleértve a fehérjéket (78), RNS-t (79), DNS-t (80) és a lipideket (81), amelyek mindegyike megfelelő posztisztetikus módosításokkal rendelkezik (glikoziláció, oxidáció, citrullináció) (82). Az ilyen molekulák átvitelével az EV-k különféle biológiai folyamatokban játszanak szerepet, mint például a gyulladás (83), a rák (84) és a szív- és érrendszeri betegségek (85). Az elmúlt években az EV-k jelentős kutatási érdeklődést váltottak ki, mivel potenciálisan betegségek biomarkerei lehetnek azáltal, hogy molekulákat hordoznak az őket kibocsátó sejtekből (86). A „kis” EV-kel asszociált glipikán-1-et a pancreas tumorok potenciális biomarkereként azonosították (87), míg egy másik tanulmány szerint szintén a kis EV-kel asszociált miRNS profil a betegség kiváló biomarkere (88). Az EV-k tartalmának proteomikus elemzése során született eredményeink azt mutatják, hogy a különböző betegségek esetén ezek eltérnek egymástól, ami potenciális biomarkerek azonosítását teheti lehetővé. Az extracelluláris vezikulák (EV) biológiailag fontos molekulákat szállítanak, például miRNS-eket (89), amelyek új, ígéretes biomarkerek lehetnek számos rákos megbetegedésben (90) és más betegségekben (91). Mivel az EV altípusok sejtes eredetük alapján történő izolálása nehézkes, gyakran méretbeli frakciók szerint csoportosítják őket differenciális centrifugálással és ultracentrifugálással (92). Ez a csoportosítási módszer „nagy”, „közepes” és „kis” EV-kre osztja őket a különböző centrifugálási sebességek használata során (93). A közelmúltban munkacsoportunk és mások EV-ket izoláltak PDAC-betegek perifériás véréből és megkezdődött az EV-k miRNS rakományának elemzése (76, 88, 94). Érdekes módon ezek a tanulmányok különböző, PDAC potenciális markereiként használható EV rakományelemek azonosításához vezettek. Ezen túlmenően egy nemrégiben készült tanulmány EV-ket használt az IPMN-ek rosszindulatú potenciáljának előrejelzésére. Yang KS és munkatársai perifériás vért használtak és a MUC5AC fehérjét azonosították az EV rakomány komponenseként, amely előrejelzi az IPMN-ek rosszindulatú progresszióját (95). Vizsgálatuk azonban csak az IPMN-ekre összpontosított, anélkül, hogy figyelembe vett volna más rosszindulatú potenciállal rendelkező M-PCN-eket is

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásainkban vizsgáltuk pancreas tumoros betegeknél a különböző potenciális biomarkerek szerepét a korai diagnosztikában és a sebészi döntéshozatalban.

Ezen célkitűzés teljesítése három kutatásunkra épült.

2.1 CA 19-9 vizsgálata

Alkalmas lehet -e egy jól ismert és széles körben elterjedt biomarker, a CA19-9, a pancreas ductalis adenocarcinomás betegeknél a tumor reszekabilitásának előrejelzésére?

2.2 Humán pancreas nedv vizsgálata

Azonosíthatók -e humán pancreas nedvből potenciális új biomarkerként szolgáló extraelluláris vezikulák? Amennyiben igen, részletes proteomikus karakterizálásukkal sikerülhet -e azonosítani potenciális biomarkert, valamint felszíni markereik közül szolgálhat -e valamelyik potenciális biomarkerként? Amennyiben találunk lehetséges jelöltet, kimutatható pancreas ductalis adenocarcinomás sejtvonalakból származó extracelluláris vezikulákon?

2.3 Pancreas cisztózus neopláziák vizsgálata

Pancreas cisztosus neoplasias betegcsoportokban a ciszta punktatumból származó extracelluláris vezikulákból izolált mikro-RNS-ek alkalmasak lehetnek biomarkerként a magasabb malignizálódási potenciállal rendelkező alcsoportok elkülönítésére? Amennyiben igen, azonosíthatók ezek a teljes cisztafolyadékból is?

3. MÓDSZEREK

3.1 A preoperatív serum CA 19-9 szint és a PDAC operabilitása összefüggésének vizsgálata metaanalízis segítségével

3.1.1 Regisztráció

Ez a metaanalízis a PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) nyilatkozat által megfogalmazott kritériumok alapján készült (96). Az ehhez szükséges protokollt CRD42019132522-es azonosítóval regisztráltuk a PROSPERO (Prospective Register of Systematic Reviews) adatbázisban.

3.1.2 Keresés és alkalmazhatóság

A kutatás keretében a szerzők olyan pancreas ductalis adenocarcinoma (PDAC) miatt kezelt betegekre vonatkozó publikációkat kerestek, akiken kuratív célú műtétet végeztek és akiken a CA 19-9 szintek prognosztikai szerepét vizsgálták a műtéti reszekabilitás tekintetében. Szisztematikus keresést hajtottunk végre a MEDLINE (PubMeden keresztül), EMBASE és Web of Science adatbázisokban a 2019 április 19-ig terjedő időszakra vonatkozóan. Semmilyen korlátozást nem szabtuk meg. A kereséshez a következő angol nyelvű lekérdező formulát használtuk: (pancreas OR pancreas*) AND (cancer* OR tumor* OR tumour* OR neoplasm* OR malignant* OR carcinoma* OR adenocarcinoma*) AND (“CA 19-9” OR “CA19-9” OR “carbohydrate antigen 19-9” OR “cancer associated antigen 19-9” OR “cancer antigen 19-9” OR “cancer associated glycolipid antigen 19-9” OR “sialylated Lewis antigen”).

3.1.3 Beválogatás és alkalmazhatóság

A kutatás keretében a következő beválogatási kritériumokat alkalmaztuk: csak radiomorfológiailag és legtöbb esetben szövettanilag is igazolt PDAC-s betegek, akik kuratív szándékkal végzett műtéten estek át és a preoperatív szérum CA 19-9 értékeik rendelkezésre álltak. Csak azokat a betegeket válogattuk be, akik nem részesültek neoadjuváns kemoterápiás kezelésben. Az elemzésben kizárólag teljes szöveggel elérhető tanulmányokat vizsgáltunk.

Kizárási kritériumok a következők voltak: áttekintő tanulmányok, összefoglalások (ahol tehát csak az „abstract” -ot publikálták), radiomorfológiailag inoperábilis betegekre vonatkozó tanulmányok, neoadjuváns kemoterápiás kezelésben részesült betegek, vagy palliatív céllal operált betegek vonatkozó tanulmányok. Az adatbázis keresést követően

az eredményeket EndNote X8 programba importáltuk (Clarivate Analytics, United States). A duplikátumokat kiszűrtük és töröltük. A fennmaradó publikációkat először cím, absztrakt és végül teljes szöveg alapján szűrtük a beválogatási és kizárási kritériumok alapján.

3.1.4 Releváns adatok összegyűjtése a beválogatott publikációkból

Az szükséges adatok kinyerését előre kidolgozott adatfeldolgozási táblázat segítségével végeztük, amely a következő információkat tartalmazta: a publikációk szerzőjét, publikáció idejét, helyét, demográfiai adatokat, típusát, a reszekábilis és irreszekábilis esetek számát, preoperatív szérum CA 19-9 szintet, ROC (receiver operating characteristics) görbe alatti területet (AUC ROC), konfidenciaintervallumokat, szenzitivitást, specificitást, pozitív prediktív értéket (PPV), negatív prediktív értéket (NPV), valós pozitív eseteket (TP) és a álpozitív eseteket (FP) (1. Táblázat a-c). A nyers adatok – valós pozitív (TP), álpozitív (FP), valós negatív (TN) és álnegatív (FN) értékek 8-ból 5 tanulmány esetében voltak elérhetőek, 2 tanulmány esetén ki lehetett számítani őket, 1 tanulmány esetén nem volt elegendő információ a kiszámításukhoz.

1.Táblázat: A beválogatott cikkek tulajdonságai és a vizsgált adatok (1)

Elsőszerző	Ország	Kor		Nem		Centrumok száma	Tervezés	Kutatás típusa	preoperatív szérum CA19-9 értékkel rendelkező betegek
		Reszekábilis	Irreszekábilis	Férfi	Nő				
Albatany 2015	Egyiptom	50,6 (+- 13,6 or 51-77)	59,4 (+- 11,4 or 48- 76)	26	14	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	40
Almadi 2013	Szaúd-Arábia	61,2 (+- 1,51)		36	25	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	61
Luo 2013	Kína	60,7 (+-9,1)		115	97	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	212
Kiliç 2006	Törökország	56 (38-74)		28	23	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	33
Kim 2009	Dél-Kórea	66,0 (+-10,2 or 41-88)		60	54	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	114
Ong 2008	UK	63 (30-80)	66,5 (30-80)	64	45	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	113
Santucci 2018	Franciaország	63,4 (+- 12,3)	64,6 (+- 13,4)	97	74	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	171
Zhang 2008	Kína	59,0 (+-9 or 41-75)		72	32	Egy centrumos	Retrospektív	Keresztmetszeti	104

3.1.5 Az elfogultság kockázatának értékelése

Az elfogultsági kockázat (Risk of Bias- ROB) értékelése a PROBAST (Prediction Model Risk of Bias Assessment Tool) eszköz segítségével történt, amely a prognosztikus metaanalízisek esetén standard javasolt módszer. A ROB értékelése és alkalmazása a PROBAST segítségével történt. A PROBAST négy fő tartomány alapján vizsgálja a tanulmányokat: résztvevők, előrejelzők, eredmények és elemzés. Ez a négy fő tartomány célzott kérdéseket tartalmaz, melyek célja, hogy kiszűrjük az esetleges elfogultságot a beválogatott publikációkban. Az elfogultsági kockázat felmérése során a kérdésekre adható lehetséges válaszok „igen”, „nem” vagy a „tisztázatlan”. Legalább egy „nem”, vagy „valószínűleg nem” válasz esetén a tanulmány magas elfogultsági kockázatúnak tekintendő. Az a tartomány, ahol legalább egy kérdésre adott „tisztázatlan” válasz esetén a tanulmány elfogultsági kockázat tekintetében „tisztázatlannak” tekintendő. Összességében csak abban az esetben állapítottunk meg alacsony elfogultsági kockázatot, ha minden célzott kérdésre a válasz „igen”, vagy „valószínűleg igen” volt.

3.1.6 Statisztikai elemzés

A metaanalízishez szükséges számítások a STATA 15.0 (Stata, College Station, TX, United States) program használatával történtek. A beválogatott tanulmányok összesített becsült hatásnagyságát (effect size) DerSimonian és Laird random effekt modellek alkalmazásával állapítottuk meg. A ROC görbék alatti terület (AUC) értékeket és a konfidencia intervallumaikat felhasználva vizsgáltuk a preoperatív szérum CA 19-9 szint prognosztikai értékét a sebészi reszekabilitásra vonatkozóan. Az AUC eredmények klasszifikációja a Cochrane Kézikönyv alapján a következő: 90-100= kiváló, 80-90= jó, 70-80= elfogadható, 60-70= gyenge, 50-60= sikertelen (97). Poolozott szenzitivitást és specificitást szintén számoltunk az elérhető nyers adatok alapján (TP, TN, FP, FN). Ezenkívül kiszámoltuk a súlyozott átlagos eltérést (weighted mean difference- WMD), hogy meghatározzuk a különbséget a reszekábilis esetekben mért preoperatív szérum CA 19-9 értékek és az irreszekábilis esetekben mért preoperatív szérum CA 19-9 értékek között. A heterogenitást a Cochrane kézikönyv által javasolt Q (χ^2) és I^2 statisztikai módszer alapján állapítottuk meg. Az I^2 próba a teljes variabilitás azon százalékát határozza meg, amely nem magyarázható véletlenszerűséggel. A 40% alatti I^2 érték

2. Táblázat: a vizsgálatba beválogatott betegek adatai (2)

A táblázat a kutatásban résztvevő betegek adatait foglalja össze, akiktől a kutatás során felhasznált hasnyál minták származtak

Nem	Kor (év)	Diagnózis	Műtét	Szövetetani lelet
Férfi	53	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Frey-műtét	Krónikus gyulladás
Nő	48	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Frey-műtét	Krónikus gyulladás
Férfi	50	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Frey-műtét	Krónikus gyulladás
Nő	71	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Cisztto-wirsungo-jejunostomia	Krónikus gyulladás
Nő	46	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Pancreato-cisztto-duodenostomia	Krónikus gyulladás
Férfi	63	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Pancreato-cisztto-duodenostomia	Krónikus gyulladás
Férfi	47	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Frey-műtét	Krónikus gyulladás
Nő	30	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Frey-műtét	Krónikus gyulladás
Nő	68	Pancreasfej tumor	Pylorus megtartásos pancreaticoduodenectomy (PPPD)	Adenocarcinoma pt2n0mx
Nő	75	Pancreasfej tumor	PPPD	Carcinoma shigillocellulare pt3n1mx
Nő	70	Pancreasfej tumor	PPPD	Neuroendocrin carcinoma, grade II., Pt2n1
Férfi	71	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma , pt3n1mx
Férfi	54	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma , grade II., Pt3n1
Férfi	65	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma , grade III., Pt3n1
Nő	74	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma , grade III., Pt3n0
Nő	77	Vater papilla tumor	PPPD	Adenocarcinoma , grade II. Pt2n1
Férfi	67	Vater papilla tumor	PPPD	Adenocarcinoma , grade II. Pt1nmx
Férfi	77	Vater papilla tumor	Papilla excision	Neuroendocrin carcinoma grade III. Pt2n1
Férfi	84	Vater papilla tumor	PPPD	Carcinoma in situ pt1sn0mx
Férfi	68	Vater papilla tumor	PPPD	Adenocarcinoma , pt2n1mx
Férfi	65	Vater papilla tumor	PPPD	Adenocarcinoma (mixed type), grade II., Pt4n1
Férfi	59	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Hepatico-jejunostomia	Krónikus gyulladás
Nő	56	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Gastronetro-anastomosis (GEA)	Krónikus gyulladás
Nő	74	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Cisztto-Wirsungo-jejunostomia	Krónikus gyulladás
Férfi	64	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Cisztto-Wirsungo-gastrostomia	Krónikus gyulladás
Nő	30	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Frey-műtét	Krónikus gyulladás
Férfi	45	Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	Hepatico-jejunostomia, Wirsungo-gastrostomia	Krónikus gyulladás
Férfi	56	Pancreasfej tumor	Exploratív laparotomia	Adenocarcinoma
Férfi	64	Pancreasfej tumor	Choledcho-duodenostomia	Adenocarcinoma
Nő	69	Pancreasfej tumor	PPPD	Intraductalis tubulopapillaris neoplasia (ITPN)
Nő	60	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma, grade III., Pt3n1mx
Férfi	72	Pancreasfej tumor	Exploratív laparotomia	Adenocarcinoma

Nő	60	Pancreasfej tumor	Exploratív laparotomia	Nem elérhető
Férfi	63	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma, grade III., Pt3n1mx
Férfi	77	Pancreasfej tumor	Hepatico-jejunostomia	Adenocarcinoma, ct4nmx
Férfi	67	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma III., Pt3n1mx
Nő	76	Pancreasfej tumor	PPPD	Adenocarcinoma grade III., Pt3n0mx
Férfi	56	Vater papilla tumor	PPPD	Adenocarcinoma, grade II., Pt3n1mx
Nő	68	Vater papilla tumor	Papilla excisio	Adenocarcinoma, grade II., T1b
Férfi	76	Vater papilla tumor	Choledocho-duodenostomia	P Adenocarcinoma
Nő	64	Vater papilla tumor	Hepatico-jejunostomy	Adenocarcinoma
Férfi	67	Vater papilla tumor	Pancreato-duodenectomy	Hepatopancreatic ampulla adenocarcinoma grade II., Pt4n1mx
Nő	63	Vater papilla tumor	Pancreato-duodenectomy	Hepatopancreatic ampulla adenocarcinoma grade III., Pt4n1mx
Nő	23	Egészséges	Nem történt műtét	-
Férfi	60	Egészséges	Nem történt műtét	-
Férfi	49	Egészséges	Nem történt műtét	-
Nő	53	Egészséges	Nem történt műtét	-

jelentéktelen heterogenitást jelent, 30-60% közepes heterogenitást, 50-90% „lényeges” heterogenitást, 75% feletti érték „jelentős” heterogenitást jelent. Ezen kutatás részeként SROC (Summary Receiver Operating Characteristics) analízis elvégzését is terveztük, azonban az ehhez szükséges minimum feltételek nem álltak rendelkezésre (98).

3.2 Extracelluláris vezikulák azonosítása és karakterizálása humán pancreas nedvből

3.2.1 Betegek és mintagyűjtés

Az összes használt kísérleti protokollt jóváhagyta az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT- TUKEB). A jóváhagyott protokollok alapján a kísérletek elvégzése az 1975-ös Helsinki Nyilatkozat irányelvei és rendelkezései betartása mellett történt.

A vizsgálatban szereplő krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban (CP) szenvedő betegek, valamint hasnyálmirigy ductalis adenocarcinómában (PDAC) vagy Vater-papilla (Ampulla of Vater) adenocarcinómájában (A-AC) szenvedő betegek a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján (jelenleg Semmelweis Egyetem Sebészeti, Transzplantációs és Gasztroenterológiai Klinika) álltak kezelés alatt. A Vater papilla tumoros betegek bevonásával való célunk az volt, hogy kiderítsük, van -e tumoros eredetre utaló potenciális biomarkerként szolgálhatnak -e az ezen betegektől nyert

pancreas nedvből származó extracellulári vezikulák a pancreas deji pancreas ductalis adenocarcinomás betegektől nyert extracelluláris vezikulák mellett. A krónikus pancreatitis betegektől vett minták célja az volt, hogy mivel egészséges hasnyálmirigy szövethez műtői körülmények között nem lehet jutni, illetve számos etikai aggályt vetne fel, ezért a tumoros betegek kontrollcsoportjaként krónikus pancreatitisben szenvedő betegek szövetmintáit használtuk. A 2. Táblázat az AJCC ("American Joint Committee on Cancer") rendszer szerint foglalja össze azoknak a betegeknek az adatait és szövettani diagnózisát, akik részt vettek a vizsgálatban (99, 100). A hasnyálmirigynedv gyűjtése műtétek során történt. Olyan műtétek során, ahol elkerülhetetlen volt a Wirsung vezeték megnyitása (parciális pancreatododenectomia, Vater-papilla excisio, dekompresziós műtétek) 20G-s kanült vezettünk az átvágott Wirsung vezetékbe és 1-5 ml hansyát szívtunk le, vér nélkül, majd ezt követően a műtétet a terv szerint folytattuk. A hasnyálmirigynedv mintákat 2x15 perces 2500 g-n történő centrifugálásnak vetettük alá, majd -80°C-os fagyasztóban tároltuk felhasználásig. Előzetes tájékoztatást követően minden résztvevő beteg beleegyező nyilatkozatot tett.

3.2.2 Sejtvonalak

Dr. Klaus Felix (Heidelbergi Egyetem) szolgáltatta a kutatáshoz szükséges Capan-1 és MIA PaCa-2 pancreas ductalis adenocarcinoma (PDAC) sejtvonalakat. Ezeket a sejtvonalakat 20% (v/v) FBS (fetal bovine serum) tartalmú IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) táptalajon és 10% (v/v) FBS tartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) táptalajon tenyésztettük. A sejtvonalakat 2mM glutamin, 1% Ab/AM (antibiotikus/antimikrobiális adalékok) koncentrációval 37°C-on 5% CO₂/ levegő keverékben tenyésztettük és rendszeresen teszteltük Mycoplasma kontamináció kizárása céljából.

3.2.3 EV izolálás

A sejtvonalakból származó EV-k esetén a sejteket háromszor átöblítettük PBS (Phosphate Buffer Saline) oldattal, az EV termelés 24 óráig tartott, szérummentes közegben, hogy elkerüljük a minták beszennyezését az FBS-ben található EV-kel. A sejtek életképessége szérummentes közegben 24 órán keresztül 90-95% feletti volt, ezt megerősítette az annexinV-FITC és propidium jodid (mindkettő BD Biosciences) festés a korábban leírtaknak megfelelően (101). Három méret szerint elkülöníthető EV frakciót izoláltunk.

A sejtvonalakból származó EV-k esetén először 10 percig tartó 300 g-n történő centrifugálás segítségével távolítottuk el a sejteket. A hasnyálmirigynedvből származó minták esetén a mintákat négyszer hígítottuk fel PBS oldattal EV izolálás előtt. Következő lépésként a mintákat gravitáció segítségével 5 µm-es pórusméretű szűrőn (Millipore) szűrtük át, majd szobahőmérsékleten 2000 g-n 10 percig centrifugáltuk, amely végeredményeként „nagy” EV-ben gazdag pelletet kaptunk. A felülúszókat ezt követően ismételt gravitáció által 0,8 µm-es pórusméretű szűrőn (Millipore) bocsátottuk át, majd szobahőmérsékleten 12600 g-n 30 percig centrifugáltuk. Ennek eredményeként „közepes” EV-kben gazdag pelletet kaptunk. Utolsó lépésként a felülúszókat Optima MAX-XP MLA-55 rotorral rendelkező ultracentrifugán (Beckman Coulter Inc.) 100000 g-n 70 percig centrifugáltuk 4°C-on. Ennek eredményeként „kis” EV-ben gazdag pelletet kaptunk.

A hasnyálmirigynedvből származó EV-ket anti-CD63-mal fedett mágneses mikrogyöngyök (Thermo Fisher) segítségével izoláltuk. A hasnyálmirigynedvből származó mintákat 300 g-n 5 percig, majd 2000 g-n 20 percig centrifugáltuk. A mágnesezett mikrogyöngyöket 1 %-os BSA-val (Bovine Serum Albumin) 30 percig blokkoltuk. Ezt követően a minták 250 mL hígítatlan hasnyálmirigynedv felülúszó 12 mL mikrogyöngy/minta került inkubálásra éjszakára folyamatos rotáció mellett 4°C-on. Ezt követően áramlási citometriás detektálás történt a mikrogyöngyökhöz kötött EV-k fluorescens anti-CD63 PE (Phycoerythrin- Sigma Aldrich) festését követően.

3.2.4 TRPS (Tunable resistive pulse sensing - állítható ellenálláson alapuló pulzusérzékelés) mérések

Az EV-ket qNano (TRPS- IZON Science) segítségével elemeztük, a korábban leírtaknak megfelelően [6,30,31], legalább 500 részecskeszámmal a NP100, NP400, NP800 és NP2000 nanopórusokon. Az eseményeket stabil árammal (115-145 nA), 12 pA alatti gyökös négyzetes zajjal (root mean square noise) és lineáris részecske-arányokkal rögzítettük CPC100B, CPC400E, CPC800D és CPC2000D segítségével (mind IZON Science) a kalibrációs mikrogyöngyök használatával.

3.2.5 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

Az EV pelleteket 4%-os paraformaldehyd oldattal fixáltuk, majd PBS oldattal mostuk és 30 percig utófixáltuk 1%-os OsO₄ (Osmium tetroxid- Taab) oldatban. Az öblítést követően a pelletet desztillált vízzel öblítettük, majd alkoholos oldatban dehidratáltuk. Ezután 1%-os uranyl-acetáttal 50% etanolban 30 percig blokkfestést végeztünk, majd a mintákat Taab 812 (Taab) beágyazóanyaggal beágyaztuk. A mintákat 60 °C-on egy éjszakán át polimerizáltuk, majd ezt követte a szekcionálás és elemzés Hitachi 7100 elektronmikroszkóp (Hitachi Ltd.) használatával.

3.2.6 Extracelluláris vezikulák áramlási citometriával történő vizsgálata

Az EV-ket inkubáltuk 1 ml-es mennyiségben minden kötődő reagenssel, antitesttel vagy izotípus kontrollal (amelyek felsorolása a 3. Táblázatban található) a sötétben, szobahőmérsékleten, 30 percig 50 mL-es térfogatban, majd 300 mL-re hígított mennyiségben a mérés előtt.

3. Táblázat: Az áramlási citometriás mérésekhez használt affinitási reagenszek és izotípus kontrollok (2)

Ez a táblázat összefoglalja az áramlási citometriás mérésekhez használt affinitási reagenszeket és izotípus kontrollokat



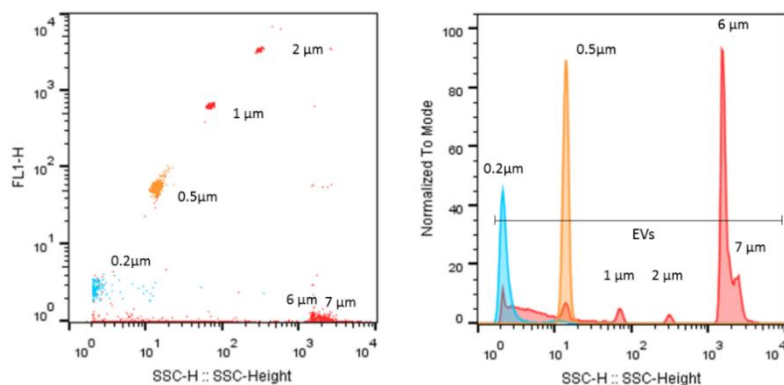
Affinitási reagenszek	Katalógusszám	Forgalmazó
annexin V APC	550474	BD Biosciences
anti-MUC-1 PE	BZ-355604	Biolegend
anti-MUC-4 APC	781631	Novus Biologicals
anti-MUC-5AC Alexa 488	45M1	Novus Biologicals
anti-CFTR FITC	sc-3766683	Santa Cruz
anti-MDR PE	A18376	Thermo Fisher
anti-CD9	A15698	Thermo Fisher
anti-CD63	2365100	Soft Flow
anti-CD81	MA1-81261	Biocenter
anti-EPCAM	2221040	Sony Biotechnology

anti-CD107a	1208130	Sony Biotechnology
anti-MUC-4	FAB8195A	R&D Systems
anti-MUC-5AC	NBP2-15196AF488	Novus Biological
anti-CFTR	sc-3766683	Santa Cruz
anti-MDR1	A18376	Thermo Fisher
anti-HSP70	3840020	Soft Flow
TO-PRO3	2216020	Thermo Fisher
annexin V	3804725	Soft Flow
Izotípus kontroll	Katalógusszám	Forgalmazó
mouse IgG1	51-13854X-2	BD Biosciences
mouse IgG2a	400211	Biolegend
Mouse IgG2b	IC0041A	R&D Systems

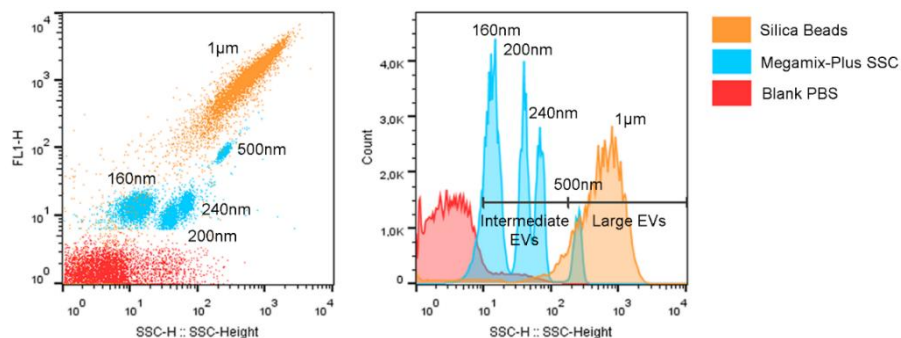
Kiemelendő, hogy a CD63 és CD81 felszíni markereket az mintában jelen levő extracelluláris vezikulák jelenlétének igazolása céljából vizsgáltuk ezekkel a rájuk jellemző felszíni markerekkel (77).

Az autofluoreszcencia és a kötődő reagensek fluoreszcenciája az EV-k hiányában is meghatározásra került és a 0,1% Triton X100 lízis használata kontrollként szolgált az EV-k feloldása segítségével EV-kból érkező jelek megszakításával. Az izolált „kis” EV-ket 4 µm-es aldehid/ szulfát mikrogyöngyökhöz kapcsoltuk (Life Technologies) és 1%-os BSA-val blokkoltuk PBS oldatban 2 óráig, majd ezt követően 100 mM glycinnel.

Az **2A. Ábrához** az eszközbeállítások és kapuk úgy lettek beállítva, ahogy az **1A. Ábrán** látható. Az **2B. Ábrához** az eszközbeállításokat és kapukat korábban leírt módon (101-103) állítottuk be, Megamix gyöngyöket (BioCytex) és 1 µm-es Silica Beads Fluo-Green (Kisker) mikrogyöngyöket használva, ahogy azt az **1B. Ábrán** láthatjuk. Az adatok elemzéséhez FlowJo szoftvert (Treestar) használtunk.



1A. Ábra: Áramlási citometria kapu beállítók a ThermoFisher áramlási citometria szubmikron részecskeméret referenciakészletével meghatározva (2)



1B Ábra: Áramlási citometria kapu beállítások, amelyeket Megamix-Plus SSC és ismert méretű szilícium-dioxid gyöngyök alkalmazásával határoztunk meg. (2)

Az EV pelletet 10 mL vízben reszuszpendáltunk, majd a fehérjét ismételt fagyás-olvasás ciklusokkal extraháltuk, amelyet ezután miniatürizált tripszin emésztés követett, a korábbiakban leírtaknak megfelelően (104). Az emésztett peptidek elemzése Bruker Maxis II Q-TOF készüléssel történt, amely CaptiveSpray nanoBooster ionizációs forrással volt felszerelve. A peptidek szétválasztása 25 cm-es Waters Peptide BEH C18 nanoACQUITY 1,7 μm részecskeátmérőjű UPLC oszlopon a Dionex Ultimate 3000 Nano LC rendszeren. A befogás az Acclaim™ PepMap100™ C18 NanoTrap oszlop használatával történt (5 μm , 100 Å, 100 μm $\times$ 20 mm, Thermo Fisher). Az adatokat Funrich (105) és Scaffold 4.5.3 szoftverekkel értékeltük ki és Mascot 2.5 (Matrix Science) valamint X!Tandem (The GPM, thegpm.org; 2007.01.01.1 verzió) keresőmotorokat

használtunk. A fehérjeazonosítás kritériumai a Swissprot (2015_08) adatbázis alapján, a Molecular and Cellular Proteomics szigorú irányelveinek megfelelően lettek meghatározva. Röviden összefoglalva, 7 ppm peptidtömeg-tolerancia, 0,05 Da fragmentumtömeg-tolerancia és 2 hibás hasítás volt engedélyezve, valamint a következő modifikációkat kerestük: karbamidometiláció mint fix modifikációk, deamidáció (NQ), oxidáció (M) és pirókarbamidometiláció (N-terminális C) mint változó modifikációk.

3.2.7 Az EV készítmények fehérje és lipid meghatározása

Az EV-k fehérjetartalmát a Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher) segítségével, míg a lipidtartalmát a korábban leírt sulfo-phospho-vanillin reakcióval határoztuk meg (101).

3.2.8 Statisztikai elemzés

Az adatokat a GraphPad Prism v.4 szoftverrel elemeztük, ahol a normál eloszlású paraméterekhez párosítatlan t-próbát használtunk, míg nem normális eloszlású paraméterek esetén a Mann-Whitney tesztet használtuk. A 0,05-nél kisebb p-értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

3.3 Pancreas cisztafolyadékából izolált extracelluláris vezikula mikro-RNS tartalom alapján különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók a hasnyálmirigy cisztás elváltozásokkal rendelkező betegek

3.3.1 Betegek

Az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT-TUKEB, IV/6522-1/2020/EKU) jóváhagyta az összes emberi mintával végzett kísérletet és előzetes tájékoztatást követően minden beteg beleegyező nyilatkozatot tett. A mintákat 2020 július és 2023 április között gyűjtöttük.

Azokat a felnőtteket választottuk be a kutatásba, akiknél hasnyálmirigy cisztás elváltozásokat észleltek és indokolt volt az EUS (endoszkópos ultrahang) vizsgálat elvégzése a jelen irányelvek alapján (32).

Röviden, a betegeknél EUS vizsgálat indikációja állt fenn, ha bármelyik "aggasztó jel" jelen volt (pl. hasnyálmirigygyulladás a beteg kórelőzményében, ciszta átmérője 30-40

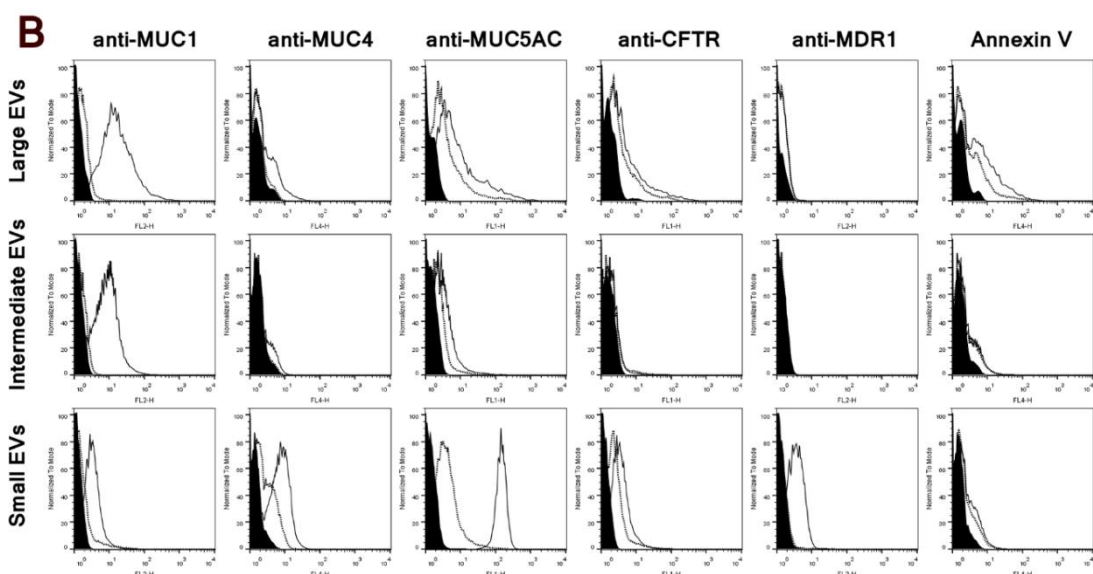
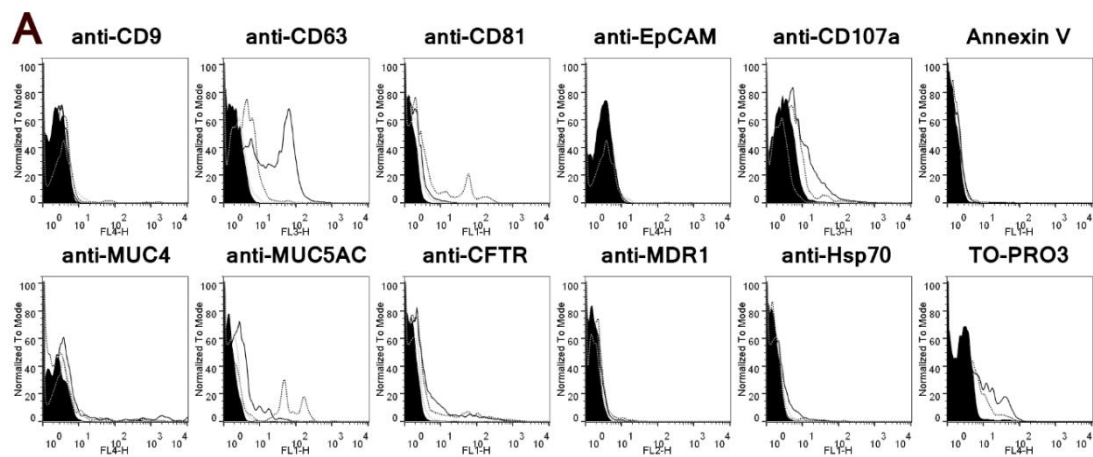
mm között, kevesebb, mint 5 mm-es falis csomó, megvastagodott, halmozó cisztafal, fő hasnyálmirigy-vezeték átmérője 5-9,99 mm, emelkedett CA19-9 szint a vérben vagy évente több mint 5 mm-es növekedés a ciszta átmérőjében). Ha bármelyik abszolút indikáció a sebészeti kezelésre jelen volt, ideértve az obstrukciós icterust, a 40 mm-nél nagyobb cisztaátmérőt, az 5 mm-nél nagyobb cisztafalas csomót, a 10 mm-nél nagyobb fő hasnyálmirigy-vezeték átmérőt vagy a fő hasnyálmirigy-vezeték érintettségének gyanúját, akkor a betegeknél EUS (endoszkópos ultrahang) vizsgálatot is végeztünk.

Csak azokat a betegeket vontuk be, akiknek a cisztafolyadék mintája a vizuális vizsgálat során nem tartalmazott vért. Azok a betegek, akik műtéten estek át, végleges szövettani eredményekkel rendelkeztek az eltávolított mintából, ezért ők szolgáltak kontrollként az EUS morfológiai és miRNS analízis eredményeinek szempontjából. A betegek klinikai és diagnosztikai paraméterei a **4. Táblázatban** vannak feltüntetve.

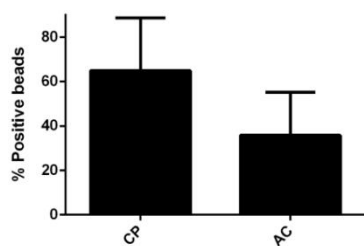
A betegeket multidiszciplináris munkacsoportmegbeszélés alapján nem-M és M kategóriákba lettek sorolva. A felfedező kohorsz (discovery cohort) n=7 nem-M beteget és n=6 M csoportba sorolt beteget tartalmazott. A megerősítő kohorsz (validation cohort) n=30 nem-M és n=24 M-csoportba tartozó beteget tartalmazott. Három nem-M és két M minta került kizárásra (mindegyik a megerősítő kohorszból) a minták centrifugálása után látható vérral történt szennyeződésük miatt. A bevont betegek klinikai és diagnosztikai paramétereit a **4. Táblázat** tartalmazza.

3.3.2 Humán hasnyálmirigy cisztafolyadék minták

A vizsgálatok elvégzéséhez Olympus EU-ME2 GF-UCT180 eszközt használtunk, a folyadékmintákat vékonytű aspirációs (FNA) technikával vettük a betegek hasnyálmirigy cisztafolyadék tartalmából (EchoTip® Ultra Endoscopic Ultrasound Needle tű használatával). A hasnyálmirigy cisztafolyadék mintákat Vacuette csövekbe (Greiner Bio-One, 456085) gyűjtöttük, 300 g-s centrifugálással 5 percig centrifugáltuk, majd a felületi folyadékot aliquotokra osztottuk és -80 °C-on hosszú távú tárolásra lefagyasztottuk (legfeljebb 30 hónapig). Az egyes aliquotokat csak egyszer használtuk fel az EV izolálására és/vagy a teljes cisztafolyadék elemzésére.



C Pancreatic EV capture on anti-CD63 beads



2A Ábra: A pancreasnedv extracelluláris vezikulákat áramlási citometriával vizsgáltuk az egyes tömegspektrometriával azonosított fehérjék jelenlétének kimutatása céljából. A krónikus pancreatitis (folytonos fekete vonal) és pancreas tumoros (Vater papilla és pancreas ductalis adenocarcinoma) csoportba tartozó betegektől vett (szaggatott fekete vonalak) extracelluláris vezikulákat, valamint a detergens-lizált kontrollokat (töltött fekete hisztogram) fluoreszcens antitestek, TO-PRO3 és Annexin V segítségével vizsgáltuk. Az izotípus-kontrollok kötődése szürke szaggatott vonallal van jelezve. (2)

2B Ábra: Az extracelluláris vezikulákat áramlási citometriával vizsgáltuk a tömegspektrometriával azonosított fehérjék egy részének jelenlétének kimutatása céljából. A Capan-1 (folytonos fekete vonal) és a MIA PaCa-2 (szaggatott fekete vonal) sejtekből származó extracelluláris vezikulákat, valamint a detergens-lizált kontrollokat (töltött fekete hisztogramok) anti-MUC1, anti-MUC4, anti-MUC5AC, anti-CFTR, anti-MDR1 és annexin V segítségével elemeztük. Az izotípus kontrollok kötődését szürke szaggatott vonalak jelzik. (2)

2C Ábra: A krónikus pancreatitis és adenocarcinomás betegek hasnyáliból származó extracelluláris vezikulákat anti-CD63 mágneses gyöngyökkel fogtuk be, majd fluoreszcensen jelölt anti-CD63 antitesttel áramlási citometriával detektáltuk. (1)

4. Táblázat: A vizsgálatba bevont betegek adatai és vizsgált paramétereik. A felfedező kohorsz mintái sárgával vannak jelölve (3)									
A betegek adatai, akikről a minták származnak Data and diagnostic values of patients with samples included in the study				Sárha szín: felfedező kohort					
Azonosító	Életkor (év)	Nem (férfi: 1, nő: 2)	Diagnózis	Citológia	CEA (ng/ml)	Képalotó	Képalotó típus	EUS	Méret/ növekedés
			PC:0. S-PCN:1. M-PCN: 2	Nem-mucinózus:1 mucinózus:2		Nem-mucinózus:1 mucinózus:2	CT: 1. MR: 2. CT+MR: 3	Nem-mucinózus:1 mucinózus:2	<4cm or not growing:1. >4cm or growing:2
d1	41	2	2	1	5758,8	2	1	2	2
d2	67	2	2	2	594	2	1	2	2
d3	75	2	0	1	9,3	1	1	1	2
d4	69	2	1	1	9,4	2	1	2	1
d5	64	2	2	2	576,4	2	3	2	1
d6	50	1	2	1	0,5	2	1	2	1
d7	42	1	0	1	13,8	1	1	1	2
d8	69	2	2	1	869	2	2	2	1
d9	54	2	2	1	447	2	2	2	1
d10	42	1	0	1	0,7	2	1	1	2
d11	42	2	0	1	54,5	2	1	1	2
d12	74	2	0	-	-	1	1	1	2
d13	52	1	0	1	0,5	1	2	1	2
3	83	1	2	1	3720,3	2	2	2	1
5	83	2	0	1	47,8	1	1	1	2
8	79	1	0	1	105,5	1	1	1	1
9	61	2	1	1	26,4	2	2	2	1
14	55	2	1	1	8,2	1	1	1	1
17	71	1	0	1	32,7	2	2	1	1
19	25	2	0	1	1,2	2	1	1	2
20	38	2	1	1	0,8	2	3	2	2

24	52	2	2	2	1615,7	2	1	2	2
25	71	2	2	1	0,5	2	2	2	1
27	81	2	2	1	92	2	2	2	1
28	68	2	2	2	276,1	2	2	2	1
29	68	2	2	1	54,5	2	2	2	1
30	50	2	1	1	0,5	2	3	1	1
31	32	1	2	1	10	2	2	2	1
32	39	2	2	2	5730	2	1	2	2
34	41	2	2	1	363,7	2	1	2	1
36	68	1	0	1	<0,5	-	1	1	1
37	41	1	2	1	818,4	2	1	1	2
38	72	1	2	1	294,2	2	2	2	1
39	62	2	0	1	71,8	-	1	1	1
40	83	1	2	1	1	2	1	2	2
41	34	2	2	1	2279,4	2	1	1	2
42	76	1	1	1	4,5	2	1	1	2
43	74	2	2	1	3265,2		1	2	1
44	42	2	0	1	<0,5	1	1	1	2
45	80	2	2	2	<0,5	2	1	2	2
46	36	2	2	1	794	2	1	1	2
47	84	2	1	1	0,8	1	1	1	2
48	74	2	1	1	92,8	2	1	1	1
49	77	2	2	1	3142,4	1	1	2	1
50	50	1	1	1	202,6	1	1	1	
51	80	2	2	1	3731,3	2	1	2	1
52	65	2	0	1	32,6	1	1	1	1
54	65	1	2	2	1119,9	2	1	2	1
55	64	1	2	1	399,6	1	1	2	1
56	26	2	1	1	52,6	1	1	1	1
57	75	2	1	1	2667,4	1	1	2	1
58	67	2	0	-	-	1	1	1	2
59	12	1	0	-	-	1	2	1	2
60	66	2	2	1	164,5	2	2	2	1
61	23	1	1	1	1,5	2	1	1	1
62	59	1	1	1	15,2	2	1	1	1
63	41	2	0	1	30,5	1	2	1	1

65	57	1	0	1	45,3	1	1	1	1
66	75	2	1	1	0,9	1	3	1	1
67	73	1	2	1	69,9	2	2	2	1
68	33	2	1	1	<0,5	1	2	1	1
69	72	2	1	1	<0,5	1	1	1	1
72	43	1	0	1	35,3	1	1	1	1
73	76	2	1	1	41,3	2	1	2	1
74	67	2	2	2	-	2	1	2	2
75	37	1	0	1	32,2	1	1	1	2
76	85	1	2	2	<0,5	2	1	2	1

3.3.3 NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)

A tisztafolyadék mintákat (500 µL) sorozatosan centrifugálásnak vetettük alá 300 g-n 5 percre, 2000 g-n 20 percre és 12,500 g-n 40 percre (minden lépés 16 °C-os hőmérsékleten történt). A felülúszókból minden centrifugálási lépést követően aliquotokat készítettünk. Sorozatos hígítások (50x, 100x, 500x, 1000x és 5000x) készültek a mintákból foszfát pufferes sóoldattal (PBS), és 1 ml-t használtunk az NTA-val történő mérésekhez. A részecskeméret-eloszlás és a koncentráció mérése ZetaView Z-NTA készülék (Particle Metrix) használatával történt. Minden mintához olyan hígítást választottunk, amely az EV-k koncentrációját az eszköz optimális érzékelési határain belül tartotta. Az alapértelmezett beállítások szerint tizenegy sejtpozícióban végeztük a szkennelést 25 °C-on annak érdekében, hogy növeljük a mérések megbízhatóságát. A kamera beállításai minden mérésnél azonosak voltak, a következők szerint: automatikus expozíció, „gain”: 28.8, „offset”: 0, zársebesség: 100, érzékenység: 73. A videók elemzése a ZetaView Analyze 8.05.10 szoftverrel történt, ahol a minimális terület 5, a maximális terület 1000, a minimális fényerő pedig 20 volt. Egyes kísérletek során az EV-ket (a 300g és 2000g-os centrifugálási lépések után) lipofil membránfestő BioxML-Yellow festékkel (Bioxol, Budapest, Hungary) jelöltük (106). A kalibráció fluoreszkáló sárga-zöld (YG) nanorészecskékkel történt, és a paramétereket a következőképpen állítottuk be: zársebesség: 100, érzékenység: 85, korrekciós faktor: 1,27. Az összes érzékelhető részecskéhez viszonyítva kiszámítottuk a fluoreszkálóan festett részecskék arányát. A kolloid rendszer stabilitásának értékeléséhez megmértük az EV minták zéta potenciálját 2 SL pozícióban PBS-ben 0,1xPBS/pH=6,9 hígításban.

3.3.4 EV-k detektálása antitestbevonatú mikrogyöngyökkel és áramlási citometriával
A mintákat 300 g-s centrifugálással 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót, vagy annak 10-szeres hígítását 200 µl-es mennyiségben inkubáltuk 8 µl vagy 4 µl anti-CD63 vagy anti-CD81-bevonatú 10606D és 10616D mágneses gyöngyökkel (Thermo Fisher). Az inkubáció egy éjszakán át tartott 4°C-on folyamatos rotáció mellett. Ezután a gyöngyöket háromszor mostuk PBS oldatban, majd 50 µl PBS-ben reszuszpendáltuk felcímkezéshez. A pozitív gyöngyök arányát anti-CD63 PE (2 µl/50 µl, SAB47000218, Merck) vagy anti-CD81 FITC (1 µl/50 µl, A15753, Molecular Probes) antitestekkel és áramlási citometriával határoztuk meg (FACS Calibur, BD Biosciences). A nem specifikus háttér meghatározásához a mikrogyöngyöket DMEM-mel inkubáltuk és ezt követően ezeket a mikrogyöngyöket kontrollként jelöltük.

3.3.5 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A differenciális centrifugálás utolsó lépésének (12,500g) felülúszóját 70 percig, 4°C-on ultracentrifugáltuk (UC) 100,000 g-n. A pelletet PBS-ben reszuszpendáltuk, majd megismételtük az előbbi UC lépést. Az EV-ket 30 percig 4% paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk, majd 30 percig 2% PFA+2% glutáraldehidoldattal szobahőmérsékleten fixáltuk. Ezt követően PBS-sel mostuk le, majd post-fixációs eljárást alkalmaztunk 1% OsO₄-ben 15 percig. A pelletet fokozatosan etanollal dehidratáltuk, majd 30 percig 1% uranyl-acetáttal 50% etanolban festettük, végül Taab 812 (Aldermaston) epoxi gyantába ágyaztuk. 12 óra 60°C-on történő polimerizációt követően Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems) 50-60 nm vastag ultravékony szeleteket metszettünk belőle. A TEM képek Hitachi 7100 TEM készülékkel (Hitachi Ltd, Japán) készültek, amelyhez Veleta 2k x 2k MegaPixel oldalra szerelt TEM CCD kamera (Olympus) volt csatlakoztatva.

3.3.6 MiRNS analízis

A 300 g-s centrifugálás utáni felülúszót 500 µL térfogatban inkubáltuk 20 µL anti-CD63-bevonatú és 10 µL anti-CD681-bevonatú mágneses gyöngyök keverékével éjszakára, 4°C-on folyamatos rotációval. Azonos kezdeti EV-számot (7x10⁸ EV, NTA alapján meghatározva) használtunk kísérletekben, majd DMEM (Thermo Fisher) került a mintákhoz, amíg el nem érte a 500 µL térfogatot, majd a mintákkal azonos mennyiségű mikrogyönggyel inkubáltuk. A gyöngyöket háromszor mostuk PBS oldattal (3x500 µL), majd 700 µL Qiazol (Qiagen) oldattal lizáltuk. A teljes RNS izolációja, beleértve a

miRNS-t is, a miRNEasy Micro Kit (Qiagen) segítségével történt, a gyártó előírásának megfelelően. A szabad miRNS analízise során 400 μ L cisztafolyadék a miRNEasy serum/plasma kit (Qiagen) használatával került feldolgozásra. A miRNS-array kártyákhon 3 μ L teljes RNS fordított transzkripciója történt Megaplex RT primerrel, majd a mintákat Megaplex PreAmp Primerekkel (Thermo Fisher) elő-amplifikációt végeztünk a gyártó előírásának megfelelően. A TaqMan™ Array Human MicroRNA A Cards v2.0-k (Thermo Fisher) az ABI 7900HT készüléken kerültek lemérésre. A küszöbértéket 0.2-re állítottuk. A pseudociszták (PC) és a szerózus PCN-eket (összesen a nem-M-PCN) M-PCN csoporttal történő összehasonlítása során, azokat a miRNS-eket választottuk ki további elemzésre, amelyek jelen voltak minden mintában ($C_t < 35$) a megadott feltételek mellett, de legfeljebb egy mintában voltak csak jelen a másik csoportban.

Az egyedi miRNS-ek méréséhez 2 μ L teljes RNS-t fordított transzkripció reakciónak vetettünk alá a TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher) használatával a gyártó protokollja szerint. Azon kísérletekben, ahol az RNS mennyiség normalizálását végeztük, 25 ng teljes RNS-t használtunk, amely 2 μ L térfogatra lett vízzel hígítva. A miRNS-szinteket ezután a TaqMan® Fast Advanced Master Mix, TaqMan® Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher) és az ABI 7900HT Fast real time idejű PCR készülék vagy a QuantStudio™ 7 Flex készülék (Thermo Fisher) segítségével 40 ciklusban analizáltuk. Az elemzési azonosítók megtalálhatóak az **5. Táblázatban**. Összehasonlítható eredmények elérése érdekében ugyanazon kísérleti sorozatok méréseit ugyanazon készüléken végeztük.

3.3.7 Statisztikai elemzés

Mann-Whitney U-próbát és a chi-négyzet próbát használtunk, melynek során $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ és $***p < 0,005$ szignifikancia szinteket alkalmaztunk. A statisztikai kiértékelés és a vizualizáció során a Microsoft Excel és az SPSS version 25. szoftvereket használtunk. Az oszlopdiagramokon a mean+SD értékeket, míg a box diagramokon a medián, 25. és 75. percentilis értékek láthatóak.

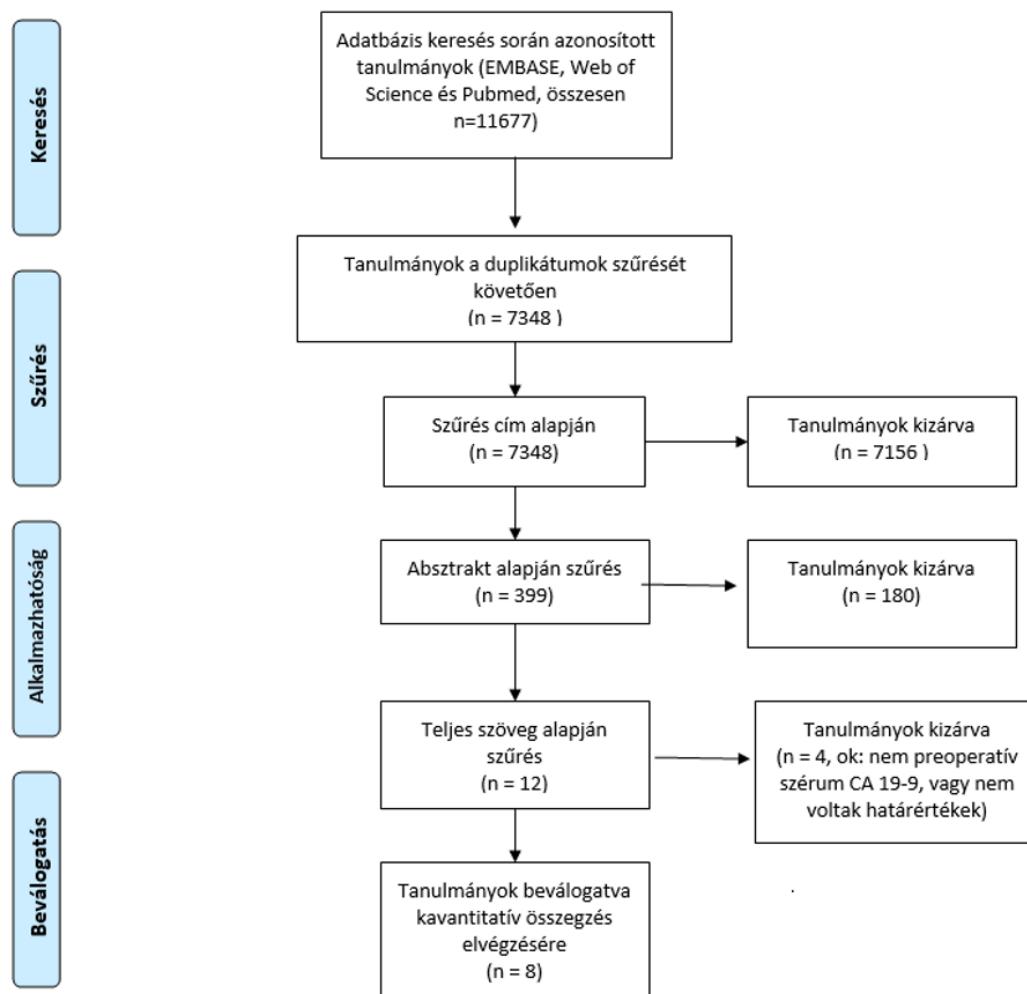
5. Táblázat: A miR-200b jelenléte egy kivételével minden mucinózus PCN (M-PCN) mintában és hiánya az összes nem M-PCN mintában a felfedező kohorszon végzett vizsgálatban (3)							
Ct values from the discovery samples							
		miR28-3p		miR-200b		miR-375	
Szám	Csoport						
d3	not-M (PC)	nem észlelt		nem észlelt		nem észlelt	30,28
d4	not-M (S-PCN)	nem észlelt		nem észlelt		nem észlelt	32,54
d7	not-M (PC)	33,99		nem észlelt		nem észlelt	29,11
d10	not-M (PC)	nem észlelt		nem észlelt		nem észlelt	34,82
d11	not-M (PC)	nem észlelt		nem észlelt		nem észlelt	32,91
d12	not-M (PC)	nem észlelt		nem észlelt		nem észlelt	30,04
d13	not-M (PC)	nem észlelt		nem észlelt		nem észlelt	33,06
Frequency of undet.		0,86		1		1	0
d1	M-PCN	28,28		21,25		24,14	24,64
d2	M-PCN	nem észlelt		28,10		26,52	29,96
d5	M-PCN	27,80		22,08		21,25	24,29
d6	M-PCN	nem észlelt		nem észlelt		nem észlelt	31,67
d8	M-PCN	33,38		26,66		undet	28,13
d9	M-PCN	nem észlelt		28,07		25,26	29,40
Nem észlelték gyakorisága		0,5		0,17		0,33	0
p-érték a nem észlelt megjelöléshez (Chi-négyzet teszt, „Fisher's exact” teszt)		0,27		0,005		0,02	NA

4. EREDMÉNYEK

4.1 A preoperatív szérum CA 19-9 szint és a PDAC reszekabilitása összefüggésének vizsgálata

4.1.1 Keresési eredmények

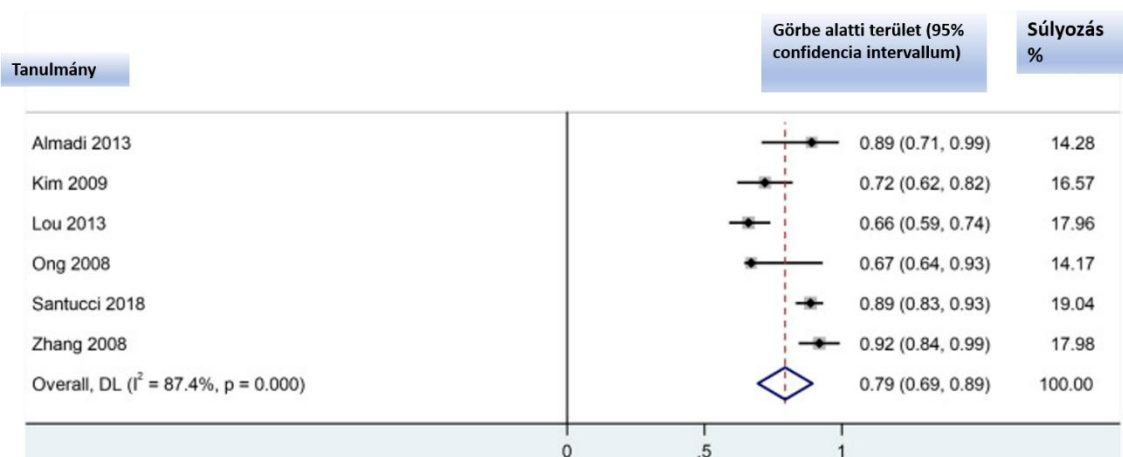
Az elvégzett szisztematikus keresés összesen 11,677 találatot eredményezett (EMBASE: 6111, PubMed: 2928, Web of Science: 2638). A keresés részletes PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) folyamatábrája az **3. Ábrán** látható. A beválasztási és kizárási kritériumok alapján nyolc publikációt választottunk ki a kvantitatív elemzéshez (107-115).



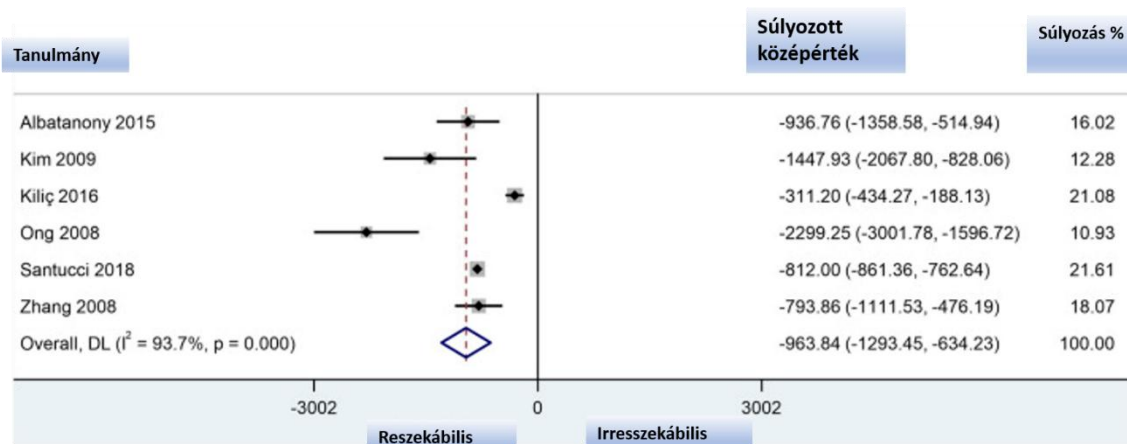
3. Ábra: A keresés részleteit ábrázoló folyamatábra (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses- PRISMA) (1)

4.1.2 A preoperatív szérum CA 19-9 szint a sebészi reszekabilitás előrejelzésében

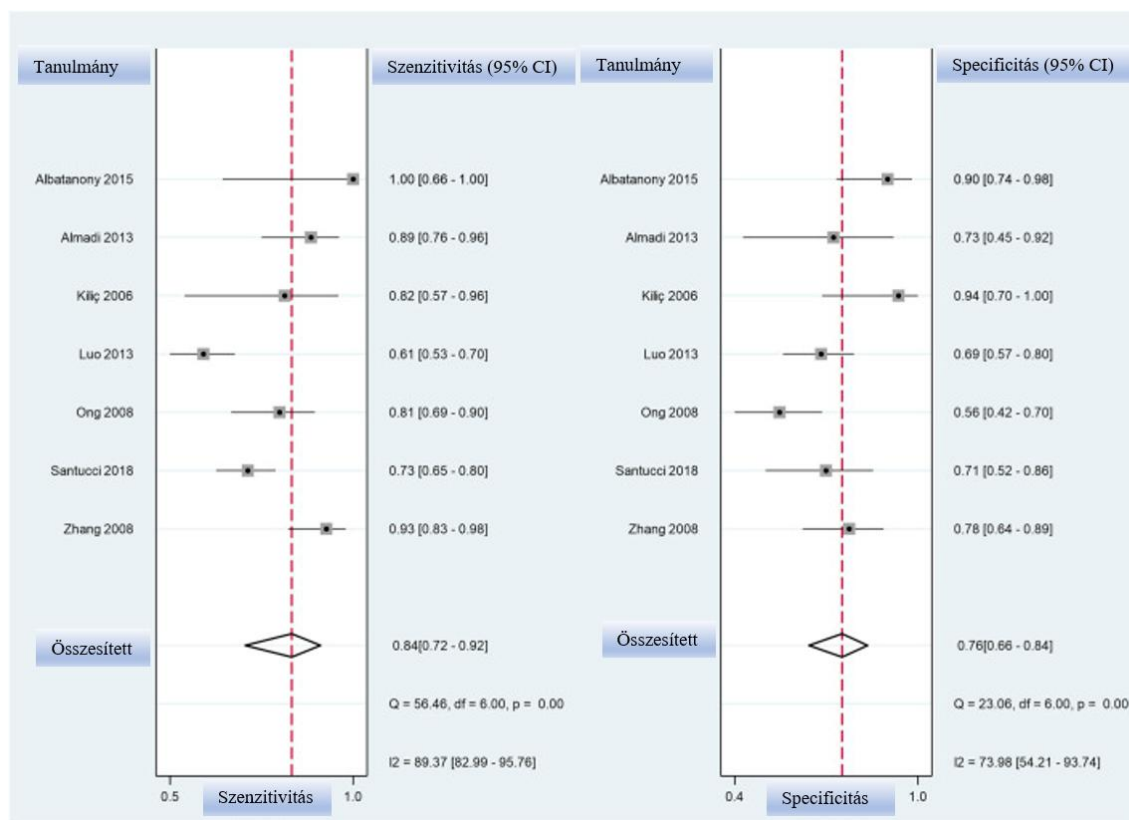
A fent említett nyolc publikáció közül hat alkalmaz ROC (Receiver Operating Characteristic) görbéket a betegség irreszekabilitását jelző szérum CA 19-9 küszöb meghatározása céljából. A végső összesített, a ROC görbékből számolt AUC (Area Under Curve- Grafikon alatti terület) eredmény 0,79 (Konfidencia Intervallum: 0,694-0,893) volt. Ez alapján a preoperatív szérum CA 19-9 szint egy „elfogadható” („fair”) előrejelzője a reszekabilitásnak, de nem érte el a 0,8 értéket, vagyis nem klasszifikálható a „jó” kategóriába (**4. Ábra**) (116). A preoperatív CA 19- 9 értékek szignifikáns különbséget mutattak a reszekábilis és irreszekábilis csoportban. A preoperatív szérum CA 19-9 értékek 964 U/ml-rel ($p < 0,001$) alacsonyabbak voltak az operábilis csoportban, mint az az irreszekábilis csoportban (**5. Ábra**). Elvégeztük az I négyzet próbát a minta heterogenitás megvizsgálása céljából. Az elvégzett vizsgálat eredménye alapján (87,4%, tehát meghaladja a 75%-os határértéket), jelentős volt a vizsgált populáción belül a heterogenitás. A vizsgált publikációk nyers adataiból kiszámoltuk az összesített szenzitivitás és specificitás értékeket (Valós Pozitív - VP, Valós Negatív- VN, Álpozitív- ÁP és Álnegatív- ÁN). Az eredményeket az **6. Ábra** tartalmazza.



4. Ábra: A görbék alatti terület (Area Under Curve- AUC), ami a CA 19-9 prognosztikai hatékonyságát mutatja a hasnyálmirigy ductalis adenocarcinoma műtéti reszekabilitásának meghatározására (1)



5. Ábra: Súlyozott átlagos különbségek (Weighed Mean Difference- WMD) a reszekábilis és irreszekábilis pancreas ductalis adenocarcinomával rendelkező betegek preoperatív szérum CA 19-9 szintjének U/ml-ében (1)



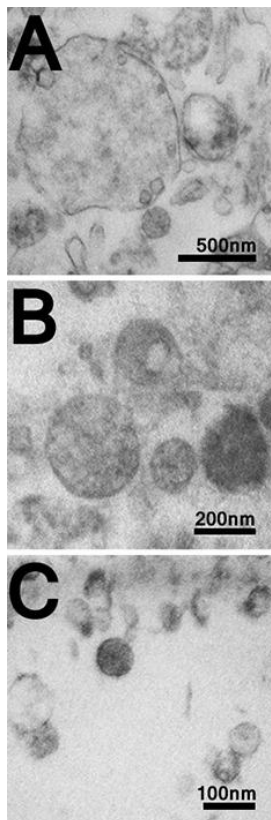
6. Ábra: A poolozott szenzitivitási és specifitási értékeket a vizsgálatokban szereplő nyers adatokból számítottuk ki (Valós Pozitív- True Positive (TP), Valós Negatív- True Negative (TN), Álpozitív- False Positive (FP), Álnegatív- False Negative (FN)) (1)

4.1.3 Az Elfogultsági Kockázat vizsgálatának eredménye

Az úgynevezett „elfogultsági kockázat” („Risk of Bias”) egy kivétellel minden beválogatott tanulmány esetében alacsony volt, és mindegyik beválogatott tanulmány alkalmazhatósága alacsony kockázatú volt (**7. Ábra**). Az elfogultság kockázata egy tanulmány esetén volt magas a résztvevők tekintetében, illetve egy tanulmány esetén volt tisztázatlan („unclear”). Az elfogultsági kockázat az összes többi tanulmány esetén alacsony volt. Az előrejelzők tekintetében az összes tanulmány esetén alacsony volt az alkalmazhatóság kockázata. Három tanulmány esetén volt magas az elfogultsági kockázat a kimenetelre és eredményekre vonatkozóan, a többi tanulmány esetén ez az érték alacsony volt. Két tanulmány esetén volt tisztázatlan az alkalmazhatósági kockázat. A többi tanulmány esetén alacsony volt az eredményekre vonatkozó alkalmazhatósági kockázat, két tanulmány kivételével, ahol ez tisztázatlan volt. Az analízis területen négy tanulmány esetén volt magas az alkalmazhatóság kockázat, kettőnél tisztázatlan és egynél alacsony.

Tanulmány	Elfogultsági Kockázat				Alkalmazhatóság			ROB	Összesítés
	Résztvevők	Előrejelzők	Eredmények	Elemzés	Résztvevők	Előrejelzők	Eredmények		
Albatony 2015	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Almadi 2013	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Lou 2013	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Kilic 2006	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Kim 2009	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ong 2007	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Santucci 2018	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Zhang 2008	●	●	●	●	●	●	●	●	●

7. Ábra: A beválogatott tanulmányok elfogultsági kockázatának összefoglalása a (Prediction model study Risk Of Bias Assessment Tool- PROBAST) eszköz használatának segítségével. A zöld pöttyök alacsony elfogultsági kockázatot jelentenek, vagy „igen”-t az alkalmazhatóság tekintetében, a sárga pöttyök tisztázatlan elfogultsági kockázatot vagy alkalmazhatóságot, a piros pöttyök magas elfogultsági kockázatot jelentenek, vagy „nem”-et az alkalmazhatóság tekintetében. (1)

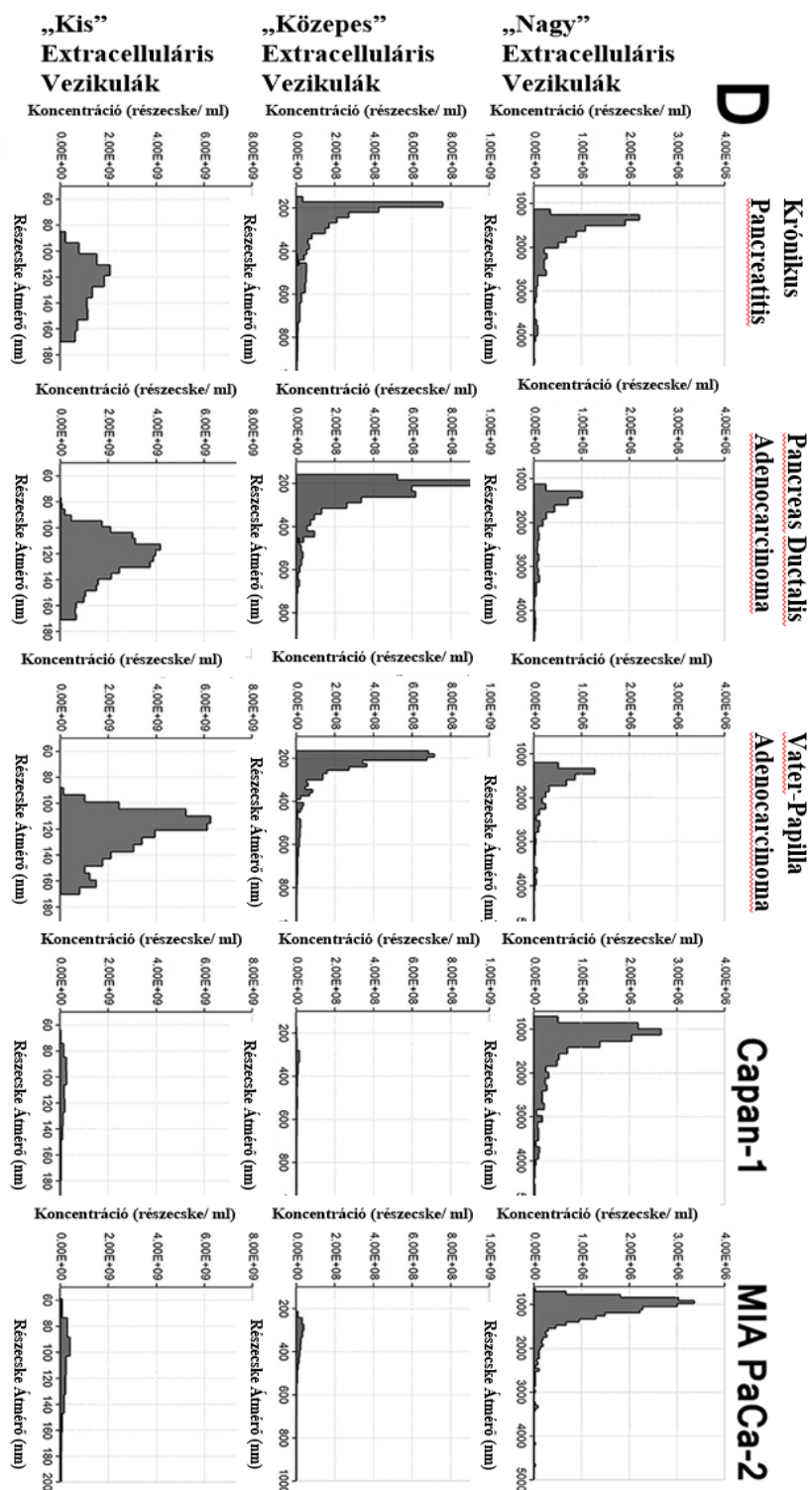


8 A-C Ábra: A pancreasnedvből izolált extracelluláris vezikulák Transzmissziós Elektronmikroszkópos képe; A a nagy, B a közpes és C a kis mérettartományba eső Extracellulááris vezikulák képe (2)

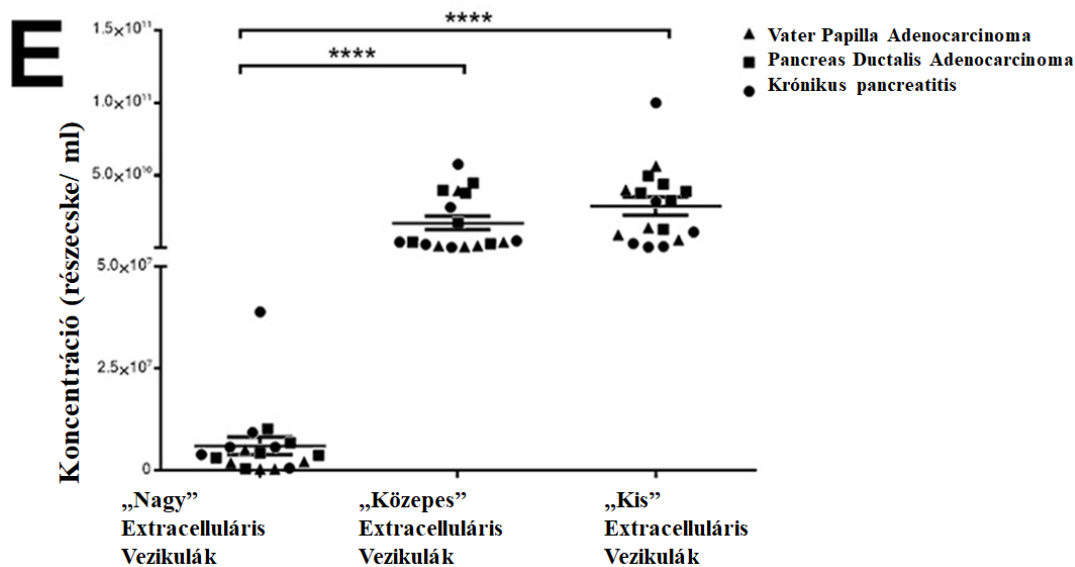
4.2 Extracelluláris vezikulák azonosítása és proteomikus karakterizálás humán pancreas nedvből

4.2.1 A humán pancreas nedv minták tartalmaznak extracelluláris vezikulákat

A humán hasnyálmirigynedv minták begyűjtése műtétek során zajlott krónikus pancreatitises, pancreas fej daganatos és Vater-papilla daganatos betegek hasnyálmirigy vezetékéből. A hasnyálmirigynedvből származó kis („small”), közepes („intermediate”) és nagy („large”) extracelluláris vezikulákat transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) vizsgáltuk. A TEM vizsgálatok alapján az összes mintában jelen voltak a phospholipid kettősréteggel rendelkező extracelluláris vezikulák (**8A-C. Ábra**). Ezen felül a Capan-1 (pancreas adenocarcinoma sejtvonal) sejtenyészetekből izolált extracelluláris vezikulák szintén hasonló struktúrát mutattak, mint a hasnyálmirigynedvből nyertek (**9. Ábra**). A hasnyálmirigynedvből izolált extracelluláris vezikulák protein-lipid arányai a tipikus extracelluláris vezikulákra jellemző tartományban voltak: $0,41 \pm 0,09$, $0,30 \pm 0,06$ és $0,37 \pm 0,07$ (átlag $\pm$ standard hiba) mind a kicsi, közepes és nagy EV-k esetében. (**10. Ábra**) (2).



8 D Ábra: Kis, Közepes és Nagy Extracelluláris vezikulák eloszlása Krónikus pancreatitis, Pancreas Ductalis Adenocarcinomás, Vater-Papilla Adenocarcinomás, Capan-1 sejtvonalból és MIA PaCa-2 sejtvonalból származó mintákban. (2)



8 E Ábra: Kis, Közepes és Nagy Extracelluláris Vezikulák eloszlása méretük alapján Vater Papilla Adenocarcinomás, Pancreas Ductalis Adenocarcinomás és Krónikus Pancreatitises betegek mintáiban (2)

4.2.1. Humán hasnyálmirigynedvből származó extracelluláris vezikulák mérete és koncentrációja

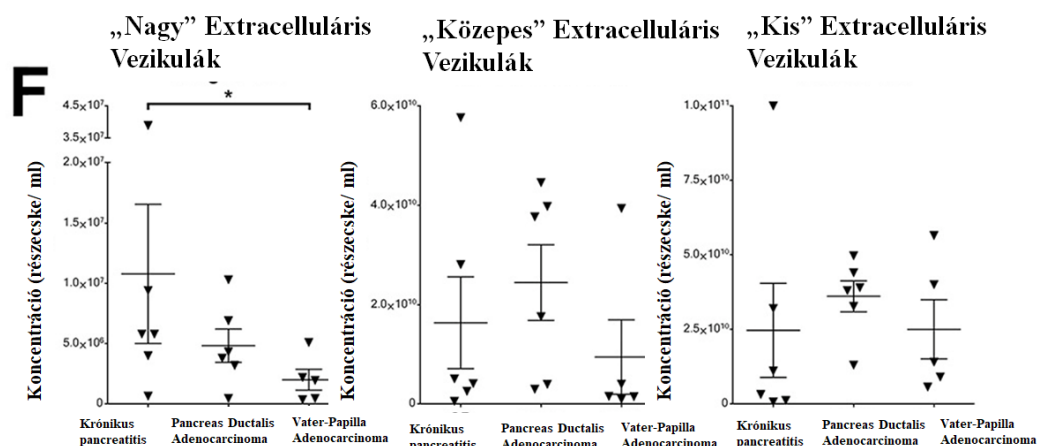
Krónikus pancreatitises (n =6), pancreasfej adenocarcinomás (n =6) és Vater papilla tumoros (n = 5) betegektől származó hasnyálmirigynedv mintákat TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) vizsgálatnak vetettük alá részecskeméret és koncentrációelemzés céljából. Az **8D. Ábra** mutatja a hasnyálmirigynedvekben a részecskeméret-eloszlásokat. A hasnyálmirigynedv minták tartalmaztak extracelluláris vezikulákat; részecskeméretbeli eloszlás alapján (átlag $\pm$ standard hiba) „nagy” extracelluláris vezikuláknak megfelelő 1646.0 ± 41.5 nm-es, „közepes” extracelluláris vezikuláknak megfelelő 189.8 ± 11.41 nm-es és „kis” extracelluláris vezikuláknak megfelelő 125.4 ± 3.8 nm-es extracelluláris vezikulákat. A humán hasnyálmirigynedvből és a hasnyálmirigy tumoros sejtvonal tenyészetből (Capan 1) származó extracelluláris vezikulák mérete hasonló volt. A hasnyálmirigynedvben magasabb volt a kis és közepes extracelluláris vezikula koncentráció, a nagy viszont alacsonyabb volt (**8D. Ábra**). A TRPS vizsgálat megmutatta, hogy a hasnyálmirigynedvben magasabb volt a „kis”

extracelluláris vezikulák koncentrációja ($6.1 \pm 2.2 \times 10^6$ részecske/mL), mint a közepes ($1.7 \pm 0.5 \times 10^{10}$ részecske/mL) és nagy extracelluláris vezikuláké ($2.9 \pm 0.6 \times 10^{10}$ részecske/mL) (átlag $\pm$ standard hiba) (**8E. Ábra**). A betegektől származó hasnyálmirigynedv kis és közepes extracelluláris vezikula koncentrációja nem különbözött egymástól szignifikánsan, de a Vater-papilla tumoros betegekből származó mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt a nagy extracelluláris vezikula koncentráció ($2.0 \pm 0.9 \times 10^6$ részecske/mL) a krónikus pancreatitises betegekből származó hasnyálmirigynedvből izolált nagy extracelluláris vezikulák $1.1 \pm 0.6 \times 10^7$ részecske/mL-es koncentrációjánál (átlag $\pm$ standard hiba) (**8F Ábra**).

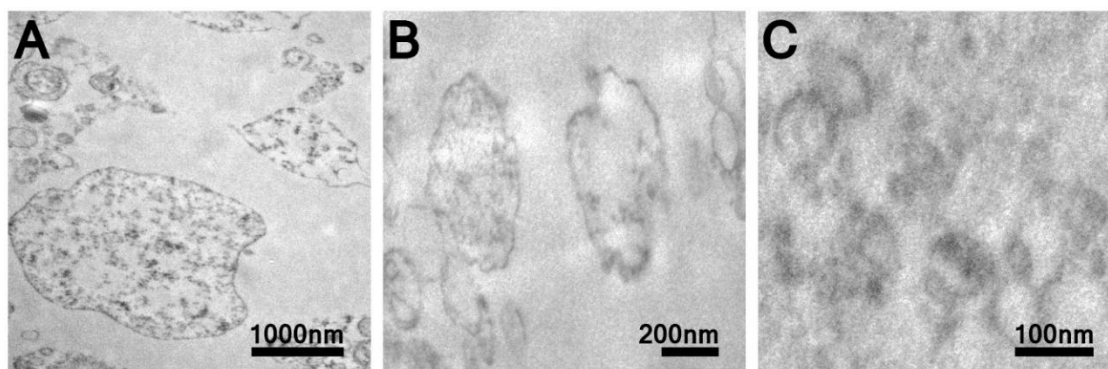
4.2.2 Az extracelluláris vezikulák vizsgálata tömegspektrometria módszerrel

A hasnyálmirigynedvből, pancreas tumoros sejtvonalakból és vérből izolált extracelluláris vezikulákat tömegspektrometriás vizsgálatnak vetettük alá. Ennek eredményeként nagy mennyiségű fehérjét azonosítottunk, amelyek legalább két extracelluláris vezikula eredetű peptidet tartalmaztak (**11. Ábra**). A tömegspektrometria vizsgálat eredményei alapján a hasnyálmirigynedvből származó extracelluláris vezikulákban jelentősen magasabb volt a pancreas eredetű fehérjék mennyisége, mint a vérből és epéből származó extracelluláris vezikulákban (**11. Ábra**). Ezt követően ezeket a pancreas eredetű fehérjéket mennyiségileg összehasonlítottuk krónikus pancreatitises, pancreas fej tumoros és Vater papilla tumoros betegek hasnyálmirigynedvéből izolált extracelluláris vezikulákkal (n =4 minden csoportban). A **12A és 12C Ábra** Venn diagramokat tartalmaz, ahol látható, melyek a közös és az egyedi fehérjék a nagy extracelluláris vezikulák pelletének tömegspektrometriai vizsgálata alapján hasnyálmirigy nedvből származó (**12A Ábra**), és vérből származó (**12C Ábra**) extracelluláris vezikulák esetében. A **12B Ábra** mutatja a GO (Gene Ontology) besorolását azoknak a fehérjéknek, amelyek az „extracelluláris exosomák” GO csoportjába tartoznak. A **12D Ábra** a hasnyálmirigynedvből izolált EV-k fehérjei közül azokat a potenciális markereket mutatja, amelyek egyediként jelentek meg a különböző betegcsoportoknál, vagy közösen jelentek meg a tumoros csoportokban, vagy megjelentek minden nagy extracelluláris vezikula csoportban, vagy olyan jellemző fehérjék voltak, amelyekre extracelluláris vezikulákból származó fehérje izolálás során számítanánk.(117). A **12 A-D Ábrán** a vastagon szedett részek mutatják azokat a

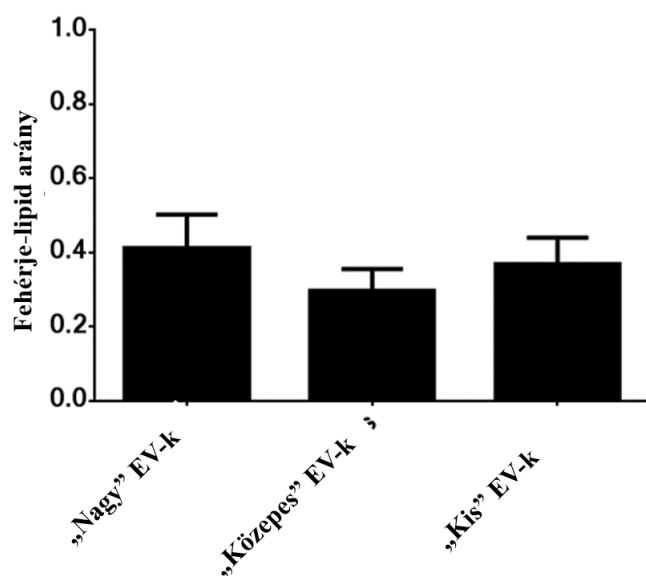
fehérjéket, amelyeket pancreas tumoros sejtvonalakból izolált extracelluláris vezikulák esetében is azonosítottunk. A dőlt betűsen szedettek azok a fehérjék, amelyek a vérplazmából izolált extracelluláris vezikulákban is megjelentek. A **3. és 4. Ábra** a fenti paramétereket mutatja „közepes” és „kis” extracelluláris vezikulák esetében.



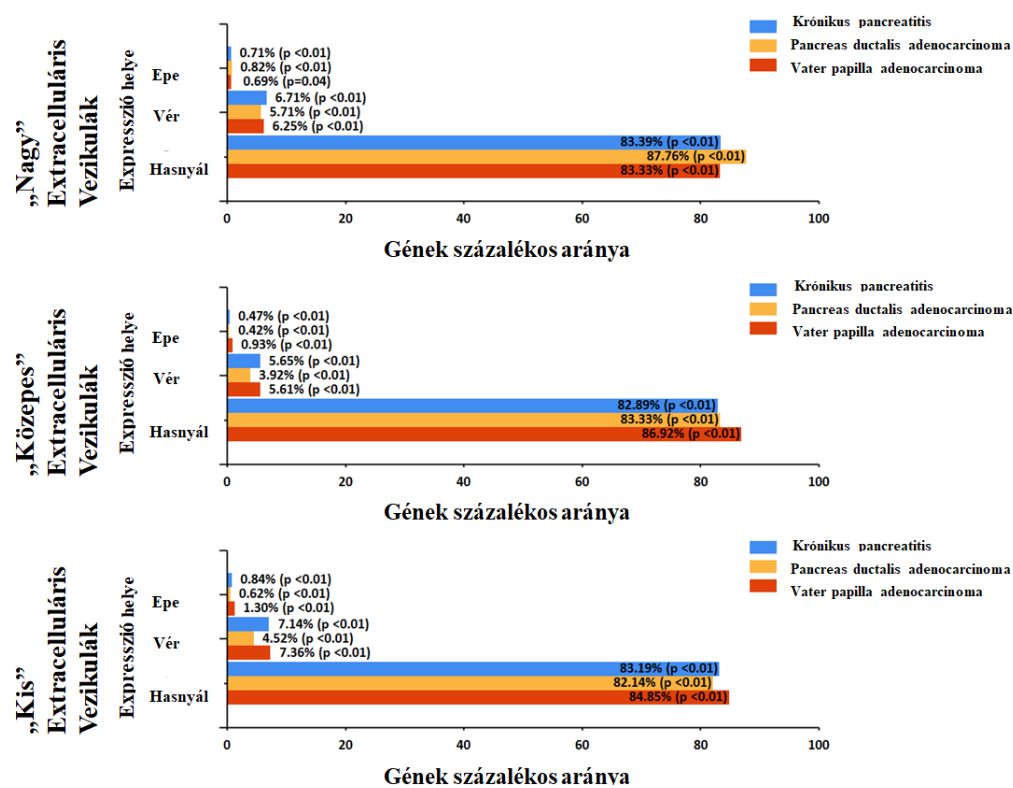
8 F Ábra: Kis, Közepes és Nagy Extracelluláris Vezikulák betegcsoportonkénti koncentrációbeli eloszlása pancreasnedvből izolálva (2)



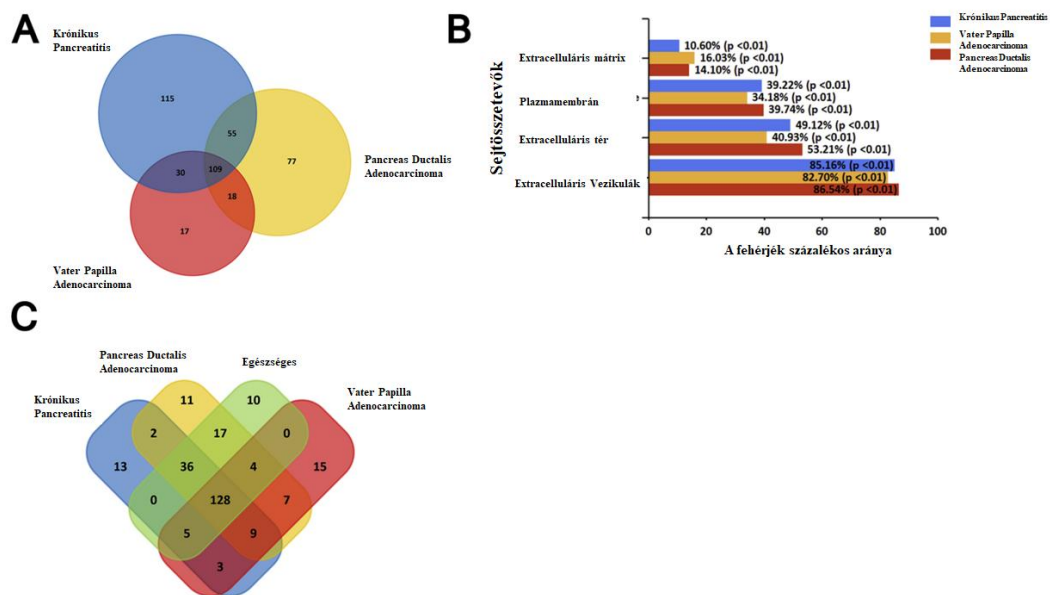
9. Ábra: Az A, B és C paneleken nagy, közepes és kis extracelluláris vezikulák láthatóak a Capan-1 hasnyálmirigyrák sejtvonal kondicionált tápközegéből (2)



10. Ábra: A hasnyálmirigynedv extracelluláris vezikula pellet fehérje-lipid aránya (2)



11. Ábra: A tömegspektrometriával azonosított hasnyálmirigy-nedv extracelluláris vezikuláiból származó fehérjék expressziójának elemzése a Funrich szoftverrel történt (2)



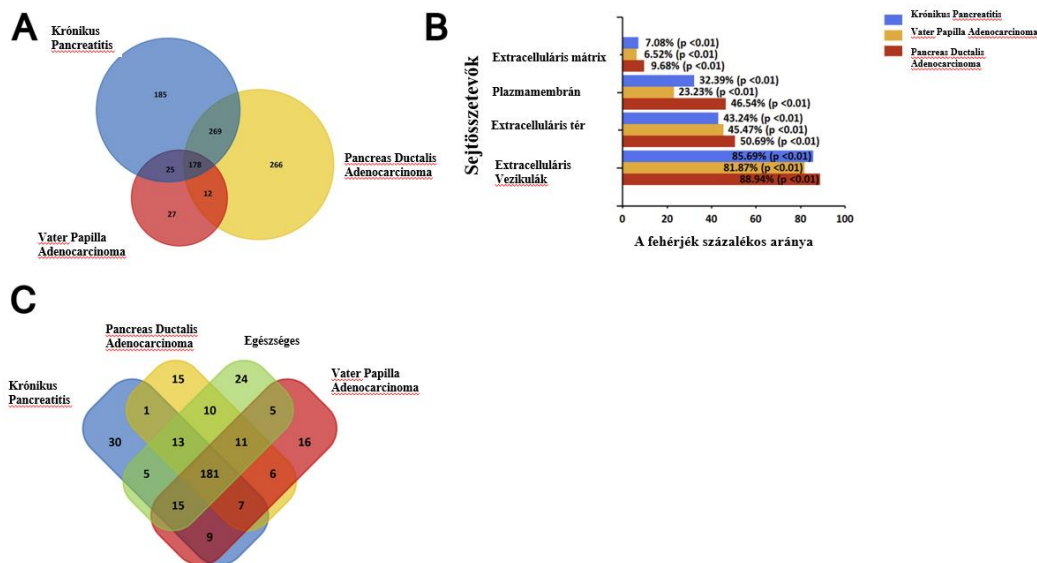
12A-C Ábra: „Nagy” extracelluláris vezikulák tömegspektrometriája hasnyálmirigynedvben és vérplazmában (2)

D

Egyedi fehérjék Krónikus pancreatitis mintákban	Egyedi fehérjék Pancreas Ductalis Adenocarcinoma mintákban	Egyedi fehérjék Vater Papilla Adenocarcinoma mintákban	Adenocarcinómákban közös	Mindben közös	Fehérjék az Extracelluláris Vezikula izolátumokban
Neutrophil elastase	Mucin-5AC	Prostaglandin-H2D-isomerase	Prolactin-inducible protein	Pancreatic alpha-amylase	Annexins A1, A2, A3, A4, A5, A6, A11, A13
Eosinophil peroxidase	Mucin-6		Glutathione hydrolase 1	Bile salt-activated lipase	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1, 5, 7
C-reactive protein	Septin-2		Transglutaminase C	Pancreatic secretory granule membrane glycoprotein GP2	Integrins $\alpha 1b$, αM , $\beta 2$, $\beta 3$
Azuocidin	Matrilysin			Alpha-enolase	Syntenins 1, 2
Cathepsin D					Ras-related proteins Rab-1A, -27A
Complement component C7					

Félkövér: PDAC sejtvonalakból izolált fehérjékből származó EV-ben is azonosítottuk Dölt:Vérből származó EV-ben is azonosítottuk

12 D Ábra: „Nagy” extracelluláris vezikulák tömegspektrometriája során azonosított fehérjék hasnyálmirigynedvben és vérplazmában (2)



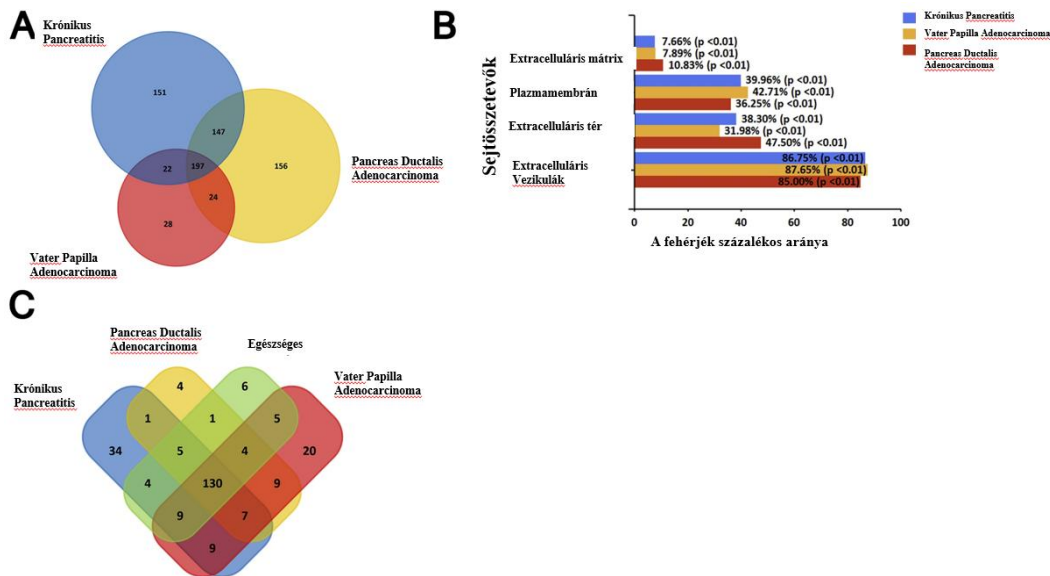
13 A-C Ábra: Közepes („Intermediat”) extracelluláris ezikulák tömegspektrometriája hasnyálmirigynedvben és vérplazmában (2)

D

Egyedi fehérjék Krónikus pancreatitisek mintákban	Egyedi fehérjék Pancreas Ductalis Adenocarcinomas mintákban	Egyedi fehérjék Vater Papilla Adenocarcinomas mintákban	Adenocarcinomas közös	Mindben közös	Fehérjék az Extracelluláris Vezikula izolátumokban
Neutrophil elastase	Mucin-4	Prostaglandin-H2D- isomerase	Prolactin-inducible protein	Pancreatic alpha- amylase	<i>Annexins A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A11, A13</i>
Eosinophil peroxidase	Pituitary tumor- transforming gene 1 protein-interacting protein		<i>Glutathione hydrolase 1</i>	Bile salt-activated lipase	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1, 5, 6, 7, 8
<i>C-reactive protein</i>	Transmembrane 4 L6 family member 4		Transglutaminase C	Pancreatic secretory granule membrane glycoprotein GP2	CD63
Cathepsin D	Septin-2		Catenin beta-1	Alpha-enolase	CD81
Bactericidal permeability-increasing protein	Septin-7		Caternin delta-1	Pancreatic triacylglycerol lipase	Epithelial cell adhesion molecule
Gasdermin-D	Multidrug resistance protein 1			Carboxypeptidase A1	<i>Integrins α2, α3, α5, α6, α1b, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4</i>
Serine protease HTRA1	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator			Carboxypeptidase B	<i>Lactadherin</i>
	Occludin				Syntenins 1, 2
	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>				<i>Ras-related proteins Rab-1A, -1B, -2A, -3D, -5A, -5B, -5C, -7A, - 8A, -8B, -10, -11B, -13, -21, -25, -27A, -27B, -35</i>
	Prostate stem cell antigen				Tumor susceptibility gene 101 protein

Félkövér: PDAC sejtvonalakból izolált fehérjékből származó EV-ben is azonosítottuk
Dólt: Vérből származó EV-ben is azonosítottuk

13 D Ábra: „Közepes” extracelluláris vezikulák tömegspektrometriája során azonosított fehérjék hasnyálmirigynedvben és vérplazmában (2)



14 A-C Ábra: „Kis” extracelluláris vezikulák tömegspektrometriája hasnyálmirigynedvben és vérplazmában (2)

D

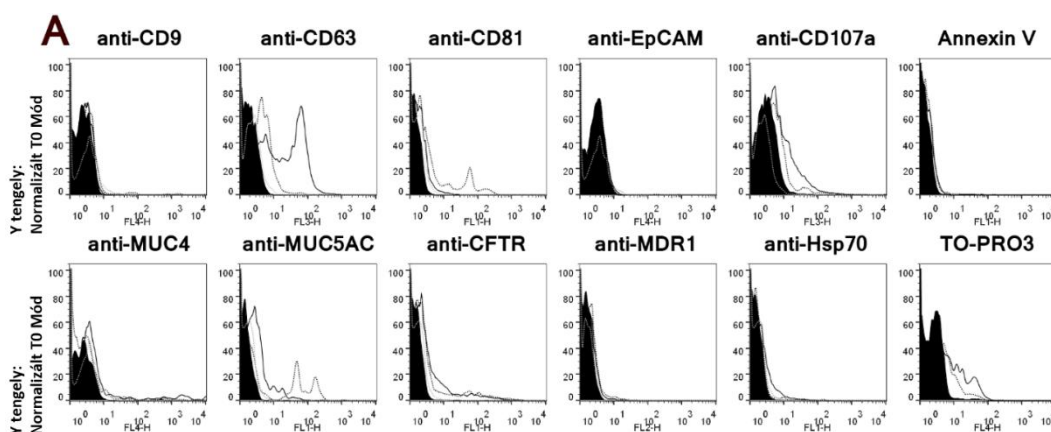
Egyedi fehérjék Krónikus pancreatitis mintákban	Egyedi fehérjék Pancreas Ductalis Adenocarcinoma mintákban	Egyedi fehérjék Vater Papilla Adenocarcinoma mintákban	Adenocarcinomákban közös	Mindben közös	Fehérjék az Extracelluláris Vezikula izolátumokban
Neutrophil elastase	Mucin-4	Multimerin-1	Prolactin-inducible protein	Pancreatic alpha-amylase	Annexins A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A11, A13
Eosinophil peroxidase	Mucin-16		Pancreatic carcinoma marker protein GA733-1	Bile salt-activated lipase	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1, 5, 6, 7
C-reactive protein	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein		Catenin beta-1	Pancreatic secretory granule membrane glycoprotein GP2	CD63
Peroxioredoxin-6	Septin-2			Alpha-enolase	CD81
Bactericidal permeability-increasing protein	Dihydropyrimidinase-related protein 2			Trypsin-1	Epithelial cell adhesion molecule
Macrophage metalloelastase	Multidrug resistance protein 1			Pancreatic triacylglycerol lipase	Integrins α3, α5, α1b, αM, αV, αX, β1, β2, β3
	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator			Carboxypeptidase A1	Lactadherin
	Matrilysin			Carboxypeptidase B	Syntenins 1, 2
	Heat shock protein HSP 90-alpha				Ras-related proteins Rab-1A, -2A, -3D, -5C, -7A, -8A, -11A, -14, -21, -27B, -35
	Transmembrane 4 L6 family member 4				Tumor susceptibility gene 101 protein

Félkövér: PDAC sejtvonalakból izolált fehérjékből származó EV-ben is azonosítottuk
Dólt: Vérből származó EV-ben is azonosítottuk

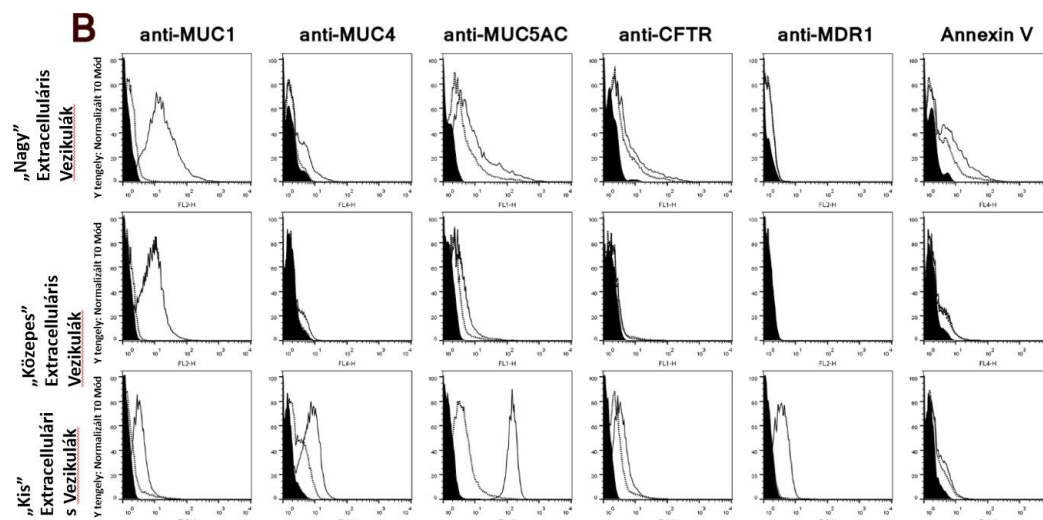
14 D Ábra: „Kis” extracelluláris vezikulák tömegspektrometriája során azonosított fehérjék hasnyálmirigynedvben és vérplazmában (2)

4.2.3 Potenciális markerként használható extracelluláris vezikulák detektálása áramlási citometria módszerrel

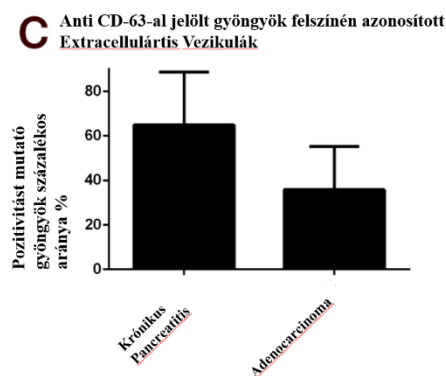
Hasnyálmirigynedvből és pancreas tumoros sejtvonalakból izolált extracelluláris vezikulák detektálására áramlási citometriát használtunk a módszerekről szóló fejezetben leírtaknak megfelelően. A **15A Ábrán** hasnyálmirigynedvből és pancreas tumoros sejtvonalból izolált extracelluláris vezikulákat fluorescens antitestekkel jelöltünk, ismert extracelluláris vezikula fehérjéket és a tömegspektrometria vizsgálat során azonosított fehérjéket használva célpontul. A hasnyálmirigynedvből származó extracelluláris vezikulák az áramlási citometria vizsgálat során pozitivitást mutattak CD63, CD81, CD107a (LAMP-1), MUC5AC, CFTR és TO-PRO3 DNS kötő festésekre. A **15B Ábra** mutatja a detektált MUC1, MUC4, MUC5AC, CFTR, MDR1 és Annexin V fehérjéket a pancreas tumoros sejtvonalból izolált extracelluláris vezikulák felszínén. Apróbb eltérések mellett mindezen markerek megjelentek extracelluláris vezikula frakciókban, amelyeket a pancreas tumoros sejtvonalakból izoláltunk. A **15C Ábra** a hasnyálmirigynedvből származó extracelluláris vezikulákon CD63-as jelölt mágneses mikrogyöngyökkel való kötődését mutatja, demonstrálva azt, hogy jelen van rajtuk a CD63 marker.



15A Ábra: A pancreasnedvből származó extracelluláris vezikulákat áramlási citometriai vizsgálatnak vetettük alá az egyes, tömegspektrometriával azonosított fehérjék jelenlétének igazolására. A krónikus pancreatitis (az ábrán CP, folytonos fekete vonal) és a tumoros (az ábrán AC, szaggatott fekete vonalak) betegektől nyert pancreasnedv mintákból származó extracelluláris vezikulákat, valamint a detergens-lízált kontrollokat (töltött fekete hisztogram) fluoreszcens antitestek, TO-PRO3 és Annexin V segítségével elemeztük. Az izotípus-kontrollok kötődését a szürke szaggatott vonalak jelzik.



15 B Ábra: Az extracelluláris vezikulákat áramlási citometriával vizsgáltuk a tömegspektrometriával azonosított fehérjék egy részének jelenlétére. A Capan-1 (folytonos fekete vonal) és a MIA PaCa-2 (szaggatott fekete vonal) sejtekből származó extracelluláris vezikulákat, valamint a detergens-lízált kontrollokat (töltött fekete hisztogram) anti-MUC1, anti-MUC4, anti-MUC5AC, anti-CFTR, anti-MDR1 és annexin V segítségével elemeztük. Az izotípus kontrollok kötődését szürke szaggatott vonalak jelzik.

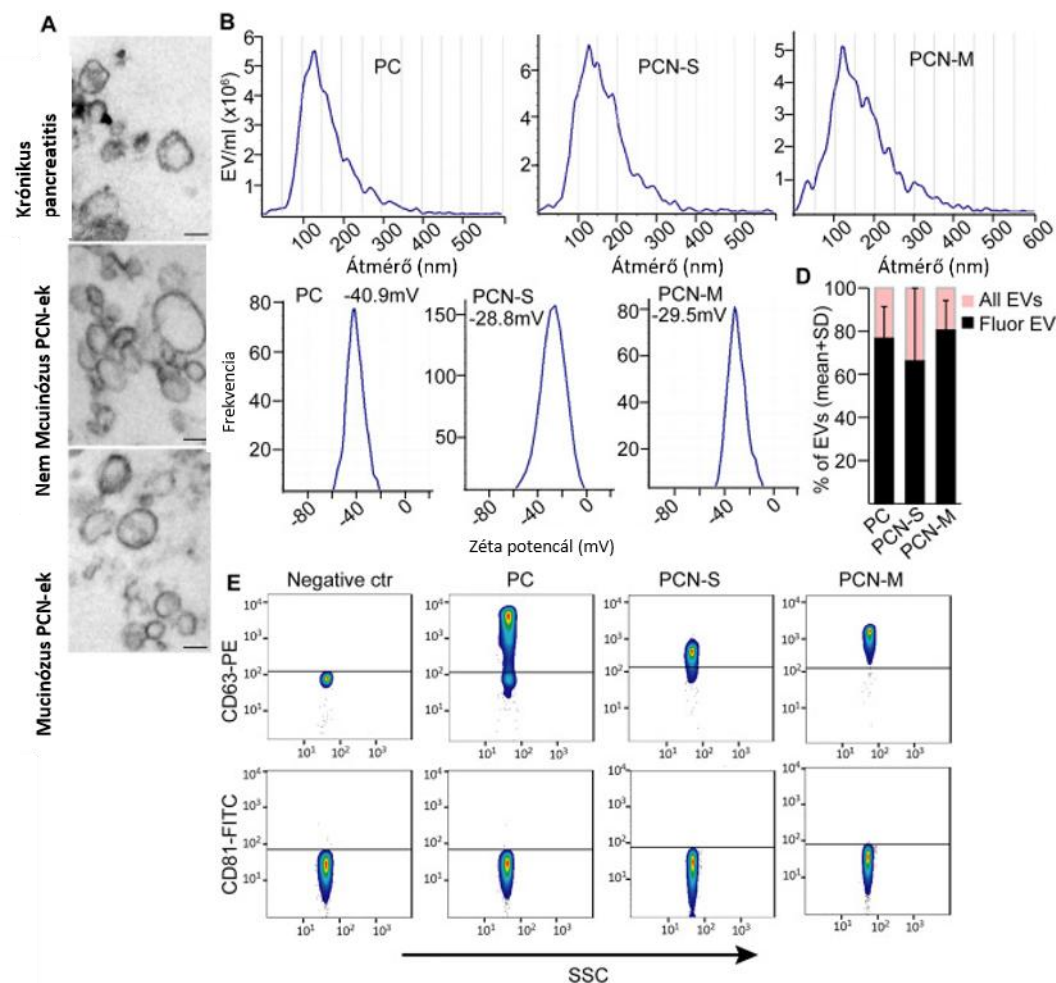


15 C Ábra: A krónikus pancreatitisben és Vater papilla, vagy pancreas ductalis adenocarcinómában szenvedő betegek hasnyálából származó extracelluláris vezikulákat anti-CD63 mágneses gyöngyökön rögzítettük, és áramlási citometriával detektáltuk fluoreszcensen jelölt anti-CD63 alkalmazásával. (2)

4.3 Pancreas cisztafolyadékból izolált extracelluláris vezikula mikro-RNS tartalom alapján különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók a hasnyálmirigy cisztás elváltozásokkal rendelkező betegek

4.3.1 A pszeudociszta és PCN cisztafolyadék CD63+ extracelluláris vezikulákat tartalmaz

Először a módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően karakterizáltuk a pseudocisztákból (PC) származó, a szerózus PCN-es (S-PCN) és a mucinózus PCN-es (M-PCN) cisztafolyadékból származó extracelluláris vezikulákat. A különböző csoportokba való besorolást a cytologiai eredmény, cisztafolyadék CEA tartalom, EUS morfológia és a képalkotó vizsgálatok eredményei alapján végeztük. Mivel ez a besorolási módszer gyakran ellentmondásos volt, a diagnózist a beteg klinikuma és kórtörténete figyelembevételével határoztuk meg. A vizsgálatba bevont betegek besorolását követően TEM segítségével bebizonyítottuk az EV-k jelenlétét a PC, S-PCN és M-PCN mintákban (**16A Ábra**), és NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) segítségével, amely egy széles körben használt módszer az EV-k méretbeli és koncentrációbeli eloszlásának vizsgálatára (**16B Ábra**). Ezenfelül egy membránjelölő festés és NTA segítségével megmutattuk, hogy az EV-k túlnyomó többségének a membránja ép volt (**16C Ábra**). A magas zéta potenciál érték (>20 mV) (2) megmutatta, hogy az EV oldatok a tárolást követően is stabilak maradtak és nem jelentkeztet aggregáció (118) (**16D Ábra**). A CD81 és a CD63 széles körben ismert EV specifikus markerek (119). Áramlási citometria vizsgálat során anti-CD63 és anti-CD81 antitesttel jelölt mikrogyöngyöket használva az összes minta CD63 pozitivitást mutatott, de érdekes módon negatívak voltak a CD81 markerre (**16E Ábra**). Összességében kimutattuk CD63+ EV-k jelenlétét a PC, S-PCN és M-PCN mintákban is.



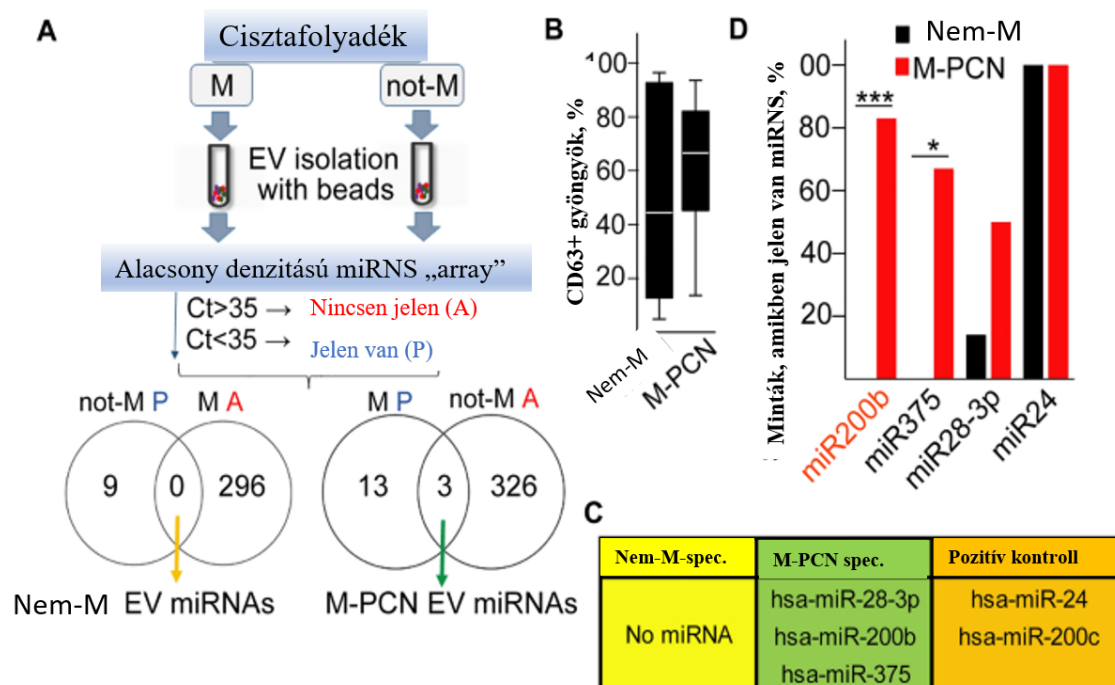
16A-E Ábra: A hasnyálmirigy ciszta folyadék EV-ket tartalmaz. **A:** Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képek a krónikus pancreatitises (az ábrán PC), szerózus cisztózus neopláziás (az ábrán S-PCN) vagy a mucinózus csoportba tartozó pancreas cisztózus neopláziás (M-PCN) betegekből származó cisztafolyadékából izolált minták pelleteiről ultracentrifugálást követően. **B:** Nanorészecske-követő analízis eredményei (nanoparticle tracking analysis- NTA) a betegek ciszta folyadékmintáiból **C:** Zéta potenciálok a sejtek és sejtödékek eltávolítása után a minták 300 g-n történő centrifugálását követően. **D:** A fluoreszcens extracelluláris vezikulák aránya. A teljes extracelluláris vezikulák számot megmértük, és az extracelluláris vezikulák ugyanabban a mintában membránjelölő festékkel tettük láthatóvá és mértük meg NTA segítségével **E:** extracelluláris vezikulák áramlási citometrián alapuló vizsgálata cisztafolyadékokban. Az extracelluláris vezikulák anti-CD63 vagy anti-CD81-gyel bevont gyöngyökkel izoláltuk a minták 300 g-vel történő centrifugálása után, és anti-CD63-mal, vagy anti-CD81-gyel jelöltük. Negatív kontrollként Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (DMEM) inkubált gyöngyöket használtunk. Méretet jelölő beosztások: 100 nm. (3)

4.3.2 A miR-200b nagyon mennyiségben van jelen M-PCN cisztafolyadékból származó EV-ben mint a non-M-PCN mintákban

A miRNS-ek fontos összetevői az EV-k szállítmányának ezért a további kísérleteink során ezekre fókuszáltunk. Korábban azt találtuk, hogy az EV-k antitestekkel borított mikrogyöngyök segítségével történő izolálása alacsonyabb nem specifikus miRNS háttérszintet eredményezett, mint a széles körben használt differenciál-ultracentrifugálás, vagy a kereskedelmi forgalomban levő EV izoláló felszerelések alkalmazása (120). Ezért anti-CD63-al borított mikrogyöngyöket használtunk EV-k izolálásához a sejtmentes cisztafolyadékok esetében 300 g-n való centrifugálást követően, és 377 különböző miRNS szintjét vizsgáltuk „low-density miRNA array”-k használatával. Az S-PCN és a krónikus pancreatitis-es betegek esetén a malignus transformáció esélye rendkívül alacsony, ezzel szemben az M-PCN-ek esetén fennáll a malignus transformáció veszélye. Emiatt a kutatásunk során két kategóriába, non-M-PCN (S-PCN és krónikus pancreatitis egy csoportként) és M-PCN csoportba, soroltuk a mintákat, azzal a céllal, hogy szignifikáns különbségeket keressünk a két csoport EV tartalom összetétele között. Ezt követően azonosítottuk azokat a miRNS-eket, amelyek szintje különbözött a két csoport között (ennek az eljárásnak a részletes leírása megtalálható a Vizsgálati Módszerek fejezetben **17A Ábra, 6. Táblázat**). Ezen vizsgálatok során mindig megegyező kezdő minta térfogatot használtunk és nem volt különbség a CD63+ EV-t tartalmazó mikrogyöngyök mennyiségében a non-M PCN és az M-PCN csoportok között (**17B Ábra**). Amíg nem volt olyan miRNS, amely specifikus lett volna a non-PCN csoportra, addig a miR28-3p, miR200b és a miR375 specifikusan csak az M-PCN mintákban volt jelen (**17C Ábra**), ezeket M-specifikus EV-miRNS-ként jelöltük meg. Ezen felül azonosítottunk két miRns-t, a miR-24-et és a miR-200c-t, amelyek 13-ból 12 vizsgált mintában jelen voltak, felvetve annak a lehetőségét, hogy ezeket a miRNS-eket pozitív kontrollként használjuk (**17C Ábra**).

Eredményeink további megerősítése céljából anti-CD63 mikrogyöngyökkel történő 300 g-s centrifugálást követően egyenlő térfogatokat (500 µL) mértünk ki a mintákból és egyedi vizsgálatnak vetettük alá az M-PCN specifikus miRNS csoportot (felderítő csoport/ discovery set). Mivel korábban felfedeztük, hogy a miR-24 szintje konstans a PDAC betegek mintáiból származó EV-k esetén (121), ezt a miRNS-t használtuk pozitív kontrollként és minden mintában detektáltuk (**7. Táblázat**). A miRNS vizsgálatához

használt minták elemzése során azt figyeltük meg, hogy az M-specifikus EV miRNS-ek közül a miR-200b az összes non-M mintából hiányzott, viszont csaknem az összes M-PCN mintában jelen volt (**17D. Ábra, 8. Táblázat**).



17A-D Ábra: Az mucinózus csoportba tartozó PCN (M-PCN) csoport betegeitől származó extracelluláris vezikula EV- specifikus mikro-RNS-eket (miRNS) tartalmaznak. **A:** A kísérletek sematikus munkafolyamata. A pontos részleteket lásd a „Módszerek” részben. **B:** A CD63+ gyöngyök százalékos aránya non-M és M-PCN betegek mintáiban, áramlási citometriával kimutatva. **C:** Az M-PCN extracelluláris vezikula specifikus miRNS-készlet és a pozitív kontroll miRNS-ei. **D:** Azon minták százalékos aránya a felfedezési kohorszban (discovery cohort), ahol az M-PCN EV miRNS tartalom készlet jelzett tagjai jelen voltak ($Ct < 35$). Az miR-200b mutatta a legnagyobb különbséget a not-M ($n = 7$) és az M-PCN ($n = 6$) összehasonlításakor. Chi-négyzet teszt, $*p < 0,05$ és $***p < 0,001$. Lásd még az S1 és S2 táblázatot (3)

6. Táblázat: Ct értékek a validációs kohorsz miR-200b vizsgálata során (3)

A validációs kohorszhoz tartozó Ct értékek						
Azonosító	Csoport 1	Csoport 2	miR-200b (Ct<35)		miR-24	miR-200b (30,5-Ct)
8	PC	nem-M	31,14		30,42	0
9	S-PCN	nem-M	25,88		27,90	4,62
17	PC	nem-M	nem detekt.		27,89	0
19	PC	nem-M	nem detekt.		32,79	0
20	S-PCN	nem-M	28,23		32,02	2,27
36	PC	nem-M	nem detekt.		35,27	0
39	PC	nem-M	34,47		33,79	0
42	S-PCN	nem-M	nem detekt.		33,09	0
44	PC	nem-M	nem detekt.		36,31	0
48	S-PCN	nem-M	27,64		31,13	2,86
50	S-PCN	nem-M	31,30		33,83	0
52	PC	nem-M	nem detekt.		34,27	0
56	S-PCN	nem-M	34,62		32,78	0
58	PC	nem-M	nem detekt.		34,67	0
59	PC	nem-M	nem detekt.		33,97	0
62	S-PCN	nem-M	nem detekt.		33,31	0
63	PC	nem-M	31,25		34,14	0
65	PC	nem-M	30,55		32,28	0
66	S-PCN	nem-M	29,10		31,52	1,40
68	S-PCN	nem-M	31,66		33,27	0
69	S-PCN	nem-M	32,64		34,34	0
73	S-PCN	nem-M	29,73		34,60	0,77
75	PC	nem-M	30,59		28,97	0
Frequency of absent or "0" flag			0,39		0,00	0,78
3	M-PCN	M-PCN	25,87		29,55	4,63
24	M-PCN	M-PCN	22,92		27,15	7,58
25	M-PCN	M-PCN	29,15		32,45	1,35
27	M-PCN	M-PCN	23,65		28,09	6,85
28	M-PCN	M-PCN	24,52		27,96	5,98
29	M-PCN	M-PCN	28,19		30,16	2,31
31	M-PCN	M-PCN	undet.		31,86	0
32	M-PCN	M-PCN	30,48		32,79	0,02
34	M-PCN	M-PCN	22,94		27,70	7,56
37	M-PCN	M-PCN	34,81		32,73	0
38	M-PCN	M-PCN	30,50		33,45	0,00

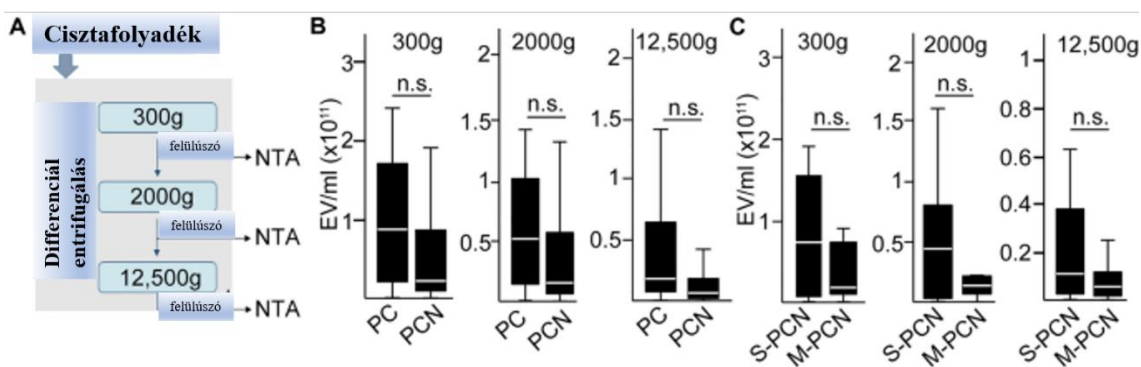
41	M-PCN	M-PCN	28,95		32,96	1,55
43	M-PCN	M-PCN	26,80		30,24	3,70
45	M-PCN	M-PCN	27,12		32,33	3,38
49	M-PCN	M-PCN	27,40		31,25	3,10
51	M-PCN	M-PCN	25,08		29,35	5,42
54	M-PCN	M-PCN	28,69		36,98	1,81
67	M-PCN	M-PCN	31,01		33,37	0
74	M-PCN	M-PCN	19,18		25,77	11,32
76	M-PCN	M-PCN	27,93		31,90	2,57
Hiányzó, vagy „0” jelölés gyakorisága			0,05		0,00	0,20
p- érték a nem detektált, vagy „0” jelöléshez (Chi-négyzet, Fisher's exact teszt)			0,011			<0,001

7. Táblázat: Ct értékek a felfedezési kohorsz miR-200b vizsgálata során (3)								
Ct értékek a felfedezési kohorsz mintáiból								
		miR28-3p		miR-200b		miR-375		miR-24
Azonosító	Group							
d3	nem-M (PC)	nem detekt.		nem detekt.		nem detekt.		30,28
d4	not-M (S-PCN)	nem detekt.		nem detekt.		nem detekt.		32,54
d7	nem-M (PC)	33,99		nem detekt.		nem detekt.		29,11
d10	nem-M (PC)	nem detekt.		nem detekt.		nem detekt.		34,82
d11	nem-M (PC)	nem detekt.		nem detekt.		nem detekt.		32,91
d12	nem-M (PC)	nem detekt.		nem detekt.		nem detekt.		30,04
d13	nem-M (PC)	nem detekt.		nem detekt.		nem detekt.		33,06
Frequency of undet.		0,86		1		1		0
d1	M-PCN	28,28		21,25		24,14		24,64
d2	M-PCN	undet		28,10		26,52		29,96
d5	M-PCN	27,80		22,08		21,25		24,29
d6	M-PCN	nem detekt.		nem detekt.		nem detekt.		31,67
d8	M-PCN	33,38		26,66		nem detekt.		28,13
d9	M-PCN	nem detekt.		28,07		25,26		29,40
Nme detektálható gyakorisága		0,5		0,17		0,33		0
p- érték a nem detektált jelöléshez (Chi-négyzet, Fisher's exact" teszt)		0,27		0,005		0,02		NA

8. Táblázat: Ct értékek egyenlő kiinduló EV számok esetén (3)						
Ct értékek egyenlő EV számmal rendelkező minták mérése során						
Azonosító	Csoport1	Csoport2	mir200b (Ct<37)	mir24 (Ct)		mir200b jelen van (Ct<30,5)
14	S-PCN	nem-M	nem detekt.	36,97		0
19	PC	nem-M	nem detekt.	31,61		0
30	S-PCN	nem-M	30,35	27,04		1
36	PC	nem-M	37,70	34,71		0
39	PC	nem-M	25,07	28,86		1
42	S-PCN	nem-M	28,97	32,17		1
44	PC	nem-M	nem detekt.	31,20		0
47	S-PCN	nem-M	34,43	30,56		0
48	S-PCN	nem-M	27,10	30,68		1
50	S-PCN	nem-M	29,43	35,56		1
52	PC	nem-M	nem detekt.	31,46		0
56	S-PCN	nem-M	30,56	31,77		0
57	S-PCN	nem-M	35,02	32,39		0
58	PC	nem-M	nem detekt.	31,60		0
59	PC	nem-M	nem detekt.	31,27		0
61	S-PCN	nem-M	36,63	33,41		0
62	S-PCN	nem-M	27,73	31,24		1
„Jelen van” gyakorisága						0,35
32	M-PCN	M-PCN	27,92	32,55		1
34	M-PCN	M-PCN	21,43	23,83		1
37	M-PCN	M-PCN	34,62	29,75		0
38	M-PCN	M-PCN	26,05	29,25		1
40	M-PCN	M-PCN	29,86	31,67		1
41	M-PCN	M-PCN	undet.	35,28		0
43	M-PCN	M-PCN	undet.	32,52		0
45	M-PCN	M-PCN	24,15	26,78		1
49	M-PCN	M-PCN	27,94	30,27		1
51	M-PCN	M-PCN	28,75	31,43		1
54	M-PCN	M-PCN	27,11	30,33		1
55	M-PCN	M-PCN	28,09	31,62		1
60	M-PCN	M-PCN	25,02	30,63		1
„Jelen van” gyakorisága						0,77
Chi-square test						0,03

4.3.3 Nincsen összefüggés az EV-k száma, a diagnózis, vagy a PCN típusa között

Ezt követően további mintákat válogattunk be (validációs csoport- validation cohort) és a felderítő (discovery) és az ellenőrző (validation) mintáinak felülúszójából az NTA-val történő sorozatos centrifugálási lépéseket követően elemeztük az EV csoportokat (**18. Ábra**). Ez a módszer az összes EV csoport vizsgálatát lehetővé teszi: minden EV-t a sejtes elemek eltávolítása után (300 g-n centrifugálás), EV-eket, a nagy EV-ken kívül (2000g centrifugálás után) vagy csak a kis EV-eket (12500g centrifugálás után). Ezen vizsgálat során nem találtunk összefüggést az EV-k száma és a diagnózis között (krónikus pancreatitis vagy PCN, **18B Ábra**) függetlenül a vizsgált EV-k mérettartományától. Hasonlóképpen, nem volt szignifikáns EV számbeli különbség az S-PCN és M-PCN csoportok között (**18C Ábra**). Ez is azt mutatja, hogy nincsen összefüggés az EV szám és a klinikai paraméterek között a vizsgált PCN minták esetén.



18A-C Ábra: A cisztafolyadék extracelluláris vezikulák számában nincs szignifikáns különbség a betegcsoportok között. **A:** A kísérletek sématis munkafolyamata. **(B, C)** Az extracelluláris vezikulaák koncentrációja a **B:** PC- krónikus pancreatitis és PCN vagy **C:** szerózus PCN és mucinosus PCN betegek cisztafolyadékában, Nanoparticle Tracking Analízis (NTA) segítségével mérve. n = 10–20 a felfedezési és érvényesítési kohorszból. $p > 0,05$ minden összehasonlításnál (Mann–Whitney U-teszt) (3)

4.3.4 Az EV-k miR-200b tartalmának szintje elkülöníti egymástól a M-PCN és a non-M-PCN eredetű pancreas cisztákat a megerősítő kohorszban (validation cohort)

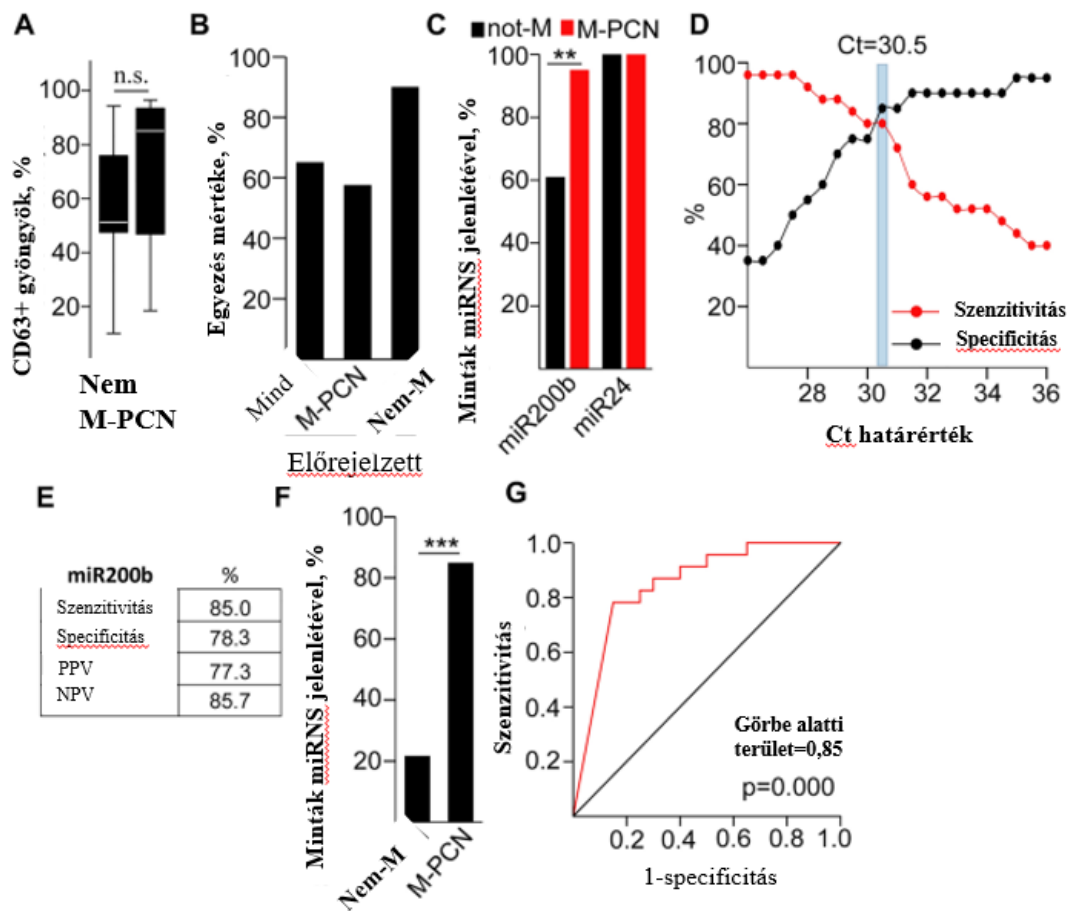
A miRNS vizsgálatok eredményei alapján, valamint a felderítő mintacsoporttal való megerősítést követően a további vizsgálatainkat a miR-200b-re fókuszáltuk. A felderítő kohorszhoz (validation cohort) hasonlóan először egyenlő mennyiségű cisztafolyadék térfogatokkal indulva antitestekkel fedett mikrogöngyök használatával végeztük el az EV izolálást, hasonlóan a validációs csoporthoz. Ct=35 felső értéket használtunk miR-200b jelenlétének detektálásához „jelen van” vagy „hiányzik” jelölések használatával. A felderítő csoporthoz hasonlóan nem találtunk különbséget az anti-CD63+ mikrogöngyök mennyiségében az M-PCN és a non-M-PCN csoportok között (**19A Ábra**). Érdekes módon az EV eredetű miR-200b alapján kialakított klasszifikáció több mint 65%-ban megegyezett a klinikai adatok alapján kapott klasszifikációval. Hasonló értékeket kaptunk abban az esetben, amikor csak arra fókuszáltunk, hogy a minta az M-PCN vagy a non-M-PCN csoportba tartozik miR-200b alapján (**19B Ábra**). Ezekkel az eredményekkel egybehangzóan a miR-200b-re vonatkozó (Ct>35) „hiányzó” jelölések a non-M-PCN csoportban jelentek meg (**19C Ábra, 6. Táblázat**). Így a validációs csoport összegezte és igazolta a felderítő csoportot. Megvizsgáltuk az EV miR-200b szint szenzitivitását és specificitását, hogy megtaláljuk az optimális CT határértéket, az M-PCN és a non-M-PCN csoportok elkülönítéséhez. Bináris rendszer használatával a Ct=30,5 alatt „jelen van”, efelett a „hiányzik” értékek jelentek meg. Ezt a határértéket használva a szenzitivitás és a specificitás 78% feletti volt (**19D-E Ábra**). Amíg ezt a határértéket használva a miR-200b minden krónikus pancreatitis mintánál „hiányzik” jelölést kapott, addig jelen volt a legtöbb PCN minta esetén. A miR-200b szignifikánsan gyakrabban volt jelen M-PCN mintákból izolált EV-k esetén, mint a non-M-PCN minták esetében (**19F Ábra**). Elvégeztük a ROC görbe (Receiver Operating Characteristics curve) analízist és az eredmény alapján az EV eredetű miR-200b vizsgálat hatékonyan használható (görbe alatti terület > 0,8) M-PCN és non-M-PCN minták elkülönítésére (**19G Ábra**). Hasonló eredményeket figyeltünk meg amikor megismételtük a méréseket egyenlő mennyiségű NTA-val meghatározott kiindulási EV-vel. Gyakrabban jelentek meg a miR-200b „jelen van” jelölések (Ct<30,5) esetén az M-PCN mintákban a validációs csoport non-M-PCN mintáihoz képest (**8. Táblázat**). Az EV készítményekben klinikailag egyszerűbben kivitelezhető módja lenne a pozitív kontrollnak egy egységes

minta térfogat mennyiség vagy egyenlő mennyiségű EV használata és a standard EV zolálási és tartalom karakterizálási módszer, beleértve a miR-24 detektálását.

A detektálási módszerünk további fejlesztése érdekében egyenlő mennyiségű miRNS-t használtunk az EV preparátumokból (**9. Táblázat**) és megismételtük a mucinózus és nem mucinózus minták karakterizálását. A miR-200b abszolút értékeit és $Ct=30,5$ felső határt használva 90% feletti szenzitivitást, specificitást és negatív prediktív értéket (NPV), valamint 80% feletti pozitív prediktív értékeket (PPV) kaptunk (**20A-B Ábra**). ROC görbe analízist végeztünk, amelynek eredménye mutatja, hogy sikeres volt az elkülönítés az M és a non-M csoportok között (**20C Ábra**). További elemzés keretei között kiszámítottuk a miR-200b relatív Ct értékét és összehasonlítottuk a miR-24 relatív Ct értékével. Szignifikáns különbség volt megfigyelhető az M-PCN és a non-M-PCN csoportok között (**20D Ábra**). A relatív és abszolút Ct értékek kombinálása a $Ct<30,5$ határértékkel a miR-200b esetében és $Ct<2$ határértékkel segített még pontosabban elkülöníteni az M-PCN és a non-M-PCN csoportokat (**9. Táblázat, 20E Ábra**).

Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a kombinált abszolút és relatív miR-200b szint meghatározása EV mintákból, amelyeket normalizáltunk a teljes pancreas cisztafolyadék RNS tartalomra, hatékony módszer lehet a betegek M-PCN és non-M-PCN csoportokba történő klasszifikálására. Ez azért fontos, mert így el lehet különíteni két csoportot, amelyeknél jelentős különbség van a malignizálódási tendencia között.

Ezt követően mindkét kohorszból kiválasztottunk ismert szövettani eredményekkel rendelkező operált betegeket, és újra elemeztük a térfogatra normalizált EV-alapú miR-24 és miR-200b adataikat (S6. táblázat). A várakozásainknak megfelelően mindannyian az M csoportba tartoztak. Érdekes módon azt találtuk, hogy a rosszindulatú szövettani eredménnyel rendelkező betegeknél magasabb (miR-24-re normalizált) miR-200b szintek mutatkoztak a jóindulatú mintákhoz képest (S6 táblázat), bár a különbség valószínűleg az alacsony mintaszám miatt nem volt szignifikáns. A rosszindulatú M csoportban azonban további vizsgálatoknak meg kell erősítenie ezt a megállapítást nagyobb mintaszámmal. A ciszta folyadék EV-alapú miR-200b szintje is jelezheti a betegek rosszindulatú M csoportba tartozását, azonban további vizsgálatok szükségesek ezen megállapítás megerősítéséhez.

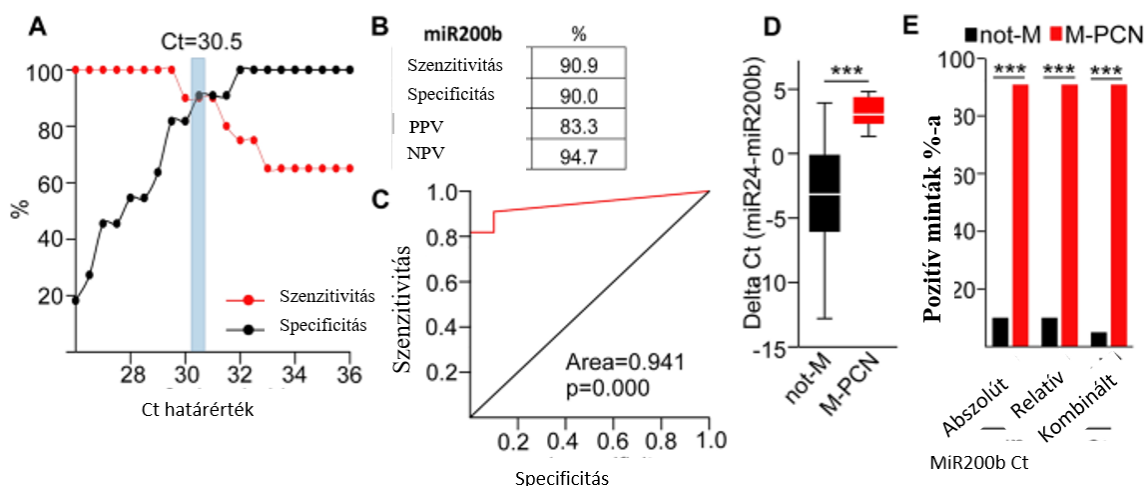


19A-G Ábra: Az extracelluláris vezikulák azonos cisztafolyadék minta térfogatból származó miR-200b a validációs kohorszba tartozó betegeket a nem mucinózus és mucinózus pancreas cisztózus neopláziás (PCN) csoportokba sorolja. **A:** A CD63+ gyöngyök százalékos aránya mucinózus PCN csoportban (M-PCN) és a nem mucinózus PCN csoportban (nem-M-PCN), áramlási citometriával kimutatva. **B:** A miR-200b elemzés és a multidiszciplináris panel általi kategorizálás közötti egyezést mutató minták aránya. A mintákat először a miR-200b jelenléte Ct (Cycle threshold) <35 vagy hiánya (Ct > 35) alapján M-PCN (n = 33) és non-M (n = 10) csoportokba soroltuk, valamint a azonos klinikai diagnózisú minták láthatók. **C:** A miR-200b-t tartalmazó minták százalékos aránya a nem-M (n = 23) és M-PCN (n = 20) csoporton belül (a multidiszciplináris klinikai panel osztályozása). **D:** A specifitás és szenzitivitás ábrázolása a Ct küszöb függvényében a jelenlegi és a hiányzó jelzők megkülönböztetésére. **E:** Szenzitivitás, specifitás, pozitív (positive predictive value- PPV) és negatív prediktív érték (negative predictive value- NPV) a ciszta folyadék extracelluláris vezikula miR-200b szintjéhez, ha Ct = 30,5 küszöbértéket használunk a jelenlévő és hiányzó jelzőkre (az M-PCN és a not-M összehasonlítása). **F:** A cisztafolyadékban jelen lévő miR-200b-t tartalmazó minták százalékos aránya (Ct < 30,5, n = 23 és n = 20 a not-M és az M-PCN esetében). **G:** A miR-200b Ct értékek ROC görbe elemzése. Figyelembe veendő, hogy a 0,85-ös görbe alatti terület jó kategória ezen tesztekhez. Mann–Whitney U-próbát (A) vagy Khi-négyzet tesztet (C,F) használtunk n.s.-vel: p > 0,05, **p < 0,01 és ***p < 0,005. Lásd még az **6. Táblázatot** (3)

9. Táblázat: Ct értékek, ha azonos extracelluláris vezikula RNS mennyiségből indulunk ki (3)

Ct értékek, ha azonos EV RNS mennyiségből indulunk ki										Sárga: mir24-mir200b>2 (1) és Ct (mir200b)<30,5 (1)
Abszolút Ct érték esetén							Relatív Ct érték esetén			Összesített
Vizsgálatban használt azonosító	Csoport 1	Csoport 2	mir200b (Ct<40)	mir24 (Ct)	mir200b (30,5-Ct)	mir24-mir200b			mir24-mir200b>2	Ct(mir200b)<30,5
17	PC	nem-M	nem d.	27,21	0	0			0	0
19	PC	nem-M	nem d.	32,76	0	0			0	0
30	S-PCN	nem-M	31,68	35,61	0	3,93			1	0
36	PC	nem-M	nem d.	37,29	0	0			0	0
39	PC	nem-M	36,60	32,91	0	-3,68			0	0
42	S-PCN	nem-M	nem d.	31,56	0	0			0	0
44	PC	nem-M	nem d.	34,19	0	0			0	0
47	S-PCN	nem-M	nem d.	39,33	0	0			0	0
50	S-PCN	nem-M	29,69	32,57	0,81	2,88			1	1
52	PC	nem-M	nem d.	33,67	0	0			0	0
56	S-PCN	nem-M	nem d.	33,24	0	0			0	0
58	PC	nem-M	38,52	37,43	0	-1,08			0	0
59	PC	nem-M	37,05	32,84	0	-4,21			0	0
62	S-PCN	nem-M	36,56	32,95	0	-3,61			0	0
65	PC	nem-M	36,29	32,20	0	-4,09			0	0
66	S-PCN	nem-M	32,55	32,97	0	0,42			0	0
68	S-PCN	nem-M	31,35	31,32	0	-0,03			0	0
69	S-PCN	nem-M	32,61	32,45	0	-0,16			0	0
73	S-PCN	nem-M	31,25	32,59	0	1,34			0	0
75	PC	nem-M	29,85	28,76	0,65	-1,09			0	1
3	M-PCN	M-PCN	30,26	33,29	0,24	3,03			1	1
27	M-PCN	M-PCN	26,72	29,10	3,78	2,37			1	1
28	M-PCN	M-PCN	26,22	28,48	4,28	2,26			1	1
32	M-PCN	M-PCN	31,84	33,18	0	1,33			0	0
34	M-PCN	M-PCN	24,07	27,66	6,43	3,59			1	1
41	M-PCN	M-PCN	27,92	32,16	2,58	4,24			1	1
49	M-PCN	M-PCN	29,47	34,00	1,03	4,53			1	1
60	M-PCN	M-PCN	26,86	29,45	3,64	2,58			1	1
67	M-PCN	M-PCN	29,29	31,44	1,21	2,15			1	1
74	M-PCN	M-PCN	21,95	26,74	8,55	4,80			1	1
76	M-PCN	M-PCN	28,91	33,72	1,59	4,81			1	1
	not-M				0,1			not_M		0,05

„Jelen van” gyakorisága	M-PCN							1-1 kombináció gyakorisága	M- PCN			0,91
Chi négyzet p-érték								Chi négyzet p-érték				<0,001

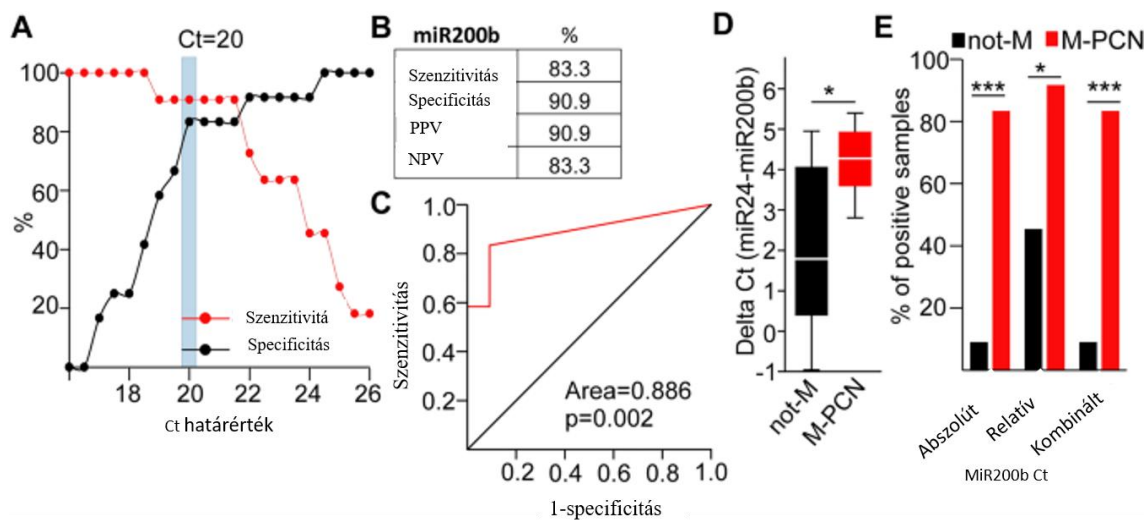


20. Ábra: Az extracelluláris vezikula miR-200b mérése tisztás folyadékmintákban egyenlő RNS-mennyiségre normalizált, a betegeket nem mucinózus (nem-M PCN) és mucinózus PCN (M-PCN) csoportokba sorolja. **A:** A specifitás és érzékenység a Ct (cycle trashold) függvényében a jelenlevő és a hiányzó jelzők megkülönböztetésére. **B:** Szenzitivitás, specifitás, pozitív (positive predictive value-PPV) és negatív prediktív érték (negative predictive value- NPV) a tisztafolyadék EV miR-200b szintjére (hiányzó és jelenlevő küszöbe: Ct=30,5). **C:** A miR-200b Ct értékek ROC (Receiver Operating Characteristics (curve)- hatásfokmérő karakterisztika görbe) elemzése. **D:** A relatív miR-200b Ct értékek megoszlása a jelzett betegcsoportok között. A relatív Ct értékeket a miR-24 és a miR-200b Ct közötti különbségeként határoztuk meg. **E:** A non-M és M-PCN csoportokban jelenlevő jelzőkkel rendelkező minták százalékos aránya. Ct <30,5 a miR-200b és ΔCt (miR-24-miR-200b) > 2 értékét használtuk az abszolút és relatív mennyiségi küszöbértékekhez. Vegye figyelembe, hogy e két paraméter (Ct <30,5 és ΔCt > 2) kombinációja segítségével lehetett a legjobban elkülöníteni M-PCN-eket n = 20 non-M és n = 11 M-PCN esetén. Mann–Whitney U-próbát (D) és Khi-négyzet tesztet (E) alkalmaztunk ***p <0,001 értékkel. Lásd még az **9. Táblázatot** (3)

4.3.5 A pancreas cisztákból nyert folyadék teljes miR-200b tartalma potenciálisan alkalmas lehet M-PCN-ek és non-M-PCN elkülönítésére

Érdekes módon, csak kevés tanulmány hasonlította össze az EV tartalom elemzés és az miRNS szintek potenciális alkalmazhatóságát teljes testfolyadék mintákból korai diagnosztika céljából. Annak érdekében, hogy ezt a lehetőséget megvizsgáljuk, pancreas ciszta folyadékokból miR-200b és miR-24 elemzést hajtottunk végre teljes RNS tartalomra normalizálva (**10. Táblázat**). Ugyanazt a megközelítést használva, mint az EV miRNS tartalom esetén vizsgáltuk amiR-200b abszolút mennyiségét. Ct<20 esetén „jelen van” jelölést adva, Ct>20 esetén „hiányzik” jelölést adva magas szenzitivitást, specificitást, NPV és PPV eredményeztek értékeket kaptunk. Továbbá ROC analízis segítségével mutattuk meg ennek hatékonyságát az M-PCN és non-M-PCN elkülönítésében (**21A-C Ábra**). Ezen felül megfigyeltük, hogy az M-PCN és a non-M-PCN csoportok miR-200b miR-24-re normalizált relatív Ct értékében eltérés mutatható ki (**21D Ábra**). A Ct<20 abszolút és a Ct<2 relatív miR-200b értékeinek kombinálása az M-PCN betegek elkülönítésére hatékonyabb volt, mint az abszolút és relatív értékek magában való használata (**10. Táblázat, 21E Ábra**). Mindezt követően az operált M-PCN betegek szövetmintáinak elemzése során magas miR-200b és miR-24 szinteket figyeltünk meg (**11. Táblázat**), ami arra utal, hogy a minták EV-ből izolált miR-200b és miR-24 pancreas eredetűek.

10. Táblázat: Ct értékek, ha azonos mennyiségű RNS-ből indulunk ki teljes cystafolyadék vizsgálatakor (3)											
Ct értékek, ha azonos mennyiségű RNS-ből indulunk ki teljes cystafolyadék vizsgálatakor									Sárga: miR24-miR200b>2 (1) és Ct(miR200b)<20 (1)		
Abszolút Ct érték esetén							RelatívCt érték esetén			Összesített	
Vizsgálatban használt azonosító	Csoport 1	Csoport 2	mir200b (Ct<40)	mir24 (Ct)	mir200b (20-Ct)	mir24-mir200b				Ct (miR24-miR200b)>2	Ct(miR200b)<20
44	PC	nem-M	28,22	30,01	0	1,79				0	0
52	PC	nem-M	23,66	22,70	0	-0,96				0	0
59	PC	nem-M	24,55	26,06	0	1,51				0	0
65	PC	nem-M	21,52	20,93	0	-0,59				0	0
63	PC	nem-M	21,78	26,42	0	4,63				1	0
72	PC	nem-M	22,26	23,54	0	1,28				0	0
50	S-PCN	nem-M	23,97	27,47	0	3,50				1	0
14	S-PCN	nem-M	24,92	29,81	0	4,89				1	0
47	S-PCN	nem-M	26,21	28,50	0	2,30				1	0
48	S-PCN	nem-M	18,82	23,77	1,18	4,95				1	1
42	S-PCN	nem-M	25,01	24,51	0	-0,51				0	0
43	M-PCN	M-PCN	18,77	23,66	1,23	4,89				1	1
54	M-PCN	M-PCN	19,12	23,96	0,88	4,84				1	1
32	M-PCN	M-PCN	19,88	23,82	0,12	3,94				1	1
51	M-PCN	M-PCN	16,78	21,09	3,22	4,31				1	1
41	M-PCN	M-PCN	18,66	24,06	1,34	5,40				1	1
49	M-PCN	M-PCN	18,12	22,35	1,88	4,23				1	1
45	M-PCN	M-PCN	24,42	24,80	0	0,38				0	0
46	M-PCN	M-PCN	19,57	22,38	0,43	2,81				1	1
55	M-PCN	M-PCN	18,34	23,31	1,66	4,97				1	1
67	M-PCN	M-PCN	21,81	27,10	0	5,30				1	0
74	M-PCN	M-PCN	17,24	20,78	2,76	3,55				1	1
76	M-PCN	M-PCN	16,74	20,37	3,26	3,63				1	1
„Jelen van” gyakorisága	nem-M				0,09			1-1 kombináció gyakorisága	nem-M		0,09
	M-PCN				0,83			M-PCN			0,83
Chi négyzet p-érték					<0,001			Chi négyzet p-érték			<0,001

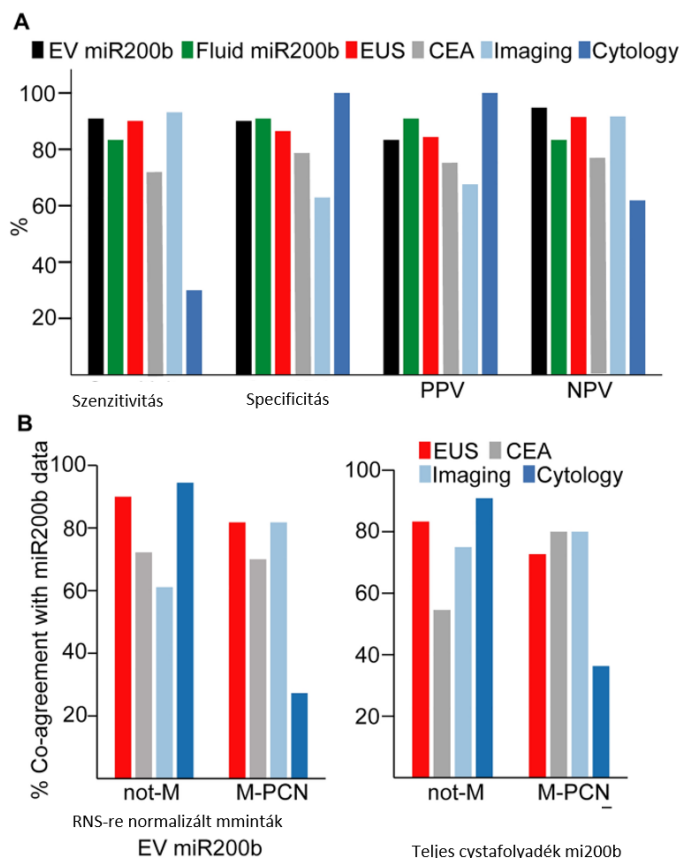


21A-E Ábra: a teljes ciszta folyadékból mért miR-200b megkülönbözteti a nem mucinózus PCN (nem-M-PCN) és a mucinózus PCN (M-PCN) mintákat. **A:** Az optimális ciklus küszöb (cycle trashold- Ct) meghatározása a jelenlevő és a hiányzó jelzők megkülönböztetésére. A legjobb elkülönülés Ct = 20–21 értéknél volt megfigyelhető. **B:** Érzékenység, specifitás, pozitív (PPV) és negatív prediktív érték (NPV) (a hiányzó és jelenlevő küszöbe: Ct = 20). **C:** A miR-200b Ct értékek ROC görbe elemzése. **D:** A relatív miR-200b Ct értékek megoszlása (különbség a miR-24 és a miR-200b Ct között) a jelzett betegcsoportokban. **E:** A nem-M és M-PCN csoportban jelenlevő jelzőkkel rendelkező minták százalékos aránya. Ct < 20 a miR-200b és ΔCt (miR-24-miR-200b) > 2 értékét használtuk az abszolút és a relatív mennyiségi határértékekhez. n = 11 non-M és n = 12 M-PCN esetén. Mann–Whitney U-próbát (D) és Khi-négyzet tesztet (E) alkalmaztunk *p < 0,05 és ***p < 0,001 értékkel.

11. Táblázat: A kutatás során használt TaqMan kártyák azonosítói (3)			
TaqMan assay IDs used in our studies			
miRNA	ID		
miR28-3p	477999_mir		
miR200b-3p	477963_mir		
miR375-3p	478074_mir		
miR24-3p	477992_mir		

4.3.6 A miR-200b szintje a legközelebbi összefüggést az EUS eredményekkel mutatja

Az egyszerű klinikai diagnózist nagyban megnehezíti az, hogy sokszor ellentmondás van az EUS morfológia, cytológia, CEA tartalom és a képalkotó eredmények között. Így, a következő lépésként összehasonlítottuk ezeknek a módszereknek a hatékonyságát; a cisztafolyadék teljes miR-200b szintjét, valamint az EV-kből izolált miR-200b szintjét az M-PCN és non-M-PCN minták elkülönítésében. A folyadékminták, amelyekben legalább 192 ng/mL CEA koncentráció van jelen valószínűsíthetően mucinózusak (122), ezért ezt használtuk a kutatásunkban határértékként. Érdekes módon a miR-200b szint és az EUS morfológia együttesen 80% feletti szenzitivitást, specificitást, PPV-t és NPV-t mutatott M-PCN és non-M-PCN elkülönítésére. Ezzel szemben a képalkotók, a cytológia, vagy a ciszta folyadék CEA szint legmagasabb esetben is csak 80% alatti értékeket mutatott szenzitivitás, specificitás, PPV és NPV tekintetében (**22A Ábra**). A minták M-PCN vagy non-M-PCN kategóriákba történő besorolása során EV, vagy teljes folyadék miR-200b szint alapján azt találtuk, hogy a legjobb egyezés az EUS morfológiával volt (**22B Ábra**). Mind a teljes ciszta folyadéktartalom és EV miR-200b tartalom szint az EUS morfológiával mutatta a legközelebbi összefüggést a tradicionális diagnosztikai eljárások közül M-PCN és non-M-PCN betegek elkülönítésében.



22A-B Ábra: miR-200b szintje a ciszta folyadékban és az endoscopos ultrahang (Endoscopic Ultrasound- EUS) morfológiája pontosabb, mint más diagnosztikai módszerek. (A) Szenzitivitás, specifitás, pozitív prediktív érték (PPV) és negatív prediktív érték (NPV) a jelzett módszereknél. (B) Azon esetek százalékos aránya, amelyekben a miR-200b szint alapján létrejött eredmény és más módszerek által meghatározott kategorizálás megegyezik. Megjegyzendő, hogy az abszolút és relatív ciklus küszöb (cycle threshold- Ct) értékek kombinációjával elemzett RNS-normalizált miR-200b-t (lásd 5. és 6. ábra) nem-mucinózus (nem-M-PCN) és mucinózus-PCN (M-PCN) csoportokba soroltuk. Ezen kategóriákon belül más módszerekkel (nem-M vagy M-PCN) való előrejelzést határoztuk meg. Az adatokat a teljes ciszta folyadékból vagy az izolált extracelluláris vezikulákból nyertük. Ezen módszer segítségével nyert eredmények egyeznek meg leginkább az EUS-sal nyert eredményekkel A minták számát lásd még a **4. Táblázatban**.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Preoperatív szérum CA 19-9 szint és PDAC operabilitása közötti összefüggésvizsgálata metaanalízis segítségével

Első célkitűzésünk kutatómunkánk során az volt, hogy megállapítsuk egy jól ismert és széles körben elterjedt biomarker, a CA 19-9, vajon használható-e pancreas ductalis adenocarcinomás betegeknél a tumor reszekabilitásának előrejelzésére, ami egy metaanalízis formájában került megvalósításra. A kitűzött célt sikeresen teljesítettük, ez a tanulmány szolgáltatja az első objektív bizonyítékot arra, hogy a preoperatív szérum CA 19-9 szint önmagában nem képes megjósolni a PDAC sebészi reszekabilitását. Ez összhangban van a klinikai gyakorlattal, miszerint a preoperatív vizsgálatoknak nagyon alaposnak kell lenniük a PDAC betegeknél és a sebészeti irreszekabilitást nem szabad kizárólag a preoperatív szérum CA 19-9 szintek alapján eldönteni.

Gyakran találkozunk azzal, hogy önmagában a magas CA19-9 okán irreszekábilisnak ítélnék meg egy beteget. Ezért kerestük, van-e egy olyan érték, ami kellő szenzitivitással elválasztja a két csoportot.

A CA 19-9 az eddig ismert legátfogóbban vizsgált és legspecifikusabb biomarker a hasnyálmirigyrák esetében (6). A klinikai gyakorlatban gyakran el kell dönteni, hogyan kezdjük el a hasnyálmirigyrák kezelését; azonnali sebészeti beavatkozást, vagy kemoterápiás kezelést kell-e alkalmazni. A CA 19-9 prognosztikus markerként a reszekabilitás előrejelzésére jelentős előnyt jelentene, mert könnyen hozzáférhető a vérben egy szérumszint vizsgálatával. Korábbi áttekintő tanulmányok összefoglalóan ismertetik hatékonyságát a reszekabilitás és az életben maradási arányok előrejelzésében, de eddig még nem jelent meg metaanalízis ebben a témában. Egy szisztematikus áttekintésben (systematic review) Poruk és munkatársai közvetlen összefüggést írtak le a magas preoperatív CA 19-9 szintek és az R0 reszekabilitás között, eredményük kvalitatív elemzése alapján (115). Annak ellenére, hogy számos tanulmány beszél a CA 19-9 hasznosságáról az operabilitás előrejelzésében, a klinikai gyakorlatban általában nem használják kizárólagosan a preoperatív szérum CA 19-9 szintet a hasnyálmirigyrák reszekabilitásának meghatározására (58). Az irodalmi adatok alapján egyértelmű pozitív összefüggés van a magas CA 19-9 szintek és a daganat mérete, valamint terjedésének

előrehaladottsága között a szervezetben. Széles körben használják a betegség monitorozására kemoterápia vagy a műtét után az esetleges recidíva felismerésére (123).

A preoperatív CA 19-9 értékek szignifikáns különbséget mutattak a reszekábilis és irreszekábilis csoportban kutatásunk során. A preoperatív szérumszint CA 19-9 értékek 964 U/ml-rel ($p < 0,001$) alacsonyabbak voltak a reszekábilis csoportban, mint az irreszekábilis csoportban. Léteznek olyan, jelenleg is használatban levő irányelvek, amik a preoperatív szérumszint CA 19-9 szintet önmagában használják döntéshozásra. Az egyik ilyen, széles körben elfogadott irányelv az Európai Orvosi Onkológiai Társaság (European Society for Medical Oncology- ESMO) 2023-as irányelve a hasnyálmirigy rák kezelésére vonatkozó „Klinikai irányelvek a hasnyálmirigy rák diagnózisa, kezelése és követése” („Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up) címmel (124).

Ez az irányelv, a műtét előtti 500 IU/ml feletti szérumszint CA 19-9 értéket a kondicionális borderline reszekábilis kritériumaként tartja számon (124).

A 2018-as Franciaországi klinikai irányelvek (Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up) amik a hasnyálmirigyrák diagnosztikájáról, kezeléséről és követéséről szólnak szintén használják bizonyos döntések meghozására a preoperatív szérumszint CA 19-9 szintet (125). A fenti irányelv javaslatai alapján a szérumszint CA 19-9 szintje két esetben nyújt prognosztikai információt: egyrészt segít megjósolni a daganat potenciális reszekábilisát a diagnóziskor, ha a szérumszint eléri 1000 U/ml-t, valamint segít a terápiás utánpótlásban, azáltal, hogy a műtét utáni normalizálódás jó prognózissal asszociált előrejelzője, míg a kemoterápia vagy sugárterápia alatti csökkenés a kezelések hatékonyságát mutatja (125). A laparoszkópos műtétiexploráció lehetővé teszi a kis peritoneális, vagy májmetasztázisok kimutatását és biopsziáját, ami a terápiás stratégia újratervelésében segít olyan betegeknél, akiknek reszekábilisnak gondolták a daganatot a műtét előtti kivizsgálás alapján, de megkíméli őket a nagyobb megterhelést igénylő laparotomiás explorációtól (125). A laparoszkópos exploráció egyik indikációja az irányelv alapján a magas preoperatív szérumszint CA 19-9 szint ($>130-400$ U/ml) (125)..

Ezen források bizonyos kategóriákban a döntéshozáshoz önmagában használják a preoperatív szérumszint CA 19-9 szintet, azonban sok aspektusa van mindkét forrásban leírt

kritériumoknak, amikben számos más változót is figyelembe vesznek, nem csak ezt az egyetlen értéket és egyik sem fogalmaz meg egyértelmű kontraindikációt ez alapján a műtétrel szemben.

Más munkacsoportok is vizsgálták hasonló célokkal a preoperatív szérumban CA19-9 szintet a betegeknél. Syad S. Raza és munkatársai által elvégzett metaanalízis nem konkrétan a reszekabilitást, hanem a távoli áttétek jelenlétének korrelációját elemezte az emelkedett szérumban CA 19-9 szint értékeket felhasználva. Eredményeik alapján a 336 U/ml-es határérték felett megbízhatóan jelzi távoli metasztázis jelenlétét pancreas tumoros betegnél (126) , de ez a tanulmány sem fogalmaz meg egyértelmű kontraindikációt sebészeti műtéti ellátás megkísérlése ellen önmagában a preoperatív szérumban CA 19-9 szint alapján.

A tanulmányuk eredményei mindazonáltal fenntartással kezelendők figyelembe véve azt, hogy a 2017-es IAP irányelvek alapján az 500 U/ml feletti CA 19-9 érték is „csak” a borderline reszekabilitás kritériuma.

A dolgozat eredmények szekciójában leírtak szerint, a beválogatott tanulmányokban szereplő összesített ROC görbékből számolt AUC (Area Under Curve- Grafikon alatti terület) eredmény 0,79 (Konfidencia Intervallum: 0,694-0,893) volt, ami a „Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy” alapján a preoperatív szérumban CA 19-9 szint összesített értéke 0,79-ként a ’fair”, vagyis elfogadható kategóriába tartozik, de nem éri el a 0,8 értéket, tehát nem klasszifikálható a „jó” kategóriába. Ennek megfelelően már ez alapján is felmerül kétség afelől, hogy alkalmas lenne egy egyértelmű kezelési kimenetelt befolyásoló lépés eldöntésére önmagában (127).

Továbbá az eredményeink alapján az elvégzésre került az I négyzet próba a minta heterogenitásának megvizsgálása céljából. Az próba eredménye 87,4% volt, meghaladva 75%-os határértéket, ez azt jelenti, hogy jelentős volt a vizsgált populáción belüli a heterogenitás (127). Mindezek alapján annak ellenére, hogy bizonyos irányelvek használják válogatott kritériumokba való sorolásra, a műtéti ellátás kontraindikációjára, vagy reszekabilitás megjósolására nem alkalmas a preoperatív szérumban CA 19-9.

Az általunk bevont nyolcnál több tanulmány bevonása a metaanalízis minőségének jelentős romlását okozta volna. Ezek a cikkek rendelkeztek a legjobb elérhető adatokkal

a statisztikai elemzés elvégzéséhez, de nem voltak elegendőek a fent említett okok miatt egy megbízható SROC elemzés elvégzéséhez (98). Az összesített (poolozott) szenzitivitást és specificitást a mellékelt vizsgálatokból nyert nyers adatokból számítottuk ki. Az ebből származó eredmények részben alátámasztották következtetésünket. Az összesített szenzitivitási és specificitási értékek nem voltak elegendőek ahhoz, hogy egy ilyen súlyos rosszindulatú betegség esetén erre terápiás döntést lehessen alkalmazni a klinikai gyakorlatban. Egy további alcsoport analízis elvégzése volt tervezett az adatok jelentős heterogenitásának megmagyarázása céljából, de az elérhető kinyert adatok erre nem voltak elegendők.

Mindazonáltal ennek a metaanalízisnek számos erőssége van. Az elemzésben szereplő tanulmányok releváns bizonyítékot tartalmaznak a célkitűzésekben megfogalmazott kérdés megválaszolására. A „*Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy*” irányelvei alapján történt a tanulmányok beválogatása, a beválogatott tanulmányok szisztematikus áttekintésben (systematic review) és a metaanalízis elvégzése az előre meghatározott protokoll szerint valósult meg és teljesítette a célkitűzésekben megfogalmazott célokat.

További vizsgálatok során kombinálható lenne a preoperatív szérum CA 19-9 szint érték más fontos paraméterekkel, mint például a képalkotó vizsgálatok eredményeivel és a beteg általános állapotával, hogy új preoperatív pontozási rendszereket (scoring system) dolgozzunk ki a PDAC sebészeti reszekabilitásának meghatározására. A jövőben további potenciális, a PDAC reszekabilitását előre jelző markerek vizsgálata hatékonyabbá tehetné a műtéti tervezést és növelné a sebészeti reszekabilitás arányát, miközben csökkentené a műtét közben felfedezett irreszekábilis eseteket.

5.2. Extracelluláris vezikulák azonosítása és proteomikus karakterizálás humán pancreas nedvből

Kutatásunk második célkitűzése az volt, hogy kiderítsük, vajon humán pancreas nedvből azonosíthatóak -e potenciális új biomarkerként szolgáló extracelluláris vezikulák. Sikeresen izoláltunk elsőként EV-ket emberi hasnyálból. Ezen EV-k tartalmának elemzése során számos fehérjét azonosítottunk, amik a jövőben potenciális jelöltek lehetnek hasnyálmirigy tumorok markereiként.

A PDAC továbbra is rosszindulatú daganat, kiemelkedően magas mortalitási arány mellett. Az EV-k ígéretes potenciális forrásai lehetnek olyan, korán nehezen diagnosztizálható daganatoknál, mint a pancreas rák. Ebben a tanulmányban és munkacsoportunk korábbi közleményeiben először bizonyítottuk EV-k jelenlétét humán hasnyálmirigy nedv mintákban (2). Ez a felfedezés lehetővé tett egy újszerű megközelítést, amelynek során az EV-ket közvetlenül a rákos betegek intraoperatív nyert hasnyálmirigynedv mintáiból elemeztük. Az EV jelenléte a hasnyál enzimekben gazdag miliójében kissé váratlan. Tanulmányunkban alapos vizsgálatnak vetettük alá a hasnyálmirigynedv mintákat és számos bizonyítékot mutattunk be az EV-k jelenlétére.

Ezek eredményeképpen bizonyítottuk EV-k jelenlétét transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével, ahol morfológiai tulajdonságaik alapján egyértelműen azonosíthatók voltak (9 A-C ábra), TRPS módszerrel, ahol tipikus EV mérettartományokban történt részecskedetektálás, fehérjék feldúsításával az EV-izolátumokban, amelyek megfelelnek a „kis extracelluláris vezikulák” összetételének (117), áramlási citometria vizsgálatával az EV markerek kimutatása segítségével.

Ilyen típusú folyadékok elemzése lényegében folyadékbiopsziás módszer („liquid biopsy”), egy új típusú, az elmúlt időben sokat vizsgált diagnosztikus módszer. A „liquid biopsy”, vagy folyadékbiopsziás módszer egy gyűjtőfogalom, ami magába foglalja biomarker gyűjtési módokat, amik testfolyadékokból vett mintákból dolgoznak, például nyálból vizeletből, vérből és a kutatásunk esetében hasnyálból. Ennek során értékes markerek kinyerésére van lehetőség, ilyenek a keringő daganatsejtek, EV-k és a keringő tumor DNS (128). A hagyományos szövetbiopsziákhoz képest a folyadék biopsziák egyedülálló előnyökkel járnak, mint például a kisebb mintavételi invazivitás, a

kényelmes mintavétel, a tumor heterogenitásának jobb tükrözése és a sorozatos mintavételre való lehetőség. Ez utóbbi valós idejű, dinamikus és longitudinális elemzéseket tesz lehetővé, potenciálisan átfogó és hosszú távú utánkövetésre vonatkozó információkat biztosítva (128). Ugyanakkor ki kell emelnem azt, hogy a folyadékbiopsziák előnyei mellett számos folyadékból való minta nyérése potenciálisan rendkívül eszközigenyes, vagy invazív feladat lehet. Természetesen a műtéti körülményeken kívül a hasnyálmirigyvezeték rendszer kanulálása egy potenciálisan rendkívül bonyolult megoldható feladat lenne (2). Emellett a pancreas vezetékből származó extracelluláris vezikulák izolálása valamint ezt követően karakterizálása is hosszas folyamatot vesz igénybe és jelentős költségekkel járhat. Erre tekintettel a kutatás jövőbeni hasznosítása nem biztos, hogy a pancreas nedv EV vizsgálata lesz. Ezen eredményeket felhasználva lehetne a jövőben egy jóval kevésbé invazív, vér vizsgálatán alapuló tesztet kidolgozni, ami hordozná a liquid biopsy módszerek fent ismertetett előnyeit az egyszerű mintavételt és költséghatékonyságot.

Az EV-k, különösen az EV mérettartomány alapján kategorizált populációi közül a kis EV-k lehetséges korai biomarkerei lehetnek a malignus transzformációnak, tekintettel arra, hogy különböző mértékben, de minden egészséges, valamint már kórosan átalakult sejt kibocsátja őket és jelen vannak gyakorlatilag minden testváladékban. Érdekes módon az EV-ken lévő felszíni fehérjék mintázata alapján sokszor következtetéseket lehet levonni az EV-t kibocsátó sejt eredetéről, ezért lehetnek alkalmasak daganatos sejtszaporulatok biomarkereiként való használatra (128).

A hasnyálmirigyrák sejtekből származó EV-k egyik legígéretesebb, de egyben az egyik legtöbb vitát kiváltó Glypican-1 (GPC1), egy sejtfelszíni proteoglikán. Melo és munkacsoportja megállapították, hogy a GPC1+ EV-k kimutathatóak a hasnyálmirigyrákos betegek plazmájából (129). A tanulmányukban közzétett eredményeik alapján a GPC1+ EV-k egyértelműen megkülönböztették a korai stádiumú hasnyálmirigyrákos betegeket az egészséges egyénektől és a jóindulatú hasnyálmirigy-betegségben szenvedő betegektől, figyelemre méltó specificitással és 100%-os szenzitivitással (129).

A későbbi, más kutatócsoportok által az eredményeik és protokolljukból kiindulva elvégzett vizsgálatok azonban azt találták, hogy a GPC1+ EV-k nem tudták

megkülönböztetni a hasnyálmirigyrákos betegeket a jóindulatú hasnyálmirigy-betegségben szenvedő betegektől (128). Ma már azt is tudjuk, hogy a GPC1 számos más tumoros betegségnél is kifejeződik, úgy mint emlőrák, ovarium tumorok, prosztata tumor és nyelőcső tumor esetén (130). Ebből látszik, hogy szűrővizsgálatra, vagy differenciál diagnosztikai szándékkal pancreas tumorok esetén a glypican a nem használható, az eredeti Melo és munkatársai által publikált közleménnyel ellentétben meglehetősen gyengébb specificitása miatt.

Ez alapján nem ért véget az EV alapú pancreas tumor biomarkerek keresése, továbbra is folyik a rákos sejt-specifikus felszíni markerek keresése és továbbra is fontos és sokban hozzájárulhatnak a hasnyálmirigyrák diagnosztikai módszereihez az olyan kutatások, mint a miénk.

Genetikai szinten a PDAC jól karakterizált tumorfajta, ennek ellenére nem teljesen tisztázottak a tumor agresszív természetének molekuláris okai. Jelen pillanatban az az elgondolás, hogy a PanIN invazív tumorrá alakulása összefügg az onkogének és tumor szupresszor gének mutációival (9). A tumor egyre agresszívabb viselkedését a mutációk fokozatos felhalmozódásával magyarázzák (9). A K-ras onkogén mutációja az egyik legkorábbi és leggyakoribb mutáció, jelen van az esetek 90%-ban. A Her-2/neu onkogén aktivációja és a p16, p13, SMAD4 tumor szupresszor gének funkcióvesztéses mutációja szintén gyakori eltérés. Fokozódó genetikai variabilitást mutatnak az előrehaladott PanIn léziók, egyre gyorsabban proliferálnak és végül képessé válnak metastasis kialakítására (10).

A kis EV-k alakítják a tumor mikrokörnyezetét és a premetasztatikus rést („premetastatic niche”). Az EV-k kulcsfontosságú rakományokat szállítanak, amik rendkívül lényeges szerepet töltenek be a sejtek közötti kommunikációban, molekuláris információk továbbításában és a sejtfunkciók szabályozásában. A normál szövetekhez képest a hasnyálmirigyrák szövetében a kis EV-k termelődésének aránya jelentősen magasabb. A rákeredetű kis EV-kben lévő fokozottabban aktivált fehérjék részt vesznek a vezikulák transzportjában, a tumorszövet heterogenitásának létrejöttében és a rák progressziójában (131). Ez mutatja, hogy mennyire relevánsak és fontosak a hasnyálból izolált EV-k és különböző modalitásokkal való vizsgálatuk, amiket kutatásunk során végeztünk.

Liang és munkatársai által jegyzett kutatás során egy gyors, ultraérzékeny nanoplaszmonikusan dúsított szórás elemzést (nPES) írtak le, amely közvetlenül meghatározza a daganatból származó EV-eket már 1 µl plazmából. A vizsgálat az antitestekkel konjugált arany nanogömbök és nanorudak EV-specifikus antitestek által EV-khez való kötését használta fel egy szenzorchipen, hogy helyi plazmonhatást hozzon létre, amely fokozza a daganatból származó EV-detektálás érzékenységet és specificitást. Ennek során azonosításra került egy hasnyálmirigyrák potenciális EV biomarker, az efrin-A típusú receptor 2-t (EphA2) és kimutatták, hogy az EphA2-EV-ekre vonatkozó nPES-teszt megkülönbözteti a hasnyálmirigyrákos betegeket a hasnyálmirigyrákos betegektől és az egészséges alanyoktól. Az nPES-teszt könnyen finomítható klinikai használatra, és könnyen adaptálható más állapotok diagnosztizálására és monitorozására betegség-specifikus EV biomarkerekkel (132).

Kutatásunk abban is különbözik a fentitől és több előzőtől, amiknél az EV biomarkerek vagy a pancreas tumoros sejtek kondicionált közegéből, vagy a keringésből kerültek izolálásra, hogy ezeknél az EV-k túlnyomó többsége nem direkt tumoros eredetű volt (86-88, 132). Ezen tanulmány egy további másik eredeti aspektusa az elkülönített méret alapú EV frakciók elemzése volt, amely előző laboratóriumi és más munkákból származó kutatásokra épült, amelyek azt mutatták, hogy a méret alapú EV frakciók különböznek a nukleinsav (79), fehérje (76) és lipidek tartalmukban (101). Proteomikai elemzésünk kimutatta, hogy az azonosított fehérjék 41,8%, 48,4% és 50,1% -a egyedülálló volt a különböző méret alapú EV frakciókban a krónikus pancreatitis, PDAC és Vater-papilla tumoros betegeknél.

A közelmúltban munkacsoportunk és mások EV-eket izoláltunk PDAC-betegek perifériás véréből és megkezdődött az EV-k miRNS rakományának elemzése (103, 133).

Érdekes módon ezek a tanulmányok különböző, PDAC potenciális markereiként használható EV rakományelemek azonosításához vezettek. Ezen túlmenően egy nemrégiben készült tanulmány EV-eket használt az IPMN-ek rosszindulatú potenciáljának előrejelzésére. Yang KS és munkatársai perifériás vért használtak és a MUC5AC fehérjét azonosították az EV rakomány komponenseként, amely előre jelzi az IPMN-ek rosszindulatú progresszióját (95). Vizsgálatuk azonban csak az IPMN-ekre összpontosított, anélkül, hogy figyelembe vett volna más rosszindulatú potenciállal

rendelkező M-PCN-eket is. Az MDR1-et korábban kimutatták prosztatarák-eredetű EV-
kel összefüggésben (134). Ezenkívül a CFTR és az EV-k között írtak már le korábban
összefüggést (135) és a PDAC patomechanizmusában is szerepet játszanak, mivel a
mutációk növelik ennek a rosszindulatú daganatnak a kockázatát (136). Fontos, hogy
ezen fehérjék némelyikének jelenlétét áramlási citometriával validáltuk PDAC sejtvonal-
eredetű és hasnyálmirigynedv-eredetű EV-ken.

Míg ez és más tanulmányok (2, 87, 88, 132, 137, 138) felvetnek bizonyos molekulákat,
amik potenciálisan használhatóak lennének pancreas rák diagnózisához, de további
validálásra van szükség nagyobb számú betegmintával, mielőtt az EV-diagnosztika
valósággá válna a klinikumban.

Ennek ellenére ebben a tanulmányban bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy
a hasnyál egy olyan testnedv, amelyben EV-k vannak jelen és izolálhatók, hogy
potenciális biomarkerforrásként szolgáljanak a pancreas tumorok diagnosztikájában.

5.3. MiR-200b szint segítségével a PCN-ben szenvedő betegek különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók

Harmadik célunk az volt, hogy kiderítsük, pancreas cisztosus neoplasias betegcsoportokban ciszta punktatumból izolált extracelluláris vezikulák alkalmazhatóak-e biomarkerként a magasabb malignizálódási potenciállal rendelkező alcsoportok elkülönítésére. Kutatásunk során sikeresen szolgáltatunk bizonyítékot arra, hogy az M-PCN-ekből származó EV-kben magasabb a miR-200b szint, ami megkülönbözteti a potenciális malignizálódási tendenciával rendelkező M-PCN és nem-M-PCN kategóriába tartozó betegeket.

Mivel az EV-k számos betegségben szolgálhatnak új diagnosztikai eszközökként, úgy döntöttünk, hogy EV-alapú biomarker-kutatást végzünk a mucinózus típusú PCN-ek elkülönítése céljából. Az eredmények szekcióban bemutattuk, hogy a krónikus pancreatitis (PC) eredetű és PCN eredetű folyadékminták CD63+ felszíni markerrel rendelkező EV-ket tartalmaznak, de CD81+ EV-ket nem. Érdekes módon méréseink során nem találtunk összefüggést az EV-k koncentrációja és a betegkategóriák (krónikus pancreatitis vagy PCN, M-PCN vagy nem-M PCN és krónikus pancreatitis betegek) között. Bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy az M-PCN-ből származó EV-k közös miRNS-készlettel rendelkeznek, amely a miR-28-3p-t, a miR-200b-t és a miR-375-öt tartalmazza. Ez alapján már önmagában bizonyos mértékig elkülöníthetőek voltak rákomány összetétel alapján a mucinózus és nem mucinózus PCN betegcsoportok.

Vizsgálatunkat folytatva az volt a célunk, hogy a cisztafolyadékmintákból izolált EV-k mikro-RNS profilja alapján tudjuk elkülöníteni a mucinózus és nem mucinózus PCN csoportokat, nem csak az átfedő miRNS tartalom, hanem specifikus miRNS profilok keresése alapján is. Több, korábbi hasnyálmirigy-ciszta eredetű miRNS-ek kutatásával foglalkozó tanulmány arról számolt be, hogy PCN betegcsoportok vizsgálata során mikro-RNS profilok segítségével tudtak elkülöníteni alcsoportokat malignizálódási potenciál szerint (139, 140).

Habbe és munkatársai a kutatásuk során archív, nem-invazív IPMN szövettani metszeteket használtak fel és ezek vizsgálata során kvantitatív reverz transkripció PCR módszert alkalmaztak (qRT-PCR). Tíz különböző kifejezetten túlműködő („upregulated”)

miRNS-t azonosítottak a méréseik során. Ezek közül a legprominensebbek a miR-155 és a miR-21 volt. Ekkor már ismert volt, hogy ezek a mikro-RNS-ek összefüggésbe hozhatók több humán daganatos betegséggel, többek között a hasnyálmirigyrákkal, ezért döntöttek ezeknek a mikro RNS-eknek az elemzése mellett (139, 140). Caponi és munkatársai szintén qRT-PCR módszert alkalmaztak szövettani metszetek használatával, aminek során 65 invazív IPMN, 16 nem-invazív IPMN és 5 normál hasnyálmirigy vezeték szövetmintát vizsgáltak. Eredményeik alapján a miR-155 és a miR-21 volt kifejezetten aktívabb az invazív IPMN mintákban a nem-invazív IPMN-ből származó mintákhoz képest (139, 140). Natsuhiko és munkatársai által végzett kutatás során IPMN-ben szenvedő betegekből származó szövet és hasnyál mintákban elemezték a miRNS-ek expressziójának a szintjét. Ennek során azt találták, hogy miR-10 és a miR-221 túl volt szabályozva az invazív IPMN-es betegekből származó szövetmintákban, valamint hasnyálmintákban (141). Ezen három kutatás retrospektív, ismert szövettanú PCN-ekkel és egy esetben emellett hasnyál mintákat vizsgáló kutatás megmutatta, hogy különböző malignitási potenciállal rendelkező PCN-ek elkülönítésére alkalmasak lehetnek specifikus mikro RNS profilok. Érdekes módon elemzésük során nem kerültek azonosításra miRNS profilbeli különbségként az M-PCN és a nem-M-PCN csoportok között. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy ezek a vizsgálatok elsősorban szövetmintákra fókuszáltak és eltérő betegségcsoportokat használtak.

Az M-PCN és a nem-M eredetű cisztafolyadékmintákból izolált EV-k mikroRNS profiljának összehasonlításakor azt találtuk, hogy a miR-200b jelenléte specifikus az M-PCN-eredetű EV-kre. Fontos azonban, hogy bebizonyítottuk, hogy a miR-200b szint nem csak az EV-kből, hanem a teljes cisztafolyadékból mérve is elkülöníti a non-M-PCN és az M-PCN betegeket, bár rosszabb szenzitivitással és rosszabb negatív prediktív értékkel. A jövőben esetlegesen tervezett vizsgálatok során nagyobb számú minta vizsgálatára lenne szükség annak eldöntésére, hogy az EV-alapú miR-200b analízis jobb szenzitivitás és NPV értéke az teljes cisztafolyadékhoz képest bír-e klinikai jelentőséggel. Amennyiben az esetleges későbbi vizsgálatok azt mutatnák, hogy nincsen jelentősége, a klinikai gyakorlatban könnyebben megvalósítható lehetne egy, a direktben a cisztafolyadékból történő mikro RNS mintavétel alapján működő diagnosztikai módszer.

Megjegyzendő azért, hogy az EV-ből izolált miRNS mind az érzékenység, mind a specificitás, mind a pozitív és negatív prediktív érték tekintetében jobban teljesít, mint

néhány más klasszikus diagnosztikai módszer, mint például a CEA vagy a képalkotó technikák (142).

A cisztafolyadék EV eredetű miR-200b elemzésekor ezek a paraméterek 83% felettiek voltak, ezzel szemben a cisztafolyadék CEA koncentrációja a cisztás folyadékokban 192 ng/ml határértékkel csak 52-78%-os szenzitivitással és 63-91%-os specificitással képes különbséget tenni mucinosus és szerózus PCN-ek között (122). Hasonlóképpen, az EUS morfológia és képalkotó modalitások pontossága széles skálán mozog a PCN altípusok megkülönböztetése tekintetében (32, 143, 144). A ciszta folyadék citológiai vizsgálatának magas a specificitása (83-100%), de alacsony a szenzitivitása (27-48%). Mindezek a módszerek tehát nem kellőképpen pontosak a malignus potenciállal rendelkező elváltozások előrejelzésében a pancreas cisztózus elváltozásai esetén (145).

Az EV-k a legtöbb testnedvben jelen vannak, így bizonyos betegségspecifikus molekulák könnyen hozzáférhető forrásai lehetnek. Munkánk során bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a hasnyálmirigy-ciszta folyadék EV-ket tartalmaz. Érdekes módon azt találtuk, hogy ezek az EV-k pozitivitást mutattak a CD63-ra, azonban nem tudtuk kimutatni a CD81-et a felületükön. Ez összhangban van korábbi eredményeinkkel, amelyek azt mutatták, hogy a hasnyálmirigynedvben magas a CD63+, de alacsony a CD81+ EV-k száma (146). Ezenkívül korábban beszámoltunk arról, hogy mind a normál, mind a pancreas ductalis adenocarcinomában (PDAC) szenvedő betegek vérében CD63+/CD81-EV-k voltak (2). Ezen túlmenően egy nemrégiben megjelent tanulmány eredményei alapján a vér eredetű EV-k többsége csak CD63 pozitivitást mutatott, CD81-et nem (147). Jelenleg még nem tisztázott, hogy a CD63+ és a CD81+ EV-k eltérő sejt eredetűek-e és van-e ennek a különbségnek funkcionális jelentősége.

Az EV-k egyik legfontosabb rakománya az miRNS-ek. Az EV-k miRNS-tartalmát számos betegségben, például hasnyálmirigyrákban már behatóan tanulmányozták (95, 121, 148).

Zeöld és munkatársai kutatásuk során arra az eredményre jutottak, hogy a PDAC organoidokból származó EV-k miRNS rakománya nagymértékben különbözik a betegek között. Az EV eredetű EV miR-21 és miR-195 szintje magasabb volt a PDAC betegektől származó vér eredetű EV-ben, mint az egészséges kontrollokban, bár nem találtak különbséget a krónikus pancreatitis mintákhoz képest (95, 121, 148).

Guo és munkatársai vizsgálata során krónikus pancreatitises és pancreas daganatos betegek véréből izolált kis mérettartományba tartozó EV-k mikroRNS tartalmát vizsgálták. Eredményeik alapján az EV eredetű miR-95-3p és a miR-26b-5p átlagosan 84,1%-os szenzitivitást és 96,6%-os specificitást mutatott a PDAC és krónikus pancreatitises betegcsoportok elkülönítésére. A „Bayes-hálózat” (Bayesian network) segítségével végzett ok-okozati elemzésük kimutatta, hogy a miR-95-3p a "rák" "következményével", a miR-26b-5p pedig a "hasnyálmirigy-gyulladás" "okával" társult (94).

Lai és munkatársai kutatásuk során PDAC és krónikus hasnyálmirigy gyulladásos betegcsoportokat vizsgáltak. Összehasonlították a keringő kis mérettartományba tartozó EV-k glipikán-1 és mikroRNS szintjét normál kontroll egyénekben, valamint PDAC-ban és krónikus pancreatitisben szenvedő betegeknek. Kutatásuk eredményei alapján az EV-ből származó glipikán-1 nem különítette el a PDAC-s betegeket, de miR-10b, miR-30c és miR-181a magas szintje, valamint a miR-let7a alacsony szintje alapján elkülönültek a PDAC és nem PDAC betegek (88).

Ezen kutatások eredményei alapján látható, hogy a EV eredetű mikroRNS-eknek jelentős szerepe lehet a hasnyálmirigyrák diagnosztikájában.

Bár egy közelmúltban végzett munka az EV-rakományt az M-PCN-ek egyik alcsoportjában, az IPMN esetében vizsgálta, a vérből származó EV-kből származó fehérjékre összpontosítottak (149). Ezzel szemben közvetlenül ezen kutatás során közvetlenül tanulmányoztuk a hasnyálmirigy-ciszta folyadékból származó EV-k miRNS rakományát és azt találtuk, hogy egyes miRNS-ek különböző szinten voltak jelen a különböző betegcsoportokból származó EV-kben. Fontos, hogy a mi tanulmányunk az első, amely összefüggést mutatott ki a miR-200b szintje és a PCN-ek mucinos jellege között.

A miR-200 család és a miR-200b azért lényeges, mert ez a mikro RNS család számos, a tumorok szabályozásával kapcsolatos mechanizmusban vesz részt azok progresszióját segítő vagy gátló szerepben. A miR-200 család öt különböző mikro- RNS-ből áll, ezek a miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 és a miR-429. Az egyik legfontosabb mechanizmus aminek a szabályozásában részt vesznek, az a tumornövekedést segítő jelátviteli utak szabályozása. A tumor növekedést különböző növekedési faktorok,

specifikus jelátviteli utak, növekedést gátló mechanizmusok elkerülését segítő faktorok, mint a p53 vagy az RB és az osztódási halhatatlanság kialakítása („replicative immortality”) tartják fenn (150). A proliferációt számos jelátviteli útvonal szabályozza, ideértve a PI3K/AKT, MEK/ERK, JAK/STAT és β -catenin/Wnt útvonalakat, valamint a sejtciklus-szabályozókat, például a ciklin-dependens kinázokat (CDK-k). Ezeknek az útvonalaknak a komponenseit miRNS-ek szabályozzák, amelyek elősegíthetik vagy gátolhatják a ráksejtek proliferációját. Az ezt szabályozó miRNS-ek közé tartozik a miR-200 család (151). A miR-200b 4 ráktípus esetében serkenti, míg 13 ráktípus esetében gátolja a proliferációt. A vastagbélrák, a nem-kissejtes tüdőrák és a petefészekrák esetében az eredmények ellentmondásosak a szakirodalomban (151). A rákos sejtek migrációja és inváziója többlépcsős folyamat, amely magában foglalja a citoskeleton átrendeződését, a sejtek és az extracelluláris mátrix (ECM) kölcsönhatását, majd az ECM lebontását. Ezen lépéseket olyan mikro-RNS-ek (miRNS-ek) szabályozzák, amelyek gátolhatják vagy elősegíthetik a daganat progresszióját (152). A miR-200 család tagjai a legtöbb daganattípusban gátolják a sejtek migrációját és invázióját. A miR-200b fokozza a vesesejtes karcinóma migrációját, ugyanakkor csökkenti a sejtek migrációját 16 daganattípusban és az inváziót 15 daganattípusban (151). Az apoptózis az úgynevezett programozott sejthalál, amely nélkülözhetetlen a szöveti homeosztázis fenntartásához. Az apoptózis mechanizmusa komplex, több lépésből álló folyamat. E lépések mindegyike károsodhat, ami karcinogenezishez vezethet. Az apoptózis szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszanak a kaspázok, amelyek lehetnek az apoptózis kezdeményezői és végrehajtói is (153). Számos tanulmány beszámolt arról, hogy a miRNS-ek mind az intrinsic (belső), mind az extrinsic (külső) apoptózis útvonalak szabályozásában szerepet játszanak (154). A miR-200 család tagjai főként az apoptózist elősegítőként működnek. A miR-200b öt daganattípusban, a miR-200c pedig hat daganattípusban segíti elő az apoptózist (151). Az angiogenezis új kapillárisok képződésének folyamata a meglévő érhálózatból, ami döntő tényező a daganat kialakulásában, progressziójában és az áttétképzésében (150). A rosszindulatú daganatok olyan mikrokörnyezetet hoznak létre, amely elősegíti a proangiogén faktorok dominanciáját az antiangiogén faktorokkal szemben, így az érhálózat aberráns növekedését okozza a tumoros lézió irányába. Számos pro- és antiangiogén faktort azonosítottak, amelyeket endotélsejtek, tumorsejtek vagy a környező stróma választhat

ki. A miRNS-ek olyan géneket célozhatnak meg, amelyek részt vesznek az angiogenezisben, ugyanakkor expressziójukat a proangiogén vagy antiangiogén faktorok is módosíthatják (155). A miR-200a, miR-200b és a miR-429 mind gátló hatással vannak az angiogenezisre (151). A daganatos sejtek gyógyszerrezisztenciája potenciálisan jelentősen csökkentheti az onkológiai kezelésre adott választ és jelentősen ronthatja a betegek túlélését csökkentve a kemoterápiás szerek hatékonyságát. A terápiát túlélő, ellenálló daganatsejtek okozhatják a betegség recidiválását, amely gyakran rosszabbul reagál a kezelésre, és kedvezőtlenebb prognózissal jár. A kemorezisztencia különböző mechanizmusokon keresztül alakulhat ki, mint például génmutáció, DNS-metiláció vagy hisztonmódosulások (156). A miR-200 család tagjai az esetek többségében csökkentik a gyógyszerrezisztenciát. A miR-200b 7 ismert daganattípusban csökkenti a gyógyszerrezisztenciát (151). A tumorsejtek számos mechanizmus révén kerülnek ki az immunválaszt. A Programozott Sejthalál Protein 1 (PD-1) és ligandja, a PD-L1 kulcsfontosságú immunellenőrző molekulák, amelyek elnyomják a tumorelles immunválaszt (157). Több miRNS-t, köztük a miR-200-at is azonosítottak, amelyek szabályozzák a PD-1/PD-L1 tengelyt (158). A PD-L1 célzásával a miR-200 fokozza a CD8⁺ citotoxikus T-sejtek aktivitását a tumormikrokörnyezetben, és szabályozza a daganat metasztatikus potenciálját (158). Különböző miRNS-ek szabályozzák a DNS-károsodás javításában résztvevő fehérjék expresszióját, ami genom instabilitáshoz vezethet. A miR-200 család szerepe azonban még kevésbé ismert ezen folyamatok szabályozásában. Kimutatták, hogy a miR-200a szabályozza a DNS-javítást az öregedő keratinocitákban, a miR-200 család többi tagjának szerepe nem tisztázott (159). A miRNS-ek, köztük a miR-200 család is, részt vesznek a daganatsejtek metabolikus átprogramozásában. A miR-200b gátolja a laktát-dehidrogenáz A-t, amely gátolja a glikolízist, ezáltal akadályozva a gliomasejtek proliferációját és invázióját (160). A miR-200b/miR-200c ismert szerepe, hogy szabályozza az EMT differenciálódását és proliferációját a vastagbélráksejtek metabolikus tulajdonságainak módosításával (120). Fontos megjegyezni, hogy a miR-200 család a daganatsejtek osztódási képességét szabályozza. Kimutatták, hogy a miR-200 család elnyomása vagy elvesztése morfológiai változásokat, sejtciklus-leállást és az osztódásuk leállítását váltja ki a daganatsejteknek (161). Az utóbbi időben egyre több tanulmány számol be arról, hogy a mikrobiom soktényezős hatása a daganat szabályozására összefügg a miRNS-ekkel való

kölcsönhatásukkal és ezek interakciója apoptózist vagy proliferációt eredményezhet a tumorsejtekben (162). Egy példa erre a petefészekrák, ahol a szövet-specifikus baktériumok, mint a *L. lactis*, szabályozni látszanak a miR-200b és a TLR-4 expresszióját, amely összefügg a petefészekrák progressziójával (162).

Bár a miR-200b szerepe az M-PCN cisztás folyadékban nem ismert, vizsgálataink azt bizonyítják, hogy ez a miRNS nem specifikus a PDAC-ra és már jelen van a malignus potenciállal rendelkező hasnyálmirigy-cisztákban. Ezekkel az adatokkal összhangban korábban azt találtuk, hogy a PDAC-beteg eredetű EV-kre jellemző miRNS-ek már jelen lehetnek krónikus pancreatitisben is (121). Mindezen adatok arra utalnak, hogy a miR-200b megfelelő biomarker lehet a PCN-k lehetséges rosszindulatú potenciáljának előrejelzéséhez.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. A preoperatív szérum CA 19-9 szint és a PDAC sebészi reszekabilitásának összefüggésének vizsgálata eredményei alapján levont következtetések

Ez a tanulmány az első objektív bizonyítékot szolgáltatja arra, hogy a preoperatív szérum CA 19-9 szint önmagában nem képes megjósolni a PDAC sebészi reszekabilitását. Ez összhangban van a klinikai gyakorlattal, miszerint a preoperatív vizsgálatoknak nagyon alaposnak kell lenniük a PDAC betegeknél és a sebészeti irreszekabilitást nem szabad kizárólag a preoperatív szérum CA 19-9 szintek alapján eldönteni. Bár a CA 19-9 egyedül nem alkalmas a reszekabilitás meghatározására, de más paraméterekkel együtt használva értékes jelölt lehet pontozási rendszerek létrehozásához a PDAC preoperatív reszekabilitásának meghatározásához. A jövőbeli tanulmányok segítségével pontozási rendszereket lehetne kialakítani a hasnyálmirigy rák reszekabilitásának meghatározásához, amely magába foglalná a preoperatív szérum CA 19-9 szintet is. Ez hasznos lehet nehéz döntési helyzetekben is, például a borderline reszekábilis hasnyálmirigy rák esetén az elsődleges műtét és a neoadjuváns kemoterápia közötti választásban.

6.2. Az intraoperatív nyert pancreasnedvből és vérből izolált extracelluláris vezikula markerek vizsgálata során nyert eredmények alapján levont következtetések

Az pancreas rák továbbra is egy magas halálozási aránnyal rendelkező rosszindulatú betegség, és a keringő EV-k ígéretes potenciális markerei lehetnek akár a pancreas daganatoknak. Ebben a tanulmányban és munkacsoportunk korábbi publikációiban (2) először mutattuk ki, hogy az EV-k jelen vannak emberi hasnyálmirigynedv-mintákban. Ez a felfedezés lehetővé tette az EV-k közvetlen elemzését a betegek hasnyálmirigynedvéből. Az EV-k jelenléte a hasnyálmirigynedv enzimgazdag környezetében meglehetősen váratlan. Ezen tanulmány során számos bizonyítékot bemutatunk az EV-k jelenlétére a hasnyálmirigynedv mintákban. Ezek közé tartoznak az elektronmikroszkópos képek, a vizsgált részecskék detektálása a tipikus EV mérettartományban TRPS segítségével, fehérjék felszaporodása az EV izolátumban,

amelyek a "sejten kívüli exoszóma" GO kategóriába tartoznak, beleértve az EV-izolátumokban várható tipikus fehérjéket [35], a tipikus felszíni EV markereket (CD63, CD81 és LAMP-1) kimutatása a hasnyálmirigy-nedv EV-iben áramlási citometriával és CD63 pozitív EV-ek jelenlétének bemutatása az immunoaffinitásos módszerrel rögzített mágneses mikrogöngyökhöz.

6.3. Az endoscopos ultrahang vizsgálattal nyert cisztafolyadékából izolált EV tartalom elemzésének eredményei alapján levont következtetések

Összességében bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy a hasnyálmirigy-ciszta folyadék gazdag EV forrás és az M-PCN-ekből származó EV-kben magasabb a miR-200b szint, ami megkülönbözteti az M-PCN-ben szenvedő betegeket a többi hasnyálmirigy-cisztától. Érdekes módon a teljes cisztafolyadékban mért miR-200b hatékony ezek elkülönítésében, habár nem annyira, mint a cisztafolyadék EV eredetű miR-200b. Mivel az M-PCN-ek potenciálisan malignusak lehetnek, a ciszta folyadék eredetű EV miR-200b szintjének mérése jelentős lehet a klinikai gyakorlatban. Bár ezt a megközelítést tovább kellene optimalizálni egy nagyobb betegcsoporttal, eredményeink arra utalnak, hogy a miR-200b-re összpontosító miRNS profilalkotás hasznos lehet a hasnyálmirigy-cisztás betegek kategorizálásában.

7. ÖSSZEFOGLALÁS, SUMMARY

7.1 Összefoglalás

Ezen értekezés első állomását egy olyan prognosztikai metaanalízis képzi, ami arra kérdésre ad választ, alkalmas -e a preoperatív szérumban CA 19-9 szint pancreas ductalis adenocarcinoma sebészi reszekálhatóságának megállapítására. Az eredményeink alapján a preoperatív szérumban CA 19-9 szint egy elfogadható marker a PDAC reszekabilitásának megítélésére, az összesített AUC értéke 0,79 (CI: 0,69–0,89). Annak ellenére, hogy jelentős különbség van a reszekálható és nem reszekálható esetekben a preoperatív szérumban CA19-9 értékek között, csak egy „elfogadható” marker, használhatósága korlátozott, különösen a klinikai gyakorlatban, így a CA 19-9 önmagában nem alkalmazható a PDAC reszekabilitásának eldöntésére. A fentiek okán a továbbiakban a daganatok korai azonosításában használható biomarkereket kerestünk. Kutatásunk második állomásaként történt vizsgálatuk során bizonyítottuk EV-k jelenét emberi hasnyálmintákban. A hasnyálból izolált EV asszociált fehérjéket vizsgálva potenciális biomarkereket azonosítottunk, ezek a MUC1, MUC4, MUC5AC, MUC6 és MUC16, CFTR és MDR1 fehérjék voltak. Ezek az áramlási citometriával is kimutathatók voltak a hasnyálból izolált EV-kben és a hasnyálmirigyrákos sejtvonalak által kiválasztott EV-kből. Kutatásunk eredményei összességében azt mutatják, hogy az EV-k kimutatása és jellemzése közvetlenül a hasnyálból megvalósítható és a hasnyálmirigyrák potenciális biomarkereinek értékes forrásának bizonyulhat. Az értekezés harmadik állomásaként a potenciálisan malignizálódó pancreas cisztosus neopláziák tulajdonságait vizsgáltuk egy olyan biomarkert keresve, aminek segítségével lehet következtetni a malignizálódás kockázatára. Megmutattuk, hogy a krónikus pancreatitis és a PCN folyadékminták CD63+ EV-ket tartalmaznak, de CD81+ EV-ket nem. Érdekes módon nem találtunk összefüggést az EV-k koncentrációja és a klinikai diagnózis között egyetlen vizsgált paraméterben sem, mint amilyen betegkategóriában (PC, PCN, M-PCN vagy non-M-PCN betegek). Bebizonyítottuk, hogy az M-PCN-eredetű EV-k tartalmában vannak közös miRNS-ek. Az M-PCN-t S-PCN-nel és pseudociszta eredetű EV-kel (non-M) összehasonlítva azt találtuk, hogy a miR-200b specifikus az M-PCN-eredetű EV-kre. Az EV eredetű miRNS mind a szenzitivitás, mind a specificitás, mind a pozitív és negatív prediktív érték tekintetében jobban teljesít, mint néhány más klasszikus diagnosztikai módszer, mint például a cisztafolyadék CEA, vagy a képalkotó vizsgálatok.

7.2 Summary

The first stage of the thesis is a prognostic meta-analysis that answers the question of whether the preoperative serum CA 19-9 level is suitable for determining the surgical resectability of pancreatic ductal adenocarcinoma. Based on our results, the preoperative serum CA 19-9 level is an acceptable marker for assessing the resectability of PDAC, the overall AUC value is 0.79 (CI: 0.69–0.89). Despite the fact that there is a significant difference between preoperative serum CA19-9 values in resectable and non-resectable cases, it is only an "acceptable" marker, its utility is limited, especially in clinical practice, so CA 19-9 alone cannot be used to decide the resectability of PDAC. We continued and further searched for biomarkers that can be used in the early identification of pancreatic tumors. During the second stage of our research, we proved the presence of EVs in human pancreatic juice samples. Examining EV-associated proteins isolated from pancreatic juice, we identified potential biomarkers, these were MUC1, MUC4, MUC5AC, MUC6 and MUC16, CFTR and MDR1 proteins. They were also detected by flow cytometry in EVs isolated from pancreatic juice in EVs secreted by pancreatic cancer cell lines. Overall, the results of our research show that the detection and characterization of EVs can be performed directly from the pancreatic juice samples and can prove to be a valuable source of potential biomarkers for pancreatic cancer. As the third stage of the thesis, we examined the properties of potentially malignant pancreatic cystic neoplasias in search of a biomarker that can be used as a predictor of the risk of malignancy. We show that chronic pancreatitis derived and PCN fluid samples contain CD63+ EVs but not CD81+ EVs. Interestingly, we did not find a correlation between the concentration of EVs and the clinical diagnosis in any of the investigated parameters, such as the patient category (PC, PCN, M-PCN or non-M-PCN patients). We demonstrated that there are common miRNAs in the content of M-PCN-derived EVs. Comparing M-PCN with S-PCN and pseudocyst-derived EVs (non-M), we found that miR-200b is specific for M-PCN-derived EVs. EV-derived miRNA outperforms some other classical diagnostic methods, such as pancreatic cyst fluid CEA, or imaging studies, in terms of both sensitivity and specificity, as well as positive and negative predictive values.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Benke M, Farkas N, Hegyi P, Tinusz B, Sarlós P, Erőss B, et al. Preoperative Serum Carbohydrate Antigen 19-9 Levels Cannot Predict the Surgical Resectability of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Pathol Oncol Res.* 2022;28:1610266.
2. Osteikoetxea X, Benke M, Rodriguez M, Pálóczi K, Sódar BW, Szvicsek Z, et al. Detection and proteomic characterization of extracellular vesicles in human pancreatic juice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;499(1):37-43.
3. Benke M, Zeöld A, Kittel Á, Khamari D, Hritz I, Horváth M, et al. MiR-200b categorizes patients into pancreas cystic lesion subgroups with different malignant potential. *Sci Rep.* 2023;13(1):19820.
4. Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
5. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2020;395(10242):2008-20.
6. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16022.
7. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(1):11-30.
8. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *Jama.* 2021;326(9):851-62.
9. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2004;363(9414):1049-57.
10. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008;321(5897):1801-6.
11. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology.* 2012;142(4):730-3.e9.

12. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015;518(7540):495-501.
13. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016;531(7592):47-52.
14. Hayashi A, Fan J, Chen R, Ho YJ, Makohon-Moore AP, Lecomte N, et al. A unifying paradigm for transcriptional heterogeneity and squamous features in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cancer*. 2020;1(1):59-74.
15. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1114-7.
16. Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. Pancreatic adenocarcinoma. *Bmj*. 2012;344:e2476.
17. Hirata Y, Kobayashi T, Nishiumi S, Yamanaka K, Nakagawa T, Fujigaki S, et al. Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics. *Clin Chim Acta*. 2017;468:98-104.
18. Donahue TR, Reber HA. Surgical management of pancreatic cancer--pancreaticoduodenectomy. *Semin Oncol*. 2015;42(1):98-109.
19. Diener MK, Knaebel HP, Heukaufer C, Antes G, Büchler MW, Seiler CM. A systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus classical pancreaticoduodenectomy for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *Ann Surg*. 2007;245(2):187-200.
20. Parikh PY, Lillemoe KD. Surgical management of pancreatic cancer--distal pancreatectomy. *Semin Oncol*. 2015;42(1):110-22.
21. Riediger H, Makowiec F, Fischer E, Adam U, Hopt UT. Postoperative morbidity and long-term survival after pancreaticoduodenectomy with superior mesenterico-portal vein resection. *J Gastrointest Surg*. 2006;10(8):1106-15.
22. Kanda M, Fujii T, Suenaga M, Takami H, Inokawa Y, Yamada S, et al. Pancreatoduodenectomy With Portal Vein Resection Is Feasible and Potentially Beneficial for Elderly Patients With Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2014;43(6).

23. Jabłońska B, Król R, Mrowiec S. Vascular Resection in Pancreatectomy-Is It Safe and Useful for Patients with Advanced Pancreatic Cancer? *Cancers (Basel)*. 2022;14(5).
24. Schmidt CM, Turrini O, Parikh P, House MG, Zyromski NJ, Nakeeb A, et al. Effect of hospital volume, surgeon experience, and surgeon volume on patient outcomes after pancreaticoduodenectomy: a single-institution experience. *Arch Surg*. 2010;145(7):634-40.
25. Cannas S, Casciani F, Vollmer CM, on behalf of the Pancreas Fistula Study G. Extending Quality Improvement for Pancreatoduodenectomy Within the High-Volume Setting: The Experience Factor. *Annals of Surgery*. 9900.
26. Ramacciato G, Nigri G, Petrucciani N, Pinna AD, Ravaioli M, Jovine E, et al. Pancreatectomy with Mesenteric and Portal Vein Resection for Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Multicenter Study of 406 Patients. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(6):2028-37.
27. Moffat GT, Epstein AS, O'Reilly EM. Pancreatic cancer-A disease in need: Optimizing and integrating supportive care. *Cancer*. 2019;125(22):3927-35.
28. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(1):7-33.
29. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014;74(11):2913-21.
30. Aslanian HR, Lee JH, Canto MI. AGA Clinical Practice Update on Pancreas Cancer Screening in High-Risk Individuals: Expert Review. *Gastroenterology*. 2020;159(1):358-62.
31. Tanaka M, Fernández-Del Castillo C, Kamisawa T, Jang JY, Levy P, Ohtsuka T, et al. Revisions of international consensus Fukuoka guidelines for the management of IPMN of the pancreas. *Pancreatology*. 2017;17(5):738-53.
32. European evidence-based guidelines on pancreatic cystic neoplasms. *Gut*. 2018;67(5):789-804.
33. Laffan TA, Horton KM, Klein AP, Berlanstein B, Siegelman SS, Kawamoto S, et al. Prevalence of unsuspected pancreatic cysts on MDCT. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;191(3):802-7.

34. Lee KS, Sekhar A, Rofsky NM, Pedrosa I. Prevalence of incidental pancreatic cysts in the adult population on MR imaging. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(9):2079-84.
35. Zaheer A, Pokharel SS, Wolfgang C, Fishman EK, Horton KM. Incidentally detected cystic lesions of the pancreas on CT: review of literature and management suggestions. *Abdom Imaging*. 2013;38(2):331-41.
36. Kromrey ML, Bülow R, Hübner J, Paperlein C, Lerch MM, Ittermann T, et al. Prospective study on the incidence, prevalence and 5-year pancreatic-related mortality of pancreatic cysts in a population-based study. *Gut*. 2018;67(1):138-45.
37. Moris M, Raimondo M, Woodward TA, Skinner V, Arcidiacono PG, Petrone MC, et al. Diagnostic Accuracy of Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Cytology, Carcinoembryonic Antigen, and Amylase in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm. *Pancreas*. 2016;45(6):870-5.
38. Capurso G, Boccia S, Salvia R, Del Chiaro M, Frulloni L, Arcidiacono PG, et al. Risk factors for intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas: a multicentre case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(6):1003-9.
39. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-8.
40. Crippa S, Fernández-Del Castillo C, Salvia R, Finkelstein D, Bassi C, Domínguez I, et al. Mucin-producing neoplasms of the pancreas: an analysis of distinguishing clinical and epidemiologic characteristics. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(2):213-9.
41. Marchegiani G, Mino-Kenudson M, Sahora K, Morales-Oyarvide V, Thayer S, Ferrone C, et al. IPMN involving the main pancreatic duct: biology, epidemiology, and long-term outcomes following resection. *Ann Surg*. 2015;261(5):976-83.
42. Felsenstein M, Noë M, Masica DL, Hosoda W, Chianchiano P, Fischer CG, et al. IPMNs with co-occurring invasive cancers: neighbours but not always relatives. *Gut*. 2018;67(9):1652-62.
43. Jang KT, Park SM, Basturk O, Bagci P, Bandyopadhyay S, Stelow EB, et al. Clinicopathologic characteristics of 29 invasive carcinomas arising in 178 pancreatic

mucinous cystic neoplasms with ovarian-type stroma: implications for management and prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(2):179-87.

44. Adsay V, Mino-Kenudson M, Furukawa T, Basturk O, Zamboni G, Marchegiani G, et al. Pathologic Evaluation and Reporting of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas and Other Tumoral Intraepithelial Neoplasms of Pancreatobiliary Tract: Recommendations of Verona Consensus Meeting. *Ann Surg*. 2016;263(1):162-77.

45. Canto MI, Hruban RH. Managing pancreatic cysts: less is more? *Gastroenterology*. 2015;148(4):688-91.

46. Fernández-Del Castillo C, Tanaka M. Management of pancreatic cysts: the evidence is not here yet. *Gastroenterology*. 2015;148(4):685-7.

47. Vege SS, Ziring B, Jain R, Moayyedi P. American gastroenterological association institute guideline on the diagnosis and management of asymptomatic neoplastic pancreatic cysts. *Gastroenterology*. 2015;148(4):819-22; quiz 822-3.

48. Palanivelu C, Senthilnathan P, Sabnis SC, Babu NS, Srivatsan Gurumurthy S, Anand Vijai N, et al. Randomized clinical trial of laparoscopic versus open pancreatoduodenectomy for periampullary tumours. *Br J Surg*. 2017;104(11):1443-50.

49. van Hilst J, de Rooij T, Bosscha K, Brinkman DJ, van Dieren S, Dijkgraaf MG, et al. Laparoscopic versus open pancreatoduodenectomy for pancreatic or periampullary tumours (LEOPARD-2): a multicentre, patient-blinded, randomised controlled phase 2/3 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(3):199-207.

50. de Rooij T, van Hilst J, van Santvoort H, Boerma D, van den Boezem P, Daams F, et al. Minimally Invasive Versus Open Distal Pancreatectomy (LEOPARD): A Multicenter Patient-blinded Randomized Controlled Trial. *Ann Surg*. 2019;269(1):2-9.

51. Clancy TE. Surgery for Pancreatic Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015;29(4):701-16.

52. Nilsson LN, Keane MG, Shamali A, Millastre Bocos J, Marijinissen van Zanten M, Antila A, et al. Nature and management of pancreatic mucinous cystic neoplasm (MCN): A systematic review of the literature. *Pancreatology*. 2016;16(6):1028-36.

53. Keane MG, Shamali A, Nilsson LN, Antila A, Millastre Bocos J, Marijinissen Van Zanten M, et al. Risk of malignancy in resected pancreatic mucinous cystic neoplasms. *Br J Surg*. 2018;105(4):439-46.

54. Kimura W, Moriya T, Hirai I, Hanada K, Abe H, Yanagisawa A, et al. Multicenter study of serous cystic neoplasm of the Japan pancreas society. *Pancreas*. 2012;41(3):380-7.
55. Allen PJ, Kuk D, Castillo CF, Basturk O, Wolfgang CL, Cameron JL, et al. Multi-institutional Validation Study of the American Joint Commission on Cancer (8th Edition) Changes for T and N Staging in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2017;265(1):185-91.
56. Gilbert JW, Wolpin B, Clancy T, Wang J, Mamon H, Shinagare AB, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: conceptual evolution and current approach to image-based classification. *Ann Oncol*. 2017;28(9):2067-76.
57. Versteijne E, van Dam JL, Suker M, Janssen QP, Groothuis K, Akkermans-Vogelaar JM, et al. Neoadjuvant Chemoradiotherapy Versus Upfront Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Long-Term Results of the Dutch Randomized PREOPANC Trial. *J Clin Oncol*. 2022;40(11):1220-30.
58. Isaji S, Mizuno S, Windsor JA, Bassi C, Fernández-Del Castillo C, Hackert T, et al. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology*. 2018;18(1):2-11.
59. Tempero MA, Malafa MP, Al-Hawary M, Asbun H, Bain A, Behrman SW, et al. Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(8):1028-61.
60. Jang JY, Park T, Lee S, Kim Y, Lee SY, Kim SW, et al. Proposed Nomogram Predicting the Individual Risk of Malignancy in the Patients With Branch Duct Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Ann Surg*. 2017;266(6):1062-8.
61. Scheiman JM, Hwang JH, Moayyedi P. American gastroenterological association technical review on the diagnosis and management of asymptomatic neoplastic pancreatic cysts. *Gastroenterology*. 2015;148(4):824-48.e22.
62. Lévy P, Rebours V. The Role of Endoscopic Ultrasound in the Diagnosis of Cystic Lesions of the Pancreas. *Visc Med*. 2018;34(3):192-6.
63. Mishra A, Hunold TM, Peddu DK, Philips GM, Wamsteker EJ, Kwon RS, et al. Histologic Diagnosis of Pancreatic Cystic Lesions with Endoscopic Ultrasound Fine Needle Biopsy and Impact on Management Decisions. *Dig Dis Sci*. 2025.

64. Khalid A, Zahid M, Finkelstein SD, LeBlanc JK, Kaushik N, Ahmad N, et al. Pancreatic cyst fluid DNA analysis in evaluating pancreatic cysts: a report of the PANDA study. *Gastrointest Endosc.* 2009;69(6):1095-102.
65. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5423-34.
66. Ghallab M, Abosheaishaa H, Gupta I, Abdelmoteleb S, Stern R. A Case of Choledocholithiasis and Obstructive Jaundice With a Very High Serum Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9) Level: A Case Report and Review of Literature. *Cureus.* 2022;14(12):e32447.
67. Kannagi R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J.* 2007;30(3):189-209.
68. O'Neill RS, Stoita A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? *World J Gastroenterol.* 2021;27(26):4045-87.
69. Ragupathi G, Damani P, Srivastava G, Srivastava O, Suchek SJ, Ichikawa Y, et al. Synthesis of sialyl Lewis(a) (sLe (a), CA19-9) and construction of an immunogenic sLe(a) vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(9):1397-405.
70. Balmaña M, Sarrats A, Llop E, Barrabés S, Saldova R, Ferri MJ, et al. Identification of potential pancreatic cancer serum markers: Increased sialyl-Lewis X on ceruloplasmin. *Clin Chim Acta.* 2015;442:56-62.
71. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* 2004;95(5):377-84.
72. Dall'Olio F, Pucci M, Malagolini N. The Cancer-Associated Antigens Sialyl Lewis(a/x) and Sd(a): Two Opposite Faces of Terminal Glycosylation. *Cancers (Basel).* 2021;13(21).
73. Steinberg WM, Gelfand R, Anderson KK, Glenn J, Kurtzman SH, Sindelar WF, et al. Comparison of the sensitivity and specificity of the CA19-9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology.* 1986;90(2):343-9.
74. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1039-49.

75. Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep.* 2011;3:15.
76. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(8):E968-77.
77. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20121-7.
78. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):619-24.
79. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles.* 2013;2.
80. Lázaro-Ibáñez E, Sanz-Garcia A, Visakorpi T, Escobedo-Lucea C, Siljander P, Ayuso-Sacido A, et al. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *Prostate.* 2014;74(14):1379-90.
81. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(7):1302-9.
82. Szabó-Taylor K, Ryan B, Osteikoetxea X, Szabó TG, Sódar B, Holub M, et al. Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;40:8-16.
83. Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(6):356-64.
84. Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, Kamermans A, Schäfer R, Beerling E, et al. In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell.* 2015;161(5):1046-57.

85. Osteikoetxea X, Németh A, Sódar BW, Vukman KV, Buzás EI. Extracellular vesicles in cardiovascular disease: are they Jedi or Sith? *J Physiol.* 2016;594(11):2881-94.
86. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470-6.
87. Théry C. Cancer: Diagnosis by extracellular vesicles. *Nature.* 2015;523(7559):161-2.
88. Lai X, Wang M, McElyea SD, Sherman S, House M, Korc M. A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2017;393:86-93.
89. Park JW, Jang JY, Kang MJ, Kwon W, Chang YR, Kim SW. Mucinous cystic neoplasm of the pancreas: is surgical resection recommended for all surgically fit patients? *Pancreatology.* 2014;14(2):131-6.
90. Li C, Zhou T, Chen J, Li R, Chen H, Luo S, et al. The role of Exosomal miRNAs in cancer. *J Transl Med.* 2022;20(1):6.
91. Iwasaki H, Shimura T, Yamada T, Okuda Y, Natsume M, Kitagawa M, et al. A novel urinary microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer. *J Gastroenterol.* 2019;54(12):1061-9.
92. Shi Y, Du L, Lv D, Li Y, Zhang Z, Huang X, et al. Emerging role and therapeutic application of exosome in hepatitis virus infection and associated diseases. *J Gastroenterol.* 2021;56(4):336-49.
93. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. 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. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
94. Guo S, Qin H, Liu K, Wang H, Bai S, Liu S, et al. Blood small extracellular vesicles derived miRNAs to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Clin Transl Med.* 2021;11(9):e520.
95. Zeöld A, Sándor GO, Kiss A, Soós A, Tölgyes T, Bursics A, et al. Shared extracellular vesicle miRNA profiles of matched ductal pancreatic adenocarcinoma

organoids and blood plasma samples show the power of organoid technology. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(6):3005-20.

96. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Int J Surg.* 2010;8(5):336-41.

97. Kamarudin AN, Cox T, Kolamunnage-Dona R. Time-dependent ROC curve analysis in medical research: current methods and applications. *BMC Med Res Methodol.* 2017;17(1):53.

98. Jones CM, Athanasiou T. Summary receiver operating characteristic curve analysis techniques in the evaluation of diagnostic tests. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(1):16-20.

99. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-4.

100. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Ritchey J, Stewart AK, Winchester DP, et al. Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer.* 2007;110(4):738-44.

101. Osteikoetxea X, Balogh A, Szabó-Taylor K, Németh A, Szabó TG, Pálóczi K, et al. Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121184.

102. Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, Szabó-Taylor K, Pálóczi K, Vukman KV, et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem.* 2015;13(38):9775-82.

103. Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep.* 2016;6:24316.

104. Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, et al. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics.* 2011;74(10):2025-33.

105. Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CY, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics.* 2015;15(15):2597-601.

106. Szvicsek Z, Oszvald Á, Szabó L, Sándor GO, Kelemen A, Soós A, et al. Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(12):2463-76.
107. Albatanony AA, Alseesi AA. The value of serum carbohydrate antigen 19-9 as a predictor of resectability in pancreatic adenocarcinoma. *The Egyptian Journal of Surgery.* 2015;34(4).
108. Almadi MA, Alharbi O, Azzam N, Altayeb M, Javed M, Alsaif F, et al. Clinical predictors of resectability of pancreatic adenocarcinoma. *Saudi J Gastroenterol.* 2013;19(6):278-85.
109. Kiliç M, Göçmen E, Tez M, Ertan T, Keskek M, Koç M. Value of preoperative serum CA 19-9 levels in predicting resectability for pancreatic cancer. *Can J Surg.* 2006;49(4):241-4.
110. Kim YC, Kim HJ, Park JH, Park DI, Cho YK, Sohn CI, et al. Can preoperative CA19-9 and CEA levels predict the resectability of patients with pancreatic adenocarcinoma? *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(12):1869-75.
111. Luo G, Xiao Z, Long J, Liu Z, Liu L, Liu C, et al. CA125 is superior to CA19-9 in predicting the resectability of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(12):2092-8.
112. Ong SL, Garcea G, Thomasset SC, Mann CD, Neal CP, Abu Amara M, et al. Surrogate markers of resectability in patients undergoing exploration of potentially resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2008;12(6):1068-73.
113. Santucci N, Facy O, Ortega-Deballon P, Lequeu JB, Rat P, Rat P. CA 19-9 predicts resectability of pancreatic cancer even in jaundiced patients. *Pancreatology.* 2018;18(6):666-70.
114. Zhang S, Wang YM, Sun CD, Lu Y, Wu LQ. Clinical value of serum CA19-9 levels in evaluating resectability of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14(23):3750-3.
115. Poruk KE, Firpo MA, Adler DG, Mulvihill SJ. Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? *Ann Surg.* 2013;257(1):17-26.

116. Bossuyt PM, Deeks JJ, Leeftang MM, Takwoingi Y, Flemyng E. Evaluating medical tests: introducing the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2023;7(7):Ed000163.
117. Lötval J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913.
118. Karimi N, Dalirfardouei R, Dias T, Lötval J, Lässer C. Tetraspanins distinguish separate extracellular vesicle subpopulations in human serum and plasma - Contributions of platelet extracellular vesicles in plasma samples. *J Extracell Vesicles*. 2022;11(5):e12213.
119. Fan Y, Pionneau C, Cocozza F, Boëlle PY, Chardonnet S, Charrin S, et al. Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2023;12(8):e12352.
120. Gollavilli PN, Parma B, Siddiqui A, Yang H, Ramesh V, Napoli F, et al. The role of miR-200b/c in balancing EMT and proliferation revealed by an activity reporter. *Oncogene*. 2021;40(12):2309-22.
121. Beit-Yannai E, Tabak S, Stamer WD. Physical exosome:exosome interactions. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):2001-6.
122. Brugge WR, Lewandrowski K, Lee-Lewandrowski E, Centeno BA, Szydlowski T, Regan S, et al. Diagnosis of pancreatic cystic neoplasms: a report of the cooperative pancreatic cyst study. *Gastroenterology*. 2004;126(5):1330-6.
123. Daamen LA, Groot VP, Goense L, Wessels FJ, Borel Rinkes IH, Intven MPW, et al. The diagnostic performance of CT versus FDG PET-CT for the detection of recurrent pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol*. 2018;106:128-36.
124. Conroy T, Pfeiffer P, Vilgrain V, Lamarca A, Seufferlein T, O'Reilly EM, et al. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023;34(11):987-1002.
125. Neuzillet C, Gaujoux S, Williet N, Bachet J-B, Bauguion L, Colson Durand L, et al. Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and

follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Digestive and Liver Disease*. 2018;50(12):1257-71.

126. Raza SS, Khan H, Hajibandeh S, Hajibandeh S, Bartlett D, Chatzizacharias N, et al. Can preoperative Carbohydrate Antigen 19-9 predict metastatic pancreatic cancer? Results of a systematic review and meta-analysis. *HPB*. 2024.

127. Deeks JJ BP, Leeflang MM, Takwoingi Y (editors). . *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy* updated July 2023.

128. Zhao Y, Tang J, Jiang K, Liu SY, Aicher A, Heeschen C. Liquid biopsy in pancreatic cancer - Current perspective and future outlook. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2023;1878(3):188868.

129. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523(7559):177-82.

130. Wang S, Qiu Y, Bai B. The Expression, Regulation, and Biomarker Potential of Glypican-1 in Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:614.

131. Buenafe AC, Dorrell C, Reddy AP, Klimek J, Marks DL. Proteomic analysis distinguishes extracellular vesicles produced by cancerous versus healthy pancreatic organoids. *Sci Rep*. 2022;12(1):3556.

132. Liang K, Liu F, Fan J, Sun D, Liu C, Lyon CJ, et al. Nanoplasmonic Quantification of Tumor-derived Extracellular Vesicles in Plasma Microsamples for Diagnosis and Treatment Monitoring. *Nat Biomed Eng*. 2017;1.

133. Moschovis D, Bamias G, Delladetsima I. Mucins in neoplasms of pancreas, ampulla of Vater and biliary system. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(10):725-34.

134. Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One*. 2012;7(12):e50999.

135. Vitoret C, Gally K, Confort MP, Ftaich N, Matei CI, Archer F, et al. Transfer of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Human Cystic Fibrosis Cells Mediated by Extracellular Vesicles. *Hum Gene Ther*. 2016;27(2):166-83.

136. McWilliams RR, Petersen GM, Rabe KG, Holtegaard LM, Lynch PJ, Bishop MD, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations and risk for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 2010;116(1):203-9.

137. Zheng J, Hernandez JM, Doussot A, Bojmar L, Zambirinis CP, Costa-Silva B, et al. Extracellular matrix proteins and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules characterize pancreatic duct fluid exosomes in patients with pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2018;20(7):597-604.
138. Heiler S, Wang Z, Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push. *World J Gastroenterol*. 2016;22(26):5971-6007.
139. Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G, et al. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(4):340-6.
140. Caponi S, Funel N, Frampton AE, Mosca F, Santarpia L, Van der Velde AG, et al. The good, the bad and the ugly: a tale of miR-101, miR-21 and miR-155 in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. *Ann Oncol*. 2013;24(3):734-41.
141. Kuratomi N, Takano S, Fukasawa M, Maekawa S, Kadokura M, Shindo H, et al. MiR-10a in Pancreatic Juice as a Biomarker for Invasive Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm by miRNA Sequencing. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6).
142. Mukewar S, de Pretis N, Aryal-Khanal A, Ahmed N, Sah R, Enders F, et al. Fukuoka criteria accurately predict risk for adverse outcomes during follow-up of pancreatic cysts presumed to be intraductal papillary mucinous neoplasms. *Gut*. 2017;66(10):1811-7.
143. Jang DK, Song BJ, Ryu JK, Chung KH, Lee BS, Park JK, et al. Preoperative Diagnosis of Pancreatic Cystic Lesions: The Accuracy of Endoscopic Ultrasound and Cross-Sectional Imaging. *Pancreas*. 2015;44(8):1329-33.
144. Lee HJ, Kim MJ, Choi JY, Hong HS, Kim KA. Relative accuracy of CT and MRI in the differentiation of benign from malignant pancreatic cystic lesions. *Clin Radiol*. 2011;66(4):315-21.
145. Perri G, Marchegiani G, Frigerio I, Dervenis CG, Conlon KC, Bassi C, et al. Management of Pancreatic Cystic Lesions. *Dig Surg*. 2020;37(1):1-9.
146. Satoh K, Hamada S, Shimosegawa T. Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol*. 2015;50(2):140-6.
147. Ceppi P, Peter ME. MicroRNAs regulate both epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Oncogene*. 2014;33(3):269-78.

148. Yang KS, Ciprani D, O'Shea A, Liss AS, Yang R, Fletcher-Mercaldo S, et al. Extracellular Vesicle Analysis Allows for Identification of Invasive IPMN. *Gastroenterology*. 2021;160(4):1345-58.e11.
149. Gelibter S, Marostica G, Mandelli A, Siciliani S, Podini P, Finardi A, et al. The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic study. *J Extracell Vesicles*. 2022;11(2):e12162.
150. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
151. Klicka K, Grzywa TM, Mielniczuk A, Klinke A, Włodarski PK. The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer. *Front Oncol*. 2022;12:965231.
152. Grzywa TM, Klicka K, Włodarski PK. Regulators at Every Step-How microRNAs Drive Tumor Cell Invasiveness and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12).
153. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):87.
154. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2009;84(1):55-71.
155. Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2011;55(4):79-86.
156. Ma J, Dong C, Ji C. MicroRNA and drug resistance. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(8):523-31.
157. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-42.
158. Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn YH, Byers LA, et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun*. 2014;5:5241.
159. Tinaburri L, D'Errico M, Sileno S, Maurelli R, Degan P, Magenta A, et al. miR-200a Modulates the Expression of the DNA Repair Protein OGG1 Playing a Role in Aging of Primary Human Keratinocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9147326.
160. Hu S, Jiang Q, Luo D, Zhao L, Fu X, Chen Y, et al. miR-200b is a key regulator of tumor progression and metabolism targeting lactate dehydrogenase A in human malignant glioma. *Oncotarget*. 2016;7(30):48423-31.

161. Yu L, Cao C, Li X, Zhang M, Gu Q, Gao H, et al. Complete loss of miR-200 family induces EMT associated cellular senescence in gastric cancer. *Oncogene*. 2022;41(1):26-36.
162. Allegra A, Musolino C, Tonacci A, Pioggia G, Gangemi S. Interactions between the MicroRNAs and Microbiota in Cancer Development: Roles and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4).

9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

9.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Benke Márton¹, Zeöld Anikó, Kittel Ágnes, Khamari Delaram, Hritz István, Horváth

Miklós, Keczer Bánk, Borka Katalin, Szücs Ákos, Wiener Zoltán

MiR-200b categorizes patients into pancreas cystic lesion subgroups with different malignant potential

SCIENTIFIC REPORTS 13: 1 Paper: 19820, 12 p. (2023)

Közlemény: 34371433 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Multidisciplinary SJR indikátor: D1

Megosztott első szerzők

IF: 3,8

Benke Márton, Farkas Nelli, Hegyi Péter, Tinusz Benedek, Sarlós Patrícia, Eröss

Bálint, Szemes Kata, Vörhendi Nóra, Szakács Zsolt, Szücs Ákos

Preoperative Serum Carbohydrate Antigen 19-9 Levels Cannot Predict the Surgical

Resectability of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 28 Paper: 1610266, 9 p. (2022)

Közlemény: 32862713 | Összefoglaló cikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: Q2

Scopus - Pathology and Forensic Medicine SJR indikátor: Q2

Scopus - Cancer Research SJR indikátor: Q3

Scopus - Oncology SJR indikátor: Q3

IF: 2,82

Osteikoetxea X, Benke M, Rodriguez M, Pálóczi K, Sódar BW, Szvicsek Z, Szabó-Taylor K, Vukman KV, Kittel A, Wiener Z, Vékey K, Harsányi L, Szücs Á, Turiák L, Buzás E
Detection and proteomic characterization of extracellular vesicles in human pancreatic juice

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 499: 1 pp.
37-43. (2018)

Közlemény: 3353499 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Biochemistry SJR indikátor: Q2

Scopus - Biophysics SJR indikátor: Q2

Scopus - Cell Biology SJR indikátor: Q3

Scopus - Molecular Biology SJR indikátor: Q3

IF: 2,705

9.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

Dudás Ibolyka, Schultz Leona, Benke Márton, Szücs Ákos, Kaposi Pál Novák, Szijártó Attila, Maurovich-Horvat Pál, Budai Bettina Katalin

The reliability of virtual non-contrast reconstructions of photon-counting detector CT scans in assessing abdominal organs

BMC MEDICAL IMAGING 24: 1 Paper: 237, 18 p. (2024)

Közlemény: 35243084 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Radiology, Nuclear Medicine and Imaging SJR indikátor: Q2

IF: 2,9

Lovász Borbála, Budai Bettina Katalin, Benke Márton, Szücs Ákos, Kaposi Novák Pál, Szijártó Attila, Maurovich-Horvat Pál, Dudás Ibolyka

A fotonszámláló detektor CT szerepe a pancreas képalkotásában – Az első klinikai tapasztalatok Magyarországon: Metodikai közlemény

MAGYAR RADIOLÓGIA ONLINE 15: 2 pp. 1-16. (2024)

Közlemény: 35086582 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Keczer Bánk, Benke Márton, Marjai Tamás, Horváth Miklós, Miheller Pál, Szücs Ákos, Harsányi László, Szijártó Attila, Hritz István

Quantitative Software Analysis of Endoscopic Ultrasound Images of Pancreatic Cystic Lesions

DIAGNOSTICS 12: 9 Paper: 2105, 11 p. (2022)

Közlemény: 33108464 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Clinical Biochemistry SJR indikátor: Q2

IF: 3,6

GlobalSurg Collaborative and National Institute for Health Research Global Health Research

Unit on Global Surgery (Kollaborációs szervezet), Knight Stephen R, Shaw Catherine A, Pius Riinu, Drake Thomas M, Norman Lisa, Ademuyiwa Adesoji O, Adisa Adewale O, Aguilera Maria Lorena, Al-Saqqá Sara W, et al (+49), Kollaborációs közreműködő: Benke Márton

Global variation in postoperative mortality and complications after cancer surgery: a multicentre, prospective cohort study in 82 countries

LANCET 397: 10272 pp. 387-397. (2021)

Közlemény: 32101229 | Sokszerzős vagy csoportos szerzőségű szakcikk (Folyóiratcikk)

Harsányi László, Tihanyi Tibor, Marjai Tamás, Benke Márton, Szűcs Ákos, Szijártó Attila

Hasnyálmirigy-sebészet a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján

MAGYAR SEBÉSZET 73: 3 pp. 100-103. (2020)

Közlemény: 32595666 | Összefoglaló cikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Erős Adrienn, Soós Alexandra, Hegyi Péter, Szakács Zsolt, Benke Márton, Szűcs

Ákos, Hartmann Petra, Erőss Bálint, Sarlós Patricia

Sarcopenia as an independent predictor of the surgical outcomes of patients with
inflammatory bowel disease: a meta-analysis

SURGERY TODAY 50: 10 pp. 1138-1150. (2020)

Közlemény: 30850194 | Összefoglaló cikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: Q2

Scopus - Surgery SJR indikátor: Q2

IF: 2,549

A Központi Könyvtár igazolása:

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények összesített impaktfaktor

értéke: 9,305

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények összesített

impaktfaktor értéke: 9,049

I.+II. A könyvtári adatlapon feltüntetett közlemények összesített impaktfaktor értéke:

18,354

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Szücs Ákosnak, hogy 12 éve TDK hallgatóként, majd később doktoranduszként témavezetőm volt, hogy a pancreas sebészettel kapcsolatos lelkesedését átadta nekem és motivált arra, hogy elinduljak a sebészi pályán. Hálás vagyok, hogy mindig segített tanácsaival tudományos, majd később klinikai pályafutásom során és lelkesített példamutatásával.

Köszönöm dr. Harsányi László Professzor Úrnak és dr. Szijártó Attila Professzor Úrnak doktoranduszi és párhuzamosan szakorvosjelölti éveim során tanúsított támogatását, tanácsait és a lehetőséget, hogy klinikai feladataim mellett folytathassam a kutatómunkát.

Köszönöm Buzás Edit Professzorasszonynak, Xabier Osteiketxeának és Pálóczi Krisztinának a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetéből- a pancreas nedvből izolált mikrovezikulákkal kapcsolatos kutatás során végzett sikeres közös munkát és az ennek során szerzett rengeteg tapasztalatot.

Köszönet illeti dr. Wiener Zoltán Docens Urat és dr. Zeöld Anikó Adjunktus Asszonyt szintén a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetéből, a pancreas cystosus neopláziákkal kapcsolatos közös kutatásunkért, ami az ő elképesztő szakmai tudásuk nélkül nem lehetett volna ilyen eredményes.

Köszönettel tartozom gasztroenterológus kollégáimnak, dr. Hritz István Docens Úrnak és dr. Horváth Miklós Mestertanárnak a pancreas cisztafolyadékából endoscopos ultrahang vezérelt punctioval történő mintagyűjtésért, valamint a hasznos tanácsaikért.

Köszönöm dr. Kittel Ágnes Tanárnőnek a kutatásaim során nyújtott segítségét az elektronmikroszkópos képek elkészítésében.

Köszönet az azóta jelentősen átalakult Transzlációs Medicina Központ munkatársainak a metaanalízis meetingek során tanultakért, a segítségükért és tanácsaikért: dr. Hegyi Péter Professzor Úrnak, dr. Erőss Bálintnak, dr. Farkas Nellinek, dr. Szakács Zsoltnak, valamint mindenki másnak, akik a rendszeres meetingek során hasznos tanácsokkal segítették kutatásaimat.

Köszönöm dr. Marjai Tamásnak, hogy doktoranduszi és rezidensi pályám kezdetén tanácsokkal segítette pályámat kollégaként, majd később barátként. Köszönöm dr. Tél Bálintnak, dr. Daher Hichamnak és Sörös Álmos barátaimnak, hogy a kutatásaim mellett folytatott klinikai munkám során mind a legderűsebb, mind a legnehezebb időszakokban mellettem álltak.

Végül, de nem utolsósorban a legnagyobb köszönet a szeretteimnek szól.

Köszönet Édesanyámnak, Édesapámnak, valamint testvéreimnek a szeretetükért, az együtt töltött vidám évekért és az általuk biztosított lehetőségért, hogy orvos lehettem.

Legmélyebb hálámmal és köszönetemmel kis feleségemnek, Dórinak tartozom. Felhőtlen optimizmusa, sziklaszilárd türelme, bátorítása és megértése segített át a legnehezebb pillanatokon. Végtelen szeretete és jókedve volt az, ami miatt sikeresen végig tudtam menni ezen az úton.