

A hasnyálmirigy daganatok korai diagnosztikájának új lehetőségei

Doktori értekezés
Dr. Benke Márton Milán
Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Operatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Szücs Ákos, Ph.D., egyetemi docens
Hivatalos bírálók:
Dr. Bursics Attila Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Budai András Ph.D., egyetemi tanársegéd

Komplex Vizsgabizottság Elnöke:
Dr. István Gábor Ph.D, med. habil, egyetemi docens

Hivatalos bírálóbizottság tagjai:
Titkár: Dr. Iliás Ákos Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Miheller Pál Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Csapó Zsolt Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest, 2025

1. Bevezetés

1.1 Pancreas daganatok

A pancreas ductalis adenocarcinoma (PDAC) minden erőfeszítés ellenére napjainkban is 10% alatti az 5 éves túlélési arány. 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.

1.2 Pancreas cisztózus neopláziák (PCN)

A hasnyálmirigy cisztás daganatai (PCN) a hasnyálmirigy-ciszták heterogén csoportja, amely változatos klinikai, radiológiai és patológiai jellemzőket mutat. 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 PCN-ek malignizálódási potenciállal rendelkező mucinózus illetve elhanyagolható malignizálódási kockázattal rendelkező nem mucinózus fő kategóriákba sorolhatók.

Extracelluláris vezikulák

Az extracelluláris vezikulák(EV) foszfolipid kettősréteg által határolt szubcelluláris részecskék. 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.

2 Célkitűzés

Kutatásainkban vizsgáltuk pancreas tumoros betegeknél a különböző potenciális biomarkerek szerepét a korai diagnosztikában és a sebészi döntéshozatalban. A kutatási folyamatnak három fő célja volt. Első célkitűzésünk az volt, hogy megállapítsuk, egy jól ismert és széles körben elterjedt biomarker, a CA 19-9 használható -e pancreas ductalis adenocarcinomás betegeknél a tumor reszekabilitásának előrejelzésére, ami egy metaanalízis formájában került megvalósításra. Második célkitűzésünk

az volt, hogy kiderítsük, vajon humán pancreas nedvből azonosíthatóak -e potenciális új biomarkerként szolgáló extraelluláris vezikulák. Harmadik célunk az volt, hogy kiderítsük, pancreas cisztosus neoplasias betegcsoportokban cysta punktatumból izolált extracelluláris vezikulák alkalmazhatóak -e biomarkerként a magasabb malignizálódási potenciállal rendelkező alcsoportok elkülönítésére.

3 Módszerek

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

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 a PROSPERO adatbázisban regisztrált protokollnak megfelelően. A beválogatott tanulmányokban 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 és kiszámoltuk a súlyozott átlagos eltérést (weighted mean difference- WMD), hogy meghatározzuk a különbséget a preoperatív szérum CA 19-9 értékek között a csoportokban. A heterogenitást I^2 statisztikai módszer alapján állapítottuk meg.

Extracelluláris vezikulák azonosítása és karakterizálása humán pancreas nedvből

Az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT- TUKEB) által jóváhagyott protokollok alapján a vizsgálatba krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegeket, hasnyálmirigy adenocarcinómában és Vater-

papilla adenocarcinomájában szenvedő betegeket vontunk be akik a Semmelweis Egyetem I. Sebészeti Klinikáján (jelenleg Semmelweis Egyetem Sebészeti, Transzplantációs és Gasztroenterológiai Klinika) álltak kezelés alatt. A hasnyálmirigynedv gyűjtése műtétek során történt, olyan műtétek során, ahol elkerülhetetlen volt a Wirsung vezeték megnyitása. További mintákat is gyűjtöttünk pancreas tumoros eredetű sejtvonalak tenyészeiből (Capan-1 és MIA PaCa-2). Az EV-k izolálását differenciál centrifugálással kombinált, részletesen a disszertációban leírt protokoll alapján végeztük elkülönítve a különböző méretbeli frakciókat. TRPS (Tunable resistive pulse sensing- IZON Science) segítségével azonosítottuk a különböző EV frakciókat részecskeméret alapján. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM- Hitachi 7100 elektronmikroszkóp) segítségével morfológiájuk alapján bizonyítottuk izolálást követően az EV-k jelenlétét humán hasnyálban. Az izolált EV-k felszíni markereit áramlási citometriai módszerrel vizsgáltuk, majd a mintákból izolált EV-k fehérje és lipidtartalmának tömegspektrometriai elemzését végeztük. Az adatokat statisztikai elemzése GraphPad Prism v.4 szoftverrel történt.

A MiR-200b segítségével különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók a hasnyálmirigy cisztás elváltozásokkal rendelkező betegek

Az ETT-TUKEB jóváhagyásával a kutatásunk során felhasznált minták olyan felnőtt betegektől kerültek begyűjtésre, akiknél hasnyálmirigy cisztás elváltozásokat észleltek és indokolt volt az EUS (endoszkópos ultrahang) vizsgálat elvégzése. A cisztafolyadék mintákból EV-ket izoláltunk, majd NTA (Nanoparticle Tracking Analysis-ZetaView Z-NTA készüléken) segítségével részecskeméret-eloszlás és a koncentráció mérését végeztük. Az mintákból izolált EV-ket antitestbevonatú mikrogöngyök használatával áramlási citometriai módszerrel is vizsgáltuk. Az EV-k izolálását követően TEM (Hitachi 7100) morfológiai segítségével is bizonyítottuk EV-k jelenlétét. Ezt követően az EV-k tartalmának mikroRNS analízisét, majd a teljes cisztafolyadék mikroRNS analízisét végeztük. A Statisztikai elemzés kiértékelés és a vizualizáció során a Microsoft Excel és az SPSS version 25. szoftvereket használtunk.

4 Eredmények

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

Az elvégzett szisztematikus keresés összesen 11,677 találatot eredményezett (EMBASE: 6111, PubMed: 2928, Web of Science: 2638). A beválasztási és kizárási kritériumok alapján nyolc publikációt választottunk ki a kvantitatív elemzéshez. A végső összesített, a ROC

görbékéből számolt AUC (Area Under Curve- Grafikon alatti terület) eredmény 0,79 (Konfidencia Intervallum: 0,694-0,893) volt. Ez alapján a preoperatívn szérumban CA 19-9 szint egy „elfogadható” („fair”) előrejelzője a reszekabilitásnak, de nem érte el a 0,8 értéket, vagyis nem klasszifikálható a „jó” kategóriába. A preoperatív CA 19-9 értékek szignifikáns különbséget mutattak a reszekábilis és irreszekábilis csoportban. A preoperatív szérumban CA 19-9 értékek 964 U/ml-rel ($p < 0,001$) alacsonyabbak voltak az operábilis csoportban, mint az az irreszekábilis csoportban. 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.

Extracelluláris vezikulák azonosítása és karakterizálása humán pancreas nedvből

A hasnyálmirigynedvből és sejtenyészetekből származó minták TEM vizsgálata alapján az összesben jelen voltak EV-k. TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) vizsgálata alapján a hasnyálmirigynedv minták tartalmaztak extracelluláris vezikulákat a részecskeméretbeli eloszlásuk szerint. 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 a krónikus

pancreatitisises betegekből származó hasnyálmirigynedvből izolált nagy extracelluláris vezikulák $1.1 \pm 0.6 \times 10^7$ részecske/mL-es koncentrációjánál. A hasnyálmirigynedvből, pancreas tumoros sejtvonalakból és vérből izolált extracelluláris vezikulák tömegspektrometriai vizsgálata eredményeként nagy mennyiségű fehérjét azonosítottunk, amelyek legalább két egyedi extracelluláris vezikula eredetű peptidet tartalmaztak. 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. 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 pancreas tumoros sejtvonalból izolált extracelluláris vezikulák felszínén MUC1, MUC4, MUC5AC, CFTR, MDR1 és Annexin V fehérjéket detektáltuk. Apróbb eltérések mellett mindezen markerek megjelentek extracelluláris vezikula frakciókban, amelyeket a pancreas tumoros sejtvonalakból izoláltunk. A hasnyálmirigynedvből származó extracelluláris vezikulákon CD63-as jelölt mágneses mikrogönggyökkel való kötődése is igazolódott, demonstrálva azt, hogy jelen van rajtuk a CD63 marker.

A MiR-200b segítségével különböző malignitási potenciállal rendelkező alcsoportokba sorolhatók a hasnyálmirigy cisztás elváltozásokkal rendelkező betegek

A vizsgálatba bevont betegek besorolását követően TEM segítségével sikeresen bebizonyítottuk az EV-k jelenlétét a PC, S-PCN és M-PCN mintákban és NTA segítségével az EV-k méretbeli és koncentrációbeli eloszlását. Ezenfelül egy membránjelölő festés és NTA segítségével megmutattuk, hogy az EV-k túlnyomó többségének a membránja ép volt. A magas zéta potenciál érték megmutatta, hogy az EV oldatok a tárolást követően is stabilak maradtak és nem jelentkezett aggregáció. Az S-PCN és PC betegek esetén a malignus transformáció esélye rendkívül alacsony, ezzel szemben az M-PCN-ek esetén fennáll a malignus transformáció veszélye. A kutatásunk során két kategóriába, a potenciálisan malignizálódó M-PCN és a malignizálódási kockázatot nem jelentő nem-M-PCN csoportba soroltuk a mintákat. Nem találtunk összefüggést az EV-k száma és a diagnózis (M és nem-M-PCN csoport) között függetlenül a vizsgált EV-k mérettartományától.

Ezt követően azonosítottuk azokat a miRNS-eket, amelyek szintje különbözött a két csoport között. 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. 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. ROC görbe analízist végeztünk, amelynek eredménye mutatja, hogy sikeres volt az elkülönítés az M és a non-M csoportok között. Teljes pancreas ciszta folyadékokból miR-200b és miR-24 elemzést hajtottunk végre, ennek eredményeként a teljes cisztafolyadék szintén alkalmas volt M és nem-M PCN minták elkülönítésére. Összehasonlítva különböző diagnosztikai módszereket, ami eredményeként azt kaptuk, hogy a legjobb egyezés az EUS morfológiával volt, továbbá 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.

5 Következtetések

A kutatás első lépése eredménye alapján megmutattuk, hogy a preoperatív szérum CA 19-9 szint annak ellenére, hogy jelentős különbség van a reszekábilis és nem reszekábilis esetekben a preoperatív szérum CA19-9 értékek között, csak egy „elfogadható” marker, valamint a populáción belüli heterogenitás magas volt, használhatósága korlátozott, különösen a klinikai gyakorlatban, így a CA 19-9 önmagában nem alkalmazható a PDAC reszekabilitásának eldöntésére. Kutatómunkánk második lépése során a humán hasnyálból izolált EV-k vizsgálatának eredményei összességében azt mutatják, hogy az EV-k kimutatása és jellemzése

közvetlenül a hasnyálból megvalósítható és a hasnyálmirigyrák potenciális biomarkereinek értékes forrásának bizonyulhat. Harmadik kutatásunk során

bebizonyítottuk, hogy az M-PCN-eredetű EV-k tartalmában vannak közös miRNS-ek. Az M-PCN-t S-PCN-nel és pszeudociszta eredetű EV-vel (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.

6 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- Benke, M., Zeöld, A., Kittel, Á., Khamari, D., Hritz, I., Horváth, M., Keczer, B., Borka, K., Szücs, Á., & Wiener, Z. (2023). MiR-200b categorizes patients into pancreas cystic lesion subgroups with different malignant potential. *Scientific reports*, 13(1), 19820. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47129-1>
- Benke, M., Farkas, N., Hegyi, P., Tinusz, B., Sarlós, P., Eröss, B., Szemes, K., Vörhendi, N., Szakács, Z., & Szücs, Á. (2022). Preoperative Serum Carbohydrate Antigen 19-9 Levels Cannot Predict the Surgical Resectability of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Pathology oncology*

research : POR, 28, 1610266.
<https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610266>

- Osteikoetxea, X., Benke, M., Rodriguez, M., Pálóczi, K., Sódar, B. W., Szvicsek, Z., Szabó-Taylor, K., Vukman, K. V., Kittel, Á., Wiener, Z., Vékey, K., Harsányi, L., Szűcs, Á., Turiák, L., & Buzás, E. I. (2018). Detection and proteomic characterization of extracellular vesicles in human pancreatic juice. *Biochemical and biophysical research communications*, 499(1), 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.107>

A disszertációtól független közlemények

- Keczer, B., Benke, M., Marjai, T., Horváth, M., Miheller, P., Szűcs, Á., Harsányi, L., Szijártó, A., & Hritz, I. (2022). Quantitative Software Analysis of Endoscopic Ultrasound Images of Pancreatic Cystic Lesions. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(9), 2105.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics12092105>
- Harsányi, L., Tihanyi, T., Marjai, T., Benke, M., Szűcs, Á., & Szijártó, A. (2020). Hasnyálmirigy-sebészet a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján. *Magyar sebeszet*, 73(3), 100–103.
<https://doi.org/10.1556/1046.73.2020.3.6>
- Erős, A., Soós, A., Hegyi, P., Szakács, Z., Benke, M., Szűcs, Á., Hartmann, P., Erőss, B., & Sarlós, P. (2020). Sarcopenia as an independent predictor

of the surgical outcomes of patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Surgery today*, 50(10), 1138–1150. <https://doi.org/10.1007/s00595-019-01893-8>

- GlobalSurg Collaborative and NIHR Global Health Research Unit on Global Surgery (2022). Effects of hospital facilities on patient outcomes after cancer surgery: an international, prospective, observational study. *The Lancet. Global health*, 10(7), e1003–e1011. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(22\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00168-1)
- GlobalSurg Collaborative and National Institute for Health Research Global Health Research Unit on Global Surgery (2021). Global variation in postoperative mortality and complications after cancer surgery: a multicentre, prospective cohort study in 82 countries. *Lancet (London, England)*, 397(10272), 387–397. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00001-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00001-5)
- [Benke, Márton](#) ; Bán, Kinga ; [Bennemann, Stephan](#) ; [Balázs, Ákos](#) ; [Vass, Tamás](#) ; [Szijártó, Attila](#)
[Egy nem várt mellékhatás](#)
MAGYAR SEBÉSZET 75 : 4 pp. 278-278. , 1 p. (2022)
<https://doi.org/10.1556/1046.2022.40004>

- [Gellért, B ; Horváth, M ; Péter, Z ; Miheller, P ; Dudás, I ; Benke, M ; Marjai, T ; Szűcs, Á ; Szijártó, A ; Hritz, I](#)
[*Ampullaris neoplasiák kezelése – kié a beteg?*](#)
 CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF
 GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY /
 GASZTROENTEROLÓGIAI ÉS
 HEPATOLÓGIAI SZEMLE 8 : Suppl. 1 pp. 77-
 78. Paper: 39 , 2 p. (2022)
- Vass, T. ; Balázs, Á. ; Baranyai, Z. ; Bán, K. ;
 Benke, M. ; Hritz, I. ; Keczer, B. ; Szijártó, A
 Nyelőcső sérülések nem sebészi kezelésének
 lehetőségei
 Central European Journal of Gastroenterology and
 Hepatology / Gasztroenterológiai és Hepatológiai
 Szemle 6 : Suppl. 2 pp. 86-87. Paper: 143 , 2 p.
 (2020)