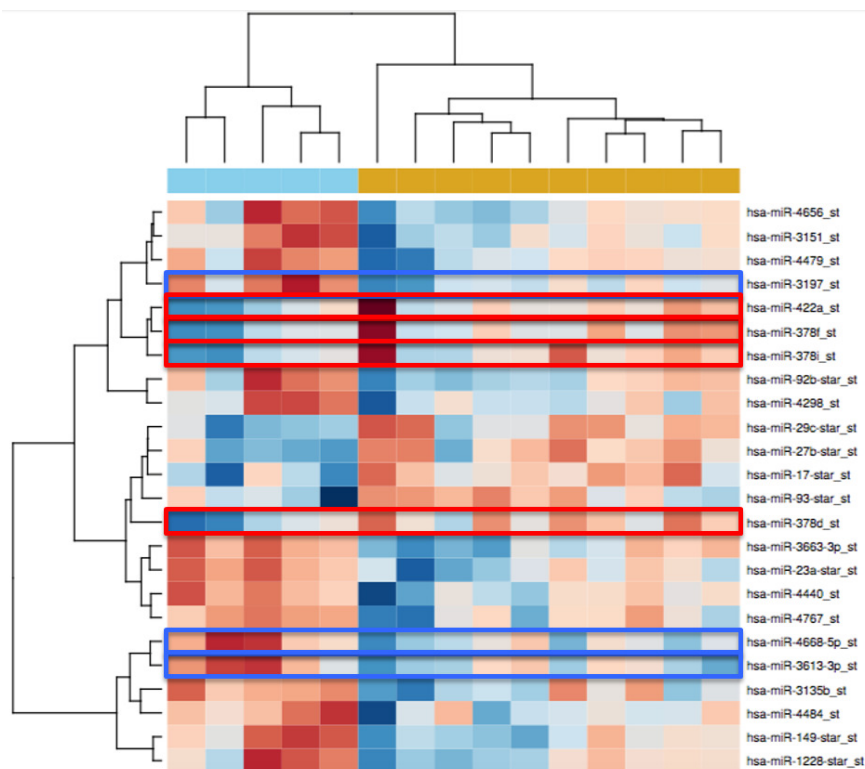


Projekt záróbeszámoló (OTKA –KLI/PD/101808)

A projekt első lépéseként krónikus hasnyálmirigy gyulladásban és hasnyálmirigy daganatban szenvedők vér és szövetmintáit gyűjtöttük össze. A mintagyűjtés fázisa alatt a nukleinsav izolálás optimalizálását nemcsak szövet-, hanem vérmintákból is elvégeztük. Az izolálás eredményeképpen vérből 10ng/μl feletti RNS koncentrációkat mértünk Qubit segítségével, majd az RNS integritás becslésére a mintákat RNS Pico chipen Agilent 2100 Bioanalyzer segítségével ellenőriztük. A nagy volumenű microRNS chip analízis előtt *Affymetrix GeneChip miRNA 1.0* microarray segítségével kísérleteket végeztünk a módszer optimalizálására, a chipre 400ng RNS mintát hibridizáltunk biotin jelölést követően. Az elővizsgálatokhoz normál és krónikus pankreatitisz-ben szenvedő egyének plazmamintáiból izolált RNS-t használtuk fel. A chip-en szereplő 848 darab humán mikroRNS közül 222 darab (több mint 25%) adott szignifikáns jelet. A Semmelweis Egyetem, I.sz. Sebészeti Klinika (Dr. Szűcs Ákos, adjunktus, Budapest) és a Petz Aladár Megyei Oktatókórház (Prof. Dr. Oláh Attila, Győr) közreműködésével 60 betegből szövet és vérmintához jutottunk, valamint Prof. Dr. Markus Lerch-el (Greifswald, Németország) való kollaborációnk eredményeképpen további 100 krónikus pankreatitiszben szenvedő egyén plazmamintája is rendelkezésünkre áll, a felsorolt minták mind a kiterjedt M-ANNHEIM beosztás szerint lettek besorolva. A microarray analízisre (n=20 szövet, n=20 plazma ugyanabból a betegből) az alábbi szempontrendszer alkalmaztuk: (1) a mikroRNS izolátum minősége (Qubit, Nanodrop, Bioanalyzer futási kép), (2) a metszett szövetben legalább 30%-os legyen a pathológiás rész aránya (a pathológiai szakvéleményt két független szakértőtől szereztük be), (3) a betegségek korai stádiumai is megfelelőképpen legyenek reprezentálva, (4) jó minőségű műtéti szövet és vérminta is rendelkezésre álljon ugyanabból az egyénből. A nagy felbontású microarray analízisekhez (n=1733 humán, érett mikroRNS szekvencia egyidejű meghatározása) a 20 legígéretesebb mintát választottuk ki: 10 krónikus pankreatitisz, 5 hasnyálmirigydaganat, 5 tumor melletti szövet (krónikus pankreatitiszre jellemző struktúra és PanIN léziók szövettanilag kizárva).

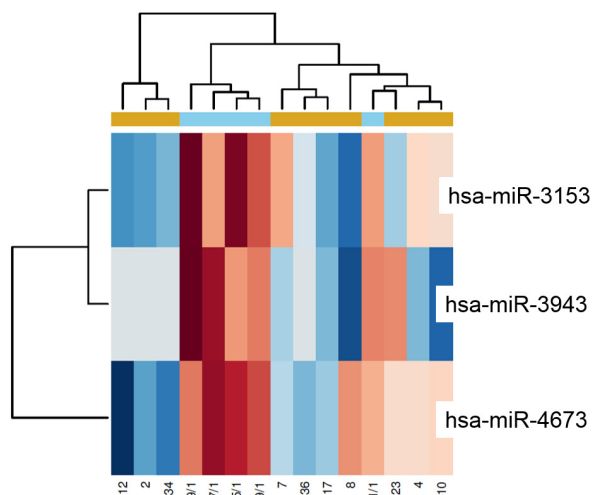
A nagy volumenű mikroRNS chip analízis *Affymetrix GeneChip miRNA 3.0* microarray segítségével történt, a chipre 1000ng RNS mintát (szöveti izolátum) hibridizáltunk biotin jelölést követően. A chip-en szereplő 1733 darab érett, humán mikroRNS közül átlagosan 400 darab (kb. 23%) adott szignifikáns jelet, ami az irodalmi adatoknak megfelelt, a mintatípusok között ebben lényeges különbség nem volt. A statisztikai analízis eredményei (Prof. Dr. Csabai István és Dr. Solymosi Norbert, ELTE Komplex Rendszerek Fizikája Tanszék) azt mutatták, hogy az átlagok eltéréseinek figyelembe vételekor összesen 24 miRNS mutatott eltérő mintázatot normál vs. krónikus pankreatitisz esetében (minimum 2 feletti FC értékeket figyelembe véve), így ezeknek a markereknek sikeres validációt követően szerepük lehet a betegség szero-diagnosztikájában. A miR-3613-3p, miR-4668-5p, miR-3197 krónikus pankreatitiszben lineáris regressziós modell alapján több mint 2,5x dúsulást mutat (ábrán

kékkel jelölve), míg a miR-422a, miR-378i, miR-378f és a miR-378d alulexpresszáltak (ábrán pirossal jelölve) a beteg szövetekben a normál kontrollokhöz képest (a korrigált p-értékek <0.05 -nél) (1. ábra).



1. ábra: A mikroRNS szöveti chip eredményei „heatmap” ábrázolásban a lineáris modell alapján normál (n=5, bal oldal) és krónikus pankreatitisz (n=10, jobb oldal) összehasonlításban.

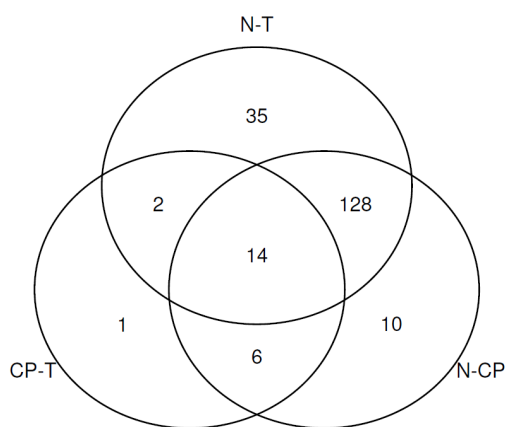
SAM analízis során ($\Delta > 0.987$, korrigált p-érték < 0.003) a miR-3153, miR-3943 és a miR-4673 expressziós értékek alapján a mintatípusok elkülöníthetők (2. ábra).



2. ábra: SAM analízis normál és krónikus pankreatitisz szövetminták elkülönítésére.

A gyulladás-tumor összehasonlításban is 38 értékes markerhez jutottunk: miR-155, miR-222, miR-21, miR-224, miR-1246, miR-221 mikroRNS-ek 3,5x feletti dúsulása figyelhető meg tumorban, krónikus pankreatitishoz képest, a miR-375 ellenben jellemzően alulexpresszált daganatban, az eredmények itt is statisztikailag szignifikánsak.

A nagy felbontású microarray analíziseket a továbbiakban a 10 krónikus pankreatitiszben és 5 hasnyálmirigydaganatban szenvedő beteg plazmamintájának analízisével folytattuk, a kontroll vérek (n=5) egészséges, az átlagéletkorban nem eltérő, egyénektől származtak. A mikroRNS chipekre kb. 100ng RNS mintát hibridizáltunk biotin jelölést követően az érett, humán mikroRNS-ek közül átlagosan 300 darab (kb. 17%) adott szignifikáns jelet, a mintatípusok között ebben lényeges különbség nem volt. A SAM és a VSN pre-processzált lineáris regressziós modell alapján statisztikai szignifikanciát mutató, differenciál-diagnosztikai szereppel bíró plazma markerhez nem jutottunk. Az RMA előkészítés után lineáris modellel kapott eredmények (fold-change /FC/ értékek) alapján több 2FC feletti marker volt azonosítható minden összehasonlításban (N-CP, N-T, CP-T). Az ábrán (3. ábra) bemutatott „metszetek” alapján a centrumban látható 14 marker alkalmas lehet a normál/gyulladt/tumoros vérek elkülönítésére, a tumor-gyulladás összehasonlításban, a várakozásoknak megfelelően, találtunk a legkevesebb differenciáló markert, a normál-gyulladás összevetésben többet, ugyanakkor a mikroRNS-ek a normál-tumor összehasonlításban alkalmazhatóak igazán jól. A metszet-diagrammok alapján a legjobban differenciáló plazmamarkerek az alábbiak: hsa-miR-17_st, hsa-miR-19b_st, hsa-miR-130a_st, hsa-miR-151-3p_st, hsa-miR-199b-3p_st, hsa-miR-762_st, hsa-miR-4484_st.



3. ábra: Venn-diagramm a plazmamintákat differenciáló „markerszámok” bemutatására.
(N=normál, CP=krónikus pankreatitisz, T=tumor)

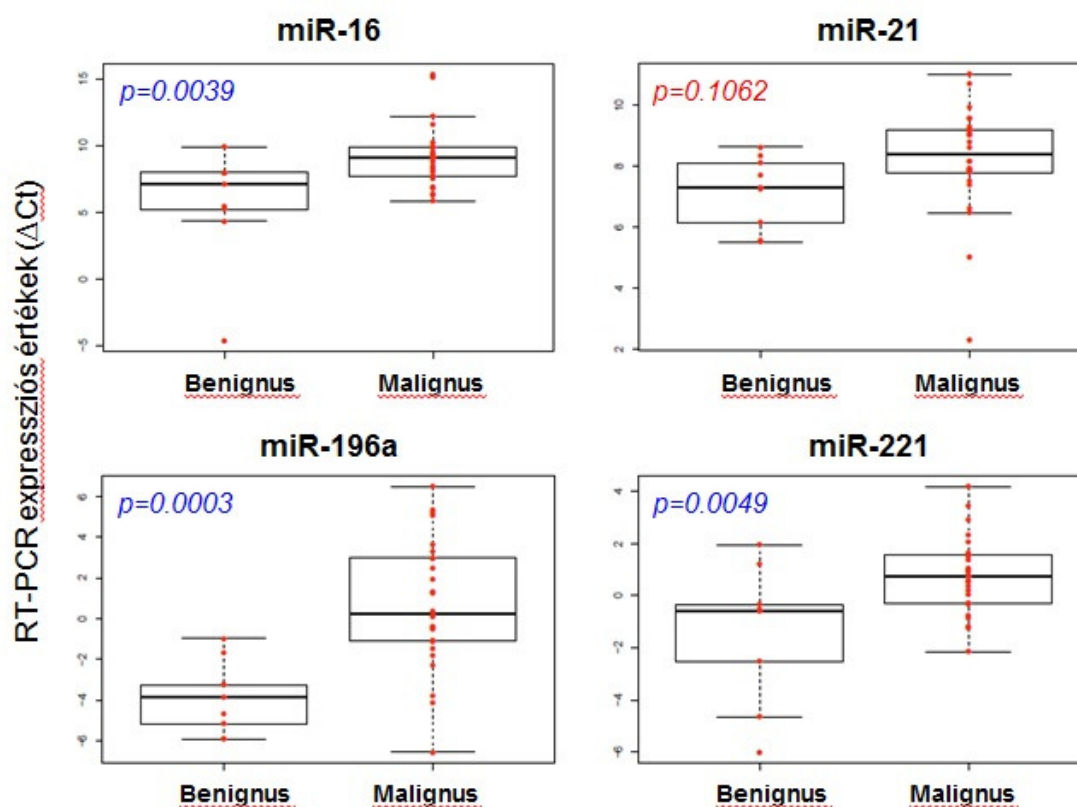
A pancreasbetegségek vérdiagnosztikáját segítő plazma mikroRNS markerek azonosítása. A következőkben a krónikus pankreatitist a normál szövetmintáktól, illetve plazmamintáktól nagy expressziós különbséggel elkülönítő markerek után kutattunk, a legalább 3x különbséget mutató mikroRNS-ek közül azokat választottuk ki, amelyek szövetben és vérben is differenciáltak (RMA előkészítés alapján lineáris modellel kapott eredmények, FC értékek alapján), illetve a krónikus

gyulladást a tumortól és normál mintáktól is jól elkülönítették (Venn-diagramm). A fentiek alapján a plazmamintákon az alábbi 9 mikroRNS meghatározását tervezzük: hsa-miR-17_st, hsa-miR-28_5p_st, hsa-miR-30e_st, hsa-miR-106b_st, hsa-miR-130b_st, hsa-miR-146b_5p_st, hsa-miR-149-star_st (3p új nomenklátúra), hsa-miR-155_st, hsa-miR-199b_3p_st. A krónikus pankreatitiszre legspecifikusabb markereket 60 pancreatitises, 15 daganatos és 15 egyéb gyulladásban (gyulladásos bélbetegség) szenvedő egyénen teszteljük RT-PCR segítségével, a mérések jelenleg a validáció fázisában vannak. A krónikus pankreatitiszben szenvedők vérmintáit Prof. Dr. Markus Lerch, a Greifswald-i Klinikáról biztosította, a pancreasrákban és gyulladásos bélbetegségben szenvedők mintáit a Semmelweis Egyetemen gyűjtöttük az etikai engedélyben foglaltaknak megfelelően.

A pankreatobiliáris kefecitológiai diagnosztikát segítő új mikroRNS markerek. A nukleinsav izolálás optimalizálását a szövet-, és vérminták után egy teljesen új mintatípusból, az endoszkópos retrográd cholangiopancreatográfia (ERCP) során nyert kefecitológiás mintákból is elvégeztük, amely mintatípusból mikroRNS izolálásról v. meghatározásról szóló közlés az irodalomban nem szerepel. A jóindulatú (krónikus pankreatitisz) és rosszindulatú (adenocarcinoma) pancreas-vezeték szűkületek elkülönítése a mindennapok nagy kihívása a gasztroenterológus számára. Ebben az intraduktális mintavételi módszerek lehetnek segítségünkre, amelyek ennél a mindennapi rutinban használt tesztnél elfogadhatatlanul alacsony szenzitivitást mutatnak (20-70%). A hasnyálmirigy malignus betegségek rossz túlélési mutatóinak ismeretében ilyen mértékű diagnosztikus bizonytalanság nem megengedhető, ezért a kefecitológiai diagnosztikát segítő biomarkerekre nagy szükség van. Kísérleteink igazolták, hogy valós-idejű TaqMan módszeren alapuló PCR (qRT-PCR) segítségével Roche Light Cycler 480-as berendezésen a miR-16, miR-21, miR-221, miR-196a mikroRNS-ek expressziója ebben a mintatípusban is meghatározható. A szigorú beválasztási kritériumok miatt a prospektíven összegyűjtött minták 45.2%-a (33/73) kizárásra került, két esetet a citológiai diagnózis hiánya miatt (nem megfelelő cellularitás) kellett nélkülöznünk. A maradék 40 beteg 18 hónapig vagy halálukig szorosán követve volt a klinikai diagnózis megerősítése érdekében. Rosszindulatú betegsége 30 betegünknek (70%) volt, mely 16 betegben epeúti, 14 betegben hasnyálmirigyben lévő szűkületként jelent meg. 10 betegben (25%) benignus betegség okozott pankreatobiliáris szűkületet. Az irodalmi adatoknak megfelelően, a rutin citológia nem eredményezett álpozitív diagnózist (100% specificitás) a saját mintacsoportunkon sem, azonban 46.7%-ban (14/30) álnegatív eredményt kaptunk, azaz a rosszindulatú betegség rejtve maradt. Ha az egyértelműen malignus (D) citológiai mellett a malignitásra gyanús eseteket (C) is pozitívnak vesszük, a szenzitivitás kissé megnő (73.3%), de ez a specificitás csökkenését eredményezi.

A kiválasztott mikroRNS-ek expressziós szintjei. A totál RNS frakció izolálása, beleértve a mikroRNS-eket, sikeres és reprodukálható volt mind a 73 vizsgált kefecitológiás mintán, és $2.4 \pm 1.8 \mu\text{g}$ totál RNS-mennyiséget eredményezett jó kvalitatív eredményekkel. Az összes vizsgált mikroRNS expressziós szintje magasabb volt a malignus szűkülettel rendelkező 30 beteg kefecitológiás mintáiban, mint a

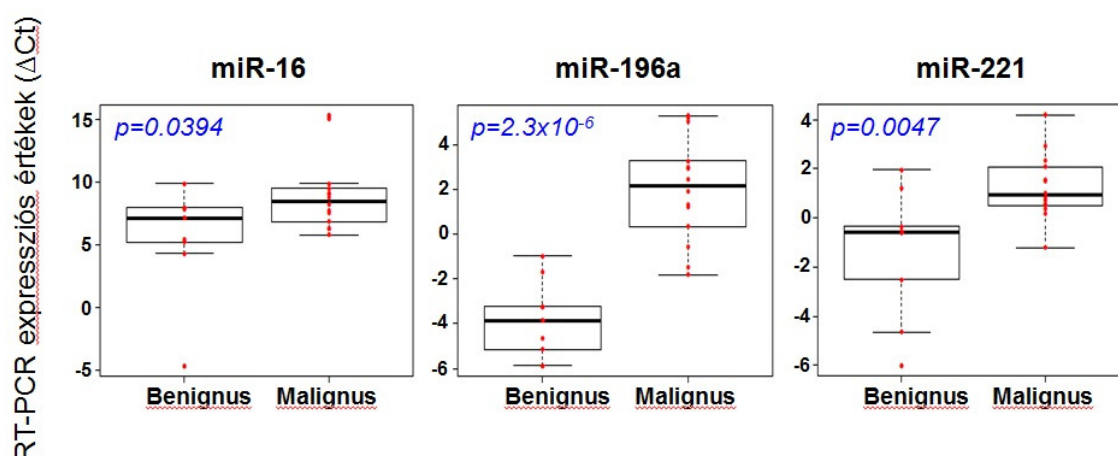
benignus csoportban, habár ez a tendencia statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak a miR-21 esetén ($p=0.1062$). A benignus hasnyálmirigy és epeúti minták összehasonlításakor szignifikáns expressziós különbségek nem voltak mérhetőek, így ezeket a mintákat egy csoportba vontuk össze. A miR-16, miR-196a és a miR-221 kifejeződési értékei (ΔCt) statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak a malignus és benignus szűkületek összehasonlítása során (4.ábra). A miR-16 esetén 3.5 ciklus, a miR-196a esetén 4.6 ciklus és a miR-221 esetén 2.1 ciklus különbséggel, körülbelül 11.3-szoros, 23.6-szoros és 4.3-szoros mikroRNS expresszió-növekedést jelezve a rosszindulatú szűkületekben a jóindulatúakkal való összevetésben ($n=35$). A miR-196a kifejeződését vizsgálva magasabb, a duplikátumokat is beszámolva 55 darabos mintaszámon, az expressziós különbség a két mintacsoportban még nagyobb lett, 1.4×10^{-8} p-értékkel. A legszenzitívebb három mikroRNS-sel (miR-16, miR-196a, miR-221) történtek a további vizsgálatok. A mintákat a nem, az ERCP előtt mért bilirubin, illetve CA19-9 értékek, valamint tumorméret szerint csoportosítva nem kaptunk statisztikailag szignifikáns eltérést a mikroRNS expressziós szintekben.



4. ábra: A vizsgált mikroRNS-ek expressziójának összehasonlítása malignus és benignus pankreatobiliáris szűkülettel rendelkező betegek mintáiban ($n=40$). Kékkel a statisztikailag szignifikáns paramétereket jelöltem.

Alcsoportok vizsgálata. Mivel az ERCP-t terápiás céllal gyakrabban alkalmazzuk epeúti szűkületek esetén, és irodalmi adatok szerint szenzitivitásbeli különbségek vannak a diagnosztikában a lokalizációtól függően is, így a következő vizsgálatban az epeúti-, és hasnyálmirigyrák minták külön

csoportokba lettek sorolva. A hasnyálmirigy szűkületeiben a kefecitológia érzékenysége egyértelműen magasabbnak bizonyult (66.7% a 42.9%-kal szemben), 81%-os diagnosztikus pontossággal. Az eszköz végéhez közelebb eső részek (hasnyálmirigy-fej, disztális choledochus) mintavétele általánosságban jobban sikerült a proximális részekhez (hasnyálmirigy-farok, hilusi léziók) képest. A malignus hasnyálmirigy-minták szignifikánsan magasabb miR-16 ($p=0.0098$) és miR-196a ($p=0.0254$) expressziós értékeket mutattak, mint a jóindulatú szűkületek. A miR-221 kifejeződése szintén magasabb volt, de ez nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p=0.973$). Ezzel ellentétben, epeúti malignus szűkületek esetén az összes vizsgált mikroRNS szignifikánsan magasabb szinteket mutatott, mint benignus strikturákban (5. ábra). A miR-196a különösen kiváló markernek bizonyult a cholangiocarcinoma és normál minták elkülönítésében ($p=2.3 \times 10^{-6}$).



5. ábra: Epeúti malignus kefecitológiai minták mikroRNS szintjei a benignus strikturákkal való összehasonlításban.

A mikroRNS-ek diagnosztikus hatékonyságának összehasonlítása kombinációban való alkalmazásuk esetén. A mikroRNS-ek klinikai felhasználhatóságának javítására felmerül azok kombinációban való vizsgálata. A következő adatokat ROC-görbék segítségével nyertük. Mivel vizsgálataink során a citológiai analízis specificitása önmagában 100% volt, megpróbáltunk a vizsgált mikroRNS markereknek olyan optimális *cut-off* értékeket találni, amelyek a specificitás értéket nem rontották. A miR-196a esetében a $\Delta C_t > -0.985$ értékét használva a malignus és benignus szűkületek elkülöníthetőek voltak 69.2%-os érzékenységgel és 100%-os specificitással, de a hatékonyság tovább növelhető a citológia és a mikroRNS vizsgálat kombinációjával, 84.6%-os szenzitivitást és 100%-os PPV-t eredményezve. Több mikroRNS kombinációja nem javította ezeket a statisztikákat (1. táblázat).

1. táblázat: A pankreatobiliáris szűkületekből származó minták differenciálásának mérőszámai a rutin citológia és a mikroRNS markerek kombinációinak alkalmazásával.

	Citológia	miR-16	miR-196a	miR-221
Szenzitivitás (%)	53.8	73.1	69.2	80.8
Specifititás (%)	100.0	88.9	100.0	77.8
PPV (%)	100.0	95.0	100.0	91.3
NPV (%)	42.9	53.3	52.9	58.3
Pontosság (%)	65.7	77.1	77.1	80.0

	Kombinált expressziós profilok			Citológia+ miR-196a	Citológia + miR expresszió (2 pozitív)
	1 pozitív	2 pozitív	3 pozitív		
Szenzitivitás (%)	96.1	88.5	38.5	84.6	88.5
Specifititás (%)	77.8	88.9	100.0	100.0	88.9
PPV (%)	92.6	95.8	100.0	100.0	95.8
NPV (%)	87.5	72.7	36.0	69.2	72.7
Pontosság (%)	91.4	88.6	54.3	88.6	88.6

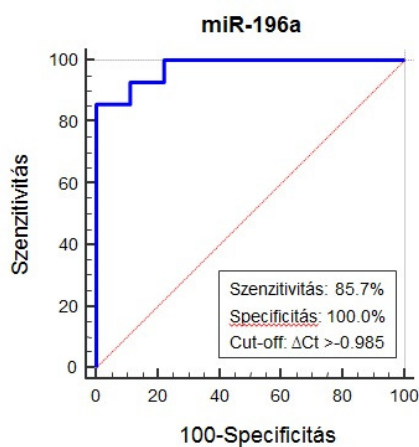
A hasnyálmirigy-minták *ROC*-analízise alapján az optimális *cut-off* értékek a $\Delta Ct > 7.975$ (miR-16), $\Delta Ct > -1.68$ (miR-196a) és $\Delta Ct > -0.345$ (miR-221). A legjobb markernek a miR-16 bizonyult, amely 91.7%-os szenzitivitással és 88.9%-os specificitással különíti el a mintacsoportokat. A kombinált analízis (citológiával vagy más markerekkel) nem növelte a miR-16 diagnosztikus hatékonyságát, és a miR-196a-al vagy miR-221-el való kombináció sem növelte a citológiáét (2. táblázat).

2. táblázat: A hasnyálmirigy szűkületekből származó minták differenciálásának mérőszámai a rutin citológia és a mikroRNS markerek kombinációinak alkalmazásával.

	Citológia	miR-16	miR-196a	miR-221
Szenzitivitás (%)	66.7	91.7	66.7	66.7
Specificitás (%)	100.0	88.9	88.9	77.8
PPV (%)	100.0	91.7	88.9	80.0
NPV (%)	69.2	88.9	66.7	63.6
Pontosság (%)	81.0	90.5	76.2	71.4

	Kombinált expressziós profilok			Citológia+ miR-196a	Citológia + miR expresszió (2 pozitív)
	1 pozitív	2 pozitív	3 pozitív		
Szenzitivitás (%)	91.7	91.7	41.7	91.7	91.7
Specificitás (%)	77.8	88.9	88.9	88.9	88.9
PPV (%)	94.6	91.7	83.3	91.7	91.7
NPV (%)	87.5	88.9	53.3	88.9	88.9
Pontosság (%)	85.7	90.5	61.9	90.5	90.5

Az epeúti minták vizsgálatakor a legjobb *cut-off* értékeknek a következők bizonyultak: $\Delta Ct > 7.975$ (miR-16), $\Delta Ct > -0.985$ (miR-196a) és $\Delta Ct > -0.345$ (miR-221). A miR-196a egyénileg extrém hatékony marker 85.7%-os érzékenységgel és 100%-os specifitással (6. ábra).



6. ábra: Az epeúti kefecitológiai minták ROC analízise miR-196a markerrel.

Több marker expressziós szintjének vizsgálata nem növelte a diagnosztikus pontosságot, habár a miR-196a és a citológia együtt 92.9%-os szenzitivitást ért el, álpozitív esetek nélkül (3. táblázat).

3. táblázat: Az epeúti szűkületekből származó minták differenciálásának mérőszámai a rutin citológia és a mikroRNS markerek kombinációinak alkalmazásával.

	Citológia	miR-16	miR-196a	miR-221
Szenzitivitás (%)	42.9	57.1	85.7	92.9
Specifititás (%)	100.0	88.9	100.0	77.8
PPV (%)	100.0	88.9	100.0	86.7
NPV (%)	52.9	57.1	81.8	87.5
Pontosság (%)	65.2	69.6	91.3	87.0

	Kombinált expressziós profilok			Citológia+ miR-196a	Citológia + miR expresszió (2 pozitív)
	1 pozitív	2 pozitív	3 pozitív		
Szenzitivitás (%)	100.0	85.7	50.0	92.9	85.7
Specifititás (%)	77.8	88.9	100.0	100.0	88.9
PPV (%)	87.5	92.3	100.0	100.0	92.3
NPV (%)	100.0	80.0	56.3	90.0	80.0
Pontosság (%)	91.3	87.0	69.6	95.7	87.0

Ezek a mikroRNS markerek, amennyiben nagyobb kefecitológias mintaszámokon is megtörténik validációjuk, olcsó és a betegnek plusz terhet nem jelentő elemei lehetnek az onkológiai diagnosztikának, segítve a benignus esetek megbízható elkülönítését.

Közlemény

Meghívott előadóként számos fórumon hangsúlyoztam a mikroRNS-ek szerepét a hasnyálmirigy betegségek diagnosztikai és prognosztikai markereiként (pl.: MGT, MGT Onkológiai Szekció, FISOSZ, MOT, Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport Konferenciái, Belgyógyász Továbbképző Tanfolyam, Országos Gasztroenterológiai Továbbképző Tanfolyam). „A mikroRNS-ek szerepe a rák keletkezésében és progressziójában” címmel könyvfejezetet írtam (*A hasnyálmirigy daganatai, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2014*). Az előzetes eredményekből három referálható abstract született, a European Pancreatic Club éves konferenciáján Angliában kiemelt előadásként szerepelt a kefecitológiai eredményeket bemutató munka. A kísérletes munkából a záró beszámoló időpontjában referálható cikk nincs, a kefecitológiai eredmények publikálása folyamatban van.

Dr. Szmola Richárd