



Velikost zunajceličnih veziklov je povezana s celokupnim preživetjem bolnikov z adenokarcinomom trebušne slinavke

The size of extracellular vesicles correlates to the overall survival of patients with pancreatic adenocarcinoma

Janja Smolar,^{*1} Blažka Šturm,^{*1} David Badovinac,² Teja Lavrin,¹ Katja Goričar,¹ Vita Dolžan,¹ Aleš Tomažič,^{2,3} Metka Lenassi¹

Izvleček

Izhodišča: Duktalni adenokarcinom trebušne slinavke (PDAC) je ena najbolj smrtonosnih rakavih bolezní. V naši raziskavi smo želeli ovrednotiti povezavo zunajceličnih veziklov (ZV) iz krvne plazme s celokupnim preživetjem bolnikov s PDAC, ki so bili kirurško obravnavani.

Metode: V retrospektivno raziskavo smo vključili 32 preiskovancev s postavljeno diagnozo PDAC, ki so bili kirurško obravnavani na KO za abdominalno kirurgijo UKC Ljubljana. Za vsakega preiskovanca smo pridobili klinične podatke, laboratorijske izvide, histopatološko analizo in vzorec krvne plazme. ZV smo osamili iz plazme preiskovancev in določili njihovo koncentracijo in velikost.

Rezultati: Preiskovance smo glede na tip kirurške obravnave razdelili na skupino z opravljeno resekcijo tumorja in skupino z opravljeno eksploracijo brez resekcije. Pokazali smo, da so ZV v krvni plazmi bolnikov z eksploracijo značilno večji od ZV bolnikov z resekcijo ($p < 0,05$). Z analize ROC smo določili mejne vrednosti velikosti ZV, ki so ločile preiskovance glede na tip kirurške obravnave. Pri mejni vrednosti 183,3 nm za povprečno velikost ZV je za napoved resekcije občutljivost 0,591 in specifičnost 0,900 s površino pod krivuljo 0,77 (95 % CI = 0,60–0,93, $p = 0,016$). Preiskovanci z večjimi ZV so imeli slabše celokupno preživetje ($p < 0,05$), pri čemer je bilo preživetje preiskovancev s povprečno velikostjo ali mediano velikosti ZV večje od mejne vrednosti za 13,8 mesecev slabše ($p < 0,05$).

* Avtorici si enakopravno delita avtorstvo.

¹ Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

³ Katedra za kirurgijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Metka Lenassi, e: metka.lenassi@mf.uni-lj.si

Ključne besede: rak trebušne slinavke; eksploracija; resekcija; personalizirano zdravljenje; zunajcelični vezikli

Key words: pancreatic cancer; exploration; resection; personalized treatment; extracellular vesicles

Prispelo / Received: 11. 5. 2022 | **Sprejeto / Accepted:** 6. 8. 2022

Citirajte kot/Cite as: Smolar J, Šturm B, Badovinac D, Lavrin T, Goričar K, Dolžan V, et al. Velikost zunajceličnih veziklov je povezana s celokupnim preživetjem bolnikov z adenokarcinomom trebušne slinavke. Zdrav Vestn. 2023;92(1–2):20–30. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3360>



Avtorske pravice (c) 2023 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

Zaključek: V sklopu raziskave smo pokazali povezavo med velikostjo ZV in celokupnim preživetjem bolnikov s PDAC, ki so bili kirurško obravnavani. S tem smo pokazali potencial ZV kot dodatnih bioloških označevalcev za personalizirani pristop k zdravljenju bolnikov s PDAC.

Abstract

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the deadliest cancers. In our study, we wanted to evaluate the correlation between extracellular vesicles (EV) from blood plasma and the overall survival rate of patients with PDAC who were treated surgically.

Methods: The retrospective study included 32 subjects diagnosed with PDAC and treated surgically at the Clinical Department of Abdominal Surgery, UMC Ljubljana. For the study, we obtained clinical data, laboratory parameters, histopathologic evaluation, and blood plasma for each subject. EVs were isolated from blood plasma and characterized for their concentration and size.

Results: According to the type of surgery, the subjects were divided into two groups, i.e., those with tumour resection and those with exploration without resection. We showed that EVs in the blood plasma of subjects with exploration were significantly larger than EVs of patients with resection ($p < 0.05$). With the help of ROC analysis, we successfully determined the EV size cut-off value, which separated subjects according to the type of surgical treatment. At a cut-off value of 183.3 nm for mean EV size, sensitivity and specificity for resection prediction are 0.591 and 0.900, respectively, with area under the curve 0.77 (95% CI = 0.60–0.93, $p = 0.016$). Subjects with larger EVs had poorer overall survival ($p < 0.05$), whereas the survival of subjects with the average size or median size of EVs greater than the cut-off value had 13.8 months shorter overall survival ($p < 0.05$).

Conclusion: As part of the research, we demonstrated a correlation between EV size and the overall survival of patients with PDAC who were treated surgically. We thereby demonstrated the potential of EVs as additional biomarkers for a personalized approach to treating patients with PDAC.

1 Uvod

Duktalni adenokarcinom trebušne slinavke (*angl.* Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC), z globalno ocenjenim celokupnim 5-letnim preživetjem pod 10 %, je ena najbolj smrtonosnih bolezní. Predstavlja najpogostejšo vrsto raka trebušne slinavke, pri čemer so tumorji umeščeni v glavi (60–70 % tumorjev) ali v telesu in repu (20–25 %) trebušne slinavke, lahko pa so difuzni (10–20 %) (1). Glede na razširjenost PDAC le-tega opredelimo kot lokalizirani tumor (resektabilen, mejno resektabilen ali lokalno napredovani neresektabilen) ali kot bolezen z oddaljenimi zasevki (2). Kirurška odstranitev tumorja oz. resekcija predstavlja edino možnost ozdravitve PDAC (5-letno preživetje se dvigne do 20 %), pri čemer pri bolnikih z lokalno napredovalim tumorjem ali boleznijo z oddaljenimi zasevki kirurško zdravljenje ni več smiselno. Kot dopolnilo kirurškega zdravljenja resektabilnega PDAC se uporabljata sistemska kemoterapija in radioterapija, pri mejno resektabilnih tumorjih pa vse pogosteje tudi neoadjuvantna kemoterapija z namenom zmanjšati PDAC (3). Možnosti zdravljenja neresektabilne ali metastatske bolezní so omejene na sistemske kemoterapijo. V Sloveniji se PDAC po pogostosti uvršča na 11. mesto med vsemi tipi raka s povprečno letno incidenco 2,7 % in smrtnostjo 6,1 % glede na vse

tipe raka (4). Vzrok slabega preživetja bolnikov s PDAC je pozno odkritje bolezní in pomanjkanje učinkovitega zdravljenja. Številne raziskave se osredinjajo na iskanje novih zgodnjih bioloških označevalcev PDAC, vendar trenutno še brez uspeha (5). Do napredka je prišlo tudi pri optimizaciji kirurškega in (neo)adjuvantnega sistemskega zdravljenja (3,6), vendar se napoved izida v zadnjih letih ni bistveno izboljšala. V danih razmerah tako ni bioloških označevalcev, ki bi omogočili personalizirani pristop k zdravljenju PDAC in s tem izboljšali preživetje in/ali kakovost življenja bolnikov.

Anamneza in klinični pregled pri bolnikih s PDAC največkrat nista povedni, saj so simptomi zelo nespecifični. Krvne preiskave imajo prav tako omejeno klinično vrednost. Karbohidratni antigen 19-9 (CA19-9) in karcinoembrionalni antigen (CEA) sta najbolj razširjena tumorska označevalca za diagnozo in spremljanje bolnikov (napoved izida, spremljanje odgovora na zdravljenje) z rakom trebušne slinavke (2,7). CA19-9 je v primerjavi s CEA boljši diagnostični označevalec, kljub temu pa ima slabo specifičnost (negativno napovedno vrednost) in občutljivost (pozitivno napovedno vrednost) (2). Približno 30 % bolnikov s PDAC namreč nima povišanih vrednosti CA19-9, prav tako jih približno

60 % nima povišanih vrednosti CEA (7). Najpogosteje uporabljene slikovne metode za diagnosticiranje PDAC so ultrazvočni pregled trebuha, računalniška tomografija in magnetno resonančno slikanje (2). Histopatološka ocena je pomemben napovedni dejavnik. Diferenciacija tumorja se določi na podlagi meril Svetovne zdravstvene organizacije, ki upoštevajo prisotnost tubularnih ali solidnih struktur, mucina, jedrnih polimorfizmov in števila mitoz (8). Poleg tega se pri diagnosticiranju uveljavlja tudi tekočinska biopsija, ki pa v klinični praksi pri obravnavi rakavih bolezni, vključno s PDAC, še ni uveljavljen rutinski test (9).

Tekočinska biopsija je test, opravljen na vzorcih telesnih tekočin, z namenom ugotoviti prisotnost rakavih celic in molekul, ki jih rakave celice izločajo. Tumor namreč z apoptozo, nekrozo ali z aktivnim izločanjem v telesne tekočine izloča cirkulirajoče tumorske celice, cirkulirajočo tumorsko DNA in RNA ter zunajcelične vezikle (ZV) (8). Pomembno je, da te komponente zrcalijo genetiko/lastnosti celotnega tumorja, medtem ko klasična biopsija zrcali stanje v natančno določenem času in na mestu tumorja (9). V primerjavi s tradicionalno biopsijo je tekočinska biopsija sorazmerno neinvaziven poseg, ki omogoča pogostost analiz pri dolgoročnem spremljanju bolezni in zdravljenja (zgodnje diagnosticiranje, določanje izida, merjenje tumorskega bremena in minimalne rezidualne bolezni in odziva na zdravljenje) (9). Večinoma se za tekočinsko biopsijo uporablja kri, vendar so primerni tudi slina, urin, ascites, plevralni izliv in druge tekočine (10,11). Tekočinska biopsija je zelo obetaven način za obravnavo PDAC (12). Raziskave kažejo na velik potencial označevalcev za zgodnje odkrivanje PDAC, kot so nekodirajoče RNA (mikro RNA in dolga nekodirajoča RNA), genetski označevalci (*KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*), cirkulirajoča tumorska DNA in tudi ZV (13). ZV so na področju PDAC še zelo neraziskan, a bogat vir informacij (12).

ZV so sferični delci raznolikih velikosti (30–1000 nm), sestavljeni iz dvoslojne lipidne membrane, ki obdaja tekočo sredico z molekulami RNA, DNA, metaboliti in proteini (14). Iz celic se izločajo neprestano ali ob aktivaciji (npr. ob vnetju, hipoksiji ali stresu) in se kopičijo v vseh telesnih tekočinah. Predstavljajo pomemben del medcelične komunikacije, saj preko vezave ZV in/ali sprostitve tovora vplivajo na delovanje lokalnih ali oddaljenih tarčnih celic (15), tudi pri razvoju rakavih bolezni (16). ZV so prepoznali tudi kot nov vir bioloških označevalcev bolezni. ZV namreč odslikavajo lastnosti starševske celice, zato nam njihova analiza poda pomembno informacijo o spremembah v telesu (17). Različna patološka stanja, vključno z rakavo boleznijo, vplivajo na

spremembo velikosti in/ali koncentracije ZV in na njihovo molekularno sestavo (8). V študijah so pokazali, da vezikularna DNA (18), miRNA (19) in proteinski tvor (20) korelirajo s stadijem in preživetjem bolnikov s PDAC, prav tako pa so proučevali ZV kot tarčo zdravljenja (16). Predhodna raziskava je pokazala, da so ZV, izolirani iz krvne plazme bolnikov s PDAC, v povprečju večji v primerjavi s tistimi pri zdravih posameznikih. Višja koncentracija ZV v krvni plazmi je bila povezana z razsojem bolezni in s slabšim preživetjem (19). Velikost ZV naj bi bila povezana tudi z diferenciacijo tumorja, skupaj s koncentracijo ZV pa naj bi korelirala s preživetjem bolnikov s PDAC (21). Visoka koncentracija ZV ali po velikosti manjši ZV v krvni plazmi kažejo na krajši čas do ponovitve bolezni in/ali slabše skupno preživetje tudi pri raku debelega črevesa in danke (22). ZV bi lahko služili kot biološki označevalci za personalizirano zdravljenje bolnikov s PDAC.

Namen naše študije je bil na neodvisni kohorti testirati hipotezo, da sta koncentracija in velikost ZV, izoliranih iz krvne plazme, povezani s celokupnim preživetjem bolnikov s PDAC, ki so bili kirurško obravnavani. V posebnem delu študije smo dodatno preverili, ali se značilnosti ZV bolnikov z eksploracijo značilno razlikujejo od bolnikov z resekcijo.

2 Metode

2.1 Opis preiskovancev

V retrospektivno raziskavo smo vključili 32 preiskovancev s postavljeno diagnozo PDAC, ki so se od 8. 6. 2016 do 15. 12. 2017 kirurško obravnavali na Kliničnem oddelku za abdominalno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Vključitveni merili sta bili bolniki s PDAC, pri katerih je indicirano kirurško zdravljenje, in starost nad 18 let. Izključeni so bili bolniki, v preteklosti zdravljeni zaradi katere koli oblike raka ali zdravljeni z neoadjuvantno kemoterapijo, in tisti, ki niso sposobni razumeti pomena raziskave. Glede na oceno razširjenosti bolezni med operacijo je bila pri bolnikih opravljena kirurška resekcija (odstranitev tumorja) ali eksploracija brez resekcije. Diagnoza PDAC je bila potrjena s histopatološkim pregledom resecirane tkiva ali iz biopsije, vzete med eksploracijo. Vsi preiskovanci so bili vključeni v analizo. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije (št. 0120-155/2016-2), ki je sledila vsem zahtevanim zakonskim smernicam in predpisom. Vsi prostovoljci so bili seznanjeni z namenom in potekom raziskave in so podali pisno soglasje za sodelovanje v raziskavi.

Klinične podatke smo zbrali iz popisa bolnikov v informacijskem sistemu BIRPIS. Podatki so bili za vsakega preiskovanca zbrani pred in ob operaciji, celokupno preživetje pa je bilo določeno glede na čas od operacije do datuma smrti oz. do preverjanja življenjskega statusa (24. 6. 2021). Zbrani so bili naslednji podatki: spol, starost (leta) ob operaciji, vrednost ASA (*angl.* The American Society of Anesthesiologists Physical Status Classification System) pred operacijo, status kajenja, uživanje alkohola, indeks telesne mase (ITM) in radio-loška velikost tumorja. Laboratorijski izvidi pred operacijo so vključevali koncentracije: C-reaktivnega proteina (CRP), levkocitov (L), prokalcitonina (PCT), CA19-9 in CEA. Histopatološko poročilo je vsebovalo diferenciacijo tumorja, resekcijski rob, število pregledanih in število pozitivnih bezgavk. Manjkajoči podatki pri posameznih kategorijah so jasno označeni v **Tabeli 1**.

Vsakemu preiskovancu smo na dan operacije v epruvete, napršene z antikoagulantom etilendiamintetraocetno kislino, odvzeli vzorec periferne venske krvi. Najkasneje v roku 4 ur smo iz krvi z 10-minutnim centrifugiranjem pri $2500 \times g$ pridobili krvno plazmo, ki smo jo po 1,1 mL alikvotirali v ločene mikrocentrifugirke in shranili pri -80°C .

2.2 Izoliranje zunajceličnih veziklov iz krvne plazme

ZV smo iz plazme izolirali z metodo ultracentrifugiranja preko raztopine 20-odstotne saharoze (20 g saharoze, dH_2O do skupne postornine 100 mL), ki delce ločuje glede na velikost, obliko in gostoto delcev. Sledili smo protokolu, opisanemu v Holcar et al. (24). Po ultracentrifugiranju smo usedlino nežno resuspendirali v 50 μL fosfatnega pufra (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4 ; dH_2O do 1 L) in alikvote ZV do analize shranili pri -20°C . Za vsakega preiskovanca smo izvedli dve neodvisni osamitvi ZV iz istega vzorca plazme, ki sta predstavljali tehnični ponovitvi z različnima operaterjema. Vsem vzorcem plazme smo tudi spektrofotometrično določili stopnjo hemolize, kot je že bilo opisano (25). Vzorce plazme s koncentracijo hemoglobina več kot 0,1 g/L smo ocenili kot hemolizirane.

2.3 Določitev koncentracije in velikosti zunajceličnih veziklov z metodo sledenja nanodelcem (NTA)

Koncentracijo in velikost izoliranih ZV smo določili z metodo NTA (*angl.* Nanoparticle tracking analysis) z napravo Nanosight NS300 (laser z valovno dolžino

488 nm), ki je povezana z avtomatiziranim sistemom za vzorčenje (oboje Malvern Panalytical Ltd). Metoda NTA deluje po načelu optičnega zaznavanja gibanja nanodelcev (premera 50–1000 nm) v raztopini. Vzorce ZV smo redčili v fosfatnem pufru ($200\text{--}400 \times$) in jih posneli (5×60 s) pri stalnih nastavitvah kamere v dveh ponovitvah. Zbrane podatke smo analizirali s programom NanoSight NTA 3.3, pri čemer smo uporabili naslednje nastavitve: zaznavanje kamere 14, prag zaznavanja 5, viskoznost za vodo, temperatura 25°C , samodejno nastavitve za najmanjšo pričakovano velikost in zamegljenost ter 10 vidnih polj kot minimalno število, pri čemer se delec še upošteva za analizo. Končni rezultati so podani kot koncentracija ZV, tj. število delcev na mL plazme, in velikost ZV, izražena kot povprečna velikost, modus in mediana hidrodinamičnega premera v nm.

2.4 Encimskoimunski test (ELISA)

Za oceno prisotnosti lipoproteinov v vzorcih ZV smo določili koncentraciji ApoA1 in ApoB100 s testom ELISA. V ta namen smo ustrezno redčene vzorce ZV ($400\text{--}10.000 \times$) analizirali s komercialnima kompletoma Human Apolipoprotein A1 ELISAPRO (3710-1HP, Mabtech) in Human Apolipoprotein B ELISAPRO (3715-1HP, Mabtech), pri čemer smo sledili navodilom proizvajalca. Absorbanco smo izmerili s čitalcem mikrotitrskih plošč Sinergy 2 (Biotek). Vse meritve smo izvedli enkrat za posamezno osamitev vzorca, kar predstavlja dve tehnični ponovitvi z različnima operaterjema.

2.5 Statistična analiza

Vse statistične analize smo izvedli s programom IBM SPSS Statistics verzija 27.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Za opis zveznih spremenljivk smo določili mediano in interkvartilni razpon. Uporabili smo dvostranske statistične teste, pri čemer smo kot statistično značilne upoštevali vrednosti p pod 0,05. Preiskovance smo razdelili na dve skupini glede na vrsto kirurške obravnave (eksploracija ali resekcija). Za primerjavo med skupinami smo uporabili testa Fisher ali Mann-Whitney, korelacije med zveznimi spremenljivkami pa smo določili s Spearmanovim koeficientom s pripadajočimi 95-odstotnimi intervali zaupanja. Z analizo ROC (*angl.* Receiver Operating Characteristic) smo določili površino pod krivuljo, specifičnost in občutljivost s pripadajočimi 95-odstotnimi intervali zaupanja in mejne vrednosti, ki najbolje ločijo preiskovance glede na tip kirurške obravnave (vrednosti z najvišjo vsoto specifičnosti in občutljivosti). Z metodo Kaplan-Meier smo

Tabela 1: Opis kliničnih značilnosti vključenih bolnikov z duktalnim adenokarcinom trebušne slinavke (*angl.* Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC) (N = 32) in primerjava glede na tip kirurške obravnave: eksploracija vs. resekcija.

Klinična značilnost		Celotna skupina N = 32	Eksploracija N = 10	Resekcija N = 22	Vrednost <i>p</i> *
Spol	Moški, N (%)	20 (62,5)	7 (70,0)	13 (59,1)	0,703 ^a
	Ženski, N (%)	12 (37,5)	3 (30,0)	9 (40,9)	
Starost	Leta, mediana (25–75 %)	69 (62,3–78,5)	74 (62,8–80,5)	68 (60,8–76,3)	0,219 ^b
ASA	2, N (%)	10 (31,3)	2 (20,0)	8 (36,4)	0,440 ^a
	3, N (%)	22 (68,8)	8 (80,0)	14 (63,6)	
Kajenje	Ne, N (%)	13 (40,6)	5 (50,0)	8 (36,4)	0,699 ^a
	Da, N (%)	19 (59,4)	5 (50,0)	14 (63,6)	
Uživanje alkohola	Nikoli, N (%)	13 (41,9) [1]	6 (60,0)	7 (33,3) [1]	0,347 ^a
	Občasno, N (%)	15 (48,4)	3 (30,0)	12 (57,1)	
	Zmerno, N (%)	2 (9,7)	1 (10,0)	2 (9,5)	
ITM ob kirurški obravnavi	kg/m ² , mediana (25–75 %)	25,4 (22,4–28,1) [2]	25,9 (21,3–28,4)	25,4 (22,6–28,7) [2]	0,812 ^b
Radiološka velikost tumorja	mm, mediana (25–75 %)	28 (22–34,5) [8]	33,5 (27–37,3) [2]	25,5 (20–32,3) [6]	0,045^b
CRP	mg/L, mediana (25–75 %)	7 (5–23) [1]	5 (5–36)	9 (5–27,5) [1]	0,416 ^b
Levkociti	*10 ⁹ /L, mediana (25–75 %)	8,3 (6,1–9,2) [1]	7,9 (6,2–9,4)	8,7 (6–9,2) [1]	1,000 ^b
CA19-9	kU/L, mediana (25–75 %)	259,6 (92,8–1076,1) [8]	1639,4 (170,7–11536,6) [3]	227 (75,2–533,6) [5]	0,055 ^b
CEA	µg/L, mediana (25–75 %)	3,4 (2,4–6,8) [10]	5,1 (2,6–12,4) [4]	3,4 (2,1–5,9) [6]	0,294 ^b
Oddaljeni zasevki	Ne, N (%)	26 (86,7) [2]	5 (62,5) [2]	21 (95,5)	0,048 ^a
	Da, N (%)	4 (13,3)	3 (37,5)	1 (4,5)	
Diferenciacija tumorja	Slabo, N (%)	15 (46,9)	6 (60,0)	9 (40,9)	0,667 ^a
	Zmerno, N (%)	13 (40,6)	3 (30,0)	10 (45,5)	
	Dobro, N (%)	4 (12,5)	1 (10,0)	3 (13,6)	

Legenda: ASA – *angl.* The American Society of Anesthesiologists Physical Status Classification System; CRP – C-reaktivni protein; CA19-9 – karbohidratni antigen 19-9 (*angl.* Carbohydrate Antigen); CEA – karcinoembrionalni antigen (*angl.* Carcinoembryonic Antigen); ITM – indeks telesne mase.

[število manjkajočih podatkov pri posamezni kategoriji]

Primerjava eksploracija-resekcija: aFisherjev test, bMann-Whitney test.

*Vrednost *p* se nanaša na primerjavo med eksploracijo in resekcijo.

izračunali celokupni čas preživetja od operacije (definirano kot čas od operacije do datuma preverjanja življenjskega statusa) in čas spremljanja. S Coxovo regresijo smo izračunali vpliv spremenljivk na čas preživetja,

pri čemer smo določili razmerje ogroženosti (*angl.* hazard ratio, HR) s pripadajočimi 95-odstotnimi intervali zaupanja. V multivariatni Coxovi regresijski analizi smo preverili sočasni vpliv več spremenljivk. Klinične

Tabela 2: Vpliv preostanka ApoA in ApoB v izolatu na značilnosti zunajceličnih veziklov.

Značilnost ZV	ApoA Spearmanov koeficient (95 % interval zaupanja)	ApoB Spearmanov koeficient (95 % interval zaupanja)
Koncentracija ($N \times 10^9/\text{ml}$)	0,330 (-0,032–0,615) $p = 0,065$	0,500 (0,173–0,728) $p = 0,004$
Povprečna velikost (nm)	0,167 (-0,204–0,390) $p = 0,362$	-0,228 (-0,542–0,142) $p = 0,210$
Modus velikosti (nm)	0,037 (-0,179–0,495) $p = 0,842$	-0,334 (-0,618–0,028) $p = 0,062$
Mediana velikost (nm)	0,191 (-0,204–0,514) $p = 0,294$	-0,227 (-0,541–0,142) $p = 0,211$

Legenda: ZV – zunajcelični vezikli.

Vrednosti p so podane za korelacijo parametrov za posamezno osamitev zunajceličnih veziklov z vrednostmi ApoA in ApoB pri tej osamitvi.

dejavnike, povezane s preživetjem, smo izbrali z uporabo metode vnaprejšnje izbire (*angl.* stepwise forward conditional selection).

Glede na število preiskovancev, vključenih v posamezno skupino (eksploracija brez resekcije oz. resekcija), in razpršenost podatkov smo v naši raziskavi med skupinama lahko zaznali razlike v povprečni velikosti ZV $\pm 25,8$ nm in koncentraciji ZV $\pm 1,9 \times 10^9/\text{mL}$ z 80 % močjo. Za izračun smo uporabili program Power and Sample Size Calculation verzija 3.0. (23).

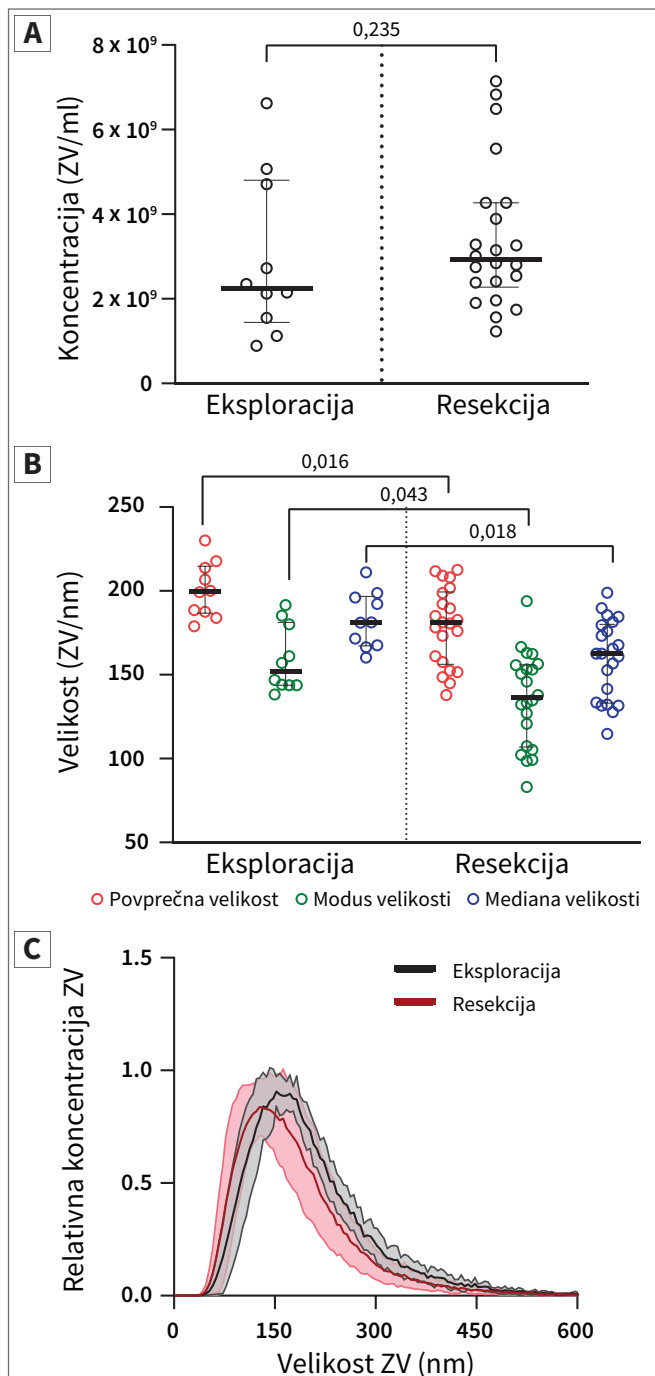
3 Rezultati

Značilnosti 32 vključenih preiskovancev so predstavljene v Tabeli 1. Pri večini kliničnih značilnosti ni bilo statistično značilnih razlik med bolniki s PDAC, ki so jim tumor odstranili (resekcija), in med tistimi, pri katerih tumor ni bil odstranjen (eksploracija brez resekcije). Bolniki z resekcijo so imeli v primerjavi z bolniki z eksploracijo značilno redkeje prisotne oddaljene zasevke ($p = 0,048$) in manjšo velikost tumorja glede na radiološko oceno ($p = 0,045$).

Za vsakega preiskovanca smo z metodo ultracentrifugiranja izvedli dve neodvisni osamitvi ZV iz iste krvne plazme ter z analizo NTA določili koncentracijo in velikost ZV. Ker sta koncentraciji in velikosti pri neodvisno opravljeni osamitvi ZV močno korelirali (pri vseh $p < 0,001$), smo izračunali povprečje izmerjenih značilnosti ZV in te vrednosti uporabili v vseh nadaljnjih analizah. Celotna skupina bolnikov je imela mediano koncentracije ZV $2,77 \times 10^9/\text{mL}$ (25–75 % = $2,00$ – $4,27 \times 10^9/\text{mL}$), povprečno velikost ZV 186,2 nm (25–75 % = 174,0–205,5 nm), modus velikosti ZV 144,9

nm (25–75 % = 128,3–160,0 nm) in mediano velikosti 167,6 nm (25–75 % = 153,7–183,8 nm). Spektrofotometrično smo dodatno določili hemolizo krvne plazme in s Spearmanovim koeficientom preverili povezavo s koncentracijo in velikostjo ZV. Pri 20 od 32 vzorcev plazme je bila prisotna hemoliza (vrednosti hemoglobina nad 0,1 g/L; mediana = 0,155 g/l; 25–75 % = 0,089–0,233 g/l), ki pa ni korelirala z značilnostmi ZV (pri vseh $p \gg 0,05$). Nadalje smo z metodo ELISA določili koncentracijo ApoA1 in ApoB100 v vzorcih ZV kot oceno prisotnosti lipoproteinskih nečistoč in s Spearmanovim koeficientom določili povezavo s koncentracijo in velikostjo ZV. Za koncentracijo ApoA1 (mediana = 405,8 ng/ml; 25–75 % = 191,5–1169,2 ng/ml) nismo pokazali korelacije z značilnostmi ZV ($p \gg 0,05$), med tem ko je koncentracija ApoB100 (mediana = 122,9 ng/ml; 25–75 % = 87,2–212,2 ng/ml) korelirala le s koncentracijo ZV ($p = 0,004$). Vrednosti Spearmanovega koeficienta z intervali zaupanja za posamezno značilnost ZV so predstavljene v Tabeli 2.

Nato smo primerjali značilnosti ZV med bolniki s PDAC z reseciranim tumorjem (resekcija) in tistimi, pri katerih tumor ni bil odstranjen (eksploracija brez resekcije) (Slika 1). Koncentracija ZV se med skupinama bolnikov ni značilno razlikovala ($p = 0,235$) (Slika 1A). Nasprotno pa so bili ZV bolnikov z eksploracijo statistično značilno večji od ZV bolnikov z resekcijo, pri čemer je bila povprečna velikost 199,7 nm v primerjavi s 180,9 nm ($p = 0,016$), modus velikosti 151,9 nm v primerjavi s 136,3 nm ($p = 0,043$), mediana velikosti pa 167,6 nm v primerjavi s 162,5 nm ($p = 0,018$) (Slika 1B). Porazdelitev velikosti ZV izoliranih iz krvne plazme bolnikov z eksploracijo ali z resekcijo tumorja je prikazana na Sliki 1C.



Slika 1: Grafični prikaz koncentracije in velikosti zunajceličnih veziklov, izoliranih iz krvne plazme kirurško obravnavanih bolnikov z duktalnim adenokarcinomom trebušne slinavke (*angl.* Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC). Graf prikazuje mediano in interkvartilni razpon (A) koncentracije in (B) povprečne velikosti, mediane velikosti in modusa velikosti zunajceličnih veziklov, ki smo jih osamili iz krvne plazme bolnikov z eksploracijo ali z resekcijo tumorja. Vsaka točka prikazuje povprečje vsaj 3 meritev enega vzorca. Primerjave med skupinama smo izvedli z Mann-Whitneyevim testom in vrednosti p na grafu prikazali nad črto. (C) Primerjava porazdelitve velikosti zunajceličnih veziklov, ki smo jih osamili iz krvne plazme bolnikov z eksploracijo ali z resekcijo tumorja.

Nadalje nas je zanimala povezava kliničnih značilnosti in značilnosti ZV iz krvne plazme s celokupnim preživetjem preiskovancev. Mediani čas preživetja preiskovancev od operacije je bil 12,4 (6,1–35,0) mesecev, čas spremljanja živih preiskovancev pa 47,2 (44,9–59,6) mesecev. Na datum preverjanja življenjskega statusa je bilo 7 (21,9 %) preiskovancev še živih. Glede na univariatno analizo je bilo slabše preživetje preiskovancev statistično značilno povezano z večjo radiološko določeno velikostjo tumorja (HR = 1,07; 95 % CI = 1,01–1,14; $p = 0,028$), višjim CRP (HR = 1,01; 95 % CI = 1,00–1,03; $p = 0,043$), višjim CEA (HR = 1,21; 95 % CI = 1,03–1,42; $p = 0,022$), višjim CA19-9 (HR = 1,00; 95 % CI = 1,00–1,00; $p = 0,038$) in eksplorativno operacijo brez resekcije (HR = 3,93; 95 % CI = 1,72–9,00; $p = 0,001$). Rezultati analize povezave med koncentracijo in velikostjo ZV iz krvne plazme in celokupnim preživetjem preiskovancev so predstavljeni v **Tabeli 3**. Preiskovanci z večjo povprečno velikostjo ($p = 0,005$), večjim modusom velikosti ($p = 0,002$) ali večjo mediano velikosti ($p = 0,002$) ZV so imeli slabše celokupno preživetje.

V eksplorativnem delu študije smo z analizo ROC ocenili mejne vrednosti velikosti ZV, ki najbolje ločijo preiskovance glede na tip kirurške obravnave, to je med eksploracijo in resekcijo (**Slika 2**). Pri mejni vrednosti 183,3 nm za povprečno velikost ZV je občutljivost za napoved resekcije 0,591 (interval zaupanja: 0,387–0,767) in specifičnost 0,900 (0,596–0,995), s površino pod krivuljo 0,77 (95 % CI = 0,60–0,93, $p = 0,016$). Pri mejni vrednosti 138,1 nm za modus velikosti ZV je občutljivost za napoved resekcije 0,545 (0,347–0,731) in specifičnost 1,000 (0,723–1,000), s površino pod krivuljo 0,73 (95 % CI = 0,55–0,90, $p = 0,042$). Pri mejni vrednosti 166,0 nm za mediano velikosti ZV je občutljivost za napoved resekcije 0,591 (0,387–0,767) in specifičnost 0,900 (0,596–0,955), s površino pod krivuljo 0,76 (95 % CI = 0,60–0,93, $p = 0,018$).

Nato smo preiskovance ločili na 2 skupini glede na mejne vrednosti značilnosti ZV, ki smo jih osamili iz krvne plazme (vrednosti pod ali nad mejno vrednostjo) in preverili povezavo s celokupnim preživetjem. Za vsako skupino smo določili tudi mediano preživetja preiskovancev (**Slika 3**). Preiskovanci s povprečno velikostjo ZV več kot 183,3 nm in preiskovanci z mediano velikosti ZV več kot 166,0 nm so imeli slabše celokupno preživetje (6,6 (3,7–10,4) mesecev v primerjavi z 20,4 (17,8–) meseci) (HR = 3,98; 95 % CI = 1,72–9,17; $p = 0,001$).

Dodatno smo preverili povezave značilnosti ZV s celokupnim preživetjem z multivariatno Coxovo regresijsko analizo, pri kateri je bila opravljena resekcija tumorja edini klinični parameter, značilno povezan s

Tabela 3: Povezava značilnosti zunajceličnih veziklov iz krvne plazme s časom preživetja od operacije.

Značilnosti ZV	HR (95 % CI)	Vrednost p^*	HR (95 % CI) _{adj}	Vrednost p_{adj}^{**}
Koncentracija ($N \times 10^9/mL$)	1,00 (1,00–1,00)	0,335	1,00 (1,00–1,00)	0,862
Povprečna velikost (nm)	1,03 (1,01–1,05)	0,005	1,03 (1,00–1,05)	0,018
Modus velikosti (nm)	1,03 (1,01–1,05)	0,002	1,03 (1,01–1,06)	0,010
Mediana velikost (nm)	1,03 (1,01–1,06)	0,002	1,03 (1,01–1,05)	0,008

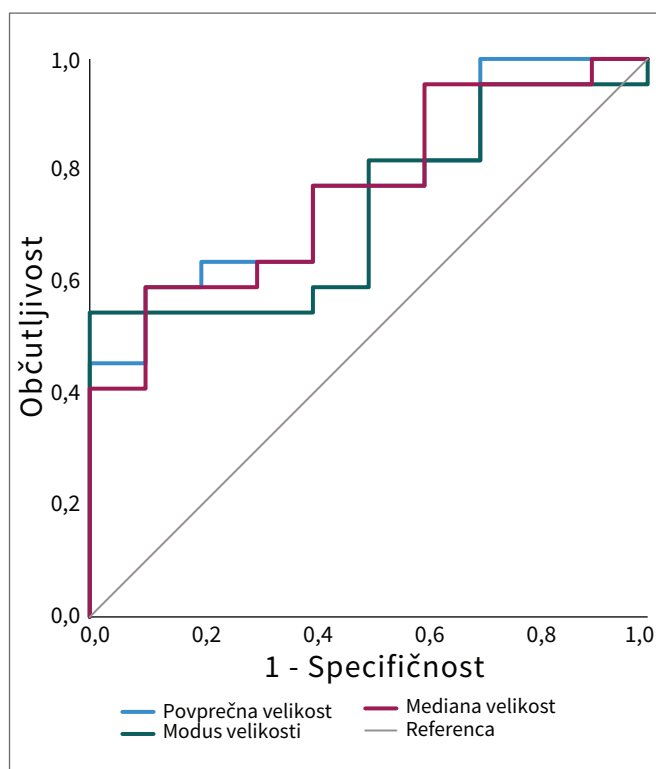
Legenda:

ZV – zunajcelični vezikli.

*Primerjava glede na čas preživetja: Coxova regresija.

**Adj: prilagoditev za vrsto operacije.

preživetjem bolnikov s PDAC po kirurškem zdravljenju. Po prilagoditvi modela glede na vrsto operacije je velikost ostala statistično značilno povezana s celokupnim preživetjem (povprečna velikost: $p = 0,018$, modus velikosti: $p = 0,010$, mediana velikosti: $p = 0,008$). Prav tako se je ohranila statistično značilna povezava s slabšim preživetjem pri preiskovancih s povprečno velikostjo ali mediano velikosti ZV, večjo od mejne vrednosti (HR = 2,95; 95 % CI = 1,18–7,39; $p = 0,021$).

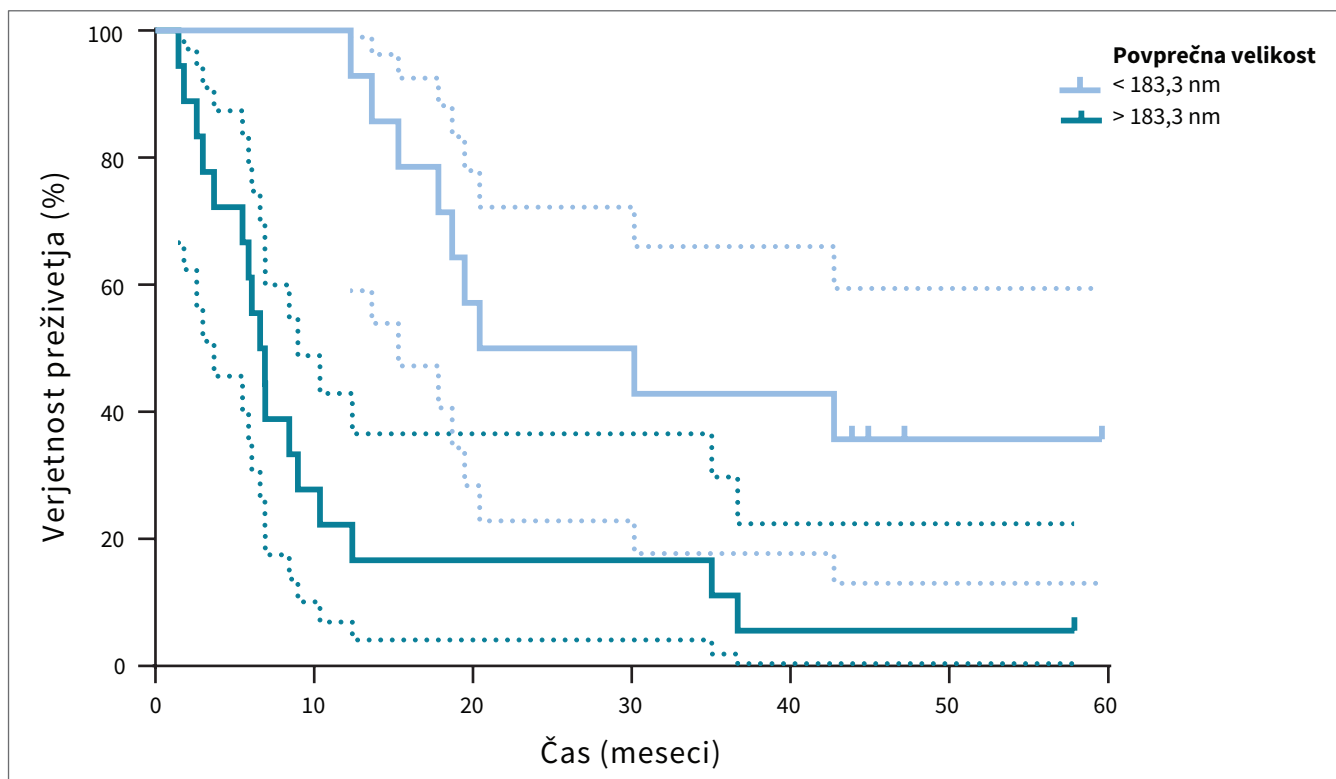


Slika 2: Grafični prikaz analize ROC (angl. Receiver Operating Characteristic) za določitev mejnih vrednosti velikosti zunajceličnih veziklov iz krvne plazme, ki najbolje ločijo preiskovance glede na tip kirurške obravnave.

4 Razprava

V raziskavo smo vključili 32 preiskovancev s postavljeno diagnozo PDAC, ki smo jih glede na tip kirurške obravnave razdelili na skupino z opravljeno resekcijo tumorja in skupino z opravljeno eksploracijo brez resekcije. Skupini sta se v kliničnih značilnostih značilno razlikovali le v radiološki velikosti tumorja in razširjenosti bolezni, ki sta (pričakovano) pomembna dejavnika za določitev tipa kirurške obravnave. Pokazali smo, da so ZV v krvni plazmi bolnikov z eksploracijo statistično značilno večji od ZV bolnikov z resekcijo. S pomočjo analize ROC smo tudi določili mejne vrednosti velikosti ZV, ki so ločile preiskovance glede na tip kirurške obravnave. Pokazali smo, da so imeli preiskovanci z večjimi ZV značilno slabše celokupno preživetje. Preiskovanci s povprečno velikostjo ZV več kot 183,3 nm in mediano velikosti ZV več kot 166,0 nm so imeli za 13,8 mesecev slabše celokupno preživetje.

V raziskavi smo z metodo ultracentrifugiranja iz krvne plazme osamili ZV s povprečno velikostjo 186,2 (174,0–205,5) nm; modusom velikosti 144,9 (128,3–160,0) nm in mediano velikosti 167,6 (153,7–183,8) nm. Koncentracija veziklov je bila 2,77 (2,00–4,27) $\times 10^9/mL$. V primerjavi z rezultati raziskave Badovinac et al. (21) so naše vrednosti velikosti ZV podobne vrednostim ZV bolnikov pred operacijo, koncentracija pa se razlikuje za 10-krat. Po natančnem pregledu se je izkazalo, da je razlika v koncentraciji le posledica neupoštevanja redčenja pri študiji Badovinac et al. (21). Naši rezultati koncentracije ZV se ujemajo tudi z rezultati koncentracije ZV pri bolnikih pred operacijo v študiji Allenson et al. (18). Pokazali smo, da so ZV v krvni plazmi bolnikov z eksploracijo značilno večji od ZV bolnikov z resekcijo, kar je v nasprotju s študijo Badovinac et al. (21), se pa ujema s študijo Allenson et al. (18). V tej raziskavi so pokazali, da so večji ZV značilni za razširjeno bolezen (18).



Slika 3: Grafični prikaz analize preživetja bolnikov z duktalnim adenokarcinom trebušne slinavke (*angl.* Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC) po kirurškem zdravljenju, ločenih glede na mejno vrednost za povprečno velikost zunajceličnih veziklov iz krvne plazme.

Osebe, ki so bile v času analize še žive, so bile krnjene na datum preverjanja življenjskega statusa (24. 6. 2021); na krivulji je to označeno z navpično črto. Črtkane črte predstavljajo 95-odstotni interval zaupanja.

Z analizo ROC določene mejne vrednosti povprečne velikosti, modusa velikosti in mediane velikosti ZV, ki najbolje ločijo preiskovance glede na tip kirurške obravnave (glej Metode), imajo visoko specifičnost (0,9–1,0) in nižjo občutljivost (0,545–0,591) za napoved resekcije. Z veliko gotovostjo torej lahko pri bolnikih z manjšimi vezikli pred operacijo napovemo možnost resekcije tumorja, ne moremo pa napovedati odvečnosti operacije pri bolnikih z večjimi vezikli, saj občutljivost ni zadosti visoka. Tako bi bilo potrebno za napovedovanje primernosti kirurškega zdravljenja z resekcijo uporabiti kakšen dodatni biološki označevalec oz. klinični dejavnik, s čimer bi izboljšali občutljivost. Bolnikom, ki imajo nizko verjetnost za kirurško resekcijo tumorja, bi s tem prihranili odprto operacijo in se najprej poslužili manj invazivnih pristopov (npr. laparoskopije za biopsijo tumorja in oceno razširjenosti bolezni) oz. takojšnjega sistemskega zdravljenja.

Pri naši skupini bolnikov koncentracija ZV ni statistično korelirala s slabšim celokupnim preživetjem, kar je v nasprotju s študijama Allenson et al. (18) in Badovinac et al. (21), ki sta pokazali povezavo med višjo koncentracijo ZV in slabšim preživetjem. Smo pa pokazali, da

imajo posamezniki z višjo povprečno velikostjo, večjim modusom velikosti in večjo mediano velikosti ZV slabše celokupno preživetje. Badovinac et al. so podobno ugotovili, da manjša razlika v velikosti ZV pred in po operaciji napoveduje slabše celokupno preživetje. Te povezave pa niso pokazali, kadar so upoštevali le velikost ZV pred operacijo (21). Ker je bila naša raziskava retrospektivna, nismo mogli ovrednotiti razlike med značilnostmi ZV pred in po operaciji. Prav tako so bili v študiji Badovinac et al. s preživetjem povezani še drugi klinični dejavniki (21), za našo kohorto pa žal nismo imeli dostopa do teh podatkov. Kljub temu smo v eksplorativnem delu pokazali, da je bila velikost ZV povezana s preživetjem tudi po prilagoditvi glede na vrsto operacije. Resekcija tumorja je bila v naši študiji izmed proučevanih kliničnih značilnosti povezana s preživetjem kirurško obravnavanih bolnikov s PDAC, kar je pričakovano, saj je odstranitev tumorja mogoča le, kadar je le-ta lokaliziran in brez oddaljenih zasevkov.

ZV so se izkazali kot pomemben napovedni dejavnik pri mnogih tipih raka. Višja koncentracija ZV oz. manjše velikosti ZV sta bili povezani s krajšim časom

do ponovitve bolezni ali slabšim celokupnim preživetjem pri raku prostate, raku pljuč, kolorektalnem raku in raku požiralnika (22,26-28). Pri raku dojke so pokazali, da je koncentracija ZV 40-krat višja kot pri zdravih posameznikih. Višja koncentracija ZV je bila povezana s slabšim odzivom na zdravljenje ter krajšim časom do ponovitve bolezni in s slabšim celokupnim preživetjem (29). Večji ZV so bili pri raku prostate povezani z metastatsko boleznijo (30). Koncentracija ZV je bila višja pri bolnikih z gliomom v primerjavi z zdravimi posamezniki, po kirurškem zdravljenju pa se je zmanjšala (31). Podobno kot v naši študiji je večja velikost ZV povezana s slabšim celokupnim preživetjem pri raku dojke (29). Iz naših ugotovitev sledi, da bi lahko na podlagi predoperativne velikosti ZV sklepali o preživetju bolnikov, kar bi pomembno prispevalo k personaliziranemu pristopu k zdravljenju bolnikov s PDAC.

Prednost naše raziskave je, da so bili bolniki vodeni v enem centru, obravnavani po istih protokolih in dobro klinično opredeljeni. Slabosti naše raziskave sta bili predvsem majhen vzorec bolnikov in analiza bolnikov samo v eni časovni točki. Za dodatno validacijo ugotovitev, da lahko na podlagi velikosti ZV ločimo med skupino bolnikov z resekcijo in eksploracijo, ter da je le-ta povezana s celokupnim preživetjem bolnikov, bi bilo smiselno izvesti longitudinalno študijo na večji skupini bolnikov in spremljati spremembe v koncentraciji in velikosti ZV glede na potek bolezni. Zaradi majhnega števila preiskovancev so rezultati eksploracijskega dela manj zanesljivi in bi jih bilo potrebno potrditi na večji skupini bolnikov.

Malo verjetno je, da bi značilnosti ZV lahko služile kot samostojen biološki označevalec, zato bi bilo potrebno v prihodnje ovrednotiti pomen značilnosti ZV za napovedovanje izida in načrtovanje zdravljenja PDAC tudi v kombinaciji z drugimi biološkimi označevalci in kliničnimi značilnostmi.

5 Zaključek

V sklopu raziskave smo pokazali povezavo med velikostjo ZV in celokupnim preživetjem bolnikov s PDAC, ki so bili kirurško obravnavani. S tem smo pokazali potencial ZV kot dodatnih bioloških označevalcev za personalizirani pristop k zdravljenju PDAC. Naše ugotovitve bi bilo potrebno potrditi v okviru longitudinalne študije, v kateri bi spremljali spremembe v koncentraciji in velikosti ZV v krvni plazmi kirurško obravnavanih bolnikov s PDAC glede na potek bolezni.

Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

Viri financiranja

Raziskavo je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS (ARRS) iz programa P1-170 in projekta J3-3068.

Uredniški komentar

Članek je nastal na podlagi nagrajene študentske Prešernove raziskovalne naloge v letu 2020/2021.

Literatura

- Gupta N, Yelamanchi R. Pancreatic adenocarcinoma: A review of recent paradigms and advances in epidemiology, clinical diagnosis and management. *World J Gastroenterol.* 2021;27(23):3158-81. DOI: [10.3748/wjg.v27.i23.3158](https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i23.3158) PMID: [34163104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34163104/)
- Li X, Xu H, Li C, Qiao G, Farooqi AA, Gedanken A, et al. Pancreatic cancer. *Front Pharmacol.* 2019;10(6):319-26. DOI: [10.3389/fphar.2019.00319](https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00319) PMID: [31001120](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31001120/)
- Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al.; ESMO Guidelines Committee. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26:v56-68. DOI: [10.1093/annonc/mdv295](https://doi.org/10.1093/annonc/mdv295) PMID: [26314780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26314780/)
- Zadnik V, Primic Zakelj M, Lokar K, Jarm K, Ivanus U, Zagar T. Cancer burden in slovenia with the time trends analysis. *Radiol Oncol.* 2017;51(1):47-55. DOI: [10.1515/raon-2017-0008](https://doi.org/10.1515/raon-2017-0008) PMID: [28265232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28265232/)
- Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. Early Detection of Pancreatic Cancer: opportunities and Challenges. *Gastroenterology.* 2019;156(7):2024-40. DOI: [10.1053/j.gastro.2019.01.259](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.259) PMID: [30721664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30721664/)
- Hackert T, Ulrich A, Büchler MW. Borderline resectable pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2016;375(2):231-7. DOI: [10.1016/j.canlet.2016.02.039](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.039) PMID: [26970276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26970276/)
- Distler M, Pilarsky E, Kersting S, Grützmann R. Preoperative CEA and CA 19-9 are prognostic markers for survival after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas - a retrospective tumor marker prognostic study. *Int J Surg.* 2013;11(10):1067-72. DOI: [10.1016/j.ijssu.2013.10.005](https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2013.10.005) PMID: [24161419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24161419/)
- Vasconcelos MH, Caires HR, Ábols A, Xavier CP, Linê A. Extracellular vesicles as a novel source of biomarkers in liquid biopsies for monitoring cancer progression and drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2019;47:100647. DOI: [10.1016/j.drug.2019.100647](https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100647) PMID: [31704541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31704541/)
- Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol.* 2018;10:1758835918794630. DOI: [10.1177/1758835918794630](https://doi.org/10.1177/1758835918794630) PMID: [30181785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30181785/)
- Lee JS, Hur JY, Kim IA, Kim HJ, Choi CM, Lee JC, et al. Liquid biopsy using the supernatant of a pleural effusion for EGFR genotyping in pulmonary adenocarcinoma patients: a comparison between cell-free DNA and extracellular vesicle-derived DNA. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1236. DOI: [10.1186/s12885-018-5138-3](https://doi.org/10.1186/s12885-018-5138-3) PMID: [30526536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30526536/)

11. Mari R, Mamessier E, Lambaudie E, Provansal M, Birnbaum D, Bertucci F, et al. Liquid Biopsies for Ovarian Carcinoma: How Blood Tests May Improve the Clinical Management of a Deadly Disease. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):774. DOI: [10.3390/cancers11060774](https://doi.org/10.3390/cancers11060774) PMID: 31167492
12. Heredia-Soto V, Rodríguez-Salas N, Feliu J. Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer: Are We Ready to Apply It in the Clinical Practice? *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1986. DOI: [10.3390/cancers13081986](https://doi.org/10.3390/cancers13081986) PMID: 33924143
13. Wang S, Zheng Y, Yang F, Zhu L, Zhu XQ, Wang ZF, et al. The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):249. DOI: [10.1038/s41392-021-00659-4](https://doi.org/10.1038/s41392-021-00659-4) PMID: 34219130
14. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Andresen TL, Simonsen JB. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1871(1):109-16. DOI: [10.1016/j.bbcan.2018.11.006](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.11.006) PMID: 30528756
15. Simeone P, Bologna G, Lanuti P, Pierdomenico L, Guagnano MT, Pieragostino D, et al. Extracellular Vesicles as Signaling Mediators and Disease Biomarkers across Biological Barriers. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2514. DOI: [10.3390/ijms21072514](https://doi.org/10.3390/ijms21072514) PMID: 32260425
16. Massoumi RL, Hines OJ, Eibl G, King JC. Emerging Evidence for the Clinical Relevance of Pancreatic Cancer Exosomes. *Pancreas*. 2019;48(1):1-8. DOI: [10.1097/MPA.0000000000001203](https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001203) PMID: 30531240
17. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015;65(8):783-97. DOI: [10.1093/biosci/biv084](https://doi.org/10.1093/biosci/biv084) PMID: 26955082
18. Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(4):741-7. DOI: [10.1093/annonc/mdx004](https://doi.org/10.1093/annonc/mdx004) PMID: 28104621
19. 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. DOI: [10.1016/j.canlet.2017.02.019](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.019) PMID: 28232049
20. Buscail E, Alix-Panabières C, Quincy P, Cauvin T, Chauvet A, Degrandi O, et al. High Clinical Value of Liquid Biopsy to Detect Circulating Tumor Cells and Tumor Exosomes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients Eligible for Up-Front Surgery. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1656. DOI: [10.3390/cancers11111656](https://doi.org/10.3390/cancers11111656) PMID: 31717747
21. Badovinac D, Goričar K, Zavrtnik H, Petrič M, Lavrin T, Mavec N, et al. Plasma Extracellular Vesicle Characteristics Correlate with Tumor Differentiation and Predict Overall Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoing Surgery with Curative Intent. *J Pers Med*. 2021;11(2):77. DOI: [10.3390/jpm11020077](https://doi.org/10.3390/jpm11020077) PMID: 33525618
22. Silva J, Garcia V, Rodriguez M, Compte M, Cisneros E, Veguillas P, et al. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(4):409-18. DOI: [10.1002/gcc.21926](https://doi.org/10.1002/gcc.21926) PMID: 22420032
23. Dupont WD, Plummer WD. Power and sample size calculations. A review and computer program. *Control Clin Trials*. 1990;11(2):116-28. DOI: [10.1016/0197-2456\(90\)90005-M](https://doi.org/10.1016/0197-2456(90)90005-M) PMID: 2161310
24. Holcar M, Ferdin J, Sitar S, Tušek-Žnidarič M, Dolžan V, Plemenitaš A, et al. Enrichment of plasma extracellular vesicles for reliable quantification of their size and concentration for biomarker discovery. *Sci Rep*. 2020;10(1):21346. DOI: [10.1038/s41598-020-78422-y](https://doi.org/10.1038/s41598-020-78422-y) PMID: 33288809
25. Han V, Serrano K, Devine DV. A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. *Vox Sang*. 2010;98(2):116-23. DOI: [10.1111/j.1423-0410.2009.01249.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01249.x) PMID: 19719459
26. Navarro A, Molins L, Marrades RM, Moises J, Viñolas N, Morales S, et al. Exosome Analysis in Tumor-Draining Pulmonary Vein Identifies NSCLC Patients with Higher Risk of Relapse after Curative Surgery. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2):E249. DOI: [10.3390/cancers11020249](https://doi.org/10.3390/cancers11020249) PMID: 30795562
27. Helley D, Banu E, Bouziane A, Banu A, Scotte F, Fischer AM, et al. Platelet microparticles: a potential predictive factor of survival in hormone-refractory prostate cancer patients treated with docetaxel-based chemotherapy. *Eur Urol*. 2009;56(3):479-84. DOI: [10.1016/j.eururo.2008.06.038](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.06.038) PMID: 18585841
28. Matsumoto Y, Kano M, Akutsu Y, Hanari N, Hoshino I, Murakami K, et al. Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2016;36(5):2535-43. DOI: [10.3892/or.2016.5066](https://doi.org/10.3892/or.2016.5066) PMID: 27599779
29. König L, Kasimir-Bauer S, Bittner AK, Hoffmann O, Wagner B, Santos Manweiler LF, et al. Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Immunology*. 2017;7(1):e1376153. DOI: [10.1080/2162402X.2017.1376153](https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1376153) PMID: 29296534
30. Coumans FA, Doggen CJ, Attard G, de Bono JS, Terstappen LW. All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*. 2010;21(9):1851-7. DOI: [10.1093/annonc/mdq030](https://doi.org/10.1093/annonc/mdq030) PMID: 20147742
31. Osti D, Del Bene M, Rappa G, Santos M, Matafora V, Richichi C, et al. Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res*. 2019;25(1):266-76. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-18-1941](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1941) PMID: 30287549