

Změny hladin cirkulujících mikroRNA u pacientů s nádory jater podstupujících termální ablací a transarteriální chemoembolizaci

Dynamic Changes in Circulating MicroRNA Levels in Liver Cancer Patients Undergoing Thermal Ablation and Transarterial Chemoembolization

Zavadil J.¹, Juráček J.², Čechová B.², Andrašina T.¹, Slabý O.², Goldberg N.³

¹ Klinika radiologie a nukleární medicíny LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

³ Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston

Souhrn

Východiska: Pacienti s primárními a sekundárními nádory jater, kteří nemohou nebo nechťejí podstoupit chirurgickou terapii, jsou možnými kandidáty pro použití metod intervenční radiologie – transarteriální chemoembolizace (TACE) či termální ablace (TA). Obě metody způsobují charakteristické změny v jaterní tkáni (zánět, hypoxie, zvýšená teplota, destrukce tkáně), které jsou navíc doprovázeny systémovou sekrecí cytokinů nebo mikroRNA (miRNA). Cílem studie bylo proto sledování dynamiky změn v hladinách cirkulujících miRNA asociovaných s hypoxií (miRNA-21, miRNA-210), poškozením jater (miRNA-122) a epitelálně-mezenchymální transicí (miRNA-200a) u pacientů podstupujících TA a TACE a zhodnocení závislosti těchto změn na systémovém účinku intervenčních zákroků. **Materiál a metody:** Do studie bylo zařazeno 10 pacientů s primárním hepatocelulárním karcinomem, léčených TACE, a 10 pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem lokalizovaným v játrech, léčených TA. TA byla provedena za použití radiofrekvenčního nebo mikrovlnného generátoru (RITA, Microsulis, AngioDynamics, Inc), pro TACE byly použity embolizační částice s navázaným doxorubicinem (DCBeads, Bio-Compatibles Ltd.). Zhodnocení nádorového onemocnění bylo provedeno pomocí RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours), mRECIST (modified RECIST) kritérií a volumetrie. Koncentrace miRNA byly u každého pacienta měřeny ve čtyřech časových odběrech (před zákrokem, ihned po něm a s odstupem 24 hod a 1 týdne) pomocí miRNA specifických TaqMan® Assays a metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce. **Výsledky:** V rámci studie byla pozorována změna hladin sledovaných miRNA u všech intervencí. U TA došlo ke statisticky významnému vzestupu hladiny miR-122 a miR-200a ihned po zákroku, zatímco u TACE byl pozorován významný nárůst cirkulujících miRNA až 24 hod po intervenci (miR-21, miR-210, miR-122, miR-200a). U obou metod následoval po iniciálním vzestupu postupný pokles hladin miRNA na původní hladinu. Zjištěné změny dynamiky hladin cirkulujících miRNA odpovídají předpokládanému biologickému efektu TA a TACE a jejich odlišnému působení na nádorovou tkáň. **Závěr:** Výsledky pilotní studie poukazují na potenciální využití cirkulujících miRNA pro monitorování systémového efektu TA a TACE.

Klíčová slova

mikroRNA – intervenční radiologie – hepatocelulární karcinom – kolorektální – novotvary

Tato práce vznikla na Masarykově univerzitě v rámci projektu MUNI/A/1574/2018 a dále byla podpořena Ministerstvem zdravotnictví České republiky, granty č. 15-32484A, 16-31765A a 16-31314A.

This work was created at Masaryk University as part of the project MUNI/A/1574/2018 and it was supported by Czech Ministry of Health grants No. 15-32484A, 16-31765A and 16-31314A.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Jan Zavadil

Klinika radiologie a nukleární medicíny
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
email: zavadil.jan@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 1. 3. 2019

Přijato/Accepted: 4. 3. 2019

Summary

Background: Hepatic cancer patients who cannot undergo surgical resection of tumour are candidates for methods of interventional radiology – transarterial chemoembolization (TACE) or thermal ablative (TA) therapy. Both methods are causing characteristic changes in liver tissue (inflammatory immune response, hypoxia, elevated temperature, tissue destruction) which are accompanied with systemic secretion of cytokines or microRNAs (miRNAs). The aim of our study was to investigate whether the level of circulating miRNAs related to hypoxia (miR-21 and miR-210), liver injury (miR-122) and epithelial-mesenchymal transition (miR-200a) could reflect systemic effect of these intervention techniques. **Materials and methods:** Study consisted of 10 primary hepatocellular carcinoma patients treated with TACE and 10 patients with liver metastases of colorectal cancer treated with TA. Thermal ablation was performed using the radiofrequency or microwave generator (RITA, Microsulis, AngioDynamics, Inc), for TACE drug eluting beads (DCBeads, Biocompatibles Ltd.) were used. Tumours were evaluated using RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours), mRECIST (modified RECIST) criterion and volumetry. For all patients we determined concentrations of miRNA in blood plasma samples from four time points (before intervention, immediately after intervention, 24 hours after intervention, 1 week after intervention) using TaqMan® Assays and quantitative real time polymerase chain reaction method. **Results:** After both intervention techniques we observed changes in circulating miRNA levels. In TA cases we observed significant increase of miR-122 and miR-200a concentrations immediately after intervention, on the contrary in TACE we observed increase in miRNA concentration at time point 24 hours after intervention (miR-21, miR-210, miR-122, miR-200a). Increased concentration of circulating miRNA was followed by subsequent decline to initial level. These changes were consistent with presumed biological effect of TA and TACE on tumour tissue. **Conclusion:** Data of this pilot study show potential usage of circulating miRNA for monitoring of systemic effect of thermal ablative and intraarterial therapies.

Key words

microRNA – interventional radiology – hepatocellular carcinoma – colorectal – neoplasms

Východiska

Maligní nádory jater jsou kvůli svému často agresivnímu chování a rezistenci ke konvenční terapii celosvětově druhou nejčastější příčinou smrti u mužů a šestou u žen. V roce 2016 bylo v ČR nově diagnostikováno 918 případů primárních nádorů jater, nicméně největší skupinu tvoří sekundární tumory jater (60–80 %). Nejčastěji se jedná o metastázy kolorektálního karcinomu, nádorů prsu či neuroendokrinních tumorů [1]. Základní terapeutickou možností u ložiskových procesů jater představuje chirurgická resekce, avšak většina pacientů s jaterními nádory je diagnostikována ve středním a pokročilém stadiu, které už není resekovatelné kvůli rozsahu, prorůstání do cév či okolí jater, celkovému špatnému stavu pacienta a funkci jater. Jednou z možností terapie jsou metody intervenční radiologie, jako je termální ablace (TA) nebo transarteriální chemoembolizace (TACE). TA je založena na lokálním zahřátí tkáně, které vede k destrukci nádorové tkáně. Naproti tomu TACE kombinuje efekt lokální ischemie a chemoterapie při selektivní obstrukci arteriálního zásobení nádoru. Úspěšnost intervenčních zákroků závisí nejen na biologické povaze, velikosti nádoru, technickém provedení a reakci organismu, ale také na molekulárních změnách spojených s těmito procedurami. Obě metody jsou totiž spojeny s cha-

rakteristickými změnami v destruované nádorové tkáni, zejména se jedná o závažné změny, hypoxii, apoptózu a elevaci teploty [2,3] doprovázené systémovou sekrecí cytokinů, růstových faktorů nebo mikroRNA (miRNA) do krevního řečiště [4,5].

MiRNA jsou nekódující jednořetězcové RNA dlouhé přibližně 21–23 nukleotidů, které posttranskripčně regulují expresi až poloviny lidských protein-kódujících genů. Díky tomu se podílí na důležitých biologických procesech, ale jsou také zapojeny do rozvoje mnoha onemocnění vč. těch nádorových. Změny v expresních profilech miRNA byly kromě nádorové tkáně pozorovány také v tělních tekutinách, kde mohou odrážet některé vlastnosti tumoru nebo průběh onemocnění. Některé studie popisují také významnou úlohu miRNA v mezibuněčné komunikaci. Příkladem může být sekrece miRNA v důsledku hypoxie vyvolané TACE vedoucí ke zvýšené angiogenezi, která hraje důležitou roli ve vzniku lokálních recidiv a metastazování HCC [6]. Stejně tak mohou být miRNA sekretovány jako odpověď na termální poškození tkáně, což může souviset s vyšším výskytem nových intrahepatických ložisek u pacientů léčených TA ve srovnání s chirurgickou resekci (až o 25–39 %) [7]. Dosud byla hladina některých miRNA asociována s prognózou a léčebnou odpovědí u pacientů

léčených TACE [8], popř. byla popsána změna hladiny konkrétních miRNA související s účinností léčby [9]. Klinický výstup u pacientů podstupujících TA i TACE se výrazně liší a je těžké ho předpovědět. Citlivé a specifické biomarkery pro predikci léčebné odpovědi by proto mohly zefektivnit výběr a nastavení terapie. Vhodnými kandidáty pro tyto biomarkery by mohly být právě cirkulující miRNA.

Materiál a metody

Do prospektivní studie bylo zařazeno celkem 20 pacientů léčených na Klinice radiologie a nukleární medicíny Fakultní nemocnice Brno. Z tohoto počtu bylo 10 pacientů diagnostikováno s primárním hepatocelulárním karcinomem (léčebná modalita TACE) a 10 pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem lokalizovaným v játrech (léčba TA). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Pro TA byl použit radiofrekvenční nebo mikrovlnný generátor (RITA, Microsulis, AngioDynamics, Inc), TACE byla provedena za použití embolizačních částic s navázaným doxorubicinem (DCBeads, Biocompatibles Ltd.). Koncentrace miRNA byly u každého pacienta stanoveny ve čtyřech sériových vzorcích krevní plazmy odebraných v různých časových intervalech (před zákrokem, ihned po něm a s odstupem 24 hod a 1 týden). Vzorky plné krve byly

odebrány za použití odběrových zkumavek S-Monovette® 9 ml K3E (Sarstedt, Německo), krevní plazma byla poté získána centrifugací (1 000 g / 10 min / 4 °C). Celková RNA obohacená o frakci krátkých RNA byla izolována za použití miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Hladina jednotlivých miRNA byla stanovena pomocí specifických TaqMan® MicroRNA Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) a metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce (quantitative real time polymerase chain reaction – qRT-PCR) v souladu s protokolem výrobce. Absolutní koncentrace byla získána za použití syntetických miRNA oligonukleotidů (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, Iowa, USA), které byly sériově ředěny a analyzovány paralelně se vzorky pacientů. Ct (cycle of threshold) hodnoty biologických vzorků byly na základě příslušných kalibračních křivek převedeny na koncentraci miRNA. Změna hladiny miRNA mezi sledovanými časovými úseky byla hodnocena pomocí Mannova-Whitneyho U testu.

Výsledky

Za účelem sledování změn v dynamice hladin cirkulujících miRNA v závislosti na provedeném výkonu TA nebo TACE jsme analyzovali hladiny miRNA asociovaných s hypoxií (miRNA-21 a miRNA-210), s poškozením jaterní tkáně (miRNA-122) a epiteliálně-mezenchymální tranzicí (miRNA-200a). U TA byl pozorován signifikantní nárůst hladin zkoumaných miRNA ihned po zákroku (miR-122, $p = 0,0059$; miR-200a, $p = 0,002$). U TACE byl vzestup hladin cirkulujících miRNA pozorován až v čase 24 hod po intervenci (miR-21, $p = 0,002$; miR-210, $p = 0,00593$; miR-122, $p = 0,0137$; miR-200a, $p = 0,0195$). U obou metod byl počáteční vzestup následován postupným snižováním hladin miRNA.

Diskuze

Klinický výstup se u pacientů podstupujících TA i TACE výrazně liší. Záro-

veň v současnosti chybí vhodný molekulární marker, který by umožnil predikovat léčebnou odpověď a úspěšnost terapie intervenčními metodami. V naší studii jsme analyzovali hladiny vybraných cirkulujících miRNA v průběhu TA a TACE. Analýza dat ukázala, že u obou metod dochází po výkonu ke změně hladin miRNA v cirkulaci, přičemž tato změna se u obou výkonů liší v dynamice. Tato změna odpovídá biologickému efektu, jakým způsobují destrukci tkáně. U radiofrekvenční ablace (RFA) k vlastní destrukci tumoru dochází teplem, které vzniká pohybem elektricky nabitých částic uvnitř tkáně působením vysokofrekvenčního proudu. Při této teplotě dochází okamžitě k rozrušení buněčné membrány a k postupné denaturaci bílkovin a v okrajových zónách také k uvolnění intracelulárního buněčného obsahu vč. miRNA do cirkulace. V okolí navozené nekrózy navíc dochází k zánětu. To zahrnuje mj. zvýšení exprese heat shock proteinů, ale i počtu zánětlivých buněk a lokálnímu i sérovému zvýšení markerů zánětu a proangiogenních faktorů [10]. U TACE spočívá princip destrukce nádorové tkáně v superselektivním podání směsi embolizačního materiálu a cytostatika. Vzniklá směs se dostane do presinusoidální oblasti cévního řečiště jater a zcela vyplní vaskulární prostory ložiska. Takto dochází k hypoxii nádorové tkáně a k lokálnímu prodlouženému působení cystostatika ve vysoké koncentraci. Obojí vede k postupné nekróze buněk, nikoliv však okamžitě, jako tomu bylo u RFA. Pozorovaný nárůst miRNA v cirkulaci tedy koreloval s biologickou podstatou obou metod.

Na základě výsledků lze tedy předpokládat, že hladina sérových miRNA umožňuje sledovat průběh metod intervenční radiologie a mění se v závislosti na systémové odpovědi ovlivněné tkáně. Cirkulující miRNA proto mají potenciál sloužit jako neinvazivní bio-

markery predikující odpověď na terapii nebo úspěšnost výkonu.

Závěr

V rámci studie jsme ověřili, že hladina vybraných cirkulujících miRNA se u pacientů podstupujících TA a TACE dynamicky mění v závislosti na provedeném výkonu. Pilotní data naznačují potenciální použití cirkulujících miRNA pro monitorování systémového efektu metod intervenční radiologie.

Literatura

- SVOD. Český národní webový portál epidemiologie nádorů. [online]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.
- Hänsler J, Wisiński TT, Schuppan D et al. Activation and dramatically increased cytolytic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2006; 12(23): 3716–3721.
- McNally ME, Martinez A, Khabiri H et al. Inflammatory markers are associated with outcome in patients with unresectable hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(3): 923–928. doi: 10.1245/s10434-012-2639-1.
- Erinjeri JP, Thomas CT, Samoilia A et al. Image-guided thermal ablation of tumors increases the plasma level of interleukin-6 and interleukin-10. *J Vasc Interv Radiol* 2013; 24(8): 1105–1112. doi: 10.1016/j.jvir.2013.02.015.
- Liu M, Liu J, Wang L et al. Association of serum microRNA expression in hepatocellular carcinomas treated with transarterial chemoembolization and patient survival. *PLoS one* 2014; 9(10): e109347. doi: 10.1371/journal.pone.0109347.
- Sergio A, Cristofori C, Cardin R et al. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): the role of angiogenesis and invasiveness. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(4): 914–921. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01712.x.
- Tanis E, Nordlinger B, Mauer M et al. Local recurrence rates after radiofrequency ablation or resection of colorectal liver metastases. Analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer #40004 and #40983. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 912–919. doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.008.
- Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834–838. doi: 10.1038/nature03702.
- Hu X, Zhang F, Liu XR et al. Efficacy and potential microRNA mechanism for computed tomography-guided percutaneous radiofrequency ablation of primary lung cancer and lung metastasis from liver cancer. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33(5): 1261–1271. doi: 10.1159/000358694.
- Ahmed M, Kumar G, Gourevitch S et al. Radiofrequency ablation (RFA)-induced systemic tumor growth can be reduced by suppression of resultant heat shock proteins. *Int J Hyperthermia* 2018; 34(7): 934–942. doi: 10.1080/02656736.2018.1462535.