

Analýza mikroRNA v krevní plazmě s cílem identifikovat pacienty s duktálním adenokarcinomem pankreatu mající benefit z chirurgické resekce

Analysis of Blood Plasma MicroRNAs to Enable Identification of Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Who Will Benefit from Surgical Resection

Gablo N. A.¹, Procházka V.², Hlavsa J.², Kiss I.³, Srovnal J.⁴, Kala Z.², Slaby O.^{1,3}

¹ CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

² Chirurgická klinika LF MU a FN Brno

³ Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴ Ústav molekulární a translační medicíny LF UP v Olomouci

Souhrn

Východiska: Duktální adenokarcinom pankreatu (pancreatic ductal adenocarcinoma – PDAC) je nejčastější maligní onemocnění pankreatu charakterizované extrémně špatnou prognózou z velké části kvůli problému s včasnou diagnózou a nedostatečným pokrokem v personalizaci léčby. Ze všech dostupných léčebných strategií zůstává totální resekce nádoru v jeho časném stadiu jediným prostředkem k dosažení dlouhodobého přežití. Nicméně i radikální chirurgická resekce nemusí v některých případech poskytnout přínos pro přežití pacientů. Vhodný výběr pacientů, kteří budou mít benefit z resekčního výkonu, je proto velice důležitý. **Materiál a metody:** Do této studie bylo zařazeno 24 PDAC pacientů, kteří podstoupili chirurgickou resekci a u kterých byl k dispozici předoperačně odebraný vzorek krevní plazmy. Pacienti byli zařazeni do dvou prognostických skupin podle jejich přežití – 12 pacientů se špatnou prognózou (medián celkového přežití 10 měsíců) a 12 pacientů s dobrou prognózou (medián celkového přežití 25 měsíců). Technologie sekvenování nové generace byla použita pro screening mikroRNA (miRNA) s rozdílnými hladinami mezi oběma skupinami pacientů PDAC. Knihovny cDNA byly připraveny pomocí QIAseq miRNA Library Kit (Qiaqen) a sekvenováním pomocí přístroje NextSeq500 (Illumina). **Výsledky:** Porovnáním profilů exprese miRNA pacientů z dobré a špatné prognostické skupiny jsme identifikovali celkem 61 miRNA, které měly mezi těmito dvěma skupinami signifikantně rozdílné hladiny ($p < 0,05$). Celkem 21 miRNA vykazovalo zvýšenou expresi a 40 miRNA vykazovalo sníženou expresi u skupiny pacientů se špatnou prognózou ve srovnání s pacienty s dobrou prognózou. **Závěr:** Tato pilotní studie popisuje rozdíly v expresi miRNA v předoperační plazmě u PDAC pacientů s kratším a delším celkovým přežíváním. Tato zjištění naznačují, že plazmatické miRNA by v budoucnu mohly sloužit jako možné biomarkery umožňující identifikovat pacienty s PDAC, kteří budou mít klinický benefit z radikální chirurgické resekce.

Klíčová slova

duktální adenokarcinom pankreatu – cirkulující mikroRNA – prognostický biomarker

Práce byla podpořena MZ ČR, grantem 16-31314A. Všechna práva vyhrazena.

This work was supported by Czech Ministry of Health, grant No. 16-31314A. All rights reserved.

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 zasílané do biomedicínských časopisů.

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



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
CEITEC – Středoevropský technologický institut
Masarykova univerzita
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: on.slaby@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 8. 3. 2019

Přijato/Accepted: 9. 3. 2019

Summary

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common malignancy of pancreas, characterized by extremely poor prognosis largely due to problem with early diagnosis and lack of progress in personalization of therapy. Of all available treatment strategies, radical surgical resection of the tumour in its early stage remains the only possibility how to reach long-term survival. However, even a technically perfect surgical resection may still not provide a survival benefit for all PDAC patients. Appropriate selection of patients for surgical resection is one the important medical needs in management of PDAC patients. **Material and methods:** To this study we enrolled 24 PDAC patients who underwent surgical resection and preoperatively collected their blood plasma specimens. Patients were divided into two prognostic groups according to their overall survival – 12 patients with poor prognosis (median overall survival 10 months) and 12 patients with good prognosis (median overall survival 25 months). Small RNA sequencing technology was applied to screen for microRNAs (miRNA) with differential levels between both PDAC patient's group. cDNA libraries were prepared using QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen) and sequencing by NextSeq500 instrument (Illumina). **Results:** When miRNA expression profiles of the PDAC patients from good and poor prognostic groups were compared, 61 miRNAs were identified to have significantly different plasma levels between the two groups ($p < 0.05$). A total of 21 miRNAs showed increased expression and 40 miRNAs showed decreased expression in a group of patients with poor prognosis compared to patients with good prognosis. **Conclusion:** This study demonstrated differences in miRNA expression profiles in preoperative plasma specimens of PDAC patients with short and long overall survival. Our observations indicate that after independent validations plasma miRNAs might become useful biomarkers for identification of PDAC patients having clinical benefit from surgical resection of the tumour.

Key words

pancreatic ductal adenocarcinoma – circulating microRNA – prognostic biomarker

Východiska

Duktální adenokarcinom pankreatu (pancreatic ductal adenocarcinoma – PDAC) vzniká z duktálního epitelu a představuje nejběžnější histologický typ malignit slinivky břišní [1]. PDAC se v celosvětovém měřítku stal čtvrtou hlavní příčinou úmrtí souvisejících s nádory. Vysoká úmrtnost PDAC je důsledkem agresivní biologické povahy nádoru, která je spojena s jeho rychlou progresí vedoucí často k pozdní diagnostice v pokročilých nerezekovatelných stádiích. Z těchto důvodů je PDAC charakteristické jedním z nejhorších přežití vůbec – pouze 5–7 % pacientů žije déle než 5 let od stanovení diagnózy [2,3]. Radikální resekce nádoru je preferovanou léčebnou metodou, která může poskytnout nejlepší přínos pro přežití u pacientů považovaných za technicky rezekovatelné v časném stadiu onemocnění. Nicméně část pacientů, kteří podstoupili radikální resekci, vykazuje časnou recidivu v důsledku přítomnosti nedetekovatelných mikrometastáz přispívajících ke špatnému přežití a resekce jako taková pro ně nepředstavuje klinický benefit [4]. V důsledku toho tito pacienti nedosahují přínosu pro přežití ve srovnání s pacienty v pokročilých stádiích nemoci, kteří jsou léčeni pouze systémovou chemoterapií. Proto je velmi žádoucí vyvinout biomarkery, které by umožnily pomocí předoperačního vyšetření iden-

tifikovat pacienty, kteří nebudou získávat zjevný klinický benefit z radikální resekce, a ušetřit je zatěžujícího chirurgického výkonu. MikroRNA (miRNA) jsou molekuly o délce přibližně 18–25 nukleotidů, které působí jako regulátory genové exprese na posttranskripční úrovni a umožňují regulaci > 50 % všech kódujících genů [5,6]. MiRNA byly spojeny s iniciací, progresí a promócí PDAC [7]. Vzhledem k tomu, že hladiny miRNA mohou reflektovat přítomnost řady patologických procesů vč. PDAC a jsou přítomny v tělních tekutinách [8], jako je krevní plazma, představují tyto molekuly potenciálně velice slibné biomarkery také ve výzkumu PDAC.

Materiál a metody

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Brno. Pacienti byli zařazeni do studie po podpisu informovaného souhlasu a předoperačně jim byl odebrán vzorek 5 ml periferní krve, který byl použit pro přípravu krevní plazmy. Pro účely této studie byla následně použita takto získaná krevní plazma od celkem 24 pacientů s histologicky potvrzeným PDAC, kteří podstoupili chirurgickou resekci. Na základě doby přežití byli pacienti rozděleni do dvou prognostických skupin – 12 pacientů s PDAC se špatnou prognózou (medián celkového přežití 10 měsíců), 12 pacientů s PDAC s dobrou prognó-

zou (medián celkového přežití 25 měsíců). Celková RNA obohacená o krátké RNA byla extrahována z 200 μ l krevní plazmy a dále použita k přípravě sekvenčních knihoven pro sekvenování krátkých RNA. Směs knihoven obsahujících ekvimolární množství každé knihovny byla sekvenována s použitím sekvenátoru NextSeq 500 (Illumina). Hodnoty exprese miRNA byly získány nástrojem Chimera. Získané sekvence byly mapovány proti miRBase, umožňujícím až dva nesoulady v sekvenci. Další analýzy byly provedeny s použitím balíčků R/Bioconductor. MiRNA s < 20 ready byly vynechány z analýzy. Počty readů byly předem normalizovány přidáním normalizačních faktorů v rámci balíčku edgeR a DESeq2 a dále mezi vzorky normalizované funkcí voom v balíčku LIMMA. Po stanovení hladin normalizované exprese byly miRNA porovnány mezi PDAC pacienty se špatnou prognózou a PDAC pacienty s dobrou prognózou a testovány pomocí lineárního regresního modelu. Získané hodnoty p byly adjustovány korekcí na mnohočetné testování hypotéz metodou Benjamini-Hochberg.

Výsledky

V analyzovaných vzorcích bylo identifikováno celkem 1 626 různých miRNA; 635 miRNA mělo > 20 čtení na jeden vzorek a bylo zahrnuto do následné analýzy.

Z nich bylo identifikováno 61 miRNA, které měly významně odlišné plazmatické hladiny mezi dvěma prognostickými skupinami ($p < 0,005$). Z těchto miRNA bylo zjištěno, že 21 vykazuje významně vyšší hladiny v plazmě pacientů se špatnou prognózou a 40 miRNA mají nižší hladinu ve srovnání s těmi s dobrou prognózou.

Diskuze a závěr

Radikální resekce nádoru zůstává jedinou léčbou, která nabízí šanci na dlouhodobé přežití pacientů s PDAC. Vzhledem k vysoké morbiditě spojené s radikálními chirurgickými výkony PDAC je však prioritou identifikovat nové prognostické markery, které mohou být předoperačně použity k identifikaci pacientů, u nichž je nepravděpodobné, že budou mít klinický benefit z chirurgické re-

sekce. Pokroky v translačním onkologickém výzkumu rozšířily spektrum nových biomarkerů pocházejících z krve, jako jsou miRNA, které mají velký potenciál stát se novým nástrojem pro prognostikaci pacientů s PDAC nezávisle nebo v kombinaci s nástroji, které jsou v současnosti k dispozici. Výsledky uvedené v této pilotní studii potvrdily, že sekvenování nové generace je velice vhodnou technologií pro screening potenciálních miRNA biomarkerů, které by mohly být použity pro další klinické testování. Současně tato studie odhalila rozdíly v preoperačních plazmatických hladinách miRNA mezi pacienty s PDAC majícími kratší a delší celkové přežívání. Tyto výsledky naznačují slibný potenciál plazmatických miRNA jako možného nástroje pro racionální indikaci léčby u pacientů s PDAC.

Literatura

1. Vincent A, Herman J, Schulick R. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011; 378(9791): 607–620. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(1): 7–30. doi: 10.3322/caac.21442.
4. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012; 148(1–2): 349–361. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.025.
5. Gu S, Jin L, Zhang F. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(2): 144–150. doi: 10.1038/nsmb.1552.
6. Schanen BC, Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics* 2011; 97(1): 1–6. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.10.005.
7. Vorvis C, Koutsoumpa M, Iliopoulos D. Developments in miRNA gene signaling pathways in pancreatic cancer. *Future Oncol* 2016; 12(9): 1135–1150. doi: 10.2217/fo-2015-0050.
8. Galatenko VV, Galatenko AV, Samatov TR. Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer. *Sci Rep* 2018; 8(1): 2418. doi: 10.1038/s41598-018-20215-5.