

Streszczenie

MikroRNA to krótkie niekodujące fragmenty RNA, które wpływają na ekspresję genów po ich transkrypcji. Cząsteczki te zaangażowane są m.in. w apoptozę i metabolizm komórki, po uwolnieniu do krwi pozostają bardzo stabilne. Właściwość ta przyczyniła się do intensywnych badań nad mikroRNA jako biomarkerem infekcji, uszkodzenia komórki po ekspozycji na leki, w tym kardiotoksyczności, hepatotoksyczności i nefrotoksyczności.

W niniejszej analizie podjęto próbę określenia przydatności wybranych, krążących w krwi obwodowej mikroRNA w przewidywaniu powikłań infekcyjnych oraz toksyczności narządowej u pacjentów z nowotworami hematologicznymi, którzy otrzymali wysokodawkową chemioterapię wspomaganą przeszczepieniem autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (autoPBSCT).

Grupę badaną stanowili chorzy, którzy otrzymali wysokodawkową chemioterapię wspomaganą autoPBSCT w latach 2017-2020 w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

Do analizowanej grupy włączono 40 pacjentów z chłoniakami – w tym 13 mężczyzn, 27 kobiet, w wieku 21-67 (mediana 49) lat – oraz 40 chorych na szpiczaka plazmocytowego – w tym 22 mężczyzn, 18 kobiet, w wieku 37-67 (mediana 57) lat. Grupa porównawcza składała się z 25 ochotników, 13 mężczyzn, 12 kobiet, w wieku 18-69 (mediana 50) lat, bez chorób nowotworowych ani poważnych chorób współistniejących. U wszystkich włączonych do analizy chorych i ochotników pobrano próbki krwi do próbek RNA later solution (Qiagen, Hilden, Germany) i przechowywano w -70°C celem wykonania badań RT-qPCR i ddPCR. Wyniki ekspresji mikroRNA porównywano między grupą chorych z i bez powikłań po wysokodawkowej chemioterapii. Dodatkowo, wynik ekspresji mikroRNA korelowano także z parametrami biochemicznymi i liczbą leukocytów rutynowo oznaczanymi podczas procedury autotransplantacji.

Pulę RNA izolowano z próbek krwi, używając zestawu Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen). Następnie przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) z wykorzystaniem kitu do odwrotnej transkrypcji firmy Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Zastosowano próbki dla specyficznego miRNA (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-155-3p,

hsa-miR-210-5p, hsa-miR423-5p, firmy TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Ilościowe oznaczanie mikroRNA przeprowadzono, stosując metodę ddPCR firmy Bio-Rad zgodnie z załączoną instrukcją. Bezwzględna liczba mikroRNA była odczytywana jako liczba zdarzeń z zastosowaniem metod statystycznych – dyskretnego rozkładu prawdopodobieństwa Poissona. Ilościowa ocena mikroRNA w mieszaninie reakcji PCR przedstawiona jest ostatecznie jako liczba kopii produktu w mikrolitrze.

U chorych na chłoniaki, po kondycjonowaniu BEAM (karmustyna, etopozyd, cytarabina, melfalan) najczęściej obserwowanym powikłaniem były infekcje, które w stopniu G3-G4 i G2 stwierdzono odpowiednio u 30% (12/40) i 15% (6/40) chorych. Wśród infekcji dominowała biegunka, zapalenie płuc, a także zakażenie związane z cewnikiem naczyniowym. Gorączkę neutropeniczną odnotowano u 32,5% (13/40) pacjentów. Powikłania nieinfekcyjne wystąpiły łącznie u 27,5% (11/40) chorych, z czego 20% (8/40) stanowiło zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego. U pacjentów ze szpiczakiem po podaniu wysokodawkowanego melfalanu dominował podobny profil powikłań, w niższym odsetku. Ciężkie infekcje w stopniu G3 występowały u 17,5% (7/40) pacjentów, a łagodne w stopniu G1-G2 u 25% (10/40) chorych. Odsetek pacjentów z gorączką neutropeniczną wyniósł jedynie 7,5% (3/40). Powikłania nieinfekcyjne wystąpiły łącznie u 42,5% (17/40) chorych, w tym 32,5% (13/40) stanowiło zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego. Zarówno w grupie pacjentów z chłoniakami, jak i szpiczakiem plazmocytowym nie stwierdzono żadnych ciężkich powikłań narządowych ze strony nerek i wątroby.

W celu określenia znaczenia mikroRNA jako biomarkera wystąpienia powikłań związanych z wysokodawkową chemioterapią wspomaganą autoPBSCT, porównywano ich wyjściową ekspresję przed rozpoczęciem kondycjonowania w grupie chorych z powikłaniami i bez powikłań. W całej badanej grupie pacjentów oraz u chorych na szpiczaka plazmocytozy, u których wystąpiły powikłania infekcyjne G1-G4 lub gorączka neutropeniczna, obserwowano wyższą ekspresję miR-122 w porównaniu z grupą bez powikłań ($p=0,01$; $p=0,013$). W analizie przeprowadzonej w całej badanej grupie oraz u chorych na chłoniaki wykazano także korelację pomiędzy wyjściową ekspresją miR-122 i wyjściową aktywnością transaminazy asparaginianowej ($p=0,009$ i $p=0,041$) i transaminazy alaninowej ($p=0,001$ i $p=0,012$).

Ponadto stwierdzono istotną statystycznie zależność między medianą miR-150, miR-155 i miR-210 w grupach pacjentów stratyfikowanych według HCT-CI. U pacjentów z wysokim i pośrednim HCT-CI stwierdzono wyższą ekspresję miR-155 ($p=0,001$), w grupie

chorych na chłoniaki także podwyższoną ekspresję miR-210 ($p=0,018$), natomiast u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym obniżoną ekspresję miR-150 ($p<0,001$).

Podsumowując, po zastosowaniu wysokodawkowej chemioterapii wspomaganej autoPBSCT obserwowano niską toksyczność narządową. Przedstawione badania potwierdzają przydatność miR-122 jako biomarkera wystąpienia powikłań infekcyjnych w całej badanej grupie. Dodatkowo nasilenie ekspresji miR-122 wykazuje związek z parametrami uszkodzenia komórki wątrobowej po chemioterapii. Wyjściowa ekspresja miR-150, miR-155 i miR-210 korelowała natomiast z liczbą i ciężkością chorób współistniejących.

Abstract

Title:

Evaluation of the selected microRNA as biomarkers of early toxicity resulting from high dose chemotherapy followed by autoPBSCT in patients with B-cell lymphoproliferative disorders

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that modulate the expression of genes at the posttranscriptional level. These molecules have been shown to be involved in apoptosis and cell metabolism. MicroRNAs are released into blood in a remarkably stable form. This feature leads to a vigorous exploration of microRNA as infection biomarkers, drug-induced toxicity including cardiotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity.

This analysis attempts to determine whether some selected microRNAs circulating in the blood are useful in predicting infectious complications and organ toxicity in patients with hematological malignancies who underwent high dose chemotherapy followed by autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation (autoPBSCT).

The study group consisted of patients, who underwent high dose chemotherapy followed by autoPBSCT in the years 2017-2020 in the Department of Hematology, Blood Neoplasms and Bone Marrow Transplantation of University Clinical Hospital in Wrocław.

The study included 40 patients - 13 male, 27 female - diagnosed with a lymphoma; the age of patients with autoPBSCT between 21-67 (median 49) years and 40 patients with multiple myeloma - 22 males, 18 females - the age between 37-67 (median 57) years. The control group consisted of 25 volunteers - 13 males, 12 females - aged between 18-69 (median 50) years, without neoplasms and severe comorbidities.

In all of the patients and volunteers included in the analysis, blood samples were collected into RNeasy lysis solution (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -70°C for RT-qPCR and ddPCR experiments. The results of microRNA expression were compared between patients who experienced side effects of high dose chemotherapy and the ones who did not. In addition, the correlation between the value of microRNA expression, biochemical parameters and leucocytes count routinely taken during autotransplant procedures was assessed.

Total RNA was isolated from the blood samples with the use of the Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen). Next, Polymerase Chain Reaction was performed (PCR) by means of the Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according in the manufacturer's protocol. The specific probes used in the experiment (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR423-5p) were also obtained from TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). MicroRNA was quantified using Droplet Digital PCR (ddPCR) (Bio-Rad) according with the manufacturer's protocol. Finally, the plate was loaded onto a Droplet Reader (Bio-Rad) and read automatically. The absolute quantification of each miRNA was calculated basing on the number of positive counts per panel by using the Poisson distribution. The quantification of the target miRNAs is presented as the number of copies/ μ l in the PCR reaction mixture.

The most frequent side effects in patients with lymphoma after BEAM (carmustine, etoposide, cytarabine, melphalan) conditioning were infections – G2 and G3-G3 were observed in 30% (12/40) and 15% (6/40) patients respectively. Diarrhoea, pneumonia as well as catheter related infections were predominant. Neutropenic fever occurred in 32,5% (13/40) of patients. Non- infectious side effects were present in 27,5% (11/40) of patients, with mucositis of digestive tract in 20% (8/40). In patients with multiple myeloma after high dose melphalan therapy the same type of side effects were observed with lower frequency. Severe infections G3 were present in 17,5% (7/40) and moderate G1-G2 in 25% (10/40) of patients. Only 7,5% (3/40) of patients suffered from neutropenic fever. From total of 42,5% (17/40) non-infectious side effect, mucositis of digestive tract was dominant 32,5% (13/40). Neither nephrotoxicity nor hepatotoxicity were observed in any analysed subjects.

To assess the efficacy of microRNA as a biomarker of side effects after high dose chemotherapy followed by autoPBSCT, we compared the expression of microRNA before conditioning between the group with or without complications. The expression of miR-122 was higher in all patients and subjects with multiple myeloma who demonstrated infections G1-G4 or neutropenic fever ($p=0,01$; $p=0,013$). In addition, In all subjects and in lymphoma patients the correlation between the expression of miR-122 and the aspartate transaminase ($p=0,009$; $p=0,041$) as well as alanine transaminase ($p=0,001$; $p=0,012$) was sought.

Moreover, the statistically significant correlation was proven between the median expression of miR-150, miR-155, miR-210 and the patients stratified in accordance with to Hematopoetic Stem Cell Transplantation Comorbidity Index (HCT-CI). The subjects with high and

intermediate HCT-CI presented higher expression of miR-155 ($p=0,001$); the lymphoma patients additionally displayed a higher expression of miR-210 ($p=0,018$) while in the multiple myelomas group a lower expression of miR-150 was proven ($p<0,001$).

In conclusion, the organ toxicity resulting from high dose of chemotherapy followed by autoPBSCT was low. The obtained results confirm the expediency of miR-122 as a biomarker of infectious complications in all of the study group. In addition, the relationship between the observed higher expression of miR-122 and transaminases levels was confirmed. The expression of miR-150, miR-155 and miR-210 before conditioning was related to quantity and severity of comorbidities.