

**Uniwersytet Medyczny w Łodzi**  
**Wydział Lekarski**

***Identyfikacja i zastosowanie krążących mikroRNA w monitorowaniu  
powikłań radioterapii u chorych na raka gardła środkowego***

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

**Bartłomiej Tomasik**  
**lekarz**

Promotor: dr hab. n. med. Wojciech Fendler Prof. UM w Łodzi

Pracę wykonano  
w Zakładzie Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej  
I Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Wojciech Fendler Prof. UM w Łodzi  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Wojciech Młynarski

Praca finansowana z projektów badawczych:  
grant PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki nr 2016/21/N/NZ5/01938,  
grant First TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej “Predictive Biomarkers of Radiation Toxicity (PBRTox)”  
grant Uniwersytetu Medycznego nr 502-03/1-090-01/502-14-272

**Łódź 2019**

## 9. STRESZCZENIE

---

**Wstęp:** Poprawa wyników leczenia z zastosowaniem radioterapii (RT) wymaga eskalacji dawki promieniowania w obrębie nowotworu przy jednoczesnej ochronie otaczających zdrowych tkanek. Obecnie stosowane ograniczenia dawek RT opierają się na danych obserwacyjnych, dlatego nasilona toksyczność obserwowana u mniejszości pacjentów limituje dopuszczalne progi dawki dla całej populacji, redukując potencjał leczniczy RT. Aktualnie nie posiadamy skutecznych narzędzi do pomiaru wrażliwości na promieniowanie, które umożliwiłyby odpowiednią personalizację leczenia. Wstępne doniesienia literaturowe wskazują, że zewnątrzkomórkowe mikroRNA (miRNA) mogą stanowić nową klasę biomarkerów, która przyczyni się do jeszcze większej personalizacji RT. Byłoby to szczególnie pożądane w przypadku nowotworów regionu głowy i szyi, w których, ze względu na anatomiczną złożoność tej okolicy, ryzyko powikłań związanych z leczeniem jest szczególnie wysokie. Dodatkowo, współcześnie obserwuje się postępujący wzrost zachorowalności na raki gardła środkowego (*oropharyngeal squamous cell carcinoma* – OPSCC) stanowiące szczególną grupę nowotworów regionu głowy i szyi. Do ich rozwoju, oprócz klasycznych czynników ryzyka, przyczynia się bowiem infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego (*human papillomavirus* – HPV). Niestety, dane epidemiologiczne dotyczące zachorowalności na HPV-zależne OPSCC w Polsce są bardzo skąpe. Ponadto, niejednoznaczne wyniki badań dotyczące modyfikacji terapii w u chorych z tym rozpoznaniem wskazują, że niezwykle istotne wydaje się być poszukiwanie nowych biomarkerów, które pomogą wyselekcjonować pacjentów o zwiększonym ryzyku wystąpienia powikłań w grupie chorych z OPSCC.

**Cele pracy:** (1) Identyfikacja miRNA o wartości prognostycznej dla wystąpienia nasilonej kserostomii i ocena ich wartości predykcyjnej. (2) Identyfikacja zależnych od infekcji HPV miRNA krążących w surowicy. (3) Ocena częstości występowania HPV-zależnych raków gardła środkowego w regionie łódzkim. (4) Porównanie profilu powikłań po RT u pacjentów HPV (-) oraz HPV (+).

**Materiały i metody:** Badanie miało charakter prospektywny, a rekrutacja pacjentów trwała w okresie 01.05.2016 r. - 31.12.2018 r. Nabór pacjentów był prowadzony w 3 ośrodkach onkologicznych – w Łodzi, Kielcach oraz Radomiu. Wstępnej ocenie spełniania kryteriów włączenia do badania poddanych zostało 152 chorych z rozpoznaniem OPSCC. Po jej zakończeniu 41 osób zostało wykluczonych z udziału i do badania zostało ostatecznie zakwalifikowanych 111 pacjentów. Zgromadzono i

zabezpieczono ich materiał biologiczny (tkanki utrwalone w parafinie i zatopione w bloczkach parafinowych, ang. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* - FFPE), dane kliniczne ze szczególnym uwzględnieniem kwestionariuszy EORTC QLQ-C30 i QLQ-H&N35 w wersji polskiej oraz dane dozymetryczne. Z grupy 111 zakwalifikowanych chorych wybrano losowo 20 osób spośród populacji zrekrutowanej w ośrodku łódzkim (grupa eksploracyjna) oraz kolejne 60 osób spośród populacji zrekrutowanej we wszystkich trzech ośrodkach (grupa walidacyjna). Dla tych chorych zabezpieczono surowicę pobraną w trzech punktach czasowych – przed RT, po podaniu 20 Gy oraz po zakończeniu RT. Zdefiniowano 2 główne punkty końcowe badania: (1) Nasilona kserostomia 90 dni po zakończeniu RT definiowana jako odpowiedzi  $\geq 3$  wybierane przez pacjentów w 4-punktowej skali Likerta zawartej w kwestionariuszu EORTC QLQ-H&N35 oraz (2) Status HPV nowotworu, które był oceniany za pomocą dwóch metod – immunohistochemicznej (IHC) oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (ang. *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR). W przypadku niezgodności wyników obydwu metod, za wiążący uznawano wynik uzyskany w metodzie qPCR. Oznaczenia IHC białka p16 zostały przeprowadzone w FFPE z wykorzystaniem zestawu CINtec™ Histology Kit (DakoCytomation B.V., Heverlee, Belgium). Do izolacji DNA z FFPE wykorzystano zestaw Promega Polska (nr kat. AS1450), a uzyskany materiał poddawano reakcji multiplex qPCR kitem AmpliSens HPV HCR-genotype-titre PCR Kit (typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68; IMOGENA, Polska). Z surowicy pobranej od pacjentów z grupy eksploracyjnej i walidacyjnej miRNA wyizolowano przy użyciu miRCURY RNA Isolation kit (QIAGEN, Hilden, Niemcy). Po przepisaniu na cDNA i przeprowadzeniu kontroli jakości, próbki były poddawane dalszej analizie przy użyciu miRCURY LNA miRNA miRNome PCR Panels; Human panel I+II, V5, miRCURY LNA miRNA miRNome PCR Panel (QIAGEN, Hilden, Niemcy). Opisane profilowanie krążących miRNA wykonano w grupie eksploracyjnej i określono w ten sposób sygnaturę krążących zewnątrzkomórkowych miRNA związanych z występowaniem nasilonej kserostomii 90 dni po zakończeniu RT oraz z rakiem zależnych od infekcji HPV. W następnym kroku dokonano walidacji sygnatur wykonując oznaczenia ekspresji wybranych miRNA na grupie walidacyjnej wykorzystując zestaw miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panels (QIAGEN, Hilden, Niemcy). Do normalizacji wyników ekspresji miRNA uzyskanych na etapach profilowania i walidacji wykorzystano algorytm NormFinder. Dane z etapu profilowania na grupie eksploracyjnej zostały przeanalizowane pod kątem występowania efektu serii, który został usunięty przy

użyciu algorytmu ComBat. Dla większości analiz próg istotności ustalono na  $p < 0,05$ . Dla porównań wielkoskalowych (etap profilowania miRNA) zdecydowano, że fałszywy wskaźnik odkrycia (FDR - *false discovery rate*) (obliczony przy użyciu metody Benjaminiego-Hochberga) nie powinien przekraczać 0,25.

**Wyniki:** Spośród wszystkich 111 pacjentów zrekrutowanych do badania dodatni status HPV (HPV (+)) stwierdzono u 56 osób (50,5%), podczas gdy nasiloną kserostomia (kserostomia (+)) 90 dni po zakończeniu RT była zgłoszona przez 63 osoby (56,8%). Pacjenci z HPV (+) OPSCC byli istotnie młodsi od chorych HPV (-) (mediana wieku 60,0 lat (IQR: 54,5-65,5 lat) dla HPV (+) oraz 63,0 lata dla HPV (-) (IQR: 57,0-69,0 lat;  $p = 0,012$ ). Chorzy w tej grupie istotnie rzadziej nadużywali alkoholu ( $p < 0,001$ ) oraz rzadziej palili papierosy ( $p < 0,001$ ). Ponadto, w grupie tej znalazło się istotnie więcej kobiet (35,7% vs 12,7%;  $p = 0,009$ ). Wszyscy włączeni do badania chorzy ( $n = 111$ ) wypełnili wyjściowe (przed RT) kwestionariusze jakości życia EORTC QLQ-C30 i QLQ-H&N35. Kwestionariusze po 3 miesiącach od zakończenia leczenia (oceniające główny punkt końcowy badania) uzyskano od 101 chorych – 54 HPV (+) oraz 46 HPV (-). Analiza wyników porównujących odpowiedzi w obydwu kwestionariuszach wskazała, że zarówno ogólna ocena stanu zdrowia jaki i ocena specyficznych objawów związanych z leczeniem nowotworów regionu głowy i szyi 3 miesiące po zakończeniu RT utrzymywała się na zbliżonym poziomie niezależnie od tego, czy nowotwór rozwinął się na tle infekcji HPV, czy też był od niej niezależny ( $p > 0,05$  dla wszystkich skal). Reprezentatywny materiał pozwalający na przeprowadzenie sparowanych porównań, tzn. ocenę IHC oraz qPCR, był dostępny dla 96 pacjentów (86,5% grupy). Analiza współczynnika Kappa Cohena wykazała dobrą zgodność obydwu metod –  $\kappa = 0,67$  (95%CI: 0,52 - 0,82). Wykazała, że metoda qPCR w zdecydowanej większości przypadków wykrywała genotyp HPV-16 ( $n = 41$ , 86%). Pozostałe wykrywane genotypy to HPV-18 ( $n = 3$ , 6%), HPV-35 ( $n = 2$ , 4%) HPV-45 ( $n = 1$ , 2%) oraz HPV-56 ( $n = 1$ , 2%). Analiza wariancji (ANOVA) dla pomiarów powtórzonych przeprowadzona w grupie eksploracyjnej wskazała, że poziom ekspresji 10 miRNA wykazywał istotne ( $p < 0,05$ ) różnice w zależności od punktu czasowego, w którym pobrano próbkę. Największy potencjał dyskryminacyjny stwierdzono dla miR-150-5p, którego ekspresja była najwyższa u pacjentów przed rozpoczęciem napromienia i spadała w kolejnych analizowanych punktach czasowych ( $p < 0,001$ ). Analiza w grupie walidacyjnej potwierdziła także, że poziom ekspresji miR-150-5p ulega istotnemu zmniejszeniu wraz ze wzrostem podanej dawki promieniowania jonizującego ( $p < 0,001$ ). Największe różnice

w ekspresji miRNA pomiędzy próbkami od pacjentów kserostomia (+) i próbkami chorych kserostomia (-) pojawiały się w próbkach pobranych od pacjentów przed rozpoczęciem RT – wykryto tam istotne różnice w ekspresji aż 40 miRNA. W kolejnych punktach czasowych liczba miRNA, których ekspresja różniła się istotnie ulegała zmniejszeniu. Po 20 Gy istotne zmiany w ekspresji obserwowano dla 14 miRNA, a po zakończeniu RT dla 10 miRNA. Model oparty o poziomy ekspresji miR-185-5p oraz miR-425-5p zmierzone przed rozpoczęciem RT cechował się bardzo dobrą zdolnością dyskryminacyjną - AUC 0,96 (95%CI: 0,88-1,00). Model oparty o ekspresję tych samych miRNA utrzymał bardzo wysoką zdolność dyskryminacyjną w sytuacji, kiedy pod uwagę brano parametry mierzone po podaniu 20 Gy (AUC 0,90 (95%CI: 0,75-1,00)). Zmiany ekspresji miR-185-5p oraz miR-425-5p okazały się również użyteczne podczas analizy próbek z grupy walidacyjnej - model oparty o poziomy ekspresji tych 2 miRNA zmierzone przed rozpoczęciem radioterapii cechował się AUC 0,80 (95%CI: 0,70-0,91). W próbkach pobranych po 20 Gy zastosowanie poziomów ekspresji tych 2 miRNA pozwalało osiągnąć AUC 0,83 (95%CI: 0,73-0,94). Największe różnice w ekspresji miRNA pomiędzy próbkami od pacjentów HPV (+) i HPV (-) pojawiały się w próbkach pobranych od pacjentów po otrzymaniu 20 Gy – wykryto tam istotne różnice w ekspresji aż 21 miRNA. W próbkach z pozostałych punktów czasowych wykryto mniej miRNA, które różnicowałyby grupy. Przed rozpoczęciem RT istotne zmiany w ekspresji obserwowano dla 9 miRNA, a po zakończeniu RT dla 5 miRNA. Model oparty o poziomy ekspresji let-7b-5p oraz miR-140-3p zmierzone przed rozpoczęciem radioterapii cechował się AUC 0,96 (95%CI: 0,88-1,00). W grupie walidacyjnej, model oparty o poziomy ekspresji tych 2 miRNA zmierzone przed rozpoczęciem radioterapii cechował się AUC 0,84 (95%CI: 0,73-0,94).

#### **Wnioski:**

1. Poziom ekspresji miR-425-5p oraz miR-185-5p mierzony w surowicy pacjentów z OPSCC przed rozpoczęciem RT oraz w trakcie terapii (po podaniu 20 Gy) ma istotną wartość prognostyczną dla wystąpienia nasilonej kserostomii 90 dni po zakończeniu RT.
2. Poziom ekspresji let-7b-5p oraz miR-140-3p mierzony w surowicy pacjentów z OPSCC przed rozpoczęciem RT pozwala identyfikować chorych, u których nowotwór związany jest z infekcją HPV.
3. Poziom ekspresji krążącego miR-150-5p jest zależny od promieniowania jonizującego, ulegając istotnemu zmniejszeniu wraz ze wzrostem dawki.

4. Częstość występowania HPV-zależnych OPSCC w centralnej Polsce wynosi około 50%, zastosowanie metody qPCR poprawia wykrywalność raków HPV-zależnych w porównaniu do metody IHC. Metody IHC oraz qPCR cechuje satysfakcjonująca zgodność wyników, jednak zastosowanie tej drugiej, oprócz poprawy wykrywalności, wnosi również unikatowe informacje biologiczne dotyczące genotypu HPV. Dominującym genotypem wykrywanym w materiale z momentu rozpoznania choroby (FFPE) jest genotyp HPV-16, jednak w kilkunastu procentach przypadków wykrywana się inne genotypy (HPV-18, HPV-35, HPV-45 czy HPV-56).
5. Profil powikłań zgłaszanych przez pacjentów w trakcie i po zakończeniu radioterapii z powodu OPSCC nie różni się istotnie w zależności od etiologii nowotworu.

## 10. SUMMARY

---

**Introduction:** Improving the results of radiotherapy (RT) requires escalating the radiation dose within the tumor while protecting the surrounding healthy tissues. The current dose constraints rely on observational data, therefore the increased toxicity observed in a minority of patients limits the acceptable dose thresholds for the entire population, reducing the therapeutic potential of RT. Currently we do not possess effective tools for measuring radiation sensitivity that would allow appropriate treatment personalization. Preliminary literature reports indicate that extracellular microRNAs (miRNAs) may be a new class of biomarkers that will pave the way for further personalization of RT. This would be especially desirable for head and neck cancers in which, due to the anatomical complexity of this area, the risk of treatment-related complications is particularly high. In addition, a progressive increase in the incidence of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC), a subgroup of head and neck cancers, is currently observed. In addition to classic risk factors, infection with human papillomavirus (HPV) contributes to the development of this clinical entity. Unfortunately, epidemiological data on the incidence of HPV-dependent OPSCC in Poland are very scarce. The inconclusive results of studies investigating possible modifications of therapy in patients with OPSCC indicate that searching for new biomarkers that will help to select patients at increased risk of complications in the group of patients with OPSCC is of utmost importance.

**Aims of the study:** (1) To identify miRNAs with prognostic value for the occurrence of severe xerostomia and assessment of their predictive value. (2) To identify serum circulating miRNAs related with HPV infection. (3) To evaluate the prevalence of HPV-dependent oropharyngeal cancers in the Lodz region. (4) To compare the profile of post-RT complications in HPV (-) and HPV (+) patients.

**Materials and methods:** This was a prospective study and the recruitment of patients lasted from 01.05.2016 to 31.12.2018. Patients were recruited in 3 oncological centers - in Łódź, Kielce and Radom. One hundred fifty-two patients with OPSCC diagnosis were assessed for eligibility. After this procedure, 41 subjects were excluded and 111 patients were finally qualified for the study. Their biological material was collected and secured (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded - FFPE) together with the clinical data with particular emphasis on the EORTC QLQ-C30 and QLQ-H & N35 questionnaires in the Polish version and dosimetry data. From a group of 111 qualified patients, 20 subjects

were randomly selected from the population recruited in the Lodz center (exploratory group) and another 60 patients from the population recruited in all three centers (validation group). For these patients, serum was collected at three time points - before RT, after 20 Gy and after RT. Two main endpoints of the study were defined: (1) Severe xerostomia 90 days after the end of RT defined as answers  $\geq 3$  selected by patients on a 4-point Likert scale included in the EORTC QLQ-H&N35 questionnaire and (2) HPV status of the tumor that was assessed using two methods - immunohistochemistry (IHC) and quantitative DNA polymerase chain reaction (qPCR). In case of discrepancies between the methods, the result of qPCR was used. IHC p16 protein assays were performed in FFPE using the CINtec<sup>TM</sup> Histology Kit (DakoCytomation B.V., Heverlee, Belgium). For DNA isolation from FFPE, the Promega Polska kit (catalog number AS1450) was used and the obtained material was used in multiplex qPCR with the AmpliSens HPV HCR-genotype-titre PCR Kit (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68; IMOGENA, Poland). MiRNAs were isolated from the sera of patients from the exploration and validation groups using miRCURY RNA Isolation kit (QIAGEN, Hilden, Germany). After reverse transcription into cDNA and quality control, the samples were further investigated for miRNA expression using miRCURY LNA miRNA miRNome PCR Panels; Human panel I + II, V5, miRCURY LNA miRNA miRNome PCR Panel (QIAGEN, Hilden, Germany). Circulating miRNAs associated with the occurrence of severe xerostomia 90 days after the end of RT and HPV-dependent OPSCC were selected for testing in the validation group. In the next step, the signatures were validated by measuring the expression levels of selected miRNAs in the validation group using the miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panels (QIAGEN, Hilden, Germany). The NormFinder algorithm was used to normalize the miRNA expression results obtained at the profiling and validation stages of the study. Data from the profiling stage on the exploration group were analyzed for the occurrence of a batch effect, which was removed using the ComBat algorithm. For most analyses, the significance threshold was set at  $p < 0.05$ . For the large-scale comparisons (miRNA profiling stage), it was decided that the false discovery rate (FDR) (calculated using the Benjamin-Hochberg method) should not exceed 0.25.

**Results:** In 111 patients recruited for the study, HPV-positive (HPV (+)) status was found in 56 subjects (50.5%), while severe xerostomia (xerostomia (+)) 90 days after the end of RT was reported by 63 patients (56.8%). Patients with HPV (+) OPSCC were significantly younger than HPV (-) group (median age 60.0 years (IQR: 54.5-65.5 years)



for HPV (+) and 63.0 years for HPV (-) (IQR: 57.0-69.0 years;  $p = 0.012$ ). Alcohol abuse and tobacco addiction were less common in patients with HPV (+) OPSCC ( $p < 0.001$  for both). In addition, there were significantly more women in this group (35.7% vs 12.7%;  $p = 0.009$ ). All patients included in the study ( $n = 111$ ) completed the initial (before RT) quality of life questionnaires EORTC QLQ-C30 and QLQ-H&N35. Questionnaires filled three months after the treatment completion (where main study endpoint was assessed) were obtained from 101 patients - 54 HPV (+) and 46 HPV (-). The comparison of responses showed that both the overall health assessment and the assessment of specific symptoms associated with the treatment of head and neck cancer 3 months after the end of RT remained at a similar level regardless the disease biology ( $p > 0.05$  for all scales). Representative material allowing paired comparisons in FFPE, i.e. IHC and qPCR, was available for 96 patients (86.5% of the group). Cohen's Kappa coefficient method showed good agreement of both methods -  $\kappa = 0.67$  (95% CI: 0.52 - 0.82). In the vast majority of cases, the qPCR method detected the HPV-16 genotype ( $n = 41$ , 86%). Other detected genotypes were as follows: HPV-18 ( $n = 3$ , 6%), HPV-35 ( $n = 2$ , 4%) HPV-45 ( $n = 1$ , 2%) and HPV-56 ( $n = 1$ , 2%). Analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements carried out in the exploration group indicated that the expression levels 10 miRNA showed significant ( $p < 0.05$ ) differences depending on the time point at which the sample was taken. The highest radiation-induced change of expression was found for miR-150-5p, which expression level was the highest in patients before the beginning of RT and decreased at subsequent analyzed time points ( $p < 0.001$ ). The analysis performed in the validation group has also confirmed that the expression level of miR-150-5p significantly decreases with increasing dose of ionizing radiation ( $p < 0.001$ ). The largest differences in miRNA expression between xerostomia (+) and xerostomia (-) patients were noted in samples taken from patients before RT - significant differences in the expression levels of 40 miRNAs were detected. At subsequent time points, the number of miRNAs which expression differed significantly decreased. After 20 Gy, significant changes in the expression levels were observed for 14 miRNAs and after the completion of RT for 10 miRNAs only. The model based on miR-185-5p and miR-425-5p expression levels measured before the start of RT had a very good discriminatory ability - AUC 0.96 (95% CI: 0.88-1.00). The model based on the expression of the same miRNAs maintained a very high discriminatory power when parameters were measured after 20 Gy (AUC 0.90 (95% CI: 0.75-1.00)). Changes in the expression levels of miR-185-5p and miR-425-5p in the samples from the validation group were also confirmed to be significant. The model

based on the expression levels of these 2 miRNAs measured before radiotherapy was characterized by an AUC 0.80 (95% CI: 0.70 -0.91). In samples taken after 20 Gy, the use of expression levels of these 2 miRNAs resulted in AUC 0.83 (95% CI: 0.73-0.94). The largest differences in miRNA expression levels between HPV (+) and HPV (-) patients were found in samples taken from patients after receiving 20 Gy - there were significant differences in expression of 21 miRNAs. Less significantly differed miRNAs were detected in the samples from the remaining time points. Significant changes in expression levels were observed for 9 miRNAs before RT and after 5 RT only for miRNAs. The model based on let-7b-5p and miR-140-3p expression levels measured before the start of RT in the profiling group had an AUC of 0.96 (95% CI: 0.88-1.00). In the validation group, the model based on the expression levels of these 2 miRNAs measured before RT had an AUC of 0.84 (95% CI: 0.73-0.94).

**Conclusions:** 1. The expression levels of miR-425-5p and miR-185-5p measured in the serum of patients with OPSCC before the start of RT and during therapy (after 20 Gy) have a significant prognostic value for the occurrence of severe xerostomia 90 days after the end of RT.

2. The expression levels of let-7b-5p and miR-140-3p measured in the serum of patients with OPSCC before the start of RT allows to identify patients with HPV-dependent cancer.

3. The expression level of circulating miR-150-5p is correlated with delivered RT dose significantly reducing with increasing doses.

4. The incidence of HPV-dependent OPSCC in central Poland is about 50%, the use of the qPCR method improves the detection rate of HPV-dependent cancers as compared to the IHC method. The results of IHC and qPCR methods are characterized by satisfactory level of concordance, however the use of the latter, in addition to improving detection, also brings unique biological information on the HPV genotype. The dominant genotype detected in the material (FFPE) at the time of diagnosis was the HPV-16 genotype, but in a considerable number of cases other genotypes (e.g. HPV-18, HPV-35, HPV-45 or HPV-56) might be detected.

5. Patient-reported toxicities during and after radiotherapy due to OPSCC were similar regardless the etiology of cancer.