

# Cirkulující a extracelulární mikroRNA jako nové potenciální diagnostické markery pro gynekologické malignity

Luděk Záveský<sup>1</sup>, Eva Jandáková<sup>2</sup>, Radovan Turyna<sup>3</sup>, Lucie Langmeierová<sup>4</sup>, Vít Weinberger<sup>5</sup>, Luboš Minář<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN, Praha, přednosta doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

<sup>2</sup> Ústav patologie LF MU a FN Brno, přednosta doc. MUDr. Leoš Křen, Ph.D.

<sup>3</sup> Onkogynekologické centrum, Ústav pro péči o matku a dítě, Praha, vedoucí MUDr. Radovan Turyna, Ph.D.

<sup>4</sup> Fakultní transfuzní oddělení, VFN, Praha, primářka MUDr. Daniela Dušková

<sup>5</sup> Onkogynekologické centrum. Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno, vedoucí as. MUDr. Luboš Minář

## Abstrakt

Malé regulační molekuly, tzv. mikroRNA, se podílejí na regulaci všech základních životních procesů v buňkách. Jsou regulátory exprese genů na posttranskripční úrovni. Ovlivňují tuto expresi vazbou na cílové mRNA, která vede k blokadě translace a štěpení mRNA. Nejnovější výzkumy ukázaly, že jejich výskyt není omezen jen na buňky, ale mikroRNA se vyskytují také v tělních tekutinách. Vzhledem k tomu, že diferenciální exprese určitých mikroRNA je často asociovaná s mnoha patologickými procesy, detekce deregulovaných mikroRNA v diagnosticky relevantních vzorcích (např. krvi, plazmě/séru, moči) se může stát základem nových diagnostických postupů. U gynekologických nádorových onemocnění je nalezení nových diagnostických biomarkerů důležitým cílem současných výzkumů. V tomto článku naleznete přehled cirkulujících a extracelulárních mikroRNA, které byly nejnověji nalezeny deregulovány u karcinomu ovaria, endometria a cervixu, především ve vzorcích krve, séra/plazmy a moči.

**Klíčová slova:** diagnostika – karcinom cervixu – karcinom endometria – karcinom ovaria – krev – mikroRNA – moč – plazma – sérum

## Circulating and extracellular microRNAs as new diagnostic biomarkers for gynecological cancers

### Abstract

Small, non-coding molecules of RNA, microRNAs, have been shown to participate in regulation of key biological processes in the cells. They regulate the expression at post-transcriptional level by binding to target mRNA, resulting in mRNA degradation or translation inhibition. The most recent investigations revealed that microRNAs may occur not only in the cells, but also in many body fluids. Differential expression of particular microRNAs is often associated with many pathological states. Therefore, the detection of deregulated microRNAs in diagnostically relevant samples such as blood, plasma/serum, or urine may become the basis for the establishment of novel diagnostic procedures. Finding alternative diagnostic biomarkers for gynecological cancers is the goal of many recent investigations. We present here the survey of novel circulating and extracellular microRNAs which have been found deregulated in ovarian cancer, endometrial cancer and cervical cancer, particularly in blood, plasma/serum and urine samples.

**Key words:** diagnosis – cervical cancer – endometrial cancer – ovarian cancer – blood – microRNA – urine – plasma – serum

### Úvod

Loňský rok uplynulo 20 let od publikování objevu tzv. malých, proteiny nekódujících regulačních molekul RNA, tj. mikroRNA. První mikroRNA, lin-4, byla objevena u hlístice *Caenorhabditis elegans*, a světlo vědeckého světa spatřila v roce 1993. K objevu a publikaci druhé mikroRNA (let-7) u stejného organismu uběhlo sedm let od té první. Další studie následovaly u různých skupin

organizmů a nyní je známo jen v lidském genomu více než 2 000 mikroRNA.

V onkogynekologickém výzkumu mají mikroRNA své nezastupitelné místo, byť počet publikací i celkové zastoupení gynekologického výzkumu je v porovnání s jinými karcinomy zřetelně nižší, což je patrně dáno relativně nižší incidencí gynekologických nádorů. Od funkční podstaty mikroRNA spočívající v regulaci

genové exprese na posttranskripční úrovni je již jen malý krok k jejich detekci v různých tkáních a též v tělních tekutinách, který se může stát velkým krokem pro diagnostické možnosti různých, tedy i gynekologických nádorových onemocnění. A jaká je tedy skutečnost v našem oboru?

### Malé představení mikroRNA

Dovolíme si pouze velmi stručně představení mikroRNA. Jedná se o v průměru 22 nukleotidů dlouhé jednořetězcové molekuly RNA. Jejich biogeneze začíná v buněčném jádru, ve kterém se transkripční genů pro mikroRNA vytváří dlouhý primární transkript, pri-microRNA. Oblasti kódující geny pro mikroRNA se nachází jak mezi protein-kódujícími geny, tak přímo v oblastech proteiny-kódujících genů, především v oblasti jejich intronů. Z velké části se tedy jejich geny nachází v oblastech DNA, která bývala dříve označována jako tzv. junk DNA (tzv. odpadní DNA). Dalším enzymatickým štěpením pri-microRNA vzniká asi 70 až 100 nukleotidů dlouhá vlásenka (pre-microRNA), která je transportována do cytoplazmy, v níž dochází k jejímu dalšímu enzymatickému štěpení. Výsledkem je nakonec jednořetězcová molekula mikroRNA, vázaná v enzymatickém komplexu, která se váže především na 3' netranslatovanou oblast (3'-UTR) mRNA dle zásad komplementarity bází. Výsledkem této vazby a působení v enzymatickém komplexu dochází k inhibici translace a dále k případnému enzymatickému štěpení cílových mRNA [1].

### Význam mikroRNA

Objev mikroRNA a jejich regulační funkce se stal přelomovým okamžikem, v němž muselo být přehodnoceno základní dogma molekulární biologie (linie gen-mRNA-protein), a modifikováno v souladu s regulační funkcí mikroRNA. Současně muselo dojít k přehodnocení dřívějšího označení proteiny nekódujících oblastí genomu jako „junk DNA“.

Nezůstalo jen u přehodnocení, ale další výzkumy ukázaly existenci ohromného množství mikroRNA. Každým rokem roste počet nově objevených mikroRNA u různých skupin organismů. U člověka vzrostl počet známých mikroRNA z přibližně jednoho tisíce v roce 2011 k dvojnásobku v roce 2014, a jejich počet neustále stoupá.

Rostou i naše znalosti o jejich působení v organizmu? Fakt, že se mikroRNA podílí na regulaci všech klíčových buněčných funkcí, je znám již delší dobu. MikroRNA regulují procesy buněčného dělení, růstu, metabolismu, apoptózy; souvisí se zánětlivými procesy a imunitním systémem. U nádorových onemocnění jsou mikroRNA spojeny např. s proliferací buněk, migrací, invazivitou, angiogenezí, ale také rezistencí k chemoterapeutickým přípravkům. Velice zjednodušeně bychom mohli klasifikovat dvě skupiny mikroRNA ve vztahu ke karcinogenezi. Tumor-supresorové mikroRNA regulují mRNA onkogenů; v případě nižší exprese takové mikroRNA roste množství onkogenu v buňce. Naopak, onkogenní mikroRNA mají za cíl svého působení tumor supresorové geny, tedy jejich

mRNA. Vyšší exprese onkogenní mikroRNA tak vede k potlačení tumor supresorů.

MikroRNA mohou také specificky reagovat na změny v prostředí (např. léčbu, kouření, potravu) změnou své exprese. Vzhledem k tomu, že jedna mikroRNA může regulovat stovky mRNA, a jednotlivé mRNA mohou být regulovány vícero mikroRNA, je však orientace v jejich funkčním působení poněkud obtížná. Z toho důvodu nebudeme v dalších částech uvádět informace o přesném působení jednotlivých deregulovaných mikroRNA, neboť dosud tyto informace většinou nejsou známy komplexně či vůbec, případně se jejich funkce zásadně liší mezi různými typy nádorů apod.

### Výskyt mikroRNA a jejich klinická aplikace

Klinický význam jakékoli molekuly použitelné pro diagnostické účely je úměrný našim schopnostem její detekce, znalostem její biologické variability, dostatečné úrovni její senzitivity a specifity. Předpokladem je také jasná diferenciální exprese mezi patologickými a kontrolními vzorky, která je detekovatelná nejlépe v časných stádiích onemocnění v diagnosticky relevantních vzorcích (např. krev, plazma/sérum, moč).

MikroRNA, přestože mají především buněčné funkce, mají i další funkce v buněčné signalizaci a jsou přítomny i jako různé extracelulární frakce. Jejich výskyt tak není omezen pouze na buňky a tkáně, ale jsou ve značných množstvích přítomny i v tělních tekutinách. Zde je nutné připomenout jeden základní fakt, totiž, že mikroRNA jsou značně odolné vůči působení RNáz, tedy enzymů štěpících RNA.

**Tab. 1. Přehled počtu mikroRNA a koncentrace celkové RNA u různých tělních tekutin. Upraveno podle Weber et al [2]**

tělní tekutina	koncentrace celkové RNA (µg/l)	počet detekovatelných mikroRNA
plodová voda	570	359
mateřské mléko	47240	429
bronchiální laváž	1128	260
mozkomíšni mok	111	212
kolostrum	585	386
peritoneální tekutina	775	397
plazma	308	349
pleurální tekutina	470	210
sliny	1945	458
seminální tekutina	17770	436
slzy	564	320
moč	94	204

\*Upraveno podle Weber et al [2]. Koncentrace celkové RNA měřena pomocí RNA 6000 Picochip (Agilent 2100 Bioanalyzer). Uveden počet detekovatelných mikroRNA převyšující 80 % průměru exprese.

## Biologická cesta mikroRNA

Na počátku je buňka, ale i v rámci buňky existují orgány původně buněčného původu. V lidských buňkách tedy existují mikroRNA, které se vyskytují nejen v cytoplazmě, ale také v mitochondriích. U tkání existují jak obecně exprimované mikroRNA, tak tkáňově specifické mikroRNA. Oba tyto typy se buď formou řízeného transportu či eliminace, nebo uvolnění při apoptóze, mohou dostat do cirkulace nebo do různých tělních tekutin. Teprve relativně nedávno byla prokázána existence mikroRNA ve 12 tělních tekutinách [2]. Jsou to: mateřské mléko, kolostrum, sliny, seminální tekutina, slzy, moč, plodová voda, mozkomíšní mok, plazma, pleurální tekutina, peritoneální tekutina a bronchiální laváž. Uvedené tekutiny se lišily spektrem a množstvím detekovaných mikroRNA, i koncentrací celkové RNA. Například mateřské mléko a seminální tekutina měly nejvyšší koncentraci RNA, ale největší počet mikroRNA byl nalezen u slin (tab. 1) [2].

Do roku 2010 drtivá většina výzkumu mikroRNA s klinickým zaměřením považovala za hlavní zdroj klinického materiálu pouze vzorky tkání, případně byl výzkum zaměřen na buněčné linie. Výskyt mikroRNA v tělních tekutinách se dříve (mylně) nepředpokládal z důvodu vysoké koncentrace RNáz.

## Zdroje cirkulující a extracelulární mikroRNA u gynekologických malignit

Gynekologická onemocnění, a z našeho hlediska především maligní onemocnění, se stejně jako ostatní nádorová onemocnění vyznačují převahou studií exprese mikroRNA u vzorků tkání či nádorových buněčných linií. Existují však také studie, které sledovaly expresi mikroRNA v séru, plazmě, plné krvi nebo moči, které ukázaly, že právě zde se může skrývat zdroj nových diagnostických markerů, exprimovaných rozdílně u pacientek a kontrolních subjektů. Jedná se o tzv. cirkulující mikroRNA, jejichž dvě hlavní skupiny představují **nebuněčná frakce mikroRNA** (cell-free microRNAs) obsažená v supernatantu po oddělení buněčných složek centrifugací a **mikroRNA** vázané v buňkách nebo buněčných elementech (např. krevních destičkách) a vyskytující se v tělních tekutinách.

Nebuněčná, tedy extracelulární mikroRNA, je především (cca 90 %) vázaná v komplexu s AGO-proteiny, nebo je obsažená v exozomech či jiných vezikulách, apoptotických těliscích nebo je vázána v lipoproteinových partikulích [3,4]. Tato extracelulární mikroRNA je však samozřejmě původem také z buněk, do vnějšího prostředí se dostává buď aktivním transportem, nebo jako produkt rozpadu buněk.

Všechny tělní tekutiny tedy obsahují dvě složky – buněčnou a nebuněčnou frakci mikroRNA. Označení cirkulující mikroRNA je nejvíce přiléhavé v souvislosti s krevním oběhem, používá se tedy především pro sérum/plazmu, eventuálně plnou krev, případně pro mikroRNA cirkulujících buněk a krevních elementů. U ostatních tělních tekutin není dosud terminologie ustálena, hovoří se tedy o extracelulárních (cell-free) mikroRNA.

Krev jako nejběžnější zdroj diagnostického materiálu obsahuje směs mikroRNA různého původu. MikroRNA byly nalezeny ve všech jejích hlavních složkách – červených a bílých krvinkách i krevních destičkách. V cirkulaci se také vyskytují další buňky; u nádorových onemocnění jsou to především nádorové buňky včetně buněk kmenových. Separací krevních buněk a buněčných elementů získáme plazmu nebo sérum, které obsahují velké množství extracelulárních mikroRNA.

Moč je zdrojem buněčných i nebuněčných mikroRNA pocházejících z filtrované krevní plazmy a buněk různého původu. U nádorových onemocnění urogenitálního traktu byla poprvé nalezena možnost sledování exprese mikroRNA u moči, v její nebuněčné frakci [2]. Další výzkumy u těchto nádorových onemocnění (často např. karcinom močového měchýře) se však zaměřují především na buňky uvolněné z nádorových tkání obsažené v moči. U ostatních onemocnění nesouvisejících s urogenitálním traktem studie zaměřené na mikroRNA v moči dosud většinou chybí (pro gynekologické nádory viz dále).

## Expresce cirkulujících a extracelulárních mikroRNA u karcinomu ovaria

**Plná krev**, jak jsme uvedli, představuje směs mikroRNA natolik rozdílného původu, že nelze přesně stanovit jejich vzájemné proporce bez dalšího detailního výzkumu. V první takto zaměřené studii z roku 2010 byly mezi 147 deregulovanými mikroRNA z plné krve recidivujících pacientek [5] nalezeny 4 mikroRNA, které byly prokazatelně signifikantně deregulovány, tj. se zvýšenou expresí (**miR-30c1\***) či se sníženou expresí (**miR-342-3p**, **miR-181a\*** a **miR-450b-5p**) u pacientek s karcinomem ovaria ve srovnání s kontrolními pacientkami.

**Sérum a plazma** a mikroRNA v nich přítomné se staly předmětem výzkumů několika nejnovějších studií u karcinomu ovaria. V roce 2008 byla publikována první studie zaměřená na nádorové exozomy v séru pacientek s karcinomem ovaria [6]. V této studii byla nalezena korelace mezi mikroRNA obsaženými v nádorech a v séru, ale EpCAM pozitivní exozomy nebyly detekovatelné v séru kontrolních pacientek. Z toho důvodu se následující studie zaměřily na detekci mikroRNA z celé frakce séra či plazmy. Resnick et al [7] našli **miR-21**, **92**, **93**, **126** a **29a** se zvýšenou expresí, a **miR-155**, **127** a **99b** se sníženou expresí u pacientek s karcinomem ovaria v jejich krevním séru.

Mezi další deregulované mikroRNA nalezené v následujících výzkumech patří **miR-21**, známá onkogenní miRNA, která byla nalezena jako up-regulovaná již dříve v nádorových tkáních ovaria (viz přehledová práce o karcinomu ovaria) [8]. Xu et al [9] prokázali její zvýšenou expresi v séru asociovanou s pokročilými stadii, nižší diferenciací a zkráceným celkovým přežitím pacientek s karcinomem ovaria. Zvýšená exprese v séru byla detekována také u **miR-92a**, jež byla asociována s postižením regionálních lymfatických uzlin a pokročilým stadiem onemocnění [10]. Tři mikroRNA z rodiny **miR-200** (**miR-200a**, **miR-200b** a **miR-200c**) byly nale-

zeny se zvýšenou expresí v séru v jiné studii [11], což odpovídá jejich obvyklé zvýšené expresi v nádorových tkáních ovaria.

V rozsáhlé studii zaměřené na expresi mikroRNA v plazmě u 360 pacientek s karcinomem ovaria a 200 kontrolních pacientek byla u pacientek s karcinomy nalezena vyšší exprese **miR-205**. Dále u nich byla detekována nižší exprese **let-7f**, asociovaná se špatnou prognózou přežití, a při porovnání časných a pokročilých stadií se zvýšená exprese ukázala u stadií III a IV [12]. V jiné studii analyzující 18 serózních karcinomů, 12 kontrol a jejich mikroRNA v séru se ukázala nejvýraznější a nejsignifikantnější snížená exprese u **miR-132**, **miR-26a**, **let-7b**, **miR-145**, a **miR-143** [13].

Karcinom ovaria je typ nádorového onemocnění známý svou heterogenitou a potenciálním vlivem ostatních tkání gynekologického traktu při jeho vzniku [14]. Z tohoto hlediska je zajímavá studie Suryawanshi et al [15], která identifikovala společně deregulované mikroRNA u endometriózy a endometrioidního typu karcinomu ovaria. Jednalo se výhradně o mikroRNA se zvýšenou expresí: **miR-21**, **miR-191**, **miR-16**, **miR-15b**, **miR-1977**, **miR-1979**, **miR-1973**, **miR-1974**, **miR-4284**, a **miR-195**.

Nejnovější studie kombinující metodu „sekvenování nové generace“ a real-time PCR u séra pacientek s karcinomem ovaria, ukázala **miR-22**, **miR-93** a **miR-451** jako up-regulované mikroRNA (první dvě zmíněné jako nejvíce konzistentní), a **miR-106b** jako signifikantně down-regulovanou, tedy se sníženou expresí [16].

Jiná nejnovější studie [17], analyzující mikroRNA v séru pacientek s karcinomem ovaria, přinesla seznam mikroRNA převážně se sníženou expresí. U těchto mikroRNA

byla nalezena minimálně desetinásobně snížená exprese: **miR-106a**, **miR-126**, **miR-146a**, **miR-150**, **miR-16**, **miR-17**, **miR-19b**, **miR-20a**, **miR-223**, **miR-24**, a **miR-92a**. Všimněme si posledně jmenované mikroRNA, která se v dřívějších studiích ukázala obvykle jako up-regulovaná, a to i v zorků tkání. Příčiny této nekonzistence nebyly dosud vysvětleny. V uvedené studii byly nalezeny 3 up-regulované mikroRNA (**miR-1274a**, **miR-625-3p**, a **miR-720**), ale neměly dobrou diskriminační schopnost mezi nádorovými a kontrolními vzorky.

Přehled deregulovaných cirkulujících a extracelulárních mikroRNA u karcinomu ovaria je uveden v tab. 2.

### Expres cirkulujících mikroRNA u karcinomu endometria

Studii zaměřených na cirkulující mikroRNA u karcinomu endometria nebylo dosud publikováno mnoho. První z nich [18] našla zvýšenou expresi **miR-99a**, **miR-100** a **miR-199b** v plazmě, a asociaci jejich snížené exprese se zvýšenou expresí mTOR kinázy v tkáňích endometrioidního typu karcinomu endometria. Kombinovaná exprese **plazmatických miR-99a/miR-199b** vedla k dosažení 88% senzitivity a 93% specificity.

Autoři se v další studii zaměřili na analýzu 16 mikroRNA, a zjistili, že dvě mikroRNA byly exprimovány méně (**miR-9** a **miR-301b**) a sedm mikroRNA více (**miR-92a**, **miR-141**, **miR-200a**, **miR-203**, **miR-449a**, **miR-1228**, a **miR-1290**) v plazmě u nádorových pacientek ve srovnání s kontrolními. Kombinovaná exprese **miR-9/miR-1228** a **miR-9/miR-92a**, zjištěná logistickou regresí, se ukázala jako dobrý klasifikátor nádorových a nenádorových vzorků plazmy (hodnoty AUC ~0.9) [19]. Rozsáhlá,

Tab. 2. Přehled deregulovaných cirkulujících a extracelulárních mikroRNA u karcinomu ovaria

zvýšená exprese mikroRNA	snížená exprese mikroRNA	typ vzorku	citace
miR-16, miR-30c-1*, miR-187, miR-191, miR-383, miR-423-3p, miR-499-3p, miR-574-5p, miR-1181, miR-1228, miR-1253, miR-1254, miR-1289, miR-1908, miR-1915	miR-28-3p, miR-29a, miR-106b, miR-138-2*, miR-146a, miR-155, miR-181a*, miR-181a-2*, miR-192, miR-342-3p, miR-450b-5p, miR-616*, miR-628-5p, miR-1287, let-7f-1*	plná krev	[5]
miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214		EpCAM-pozitivní exozómy v krevním séru	[6]
miR-21, miR-29a, miR-92, miR-93, miR-126	miR-99b, miR-127, miR-155	krevní sérum	[7]
miR-21		krevní sérum	[9]
miR-92		krevní sérum	[10]
miR-200a, miR-200b, miR-200c		krevní sérum	[11]
miR-205	let-7f	krevní plazma	[12]
	miR-132, miR-26a, let-7b, miR-145, and miR-143	krevní sérum filtrované přes 0.2 µm filtr	[13]
miR-22, miR-93	miR-106b	krevní sérum	[16]
miR-1274a, miR-625-3p, miR-720	miR-106a, miR-126, miR-146a, miR-150, miR-16, miR-17, miR-19b, miR-20a, miR-223, miR-24, and miR-92a, miR-106b, miR-191, miR-193a-5p, miR-30b, miR-30a-5p, miR-30c, miR-320, and miR-328	krevní plazma (ultracentrifugovaná bez exozómů)	[17]
miR-92a	miR-106b	moč (cell-free)	[21]

Pozn.: Tučně uvedeny nejkonzistentnější deregulované mikroRNA po Benjaminově-Hochbergově adjustaci dat.

nejnovější profilační studie vzorků séra identifikovala mezi 754 mikroRNA čtyři up-regulované mikroRNA (**miR-222**, **miR-223**, **miR-186** a **miR-204**). Následně z nich odvozená kombinovaná exprese vedla k vysokému AUC: 0,927 [20].

### Expese mikroRNA v moči u karcinomu ovaria a endometria

Náš výzkumný tým se zabývá expresí mikroRNA v moči u gynekologických malignit již několik let. Výsledkem naší pilotní studie bylo zjištění, že v moči lze nalézt a kvantifikovat různé mikroRNA, liší se expresí mezi nádorovými a kontrolními vzorky. Ve frakci extracelulární (cell-free) mikroRNA v moči jsme našli **miR-92a** signifikantně up-regulovanou u karcinomu ovaria, a **miR-106b** down-regulovanou jak u karcinomu ovaria, tak u karcinomu endometria. V této studii s omezeným počtem vzorků jsme nenalezli signifikantní rozdíly mezi před- a po-operacími vzorky moči, stejně tak se nepodařilo nalézt signifikantní rozdíly mezi čistě exozomálními mikroRNA mezi patologickými a kontrolními vzorky, a to ani u karcinomu ovaria, ani u karcinomu endometria [21]. Jedná se o první takto zaměřenou studii u gynekologických malignit.

Přehled deregulovaných cirkulujících a extracelulárních mikroRNA u karcinomu endometria je uveden v tab. 3.

### Expese cirkulujících mikroRNA u karcinomu cervixu

První studie zaměřená na expresi mikroRNA v séru u karcinomu cervixu byla publikována v roce 2012. V ní byla u nádorových vzorků nalezena snížená exprese **miR-218**, jakožto jediné testované mikroRNA, která byla asociována s pozdními stadii a metastázami v lymfatických uzlinách [22]. Další recentní práce byly zaměřeny na testování více druhů mikroRNA. Ve studii Chen et al [23] bylo analýzou 89 mikroRNA zjištěno šest mikroRNA

se zvýšenou expresí (**miR-1246**, **miR-20a**, **miR-2392**, **miR-3147**, **miR-3162-5p**, a **miR-4484**) jak ve vzorcích tkání, tak ve vzorcích séra. Pomocí těchto mikroRNA bylo možné predikovat metastázy v lymfatických uzlinách s vysokou senzitivitou a specificitou.

V následné studii byla sledována exprese **miR-20a** a **miR-203** v séru pacientek s karcinomem cervixu [24]. Ukázalo se, že obě sledované mikroRNA v séru měly zvýšenou expresi u patologických vzorků. Pro odlišení pacientek s metastatickým postižením lymfatických uzlin od negativních pacientek byla **miR-20a** vhodnější (AUC 0,734 ± 0,058) než **miR-203** (AUC 0,658 ± 0,061).

Přehled deregulovaných cirkulujících a extracelulárních mikroRNA u karcinomu cervixu je uveden v tab. 4.

### Závěr

Malé regulační molekuly, mikroRNA, mohou být přítomny nejen v buňkách a tkáních, ale také v různých tělních tekutinách. Jejich deregulovaná exprese byla nalezena i u gynekologických nádorových onemocnění, jako jsou karcinom ovaria, karcinom endometria i karcinom cervixu. Zvýšená nebo snížená exprese konkrétních mikroRNA v plné krvi, séru, plazmě a moči pacientek s nádorovým onemocněním ve srovnání s kontrolními pacientkami se tak může stát základem nových diagnostických postupů u těchto gynekologických malignit.

*Výzkum gynekologických nádorových onemocnění byl podpořen projekty Univerzity Karlovy v Praze (PRVOUK-P27/LF1/1) a Ministerstva zdravotnictví ČR (FN Brno, FNBr 65269705). Dále děkujeme za podporu našeho výzkumu Nadačnímu fondu Avast, a společností Ferona, a.s. a ČEPS, a.s.*

### Literatura

1. Iorio M, Croce C. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4(3): 143–159.

Tab. 3. Přehled deregulovaných cirkulujících a extracelulárních mikroRNA u karcinomu endometria

zvýšená exprese mikroRNA	snížená exprese mikroRNA	typ vzorku	citace
miR-99a, miR-100, miR-199b		krevní plazma	[18]
miR-92a, miR-141, miR-200a, miR-203, miR-449a, miR-1228, miR-1290	miR-9 and miR-301b	krevní plazma	[19]
miR-222, miR-223, miR-186, miR-204		krevní sérum	[20]
	miR-106b	moč (cell-free)	[21]

Tab. 4. Přehled deregulovaných cirkulujících a extracelulárních mikroRNA u karcinomu cervixu

zvýšená exprese mikroRNA	snížená exprese mikroRNA	typ vzorku	citace
	miR-218	krevní sérum	[22]
miR-1246, miR-20a, miR-2392, miR-3147, miR-3162-5p and miR-4484		krevní sérum	[23]
miR-20a, miR-203		krevní sérum	[24]

2. Weber JA, Baxter DH, Zhang SL et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem* 2010; 56(11): 1733–1741.
3. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles* 2013; 2: 20360. Dostupné z DOI: <http://doi: 10.3402/jev.v2i0.20360>.
4. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(11): 460–465.
5. Hausler SFM, Keller A, Chandran PA et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer* 2010; 103(5): 693–700.
6. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1): 13–21.
7. Resnick KE, Alder H, Hagan JP et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; 112(1): 55–59.
8. Zavesky L, Jancarkova N, Kohoutova M. Ovarian cancer: Origin and factors involved in carcinogenesis with potential use in diagnosis, treatment and prognosis of the disease. *Neoplasma* 2011; 58(6): 457–468.
9. Xu YZ, Xi QH, Ge WL et al. Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013; 14(2): 1057–1060.
10. Guo F, Tian J, Lin Y et al. Serum microRNA-92 expression in patients with ovarian epithelial carcinoma. *J Int Med Res* 2013; 41(5): 1456–1461.
11. Kan, CWS, Hahn MA, Gard GB et al. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 627. Dostupné z DOI: <http://doi: 10.1186/1471-2407-12-627>.
12. Zheng H, Zhang L, Zhao Y et al. Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e77853. Dostupné z DOI: <http://doi: 10.1371/journal.pone.0077853>.
13. Chung YW, Bae HS, Song JY, et al. Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patients. *Int J Gyn Cancer* 2013; 23(4): 673–679.
14. Erickson BK, Conner MG, Landen Jr CN. The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 209(5): 409–414.
15. Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM et al. Plasma MicroRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19(5): 1213–1224.
16. Ji T, Zheng ZG, Wang FM et al. Differential microRNA expression by solexa sequencing in the sera of ovarian cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(4): 1739–1743.
17. Shapira I, Oswald M, Lovecchio J et al. Circulating biomarkers for detection of ovarian cancer and predicting cancer outcomes. *Br J Cancer* 2014; 110(4): 976–983.
18. Torres A, Torres K, Pesci A et al. Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer* 2012; 12: 369. Dostupné z DOI: <http://doi: 10.1186/1471-2407-12-369>.
19. Torres A, Torres K, Pesci A et al. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer* 2013; 132(7): 1633–1645.
20. Jia W, Wu Y, Zhang Q et al. Identification of four serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential non-invasive biomarkers for endometrioid endometrial cancer. *Oncol Lett* 2013; 6(1): 261–267.
21. Závěský L, Jandáková E, Turyna R et al. Evaluation of cell-free urine microRNAs expression for the use in diagnosis of ovarian and endometrial cancers. A pilot study. [přijato k publikaci/accepted for publication].
22. Yu J, Wang Y, Dong R et al. Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(4): 671–674.
23. Chen J, Yao D, Li Y et al. Serum microRNA expression levels can predict lymph node metastasis in patients with early-stage cervical squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2013; 32(3): 557–567.
24. Zhao S, Yao D, Chen J et al. Circulating miRNA-20a and miRNA-203 for screening lymph node metastasis in early stage cervical cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17(8): 631–636.

*Doručeno do redakce dne 8. 10. 2014*

*Přijato po recenzi dne 18. 11. 2014*

**RNDr. Luděk Závěský, Ph.D.**  
✉ [ludek.zavesky@gmail.com](mailto:ludek.zavesky@gmail.com)

Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN, Praha  
[www.lf1.cuni.cz](http://www.lf1.cuni.cz)  
MUDr. Eva Jandáková  
MUDr. Vít Weinberger  
MUDr. Luboš Minář  
[www.fnbno.cz](http://www.fnbno.cz)  
MUDr. Radovan Turyna  
[www.upmd.cz](http://www.upmd.cz)  
MUDr. Lucie Langmeierová  
[www.vfn.cz](http://www.vfn.cz)