

KRAŻĄCE mikroRNA – NOWA KLASA BIOMARKERÓW DIAGNOSTYCZNO-PROGNOSTYCZNYCH W PRZEBIEGU CHORÓB NOWOTWOROWYCH

CIRCULATING microRNAs – A NEW CLASS OF DIAGNOSTIC
AND PROGNOSTIC BIOMARKERS IN NEOPLASTIC DISEASES

Michał BUDZYŃSKI, Anna GREENDA, Agata A. FILIP

Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Streszczenie: Cząsteczki mikroRNA biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Są produktami genów jądrowych i występują wewnątrzkomórkowo, gdzie wyciszają translację bądź przyczyniają się do degradacji poszczególnych mRNA. W ostatnich latach wykazano, że miRNA występują również w surowicy/osoczu, mleku czy moczu. Dotychczas poznano niektóre mechanizmy umożliwiające przedostawanie się tych cząsteczek do płynów ustrojowych, a ich obecność jest wykorzystywana w badaniach nad nowotworami. Okazało się, że miRNA mogą służyć jako biomarkery do wczesnego wykrywania tych chorób, monitorowania ich przebiegu czy oceny radykalności zabiegów chirurgicznych. Profilowanie ekspresji miRNA w surowicy/osoczu wydaje się być stosunkowo prostą, czułą i specyficzną metodą diagnozowania i określania stadium zaawansowania poszczególnych nowotworów. Potencjalnie czyni to z badania tych cząsteczek nieinwazyjną metodę wykrywania zmian nowotworowych, które nie są widoczne przy zastosowaniu standardowych metod obrazowania, takich jak tomografia komputerowa. Jest to niezwykle istotne, ponieważ wczesne wykrycie guza może warunkować skuteczną terapię i możliwość wyleczenia. Obecnie prowadzone są badania w kierunku określania profili wybranych miRNA, których zaburzona ekspresja najlepiej będzie charakteryzowała dany typ nowotworu. Czułość i specyficzność testów wykorzystujących surowicę/osoczę do profilowania miRNA jest o wiele większa niż w przypadku standardowych markerów nowotworowych, takich jak CA-19-9, alfa-fetoproteina czy CEA. Potrzeba jednak wielu badań na dużych grupach chorych z poszczególnymi typami nowotworów, aby profilowanie ekspresji mikroRNA w surowicy/osoczu mogło być stosowane w codziennej praktyce klinicznej. Niniejsza praca przedstawia przegląd doniesień naukowych z ostatnich lat, których przedmiotem było badanie użyteczności cząsteczek mikroRNA uwalnianych do krwiobiegu jako wartościowych, swoistych i łatwych do wykrycia wskaźników, mogących przyczynić się do skuteczniejszej diagnostyki, oceny rokowania oraz wyboru strategii terapeutycznej w wielu typach nowotworów.

Słowa kluczowe: mikroRNA, surowica, osocze, mikropęcherzyki, markery nowotworowe

Summary: MicroRNAs take part in posttranscriptional regulation of gene expression. They are encoded by nuclear genes and occur intracellularly where they inhibit translation or contribute to degradation of selected mRNAs. Recently it was found that miRNAs occur in blood serum/plasma, milk and urine as well. Some mechanisms enabling their transfer to body fluids have been described. Circulating microRNAs are used in cancer studies and they can serve as biomarkers for early detection of diseases, monitoring their course and evaluation of tumor resection radicality. MiRNA expression profiling in serum/plasma seems to be a simple, sensitive and specific method for diagnosis and staging of particular cancers. That is why the assessment of expression of these particles has a great potential to become a non-invasive method of neoplasia detection which is impossible using standard visualization techniques like computed tomography. It is vital because early diagnosis may condition effective therapy and complete remission achievement. Presently, scientists attempt to describe panels of chosen miRNAs whose dysregulated expression would best characterize particular types of cancer. Sensitivity and specificity of tests which use blood serum/plasma for miRNA profiling are much better than those for standard tumor markers like CA19-9 (cancer antigen 19-9), AFP (alpha fetoprotein) or CEA (carcinoembryonic antigen). However, many studies on large cohorts are still necessary to apply miRNA expression profiling in serum/plasma in everyday clinical practice. This paper presents a review of new scientific reports focused on usefulness of microRNAs released to blood as valuable, specific and easy to detect markers that can improve the effectiveness of diagnosis, prognosis evaluation and the choice of therapeutic strategy in many cancers.

Key words: microRNAs, serum, plasma, microvesicles, tumor markers

WSTĘP

MikroRNA to krótkie, niekodujące, jednoniciowe cząsteczki o długości 19-22 nt, biorące udział w negatywnej, potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Występują one w świecie roślin i zwierząt. Mają ogromne znaczenie dla organizmów przez zaangażowanie w procesy komórkowe takie jak różnicowanie i dojrzewanie komórek, proliferacja, kontrola cyklu komórkowego, angiogeneza czy apoptoza [45, 49]. Ich działanie jest możliwe dzięki zjawisku interferencji między miRNA i mRNA [20]. W bazie miRBase Sanger w wersji 20 jest zarejestrowanych ponad dwa i pół tysiąca ludzkich, dojrzałych sekwencji miRNA (www.mirbase.org). Cały czas prowadzone są badania, które z pewnością przyczynią się do poznania i opisanie kolejnych.

MikroRNA są produktem genów jądrowych rozsianych po całym genomie człowieka. Odsetkowo jest ich około 5%. Mogą występować jako samodzielne lub jako policistronowe jednostki transkrypcyjne. Geny miRNA występują w eksonach genów strukturalnych, regionach UTR (ang. *Untranslated Region*) czy niekodujących sekwencjach intronowych [29, 46, 80]. W ostatnim przypadku nazywane są mirtronami, a mechanizm powstawania dojrzałych mikroRNA różni się nieco od tradycyjnego szlaku [29].

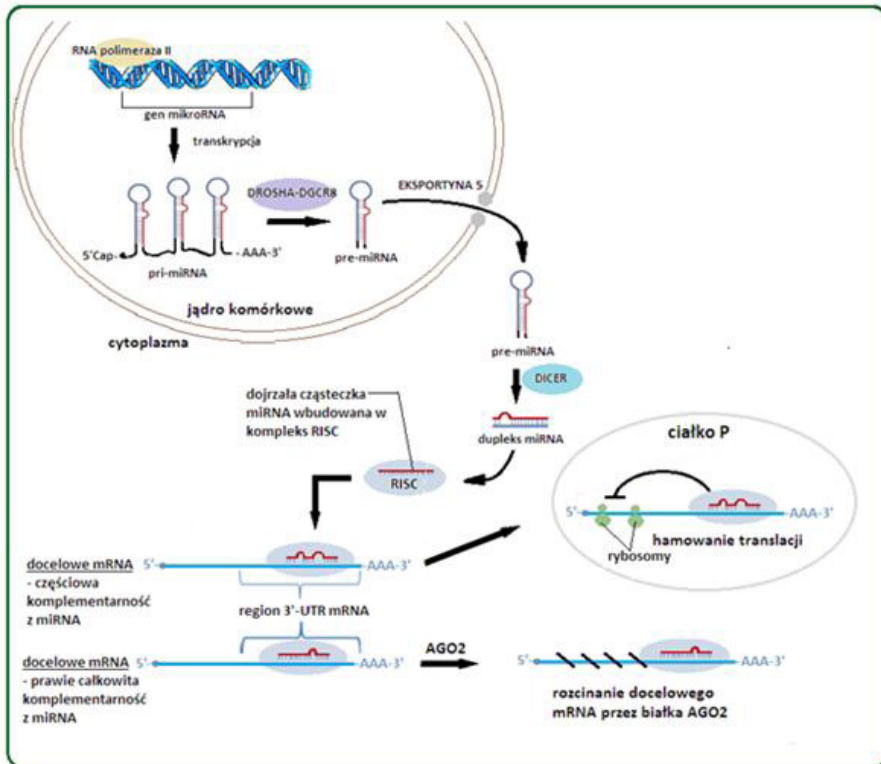
Transkrypcja jest pierwszym etapem biogenezy miRNA. Przeprowadza ją RNA polimeraza II, właściwa dla genów kodujących białka (ryc. 1) [113]. Niektóre geny miRNA są transkrybowane przez RNA polimerazę III [18]. W wyniku transkrypcji powstają pierwotne transkrypty czyli pri-miRNA. Przyjmują one dwuniciową for-

mę szpilek do włosów. Kilka takich struktur może być połączonych ze sobą krótkimi odcinkami jednoniciowego RNA. Pri-miRNA są poliadenylowane i zawierają na końcu 5' czapkę. Mają długość kilku kilo par zasad [48].

Kolejnym etapem jest modyfikacja pri-miRNA w jądrze komórkowym przez mikroprocesor, składający się z białka jądrowego DGCR8 (ang. *Di George syndrome Critical Region gene 8*) i enzymu DROSHA. Pierwszy składnik rozpoznaje pierwotny transkrypt, przyłącza się do jednoniciowych fragmentów pri-miRNA i orientuje katalityczną domenę DROSHA (RNaza III) w taki sposób, aby możliwe było jego przecięcie w odpowiednim miejscu [48]. Tak powstają pre-miRNA, czyli pojedyncze już struktury spinek do włosów o długości około 70 nt. W tej fazie posiadają one pętle macierzyste, które w cytoplazmie zostaną usunięte. Mają także jednoniciowe dwunukleotydowe nawisy na końcu 3', odgrywające ważną rolę przy przenoszeniu pre-miRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy przez białka transportujące eksportyny 5 [39]. Nawisy są niezbędne również do rozpoznania i cięcia pre-miRNA przez enzym DICER, który jest RNazą III [108]. W wyniku jej działania cząsteczka pre-miRNA przekształcana jest w dupleks, na który składają się dwie nici o długości 19-22 nt. Jedna z nich jest właściwą cząsteczką miRNA, natomiast druga nazywana jest nicią pasażerską i zwykle jest degradowana. W piśmiennictwie jest ona oznaczana gwiazdką. Niekiedy ona także może być funkcjonalna i pełnić rolę cząsteczki miRNA w regulacji ekspresji genów [11].

Dupleks miRNA jest następnie wbudowywany w białkowe kompleksy RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), gdzie dokonywany jest wybór odpowiedniej nici [34]. Kompleksy wyciszające translację (RISC) z załadowaną dojrzałą nicią miRNA są funkcjonalną całością, mającą zdolność do hamowania translacji mRNA lub jego degradacji (ryc. 1). RISC to wieloskładnikowe kompleksy. Zawierają białka strukturalne i enzymatyczne, warunkujące prawidłową regulację ekspresji genów. Wśród nich należy wyróżnić białka AGO2 (ang. *Argonaute RISC catalytic component 2*), mające właściwości endorybonukleolityczne [67]. Oznacza to, że mogą degradować docelowe mRNA lub brać udział w hamowaniu translacji [67]. Możliwe jest również połączenie obu tych procesów.

Decydujący wpływ na to, czy i które mRNA zostanie zdegradowane, ma dojrzała cząsteczka miRNA w RISC, a w szczególności tzw. „region seed” mikroRNA. Jest to krótki 6-8-nukleotydowy odcinek na końcu 5' dojrzałej cząsteczki, warunkujący rozpoznanie docelowego mRNA [50]. MikroRNA przyłącza się do regionów 3'UTR mRNA zgodnie z zasadą komplementarności. Sekwencja miRNA może być niemal całkowicie lub tylko częściowo zgodna z odcinkami 3'UTR. Ma to znaczenie przy wyborze mechanizmu regulacyjnego. Całkowita komplementarność skutkuje degradacją mRNA, natomiast częściowa powoduje hamowanie translacji [50]. Często obserwuje się represję mRNA, na którym umiejscowione są już rybosomy (ryc. 1). Takie kompleksy przechodzą do ciałek P, gdzie są przechowywane, a następnie degradowane [59]. Mechanizmy związane z tym procesem nie są jednak dokładnie poznane.



RYCINA 1. Biogeneza i działanie cząsteczek mikroRNA (opis w tekście)

FIGURE 1. Biogenesis and activity of microRNAs

Negatywna regulacja ekspresji genów przez mikroRNA jest niezwykle istotna. Podaje się, że około 1/3 genów jest kontrolowanych przez te cząsteczki [34, 73]. Należy również zaznaczyć, że jeden rodzaj mikroRNA może kontrolować około dwustu genów [34]. Jeden konkretny gen natomiast może być regulowany przez wiele mikroRNA. Cząsteczki te docelowo zapewniają prawidłową ilość poszczególnych białek przez udział w degradowaniu transkryptów, których jest nadmiar lub które nie są już potrzebne. Zaburzona ekspresja miRNA wpływa zatem negatywnie na równowagę białkową w komórce. Dobrym przykładem jest antyapoptotyczna proteina BCL2 (ang. *B-cell CLL/lymphoma 2*) w limfocytach chorych z przewlekłą białaczką limfocytową. Przy obniżonej ekspresji *miR-15a* i *miR-16-1* obserwuje się zwiększoną ilość BCL2, co przyczynia się do akumulacji białaczkowych limfocytów [9].

Nieprawidłowy profil ekspresji mikroRNA obserwowany jest w wielu typach nowotworów, a jego badanie może być użytecznym narzędziem diagnostycznym [5]. Można do tego celu wykorzystać komórki pobrane z guza, limfocyty krwi ob-

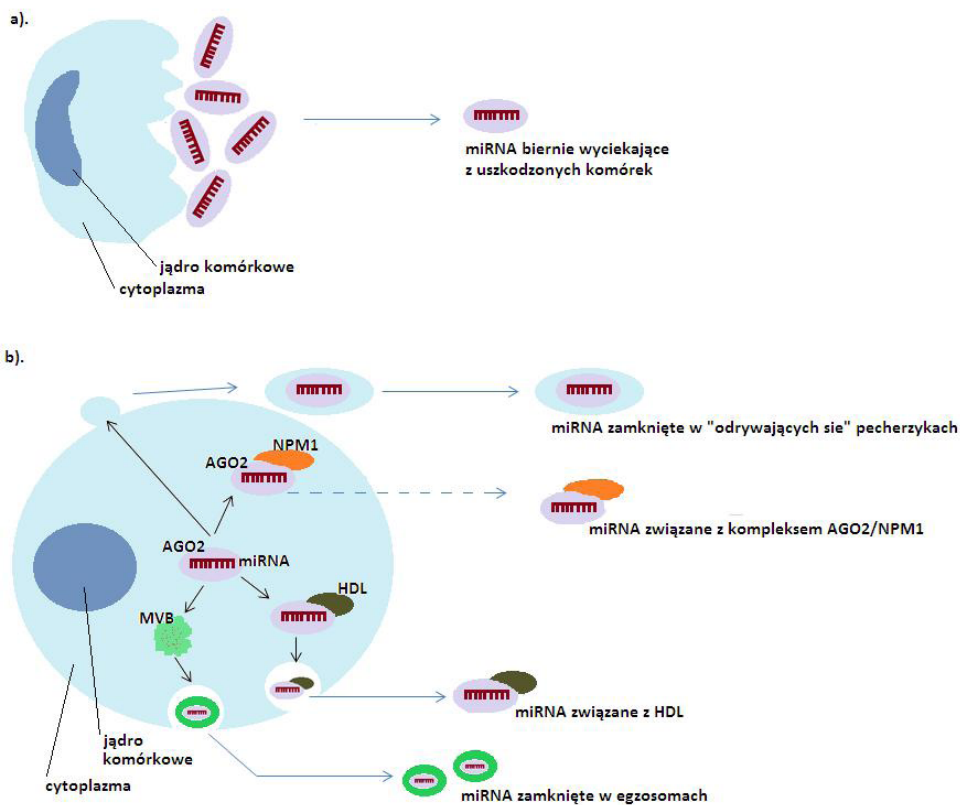
wodowej czy surowicy lub osocze [13, 52, 114]. W ostatnich dwóch przypadkach profilowanie dotyczy krążących mikroRNA. Ich znaczenie starano się przedstawić w niniejszej pracy. Zwrócono również uwagę na problemy i wątpliwości związane z tymi cząsteczkami obecnymi w surowicy/osoczu chorych na różne typy nowotworów.

ŹRÓDŁA KRAŻĄCYCH mikroRNA I MECHANIZMY ICH UWALNIANIA

Obecnie liczne doniesienia potwierdzają obecność cząsteczek mikroRNA i innych niskocząsteczkowych RNA w środowisku zewnątrzkomórkowym w wyniku ich uwolnienia z komórek i tkanek. Krążą one w wysoce stabilnej formie w różnych płynach ustrojowych, takich jak osocze, surowica, ślina, mocz i mleko. Pytanie, czy związane z transformacją nowotworową mikroRNA przedostają się tam w wyniku śmierci i lizy komórek nowotworowych, czy też podlegają aktywnej sekrecji z tych komórek nie znalazło do tej pory jednoznacznej odpowiedzi. Generalnie wyróżnia się 3 podstawowe mechanizmy, dzięki którym niskocząsteczkowe RNA mogą migrować do płynów ciała: bierny wyciek cząsteczek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, ich uwalnianie w strukturze mikropęcherzyków oraz sekrecja w postaci kompleksów z białkami (ryc. 2) [14].

Mechanizm pasywnego uwalniania jest związany z degradacją komórek na skutek ciężkiego uszkodzenia tkanek, przewlekłego stanu zapalnego, apoptozy bądź nekrozy komórek i zwiększonego wskaźnika lizy komórek, zwłaszcza nowotworowych, lub z komórek o krótkim okresie półtrwania, jak płytki krwi. W ten sposób do krwiobiegu mogą dostawać się np. cząsteczki mikroRNA-208, które są charakterystycznym wskaźnikiem uszkodzenia tkanki mięśniowej serca [37].

Według wielu autorów podstawowym sposobem przedostawania się mikroRNA do płynów ustrojowych jest ich aktywny transport z komórek w strukturach zwanych mikropęcherzykami, które dzieli się na dwie zasadnicze grupy – pęcherzyki „odrywające się” (ang. *shedding vesicles*) i egzosomy, różniące się wielkością i mechanizmem oddzielania się od komórki macierzystej [14]. Pierwsze z nich są większe i uwalniają się do przestrzeni międzykomórkowej w wyniku zewnętrznego przybrania struktury oczka i odszczepiania od błony komórkowej [16]. Dominującą formą są zaś egzosomy o średnicy 30-100 nm, a zdolność do ich sekrecji mają przede wszystkim retikulocyty, komórki dendrytyczne, limfocyty T i B, komórki tuczne, nowotworowe i nabłonkowe [96]. Ich tworzenie rozpoczyna się, gdy białka błony komórkowej przemieszczają się do wczesnych endosomów w wyniku tworzenia oczek skierowanych do wnętrza komórki. Następnie wpuklanie się błony endosomów prowadzi do powstania drobnych pęcherzyków w ich świetle – formują



RYCINA 2. Sposoby uwalniania mikroRNA z komórek

FIGURE 2. Mechanisms of microRNA releasing from cells

się ciała wielopęcherzykowe (ang. *Multivesicular Body*, MVB). Częsteczki wewnątrz pęcherzyków mogą być albo przeznaczone do degradacji w wyniku zlania się MVB z lizosomami, albo wydzielane na zewnątrz poprzez fuzję MVB z błoną plazmatyczną i uwolnieniem z ich wnętrza dojrzałych egzosomów [90].

Podstawowa funkcja egzosomów związana jest z komunikacją międzykomórkową. Ponieważ mogą one ulegać scaleniu i uwalniać swoją zawartość do innych, niekiedy oddalonych komórek, wpływają na przebieg różnorodnych procesów w komórkach-biorcach [96]. Mikropęcherzyk przetransportowany do komórki docelowej jest funkcjonalnie aktywny w nowej lokalizacji i ułatwia poziomy transfer cząsteczek bioaktywnych z komórki do komórki lub aktywuje receptory na błonie plazmatycznej komórki-biorcy za pomocą ligandów powierzchniowych [14]. Poza miRNA mikropęcherzyki zawierają także mRNA, lipidy i białka, które są albo zamknięte w ich wnętrzu albo zlokalizowane na powierzchni. RNA przekazywany z jednej ko-

mórki do drugiej (tzw. egzosomalny wahadłowy RNA, esRNA) może potencjalnie oddziaływać na biosyntezę białek w docelowych komórkach [96]. MikroRNA po przedostaniu się do docelowych komórek hamują ekspresję genów według tej samej zasady co komórkowe miRNA. Egzozomy uwalniane z pewnych komórek układu odpornościowego, np. komórek dendrytycznych i limfocytów B, mogą pośredniczyć w tworzeniu swoistej odpowiedzi immunologicznej na patogeny i komórki nowotworowe [54]. Z drugiej strony produkcja egzosomów i ich zawartość są regulowane poprzez sygnały docierające do komórki macierzystej z zewnątrz. Świadczy o tym sekrecja przez komórki nowotworowe, poddane działaniu hipoksji, mikropęcherzyków o zwiększonym potencjale angiogenetycznym i metastatycznym [74]. Sugeruje to zdolność przystosowywania się komórek nowotworowych do niedotlenienia poprzez wydzielanie mikropęcherzyków stymulujących angiogenezę i ułatwiających tworzenie przerzutów do bardziej korzystnego środowiska [74].

Wydzielanie egzosomalnych miRNA z komórek wyjściowych jest możliwe dzięki obecności komórkowych ceramidów, które stymulują proces sekrecji mikropęcherzyków [43]. Z kolei biosynteza ceramidów kontrolowana jest przez neutralną sfingomielinazę (nSMaza). Stwierdzono, że traktowanie linii komórek HEK293 (linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych ludzkich komórek nerkowych) inhibitorem nSMazy prowadzi do zmniejszenia poziomu zewnątrzkomórkowych cząsteczek miR-16 i miR-146a, podczas gdy ich ekspresja wewnątrz komórek pozostaje niezmienną [43]. Wzrost sekrecji mikroRNA regulowany przez sfingomielinazę może być związany ze wzrostem liczby egzosomów uwalnianych przez komórkę bądź z większą ilością cząsteczek miRNA pakowanych do tych struktur. Sekrecja egzosomów nie zależy zaś od udziału kompleksu ESCRT (ang. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) – kompleksu wielobiałkowego odgrywającego kluczową rolę w akumulacji egzosomów transportowanych do lizosomów [92]. Nie do końca zrozumiały i poznany jest natomiast mechanizm przenikania cząsteczek miRNA do wnętrza pęcherzyków „odrywających się”.

Pakowanie cząsteczek miRNA do mikropęcherzyków nie odbywa się w sposób losowy. Istnieją specyficzne populacje mikroRNA, które wybierane są preferencyjnie i umieszczane wewnątrz tych struktur [14]. Podejrzewa się, że ta selektywność może być związana ze złośliwością nowotworu. W przypadku miR-451 i miR-1246 bardzo duża ich ilość syntetyzowana przez nowotworowe komórki złośliwe nabłonka gruczołu piersiowego podlega sekrecji, podczas gdy w takich samych komórkach niezłośliwych te cząsteczki są zatrzymywane [75]. Wskazuje się zatem na istnienie różnic w komórkowych i pozakomórkowych profilach ekspresji miRNA w określonych schorzeniach, a ich ekspresja w płynach organizmu nie musi odzwierciedlać poziomu komórkowego. Przypuszcza się też, że mikropęcherzyki mogą służyć komórce do selektywnego usuwania z jej wnętrza uszkodzonych cząsteczek i fragmentów komórkowych, o czym świadczy obecność w przestrzeni pozakomórkowej fragmentów rRNA, snRNA oraz nieprawidłowo „przetworzonych” mikroRNA [75].

W aktywny transport we krwi i przekazywanie określonych cząsteczek odległym komórkom-biorcom zaangażowane są również lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. *High Density Lipoprotein*, HDL), które mają zdolność łatwego wiązania się z endogennymi mikroRNA [99]. Co więcej, wybrane miRNA mogą być zamknięte wyłącznie we wnętrzu HDL albo egzosomów. Jednakże nie wiadomo w jaki sposób komórki wybierają specyficzne przenośniki dla różnych miRNA. Udowodniono, że nSMaza i ceramidy blokują komórkowe przenoszenie mikroRNA na HDL [99], z drugiej zaś strony ich nadekspresja sprzyja uwalnianiu egzosomów z komórki. Dlatego też sądzi się, że eksport określonych miRNA na drodze egzosomalnej i lipoproteinowej to dwa odrębne i być może przeciwstawne mechanizmy [14].

Pomimo licznych doniesień o obecności cząsteczek mikroRNA wewnątrz mikropęcherzyków, niektórzy autorzy sugerują, że większość z nich przedostaje się do środowiska pozakomórkowego w formie niezwiązanej z egzosomami, ale w kompleksach z białkami komórkowymi wiążącymi RNA. Takim białkiem jest nukleofozmina 1 (NPM1), która wydzielana jest przez komórki ssacze razem z miRNA i przypuszczalnie odgrywa istotną rolę w ochronie tych cząsteczek przed degradacją [102].

Inne badania wskazują zaś, że większość mikroRNA w osoczu krwi i pożywkach kultur komórkowych jest związana z białkiem AGO2 [2,94]. Ponadto Turchinovich i wsp., dzięki analizom techniką Western blot, wykazali, że krążące mikroRNA ulegają immunoprecypitacji z przeciwciałami anti-AGO2 [94]. Przypuszcza się również, że inne białka Argonaute, jak AGO1, AGO3 i AGO4 mogą być sprzężone z zewnątrzkomórkowymi miRNA. Zaprezentowane wyniki mogą świadczyć o tym, iż duża część krążących cząsteczek mikroRNA pochodzi z martwych lub obumierających komórek, a utrzymują się w krążeniu dzięki wysokiej stabilności kompleksu miRNA/AGO2 [94]. Nie ma jednak bezpośrednich dowodów na to, że miRNA zasocjowane z NPM1 czy AGO2 są aktywnie uwalniane z komórek, a także danych mówiących o ich wychwycie przez komórki docelowe. Należy też ustalić czy mikroRNA sprzężone z tymi białkami mogą pochodzić z rozpadu komórek lub z uszkodzonych mikropęcherzyków.

Przypuszcza się, że AGO2 bierze też udział w pakowaniu miRNA do mikropęcherzyków [23]. Białko to jest zasocjowane z innym składnikiem kompleksu RISC niezbędnym do prawidłowego działania miRNA – białkiem GW182, którego wyjątkowo wysoką ekspresję odkryto w egzosomach [23]. Zatem dostarczanie komórkom docelowym składników kompleksu wyciszającego w celu wzmocnienia działania miRNA jest jedną z funkcji mikropęcherzyków.

Eksport miRNA z komórek jest procesem wymagającym dostarczenia energii w postaci wewnątrzkomórkowego ATP. Wprowadzenie do hodowli komórek HepG2 (linia komórek nowotworu wątrobowokomórkowego) silnego inhibitora łańcucha oddechowego – rotenonu skutkuje znacznym zmniejszeniem stężenia ATP w komórkach oraz hamowaniem sekrecji wielu rodzajów mikroRNA do pożywki hodowlanej, natomiast ich ekspresja wewnątrz komórek nie ulega

modyfikacji [102]. Wyjątek stanowią zewnątrzkomórkowe miR-671-3p i miR-943, których poziom nie zmienia się pomimo niedoboru ATP, co sugeruje złożoność mechanizmów uwalniania mikroRNA z komórek. Proces ten natomiast nie jest hamowany w obecności inhibitorów sekrecji białek i egzosomów [102]. Zwiększony eksport wybranych mikroRNA może mieć natomiast związek z ich zwiększoną ekspresją wewnątrz komórek. Są one w stanie aktywnie wydzielać na zewnątrz nie tylko endogenne, ale także egzogenne, wprowadzone za pomocą wektorów ekspresyjnych miRNA [43].

CECHY KRAŻĄCYCH mikroRNA JAKO BIOMARKERÓW I ICH STABILNOŚĆ

W praktyce klinicznej bardzo często oznacza się poziom charakterystycznych biomarkerów znajdujących się w osoczu/surowicy krwi w celu wykrycia choroby, prognozowania jej przebiegu, monitorowania efektów terapeutycznych czy szacowania ryzyka nawrotu choroby nowotworowej. Do najczęściej wykorzystywanych należą substancje białkowe, takie jak alfa-fetoproteina (AFP), ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG), specyficzny antygen sterczowy (PSA), antygen rakocemobryonalny (CEA) czy chromogranina A (CgA) [61]. Jednakże ich użycie jest ograniczone ze względu na dość niską czułość i specyficzność analiz, niepozwalającą precyzyjnie odróżnić określony nowotwór od stanów przednowotworowych czy chorób dotykających inne narządy. Przykładem może być PSA uważany za najbardziej specyficzny z markerów raka stercza, którego podwyższony poziom stwierdza się także w łagodnej hiperplazji prostaty [86]. Z tego względu coraz więcej uwagi zwraca się na krążące mikroRNA, których profile, charakterystyczne dla danego nowotworu, są wysoce specyficzne i pozwalają z dużą czułością potwierdzić obecność choroby i przewidywać jej rozwój.

Niewątpliwie jedną z zalet wykorzystania krążących miRNA jako markerów klinicznych jest mała inwazyjność i łatwość pozyskania materiału biologicznego do badań. W celu otrzymania surowicy/osocza wystarczy pobranie kilku mililitrów pełnej krwi obwodowej, a następnie uzyskanie pożądanej frakcji krwi na drodze wirowania. Należy jednak pamiętać, że postępowanie przedanalizyczne ma bardzo duży wpływ na całkowitą ilość tych cząsteczek w badanym materiale. Szczególnie niekorzystny wpływ może mieć zjawisko hemolizy, która powoduje przedostanie się do frakcji osocza miRNA z rozpadłych erytrocytów i zafałszowuje wyniki [76]. Aby wyeliminować wpływ mikroRNA pochodzących z różnych komórek krwi na poziom krążących miRNA niektórzy autorzy sugerują zbieranie frakcji komórkowej krwi i ocenę ich ekspresji w odniesieniu do liczby poszczególnych komórek [76]. Duży wpływ na uzyskiwane wyniki ma również sposób pozyskiwania surowicy/osocza. Duttagupta i wsp. stosując następujące po sobie wirowania świeżej krwi

obwodowej otrzymali kolejne, coraz czystsze frakcje osocza [17]. Najwyższa ekspresja miRNA stwierdzona została w pierwszym, mętnym supernatancie uzyskanym podczas łagodnego wirowania. Ustalono, że dużą ich część stanowią cząsteczki pochodzenia komórkowego, zanieczyszczające osocze wskutek niedokładnego usunięcia elementów komórkowych [17].

Ważną cechą umożliwiającą wykorzystanie cząsteczek miRNA jako wskaźników diagnostyczno-prognostycznych jest znaczna ich ilość i dostępność w płynach ustrojowych oraz możliwość badania ekspresji z zastosowaniem tradycyjnych narzędzi biologii molekularnej. Chen i wsp. wykryli duże ilości miRNA w osoczu oraz surowicy zarówno osób zdrowych, jak i cierpiących na choroby nowotworowe [13]. Dzięki technice ilościowej qRT-PCR udało się im zidentyfikować i określić poziom około 100 różnych rodzajów mikroRNA i na tej podstawie wyznaczyć charakterystyczne miRNA, których zmieniona ekspresja jest typowa dla raka płuca, jelita grubego i cukrzycy. Dodatkowo, na podstawie analiz ekspresji możliwe staje się wykrycie odmiennych niechorobowych stanów fizjologicznych organizmu, np. ciąży [24]. Ustalono, że poziom mikroRNA powiązanych z rozwojem łożyska (miR-527, miR-520d-5p, miR-526a) jest wyraźnie podwyższony u kobiet ciężarnych, a nadekspresja odzwierciedla stopień zaawansowania ciąży [24].

Podstawowymi metodami analitycznymi w badaniu mikroRNA są technika qRT-PCR i mikromacierze. W pierwszej z nich ocena ekspresji wybranych miRNA możliwa jest pośrednio, dzięki porównaniu poziomu ekspresji badanych cząsteczek w analizowanej próbce do ich poziomu w próbce kontrolnej (kalibratorze) bądź bezpośrednio przez odniesienie uzyskanego wyniku do krzywej wzorcowej [24]. Technika ta pozwala z wysoką czułością i specyficznością ocenić ekspresję określonego typu miRNA występującego w surowicy, w niewielkiej ilości w złożonej mieszaninie różnych cząsteczek RNA [24]. Poza metodą qRT-PCR najczęściej stosowanym narzędziem w badaniach nad mikroRNA jest technologia mikromacierzy, która umożliwia jednoczesną detekcję i szybką analizę ekspresji wszystkich znanych miRNA w próbce. Opiera się ona na hybrydyzacji między komplementarnymi odcinkami kwasów nukleinowych, a jej główną zaletą jest możliwość analizy ogromnej liczby miRNA w tym samym czasie. Można też wykorzystywać technikę Northern blot i hybrydyzację *in situ*, ale ze względu na ich pracochłonność i trudności w prowadzeniu eksperymentów na dużą skalę, obecnie odchodzi się od tych metod.

Cechą charakterystyczną krążących miRNA jest ich niezwykle duża stabilność i odporność na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych. W przeciwieństwie do innych rodzajów RNA są one bardzo odporne na działanie endogennych RNaz obecnych we krwi [13]. Wyizolowane z surowicy mikroRNA nie ulegają degradacji w obecności rybonukleaz i odznaczają się znacznie wyższą trwałością niż takie cząsteczki jak 18S rRNA, 28S rRNA, U6 snRNA oraz mRNA dla GADPH i β -aktyny [13]. Większość surowicznych miRNA wytrzymuje 3-godzinną, a nawet całonocną inkubację z rybonukleazą A, która nie ma większego wpływu na poziom

ich ekspresji, podczas gdy wielkocząsteczkowe RNA ulegają strawieniu już po 3 godzinach [13]. Cecha ta nie dotyczy jednak syntetycznych mikroRNA, które po wprowadzeniu do osocza ulegają natychmiastowej degradacji [68].

Na poziom surowicznych mikroRNA nie ma też większego wpływu temperatura przechowywania preparatu i pH środowiska. Powtarzające się cykle zamrażania i rozmrażania surowicy nie spowodowały wyraźnych zmian w ich zawartości w przeciwieństwie do innych RNA we krwi [13, 76]. Nie odnotowano też istotnych różnic po 3-godzinnym traktowaniu surowicy roztworem o niskim i wysokim pH, odpowiednio pH=1 i 13 [13]. Podobne właściwości mają mikroRNA w osoczu – pozostają stabilne w temperaturze pokojowej przez dobę, a 8 cykli naprzemiennego zamrażania i rozmrażania osocza nie powoduje ich zniszczenia [68].

Stabilność krążących miRNA wynika prawdopodobnie z formy, w jakiej występują w surowicy/osoczu krwi. Działanie ochronne dla mikroRNA być może gwarantuje ich zamknięcie wewnątrz struktury membranowej mikropęcherzyków [43, 96]. Taką zdolność mogą mieć też białka wykazujące powinowactwo do RNA, z którymi krążące mikroRNA tworzą stabilne kompleksy, głównie białko NPM1 [102]. Obydwa te mechanizmy mogą chronić wydzielane miRNA przed degradacją i zapewnić kontrolowane wewnętrzne mikrośrodowisko, dzięki czemu cząsteczki te mogą przemierzać w krwiobiegu duże odległości bez ryzyka uszkodzenia.

KRAŻĄCE mikroRNA JAK BIOMARKERY W WYBRANYCH NOWOTWORACH

MikroRNA jako biomarkery nowotworowe mogą być wykorzystywane we wczesnej diagnostyce chorób nowotworowych, określaniu prognozy czy skuteczności zastosowanej terapii. Mają wiele cech idealnego markera: nieinwazyjność, zmienność ekspresji wybranych miRNA specyficzna dla danego schorzenia, możliwość detekcji w szybki i prosty sposób. Obecnie naukowcy opracowują profile miRNA w surowicy/osoczu, które dobrze charakteryzują określony rodzaj nowotworu, stopień jego zaawansowania i rokowanie. Dalsze badania być może pozwolą w przyszłości na wprowadzenie tych wskaźników do codziennej praktyki klinicznej.

NOWOTWORY TRZUSTKI

Rak trzustki zaliczany jest do najbardziej złośliwych nowotworów ze złym rokowaniem, ze względu na gwałtowny przebieg i brak objawów w początkowym stadium choroby [79]. Późne jej wykrywanie, brak skutecznych narzędzi monitorowania jej rozwoju, wczesna i agresywna inwazja miejscowa oraz wysoki potencjał

przerzutowania sprawiają, że nowotwór ten charakteryzuje się jednym z najgorszych wskaźników całkowitego przeżycia [79]. Dlatego tak istotnym problemem jest odkrycie i wprowadzenie do powszechnej praktyki diagnostycznej efektywnych i łatwych do wykrycia biomarkerów, które pozwoliłyby stwierdzić obecność choroby w początkowym jej etapie i w ten sposób znacząco poprawić wskaźniki przeżycia chorych.

Ekspresja miRNA uwalnianych do krwioobiegu wydaje się być dobrym wskaźnikiem progresji i oceny agresywności raka trzustki, na co wskazują badania. Szereg różnych cząsteczek mikroRNA wykazuje nieprawidłową ekspresję w przebiegu tego schorzenia (tab. 1). W jednym z eksperymentów badanie osocza chorych wykazało aż 37 rodzajów miRNA o obniżonej ekspresji i 54 miRNA ulegających nadekspresji [1]. Spośród cząsteczek o znacznie podwyższonym poziomie ekspresji w porównaniu z próbkami kontrolnymi najczęściej zwraca się uwagę na onkogenne miR-16, miR-21, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-196a oraz miR-210 [58, 101]. Natomiast cząsteczki z rodziny let-7 odznaczają się ekspresją obniżoną [1]. Wang i wsp. zasugerowali, że badanie ekspresji już czterech miRNA w osoczu (miR-21, miR-155, miR-196a, miR-210) może stanowić skuteczne narzędzie do odróżniania chorych cierpiących na gruczolakoraka trzustki od osób zdrowych, z wysoką czułością i specyficznością [101]. Wykazano też, że miR-155 może być dobrym biomarkerem wczesnej neoplazji komórek trzustki, a jego funkcja onkogenna związana jest z hamowaniem działania proapoptotycznego białka TP53INP1 (ang. *Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1*), co zwiększa złośliwość komórek rakowych *in vivo* [25].

Bardzo wiele uwagi w badaniach nad rozwojem nowotworów trzustki przywiązuje się do funkcji mikroRNA-21 oraz miR-221. Funkcjonują one jako onkogeny, co związane jest z ich nadekspresją w przebiegu wielu różnych nowotworów. Genami docelowymi dla miR-21 są m.in. *PTEN* (ang. *Phosphatase and Tensin homolog*) i *PDCD4* (ang. *Programmed cell death protein 4*) o działaniu supresorowym, których obniżona aktywność skutkuje zahamowaniem apoptozy komórek nowotworowych i nabyciem właściwości inwazyjnych. Ponadto wykazano, że ekspresja tych dwu mikroRNA zmienia się pod wpływem stosowania długotrwałej, konwencjonalnej terapii przeciwnowotworowej. Zatem lekooporność raka trzustki może wynikać z nadekspresji *miR-21* i zahamowania aktywności genów regulowanych przez tą cząsteczkę w liniach komórek opornych na leczenie [1].

Jednym z surowicznych czynników pomocnych w wykrywaniu raka trzustki jest marker CA19-9. Obecnie podejmuje się próby określenia skuteczności diagnostycznej tego wskaźnika w powiązaniu z innymi cząsteczkami znajdującymi się w surowicy, potencjalnie przydatnymi w diagnozowaniu nowotworu. Liu i wsp. oznaczali poziomy ekspresji CA19-9 i wybranych mikroRNA w surowicach chorych cierpiących na nowotwór, przewlekły stan zapalny oraz u osób zdrowych. Wykazali, że kombinacja takich biomarkerów, jak CA19-9, miR-16 oraz miR-196a stanowi bardzo skuteczne

i nieinwazyjne narzędzie pozwalające zidentyfikować osoby cierpiące na nowotwór, szczególnie we wczesnym stadium [58].

Istotny potencjał diagnostyczny w przypadku raka trzustki może dotyczyć też miR-210. Ekspresja tej cząsteczki jest indukowana niedoborem tlenu na poziomie tkankowym i koreluje z niepomyślnymi wynikami leczenia w niektórych nowotworach. Udowodniono, że gruczolakorak trzustki cechuje się zwiększonym poziomem hipoksji, a to z kolei skutkuje znacznie zwiększonym poziomem krążących miR-210, gorszą prognozą i większą opornością komórek na chemio- i radioterapię [32].

TABELA 1. Zmiany ekspresji krążących mikroRNA w poszczególnych typach nowotworów
TABLE 1. Changes in expression of some circulating microRNAs in particular types of cancer

Rodzaj cząsteczki mikroRNA	Poziom ekspresji	Źródło
nowotwory trzustki		
miR-21, miR-221	↑	[1]
miR-16, miR-21, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-196a, miR-210	↑	[58][101]
miR-200a, miR-200b	↑	[53]
let-7	↓	[1]
rak jelita grubego		
miR-29a, miR-92a, miR-17-3p	↑	[33][72]
miR-21, miR-221, miR-222	↑	[77]
miR-141	↑	[12]
rak wątrobowokomórkowy		
miR-21, miR-122, miR-223	↑	[91][104]
miR-500	↑	[105]
miR-92a	↑	[65][82]
miR-375, miR-25, let-7f	↑	[51]
miR-16, miR-199a, miR-195	↓	[78]
nowotwory piersi		
miR-195, let-7a, miR-10b	↑	[31]
miR-21	↑	[3][31][83]
miR-155	↑	[31][115]
miR-122	↑	[103]
miR-92a, miR-181a	↓	[83]
miR-375	↓	[103]
rak prostaty		
miR-20b, miR-874, miR-1274a, miR-1207-5p, miR-93, miR-106a	↑	[69]
miR-622, miR-1285	↑	[15]
miR-195, miR-26a, let-7i	↑	[62]
miR-141	↑	[8][26][68]
miR-375	↑	[8]
miR-223, miR-26b, miR-30c, miR-24	↓	[69]
let-7e, let-7c, miR-30c	↓	[15]

Rodzaj cząsteczki mikroRNA	Poziom ekspresji	Źródło
nowotwory płuca		
miR-25, miR-223	↑	[13]
miR-155, miR-197, miR-182	↑	[111]
miR-1254, miR-574-5p	↑	[21]
miR-486, miR-30d, miR-1, miR-499	↑	[35]
nowotwory żołądka		
miR-17-5p, miR-21, miR-106a, miR-106b	↑	[93]
miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34, miR-423-5p	↑	[60]
miR-221, miR-744, miR-376c	↑	[84]
miR-21, miR-223, miR-451, miR-486	↑	[42][55]
miR-200c	↑	[97]
let-7a	↓	[93]
miR-218	↓	[42][55]
rak przelyku		
miR-10a, miR-22, miR-100, miR-148b, miR-223, miR-133a, miR-127-3p	↑	[107]
miR-21	↑	[41][44]
miR-1246	↑	[81]
miR-375	↓	[40][41]
nowotwory układu krwiotwórczego		
let-7b, miR-523 (AML)	↑	[19]
miR-150, miR-19b, miR-29a, miR-223, miR-320, miR-484, miR-17 (CLL)	↑	[70]
miR-21, miR-155, miR-210 (DLBCL)	↑	[47]
miR-720, miR-1246 (szpiczak mnogi)	↑	[38]
miR-92a, miR-638 (AML, ALL)	↓	[88]
miR-150, miR-339, miR-342, let-7d (AML)	↓	[19]
miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-17, miR-92a, miR-223 (szpiczak mnogi)	↓	[106]
miR-1308 (szpiczak mnogi)	↓	[38]

W surowicy chorych na raka trzustki wykazano też nadekspresję cząsteczek miR-200a i miR-200b [53]. Prawdopodobnie jest to związane z hipometylacją genów je kodujących. Celem molekularnym miR-210 jest m.in. gen *SIP1* (ang. *Smad-Interacting Protein*) podlegający wyciszeniu w komórkach nowotworowych trzustki. Jego produkt białkowy hamuje aktywność kadheryny E i bierze udział w przemianie nabłonkowo-mezenchymalnej. Wysunięto więc hipotezę, że hipermetylacja promotora genu *SIP1* obserwowana u chorych może mieć związek z nieprawidłową ekspresją *miR-210*, pomimo braku wyraźnych dowodów na udział mikroRNA w procesach epigenetycznych [53].

NOWOTWORY JELITA GRUBEGO

Według Krajowego Rejestru Nowotworów (www.onkologia.org.pl) rak jelita grubego (ang. *Colorectal Cancer*, CRC) jest trzecim pod względem częstości występowania w Polsce nowotworem u kobiet i mężczyzn (około 15800 nowych przypadków w 2010 roku). Wykryty odpowiednio wcześniej daje wysokie szanse przeżycia. Dlatego też diagnozowanie zmian przednowotworowych lub choroby we wczesnym stadium jest kluczowym elementem pozwalającym znacznie obniżyć jej śmiertelność [100]. Do najczęściej stosowanych badań przesiewowych zaliczane są: kolonoskopia, test na krew utajoną w kale (ang. *Fecal Occult Blood Test*, FOBT) i test na obecność DNA w stolcu [63]. Jednakże każda z tych metod ma wady, które nie pozwalają na uznanie jej za idealne i w pełni wiarygodne narzędzie diagnostyczne. Są to m.in. mała czułość oznaczeń, wysoki koszt i inwazyjność badania oraz niskie wskaźniki przestrzegania zaleceń lekarskich. Ze względu na to cały czas poszukuje się nowych, nieinwazyjnych biomarkerów, które poprawiłyby wykrywalność raka jelita grubego.

Takimi skutecznymi znacznikami mogą być cząsteczki mikroRNA swobodnie krążące we krwi w bardzo stabilnej formie. Ponieważ nawet kilkadziesiąt różnych miRNA może wykazywać znaczące różnice w ekspresji pomiędzy osobami chorymi na CRC i zdrowymi, wysnuto hipotezę, że pomiar ich ekspresji w surowicy lub osoczu krwi mógłby być pomocnym narzędziem w diagnostyce schorzenia [10]. Za przykład mogą posłużyć miR-29a, miR-92a i miR-17-3p, których ekspresja cechuje się znacznie podwyższonym poziomem w osoczu chorych w porównaniu z próbkami kontrolnymi (tab. 1) [33, 72]. W ten sposób różnicować można zarówno CRC jak i zaawansowane gruczolaki jelita grubego – w obydwu przypadkach obserwuje się nadekspresję miR-29a i miR-92a, ale większą w przypadku CRC i guzów o małych rozmiarach. Na specyficzność i użyteczność tych mikroRNA w badaniach przesiewowych wskazuje też fakt, iż ich poziom znacznie obniża się po zabiegu usunięcia nowotworu [33]. Co więcej, wzrost ekspresji mikroRNA-92 obserwuje się zarówno w zaawansowanych, jak i początkowych stadiach nowotworu, a nadekspresja ta nie jest powiązana ze stanami zapalnymi czy innymi nowotworami układu pokarmowego. Czyni ją to wysoce specyficzną dla CRC i pozwala na wykrywanie choroby na bardzo wczesnym etapie [72]. *MiR-92* wchodzi w skład skupiska genów *miR-17-92* znajdujących się na długim ramieniu chromosomu 13 i jako znany onkomir może pobudzać proliferację komórek, hamować apoptozę, indukować proces unaczyniania guza i stymulować jego rozwój [64].

Cząsteczkami o potencjalnym charakterze diagnostycznym i prognostycznym w przebiegu raka jelita grubego mogą być też miR-221 i miR-141 pozwalające różnić chorych i osoby zdrowe [12, 77]. Podwyższony poziom ekspresji miR-221 obserwowany u pacjentów z CRC jest czynnikiem związanym z niekorzystnym rokowaniem i znacznie krótszym całkowitym czasem przeżycia. Wykazano, że pomiar

ekspresji miR-221 bezpośrednio amplifikowanego z osocza wraz z określaniem stadium klinicznego i typu histologicznego stanowi bardzo skuteczne narzędzie predykcyjne w przypadku nowotworów jelita grubego [77]. Zaobserwowano również wyraźną korelację pomiędzy poziomami miR-221 i białka TP53 o funkcji supresora nowotworu, lecz mechanizm tych interakcji nie został dokładnie poznany. W CRC nadekspresja dotyczy także krążących miR-21 i miR-222, ale w tym przypadku nie stwierdzono istotnej roli prognostycznej [77].

Również znaczna nadekspresja miR-141 wiąże się z krótkim całkowitym czasem przeżycia chorych na CRC [12]. Poziom tego wskaźnika w osoczu jest wyraźnie podwyższony, zwłaszcza w czwartym, najbardziej zaawansowanym stadium nowotworu (T4) według klasyfikacji TNM (tumors/nodes/metastases). Udowodniono, że określanie ekspresji miR-141 pozwala odróżnić pacjentów w tym stadium z odległymi przerzutami od osób zdrowych czy charakteryzujących się niższym stopniem zaawansowania choroby [12]. Ponadto zwiększenie precyzji w wykrywaniu przerzutów można uzyskać poprzez wspólne wykorzystanie w diagnostyce miR-141 i markera CEA (ang. *Carcinoembryonic Antigen*). Co ciekawe, w przeciwieństwie do osocza, nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji miR-141 w komórkach nowotworowych CRC z różnych stadiów. Może to świadczyć o tym, że znacząca nadekspresja tego biomarkera we krwi osób cierpiących na najbardziej zaawansowaną postać raka wynika z innych ogólnoustrojowych czynników, takich jak np. reakcje zapalne [12].

NOWOTWORY WĄTROBY

Wysoka śmiertelność z powodu raka wątrobowokomórkowego (ang. *Hepatocellular Carcinoma, HCC*) wynika ze zbyt późnej diagnozy, kiedy leczenie operacyjne jest już nieskuteczne i pojawiają się przerzuty. Obecnie wykrywanie choroby opiera się na wykorzystaniu takich wizualizacyjnych technik detekcji jak ultrasonografia, tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny. Metody te jednak nie pozwalają skutecznie diagnozować niewielkich, pierwotnych zmian w narządzie [71]. Można w tym celu stosować pomiar w surowicy krwi stężenia takich markerów jak α -fetoproteina (AFP) czy białka indukowanego niedoborem witaminy K (ang. *Proteins Induced by Vitamin K Absence, PIVKA-II*), jednakże udowodniono ich zbyt niską specyficzność i czułość w stosunku do HCC [66].

Ciągłe poszukiwania nowych biomarkerów wskazują na możliwość wykorzystania wybranych mikroRNA w wykrywaniu zmian chorobowych w wątrobie. Do takiego wniosku doszli m.in. Xu i wsp., którzy stwierdzili podwyższony poziom ekspresji cząsteczek miR-21, miR-122 i miR-223 w surowicy cierpiących na raka wątrobowokomórkowego i przewlekłe zapalenie wątroby, w porównaniu z osobami zdrowymi [104] (tab. 1). Ponadto ekspresja miR-21 i miR-122 była wyższa u pacjentów z zapaleniem wątroby niż z nowotworem. Potencjał diagnostyczny miR-21

w HCC był również przedmiotem badań Tomimaru i wsp. Badacze stwierdzili znacząco podwyższony poziom markera w osoczu pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym, a jego ekspresja ulegała wyraźnemu obniżeniu po chirurgicznym usunięciu guza [91]. Analogiczną zależność związaną z nadekspresją i znaczącym obniżeniem ekspresji po leczeniu chirurgicznym odnotowano również w przypadku krążących mikroRNA-500 [105]. Rozbieżne z wynikami wcześniejszej grupy badawczej wyniki uzyskano natomiast porównując poziom miR-21 u chorych na przewlekłe zapalenie wątroby i HCC. W tym przypadku wykazano znacznie wyższą ekspresję w osoczu pacjentów z nowotworem [91]. Wskazuje to na specyficzność zmian ekspresji mikroRNA-21 i miR-122 w odniesieniu do uszkodzeń wątroby. Jednak wykorzystanie ich jako wskaźnika hepatokancerogenezy i stosowanie w badaniach pozwalających odróżnić przewlekły stan zapalny od HCC jest mocno wątpliwe i wymaga dalszych analiz. W celu zwiększenia skuteczności diagnozy HCC można stosować kombinację biomarkerów miR-21 i AFP, gdyż wykazano, że wspólne wykorzystanie tych wskaźników w diagnostyce pozwala trafniej odróżnić pacjentów z rakiem i zmniejszyć ryzyko błędu [91].

Przypuszcza się też, że poza wartością diagnostyczną, ekspresja miR-21 może być użyteczna w określaniu zaawansowania i prognozowaniu przebiegu HCC. Wykazano istotną korelację pomiędzy jej poziomem, a takimi czynnikami prognostycznymi jak m.in.: stężenie AFP, PIVKA-II, liczba guzów, maksymalny rozmiar guza, inwazja naczyńowa [91].

Wydaje się, że istotną rolę w rozwoju nowotworów wątroby pełnią też cząsteczki miR-92a, których wysoka ekspresja w liniach komórek nowotworowych wątroby przyspiesza procesy podziałowe [82]. Jeden z mechanizmów molekularnych z tym związanych polega przypuszczalnie na negatywnej regulacji przez miR-92a izoform czynnika transkrypcyjnego TP63, kontrolującego przebieg cyklu komórkowego [65]. Co więcej, wykazano, że stosunek ekspresji miR-92a do miR-638 w osoczu krwi może posłużyć jako cenny i bardzo czuły marker w wykrywaniu HCC. Wartości miR-92a/miR-638 w przypadku nowotworu są znacząco obniżone w porównaniu do osób zdrowych, a zabieg resekcji guza prowadzi do ich wzrostu [82]. Poza miR-92a podwyższoną ekspresję w surowicy chorych na HCC obserwuje się też w przypadku miR-375, miR-25 i let-7f. Nadekspresja miR-92a i miR-375 jest specyficzna również dla zakażeń wirusem HBV, który przypuszczalnie zaangażowany jest w hepatokancerogenezę [51].

Porównanie ekspresji wybranych mikroRNA ujawniło niższy poziom miR-16, miR-199a oraz miR-195 w przypadku HCC niż u chorych na przewlekłe choroby wątroby (ang. *Chronic Liver Disease*, CLD) i w surowicy osób zdrowych [78]. Dotyczy to przede wszystkim miR-16 – regulatora ekspresji genu *BCL2* i szlaku sygnalizacyjnego kaspaz, który odgrywa istotną rolę w procesie apoptozy. Zwiększenie ryzyka transformacji nowotworowej hepatocytów i uszkodzeń wątroby spowodowane obniżeniem ekspresji miR-16 świadczy o funkcji supresora nowo-

tworowego tych cząsteczek i obserwowane jest też podczas aktywacji komórek gwiaździstych wątroby [27]. Udowodniono, że wykorzystanie mikroRNA-16 jako samodzielnego markera pozwala na zidentyfikowanie największej ilości chorych na raka wątrobowokomórkowego w porównaniu do innych stosowanych w praktyce klinicznej markerów – AFP, AFP-L3 czy D-gamma karboksyprotrombiny (DCP). Ponadto zastosowanie kombinacji wszystkich tych czterech wskaźników znacznie podnosi czułość i specyficzność diagnozy w porównaniu z ich stosowaniem pojedynczo [78]. Zatem pomiar ekspresji miR-16 w surowicy zwiększa możliwości diagnostyczne pozwalając skutecznie odróżnić pacjentów z HCC od tych z CLD.

NOWOTWORY PIERSI

Podobnie jak w wielu innych schorzeniach onkologicznych, również w przypadku raka piersi jednym z największych obecnie wyzwań jest poszukiwanie wysoce specyficznych i czułych wskaźników, które mogłyby być wykorzystane w wykrywaniu wczesnych zmian nowotworowych. Niestety, żadne ze współcześnie stosowanych narzędzi diagnostycznych nie spełnia kryteriów idealnego markera choroby, a więc takich cech jak nieinwazyjność, łatwość prowadzenia badań, wysoka czułość wystarczająca do wczesnego wykrycia choroby u prawie wszystkich pacjentów oraz brak lub śladowa obecność u osób zdrowych. Przykładem mogą być krążące we krwi antygeny, takie jak CEA czy CA15-3, z którymi wiązano bardzo duże nadzieje co do poprawy skuteczności diagnostyki raka piersi. Okazało się jednak, że ich czułość jest niska i nie są one użyteczne w detekcji zmian nowotworowych w początkowej fazie choroby, wykazują natomiast istotny potencjał prognostyczny [95]. Również badania mammograficzne uważane za „złoty standard” diagnostyczny cechuje szereg wad – wymagają użycia szkodliwego promieniowania jonizującego, a odsetek wyników fałszywie pozytywnych waha się w przedziale 8-10% [89].

W przeciwieństwie do innych biomarkerów krążących we krwi zmiany ekspresji niektórych mikroRNA zdają się być czułym i precyzyjnym wskaźnikiem transformacji nowotworowej dotyczącej gruczołu piersiowego. Porównując materiał biologiczny pochodzący od pacjentek z wczesnie wykrytym rakiem piersi i surowice kontrolne od kobiet zdrowych udowodniono, że odmienna ekspresja odnosi się do ponad 30 różnych miRNA [110]. Są to zarówno cząsteczki o obniżonym, jak też podwyższonym poziomie ekspresji (tab. 1). Krążącymi biomarkerami wykazującymi nadekspresję w przebiegu raka piersi są m.in. miR-195 oraz let-7a, a usunięcie guza skutkuje ich znaczącym obniżeniem do poziomu wykrywanego w krwiobiegu osób zdrowych [31]. MiR-195 jest wskaźnikiem specyficznym dla tego nowotworu i pozwala różnicować pacjentów z rakiem piersi od osób zdrowych bądź cierpiących na inne nowotwory, z czułością i specyficznością około 90%. Ponadto, moc dyskryminacyjna testu wzrastała jeśli w diagnostyce stosowano profil ekspresji 3

różnych markerów, poza miR-195, także let-7a i miR-155. Takich wyników nie da się uzyskać wykorzystując jedynie pomiary klasycznych antygenów w surowicy – CEA, CA15-3, maspiny i mammaglobiny [31, 81].

Aktualne piśmiennictwo zwraca również uwagę na istotne różnice w zmianach ekspresji wybranych miRNA w zależności od pochodzenia etnicznego kobiet. Badania prowadzone wśród Amerykanek dotkniętych nowotworem pokazują bowiem znacząco różne profile ekspresji cząsteczek mikroRNA w surowicy kobiet rasy białej i czarnej. Nieprawidłowa ekspresja jedynie dwóch (miR-181a, miR-1304) spośród 31 różnych miRNA została potwierdzona niezależnie od rasy pacjentki, co wskazuje na konieczność poszukiwania markerów rasowo specyficznych [110].

Wybrane cząsteczki mikroRNA wykrywane w surowicy/osoczu krwi przedstawiają również znaczący potencjał predykcyjny w przebiegu nowotworów piersi, wykazując zależność z niektórymi cechami kliniczno-patologicznymi choroby. Udowodniono m.in. pozytywną korelację między wzrostem ekspresji miR-195 a stopniem zaawansowania choroby, a także niższą ekspresję krążących let-7a u pacjentek z zajęтыми węzłami chłonnymi w porównaniu do tych, u których nie stwierdzono takich przerzutów [31]. W przypadku chorych z rakiem estrogeno-niezależnym (ER-negatywny) we krwi zaobserwowano znacznie wyższy poziom miR-10b i miR-21 aniżeli w nowotworach ER-pozytywnych [31]. U kobiet cierpiących zaś na raka progesteronozależnego (PR-pozytywny) wykazano znaczne podwyższenie poziomu miR-155 w porównaniu z pacjentkami, u których progesteron nie wpływa na rozwój guza [115].

Do cząsteczek o obniżonej ekspresji w surowicy chorych należą natomiast miR-92a i miR-181a [28, 83]. Dowiedziono, że znaczne odchylenia od prawidłowego poziomu mikroRNA-92a mają związek z większą złośliwością nowotworu, większymi rozmiarami guza i przerzutowaniem do węzłów chłonnych [83]. W przypadku miR-181a nie opisano istotnych korelacji z najważniejszymi cechami patologicznymi choroby, natomiast udowodniono, że cząsteczka ta ma wysoki potencjał diagnostyczny i pozwala wykryć nowotwór we wczesnej fazie ze znacznie większą czułością niż standardowo wykorzystywane markery surowicze [28].

MikroRNA o działaniu onkogennym w rozwoju wielu różnych schorzeń onkologicznych, w tym raka piersi, jest miR-21. Liczne badania potwierdziły nadekspresję tej cząsteczki w krążeniu chorych cierpiących na nowotwór piersi [3, 83]. Co więcej, stwierdzono zależność między poziomem ekspresji mikroRNA-21 a stadium choroby i szacowaniem czasu przeżycia – najwyższa ekspresja dotyczy późnych stadiów choroby, ma związek z bardziej agresywnym przebiegiem, intensywną metastazą (w tym przerzuty odległe) i złym rokowaniem [3, 83]. Tak niekorzystne konsekwencje zaburzeń ekspresji miR-21 wynikają z funkcji, jakie pełni w komórce regulując aktywność genów będących supresorami nowotworzenia. Nadekspresja tej cząsteczki skutkuje bowiem hamowaniem ekspresji genów *PDCD4* (ang. *Programmed cell death 4*), *PTEN* (ang. *Phosphatase and Tensin homolog*)

czy *TPMI* (ang. *Tropomyosin 1*), co prowadzi do intensyfikacji takich procesów jak proliferacja i migracja komórek oraz do inhibicji apoptozy [3, 22].

Kolejnym aspektem wykorzystania ekspresji krążących mikroRNA w praktyce diagnostyczno-klinicznej jest możliwość monitorowania skuteczności terapii. Wu i wsp. zwrócili uwagę na potencjał dwóch cząsteczek – miR-122 i miR-375 jako cennych wskaźników obrazujących odpowiedź na zastosowaną metodę leczenia raka piersi i wskazujących na dalszy przebieg choroby [103]. Wykazano bowiem, że obniżona ekspresja miR-375 i podwyższony poziom miR-122 w surowicy mają związek z opornością na terapię neoadjuwantową i wskazują na szybki nawrót choroby u pacjentek HER2⁺. Dowiedziono też, że badanie ekspresji miR-122 pozwala z dużym prawdopodobieństwem określić ryzyko metastazy u pacjentek w II i III stadium zaawansowania choroby według TNM [103]. Może to ułatwić optymalizację doboru chemioterapii i ewentualnych działań prewencyjnych.

NOWOTWORY PROSTATY

Rak prostaty jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych u mężczyzn, rozwijającym się głównie po 50. roku życia. Ze względu na brak wyraźnych symptomów we wczesnym stadium rozwojowym wykrywana jest zazwyczaj zaawansowana postać choroby [56]. Rutynowo wykonywane testy diagnostyczne obejmują badanie stercza per rectum (ang. *Digital Rectal Examination*, DRE) oraz pomiar stężenia we krwi antygenu PSA (ang. *Prostate-Specific Antigen*). Badanie DRE charakteryzuje się dość niską czułością, a pomiar PSA niską specyficznością, ze względu na podwyższony poziom tego wskaźnika także w przypadku łagodnego przerostu gruczołu krokowego (ang. *Benign Prostatic Hyperplasia*, BPH), infekcji oraz przewlekłych stanów zapalnych [56]. Obniża to wartość diagnostyczną biomarkera i trafność rozpoznania choroby.

Konieczność znalezienia nowych, łatwych w detekcji i nieinwazyjnych wskaźników pozwalających wykryć raka prostaty we wczesnej fazie i ułatwić podejmowanie decyzji terapeutycznych skłoniła naukowców do zwrócenia uwagi na cząsteczki mikroRNA uwalniane do krwioobiegu. Podobnie jak w innych nowotworach, w raku prostaty sygnatury wybranych miRNA znacząco różnią się od prawidłowych próbek kontrolnych i mają potencjalnie duże znaczenie w diagnostyce schorzenia (tab. 1). Moltzahn i wsp. zidentyfikowali 10 różnych mikroRNA, których ekspresja znacząco różniła się w surowicy osób zdrowych i cierpiących na raka prostaty [69]. U nieleczonych chorych mężczyzn cztery z nich wykazywały obniżoną ekspresję – miR-223, miR-26b, miR-30c, miR-24, a podwyższony poziom dotyczył sześciu rodzajów cząsteczek – miR-20b, miR-874, miR-1274a, miR-1207-5p, miR-93, miR-106a. Co więcej, ekspresja wybranych miRNA różni-

ła się pomiędzy chorymi w zależności od ryzyka progresji choroby. Istotny potencjał prognostyczny stwierdzono dla miR-93, miR-106a i miR-24 [69].

Poważnym wyzwaniem stojącym przed współczesną diagnostyką onkologiczną wykorzystującą markery surowicze jest umiejętność precyzyjnego odróżniania pacjentów z rakiem prostaty (ang. *Prostatic Carcinoma*, PCA) i niezłośliwym przerostem gruczołu (ang. *Benign Prostatic Hyperplasia*, BPH,). Profilowanie ekspresji miRNA pozwoliło opracować profil 5 różnych cząsteczek, których ekspresja znacząco różni się w tych dwóch schorzeniach [15]. Były to: let-7e, let-7c i miR-30c o obniżonej ekspresji oraz miR-622 i miR-1285 wykazujące nadekspresję u pacjentów z nowotworem złośliwym. W praktyce klinicznej stosowanie takiego zestawu w połączeniu z PSA może wydatnie poprawić trafność diagnozy w przypadku raka prostaty [15]. Podobnych obserwacji dokonali Mahn i wsp., którzy wyróżnili 3 typy onkogennych cząsteczek mikroRNA – miR-26a, miR-195 i let-7i, których ekspresja w surowicy różnicuje mężczyzn cierpiących na PCA i BPH [62]. Ponadto zaobserwowano powiązania między poziomem tych miRNA a wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi o znaczeniu prognostycznym, np. dla ekspresji miR-195 i let-7i pokazano odwrotną zależność względem kolejnych stopni skali Gleason'a, będącej systemem klasyfikacji patomorfologicznej i określającej złośliwość nowotworu prostaty. Chirurgiczne usunięcie guza skutkowało znacznym obniżeniem ekspresji w surowicy każdej z badanych cząsteczek [62].

Cząsteczką, na której znaczenie prognostyczne i diagnostyczne w raku prostaty najczęściej zwraca się uwagę jest miR-141. Jej ekspresja w surowicy/osoczu chorych jest wyraźnie podwyższona [26, 68]. Udowodniono, że pomiar poziomu miR-141 pozwala wykryć raka prostaty z wysoką czułością i jest to marker specyficzny właśnie dla tego nowotworu [68]. Wykazano też, że zmiany ekspresji miR-141 obserwowane u chorych korelują ze zmianami poziomu takich biomarkerów jak krążące komórki nowotworowe (ang. *Circulating Tumor Cells*, CTC), dehydrogenaza mleczanowa (LDH) oraz PSA [26]. Sugeruje się, że wspólne wykorzystanie w praktyce klinicznej wszystkich tych wskaźników pozwoli lepiej prognozować przebieg schorzenia i odpowiedź na zastosowaną terapię.

Brase i wsp. obok miR-141 wskazują też ekspresję miR-375 jako istotny czynnik w ocenie zaawansowania choroby i ryzyka dalszego jej rozwoju [8]. Nadekspresja krążących miR-141 i miR-375 jest szczególnie widoczna u chorych w najbardziej zaawansowanym stadium raka prostaty i nowotworach o wysokiej złośliwości. Wykazuje też pozytywną współzależność w odniesieniu do takich wskaźników kliniczno-patologicznych jak status zajęcia węzłów chłonnych (miR-141 i miR-375) oraz stopień w skali Gleason'a (tylko miR-141). Uzyskane wyniki świadczą o wysokiej wartości prognostycznej badanych cząsteczek, a ekspresja miR-141 dodatkowo może posłużyć do oceny stopnia złośliwości guza [8].

NOWOTWORY PŁUCA

Niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*, NSCLC) należy do nowotworów odznaczających się jednym z najwyższych wskaźników śmiertelności. Pomimo niezliczonych badań nad molekularnymi mechanizmami choroby i rozwojem terapii celowanych wskaźnik całkowitego 5-letniego przeżycia jest nadal bardzo niski (ok. 10-15%), co związane jest z późnym diagnozowaniem, zazwyczaj w bardzo zaawansowanym i nieoperacyjnym stadium raka [57]. Opracowanie skutecznych metod przesiewowych pozwalających rozpoznać schorzenie w jego początkowej fazie nadal stanowi wielkie wyzwanie dla badaczy i nastrocza wielu problemów. Obecnie wczesna diagnostyka nowotworów płuca opiera się przede wszystkim na niskodawkowej tomografii komputerowej (ang. *Low-Dose Computed Tomography*, LDCT). Technika ta mimo swojego znaczącego wkładu w poprawę skuteczności wykrywania początkowych stadiów raka ma kilka wad, m.in. nadrozpoznawalność łagodnych zmian patologicznych w płucach mogąca prowadzić do niepotrzebnych interwencji chirurgicznych [4]. Dlatego też konieczne jest poszukiwanie czułych biomarkerów, które umożliwią różnicowanie łagodnych i złośliwych zmian, a także potwierdzą obecność nowotworu zanim możliwa stanie się jego wizualizacja metodami tomograficznymi.

Do takich wskaźników zaliczyć można krążące mikroRNA, których ekspresja w surowicy osób chorych i zdrowych znacząco się różni. Chen i wsp. oszacowali, że w porównaniu z materiałem uzyskanym od osób zdrowych, u pacjentów z NSCLC wykryć można ekspresję aż 63 nowych cząsteczek miRNA, natomiast nie stwierdzono aktywności aż 28 rodzajów mikroRNA [13]. Zwrócono szczególną uwagę na podwyższoną ekspresję miR-25 i miR-223 u chorych, wysuwając hipotezę, iż mogą one być bardzo pomocne w badaniach przesiewowych w kierunku niedrobnokomórkowego raka płuca (tab. 1) [13].

Szczególne znaczenie diagnostyczne mikroRNA podkreślił Bianchi i wsp. identyfikując w surowicy sygnaturę 34 różnych cząsteczek, dzięki którym możliwe jest wykrycie NSCLC w bardzo wczesnym stadium u osób bez objawów, a także odróżnienie niegroźnych guzków od złośliwych form nowotworu [6]. Porównanie ekspresji kilkuset miRNA w surowicy pacjentów ze zdiagnozowanym metodą LDCT nowotworem i próbek kontrolnych ujawniło znaczące różnice w ekspresji tylko 34 cząsteczek, zarówno o obniżonym jak i podwyższonym poziomie, a ich zastosowanie pozwala wykryć NSCLC z 80% czułością [6]. Inna grupa badawcza zidentyfikowała zaś profil ekspresji 13 różnych mikroRNA o znaczeniu diagnostycznym, mogących skutecznie (80% dokładności) różnicować agresywne i łagodne formy nowotworu zobrazowane za pomocą tomografii LDCT [7]. Co więcej, pokazano, że charakterystyczny profil miRNA wykrywa się wiele miesięcy wcześniej, zanim możliwa stanie się detekcja nowotworu metodą tomografii komputerowej.

Na potencjał diagnostyczny niektórych cząsteczek mikroRNA łatwo wykrywanych w osoczu krwi chorych na NSCLC wskazali także Zheng i wsp. Zidentyfikowali oni miR-155, miR-197 i miR-182 jako cząsteczki o wyraźnej nadekspresji we krwi osób chorych w porównaniu ze zdrowymi, co może świadczyć o ich funkcji onkogennej w czasie kancerogenezy [111]. Cząsteczki te odgrywają kluczową rolę w przebiegu różnorodnych fizjologicznych i patologicznych procesów jak różnicowanie komórek linii hematopoetycznej, reakcje odpornościowe i zapalne, rozwój chorób krążeniowo-naczyniowych i nowotworowych. Według autorów określenie poziomu tych krążących w krwiobiegu cząsteczek w znacznym stopniu ułatwia diagnostykę niedrobnokomórkowego raka płuca, niezależnie od stopnia zaawansowania nowotworu. W najbliższej przyszłości walidacja wykrytych markerów i przeprowadzenie prób klinicznych na dużej liczbie pacjentów może pozwolić na wykorzystanie ich jako nieinwazyjnego testu przesiewowego w kierunku NSCLC, uzupełniającego dla metody niskodawkowej spiralnej tomografii komputerowej [111]. Podobne rezultaty uzyskano analizując zmiany ekspresji miR-1254 i miR-574-5p u pacjentów z wczesnym stadium NSCLC, w odniesieniu do surowic kontrolnych [21]. Obydwie cząsteczki wykazują wyraźnie podwyższony poziom ekspresji u osób chorych, jednakże ich zastosowanie jako biomarkerów diagnostycznych wymaga dalszych badań.

Zmiany ekspresji wybranych mikroRNA mogą też posłużyć jako nieinwazyjny marker do określania całkowitego czasu przeżycia chorych na NSCLC. Porównanie ekspresji miRNA w surowicy identycznych liczebnie grup pacjentów – z krótszym i dłuższym czasem przeżycia od rozpoznania choroby (odpowiednio 9,5 i 49,5 miesiąca) pozwoliło zidentyfikować 11 cząsteczek miRNA, których ekspresja różniła się ponad 5-krotnie między badanymi grupami [35]. Zwrócono szczególną uwagę na cztery z nich – miR-486, miR-30d, miR-1 i miR-499 znacząco powiązane z całkowitym czasem przeżycia, sugerując ich istotny potencjał prognostyczny [35]. Spośród nich tylko w przypadku mikroRNA-1 istniały wcześniejsze doniesienia dotyczące wpływu na proces kancerogenezy. Cząsteczka ta bowiem wykazuje wyraźnie obniżoną ekspresję w szeregu różnych nowotworów, a jej funkcja związana jest z regulacją genów kontrolujących przebieg cyklu komórkowego i apoptozę – *MET*, *FoxP1*, *HDAC4* [30].

NOWOTWORY ŻOŁĄDKA I PRZELYKU

Rak żołądka i płaskonabłonkowy rak przełyku są jednymi z najczęściej występujących schorzeń onkologicznych i jedną z głównych przyczyn zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi, odznaczającymi się bardzo niskimi wskaźnikami przeżycia. Wynika to głównie z bezobjawowego charakteru wczesnych stadiów choroby [36]. Wprawdzie w ostatnich latach poczyniono postęp w dzie-

dzinie diagnozowania tych nowotworów i wprowadzono nowatorskie chirurgiczne metody ich leczenia, to jednak wciąż brakuje skutecznych metod detekcji w początkowym okresie ich rozwoju. Tradycyjnie stosowane markery surowicze, jak CEA i CA19-9 (rak żołądka) oraz SCC-Ag (rak przełyku) odznaczają się niewystarczającą czułością i specyficznością w wykrywaniu raka we wczesnych fazach [36]. Większą skuteczność uzyskuje się dzięki badaniom chromoendoskopowym i biopsji materiału tkankowego, jednakże wysoka inwazyjność i możliwość popełnienia błędu podczas pobierania próbek do analizy ograniczają ich użyteczność. Z tych względów pilnie poszukuje się nowych metod diagnostycznych i biomarkerów, które pozwolą obniżyć stopień śmiertelności i zachorowalność na raka żołądka i przełyku [36].

Ustalanie profili ekspresji krążących mikroRNA typowych dla raka żołądka stało się w ostatnich latach przedmiotem zainteresowania kilku grup badawczych. Pomimo uzyskania zróżnicowanych wyników wszyscy autorzy wskazują na ogromny potencjał diagnostyczno-predykcyjny tych cząsteczek i konieczność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Tsujiura i wsp. w osoczu pacjentów cierpiących na nowotwór zidentyfikowali 4 cząsteczki odznaczające się wyraźnie podwyższonym stopniem ekspresji – miR-17-5p, miR-21, miR-106a i miR-106b, obniżony poziom dotyczył zaś let-7a [93]. O ich udziale w procesie onkogenezy może świadczyć przywrócenie właściwej ekspresji po zabiegu resekcji żołądka.

Badania dotyczące przydatności diagnostycznej miRNA w surowicy/osoczu wskazują na możliwość wykorzystania profilu ekspresji 5 różnych cząsteczek, spośród 19 o udowodnionej nadekspresji w materiale biologicznym osób chorych, do wykrywania wczesnych postaci raka żołądka. Są to regulatory cyklu komórkowego, wzrostu komórek i odpowiedzi immunologicznej – miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34 oraz miR-423-5p [60]. Ich czułość i specyficzność diagnostyczna jest znacznie wyższa niż w przypadku CEA czy CA19-9 i wynosi ponad 80%. Co więcej, poziom ekspresji tych mikroRNA wykazuje ścisłą korelację z progresją choroby i rozmiarami nowotworu [60]. Podobną problematykę badawczą podjęli Song i wsp., którzy w surowicy chorych na raka żołądka zidentyfikowali aż 16 rodzajów mikroRNA o podwyższonej ekspresji [84]. Analizy dokładności diagnostycznej pokazały istotny potencjał w wykrywaniu raka w przypadku 3 cząsteczek – mikroRNA-221, miR-744 i miR-376c. Ich poziom w surowicy zwiększa się wraz z zaawansowaniem choroby. Ustalono też, że ekspresja miR-221 i miR-376c wykazuje wyraźnie pozytywną korelację ze słabym zróżnicowaniem nowotworu, a miR-221 dodatkowo cechuje się nadekspresją w stanach dysplastycznych [84]. Wciąż jednak nie wiadomo czy dzięki badaniom poziomu mikroRNA uwalnianych do krążenia możliwe jest precyzyjne różnicowanie typów raka żołądka i stanów przednowotworowych.

Markerami wczesnego wykrywania nowotworów żołądka i monitorowania dynamiki rozwoju choroby mogą być także miR-21, miR-223, miR-451 i miR-486 o zwiększonej ekspresji oraz miR-218 charakteryzujący się zmniejszoną ekspresją w osoczu chorych w porównaniu z osoczem kontrolnym osób zdrowych [42, 55]. Analizy krzy-

wych ROC (łączy opis czułości i specyficzności markera diagnostycznego) i normalizowanie się ekspresji tych cząsteczek w krążeniu po chirurgicznym usunięciu guza wskazują na ich wysoką zdolność w rozróżnianiu osób zdrowych i tych, u których doszło do transformacji nowotworowej. Najwyższą moc dyskryminacyjną testu uzyskuje się wykorzystując w diagnostyce łączony pomiar ekspresji miR-223, miR-21 i miR-218 [42]. Poziom miR-223 w osoczu może stać się też wskaźnikiem zakażenia *Helicobacter pylori*, gdyż jego ekspresja jest znacząco zwiększona u pacjentów z aktywnym zakażeniem, zarówno u dotkniętych chorobą nowotworową jak też nie. [55]. Z punktu widzenia onkologii jest to jednak niekorzystne ze względu na brak pewności stawianej diagnozy i możliwość otrzymania wyników fałszywie dodatnich.

Istotny potencjał prognostyczny w przebiegu raka żołądka wykazuje miR-200c [97]. Podobnie jak w większości przypadków dochodzi tu do nadekspresji, a jej stwierdzenie we krwi ułatwia prognozowanie przebiegu schorzenia i określanie czasu przeżycia chorych. Udowodniono, że bardzo wysoki poziom miR-200c w krwiobiegu towarzyszy przerzutom do węzłów chłonnych i wiąże się ze skróceniem całkowitego czasu przeżycia (do około 9 miesięcy) i czasu wolnego od progresji choroby (do około 4 miesięcy). Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy ekspresją tej cząsteczki, a głównymi cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu czy przeprowadzoną interwencją chirurgiczną [97].

W przypadku płaskonabłonkowego raka przełyku (ang. *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*, ESCC) podwyższona ekspresja została stwierdzona w przypadku 25 różnych krążących mikroRNA [107]. Spośród nich wytypowano siedem, których profilowanie ekspresji stanowi cenny wskaźnik, umożliwiający wykrycie choroby we wczesnej fazie i pozwalający w łatwy sposób odróżnić osoby zdrowe od chorych w I/II stadium zaawansowania. Ten profil ekspresji obejmuje cząsteczki miR-10a, miR-22, miR-100, miR-148b, miR-223, miR-133a oraz miR-127-3p [107].

Poszukiwania nowych markerów diagnostyczno-prognostycznych dla ESCC skupiają się głównie na dwóch krążących cząsteczkach mikroRNA: miR-21 i miR-375. Pierwsza z nich odznacza się wyraźną nadekspresją u chorych na ESCC w porównaniu z próbkami kontrolnymi od osób zdrowych [40, 41, 44]. Znaczące obniżenie poziomu ekspresji miR-21 odnotowano u pacjentów po operacji usunięcia tkanki nowotworowej oraz u tych, u których chemioterapia przynosiła zadowalające efekty, co świadczy o zaangażowaniu tego regulatora w proces onkogenezy także w przypadku komórek przełyku [41,44]. U pacjentów ze znaczną nadekspresją zaobserwowano również bardziej intensywną inwazję naczyniową i pozytywną korelację z ryzykiem nawrotu choroby. Podobny potencjał predykcyjny w ocenie rokowania ESCC wykazuje miR-375 – cząsteczka o zmniejszonej ekspresji w osoczu osób chorych [40, 41]. Nadekspresja mikroRNA-21 wraz ze znacznie obniżonym poziomem miR-375 świadczą o niekorzystnym rokowaniu i stanowią niezależny czynnik prognostyczny, który może ułatwić stratyfikację chorych do grupy wysokiego ryzyka wznowy, i co za tym idzie, spersonalizowane decyzje terapeutyczne [40].

Najnowsze doniesienia mówią też o zastosowaniu miR-1246 jako czułego i swoistego markera dla płaskonabłonkowego raka przełyku [81]. Wykazano, że jego podwyższona ekspresja u pacjentów z ESCC jest pozytywnie skorelowana ze stadiem nowotworu i stanowi jeden z najdokładniejszych wskaźników niekorzystnego rokowania. Co ciekawe, nie odnotowano zaburzeń ekspresji miR-1246 w tkance nowotworowej, a jego egzosomalny poziom nie odzwierciedla zawartości w komórkach, z których został uwolniony. Jest to związane z selektywnym mechanizmem uwalniania miR-1246, niezależnym od jego ekspresji w tkankach [87].

NOWOTWORY UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

Poza guzami litymi coraz więcej uwagi poświęca się też możliwości wykorzystania krążących mikroRNA jako biomarkerów w praktyce diagnostyczno-klinicznej nowotworów hematologicznych. Mimo to wciąż istnieje niewiele danych literaturowych, dotyczących problemu zastosowania profili ekspresji mikroRNA uwalnianych do krwiobiegu, w celu wykrywania, określania przebiegu czy odpowiedzi na leczenie nowotworów układu krwiotwórczego. Pewne próby podjęto w przypadku ostrej białaczki szpikowej (ang. *Acute Myeloid Leukemia*, AML) i limfoblastycznej (ang. *Acute Lymphoblastic Leukemia*, ALL). Udało się ustalić, że w osoczu pacjentów cierpiących na te choroby, niezależnie od podtypu, dochodzi do znacznego obniżenia ekspresji miR-92a i miR-638, w porównaniu z osoczem kontrolnym od osób zdrowych [88]. Wskazuje się zatem na możliwość wykorzystania tych cząsteczek jako czułych i łatwych do wykrycia markerów diagnostyczno-prognostycznych dla białaczek ostrych.

W innym projekcie naukowym Fayyad-Kazan i wsp. skupili się na badaniu poziomu wybranych mikroRNA w osoczu cierpiących na AML. Na tej podstawie stwierdzono, że cząsteczki let-7d, miR-150, miR-339 i miR-342 cechuje obniżona ekspresja u osób chorych, w odniesieniu do materiału kontrolnego, natomiast nadekspresję zaobserwowano w przypadku let-7b i miR-523 (tab. 1) [19]. Dodatkowo, dzięki analizie dokładności diagnostycznej (krzywa ROC), ustalono, że cząsteczki miR-150 i miR-342 przedstawiają istotną wartość detekcyjną w wykrywaniu AML. Dla miR-150 cząsteczkami docelowymi mogą być geny kodujące TNF- α (ang. *Tumor Necrosis Factor alpha*), interleukinę 10 i 18. Zaobserwowano odwrotną korelację między ekspresją mikroRNA-150 a poziomem tych związków we krwi [98]. Z kolei Zhi i wsp. opisali profil ekspresji 6 różnych mikroRNA, który z dużą precyzją pozwala rozróżnić chorych na ostrą białaczkę szpikową od osób zdrowych [112]. Są to cząsteczki, których ekspresja w AML znacząco odbiega od prawidłowego poziomu w kontrolnym materiale biologicznym – miR-10a, miR-93, miR-129, miR-155, miR-181b i miR-320d. Ponadto zauważono, że ekspresja miR-181b w surowicy chorych wykazuje wyraźną korelację z całkowitym czasem przeżycia

i może służyć jako niezależny czynnik predykcyjny. Częsteczka ta zwykle funkcjonuje jako supresor nowotworzenia, a przywrócenie jej prawidłowej ekspresji skutkuje promocją apoptozy, hamowaniem proliferacji komórek białaczkowych i opóźnieniem leukemogenezy. Potencjalnymi genami docelowymi są *P27*, *CREB1* (ang. *cAMP Responsive Element Binding protein 1*), *TIMP3* (ang. *TIMP metalloproteinase inhibitor 3*), *BCL2* (ang. *B-cell CLL/lymphoma 2*), *MCL1* (ang. *Myeloid Cell Leukemia sequence 1*) i *XIAP* (ang. *X-linked inhibitor of Apoptosis*) zaangażowane w takie procesy jak apoptoza, podziały komórkowe, chemooporność czy migracja komórek [112].

W przypadku przewlekłej białaczki limfocytowej (ang. *Chronic Lymphocytic Leukemia*, CLL) także stwierdzić można charakterystyczne profile ekspresji mikroRNA uwalnianych do krwiobiegu. Szczególnie wysoka ekspresja u chorych dotyczy takich cząsteczek jak miR-150, miR-19b, miR-29a, miR-223, miR-320, miR-484 i miR-17 [70]. Poziom tych miRNA i ilość możliwych do wykrycia w osoczu markerów uzależniony jest z kolei od ekspresji cytoplazmatycznej kinazy ZAP-70 – ważnego czynnika prognostycznego w przebiegu przewlekłej białaczki limfocytowej [70]. W CLL ZAP-70(+) [niekorzystny czynnik rokowniczy] identyfikuje się większą ilość różnych krążących mikroRNA niż w przypadkach negatywnych pod względem ekspresji tej kinazy. Dla CLL ZAP-70(-) znamieną wydaje się być bardzo wysoka ekspresja miR-150 [70]. Być może uzyskane wyniki dadzą możliwość wykorzystywania profili ekspresji krążących miRNA jako wskaźników diagnostycznych dla przewlekłej białaczki limfocytowej oraz umożliwią łatwe określanie statusu białka ZAP-70. Według niektórych danych potencjał prognostyczny dla przebiegu CLL może wykazywać z kolei miR-155, zaburzenia ekspresji którego stwierdzono w surowicy wielu chorych na ten rodzaj białaczki [109].

U osób chorych na chłoniaka rozlanego olbrzymiokomórkowego z komórek B (ang. *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*, DLBCL) także określono ekspresję niektórych miRNA zaangażowanych w transformację nowotworową. W surowicy pacjentów stwierdzono nadekspresję takich cząsteczek jak miR-21, miR-155 i miR-210 [47]. Co więcej, udowodniono, że zwiększona ilość miR-21 w krwiobiegu wiąże się z korzystniejszym rokowaniem i dłuższym czasem przeżycia chorych na DLBCL.

Nowe doniesienia naukowe świadczą o tym, że również w rozwoju szpiczaka mnogiego wybrane typy mikroRNA uwalniane są przez komórki nowotworowe, dzięki czemu możliwa staje się identyfikacja pewnych profili ekspresji krążących miRNA charakteryzujących tę chorobę. Yoshizawa i wsp. w osoczu chorych na szpiczaka wykryli 50 spośród 381 badanych mikroRNA [106]. Wśród nich 20 wykazywało obniżoną ekspresję, a 5 cechowała nadekspresja, w odniesieniu do osocza osób zdrowych. Największą różnicę pomiędzy dwoma badanymi grupami zaobserwowano dla mikroRNA-223 – regulatora proliferacji i aktywacji neutrofilów. Znaczące różnice w ekspresji odnotowano w przypadku skupiska miR-17-92a (miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-17, miR-92a), których poziom u pacjentów ze szpiczakiem był wyraźnie obniżony, niezależnie od fazy choroby [106]. Stwier-

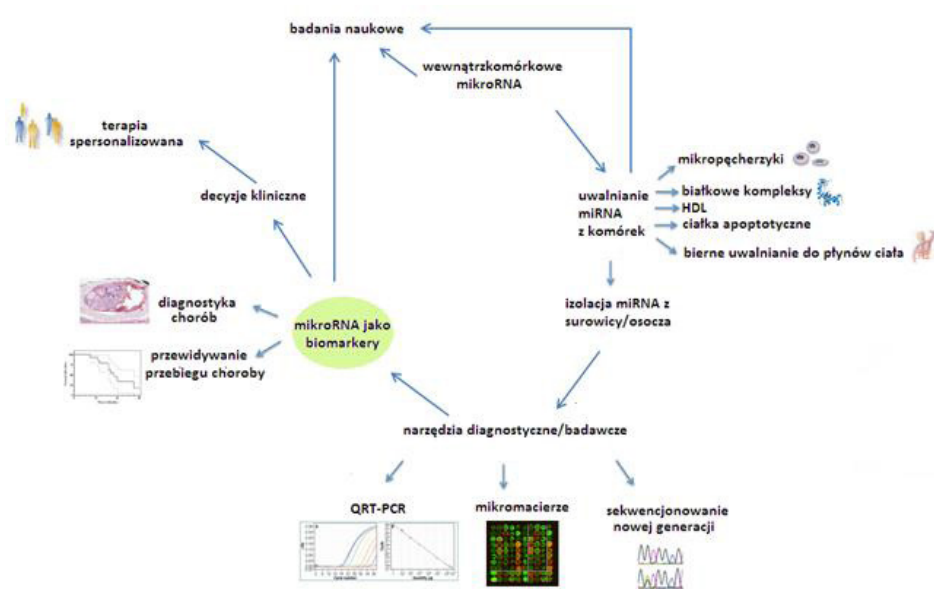
dzono też, że u pacjentów z całkowitą remisją choroby dochodzi do przywrócenia prawidłowej ekspresji tych cząsteczek, co nie ma miejsca u osób z częściową odpowiedzią na leczenie [106]. Uzyskane wyniki dały autorom podstawy do wysunięcia hipotezy, iż analiza ekspresji krążących miR-17-92a może być pomocna przy planowaniu chemioterapii, obserwacji przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie, a ich poziom może obrazować status immunologiczny komórek T.

Z kolei Jones i wsp. ustalili, że występujące w surowicy chorych miR-720, miR-1246 (nadekspresja) i miR-1308 (zmniejszona ekspresja) prezentują istotny potencjał w wykrywaniu szpiczaka, a ich poziom nie zmienia się istotnie w zależności od wieku i płci [38]. Szczególnie przydatnym biomarkerem diagnostycznym wydaje się wspólne określanie ekspresji cząsteczek miR-720 i miR-1308, pozwalające odróżnić osoby zdrowe od osób w stanie przednowotworowym i z zaawansowanym szpiczakiem. Dodatkowo, jednoczesny pomiar poziomu miR-1246 i miR-1308 w surowicy stanowi cenne narzędzie diagnostyczne umożliwiające różnicowanie pacjentów na dwie grupy – cierpiących na w pełni wykształconego szpiczaka mnogiego oraz gammapatię monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu [38].

PODSUMOWANIE

Zaburzenia ekspresji krążących mikroRNA mają związek ze zmianami zachodzącymi w komórkach podczas transformacji nowotworowej. Z tego względu analizowanie funkcji regulacyjnych cząsteczek miRNA oraz określanie profili ich ekspresji charakteryzujących poszczególne nowotwory nabiera coraz większego znaczenia. Ponadto, niezwykła stabilność w środowisku osocza/surowicy, bogatym w endogenne rybonukleazy, zwiększa możliwości analityczne przy wykorzystaniu ich ekspresji jako rutynowej metody diagnozowania i monitorowania klinicznego nowotworów.

Zastosowanie krążących miRNA jako biomarkerów w powszechnej praktyce klinicznej wymaga jednak jeszcze wielu badań. Należy przeprowadzić niezależne analizy ekspresji na dużej grupie pacjentów, w odniesieniu do takich czynników jak wiek, pochodzenie etniczne, ogólny stan zdrowia czy styl życia. Niezbędne są dalsze badania nad mechanizmami wydzielania mikroRNA do środowiska zewnątrzkomórkowego oraz ich pośredniego i bezpośredniego wpływu na odległe komórki wychwytyjące te cząsteczki z krążenia. Konieczne jest również udoskonalenie i wystandaryzowanie metody izolacji miRNA z surowicy/osocza, ilościowego oznaczania, analizy i normalizacji danych. W przyszłości może to zaowocować włączeniem badań tej nowej klasy biomarkerów do wczesnej i precyzyjnej diagnostyki chorób nowotworowych i będzie pomocne przy doborze właściwej terapii u poszczególnych chorych (ryc. 3).



RYCINA 3. Możliwości wykorzystania cząsteczek mikroRNA (za Steer i Subramanian, 2012, zmodyfikowane [85])

FIGURE 3. Possibilities of microRNA application

PODZIĘKOWANIA

Praca jest współfinansowana z tematu statutowego DS225 Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Kierownik tematu: dr hab. n. med. Agata Filip, Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną

LITERATURA

- [1] ALI S, ALMHANNA K, CHEN W, PHILIP PA, SARKAR FH. Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer. *Am J Transl Res* 2011; **3**: 28-47.
- [2] ARROYO JD, CHEVILLET JR, KROH EM, RUF IK, PRITCHARD CC, GIBSON DF, MITCHELL PS, BENNETT CF, POGOSOVA-AGADJANYAN EL, STIREWALT DL, TAIT JF, TEWARI M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 5003-5008.
- [3] ASAGA S, KUO C, NGUYEN T, TERPENNING M, GIULIANO AE, HOON DS. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem* 2011; **57**: 84-91.
- [4] BACH PB. Is our natural-history model of lung cancer wrong? *Lancet Oncol* 2008; **9**: 693-697.

- [5] BANDYOPADHYAY S, MITRA R, MAULIK U, ZHANG MQ. Development of the human cancer microRNA network. *Silence* 2010; **1**: 6.
- [6] BIANCHI F, NICASSIO F, MARZI M, BELLONI E, DALL'OLIO V, BERNARD L, PELOSI G, MAISONNEUVE P, VERONESI G, DI FIORE PP. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol Med* 2011; **3**: 495-503.
- [7] BOERI M, VERRI C, CONTE D, ROZ L, MODENA P, FACCHINETTI F, CALABRO E, CROCE CM, PASTORINO U, SOZZI G. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 3713-3718.
- [8] BRASE JC, JOHANNES M, SCHLOMM T, FÄLTH M, HAESE A, STEUBER T, BEISSBARTH T, KUNER R, SÜLTSMANN H. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2011; **128**: 608-616.
- [9] CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ALDLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15524-15529.
- [10] CHAJUT A, BENJAMIN S, GILAD S, GOREN Y, DAN H, ZION O, KUSHNIR M, KUNDEL Y, NIV Y, BRENNER B. Circulating microRNAs as potential blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer. *Abstract. J Clin Oncol* 2009; **27**: e15040.
- [11] CHANG KW, KAO SY, WU YH, TSAI MM, TU HF, LIU CJ, LUI MT, LIN SC. Passenger strand miRNA miR-31* regulates the phenotypes of oral cancer cells by targeting RhoA. *Oral Oncol* 2013; **49**: 27-33.
- [12] CHENG H, ZHANG L, COGDELL DE, ZHENG H, SCHEPPE AJ, NYKTER M, HARRIS CC, CHEN K, HAMILTON SR, ZHANG W. Circulating plasma miR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS ONE* 2011; **6**: e17745.
- [13] CHEN X, BA Y, MA L, CAI X, YIN Y, WANG K, GUO J, ZHANG Y, CHEN J, GUO X, LI Q, LI X, WANG W, ZHANG Y, WANG J, JIANG X, XIANG Y, XU C, ZHENG P, ZHANG J, LI R, ZHANG H, SHANG X, GONG T, NING G, WANG J, ZEN K, ZHANG J, ZHANG CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; **18**: 997-1006.
- [14] CHEN X, LIANG H, ZHANG J, ZEN K, ZHANG CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 2012; **22**: 125-132.
- [15] CHEN ZH, ZHANG GL, LI HR, LUO JD, LI ZX, CHEN GM, YANG J. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *The Prostate* 2012; **72**: 1443-1452.
- [16] COCUCCI E, RACCHETTI G, MELDOLESI J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009; **19**: 43-51.
- [17] DUTTAGUPTA R, JIANG R, GOLLUB J, GETTS RC, JONES KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One* 2011; **6**: e20769.
- [18] FALLER M, GUO F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1779**: 663-667.
- [19] FAYYAD-KAZAN H, BITAR N, NAJAR M, LEWALLE P, FAYYAD-KAZAN M, BADRAN R, HAMADE E, DAHER A, HUSSEIN N, ELDIRANI R, BERRI F, VANHAMME L, BURNY A, MARTIAT P, ROUAS R, BADRAN B. Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia. *J Transl Med* 2013; **11**: 31.
- [20] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806-811.
- [21] FOSS KM, SIMA C, UGOLINI D, NERI M, ALLEN KE, WEISS GJ. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; **6**: 482-488.
- [22] FRANKEL LB, CHRISTOFFERSEN NR, JACOBSEN A, LINDOW M, KROGH A, LUND AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008; **283**: 1026-1033.
- [23] GIBBINGS DJ, CLAUDIO C, ERHARDT M, VOINNET O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1143-1149.
- [24] GILAD S, MEIRI E, YOGEV Y, BENJAMIN S, LEBANONY D, YERUSHALMI N, BENJAMIN H, KUSHNIR M, CHOLAKH H, MELAMED N, BENTWICH Z, HOD M, GOREN Y, CHAJUT A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; **3**: e3148.

- [25] GIRONELLA M, SEUX M, XIE MJ, CANO C, TOMASINI R, GOMMEAUX J, GARCIA S, NOWAK J, YEUNG ML, JEANG KT, CHAIX A, FAZLI L, MOTOO Y, WANG Q, ROCCHI P, RUSSO A, GLEAVE M, DAGORN JC, IOVANNA JL, CARRIER A, PÉBUSQUE MJ, DUSETTI NJ. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 16170-16175.
- [26] GONZALES JC, FINK LM, GOODMAN OB JR, SYMANOWSKI JT, VOGELZANG NJ, WARD DC. Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2011; **9**: 39-45.
- [27] GUO CJ, PAN Q, JIANG B, CHEN GY, LI DG. Effects of upregulated expression of microRNA-16 on biological properties of culture-activated hepatic stellate cells. *Apoptosis* 2009; **14**: 1331-1340.
- [28] GUO LJ, ZHANG QY. Decreased serum miR-181a is a potential new tool for breast cancer screening. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 680-686.
- [29] HAVENS MA, REICH AA, DUELLI DM, HASTINGS ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 4626-4640.
- [30] HENEGHAN HM, MILLER N, KERIN MJ. Circulating miRNA signatures: promising prognostic tools for cancer. *J Clin Oncol* 2010; **573**-574.
- [31] HENEGHAN HM, MILLER N, LOWERY AJ, SWEENEY KJ, NEWELL J, KERIN MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; **251**: 499-505.
- [32] HO AS, HUANG X, CAO H, CHRISTMAN-SKIELLER C, BENNEWITH K, LE QT, KOONG AC. Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer. *Trans Onc* 2010; **3**: 109-113.
- [33] HUANG Z, HUANG D, NI S, PENG Z, SHENG W, DU X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; **127**: 118-126.
- [34] HUTVÁGNER G, ZAMORE PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; **297**: 2056-2060.
- [35] HU Z, CHEN X, ZHAO Y, TIAN T, JIN G, SHU Y, CHEN Y, XU L, ZEN K, ZHANG C, SHEN H. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1721-1726.
- [36] IMDAHL A. Early diagnosis is crucial for prognosis in gastric cancer. *MMW Fortschr Med* 2008; **150**: 27-28.
- [37] JI X, TAKAHASHI R, HIURA Y, HIROKAWA G, FUKUSHIMA Y, IWAI N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; **55**: 1944-1949.
- [38] JONES CI, ZABOLOTSKAYA MV, KING AJ, STEWART HJ, HORNE GA, CHEVASSUT TJ, NEWBURY SF. Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma. *Br J Cancer* 2012; **107**: 1987-1996.
- [39] KIM VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004; **14**: 156-159.
- [40] KOMATSU S, ICHIKAWA D, TAKESHITA H, KONISHI H, NAGATA H, HIRAJIMA S, KAWAGUCHI T, ARITA T, SHIOZAKI A, FUJIWARA H, OKAMOTO K, OTSUJI E. Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther* 2012; **12** Suppl 1: S53-59.
- [41] KOMATSU S, ICHIKAWA D, TAKESHITA H, TSUJIURA M, MORIMURA R, NAGATA H, KOSUGA T, IITAKA D, KONISHI H, SHIOZAKI A, FUJIWARA H, OKAMOTO K, OTSUJI E. Circulating microRNAs in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2011; **105**: 104-111.
- [42] KONISHI H, ICHIKAWA D, KOMATSU S, SHIOZAKI A, TSUJIURA M, TAKESHITA H, MORIMURA R, NAGATA H, ARITA T, KAWAGUCHI T, HIRASHIMA S, FUJIWARA H, OKAMOTO K, OTSUJI E. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. *Br J Cancer* 2012; **106**: 740-747.
- [43] KOSAKA N, IGUCHI H, YOSHIOKA Y, TAKESHITA F, MATSUKI Y, OCHIYA T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010; **285**: 17442-17452.
- [44] KURASHIGE J, KAMOHARA H, WATANABE M, TANAKA Y, KINOSHITA K, SAITO S, HIYOSHI Y, IWATSUKI M, BABA Y, BABA H. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2012; **106**: 188-192.

- [45] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; **294**: 853-858.
- [46] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, MEYER J, BORKHARDT A, TUSCHL T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; **9**: 175-179.
- [47] LAWRIE CH, GAL S, DUNLOP HM, PUSHKARAN B, LIGGINS AP, PULFORD K, BANHAM AH, PEZZELLA F, BOULTWOOD J, WAINSCOAT JS, HATTON CS, HARRIS AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; **141**: 672-675.
- [48] LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J, LEE J, PROVOST P, RADMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; **425**: 415-419.
- [49] LEE Y, JEON K, LEE JT, KIM S, KIM VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; **21**: 4663-4670.
- [50] LEWIS BP, SHIH IH, JONES-RHOADES MW, BARTEL DP, BURGE CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; **115**: 787-798.
- [51] LI LM, HU ZB, ZHOU ZX, CHEN X, LIU FY, ZHANG JF, SHEN HB, ZHANG CY, ZEN K. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2010; **70**: 9798-9807.
- [52] LI S, MOFFETT HF, LU J, WERNER L, ZHANG H, RITZ J, NEUBERG D, WUCHERPENNIG KW, BROWN JR, NOVINA CD. MicroRNA expression profiling identifies activated B cell status in chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One* 2010; **6**: e16956.
- [53] LI A, OMURA N, HONG SM, VINCENT A, WALTER K, GRIFFITH M, BORGES M, GOGGINS M. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in associated with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Res* 2010; **70**: 5226-5237.
- [54] LI XB, ZHANG ZR, SCHLUESENER HJ, XU SQ. Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med* 2006; **10**: 364-375.
- [55] LI BS, ZHAO YL, GUO G, LI W, ZHU ED, LUO X, MAO XH, ZOU QM, YU PW, ZUO QF, LI N, TANG B, LIU KY, XIAO B. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. *PLoS One* 2012; **7**: e41629.
- [56] LILJA H, ULMERT D, VICKERS AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008; **4**: 268-278.
- [57] LIN PY, YANG PC. Circulating miRNA signature for early diagnosis of lung cancer. *EMBO Mol Med* 2011; **3**: 436-437.
- [58] LIU J, GAO J, DU Y, LI Z, REN Y, GU J, WANG X, GONG Y, WANG W, KONG X. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2012; **131**: 683-691.
- [59] LIU J, VALENCIA-SANCHEZ MA, HANNON GJ, PARKER R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 2005; **7**: 719-723.
- [60] LIU R, ZHANG C, HU Z, LI G, WANG C, YANG C, HUANG D, CHEN X, ZHANG H, ZHUANG R, DENG T, LIU H, YIN J, WANG S, ZEN K, BA Y, ZHANG CY. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer* 2011; **47**: 784-791.
- [61] MA R, JIANG T, KANG X. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; **31**: 38.
- [62] MAHN R, HEUKAMP LC, ROGENHOFER S, VON RUECKER A, MULLER SC, ELLINGER J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011; **77**: 1265.e9-e16.
- [63] MANDEL JS. Screening for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2008; **37**: 97-115.
- [64] MANDELL JT. MiRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008; **133**: 217-222.
- [65] MANNI I, ARTUSO S, CARECCIA S, RIZZO MG, BASERGA R, PIAGGIO G, SACCHI A. The microRNA miR-92 increases proliferation of myeloid cells and by targeting p63 modulates the abundance of its isoforms. *FASEB J* 2009; **23**: 3957-3966.

- [66] MARRERO JA, LOK AS. Newer markers for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; **127**: 113-119.
- [67] MEISTER G, LANDTHALER M, PATKANIOWSKA A, DORSETT Y, TENG G, TUSCHL T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; **15**: 185-197.
- [68] MITCHELL PS, PARKIN RK, KROH EM, FRITZ BR, WYMAN SK, POGOSOVA-AGADJANYAN EL, PETERSON A, NOTEBOOM J, O'BRIANT K, ALLEN A, LIN DW, URBAN N, DRESCHER CW, KNUDSEN BS, STIREWALT DL, GENTLEMAN R, VESSELLA RL, NELSON PS, MARTIN DB, TEWARI M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 10513-10518.
- [69] MOLTZAHN F, OLSHEN AB, BAEHNER L, PEEK A, FONG L, STOPPLER H, SIMKO J, HILTON JF, CARROLL P, BLELLOCH R. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res* 2011; **71**: 550-560.
- [70] MOUSSAY E, WANG K, CHO JH, VAN MOER K, PIERSON S, PAGGETTI J, NAZAROV PV, PALISSOT V, HOOD LE, BERCHEM G, GALAS DJ. MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 6573-6578.
- [71] MURAKAMI T, KIM T, OI H, NAKAMURA H, IGARASHI H, MATSUSHITA M, OKAMURA J, KOZUKA T. Detectability of hypervascular hepatocellular carcinoma by arterial phase images of MR and spiral CT. *Acta Radiol* 1995; **36**: 372-376.
- [72] NG EK, CHONG WW, JIN H, LAM EK, SHIN YV, YU J, POON TC, NG SS, SUNG JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; **58**: 1375-1381.
- [73] OUELLET DL, PERRON MP, GOBEIL LA, PLANTE P, PROVOST P. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol* 2006; **2006**: 69616.
- [74] PARK JE, TAN HS, DATTA A, LAI RC, ZHANG H, MENG W, LIM SK, SZE SK. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* 2010; **9**: 1085-1099.
- [75] PIGATI L, YADDANAPUDI SC, IYENGAR R, KIM DJ, HEARN SA, DANFORTH D, HASTINGS ML, DUELLI DM. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 2010; **5**: e13515.
- [76] PRITCHARD CC, KROH E, WOOD B, ARROYO JD, DOUGHERTY KJ, MIYAJI MM, TAIT JF, TEWARI M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; **5**: 492-497.
- [77] PU XX, HUANG GI, GUO HQ, GUO CC, LI H, YE S, LING S, JIANG L, TIAN Y, LIN TY. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *Gastroenterology* 2010; **25**: 1674-1680.
- [78] QU KZ, ZHANG K, LI HR, AFDHAL NH, ALBITAR M. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2011; **45**: 355-360.
- [79] REAL FX. A catastrophic hypothesis for pancreas cancer progression. *Gastroenterology* 2003; **124**: 1958-1964.
- [80] RODRIGUEZ A, GRIFFITHS-JONES S, ASHURST JL, BRADLEY A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; **14**: 1902-1910.
- [81] ROSS JS. Measuring circulating miRNAs: the new "PSA" for breast cancer? *Oncologist* 2010; **15**: 656.
- [82] SHIGOKA M, TSUCHIDA A, MATSUDO T, NAGAKAWA Y, SAITO H, SUZUKI Y, AOKI T, MURAKAMI Y, TOYODA H, KUMADA T, BARTENSCHLAGER R, KATO N, IKEDA M, TAKASHINA T, TANAKA M, SUZUKI R, OIKAWA K, TAKANASHI M, KURODA M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int* 2010; **60**: 351-357.
- [83] SI H, SUN X, CHEN Y, CAO Y, CHEN S, WANG H, HU C. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res ClinOncol* 2013; **139**: 223-229.
- [84] SONG MY, PAN KF, SU HJ, ZHANG L, MA JL, LI JY, YUASA Y, KANG D, KIM YS, YOU WC. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PLoS One* 2012; **7**: e33608.

- [85] STEER CJ, SUBRAMANIAN S. Circulating microRNAs as biomarkers: a new frontier in diagnostics. *Liver Transplant* 2012; **18**: 265-269.
- [86] STENMAN UH, LEINONEN J, ZHANG WM, FINNE P: Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol* 1999; **9**: 83-93.
- [87] TAKESHITA N, HOSHINO I, MORI M, AKUTSU Y, HANARI N, YONEYAMA Y, IKEDA N, ISOZAKI Y, MARUYAMA T, AKANUMA N, KOMATSU A, JITSUKAWA M, MATSUBARA H. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013; **108**: 644-652.
- [88] TANAKA M, OIKAWA K, TAKANASHI M, KUDO M, OHYASHIKI J, OHYASHIKI K, KURODA M. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS ONE*, 2009; **4**: e5532.
- [89] TAPLIN S, ABRAHAM L, BARLOW WE, FENTON JJ, BERNS EA, CARNEY PA, CUTTER GR, SICKLES EA, CARL D, ELMORE JG. Mammography facility characteristics associated with interpretive accuracy of screening mammography. *J Natl Cancer Inst* 2008; **100**: 876-887.
- [90] THÉRY C, ZITVOGEL L, AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 569-579.
- [91] TOMIMARU Y, EGUCHI H, NAGANO H, WADA H, KOBAYASHI S, MARUBASHI S, TANEMURA M, TOMOKUNI A, TAKEMASA I, UMESHITA K, KANTO T, DOKI Y, MORI M. Circulating mikroRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; **56**: 167-175.
- [92] TRAJKOVIC K, HSU C, CHIANTIA S, RAJENDRAN L, WENZEL D, WIELAND F, SCHWILLE P, BRÜGGER B, SIMONS M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; **319**: 1244-1247.
- [93] TSUJIURA M, ICHIKAWA D, KOMATSU S, SHIOZAKI A, TAKESHITA H, KOSUGA T, KONISHI H, MORIMURA R, DEGUCHI K, FUJIWARA H, OKAMOTO K, OTSUJI E. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010; **102**: 1174-1179.
- [94] TURCHINOVICH A, WEIZ L, LANGHEINZ A, BURWINKEL B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 7223-7233.
- [95] UEHARA M, KINOSHITA T, HOJO T, AKASHI-TANAKA S, IWAMOTO E, FUKUTOMI T. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; **13**: 447-451.
- [96] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, SJÖSTRAND M, LEE JJ, LÖTVALL JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 654-659.
- [97] VALLADARES-AYERBES M, REBOREDO M, MEDINA-VILLAAMIL V, IGLESIAS-DÍAZ P, LORENZO-PATIÑO MJ, HAZ M, SANTAMARINA I, BLANCO M, FERNÁNDEZ-TAJES J, QUINDÓS M, CARRAL A, FIGUEROA A, ANTÓN-APARICIO LM, CALVO L. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *J Transl Med* 2012; **10**: 186.
- [98] VASILESCU C, ROSSI S, SHIMIZU M, TUDOR S, VERONESE A, FERRACIN M, NICOLOSO MS, BARBAROTTO E, POPA M, STANCIULEA O, FERNANDEZ MH, TULBURE D, BUESO-RAMOS CE, NEGRINI M, CALIN GA. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* 2009, **4**: e7405.
- [99] VICKERS KC, PALMISANO BT, SHOUCRI BM, SHAMBUREK RD, REMALEY AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 423-433.
- [100] WALSH JM, TERDIMAN JP. Colorectal cancer screening: scientific review. *JAMA* 2003; **289**: 1288-1296.
- [101] WANG J, CHEN J, CHANG P, LEBLANC A, LI D, ABBRUZZESSE JL, FRAZIER ML, KILLARY AM, SEN S. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res* 2009; **2**: 807-813.
- [102] WANG K, ZHANG S, WEBER J, BAXTER D, GALAS DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: 7248-7259.

- [103] WU X, SOMLO G, YU Y, PALOMARES MR, LI AX, ZHOU W, CHOW A, YEN Y, ROSSI JJ, GAO H, WANG J, YUAN YC, FRANKEL P, LI S, ASHING-GIWA KT, SUN G, WANG Y, SMITH R, ROBINSON K, REN X, WANG SE. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med* 2012; **10**: 42.
- [104] XU J, WU C, CHE X, WANG L, YU D, ZHANG T, HUANG L, LI H, TAN W, WANG C, LIN D. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122 and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog* 2011; **50**: 136-142.
- [105] YAMAMOTO Y, KOSAKA N, TANAKA M, KOIZUMI F, KANAI Y, MIZUTANI T, MURAKAMI Y, KURODA M, MIYAJIMA A, KATO T, OCHIYA T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers* 2009; **14**: 529-538.
- [106] YOSHIZAWA S, OHYASHIKI JH, OHYASHIKI M, UMEZU T, SUZUKI K, INAGAKI A, IIDA S, OHYASHIKI K. Down-regulated plasma miR-92a levels have clinical impact on multiple myeloma and related disorders. *Blood Cancer J* 2012; **2**: e53.
- [107] ZHANG C, WANG C, CHEN X, YANG C, LI K, WANG J, DAI J, HU Z, ZHOU X, CHEN L, ZHANG Y, LI Y, QIU H, XING J, LIANG Z, REN B, YANG C, ZEN K, ZHANG CY. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem* 2010; **56**: 1871-1879.
- [108] ZHANG H, KOLB FA, JASKIEWICZ L, WESTHOF E, FILIPOWICZ W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; **118**: 57-68.
- [109] ZHANG Y, ROMBAOA CP, BANWAIT R, LIU Y, NGO HT, QUANG P, AZAB AK, AZAB F, MAISO P, REAGAN M, SACCO A, ROCCARDO AM, BROWN JR, GHOBRIAL IM. MicroRNA-155 as a potential plasma biomarker for chronic lymphocytic leukemia and Waldenstrom macroglobulinemia. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2011. Oral and Poster Abstracts.
- [110] ZHAO H, SHEN J, MEDICO L, WANG D, AMBROSONE CB, LIU S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One* 2010; **5**: e13735.
- [111] ZHENG D, HADDADIN S, WANG Y, GU LQ, PERRY MC, FRETER CE, WANG MX. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; **4**: 575-586.
- [112] ZHI F, CAO X, XIE X, WANG B, DONG W, GU W, LING Y, WANG R, YANG Y, LIU Y. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2013; **8**: e56718.
- [113] ZHOU X, RUAN J, WANG G, ZHANG W. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* 2007; **3**: e37.
- [114] ZHU W, LIU X, HE J, CHEN D, HUNAG Y, ZHANG YK. Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: A case control study. *BMC Cancer* 2011; **11**: 393.
- [115] ZHU W, QIN W, ATASOY U, SAUTER ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009; **2**: 89.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 30.10.2013

Przyjęto: 14.01.2014

Michał Budzyński

Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

ul. Radziwiłłowska 11, 20-059 Lublin

e-mail:micha_s20@interia.pl

