

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Analýza volných nukleových kyselin v moči urologických pacientů

Analysis of cell-free nucleic acids in urine of urological patients

Mgr. Šárka Šantorová

Praha, 2019

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

v Praze, Albertov 4, Praha 128 00

Školitel: Prof. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	1
Abstract	2
I Úvod	3
II Literární přehled.....	3
II.1 miRNA	3
II.2 Volná DNA	5
II.3 Rakovina močového měchýře.....	6
III Cíle práce:.....	7
IV Materiál a metody.....	8
IV.1 Soubory vzorků	8
IV.2 Zpracování moči.....	8
IV.3 Izolace miRNA z moči.....	9
IV.4 Izolace cfDNA z moči.....	9
IV.5 Reverzní transkripce miRNA	9
IV.6 Preamplifikace miRNA	9
IV.7 Real-time PCR	9
V Výsledky	11
V.1 miRNA v moči.....	11
V.2 cfDNA v moči.....	13
VI Diskuze	14
VI.1 miRNA v moči.....	14
VI.2 cfDNA v moči.....	16
VII Závěr.....	18
VIII Seznam publikací.....	19
VIII.1 Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace	19
VIII.2 Publikace <i>in extenso</i> , které nejsou podkladem disertace	19

Abstrakt

Ve dvou studiích zabývajících se volnými nukleovými kyselinami v moči byl hledán biomarker pro odlišení pacientů s rakovinou močového měchýře od kontrolní skupiny. Karcinom močového měchýře tvoří 4 % nově diagnostikovaných onkologických onemocnění v České republice a zatím neexistuje dostatečně přesná neinvazivní metoda k jeho diagnostice. Supernatant moči, omývající sliznici močového měchýře, který neobsahuje buňky a jejich fragmenty, se zdá být vhodným zdrojem biomarkerů pro neinvazivní diagnostiku.

V jedné studii byly zkoumány miRNA, jako neinvazivní biomarkery rakoviny močového měchýře. miRNA jsou krátké nekódující RNA, které blokují translaci, vyskytují se ve všech tělních tekutinách a jsou velmi stabilní.

K nalezení vhodných markerů mezi miRNA byla provedena studie o třech částech. Ve všech třech částech bylo vyšetřeno celkem 109 jedinců (36 kontrol a 73 pacientů s rakovinou močového měchýře). Analýza miRNA byla založena na RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). V první fázi bylo vyšetřeno 59 jedinců TaqMan array kartami s 381 miRNA. V druhé fázi byly potvrzovány výsledky první fáze na stejném souboru jedinců jednotlivými assayemi pro 13 vybraných miRNA. Ve třetí fázi byl vyšetřen nový soubor jedinců (23 kontrol a 27 pacientů s rakovinou močového měchýře) opět assayemi pro jednotlivé miRNA. Výsledky všech tří fází byly normalizovány třemi miRNA vybranými algoritmem geNorm v programu qBase+©: miR 191, miR-28-3p a miR 200b.

Bylo nalezeno pět miRNA, které měly signifikantně sníženou expresi v supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře oproti kontrolám: miR-125b, miR-30b, miR-204, miR 99a a miR-532-3p. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s miR-125b a miR 99a.

Tyto výsledky naznačují, že by hladiny miRNA mohly sloužit jako diagnostický marker k neinvazivní detekci rakoviny močového měchýře.

V druhé studii byly měřeny hladiny volné DNA (*cell-free* DNA – cfDNA) v močovém supernatantu jako biomarkeru rakoviny močového měchýře. Bylo vyšetřeno celkem 100 jedinců (34 kontrol a 66 pacientů s rakovinou močového měchýře). U každého jedince byl zaznamenán objem moči a pomocí real-time PCR stanovena koncentrace cfDNA. Z těchto údajů bylo vypočteno celkové množství cfDNA. Bylo zjištěno, že druhá ranní moč je pro stanovení celkového množství cfDNA vhodnější než první ranní moč.

Byla navržena metodologie měření cfDNA v moči. Výpočet celkového množství cfDNA v druhé ranní moči dokázal odlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol ($p=0,0002$).

Kvantifikace cfDNA v supernatantu moči má při dodržení metodologických postupů potenciál sloužit jako neinvazivní diagnostický marker rakoviny močového měchýře.

Klíčová slova: miRNA, cfDNA, moč, rakovina močového měchýře, neinvazivní marker

Abstract

The two studies follow free nucleic acids in urine in search for biomarkers to distinguish urinary bladder cancer patients from controls. Bladder cancer forms 4 % of newly diagnosed oncological diseases in the Czech Republic. Nowadays, there is no accredited non-invasive method for its diagnosis, which is sufficiently accurate. Urine supernatant, which is washing the bladder mucosa and which does not contain cell debris, seems to be an appropriate source of biomarkers for non-invasive diagnosis.

miRNAs, as a non-invasive biomarker of urinary bladder cancer, were studied in one of the studies. miRNAs are short noncoding RNA, which block the process of translation. miRNAs occur in all body fluids and are relatively stable.

A study with three phases was assessed to find a suitable miRNA marker. 109 individuals were examined in total (36 controls and 73 bladder cancer patients). The analysis of miRNAs was based on RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). In the first phase, the urine of 59 individuals was analyzed on TaqMan array card with 381 miRNAs. In the second phase, the results of the first phase were confirmed on the same cohort by a single miRNA assay. In the third phase, a new cohort was used (23 controls and 27 bladder cancer patients), analyzed by a single miRNA assay again. All the results were normalized to three miRNAs, which were chosen by geNorm algorithm within the qBase⁺ program: miR-191, miR-28-3p, and miR-200b.

Five miRNAs were found to be down-regulated in the urine supernatant of bladder cancer patients: miR-125b, miR-30b, miR-204, miR 99a, and miR-532-3p. The best results were reached with miR-125b and miR 99a.

These results show that miRNA levels can be used as a diagnostic marker for non-invasive detection of bladder cancer.

Levels of cell-free DNA (cfDNA) as a biomarker for urinary bladder cancer were measured in the second study. Altogether, 100 individuals were examined (34 controls and 66 bladder cancer patients). The volume of each portion of voided urine was recorded, and cfDNA concentration was measured by real-time PCR. This way the total amount of cfDNA was calculated. The second portion of morning urine was assessed as the better one for the calculation of cfDNA total amount than the first morning portion.

The methodology for measuring the cfDNA in urine was proposed. Calculation of the total cfDNA amount in the second morning urine is capable of distinguishing bladder cancer patients from controls ($p=0.0002$).

When following correct methodological procedures, quantification of cfDNA in urine supernatant has the potential to serve as a non-invasive diagnostic marker for bladder cancer.

Key words: miRNA, cfDNA, urine, bladder cancer, non-invasive marker

I Úvod

V této práci byly studovány rozdíly v expresi miRNA (podrobněji v oddílu III.1. Literárního přehledu) a koncentraci volné cirkulující DNA (cfDNA, *cell free DNA*) (oddíl III.2.) v supernatantu moči u pacientů s karcinomem močového měchýře (oddíl III.3) proti zdravým kontrolám i kontrolám s benigním onemocněním vylučovací soustavy.

Karcinom močového měchýře tvoří 4 % nově diagnostikovaných onkologických onemocnění v České republice. Jde o 11. nejčastěji diagnostikované maligní onemocnění ve světě. Rakovina močového měchýře postihuje třikrát častěji muže než ženy. Zatím neexistuje spolehlivé diagnostické neinvazivní vyšetření. Supernatant moči, omývající sliznici močového měchýře, který není zatížen buněčnými nukleovými kyselinami, se zdá být vhodným zdrojem biomarkerů pro neinvazivní diagnostiku.

miRNA jsou krátké nekódující RNA, které blokují translaci genu na základě komplementarity s částí příslušné mRNA, vyskytují se ve všech tělních tekutinách a jsou velmi stabilní. Ve studiích předcházejících naší studii bylo prokázáno, že při použití hladiny vybraných miRNA lze rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol.

cfDNA je DNA v tělních tekutinách, která není vázána v buňce. Její množství je zvýšeno při poškození tkání i při fyziologických stavech jako je zvýšená námaha a těhotenství. Množství cfDNA je u onkologických pacientů zvýšeno a u většiny pacientů po léčbě klesá. cfDNA lze k diagnostice využít několika způsoby: lze zjišťovat koncentraci cfDNA a její integritu, detekovat nádorově specifické mutace či charakterizovat stupeň metylace vybraných sekvencí přítomných v cfDNA. Na základě kvantifikace cfDNA v močovém supernatantu se rovněž podařilo odlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od zdravých jedinců.

Poznámka:

V práci je používáno spojení „exprese miRNA“ i když to *de facto* exprese není. Tento termín je použit v souladu s literaturou, kde běžně používán je, protože je využívána stejná metodika jako při studiu opravdové exprese.

Zároveň je v práci použito mnoho termínů a zkratk především z anglického jazyka, které nemají český ekvivalent a nejsou obvykle překládané do češtiny.

II Literární přehled

II.1 miRNA

MicroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA, které byly objeveny v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans* Leem a kol., kteří zjistili, že 22 nukleotidů dlouhé RNA blokují translaci genu na základě komplementarity s částí příslušné mRNA. Po sedmi letech byla charakterizována let-7, miRNA, která je evolučně konzervována. V dalších letech bylo objeveno mnoho dalších miRNA u rostlin i všech živočišných druhů včetně lidí. Některé miRNA jsou exprimovány ve všech tkáních, jiné jsou tkáňově specifické.

II.1.1 Nomenklatura microRNA

Zralá miRNA je značena zkratkou miR a unikátním číselným kódem, které jsou u živočichů odděleny pomlčkou. Čísla jsou přidělována postupně v rámci druhu, ale identické miRNA mají stejné číslo bez

ohledu na organizmus. Za další pomlčkou může být ještě číselná přípona, která označuje zralé miRNA s identickou sekvencí uvnitř jednoho druhu. Když bylo zjištěno, že *passenger strand* také může cílit na mRNA, a proto se začaly používat přípony -3p a -5p.

Geny pro miRNA se označují kapitálkami (MIR) a jsou pojmenovány po svých produktech. pre-miRNA se zapisuje kurzívou a pouze malými písmeny (*mir-*).

Pokud je potřeba rozlišit miRNA z různých živočichů, používá se před miR troj písmenná zkratka skládající se z jednoho písmene názvu rodu a dvou písmen názvu druhu (*Homo sapiens sapiens* – hsa-miR).

Vzhledem k rozšiřujícím se znalostem o miRNA a jejich zvyšujícímu se počtu někteří volají po revizi a zpřehlednění dalšího označování miRNA. Pro orientaci v miRNA názvech, vlastnostech a hledání jejich cílů je mnoho databází jako například www.mirBase.org.

II.1.2 Biogeneze miRNA

miRNA se v genomu vyskytují většinou v intronech protein kódujících genů, ale i v oblastech, které nekódují RNA.

Prvotní prekurzory pri-miRNA (*primary precursor for miRNA*) jsou transkribovány RNA polymerázou II, ale mohou být i produktem RNA polymerázy III. pri-miRNA mají na 5' konci 7-metyl guanozinovou (m⁷G 7-metyl guanozin) čepičku a poly-A řetězec na 3' konci. Transkript pri-miRNA může být až několik set bazí dlouhý a může obsahovat více miRNA naráz.

Po translaci je pri-miRNA v jádře štěpena enzymem Drosha na pre-miRNA (*precursor for miRNA*). pre-miRNA, vzniklá štěpením pri-miRNA, je po navázání na Exportin-5 transportována do cytoplazmy. Typická pre-miRNA je tvořena vlásenkovitou strukturou se smyčkou.

V cytoplazmě je pre-miRNA štěpena enzymem Dicer na cca 22 nt dlouhý dvouvláknový miRNA duplex obsahující miRNA a miRNA*.

Duplex miRNA vytvoří komplex s enzymem RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). miRNA asociuje s enzymem RISC a podle asymetrické nedokonalosti párování dojde k výběru miRNA (*guide strand*), která navede RISC na mRNA.

II.1.3 Funkce microRNA

miRNA inhibují translaci tím, že v komplexu s RISC nasedají na 3'UTR (*untranslated region* – netranslatovaná oblast), popřípadě 5'UTR nebo kódující oblast příslušné mRNA. Díky nasedání na různé části mRNA a účinnosti i při neúplné komplementaritě může miRNA regulovat více cílů a jedna mRNA může být regulována více miRNA. Na základě míry komplementarity RISC buď mRNA štěpí (při vysoké komplementaritě), nebo jen blokuje translaci (při nedokonalé komplementaritě). Nejdůležitější je přesné párování v takzvané *seed* sekvenci, ale závisí i na dalších sekvencích a jejich kombinaci.

K represi může dojít čtyřmi způsoby: deadenylací, při iniciaci translace, přerušením v průběhu translace a přerušením elongace.

II.2 Volná DNA

Volná dna (cfDNA, *cell free DNA*) byla objevena v krvi již v roce 1948 Mandelem. Dále se tímto tématem nikdo nezabýval, až o desetiletí později byla prokázána u pacientů se systémovým lupus erythematoses a pacientů s dalšími onemocněními. V plazmě zdravých lidí byl obsah cfDNA dlouho diskutován, až s moderními metodami byla cfDNA potvrzena jako běžná složka plazmy i u zdravých lidí.

cfDNA se nejčastěji vyskytuje ve fragmentech o velikosti 180 bp a jejích násobcích, což se nápadně podobá vzoru DNA z apoptotických buněk. Fragmentace cfDNA kopíruje rozložení nukleozomů. Na základě toho se předpokládá, že se většina cfDNA v cirkulaci vyskytuje v podobě nukleoproteinu anebo vázána na povrch buněk.

Množství cfDNA je zvýšeno při poškození tkání i při fyziologických stavech jako je zvýšená námaha a těhotenství. V těhotenství je kvantum cfDNA zvýšeno o fetální DNA, ta je do maternální cirkulace uvolňována z trofoblastu a je po porodu velmi rychle odbourána.

Koncentrace cfDNA u zdravých se neliší mezi pohlavími, věkovými skupinami ani rasami. U téměř všech malignit je její koncentrace zvýšena.

Prokaryotická i eukaryotická DNA z média/cirkulace je aktivně přijímána do buněk, což naznačuje možnost jejího využití jako posla se signální funkcí mezi buňkami a tkáněmi. Savčí DNA v cirkulaci působí imunopresivně. Proti prokaryotické DNA vznikají protilátky a jsou důležité při imunitní reakci.

II.2.1 Původ cfDNA

Přesto, že existence volné cirkulující DNA byla popsána už v roce 1948, přesný mechanismus jejího uvolňování je stále nejasný. Vzhledem k velikosti fragmentů cfDNA se jako hlavní původce jeví apoptotické a nekrotické buňky.

DNA je buňkami aktivně uvolňována do cirkulace do dosažení určité koncentrace mimo buňky.

Většina nenádorové cfDNA v cirkulaci pochází z hematopoetických buněk. Dalším zdrojem jsou apoptotické buňky, které DNA uvolňují do cirkulace.

II.2.2 cfDNA a malignity

Fragmenty nádorové DNA v cirkulaci pochází z nekrotických neoplastických buněk, které jsou fagocytovány makrofágy. Makrofágy také fagocytují apoptotické buňky a tím se do cirkulace dostává i nenádorová cfDNA.

cfDNA je nejčastěji ve fragmentech o velikosti 180 bp a jejích násobcích, ale vyskytuje se i v mnohem delších fragmentech, což odpovídá původu z apoptotických i nekrotických buněk pacientů s rakovinou.

Stupeň invazivity nádoru koreluje s množstvím fragmentů cfDNA v krvi. Čím rychleji nádor roste a čím je vyšší míra invaze, dochází k horšímu krevnímu zásobením a tím více je nádor v hypoxii a více dochází k nekróze.

Množství cfDNA u většiny onkologických pacientů po léčbě klesá, pokud ne, je to špatný prognostický znak naznačující, že tumor na léčbu neodpovídá.

II.2.3 cfDNA v moči

DNA se dá získat ze dvou částí moči, které oddělíme centrifugací 1) ze supernatantu – skutečná cfDNA a 2) ze sedimentu – čili buněk odloučených ze sliznice močového traktu. Nemálo studií pracuje i s celou močí, pracují tedy s volnou i buněčnou DNA.

cfDNA v supernatantu moči pochází ze dvou zdrojů, prvním jsou buňky močového traktu a druhým je krev. Z buněk uroteliálního traktu má volná DNA větší fragmenty, někdy i přes 1 kb (s největším zastoupením mezi 200-300 bp), delší než jsou běžné fragmenty v krvi a plazmě. Z krve se cfDNA do moči dostává filtrací ledvinovými glomeruly, přes které projdou fragmenty v délce mezi 100 a 250 bp.

II.3 Rakovina močového měchýře

Rakovina močového měchýře je 11. nejčastěji diagnostikované maligní onemocnění ve světě. V České republice jde o šesté nejčastější maligní onemocnění a tvoří 4 % nově diagnostikovaných malignit. Rakovina močového měchýře postihuje třikrát častěji muže než ženy.

Přibližně 70 % nádorů tvoří neinvazivní nádory, které mají velmi dobrou prognózu i přes to, že často recidivují (50-70 % případů). Jen zřídka, zhruba u 15 % pacientů dochází k progresi. Zbytek tvoří nádory, které infiltrují subepiteliální pojivovou tkáň a svaly, pacienti s těmito tumory mají méně než 50 % pravděpodobnost pětiletého přežití.

Kouření cigaret je výrazným rizikovým faktorem pro vznik rakoviny močového měchýře, mezi další patří aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, ionizační záření, ale i schistosomóza.

Nejčastějším příznakem je bezbolestná makroskopická hematurie, dalším příznakem je nesymptomatická mikroskopická hematurie, zbytek pacientů má potíže, které se snadno zamění s příznaky jiných urologických onemocnění.

II.3.1 Diagnostika a klasifikace rakoviny močového měchýře

Diagnostickými metodami jsou cystoskopie, ultrazvuk, počítačová tomografie (CT), vyšetření moči, popřípadě výplachu močového měchýře a odloučených nádorových buněk. Cystoskopie je zlatý standard, protože je to diagnostická i terapeutická metoda. Léčebnou metodou je transuretrální resekce močového měchýře nebo radikální cystektomie.

Klasifikace rakoviny močového měchýře spočívá ve stagingu (TNM klasifikace, kterou provádí urolog) a gradingu (patologického stanovení stupně malignity).

Pro účely léčby se uroteliální karcinom dělí na dvě velké skupiny:

1) Mezi NMIBC (*non-muscle invasive bladder cancer* – do svalů neinvadující rakovina močového měchýře) patří stadia Ta, T1 a CIS (*Carcinoma in situ*). Standartní léčba je transuretrální resekce lézí a intravezikální instilace mytomycinu C nebo instilace roztoku *Bacillus Calmette-Guérin*.

2) MIBC (*muscle invasive bladder cancer* – do svalů invadující rakovina močového měchýře). Všechny MIBC jsou považovány za HG nádory. Radikální cystektomie spolu s neoadjuvantní chemoterapií je standartní léčba.

II.3.2 miRNA v moči jako diagnostický marker

Rakovina močového měchýře je charakteristická dlouhou dobou přežití a z ekonomického hlediska patří mezi nejnákladnější z rakovin na léčbu od diagnózy do úmrtí pacienta. I proto by nalezení vhodného markeru mohlo vést nejen k lepší péči o pacienta, ale i ke snížení těchto nákladů.

Přes to, že se obsahem miRNA v moči zabývá mnoho souborných článků, každé má kritéria, při kterých některé výzkumy vypadnou. Proto jsem provedla vlastní rešerši, kdy jsem do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) zadala hesla: „miRNA“, „bladder cancer“, „urine“. K 24.4.2019 bylo nalezeno 99 článků, vynechala jsem všechny nepůvodní práce (review, meta analýzy) a práce, které se do výběru dostaly, přes to, že se nezabývaly jedním z kýžených témat a zbylo 41 článků. Přehledné shrnutí je v tabulce 1 v nezkrácené verzi dizertační práce.

I když většina těchto článků závěrem uvádí, že jejich postup by byl vhodný jako neinvazivní diagnostický marker, žádný test se v České Republice dodnes rutinně nepoužívá.

II.3.3 cfDNA v moči jako diagnostický marker

V dnešní době je velká poptávka po neinvazivních diagnostických metodách, které nahrazují nepřijemné invazivní výkony jako je biopsie či cystoskopie.

Jako první volba „neinvazivně“ získaného vzorku je stále plazma, ale u urologických malignit se moč nabízí jako dobře dostupný a opravdu neinvazivně získaný zdroj biologického materiálu. Cytologie moči, i přes velmi vysokou specifitu (94-98 %), nemůže být použita jako samostatný test z toho důvodu, že má velmi nízkou senzitivitu (38-51 %) a to hlavně u neinvazivních tumorů. cfDNA v moči má u urologických malignit lepší výpovědní hodnotu než cfDNA v plazmě.

Několik studií porovnává množství cfDNA v moči pacientů s karcinomem močového měchýře k pacientům s benigními onemocněními. Tento přístup má slibné diagnostické i prognostické výsledky.

cfDNA lze k diagnostice využít několika způsoby: zjišťování koncentrace cfDNA, delece, ztráta heterozygoty, integrita cfDNA, míra metylace nebo mutace v genech či jejich promotorech.

Jako lepší zdroj informací se zdá být močový supernatant, ve kterém je vyšší zastoupení nádorové DNA než v peletu buněk, což je pravděpodobně způsobeno vyšší mírou nekrózy v prostředí tumoru.

III Cíle práce:

Práce si kladla za cíl najít odpovědi na následující otázky:

1. Existují klinicky využitelné rozdíly v obsahu miRNA v moči pacientů s nádorem močového měchýře, které jednoznačně odlišují tyto pacienty od osob bez tohoto nádoru?
2. Lze najít rozdíly v expresi močových miRNA dovolující staging pacientů s nádory močového měchýře?
3. Lze hladiny volné DNA v moči využít pro diagnostiku a staging u pacientů s nádory močového měchýře?

Předpoklady pro splnění cílů:

1. V literatuře je mnoho studií zabývajících se expresí miRNA v moči či jejich frakcích u pacientů s rakovinou močového měchýře a porovnávající ji oproti jejich expresi u kontrol, které poukazují na slibnou možnost analýzy vybraných miRNA jako diagnostického nástroje k detekci nádoru močového měchýře.

2. Některé ze studií byly schopny na základě exprese miRNA provést staging pacientů s rakovinou močového měchýře.

cfDNA byla v několika dříve publikovaných pracích studována jako marker potenciálně sloužící k odlišení pacientů.

IV Materiál a metody

IV.1 Soubory vzorků

Všechny vzorky byly odebírány se souhlasem příslušných etických komisí a s písemným informovaným souhlasem pacientů.

Vzorky přirozeně vymočené moči byly sbírány na Urologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Urologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a fakultní nemocnice Motol.

Práce byla financována grantem IGA MZ CR, NT12417 Mezinárodní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České Republiky.

IV.1.1 Soubor vzorků pro studium miRNA v supernatantu moči

Odebrána byla druhá ranní moč celkem 109 jedinců. Vzorky zahrnuté do studie neměly pozitivní kultivaci ani leukocyturii. Pacienti s podezřením na uroteliální karcinom podstoupili transuretrální resekci močového měchýře nebo radikální cystektomii. Staging a grading rakoviny byl určen urologem a patologem na základě zobrazovacích.

Studie sestávala ze tří částí, z nichž první dvě měly shodné složení vyšetřovaných jedinců (46 pacientů s uroteliálním karcinomem a 13 zdravých kontrol), ve třetí fázi byl vybrán nový soubor jedinců (27 pacientů a 23 kontrol). Kontroly byly rozděleny na zdravé jedince a pacienty s benigním urologickým onemocněním.

IV.1.2 Soubor vzorků pro studium cfDNA v supernatantu moči

Odebírány byly přirozeně vymočené vzorky první a druhé (získané cca 2 h po první) ranní moči. Vzorky zahrnuté do studie byly kultivačně negativní a bez leukocyturie. Na začátku byla do sterilních nádob odebrána první a druhá ranní moč celkem 27 jedinců; 10 pacientů s uroteliálním karcinomem, 11 zdravých a 6 kontrol s benigním urologickým onemocněním. Následně byla odebrána pouze druhá ranní moč od dalších 73 jedinců (34 kontrol a 66 pacientů s rakovinou močového měchýře).

IV.2 Zpracování moči

První a druhá ranní moč byla odebrána do sterilních nádob a její objem byl zaznamenán, z moči byly odebrány vzorky pro potřebné vyšetření (analýza moči, cytologie a kultivace). 50 ml moči bylo odebráno do zkumavky s 535 µl 0,5 M EDTA a druhých 50 ml do zkumavky s 1,5 ml RNA Later (Ambion, Life Technologies, NY, USA).

Moč s EDTA i RNA Later byla stočena (1100 g, 10 min, 10 °C). Supernatanty byly uskladněny v -20 °C.

IV.3 Izolace miRNA z moči

Z 1 ml supernatantu moči s RNA Laterem roztátého na ledu byly izolovány miRNA kitem *Urine microRNA Purification Kit* (NORGEN BIOTEK CORPORATION, Canada) podle standardního.

Vyizolované miRNA byly použity ihned do reverzní transkripce.

IV.4 Izolace cfDNA z moči

Z 2 ml supernatantu moči s EDTA roztátého na ledu byla izolována cfDNA kitem *QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit* (QIAGEN, Germany) podle standardního protokolu pro 2 ml moči.

Vyizolovaná cfDNA byla použita ihned do real-time PCR.

IV.5 Reverzní transkripce miRNA

IV.5.1 Reverzní transkripce pro array technologii

Reverzní transkripce byla prováděna podle protokolu *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* pro *TaqMan® Array Human MicroRNA Card*. Použity byly primery *Megaplex™ RT Primers, Human Pool A v2.1* (vše Applied Biosystems™, CA, USA).

cDNA byla okamžitě zmrazena na -20 °C.

IV.5.2 Reverzní transkripce pro jednotlivé assaye

Reverzní transkripce byla prováděna podle protokolu *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* pro jednotlivé assaye. Použity byly primery *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems™, CA, USA) pro jednotlivé miRNA.

cDNA byla okamžitě zmrazena na -20 °C.

IV.6 Preamplifikace miRNA

Preamplifikace byla prováděna pouze při použití na array karty, a to podle protokolu *TaqMan® MicroRNA Preamplification s Megaplex™ PreAmp Primers*. Použity byly primery *Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A v2.1* (Applied Biosystems™, CA, USA).

Preamplifikované miRNA byly bez ředění ihned použity do real-time PCR.

IV.7 Real-time PCR

IV.7.1 Relativní kvantifikace miRNA

Pro relativní kvantifikaci miRNA byl použit stroj ABI Prism 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™, CA, USA) a real-time PCR.

IV.7.1.1 Relativní kvantifikace miRNA v uspořádání array

Do reakce na real-time PCR bylo podle protokolu *TaqMan® MicroRNA real Time PCR Reactions*.

Tento mix byl nanesen na kartu *TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1* (Applied Biosystems™, CA, USA).

IV.7.1.2 Relativní kvantifikace miRNA v jednotlivých assayích

Do reakce na real-time PCR bylo smícháno:

<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG</i>	8 µl
miRNA primery + próba	0,8 µl
Voda	3,2 µl
miRNA z reverzní transkripce	4 µl

Destička byla stočena 680 g, 90 s.

IV.7.2 Absolutní kvantifikace cfDNA

Pro absolutní kvantifikaci cfDNA v moči byla použita a metoda real-time PCR. Pro tvorbu standardní křivky byl použit gen *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (GenBank: NG_007073.2, PeBiosystems, Foster City, CA, USA). Standardní křivka byla vytvořena sériovým ředěním standardní genomické DNA (*TaqMan Control Genomic DNA (Human)*, 10 ng/µl, Applied Biosystems, USA) se sedmi body v rozsahu: 10 ng/µl – 31,25 pg/µl.

Do reakce na real-time PCR bylo podle protokolu smícháno:

<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG</i>	10 µl
<i>GAPDH</i> primery + próba	1,4 µl
Voda	3,6 µl
DNA (standardní nebo vyizolovaná z moči)	5 µl

Destička byla stočena 680 g, 90 s.

IV.7.3 Statistická analýza dat

Výsledky byly zpracovány statistikem v programech *ExpressionSuite Software v1.0.3* (Applied Biosystems™, CA, USA), *qBase+® v2.4* (Biogazelle, Belgium), *Statistica software verze 10* (StatSoft, Inc., Tulsa, USA), *G*Power verze 3.1.9.2* (Franz Faul, Universität Kiel, Germany), *The Waikato Environment for Knowledge Analysis (Weka) software* (University of Waikato, New Zealand) a *MedCalc (MedCalc Software, Belgium)*.

IV.7.3.1 Výběr miRNA endokontrol k normalizaci výsledků z jednotlivých assayí

K výběru endokontrol byl použit algoritmus *geNorm* v programu *qBase+®*. Algoritmus na základě stability exprese jednotlivých miRNA u pacientů a kontrol vybral nejstabilnější kombinaci miRNA, která byla posléze použita pro normalizaci výsledků pro jednotlivé assaye.

IV.7.3.2 Analýza miRNA ze supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře

Pro statistickou analýzu dat byl použit Man-Whitneyův U test s Benjamini-Hochbergovou korekcí v programech qBase[®] a Statistica software. V programu G*Power vypočetl efektivní velikost porovnávaných skupin pro třetí fázi studie.

K určení diagnostické síly miRNA vybraných ve třetí fázi studie byl sestaven alternující rozhodovací strom.

IV.7.3.3 Analýza cfDNA ze supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře

Pro statistickou analýzu dat byly aplikovány neparametrické testy. Pro porovnání koncentrace cfDNA v moči s celkovým množstvím cfDNA ve vymočeném objemu byl použit Wilcoxonův test pro párové vzorky. Pro zhodnocení vztahu mezi koncentrací a celkovým množstvím cfDNA byla použita regresní analýza. K porovnání celkového množství cfDNA a její koncentrace mezi pacienty a kontrolami byl použit Mann-Whitneyův test pro nezávislé vzorky. Pro zhodnocení rozdílů mezi skupinami kontrol, pacientů s rakovinou močového měchýře a pacientů s benigním urologickým onemocněním byl použit Kruskal-Wallisův test. Párové srovnání podskupin pacientů s rakovinou močového měchýře bylo provedeno Mann-Whitneyovým testem s Bonferoniho korekcí.

IV.7.4 Bioinformatická analýza výsledků

Za využití miRWalk databáze byly vyhledány validované cílové geny nalezených miRNA. Takto selektované sety genů byly dále analyzovány za pomoci databáze DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) s cílem najít funkčně vymezené klastry genů za podmínek střední klasifikační stringence a aplikace Benjaminiho korekce.

V Výsledky

V.1 miRNA v moči

V.1.1 První fáze

Na začátku studie bylo potřeba vybrat vhodné miRNA s potenciálem rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol a zároveň vybrat vhodnou normalizační metodu použitelnou pro supernatant moči. Bylo vyšetřeno 13 kontrol a 46 pacientů. Jako výhodná metoda byly použity array karty se 381 miRNA, jejichž výhodou je velké množství miRNA na jedné platformě.

miRNA byly izolovány ze supernatantu druhé ranní moči (získaná cca 2 h po první ranní moči).

Dále byl hledán vhodný způsob normalizace, protože nebyla k dispozici žádná vhodná, ustálená a vědeckou obcí uznávaná endokontrola pro miRNA v supernatantu moči.

K výběru byl použit algoritmus geNorm v programu qBase[®]. Byly vybrány tři miRNA jako endokontroly: miR-191, miR-28-3p a miR-200b.

Bylo vybráno celkem 13 miRNA pro použití ve druhé fázi. Kromě devíti vybraných na základě nízké p hodnoty a zároveň velkého rozdílu poměru mezi pacienty a kontrolami (let-7c, miR-125b, miR-16, miR-204, miR-30b, miR425, miR-532-3p, miR-93 a miR-99a), byly vybrány čtyři miRNA (miR-199a-3p, miR-301a, miR-372 a miR-519a), které se zdály být častěji exprimované u pacientů než u kontrol.

V.1.2 Druhá fáze

Ve druhé fázi studie byly ověřovány výsledky první fáze na stejném souboru jedinců (13 kontrol a 46 pacientů s rakovinou močového měchýře), ale metodou jednotlivých assayí pro 13 miRNA, vybraných v první fázi.

miRNA byly izolovány z druhého dílu supernatantu druhé ranní moči a výsledky byly normalizovány na tři endokontroly vybrané algoritmem geNorm.

Ve druhé fázi byly potvrzeny signifikantní rozdíly v expresi u 10 ze 13 miRNA, vybraných v první fázi (let-7c, miR-125b, miR-16, miR-204, miR-30b, miR425, miR-532-3p, miR-93, miR-99a a miR-199a-3p).

V.1.3 Třetí fáze

Účelem třetí fáze bylo validovat výsledky předchozích dvou fází na novém souboru jedinců. K normalizaci byly použity tři endokontroly: miR-191, miR-28-3p a miR-200b. Metoda detekce miRNA byla také stejná – assaye pro jednotlivé miRNA.

Tato fáze byla zaměřená na určení rozdílů mezi kontrolami a pacienty. Aby byla testována schopnost rozpoznat pacienty s nižšími stádii rakoviny močového měchýře, nejsou zařazeni pacienti se stádii pT3 a pT4. Zároveň bylo do souboru kontrol zařazeno i pět pacientů s benigním urologickým onemocněním, aby se soubor přiblížil klinické praxi.

Na novém souboru vzorků bylo potvrzeno signifikantní snížení exprese pěti miRNA u pacientů oproti kontrolám: miR-125b, miR-30b, miR-204, miR-99a a miR-532-3p.

Mezi expresí miR-99a a miR-125b byla nalezena korelace ($r=0,89$, $p<0,0001$), proto byla pomocí databází miRWalk a DAVID provedena bioinformatická analýza validovaných. Výsledky naznačují, že obě miRNA mohou regulovat mnoho drah, hrajících zásadní roli při karcinogenezi močového měchýře (Tabulka A).

Tabulka A: Vybrané dráhy, které jsou regulované miR-99a nebo miR-125b

Dráha	p hodnota po Benjaminiho korekci	Počet genů
Regulace apoptózy	$1,8 \times 10^{-22}$	64
Regulace transkripce RNA polymerázou II	$6,5 \times 10^{-23}$	62
Odpověď na organické látky	$1,4 \times 10^{-16}$	52
Odpověď na stimuly steroidních hormonů	$1,9 \times 10^{-13}$	26
Odpověď na cyklické organické látky	$3,5 \times 10^{-6}$	14
Regulace vazby DNA	$1,2 \times 10^{-13}$	22
Rakovina močového měchýře	$4,3 \times 10^{-11}$	15
Vaskularizace	$2,2 \times 10^{-5}$	18

V.2 cfDNA v moči

Moč je ideálním zdrojem volných nukleových kyselin a vzhledem k přímému kontaktu se sliznicí močového měchýře je ideálním médiem ke zkoumání močové cfDNA. Naším cílem tedy bylo zaměřit se na standardizaci metodiky kvantifikace cfDNA v supernatantu moči a její využití k odlišení zdravých kontrol a pacientů bez rakoviny od pacientů s rakovinou močového měchýře.

V.2.1 Výběr vhodného času pro odběr moči

Jako první bylo zkoumáno, zdali je vhodnější první nebo druhá ranní moč (získaná cca 2 h po první ranní moči), jako zdroj cfDNA. Při odběru byl zaznamenán celkový objem moči (V , [ml]). Izolována a analyzována byla první a druhá ranní moč 27 jedinců (11 zdravých dobrovolníků, 6 pacientů s benigními urologickými onemocněními a 10 pacientů s rakovinou močového měchýře) ke stanovení koncentrací močové cfDNA (c , [ng/ml]).

Koncentrace cfDNA prvních ranních močí (c_1) korelovala s koncentracemi druhých ranních močí (c_2) ($r=0,997926$). Stejně tak korelovalo celkové množství ($TA = c \times V$) (TA , *total amount*) cfDNA prvních a druhých ranních močí ($r=0,993139$). Naopak žádná korelace nebyla mezi objemy (V_1 a V_2) ($r=0,279090$).

Za předpokladu, že se do moči za daný čas uvolní stejné množství cfDNA, bylo dedukováno, že čím vyšší je vymočené množství, tím nižší bude koncentrace cfDNA ve získané moči. Tato dedukce se ukázala být pravdivá korelací $\frac{c_1}{c_2}$ versus $\frac{V_2}{V_1}$ ($r=0,550219$) a proto se jako správný přístup jeví výpočet celkového množství cfDNA v moči (TA), a nikoli samotná koncentrace cfDNA.

Druhá ranní moč měla signifikantně vyšší koncentraci močové cfDNA ($p=0,044$) a zároveň měla nižší objem ($p=0,002$). Celkové množství cfDNA u první i druhé ranní moči bylo stejné ($p=1,0$).

Vzhledem k tomu, že celkové množství cfDNA je stejné u první i druhé ranní moči, byla druhá ranní moč vybrána jako vhodnější k analýze.

V.2.2 Porovnání celkového množství močové cfDNA u pacientů a kontrol

Celkové množství močové cfDNA bylo stanoveno v druhé ranní moči u 100 jedinců (23 zdravých dobrovolníků, 11 pacientů s benigními urologickými onemocněními a 66 pacientů s rakovinou močového měchýře). Mezi jednotlivými skupinami nebyly rozdíly ve věku ani pohlaví jedinců ($p>0,05$).

Při porovnání Mann–Whitneyovým testem celkového množství cfDNA u všech kontrol a pacientů byl statisticky signifikantní rozdíl, pacienti měli vyšší množství cfDNA v supernatantu moči ($p=0,0002$).

Kontroly byly následně rozděleny na podskupiny „zdraví“ a „benigní“, pacienti zůstali jako jedna skupina, a byla provedena Kruskal-Wallisova ANOVA ($p=0,00085$). Při post hoc analýze byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ($p=0,0009$) v celkovém množství cfDNA mezi „zdravými“ a pacienty. Překvapivě mezi pacienty a „benigní“ skupinou nebyl rozdíl statisticky signifikantní ($p=0,3$). Na základě tohoto zjištění byla skupina pacienti rozdělena na podskupiny na pTa s nižšími stádii a pT1-4 s vyššími stádii rakoviny močového měchýře a opět byla provedena post hoc analýza Kruskal-Wallisovým testem s výsledkem ($p=0,000001$). Signifikantní rozdíly v celkovém množství cfDNA byly mezi oběma skupinami kontrol a podskupinou pT1-4. Podskupina pTa se nelišila od žádné z kontrolních podskupin, ale lišila se od podskupiny pT1-4 s pokročilejšími stádii rakoviny.

K prokázání potenciálu celkového množství cfDNA v 2. ranní moči rozpoznat pacienty s rakovinou močového měchýře od jedinců bez rakoviny byly spočteny senzitivita a specifita s příslušnými *cut-off* hodnotami a sestavena *receiver operating characteristic* (ROC) křivka. Pro nejlepší senzitivitu

a specifitu (42,4 % a 91,2 %) byla plocha pod ROC křivkou 0,725. Při *cut-off* hodnotě 65 055ng byla pozitivní prediktivní hodnota 90 % a negativní prediktivní hodnota 45 %.

Schopnost celkového množství cfDNA v moči detekovat pacienty s pTa nádorem měla senzitivitu 12 % a specifitu 91,2 %. U vyšších stádií pT1-4 byla senzitivita 62,5 % a specifita 91,2 %. Pokud byl brán v potaz grading, LG tumory byly detekovány se senzitivitou 20,7 % a specifitou 91,2 %, u HG tumorů dosáhla schopnost celkového množství cfDNA odlišit pacienty s nádorem močového měchýře od kontrol hodnot 59,5 % a 91,2 %.

Když vezmeme v úvahu, že cytologie v naší studii dosáhla při diagnostice obdobných výsledků, použití celkového množství cfDNA v 2. ranní moči společně s cytologií, nevede ke zvýšení senzitivity. Proto kombinace těchto dvou přístupů nezlepší diagnostickou schopnost.

VI Diskuze

Rakovina močového měchýře je zhoubný nádor, který i při úspěšné léčbě velmi často recidivuje, a proto je potřeba pacienty po léčbě doživotně sledovat. Vzhledem k tomu, že nyní používanou diagnostickou metodou je cystoskopie, nepříjemný invazivní výkon, který s sebou nese i určitá zdravotní rizika, je velkým přáním všech pacientů jednoduché, ale spolehlivé neinvazivní vyšetření. Jako ideální materiál se proto nabízí moč – je dostupná opravdu neinvazivně a omývá sliznici močového měchýře i s případným nádorem.

VI.1 miRNA v moči

Jako biomarker byly v této studii vybrány miRNA, které se vyskytují ve všech tělních tekutinách a jsou stabilní.

Ve studiích, které se zabývají miRNA, ovšem nejsou ustálené a všeobecně uznávané endokontroly pro normalizaci výsledků v různých tkáních a tělních tekutinách, ale normalizace dat je podstatnou součástí výzkumu a může velmi změnit výsledky.

S ohledem na výsledky a doporučení několika studií nebyla použita RNU6 nebo RNU6B, protože to nejsou miRNA, ale malé jaderné RNA, které nejsou vhodné pro normalizaci. Vzhledem k tomu, že nebyla nalezena žádná studie doporučující vhodné endokontroly pro supernatant moči, bylo rozhodnuto, že endokontroly budou vybrány pomocí algoritmu geNorm, který je uznávaným nástrojem ke hledání vhodných normalizačních miRNA. Algoritmus navrhl tři miRNA: miR-191, miR-28-3p a miR-200b.

K získání pilotních dat v první části studie byly použity array karty, výsledky byly následně ověřovány assayemi pro jednotlivé miRNA v druhé a třetí fázi studie. V první a druhé fázi byl použit stejný soubor jedinců a ve třetí fázi byly výsledky validovány na novém nezávislém souboru, jehož velikost byla určena power analýzou.

Výsledkem celé studie bylo nalezení pěti miRNA, které měly signifikantně sníženou expresi v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře oproti kontrolám (miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-30b a miR-532-3p).

Naše výsledky jsou v částečné shodě s předchozími i pozdějšími vědeckými články. Například miR-125b měla sníženou expresi u pacientů s rakovinou močového měchýře ve 3 dalších studiích: v celé moči, v sedimentu i v supernatantu.

miR-204 měla sníženou expresi u pacientů v celé moči, močovém sedimentu, i v buněčných liniích rakoviny močového měchýře, ale v supernatantu moči její hladiny nebyly dříve prokázány.

Doposud provedené studie poskytují nekonzistentní výsledky ohledně exprese miR-30b u pacientů s rakovinou močového měchýře. Wszolek a kol. našli sníženou expresi miR-30b ve tkáni nádoru u MIBC ve srovnání s NMIBC. Ale v dalších studiích stejného kolektivu popsali Mahdavinezhad a kol. zvýšenou expresi miR-30b v nádorové tkáni. Wei s kolegy naopak žádnou změnu exprese miR-30b v celé moči neobjevili.

Žádná studie dodnes také neoznačila miR-532-3p za významně deregulovanou u pacientů s rakovinou močového měchýře. Ale je několik studií, které spojují její deregulaci v tkáních nebo plazmě pacientů s jinými onkologickými onemocněními.

S našimi výsledky druhé fáze se shoduje také několik dalších studií. miR-93 měla zvýšenou expresi v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře ve čtyřech studiích a v extracelulárních vezikulách a let-7c měla sníženou expresi v celé moči i supernatantu, také ve zjištění zvýšení exprese miR-199a-3p u pacientů s rakovinou močového měchýře byla shoda s Urquidí a kol.

Velmi zajímavá se zdá být miR-16, která měla ve druhé fázi naší studie zvýšenou expresi, s čímž se shodnou výsledky Sapreho a kol., kteří ji našli v celé moči. Větší problém je použití miR-16 jako endokontroly pro celou moč v článku, Puerta-Gil odůvodňuje její použití tím, že její exprese je neměnná v nádorové i nenádorové tkáni, ale nevysvětlují její použití na celé moči, kde buněk není velké množství.

Také miR-191, která je v naší studii používána jako endokontrola, měla zvýšenou expresi v supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře podle studií Juráčka a kol., kteří prováděli normalizaci na absolutní koncentraci.

I miR-200b, další naše endokontrola, měla podle De Long a kol. zvýšenou expresi v extracelulárních vezikulách, v článku ovšem nemají zmíněný způsob normalizace.

A jak již bylo zmíněno, způsob normalizace velmi ovlivní výsledky.

Vzhledem k tomu, že rakovina močového měchýře je častější u mužů, byl zkoumán rozdíl exprese miRNA mezi ženami a muži, ale nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v expresi miRNA zkoumaných v naší studii.

Pouze částečné shody mezi jednotlivými studii mohou být způsobeny metodologickými přístupy různých výzkumných týmů a využitím různých způsobů normalizace. Vzhledem k této variabilitě metod mohou shodné výsledky mezi studii představovat nálezy se skutečnou biologickou významností. Naše další bádání se proto zaměřilo na regulační síť miR-125b a miR-99a a lepší porozumění jejich rolí v karcinogenezi močového měchýře.

Snížená exprese miR-125b a miR-99a byla nalezena nejen v moči, ale i v nádorové tkáni rakoviny močového měchýře.

Působení miR-125b bylo zkoumáno i na transfekčních experimentech na buněčných liniích rakoviny močového měchýře. Při transfekci miR-125b do buněčné linie byl růst buněk signifikantně inhibován ve srovnání s kontrolou. Autoři také našli potenciální cíl miR-125b – onkogen E2F3, jehož translace byla inhibována transfekovanou miR-125b.

G. Feng a kol. našli snížení exprese miR-99a v buněčných liniích rakoviny močového měchýře, v nádorové tkáni i v plazmě pacientů s rakovinou močového měchýře. Zhang a kol. také našli v supernatantu moči pacientů snížení exprese miR-99a. Y.G. Feng a kol. zjistili, že umělá miR-99a (miRNA *mimics*) dokáže inhibovat dělení buněk v buněčné linii rakoviny močového měchýře a zároveň zvyšovat senzitivitu buněk k chemoterapii.

Geny pro obě výše diskutované miRNA se sníženou expresí u pacientů s rakovinou močového měchýře (miR-125b i miR-99a) jsou v klastru na chromozomu 21. V naší studii byla nalezena korelace jejich expresí ($r=0,89$, $p<0,0001$). Bioinformatická analýza validovaných cílů těchto dvou miRNA odhalila skupiny genů zahrnujících dráhy významné při karcinogenezi rakoviny močového měchýře. Nález 52 genů zahrnujících „Odpověď na organické látky“ a 14 genů zahrnutých v „Odpovědi na cyklické organické látky“ může být velmi zajímavý zvláště s ohledem na kouření jako rizikový faktor při vzniku rakoviny močového měchýře (Tabulka A). Podle těchto zjištění byl proveden pokus o interpretaci našich výsledků s ohledem na vliv kouření jedinců na vznik rakoviny močového měchýře, ale po kritické revizi velikosti souborů (nekuřáci, bývalí kuřáci a kuřáci) bylo zřejmé, že soubory nejsou vhodné pro tento typ analýzy kvůli jejich limitované velikosti a klinické heterogenitě.

Při porovnání plochy pod křivkou, senzitivit a specifit s testy založenými na cytologii se ukazuje, že analýza vybraných miRNA v supernatantu moči by mohla obohatit portfolio neinvazivních detekčních testů rakoviny močového měchýře. Cytologie je dnes jediným neinvazivním diagnostickým testem rutinně používaným v klinické praxi, její diagnostické schopnosti jsou dobré u HG pacientů (senzitivita 86,5 % a specifita 92,6 %), ale horší u LG pacientů (senzitivita 38,5 % a specifita 92,6 %). Proto by kombinace cytologie a vybraných miRNA se změněnou expresí v supernatantu moči mohla přinést zlepšení diagnostiky.

Zajímavý pohled do karcinogeneze může poskytnout také studium exozomů, jejichž obsah se poslední také dostává do hledáčku vědců, což je patrné i v aktuální literatuře. Exozomy totiž obsahují jiné množství a poměry miRNA, než obsahuje plazma nebo sérum a dá se předpokládat, že tomu bude stejně i v jiných tělních tekutinách. To může být způsobeno tím, že obsah exozomů je chráněn před degradací. Podle Streeta a kol. mohou být exozomy vhodnějším zdrojem biomarkerů než celá moč.

VI.2 cfDNA v moči

Pro další studii byla jako neinvazivní biomarker vybrána cfDNA, která je v moči velmi dobře dostupná a stabilní. U urologických malignit bylo zjištěno, že cfDNA z moči má lepší diagnostickou schopnost než cfDNA v plazmě, proto byly od pacientů sbírány vzorky moči a nikoli plazmy.

Několik studií zkoumalo cfDNA v moči jako potenciální marker rakoviny močového měchýře. Ale žádná ze studií se podrobně nezabývala správnou metodologií. Proto byla první část této studie věnována výběru vhodné metodologie zpracování cfDNA v supernatantu moči.

V první části studie, kdy byl vybírán vhodný čas odběru moči, byla odebrána první a druhá ranní moč celkem 27 jedinců (11 zdravým dobrovolníkům, 6 kontrolám s benigním urologickým onemocněním a 10 pacientům s rakovinou močového měchýře). Do druhé části studie, kde se zkoumal rozdíl celkového množství cfDNA v supernatantu moči pacientů a kontrol, byla odebrána pouze druhá ranní moč od dalších 73 jedinců. Celkem byla odebrána moč 100 jedincům (23 zdravým dobrovolníkům, 11 pacientům s benigními urologickými onemocněními a 66 pacientům s rakovinou močového měchýře).

Výsledkem první části studie byl výběr druhé ranní moči jako vhodnější pro stanovení obsahu cfDNA v moči. Toto rozhodnutí bylo učiněno na základě toho, že celkové množství cfDNA bylo stejné u první i druhé ranní moči, a že první ranní moč při izolaci cfDNA ucpávala izolační kolonky (*QIAamp Mini column*) a tím prodlužovala dobu izolace.

Zároveň byla řešena otázka, zda používat koncentraci cfDNA a normalizovat ji například na kreatinin, který je používán ve většině biochemických testů a který se liší v závislosti na objemu moči. Tato metoda normalizace byla použita pouze v jedné studii. Koncentrace kreatininu není závislá jen na příjmu tekutin a tím pádem na objemu moči, ale i na metabolismu konkrétního jedince. Z toho důvodu nebyl kreatinin vybrán jako vhodný faktor k normalizaci koncentrace cfDNA.

Hladinu cfDNA může ovlivnit i počet, velikost nádorů a jejich grade, ale je v podstatě nemožné změřit plochu všech nádorů v močovém měchýři.

Za předpokladu, že se z nádoru do moči za daný čas uvolní určité množství cfDNA, bylo dedukováno, že čím vyšší je vymočené množství v druhé ranní moči, tím nižší bude koncentrace cfDNA v získané moči. Tato dedukce se potvrdila korelací $\frac{c1}{c2}$ versus $\frac{V2}{V1}$ ($r=0,550219$), a proto byl vybrán výpočet celkového množství cfDNA v moči.

V druhé části studie bylo při použití celkového množství cfDNA stanovovaného v druhé ranní moči možné rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol ($p=0,0009$). Při rozdělení pacientů na nižší a vyšší stádia se skupina „benigní“ lišila pouze od pacientů s vyššími stádii (pT1-4), ale ne od pacientů s nižšími stádii (pTa).

Tyto výsledky jsou ve shodě s předchozími studii. Zancan a kol. ve své studii nebyli schopni rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol, ale pacienti v jejich souboru byly převážně ve stadiu pTa. Chang a kol. naproti tomu do studie zahrnuli pacienty se všemi stádii rakoviny močového měchýře a díky tomu byli schopni rozlišit mezi pacienty a zdravými kontrolami, ale nenašli rozdíly mezi skupinami pacientů s různými stádii (pTa, pT1 a pT2-3). V naší studii bylo možné rozlišit pacienty s pTa od pacientů s vyššími stádii (pT1-4), rozdělení pacientů na menší skupiny nebylo proveditelné kvůli nižšímu počtu pacientů.

Žádná ze zmíněných studií nezmiňovala, jestli kontroly byli zdraví jedinci nebo pacienti s benigním urologickým onemocněním. To je velmi podstatné, protože v klinické praxi každý pacient, který přijde na oddělení urologie, má nějaký urologický problém.

Zdraví dobrovolníci, tvořící v naší studii většinu kontrol, jsou především starší pacienti hospitalizovaní na jiných odděleních nemocnic, což může způsobit nadhodnocení specifity testu. V souboru pacientů tvoří pacienti s pTa největší podskupinu, většina z nich má LG nádor. V neselektované populaci pacientů s rakovinou močového měchýře převažují právě jedinci s pTa LG nádory a z tohoto důvodu se dá očekávat, že vypočtené senzitivity a specifity budou v reálném prostředí opět horší, protože ve studii jsou zahrnuti i pacienti s vyššími stádii. Přitom nezachycení pacientů s pTa LG při primární diagnóze je velký problém. Na druhou stranu tím, že tito pacienti mají nízké riziko progresu k invazivním nádorům, z klinického hlediska není dopad tak závažný. Proto by při negativním výsledku mohl být prodloužen interval mezi cystoskopiemi.

ROC analýza v naší studii poskytla pouze mírnou přesnost predikce s poměrně dobrou specificitou 91,5 % a nízkou senzitivitou 42,4 % při zvolených *cut-off* hodnotách. Nízká hodnota senzitivity je způsobena převažujícím počtem pacientů se stádiem pTa, kde nebyl zjištěn rozdíl celkového množství cfDNA v moči oproti kontrolám. Vyšší celkové množství cfDNA bylo u pacientů s vyššími stádii pT1-4, kde test dosáhl senzitivity 62,5 % a u HG tumorů všech stádií, kde byla senzitivita 59,5 %.

Při kombinaci analýzy celkového množství cfDNA v moči s cytologií došlo pouze k nepatrnému zvýšení specifity, proto můžeme soudit, že analýzy celkového množství cfDNA v moči a cytologie moči mají stejné diagnostické výsledky a jejich kombinace nepřináší zlepšení.

Jako metodologický podklad byl použit výběr druhé ranní moči jako lepšího zdroje cfDNA ve studii Streleckiene a kol. Ti porovnávali komerční kity na izolaci cfDNA a zároveň hledali interindividuální rozdíly v hladině cfDNA a rozdíly její hladiny mezi pohlavími.

I tato studie měla svá omezení. Hladiny cfDNA mohou být ovlivněny mnoha faktory: počtem a velikostí povrchu tumorů, jejich gradingem a stádiu, přítomností infekce ve vylučovacím ústrojí, leukocyturií a dalšími. Velikost povrchu nádoru je velmi těžko hodnotitelná vzhledem k subjektivnímu hodnocení cystoskopie, proto tento údaj nemohl být ve studii zahrnut. Ze statistického pohledu bylo hodnoceno poměrně málo jedinců v první části studie, kdy se porovnávaly první a druhé ranní moči. Stejně tak malé množství jedinců mohlo být problémem při analýzách podskupin, přestože všechny post hoc analýzy daly signifikantní výsledky.

VII Závěr

Závěrem lze konstatovat, že cíle práce byly splněny a na položené otázky se podařilo najít následující odpovědi:

1. Existují klinicky využitelné rozdíly v obsahu miRNA v moči pacientů s nádorem močového měchýře, které jednoznačně odlišují tyto pacienty od osob bez tohoto nádoru?
 - Ano, existují klinicky využitelné rozdíly v obsahu miRNA v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře a kontrol. Výsledkem první zmiňované studie bylo nalezení pěti miRNA v supernatantu moči, které odlišují pacienty od kontrol. Jedná se o miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-30b a miR-532-3p.
2. Lze najít rozdíly v expresi močových miRNA dovolující staging pacientů s nádory močového měchýře?
 - Ne, vybrané miRNA na použitém souboru pacientů nedovolují staging pacientů s rakovinou močového měchýře.
3. Lze hladiny volné DNA v moči využít pro diagnostiku a staging u pacientů s nádory močového měchýře?
 - Ano, hladiny volné DNA v moči lze použít pro diagnostiku i staging rakoviny močového měchýře. Při dodržení správné metodologie a využití celkového množství cfDNA v moči lze rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol.

Výsledky studie miRNA v moči naznačují, že byla nalezena sada biologicky významných miRNA (miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-30b a miR-532-3p), které mají sníženou expresi v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře. Jejich senzitivity, specificity a plochy pod křivkou patří k nejlepším dodnes zveřejněným výsledkům. Především výsledky miR-125b naznačují její možné použití jako markeru pro neinvazivní diagnostiku rakoviny močového měchýře.

Ve studii cfDNA v moči bylo ukázáno, že metodologie analýzy cfDNA je důležitá, proto k potenciálním diagnostickým účelům rakoviny močového měchýře bylo vybráno stanovení celkového množství cfDNA v druhé ranní moči. Při dodržení metodologických postupů by bylo možné použít stanovení celkového množství cfDNA v moči jako novou strategii neinvazivní diagnostiky rakoviny močového měchýře, a to především v případě vyšších stádií nemoci.

Výsledky našich studií jsou slibné, po zavedení uživatelsky přátelského laboratorního protokolu a validaci na velkém souboru pacientů a kontrol by mohl zmíněný přístup sloužit jako rutinní neinvazivní diagnostika rakoviny močového měchýře.

VIII Seznam publikací

VIII.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection.

Pospisilova S, Pazourkova E, Horinek A, Brisuda A, Svobodova I, Soukup V, Hrbacek J, Capoun O, Hanus T, Mares J, Korabecna M, Babjuk M.

Neoplasma (2016)

IF: 1,871 (2016), 1,696 (2017/2018)

Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer.

Brisuda A, Pazourkova E, Soukup V, Horinek A, Hrbacek J, Capoun O, Svobodova I, **Pospisilova S**, Korabecna M, Mares J, Hanus T, Babjuk M.

Urologia internationalis (2015)

IF: 1,313 (2015) 1,508 (2017/2018)

VIII.2 Publikace *in extenso*, které nejsou podkladem disertace

Comparison of MicroRNA Content in Plasma and Urine Indicates the Existence of a Transrenal Passage of Selected MicroRNAs.

Pazourkova E, **Pospisilova S**, Svobodova I, Horinek A, Brisuda A, Soukup V, Hrbacek J, Capoun O, Mares J, Hanus T, Babjuk M, Korabecna M.

Advances in Experimental Medicine and Biology (2016)

IF: 1,937 (2016)

Differentially expressed miRNAs in trisomy 21 placentas.

Svobodová I, Korabečná M, Calda P, Břešťák M, Pazourková E, **Pospíšilová Š**, Krkavcová M, Novotná M, Hořínek A.

Prenatal Diagnosis (2016)

IF: 2,523 (2016), 2,779 (2017/2018)

The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients.

Koutova L, Sterbova M, Pazourkova E, **Pospisilova S**, Svobodova I, Horinek A, Lysak D, Korabecna M.

Leukemia research (2015)

IF: 2,606 (2015), 2,319 (2017/2018)

The use of Human Inflammatory Response and Autoimmunity RT2 lncRNA PCR Array for plasma examination in breast cancer patients prior to therapy.

Sterbova M, Pazourkova E, **Santorova-Pospisilova S**, Zednikova I, Tesarova P, Korabecna M

Neoplasma (2019)

IF: 1,696 (2017/2018)