

5. Výsledky

5.1 Ambion kit versus Norgen kit

Izolácia RNA z parafínových bločkov bola realizovaná pomocou kitov *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit*, značky *Ambion®* od Life Technologies a *RNA Purification Kit* od *NORGEN* Biotek Corp. Keďže sme teda k dispozícii mali dva rôzne typy kitov na izoláciu nukleových kyselín z FFPE, niekoľko rovnakých vzoriek sme vyizolovali na základe oboch týchto protokolov a zmerali u nich expresiu miRNA pomocou RQ-RT-PCR na základe rovnakého postupu, popísaného vyššie v „Metódach“. K dispozícii bolo dohromady 82 vzoriek tkanív, vyizolovaných pomocou kitu Norgen alebo *Ambion®* v pomere 70:12. Analýzu expresných profilov sme zamerali na dva typy svalovo-špecifických miRNA, a to miR-206 a miR-133b. Z nameraných hladín sme vyrátali hodnoty priemeru a mediánu na celkové porovnanie kvality vyizolovanej vzorky pomocou oboch kitov (Tab.7 a 8).

Tab. 7 Zrovnanie kvality vyizolovanej miRNA-206 pri izolácii pomocou kitov *Ambion®* a *Norgen*.
Porovnanie vyobrazené na základe priemeru a mediánu.

miR-206	<i>Ambion®</i>	<i>Norgen</i>
priemer	- 0,91857	- 0,97429
medián	- 0,75	- 1,14

Tab. 8 Zrovnanie kvality vyizolovanej miRNA-133b pri izolácia pomocou kitov *Ambion®* a *Norgen*.
Porovnanie vyobrazené na základe priemeru a mediánu.

miR-133b	<i>Ambion®</i>	<i>Norgen</i>
priemer	- 1,075	- 1,71
medián	- 1,075	- 1,71

Naše výsledky na veľký rozdiel v kvalite izolovaných miRNA nepoukázali, práve naopak, oba izolačné protokoly boli na základe vypočítaných hodnôt priemeru aj mediánu značne porovnateľné.

5.2 FFPE /zmrazené vzorky tkanív

Testovaná RNA v tejto práci bola izolovaná pomocou viacerých postupov, ktorých výber závisí aj od spôsobu dlhodobého uchovania vzoriek tkaniva. K dispozícii nám boli ako vzorky tkaniva, zaliateho v parafíne, tak vzorky tkaniva zmrazeného. Z plného počtu 84 vzoriek bolo 74 fixovaných v podobe parafínových bločkov (FFPE = *formalin-fixed paraffine-embedded*) a zvyšných 10 v podobe zmrazených tkanív.

Izolácia celkovej RNA z FFPE pomocou jedného z kitov či Trizolová izolácia zo zmrazeného tkaniva nám poskytli vyizolované vzorky, pripravené na ďalší spoločný postup. Po špecifickej reverznej transkripcii sa kvalita vyizolovaných nukleových kyselín hodnotila na základe merania hladiny expície pomocou kvantitatívnej PCR v reálnom čase. Výsledné hodnoty ΔC_t pre vzorky FFPE a zvlášť porovnávané vzorky zmrazeného tkaniva boli výrazne podobné. Táto časť štúdie vychádza zo zatiaľ nepublikovaných výsledkov štúdie Krsková a kol., vzorky a hodnoty ďalej zhromažďujeme a štatistická významnosť sa ešte len bude stanovovať a porovnávať vo väčšej vzorke.

5.3 Štatistické vyhodnotenie hladín expície špecifických myomiRs

Spracovanie dát prebehlo pomocou štatistického programu StatView a softvéru JMP IN 5.1 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Signifikantný význam rozdielov expície jednotlivých miRNA bol vyhodnotený Kruskal-Wallisovým alebo Mann-Whitneyho testom.

Kruskal-Wallisov test (mediánový test) je prirodzeným rozšírením tzv. Mann-Whitneyho testu. Je to neparametrická metóda, vytvorená pre tri a viac vzoriek. Cieľom testu je odhalenie, či sú rozdiely mediánov jednotlivých skupín v skúmanej vzorke štatisticky významné a predstavujú určitý stupeň vzťahu premenných, alebo sú tieto rozdiely čisto náhodné a bez akéhokoľvek vzťahu medzi premennými. Princípom je testovanie nulovej štatistickej hypotézy o rovnosti všetkých mediánov. Najdôležitejším komponentom, ktorý dostaneme je *P-hodnota* s hranicou významnosti tradične 5 % ($P = 0,05$), pod ktorú keď hodnota klesne ($P < 0,05$), nulová hypotéza sa zamietne, teda rozdiel mediánov je príliš veľký aby bol náhodný, čo ho robí štatisticky významným, teda medzi premennými existuje vzťah. *P-hodnota* rovná či vyššia hladine významnosti ($P \geq 0,05$) znamená, že rozdiel medzi mediánmi je dôsledkom náhodného výberu a štatisticky významný nie je, čiže medzi premennými teda nie je žiaden vzťah (i2).

Mann-Whitneyho test sa naproti tomu používa pri porovnávaní mediánov dvoch nezávislých vzoriek, pričom hodnotí či je rozdiel mediánov týchto dvoch skupín štatisticky významný alebo len čisto náhodný. Podobne, *P* hodnota nižšia 0,05 ($P < 0,05$) znamená štatistickú významnosť a existujúci vzťah týchto dvoch vzoriek (i3).

Dohromady bolo v rámci tejto práce vyšetrených 82 vzoriek, z čoho 61 vzoriek s diagnózou RMS a 21 vzoriek kontrolnej skupiny (Tab. 9).

Tab. 9 Základný prehľad typov a jednotlivých počtov vzoriek, ktoré boli vyšetrené v rámci tejto štúdie.

Typ vzoriek		Počet vzoriek	
RMS	aRMS	PAX+	18
		PAX-	19
	eRMS		22
	pRMS		2
Kontrolná skupina	mezenchymálne nádory		14
	nenádorové svalové tkanivo		5
	mozog		2

Prípady s diagnózou RMS boli podrobnejšie samostatne rozdelené do skupín podľa všeobecného delenia na alveolárny typ rabdomyosarkómov, embryonálny typ rabdomyosarkómov či pleomorfný typ rabdomyosarkómov. Pri alveolárnom type sme sa zamerali taktiež na porovnanie výšky expresie jednotlivých špecifických miRNA v prípadoch fúzne negatívnych (PAX-) a fúzne pozitívnych vzoriek (PAX+), tvoriacich fúzne gény *PAX3-FKHR* alebo *PAX7-FKHR*.

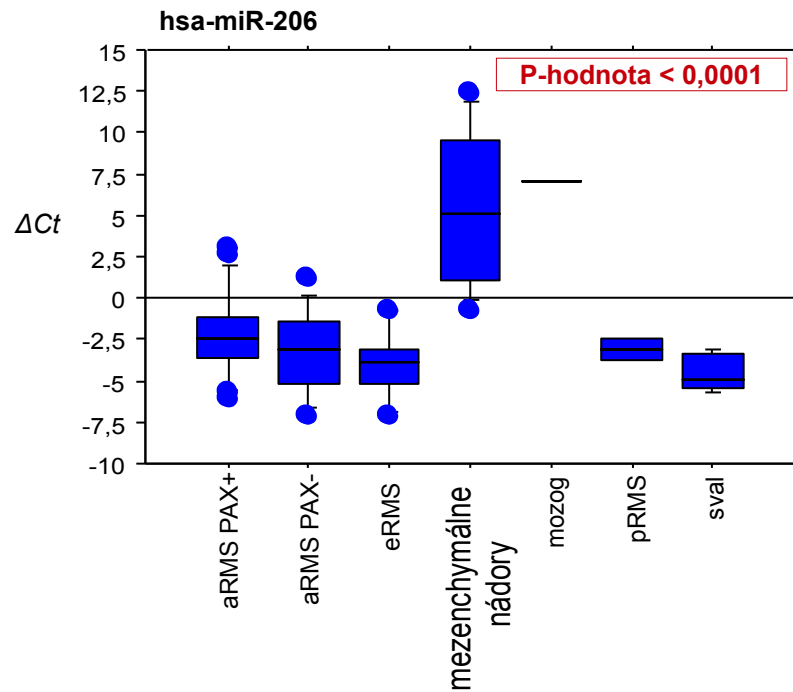
Pri jednotlivých vzorkách bola po kvantifikácii pomocou RQ-RT-PCR analyzovaná a štatisticky spracovaná hladina expresie svalovo-špecifických mikroRNA, a to miR-206, miR-133b, miR-133a a kontrolnej mikroRNA, od ktorej sa rozdiely testovaných vzoriek odvíjajú na základe výpočtov hodnoty ΔC_t . Z týchto dát bol vykonaný štatistický rozbor pomocou špeciálneho analytického programu StatView s výsledným grafickým zhodnotením v podobe tzv. *box plotu*. Každý graf disponuje osou *x* s príslušnými testovanými vzorkami a osou *y* s rozpätím výšok hladín expresie. Do jednotlivých grafov je tiež vpísaná P-hodnota, určujúca konečnú štatistickú významnosť spracovaných dát.

5.3.1 Všeobecné zhrnutie expresie myomiRs

V nižšie uvedených grafoch 1-3 je uvedené základné porovnanie hladín expresie študovaných myomiRs vo všetkých príslušných vzorkách. Výška expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA je zobrazená v samostatných grafoch, pričom v každom je porovnané rozdelenie do podtypov RMS (aRMS PAX+ / aRMS PAX- / eRMS / pRMS), vzoriek iných mezenchymálnych nádorov a vzoriek mozgového či nenádorového svalového tkaniva. Spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou mediánového Kruskal-Wallisovho testu.

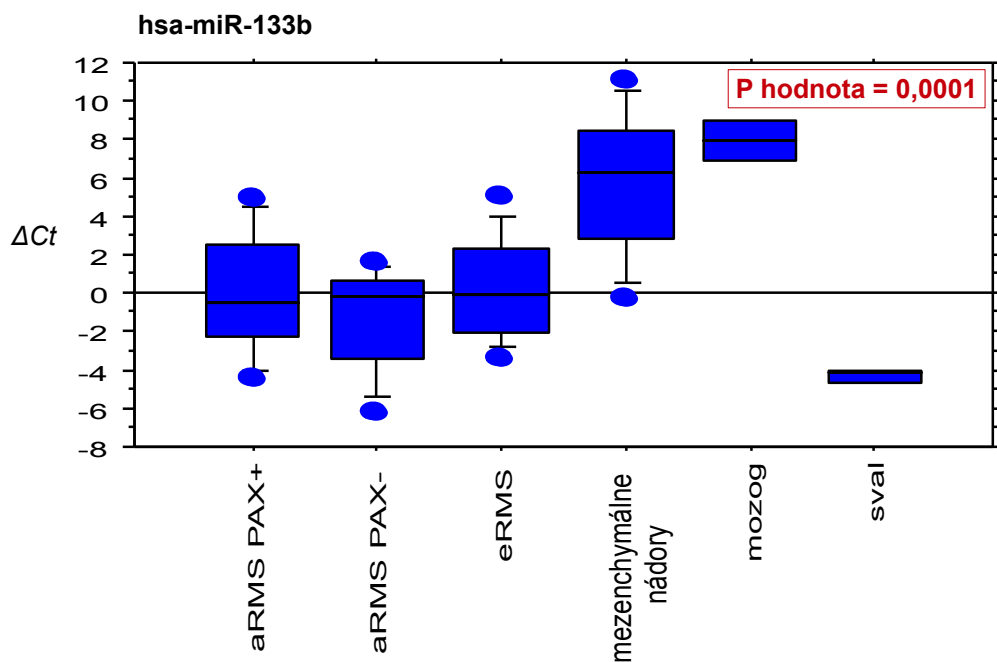
Graf 1 zobrazuje porovnanie hladín expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách rôznych podtypov RMS, vzorky kontrolnej skupiny mezenchymálnych nádorov, mozgového tkaniva a nenádorovej vzorky svalu. P hodnota tejto štatistickej analýzy je nižšia ako

0,0001 (tým pádom tiež nižšia ako hranica významnosti $P = 0,05$), čo ju robí štatisticky vysoko významnou.



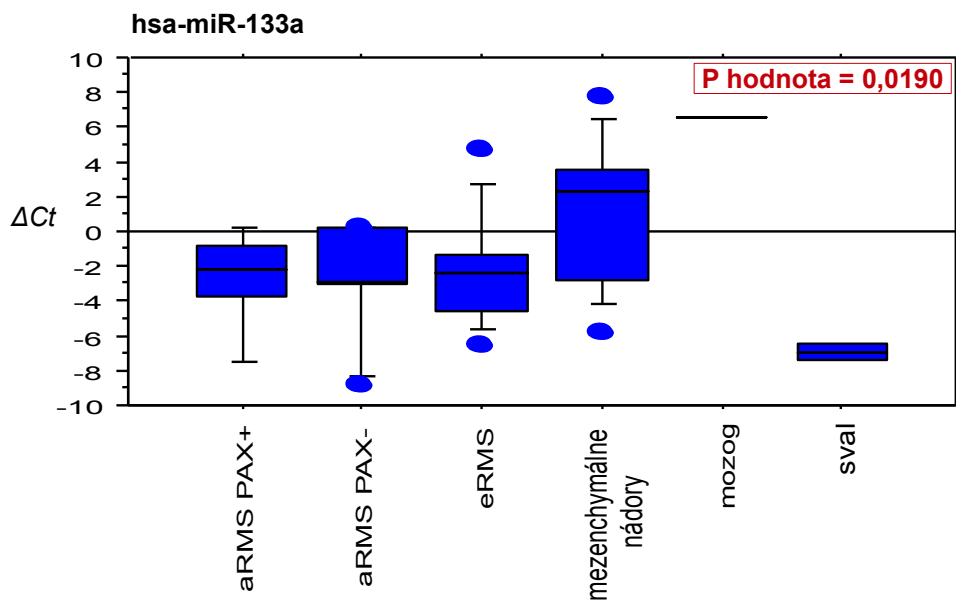
Graf. 1 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Všeobecné porovnanie podtypov RMS navzájom a so skupinami kontrolných vzoriek. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty < 0,0001.

Graf 2 predstavuje zrovnanie hladín exprimovanej hsa-miR-133b vo vzorke podobných skupín ako pri grafe 1. U jednotlivých podskupín RMS je však hladina expresie miR-133b o niečo nižšia ako pri miR-206. P-hodnota je rovná 0,0001, čo ju robí tiež štatisticky vysoko významnou.



Graf. 2 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Porovnanie podtypov RMS navzájom a so skupinami kontrolných vzoriek. V pravom rohu je vpísaná stanovená P-hodnota = 0,0001.

Graf 3 ukazuje zrovnanie hladín expresie hsa-miR-133a v podskupinách rabdomyosarkómov a vzorkách kontrolnej skupiny. Hladiny sú viditeľne vyrovnanjšie, no P hodnota je stále štatisticky významná, nakoľko je rovná 0,0190.

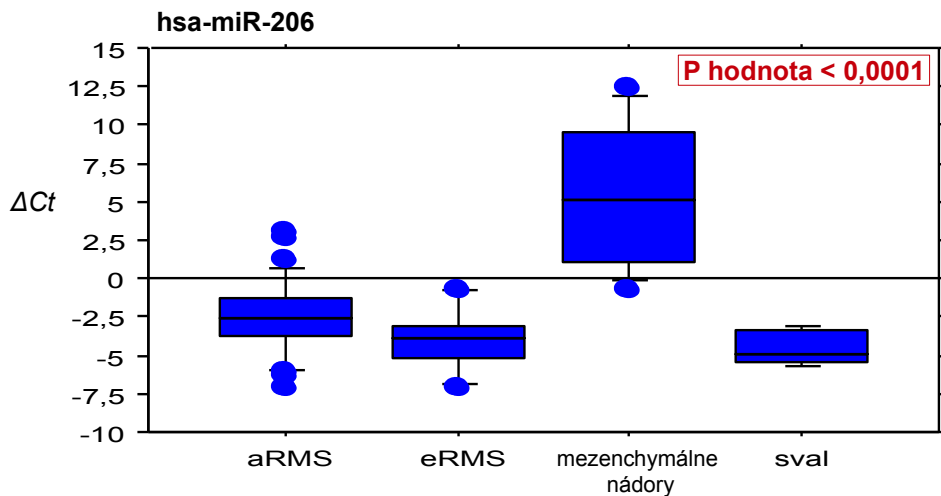


Graf. 3 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Všeobecné porovnanie podtypov RMS navzájom a so skupinami kontrolných vzoriek. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0190.

5.3.2 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS, mezenchymálnych nádoroch a svalovom tkanive

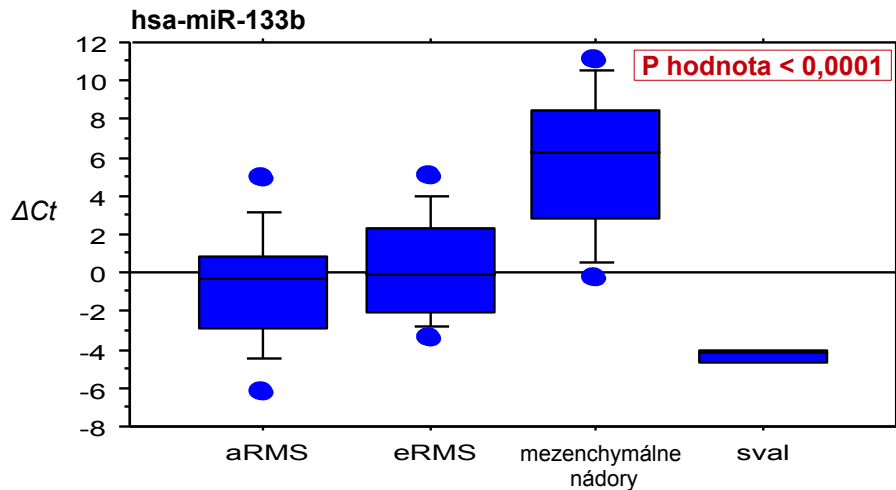
V ďalšej trojici grafov (4-6) sú bližšie porovnávané hladiny expresie jednotlivých študovaných myomiRs pri dvoch najčastejšie sa vyskytujúcich podtypoch RMS (alveolárnom a embryonálnom RMS), kontrolných vzorkách mezenchymálnych nádorov a nenádorovom svalovom tkanive. Spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Kruskal-Wallisovho testu.

Graf 4 zobrazuje porovnanie hladín expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách dvoch podtypov RMS, a to aRMS a eRMS, vzorkách kontrolnej skupiny mezenchymálnych nádorov a nenádorovej vzorky svalového tkaniva. P hodnota tohto súboru dát je nižšia ako 0,0001, čím sa preukazuje ako štatisticky vysoko významná. Rozdiel vo výške expresie svalovo-špecifickej miR-206 vo svalovom tkanive je viditeľne vyšší oproti vzorkám iných typov mezenchymálnych nádorov.



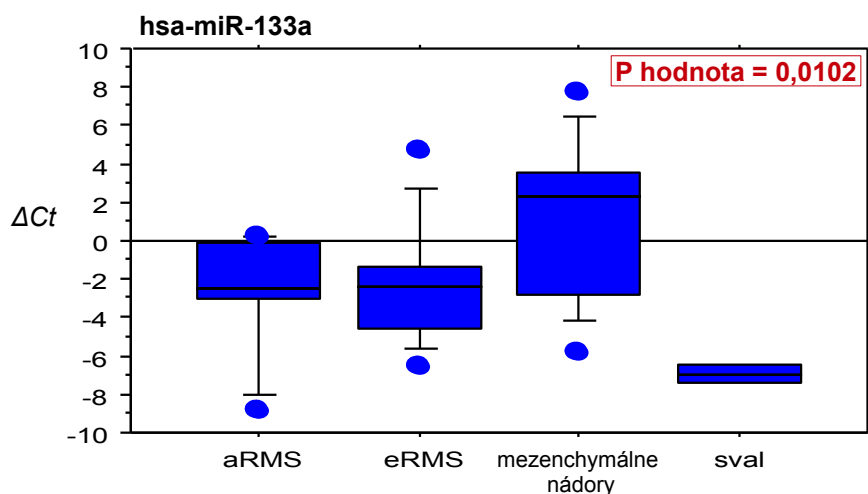
Graf. 4 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-206. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a u kontrolných skupín. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty < 0,0001.

V grafe 5 už rozdiel v hladinách expresie svalovo-špecifickej miR-133b v tkanivách svalov oproti mezenchymálnym nie je tak výrazný, avšak stále značný. Hladina významnosti je vďaka P-hodnote nižšej ako 0,0001 stále štatisticky vysoká.



Graf. 5 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a u kontrolných skupín. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty < 0,0001.

Graf 6 podobne zobrazuje rozdiely v hladinách expresie špecifickej hsa-miR-133a pri vzorkách aRMS, eRMS, kontrolných vzorkách mezenchymálnych nádorov a nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota sa rovná 0,0102, čo aj v tomto prípade potvrdzuje štatistickú významnosť nameraných hladín.

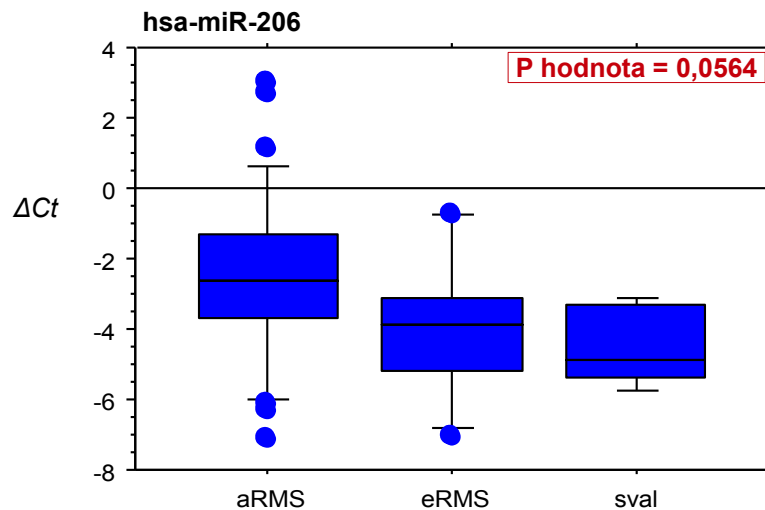


Graf. 6 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a u kontrolných skupín. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0102.

5.3.3 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS oproti svalovému tkanivu

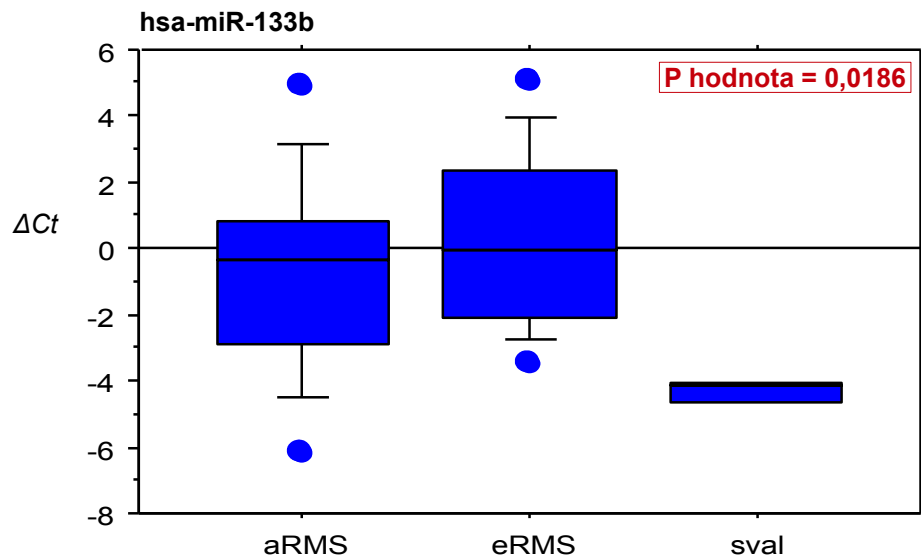
V grafoch 7-9 sú porovnávané hladiny expresie jednotlivých špecifických myomiRs zamerané na vzorky svalového tkaniva. Výška expresie je vyobrazená pri alveolárnom type RMS, embryonálnom type RMS a vzorke nenádorového svalového tkaniva. Spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Kruskal-Wallisovho testu.

V grafe 7 sú vyjadrené hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách dvoch podtypov RMS, a to aRMS a eRMS, oproti vzorke nenádorového svalového tkaniva. P hodnota štatistického súboru je rovná 0,0564, čo ju robí vyššou ako je hranica významnosti, čo znamená, že rozdiel medzi mediánmi v tomto prípade nie je štatisticky významný.



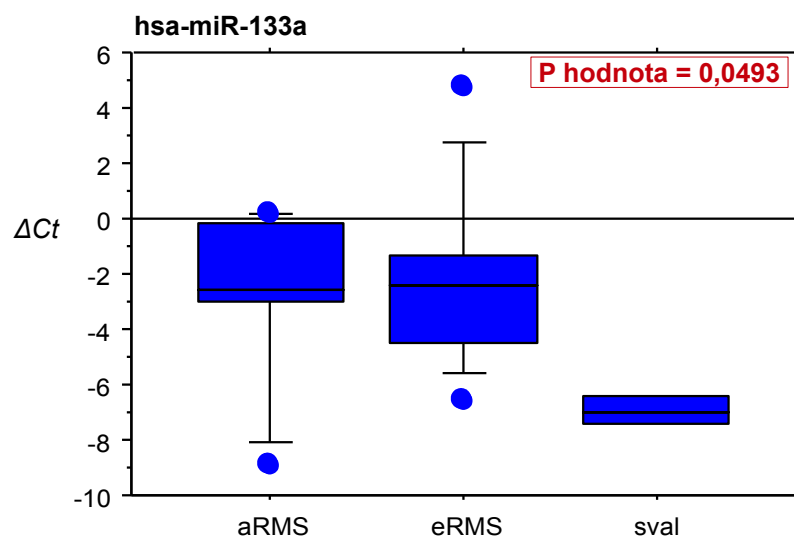
Graf. 7 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Porovnanie expresie tejto špecifickej mikroRNA u aRMS, eRMS a nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0564.

Graf 8 podobne zobrazuje hladiny expresie špecifickej hsa-miR-133b vo vzorkách aRMS, eRMS a nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota sa rovná hodnote 0,0186, čo ju robí na rozdiel od miR-206 štatisticky významnou.



Graf. 8 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0186.

V grafe 9 je zobrazený rozdiel exprimovanej hsa-miR-133a vo vzorkách aRMS, eRMS a nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota = 0,0493, čím je takmer na hranici významnosti, no rozdiel mediánov je stále ešte štatisticky významný a nenáhodný.

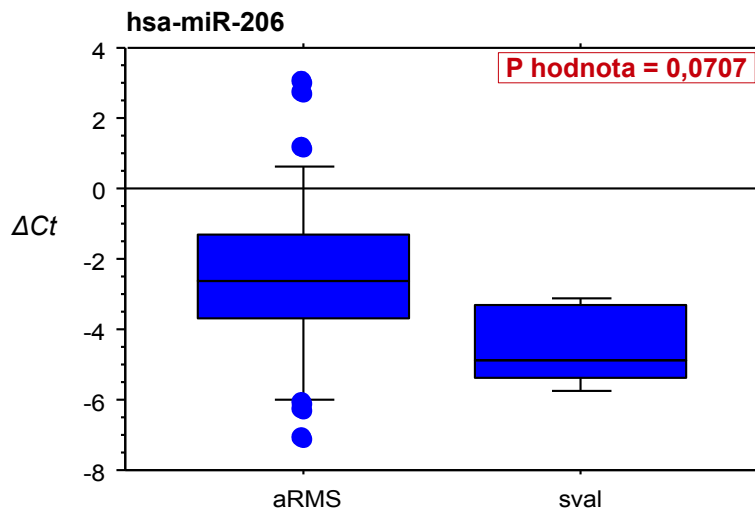


Graf. 9 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0493.

5.3.4 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS oproti svalovému tkanivu

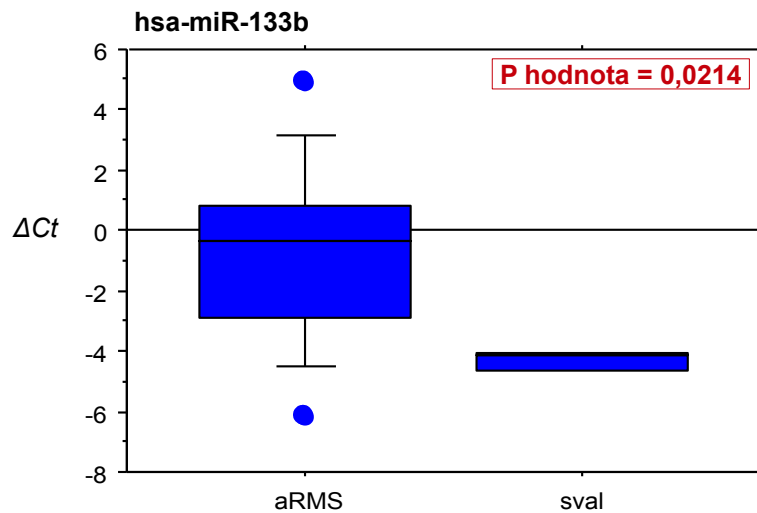
Grafy 10-12 zobrazujú hladiny expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA, porovnávané medzi skupinou vzoriek alveolárneho rabdomyosarkómu a vzorkou nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu, nakoľko boli zrovnávané rozdiely mediánov len dvoch nezávislých skupín vzoriek.

V grafe 10 sú zobrazené hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách alveolárneho typu rabdomyosarkómov v porovnaní s nenádorovou vzorkou svalového tkaniva. P hodnota súboru je rovná 0,0707, čo robí rozdiel mediánov čisto náhodný, bez bližšieho vzťahu medzi premennými a bez štatistickej významnosti.



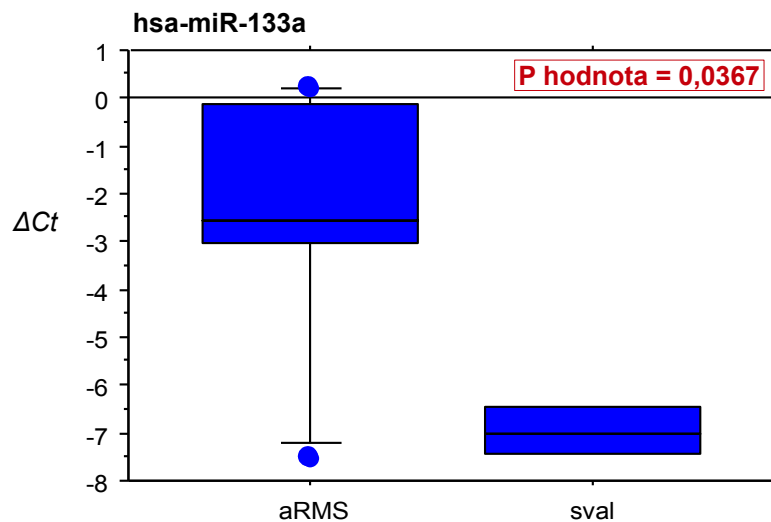
Graf. 10 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u aRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0707.

Naproti tomu rozdiel hladiny expresie špecifickej hsa-miR-133b vo vzorke aRMS oproti vzorke svalového tkaniva je viditeľne väčší ako pri miR-206 (Graf. 11). P hodnota = 0,0214, čo ju robí štatisticky významnou s preukázaným vzťahom premenných.



Graf. 11 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u aRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0214.

V grafe 12 je porovnávaná hladina expresie hsa-miR-133a v skupine vzoriek s diagnózou alveolárneho rabdomyosarkómu so skupinou vzoriek nenádorového svalového tkaniva. P hodnota je rovná hodnote 0,0367, čo ju robí taktiež štatisticky významnou.

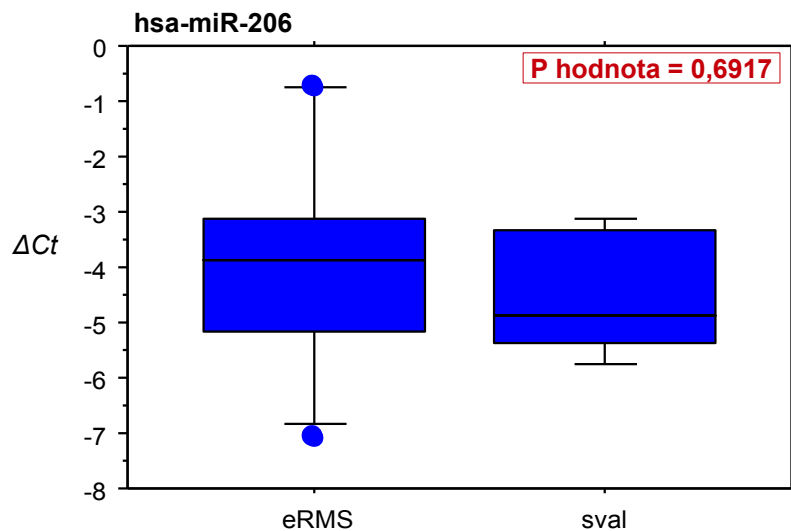


Graf. 12 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u aRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0367.

5.3.5 Porovnanie expresie myomiRs pri eRMS oproti svalovému tkanivu

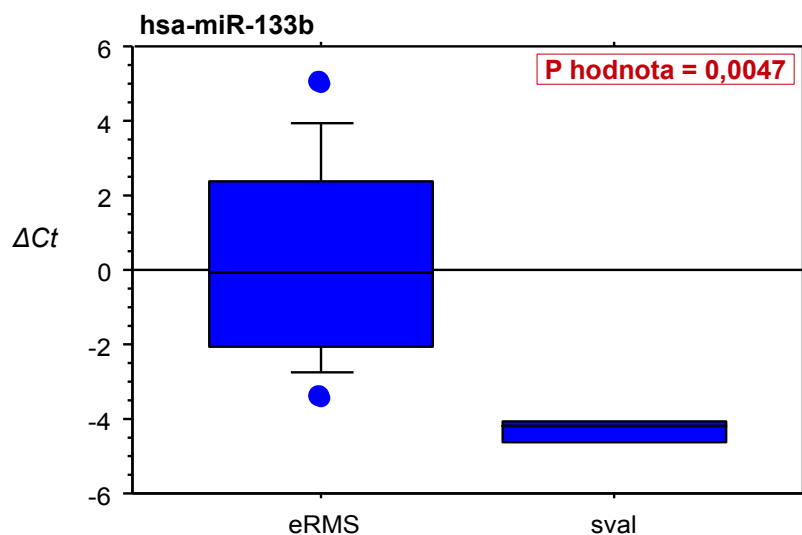
V grafoch 13-15 sú zobrazené hladiny expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA, porovnávané na podobnom princípe ako v predchádzajúcej podkapitole, no v tomto prípade je výška expresie myomiRs posudzovaná medzi skupinou vzoriek najčastejšie sa vyskytujúceho typu rhabdomyosarkómov (eRMS) a vzorkou nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie dát bolo taktiež vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu pre dve nezávislé skupiny vzoriek.

V grafe 13 sú zobrazené hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách embryonálneho typu rhabdomyosarkómov, porovnávané s nenádorovou vzorkou svalového tkaniva. P hodnota súboru dát je rovná hodnote 0,6917, vysoko nad hranicou významnosti, čo odporuje možnému vzťahu medzi príslušnými premennými na základe rozdielu mediánov. Oba súbory vzoriek však vykazujú značne vysokú hladinu expresie.



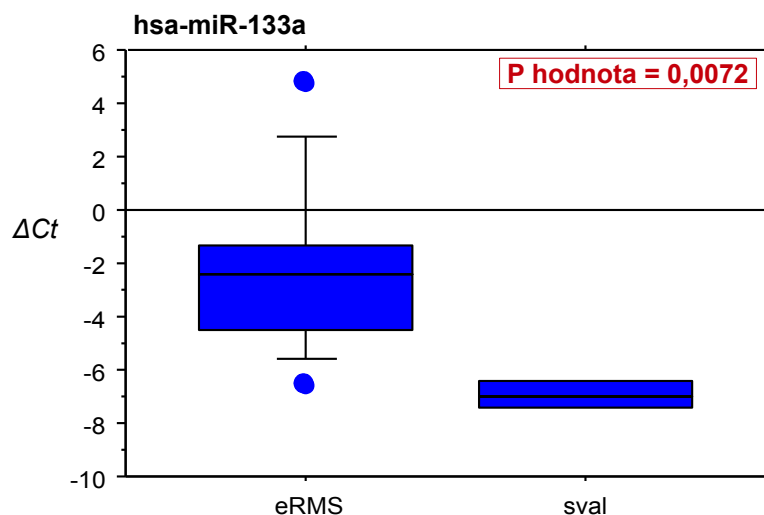
Graf. 13 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Porovnanie expresie príslušnej špecifickej myomiR u eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,6917.

Graf 14 zobrazuje výšku exprimovaných hladín špecifickej hsa-miR133b vo vzorkách eRMS a kontrolných vzorkách svalového tkaniva. P hodnota tohto súboru sa rovná 0,0047, čo ju robí, štatisticky významnou s preukázaným existujúcim vzťahom medzi premennými.



Graf. 14 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0047.

V grafe 15 je zobrazený rozdiel expresie hsa-miR-133a medzi skupinou vzoriek eRMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. P hodnota je v tomto teste taktiež štatisticky významná a vzťah premenných preukázaný (P hodnota = 0,0072).

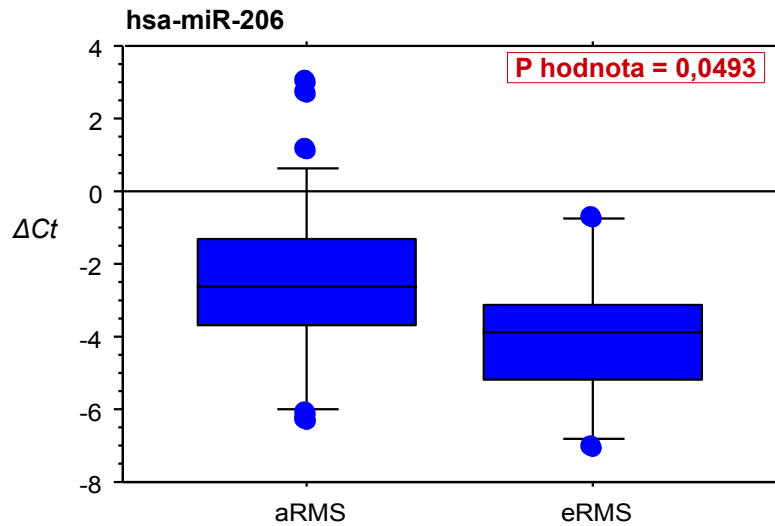


Graf. 15 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0072.

5.3.6 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS a eRMS

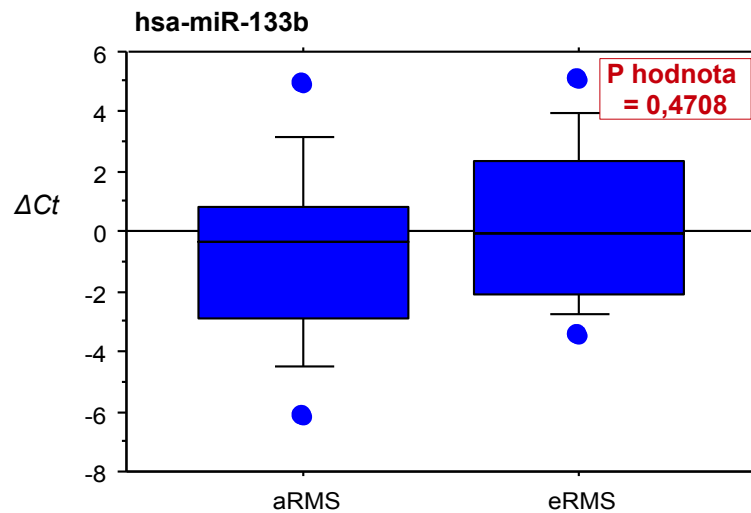
Grafy 16-18 zobrazujú hladiny expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s diagnózou RMS, presnejšie so zamerním na rozdiel v expresii myomiRs medzi alveolárnym a embryonálnym typom rhabdomyosarkómov. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu.

Graf 16 ukazuje a porovnáva hladiny expresie svalovo-špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s alveolárnym a embryonálnym typom RMS. P hodnota štatistického súboru je rovná hodnote 0,0493, čo ju robí štatisticky významnou aj napriek blízkosti s hranicou významnosti 0,05.



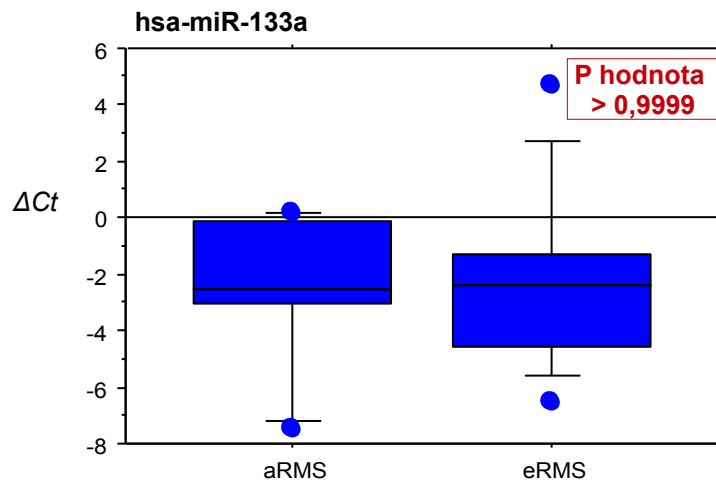
Graf. 16 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Táto špecifická myomiR je porovnávaná svojou výškou expresie medzi aRMS a eRMS podtypom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0493.

V grafe 17 je zobrazená hladina expresie špecifickej hsa-miR-133b osobitne pri vzorke pacientov s aRMS a vzorke pacientov s eRMS. P hodnota = 0,4708, čo je značne nad hranicou významovosti, čo znamená, že premenné nie sú v žiadnom bližšom vzťahu a test nie je štatisticky významný.



Graf. 17 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Táto špecifická myomiR je porovnávaná svojou výškou expresie medzi aRMS a eRMS podtypom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,4708.

Graf 18 zobrazuje vyhodnotenie hladín expresie špecifickej hsa-miR-133a vo vzorkách s diagnózou aRMS a eRMS. P hodnota > 0,9999 čo znamená súbor bez akéhokoľvek preukázneho štatistického významu alebo vzťahu medzi premennými.

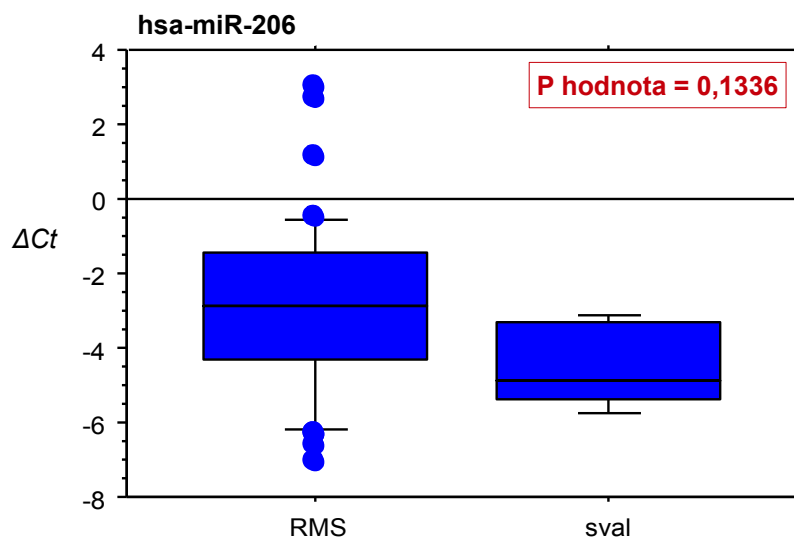


Graf. 18 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Táto špecifická myomiR je porovnávaná svojou výškou expresie medzi aRMS a eRMS podtypom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty > 0,9999.

5.3.7 Porovnanie expresie myomiRs v RMS oproti svalovému tkanivu

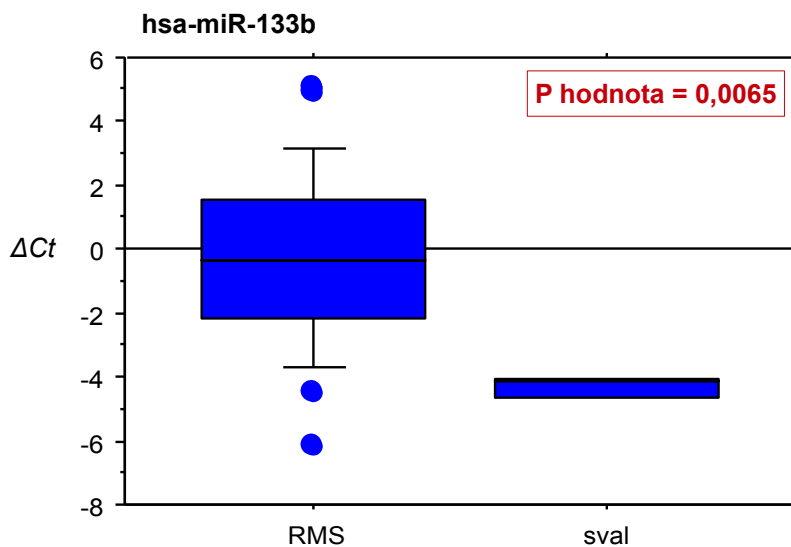
V grafoch 19-21 sú zobrazené hladiny expresie jednotlivých študovaných myomiRs, analyzované na základe rozdielnej expresie vo vzorkách pacientov s diagnostikovaným typom RMS oproti kontrolnej vzorke nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu, zostaveného pre dve nezávislé skupiny vzoriek.

V grafe 19 sú zobrazené hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s RMS, porovnané s výškou expresie tejto mikroRNA v nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota súboru je rovná hodnote 0,1336, čo nepodporuje možnosť existencie vzťahu medzi príslušnými premennými. Rozdiel medzi mediánmi nie je štatisticky významný.



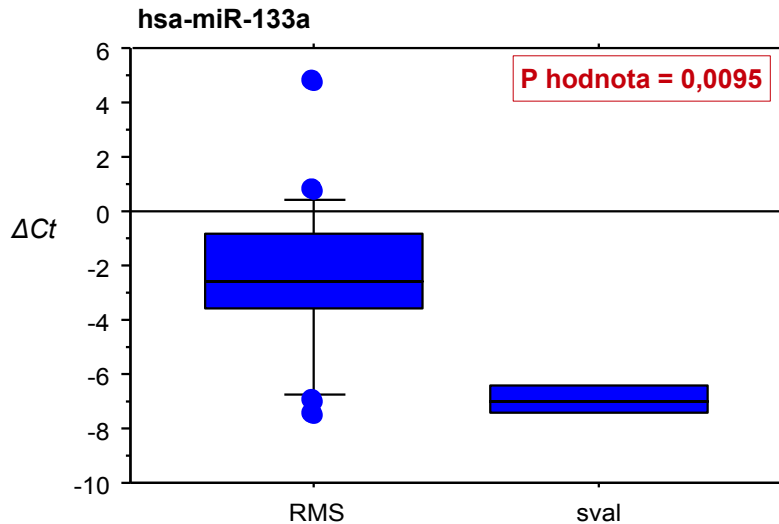
Graf. 19 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-206. Špecifická myomiR je porovnávaná na základe výšky expresie medzi vzorkami RMS a svalovým tkanivom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,1336.

V grafe 20 je zobrazená hladina expresie špecifickej myomiR-133b s porovnaním medzi vzorkami rôznych typov RMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. P hodnota sa rovná 0,0065, čo robí výsledok tohto testu štatisticky významným.



Graf. 20 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Špecifická myomiR je porovnávaná na základe výšky expresie medzi vzorkami RMS a svalovým tkanivom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0065.

Graf 21 zobrazuje porovnanie rozdielnych hladín expresie špecifickej hsa-miR-133a vo vzorkách s diagnózou RMS oproti nenádorovým vzorkám svalu. P hodnota je rovná 0,0095, čo taktiež štatisticky znamená významnosť a preukázný vzťah medzi premennými.

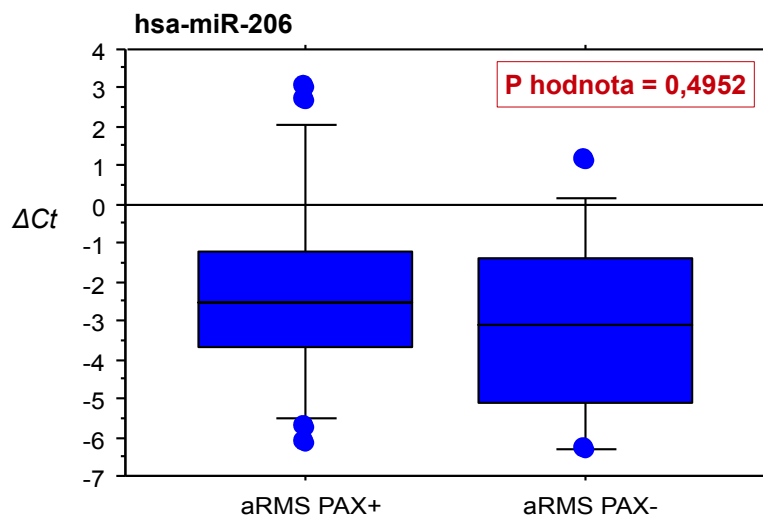


Graf. 21 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Špecifická myomiR je porovnávaná na základe výšky expresie medzi vzorkami RMS a svalovým tkanivom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0095.

5.3.8 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS PAX+ a aRMS PAX-

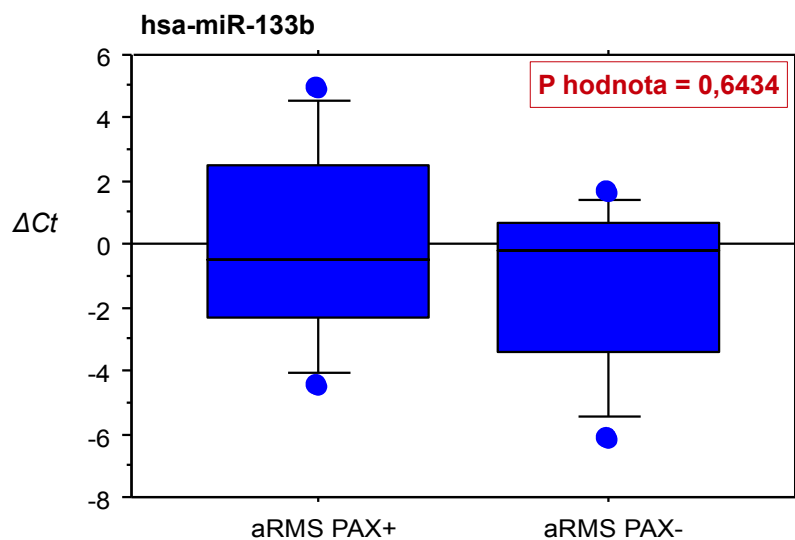
Grafy 22-24 zobrazujú merané hladiny expresie jednotlivých príslušných svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s diagnózou alveolárneho typu RMS, s rozdelením na prognosticky rozdielne fúzne pozitívne a fúzne negatívne formy aRMS. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu.

Graf 22 porovnáva hladiny expresie svalovo-špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s diagnostikovanými aRMS PAX+ alebo aRMS PAX-. P hodnota štatistického súboru je rovná hodnote 0,4952, čo znamená, že výsledky a vzťah premenných nie sú štatisticky významné.



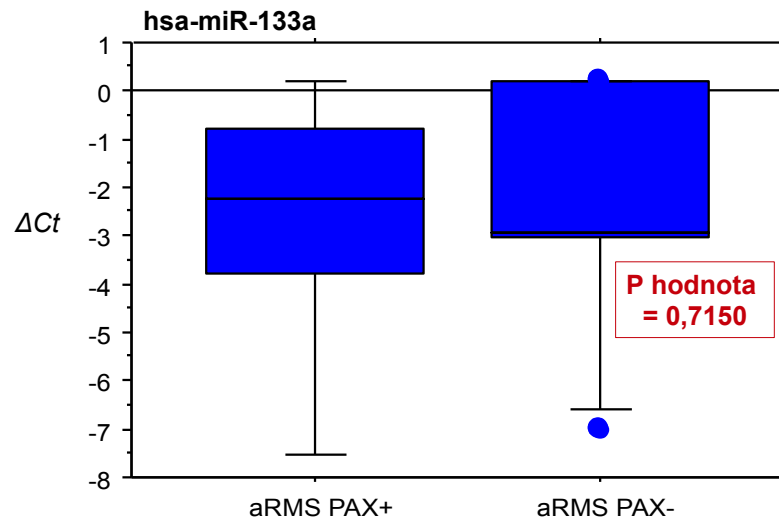
Graf. 22 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-206. Svalovo-špecifická mikroRNA je analyzovaná na základe výšky svojej expresie medzi vzorkami aRMS PAX+ a aRMS PAX-. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,4952.

Graf 23 zobrazuje porovnanie exprimovaných hladín špecifickej hsa-miR-133b vo vzorkách fúzne pozitívnych a fúzne negatívnych aRMS. P hodnota = 0,6434, čo taktiež značí štatiticky nevýznamný výsledok testu.



Graf. 23 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Svalovo-špecifická mikroRNA je analyzovaná na základe výšky svojej expresie medzi vzorkami aRMS PAX+ a aRMS PAX-. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,6434.

V grafe 24 je zobrazený rozdiel exprimovanej hladiny špecifickej myomiR-133a vo vzorkách s fúzne pozitívnym a fúzne negatívnym aRMS. P hodnota súboru sa rovná hodnote 0,7150, čo je tiež vysoko nad hranicou štatistickej významnosti bez dokázanej existencie vzťahu medzi premennými.

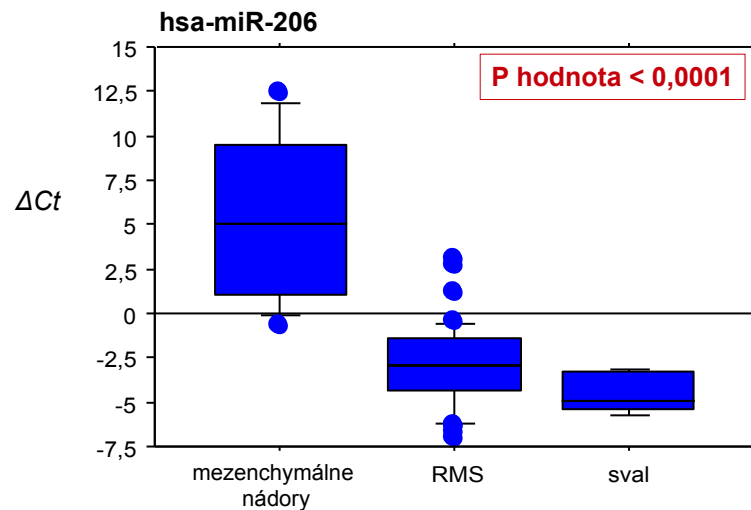


Graf. 24 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Svalovo-špecifická mikroRNA je analyzovaná na základe výšky svojej expresie medzi vzorkami aRMS PAX+ a aRMS PAX-. Vpravo je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,7150.

5.3.9 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS, mezenchymálnych nádoroch a svalovom tkanive

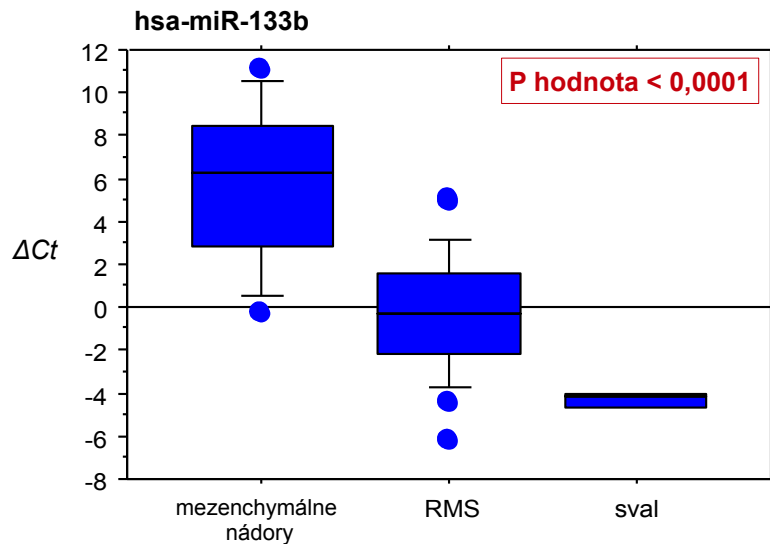
V nižšie uvedených grafoch 25-27 sú zobrazené hladiny expresie jednotlivých študovaných svalovo-špecifických mikroRNA, analyzované na základe rozdielnej expresie vo vzorkách pacientov s diagnózou RMS, vzorkách rôznych typov mezenchymálnych nádorov a vzorkách nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie súboru dát bolo vyhodnotené pomocou Kruskal-Wallisovho testu.

Graf 25 poukazuje na rozdielne hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s RMS a vzorkách kontrolných skupín mezenchymálnych nádorov či nenádorového tkaniva svalu. P hodnota súboru je $< 0,0001$, čo znamená existujúci vzťah medzi premennými a naozaj vysokú štatistickú významnosť.



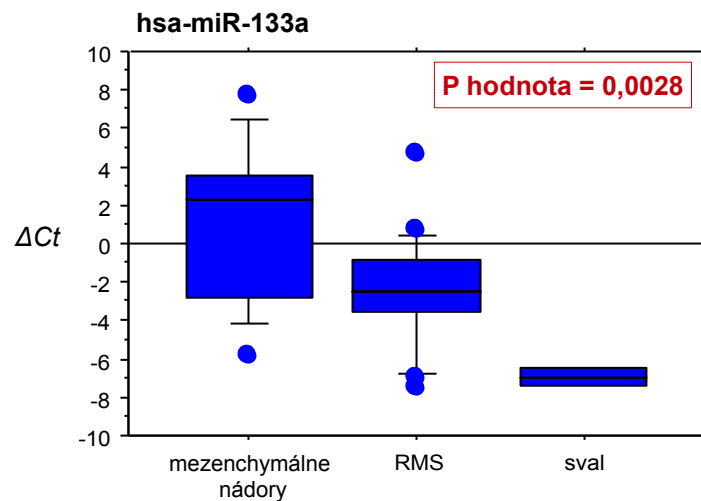
Graf. 25 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Svalovo-špecifická mikroRNA je porovnávaná na základe výšky expresie v kontrolných vzorkách mezenchymálnych nádorov, vzorkách RMS a vzorkách nenádorového svalového tkaniva. V pravom rohu je vpísaná stanovená P-hodnota $< 0,0001$.

Graf 26 rovnako zobrazuje rozdielne hladiny expresie študovanej svalovo-špecifickej miR-133b vo vzorkách rôznych typov RMS, vzorkách rôznych typov mezenchymálnych nádorov či vzorkách svalového nenádorového tkaniva. P hodnota $< 0,0001$ taktiež znamená vysokú štatistickú významnosť bez náhodného rozdielu medzi mediánmi.



Graf. 26 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Svalovo-špecifická mikroRNA je porovnávaná na základe výšky svojej expresie medzi kontrolnými vzorkami mezenchymálnych nádorov, vzorkami RMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty < 0,0001.

V grafe 27 sú hladiny exprimovanej špecifickej hsa-miR-133a vo vzorkách RMS, mezenchymálnych nádorov a svalového tkaniva menej výrazne rozdielne ako v predošlých myomiRs, no taktiež dobre viditeľné, čo potvrdzuje aj P hodnota = 0,0028, čím potvrdzuje štatistickú významnosť.

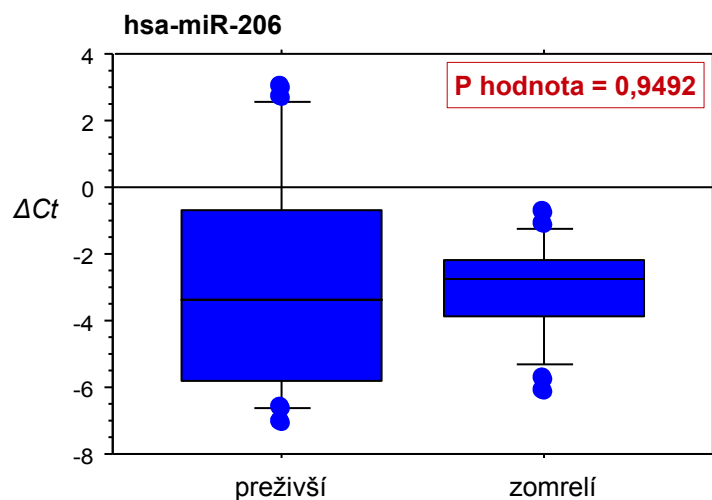


Graf. 27 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Svalovo-špecifická mikroRNA je porovnávaná na základe výšky svojej expresie medzi kontrolnými vzorkami mezenchymálnych nádorov, vzorkami RMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0028.

5.3.10 Porovnanie expresie myomiRs v prípadoch preživších a zomrelých pacientov

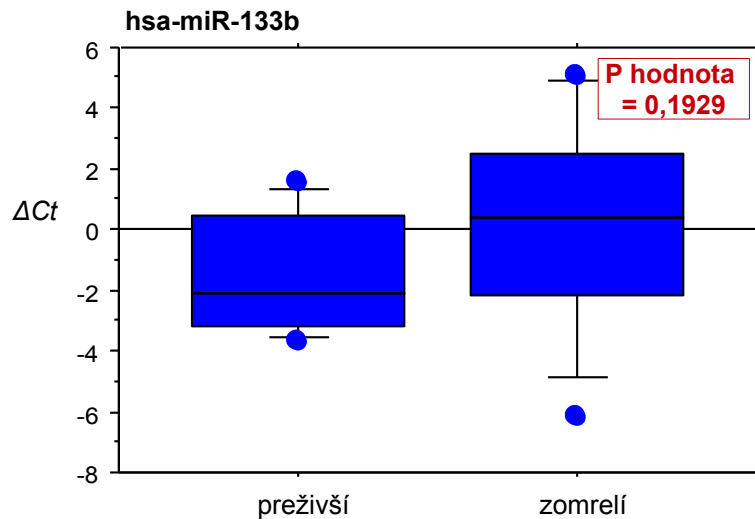
Posledná trojica grafov (28-30) sa sústreďí na porovnanie hladín expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s diagnózou RMS, no so zameraním na možný prognostický význam myomiRs, kedy by mali odzrkadľovať rôznu hladinu expresie v prognosticky pozitívnejších, alebo naopak negatívnejších prípadoch RMS, často končiacich úmrtím pacienta. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou analytického Mann-Whitneyho testu pre dve nezávislé skupiny vzoriek.

Graf 28 zobrazuje porovnanie hladín expresie špecifickej hsa-miR-206 pri vzorkách pacientov preživších / zomrelých po diagnostikovaní RMS. P hodnota sa rovná hodnote 0,9492, čo je vysoko nad hranicou významnosti, analýza a rozdielne hodnoty mediánov teda nie sú štatisticky významné.



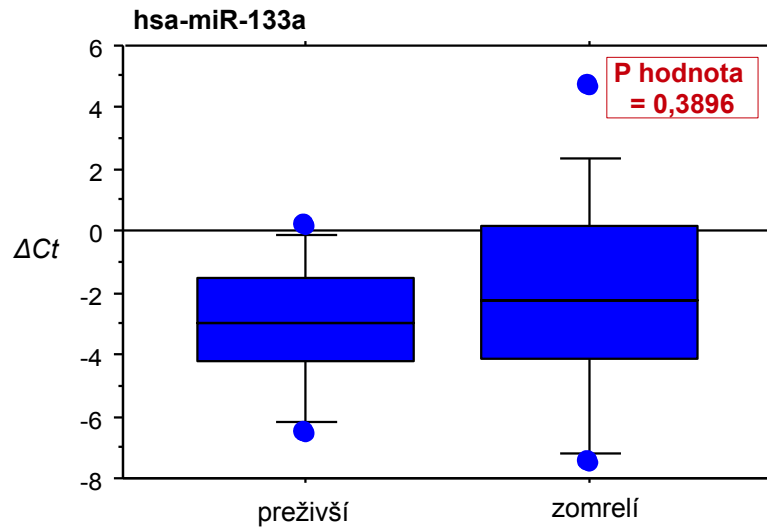
Graf. 28 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-206. Rozdiel výšky expresie príslušnej svalovo-špecifickej mikroRNA je porovnávaný na vzorke pacientov na základe ich prežitia či úmrtnosti po diagnostikovaní RMS. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,9492.

V grafe 29 je taktiež zobrazená rozdielna výška expresie svalovo-špecifickej miR-133b vo vzorkách prognosticky rozdielnych prípadov RMS. P hodnota = 0,1929 však znova znamená štatistickú nevýznamnosť výsledkov testu.



Graf. 29 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Rozdiel výšky expresie príslušnej svalovo-špecifickej mikroRNA je porovnávaný na vzorke pacientov na základe ich prežitia či úmrtnosti po diagnostikovaní RMS. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,1929.

Na poslednom grafe (Graf. 30) vidíme porovnanie dvoch skupín vzoriek pacientov s diagnózou RMS na základe výšky expresie svalovo-špecifickej miR-133a v oboch skupinách. P hodnota = 0,3896. Rozdiel medzi mediánmi je dôsledkom náhody a nie je štatisticky významný. Medzi premennými nie je žiaden vzťah.



Graf. 30 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Rozdiel výšky expresie príslušnej svalovo-špecifickej mikroRNA je porovnávaný na vzorke pacientov na základe ich prežitia či úmrtnosti po diagnostikovaní RMS. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,3896.

6. Diskusia

6.1 Ambion kit versus Norgen kit

Pri postupe izolácie nukleových kyselín sme mali možnosť pracovať s dvoma rozdielnymi kitmi dvoch rôznych značiek, čím sme sa dostali k otázke vzájomného porovnania týchto kitov a výslednej kvalite žiadanej vyizolovanej vzorky. Prvý kit *FFPE RNA Purification Kit* pochádzal od kanadskej firmy Norgen Biotek Corp., druhý *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit* značky Ambion® od Life Technologies. Pomocou oboch kitov sme izolovali vzorky, zaliate v parafrínových bločkoch (FFPE). Základným postupom sa protokoly výrazne nelíšia, princíp u oboch spočíva v kolónkovej izolácii. Po úvodnej deparafrinizácii a premytia peletky nasleduje rozklad proteázou a priame naviazanie RNA na kolónku. Kit od Norgen-u tu okrem bežného disponuje aj dobrovoľným krokom na maximálne odstránenie prítomnej DNA, zatiaľ čo Ambion® používa DNázový mix vrátane prirodzeného postupu. Následným premývaním vzorky sa dostávame k finálnej purifikácii. Komponenty k oboj jednotlivým postupom sú okrem destilovanej vody, xylénu a etanolu dodávané v balení kitu.

Podľa možností sme vzorky vyizolovali pomocou oboch kitov v pomere 70 : 12 (Norgen : Ambion®). Následný postup bol pre všetky vzorky rovnaký, po špecifickej reverznej transkripcii mikroRNA do podoby cDNA sa vzorka kvantifikovala pomocou PCR v reálnom čase na princípe protokolu *TaqMan® MicroRNA Assays*. Nakoniec boli dosiahnuté výsledky analyzované na základe výpočtu pomocou C_t hodnoty u dvoch svalovo-špecifických mikroRNA, a to miR-206 a miR-133b.

Porovnaním hladín expresie oboch miRNA samostatne sme dostali hodnoty priemeru a mediánu naozaj výrazne podobné u oboch porovnávaných kitov.

Na podobné zrovnanie komerčných izolačných kitov sa zamerala aj štúdia od Li a Kowdley, v ktorej boli zahrnuté aj nami porovnávané kity od Ambion® a Norgen. Vo svojej práci zrovnávali kvalitu a množstvo výtazku RNA za účelom zdokonalenia izolačných protokolov pre miRNA z hľadiska ich potenciálneho využitia ako

diagnostických či prognostických biomarkerov nádorových ochorení. Izolácie nukleových kyselín a následné merania hladín expresie však prevádzali na vzorkách krvi, oproti našim vzorkám FFPE. Testované boli navyše vzorky pacientov s rôznymi diagnózami mimo rabdomyosarkómov, či viacerými typmi miRNA, avšak mimo svalovo-špecifické myomiRs. Vo svojich výsledkoch, narozdiel od našich, publikujú, že kit od Ambion® mal vyšší percentuálny výťažok ako aj kvalitu vyizolovanej miRNA oproti kitu Norgen (Li a Kowdley, 2012).

Podobná štúdia bola realizovaná kanadskou skupinou Lam a kol., v ktorej analyzovali hladiny génovej expresie na základe rôznych parametrov vo vzorkách dlhých aj krátkych RNA molekúl, vrátane miRNA. Vzorky boli izolované na základe štyroch rôznych postupov, medzi ktorými boli aj protokoly Ambion® a Norgen kitov. Už meraním kvality a kvantity vyizolovanej RNA sa hodnoty pohybovali celkom blízko. Vyhodnotením dát z RQ-RT-PCR sa preukazuje kvalitatívne značná podobnosť oboch kitov, pre príklad pri miR-let7a bola hodnota ΔC_t po izolácii kitom Norgen rovná $10,1 \pm 0,3$, po izolácii kitom Ambion® bola hodnota ΔC_t rovná $10,6 \pm 0,9$. Výsledky tejto práce teda podporujú našim, keď poukazujú na kvalitné, hodnotné a hlavne značne porovnateľné výsledky oboch izolačných kitov rôznych značiek (i4).

Odvíjajúc sa od našich výsledkov a tým zhodnotenia značne vysokej podobnosti výslednej kvality izolácie na základe oboch protokolov, žiaden z nich teda výraznejšie oproti druhému neuprednostňujeme. Dáta sú však zatiaľ súčasné a priebežne budú ďalej doľňané pre optimálnejšiu štatistiku a analýzu čo sa týka porovnania oboch izolačných kitov navzájom.

6.2 FFPE / zmrazené vzorky tkanív

Formalínom fixované tkanivá v podobe vzoriek nukleových kyselín, archivovaných v parafínových bločkoch (FFPE) majú z hľadiska klinického aj praktického veľký význam z pohľadu informatívnosti, či uchovania tkaniva ako zdroja nukleovej kyseliny. Aj napriek často značnej fragmentácii či chemickej modifikácii uchovávanej NK je FFPE obzvlášť

vyhovujúcim spôsobom skladovania vzoriek, vhodných k ďalšiemu štúdiu . Okrem toho bolo preukázané, že fragmentácia RNA v parafínových bločkoch podlieha degradácii len do určitého veľkostného bodu a to približne do dĺžky 80 nukleotidov. Nakoľko sú mikroRNA podstatne malými molekulami (18 až 24 nukleotidov), v takejto chvíli majú pri fragmentácii dĺžkovú výhodu a procesom fixácie nie sú významne zasiahnuté (Liu a Xu, 2011).

Liu a Xu vo svojej štúdií porovnávali FFPE oproti vzorkám zmrazeného tkaniva, pochádzajúcich z rovnakej vzorky tkaniva. Expresné profily miRNA merali pomocou komerčne dostupných miRNA microarrays či kvantitatívnej PCR v reálnom čase. Podrobnejšími výsledkami zastávajú názor, že nameraná hladina expresie miRNA zo vzorky FFPE je zrovnateľná nameraným hladinám expresie miRNA zo vzoriek zmrazených tkanív (Liu a Xu, 2011).

Xi a kol. vo svojej práci zdôrazňuje štatistickú neexistenciu signifikantného rozdielu medzi analýzou expresného profilu miRNA , izolovanej z FFPE alebo vzorky zmrazeného tkaniva, pričom stabilitu miRNA nezmenili ani rôzne "staré" vzorky FFPE. Štatistickú významnosť dokladá dosiahnutými P-hodnotami $< 0,05$ (Xi a kol, 2007).

Výsledky práce Li a kol. zobrazujú hladiny expresie miRNA, vyizolovanej zo vzoriek FFPE, dokonca vyššie ako pri vyizolovaných vzorkách zo zmrazených tkanív. Vysvetľujú si to hlavne zvýšenou kvantitou miRNA vo vzorkách FFPE, ktorých dĺžka je v tomto prípade výhodou (Li a kol., 2007).

S podporou viacerých štúdií teda namerané výsledky inklinujú k skutočnosti, že tkanivo, uchovávané vo forme FFPE, je viac ako vhodným zdrojom pre analýzy hladín expresie molekúl mikroRNA. Tieto malé molekuly majú výhodu svojej krátkej dĺžky, vďaka čomu materiál zostáva celkovo v kvalitnom stave pre rôzne typy analýz. Zhromažďujúce sa dáta tejto práce vychádzajú zo zatiaľ nepublikovaných dát (Krsková a kol., nepublikované údaje), na ktorých sa stále ďalej pracuje.

6.3 Vyhodnotenie hladín expresie špecifických myomiRs v rôznych typoch vzoriek

Rabdomyosarkómy dnes predstavujú najčastejšie sa vyskytujúci nádor mäkkých tkanív u pediatrických pacientov s pomerne agresívnym klinickým fenotypom a zúfalým nedostatkom sérových diagnostických či prognostických markerov, čo často zťažuje rýchlu a správnu diagnózu či optimálny návrh liečby.

MikroRNA sa v posledných rokoch stáva stále viac prítlačivou témou v oblasti nádorových ochorení a tak sa otázky a požiadavky vzťahujú v súčasnosti hlavne k týmto malým nekódujúcim molekulám. Svalovo-špecifické mikroRNA sa nazývajú myomiRs a my sme sa v tejto práci zamerali na sledovanie hladiny expresie práve týchto molekúl so vzťahom k myogénnej regulácii a pri ich abnormálnych hladinách expresie voči ochoreniu RMS (Slabý, 2012).

Viacero súčasných návrhov a nápadov sa začalo upierať na sledovanie rozdielnych hladín expresie svalovo-špecifických mikroRNA ako prítlačivých potenciálnych biomarkerov pre RMS.

Všetky príslušné vzorky, zahrnuté v tejto práci boli vyizolované špeciálnymi postupmi pre izoláciu, špecifickou RT boli prepísané do cDNA, následne boli kvantifikované pomocou PCR reakcie meranej v reálnom čase a príslušné dáta boli analyzované do podoby vyhodnotenia celkovej štatistickej významnosti.

Celkovo 82 vzoriek bolo rozdelených do podskupín vo forme variant RMS a kontrolných vzoriek v podobe mezenchymálnych nádorov a svalového nenádorového tkaniva.

Do hlavnej úlohy študovaných mikroRNA z rodiny svalovo-špecifických myomiRs boli do tejto práce vybraté: miR-206, miR-133b, miR-133a. Svalovo-špecifické miRNA sa v ochoreniach rabdomyosarkómov prirodzene javia ako pod-exprimované v porovnaní s nenádorovým svalovým tkanivom.

Vzorky mozgového tkaniva sa dostali do tejto štúdie so záujmom porovnania jeho výšky expresie oproti svalovo-špecifickým mikroRNA a ako doplňujúce kontrolné vzorky iného pôvodu. Podľa očakávania boli hladiny expresie vzorky mozgu oproti svalovým vzorkám veľmi nízke, nevykazovali žiaden vzdialený kontaktný vzťah, tobôž nie inak štatisticky významný voči testovaným vzorkám ako doplňujúca kontrola.

Štatisticky najvýznamnejšie je celkové porovnanie špecifických myomiRs vrámci hlavných typov RMS, svalového tkaniva a vzoriek mezenchymálnych nádorov. Hladiny expresie myomiRs sú viditeľne významne vyššie oproti kontrolným vzorkám nádorov mezenchymálnych tkanív. Všetky tri študované svalovo-špecifické mikroRNA sú v týchto výsledkoch štatisticky vysoko signifikantné (Graf. 1, 2, 3), na čom dnes pracuje mnoho štúdií s perspektívnym využitím v klinickej praxi. MiR-206 v porovnaní s miR-133a a miR-133b vykazuje oproti kontrolným vzorkám mezenchymálnych nádorov značne vyššiu hladinu expresie, pričom v porovnaní so zdravým tkanivom svalu je v praktickom vnímaní jej expresia stále umlčaná.

Špecifickejšie porovnávanie s ohľadom na rozdielnu expresiu voči kontrolným vzorkám rôznych typov mezenchymálnych nádorov môžeme vidieť v grafoch 4 až 6. Hladiny expresie svalového tkaniva korelujú s výškou expresie dvoch najčastejšie sa vyskytujúcich variant RMS, a to aRMS a eRMS. U miR-206 je hladina expresie u RMS oproti mezenchymálnym nádorom viditeľne vyššia, pričom u eRMS ešte o čosi viac v porovnaní s aRMS. Čo sa týka miR-133a, expresia medzi RMS a mezenchymálnymi nádormi je už značne viac vyrovnaná. Všetky tri myomiRs sú vo výsledných hladinách stále vysoko štatisticky signifikantné.

Nohata a kol. vo svojej práci ponúkajú prehľadné a obširne porovnanie hladín expresie svalovo-špecifických mikroRNA vo viacerých typoch nádorových ochorení, vrátane rabdomyosarkómov. Pri RMS, ako vo väčšine štúdií, sa však aj oni zameriavajú na význam a potenciálnu úlohu miR-206 do podoby diagnostického markera a miR-133a či miR-133b nevenujú dostatočnú pozornosť. U miR-206 však svojimi výsledkami podporujú naše ohľadom preukázne významného rozdielu výšky expresie pri vzorkách pacientov s

diagnózou RMS oproti pacientom s inými typmi rôznych mezenchymálnych nádorov (Nohata a kol., 2012).

Tiež práca skupiny Miyachi a kol. sa venuje stále aktuálnemu problému neexistencie špecifického sérového biomarkera pre ochorenie RMS. Sledovali hladiny expzie špecifických myomiRs (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206) oproti kontrolným skupinám nenádorových, či iných nádorových línií mimo RMS, celkovo v 55 rôznych vzorkách. Štatistickú analýzu porovnania hladín expzie zrealizovali pomocou Mann-Whitneyho testu. Výsledná expzia všetkých myomiRs bola u RMS signifikantne vyššia oproti vzorkám iných typov nádorov, pričom s najvyššiou senzitivitou a špecificitou sa týkali miR-206, ktorú autorský kolektív s nádejou odporúča do úlohy biomarkera pri neinvazívnych diagnostických testoch pre RMS. Tento výsledok vysvetľujú na základe expzie miR-206 ako jedinej myomiR čisto v kostrovom svalstve bez detekcie v iných tkanivách (Miyachi a kol., 2010).

Čo sa týka špecifického porovnania výšky expzie myomiRs u aRMS a eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu, miR-206 ustupuje z popredia štatistickej významnosti s hladinou expzie veľmi podobnou výškam expzie myomiRs u svalových nenádorových vzoriek (Graf. 7). Pozornosť sa zameria viac na svalovo-špecifické miR-133a a miR-133b, ktoré zostávajú štatisticky signifikantné a jasne vidno rozdiel oproti nenádorovému svalovému tkanivu, ktoré sa líši vyššou hladinou expzie týchto myomiRs. MiR-133b je oproti miR-133a exprimovanejšia o niečo slabšie. U miR-133b je zaujímavé sledovať vyššiu hladinu expzie u aRMS oproti eRMS, oproti ostatným dvom myomiRs (Graf. 8, 9).

Pri porovnávaní hladín expzie myomiRs jednotlivo u aRMS a eRMS voči vzorke nenádorového svalového tkaniva miR-206 skončila znova bez štatistického významu (Graf. 10, 13). MiR-133b a miR-133a majú v oboch prípadoch signifikantne nižšie hladiny expzie ako pri nenádorovom svalovom tkanive, pričom miR-133a (Graf. 12, 15) znova vykazuje expziu na vyššej úrovni oproti miR-133b (Graf. 11, 14).

Zaujímavým a značne dôležitým je porovnanie hladín expresie myomiRs u dvoch najčastejšie sa vyskytujúcich variant RMS, a to aRMS a eRMS. Štatisticky preukáznou je v tomto prípade len miR-206, pričom u eRMS vykazovala vyššiu hladinu expresie oproti aRMS. Na základe down-regulácie myomiRs v nádorových ochoreniach sa tým pádom miR-206 ukazuje byť významnejším prognostickým markerom pre typ alveolárnej formy RMS (Graf. 16). Hladiny expresie myomiRs 133a a 133b sú v tomto prípade vysoko nepreukázne, u miR-133a je P hodnota dokonca vyššia ako 0,9999 (Graf.18).

Tomuto výsledku nahráva aj štúdia od Missiaglia a kol, v ktorej sa bližšie venujú expresii miR-206 v rozpätí 187 vzoriek materiálu. Podobne ako v našej práci, hladina expresie miR-206 bola vo vzorkách RMS mierne down-regulovaná oproti kontrolnému nenádorovému svalovému tkanivu a pritom signifikantne vyššia oproti kontrolným vzorkám mezenchymálnych typov nádorov (Missiaglia a kol., 2010). Znížená expresia miR-206, hlavne pri aRMS, takto vykazuje koreláciu s horšou prognózou prežívania. Taktiež práca od Miyachi a kol. poukazuje na koreláciu zníženej expresie miR-206 vo vzorkách RMS s negatívnejšou prognózou u týchto pacientov, no ich, aj štúdia od Missiaglia a kol., poukazuje na potrebu ďalších testov v tejto oblasti (Missiaglia a kol., 2010; Miyachi a kol., 2010).

Zrovnanie exprimovaných hladín myomiRs všeobecne pri skupine RMS oproti kontrolnému nenádorovému svalovému tkanivu je štatisticky signifikantné v prípade myomiRs 133a a 133b, pričom expresia miR-133a je približne dvakrát vyššia ako u miR-133b (Graf. 20, 21). Ako píše Missiaglia a kol. vo svojej práci, vyššia hladina expresie miR-206 priamo vplyva na gény, ovplyvňujúce diferenciáciu svalových tkanív (Missiaglia a kol, 2010). V týchto výsledkoch sa ukazuje potenciálne sľubná úloha miR-133b v oblasti diagnostiky RMS.

Jedným z najzaujímavejších hodnotení hladín expresie súčasných štúdií svalovo-špecifických mikroRNA je určite porovnanie expresie jednotlivých myomiRs pri alveolárnom type RMS. ARMS je druhý najčastejšie sa vyskytujúci typ RMS, avšak prognosticky výrazne menej priaznivý. Typický je výskytom fúzne pozitívnych génov *PAX3-FKHR* alebo *PAX7-FKHR*, čo často pomáha pri správnej a rýchlejšej diagnostike

tejto formy RMS, no bežne sa tieto fúzne gény vyskytujú len v asi 75 % prípadov aRMS, čo robí stále nepostrádateľným lov na spoľahlivejší marker tohto typu ochorenia (McDowell, 2003). Hladina expresie jednotlivých myomiRs bola porovnávaná medzi vzorkami fúzne pozitívnej (PAX+) a fúzne negatívnej (PAX-) formy aRMS. Ani jedna svalovo-špecifická mikroRNA však v tomto prípade k štatistickej významnosti blízko nemala (Graf. 22, 23, 24).

V štúdií od Missiaglia a kol. je pozorovaná znížená expresia miR-206 u aRMS fúzne negatívnej varianty a tiež spojená s kratším prežívaním pri metastatickej forme eRMS (Missiaglia a kol, 2010).

Naša štúdia bude pokračovať na zbieraní vzoriek a hromadení výsledkov v tejto oblasti.

Na zhodnotenie hladín expresie jednotlivých myomiRs sa so širším merítkom pozerá porovnanie celej skupiny RMS so svalovým nenádorovým tkanivom a so vzorkami iných typov mezenchymálnych nádorov. Všetky tri študované svalovo-špecifické mikroRNA sú v tomto prípade štatisticky preukázane. RMS má najnižšiu hladinu expresie u miR-133b s najkrajšími a najjasnejšími rozdielmi oproti kontrolným skupinám (Graf. 26). Najväčší rozdiel v hladinách expresie u RMS oproti mezenchymálnym nádorom pozorujeme znova u miR-206 (Graf. 25).

Poslednou otázkou práce bola potenciálna úloha svalovo-špecifických mikroRNA ako biomarkerov v oblasti prognózy RMS. Zostavili sme preto dve rôzne skupiny so vzorkami prognosticky priaznivejšími v podobe "preživších" pacientov oproti vzorke prognosticky nepriaznivej v podobe "zomrelých" pacientov. Dosiaľ dokončená vzorka pacientov bola v každom študovanom type svalovo-špecifických mikroRNA štatisticky absolútne nepreukázna (Graf. 28, 29, 30), no stále pokračujeme v zbieraní väčšej a širšej vzorky dát, dúfajme smerujúcej k štatistickej významnosti.

7. Súhrn

Ako prvý krok sa nám v našom laboratóriu s úspechom podarilo zaviesť postup izolácie mikroRNA a postup protokolu špecifickej RQ-RT-PCR so sledovaním expresie jednotlivých špecifických mikroRNA.

Vzájomným porovnaním (ako na základe postupu, tak na základe štatistiky) dvoch komerčných kitov použitých v tejto štúdií sme dostali až prekvapivo podobné hodnoty mediánov vyizolovaných vzoriek so študovanými svalovo-špecifickými miR-206 a miR-133b. Taktiež porovnanie dlhodobého skladovania vzoriek tkanív vo forme FFPE alebo zmrazených vzoriek tkanív preukazuje hodnoty veľmi podobné, čím s FFPE robí materiál úrovne rovnakej kvality ako je zmrazené tkanivo. Vďaka tomu hlavne krátka dĺžka mikroRNA, ktorou sa tieto nekódujúce molekuly často vyhnú fragmentácii pri postupe fixácie vzorky do parafínu.

Na základe našich expresných analýz a štatistických výsledkov sa javí všeobecná úloha svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s rabdomyosarkómami značne preukázne významná. Hladiny expresie jednotlivých tzv. myomiRs boli porovnávané a štatisticky analyzované voči kontrolným skupinám iných typov mezenchymálnych nádorov či vzorkám nenádorového svalového tkaniva.

Vo vzorkách s RMS tieto myomiRs vykazujú preukázne nižšiu hladinu expresie oproti normálnemu nenádorovému svalovému tkanivu. Čo sa týka štatisticky významného rozdielu, naša pozornosť sa sústreďuje na miR-133a a miR-133b, pričom miR-133b je ešte aj s významným rozdielom hladín expresie oproti mezenchymálnym typom nádorov potenciálne krásnym markerom vytyčujúcim ochorenie RMS.

Oproti ostatným typom študovaných mezenchymálnych nádorov je výraznejšie nadexprimovaná hlavne mikroRNA-206 s jednoznačne preukázaným vplyvom na klinické správanie RMS.

V rámci jednotlivých podskupín RMS navzájom zohráva hlavnú úlohu zase miR-206 s nízkou expresiou hlavne pri aRMS, čím sa spája s horšou prognózou tohoto ochorenia a potenciálnou úlohou biomarkera pre alveolárnu formu RMS.

Všeobecne v súčasnosti neexistuje veľa štúdií, zameraných na sledovanie expresie svalovo-špecifických mikroRNA, či ich úlohu v oblasti diagnózy a priebehu RMS. Tých pár sa zameriava hlavne na miR-206, s preukázane najperspektívnejšími výsledkami v tejto oblasti. Ostatné myomiRs zostávajú trochu opomenuté a veľa prác so sledovaním ich vplyvu na RMS k dispozícii nie je. Moja práca však podáva výsledky aj s pohľadom na rozdielnu hladinu expresií miR-133a či miR-133b s potenciálnym návrhom využitia v sfére diagnózy a prognózy aj týchto dvoch myomiRs.

V štúdiu chceme každopádne pokračovať a postupne ju rozširovať, pričom jedným z našich plánov je skúsiť vyšetrenie miR-206 z periférnej krvi ako možný neinvazívny postup vyšetrenia. Ideálne naše výsledky raz budú mať potenciálny vplyv na kandidatúru týchto myomiRs ako prípadných diagnostických či prognostických markerov v patogenéze rabdomyosarkómov!

8. Zoznam použitej literatúry

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005; 122(4):553-63.

Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2001; 20(40):5736-46.

Bartel PD. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004; 116:281–297.

Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2002; 48(8):1178-85.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(4):365-79.

Carroll SJ, Nodit L. Spindle cell rhabdomyosarcoma: a brief diagnostic review and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137(8):1155-8.

Egas-Bejar D, Huh WW. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*. 2014; 5:115–125.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(4):259-69.

Ferrari A, Dileo P, Casanova M, Bertulli R, Meazza C, Gandola L, Navarra P, Collini P, Gronchi A, Olmi P, Fossati-Bellani F, Casali PG. Rhabdomyosarcoma in adults. A retrospective analysis of 171 patients treated at a single institution. *Cancer*. 2003; 98(3):571-80.

Folpe AL, McKenney JK, Bridge JA, Weiss SW. Sclerosing rhabdomyosarcoma in adults: report of four cases of a hyalinizing, matrix-rich variant of rhabdomyosarcoma that may be confused with osteosarcoma, chondrosarcoma, or angiosarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(9):1175-83.

Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(8):1284-8.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(7):522-31.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6(10):986-94.

Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell.* 2003; 5(2):351-8.

Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(1):22-32.

Chen Q, Lu W, Li B. Primary sclerosing rhabdomyosarcoma of the scalp and skull: report of a case and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(2):2205–2207.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(20):e179.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(5):376-85.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006; 22(3):165-73.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001; 294:853–858.

Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA.* 2008; 14(1):35-42.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes smallRNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75(5):843-54.

- Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology*. 2007; 7:36.
- Li Y, Kowdley KV. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem*. 2012; 431(1): 69–75.
- Liu A, Xu X. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol*. 2011; 724:259-67.
- McCarthy JJ. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1779(11):682–691.
- McDowell H. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child*. 2003; 88(4):354–357.
- Mendell JT. MicroRNAs: Critical Regulators of Development, Cellular Physiology and Malignancy. *Cell Cycle*. 2005; 4(9):1179-1184.
- Merlino G, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma – working out the pathways. *Oncogene*. 1999; 18(38):5340-8.
- Missiaglia E, Shepherd CJ, Patel S, Thway K, Pierron G, Pritchard-Jones K, Renard M, Sciort R, Rao P, Oberlin O, Delattre O, Shipley J. MicroRNA-206 expression levels correlate with clinical behaviour of rhabdomyosarcomas. *Br J Cancer*. 2010; 102(12):1769-77.
- Miyachi M, Tsuchiya K, Yoshida H, Yagyu S, Kikuchi K, Misawa A, Iehara T, Hosoi H. Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 400(1):89-93.
- Nascimento AF, Barr FG. Spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th edn. Lyon: IARC Press; 2013. pp. 134–135.
- Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. MicroRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget*. 2012; 3(1):9-21.
- Novák J, Kružliak P, Bienertová-Vašků J, Slabý O, Novák M. MicroRNA-206: a Promising Theranostic Marker. *Theranostics*. 2014; 4(2):119-133.

- Olena AF, Patton JG. Genomic Organization of microRNAs. *J Cell Physiol.* 2010; 222(3): 540–545.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 2008; 22(22):3172-83.
- Parham DM. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol.* 2001; 14(5):506-14.
- Rao PK, Missiaglia E, Shields L, Hyde G, Yuan B, Shepherd CJ, Shipley J, Lodish HF. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *The FASEB Journal.* 2010; 24(9):3427-3437.
- Rota R, Ciarapica R, Giordano A, Miele L, Locatelli F. MicroRNAs in rhabdomyosarcoma: pathogenetic implications and translational potentiality. *Molecular Cancer.* 2011; 10:120.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology.* 2004; 5(3):R13.
- Slabý O. MikroRNA: historie, definice, biogeneze a funkce. Houdek L. (ed.): MikroRNA v onkologii. Galén, Praha, 2012, 1-29.
- Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. *PAX3-FKHR* and *PAX7-FKHR* gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2002; 20(11):2672-9.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 2003; 17(1):49-63.
- Weiss SW, Goldblum JR: Rhabdomyosarcoma. In Weiss SW, Goldblum JR (eds). *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors.* 4th ed., St. Louis, CV Mosby, 2001, 785-835.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. Elegans*. *Cell*. 1993; 75(5):855-62.

Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007; 13(10):1668-74.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*. 2004; 304(5670):594-6.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006; 54(11):1177-1191.

Internetové zdroje:

i1:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/> (11.8.2015)

i2:<http://rimarcik.com/navigator/kw.html> (11.8.2015)

i3:<http://rimarcik.com/navigator/n-ordinal.html> (11.8.2015)

i4:https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/total_rna_purification_kit_rna_quality_assessment_and_the_effect_on_gene_expression_studies_presented_at_ascb_2008_posters_68.pdf (11.8.2015)