

ABSTRAKT

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní onemocnění vyznačující se nedostatečnou krvetvorbou, dysplazií kostní dřeně a cytopenií jedné nebo více krevních řad v periferní krvi. Současný pokrok v porozumění patogenезi MDS na molekulární úrovni přináší nové možnosti v oblasti stanovení diagnózy, prognózy a léčby tohoto onemocnění.

Malé nekódující RNA (sncRNA), obzvláště mikroRNA (miRNA), jsou středem zájmu v oblasti výzkumu jejich funkce, exprese, úlohy při vzniku a vývoji onemocnění a také jejich možného využití coby biomarkerů onemocnění. V poslední době je pozornost věnována také extracelulárním sncRNA a to obzvláště těm, které jsou přítomny v krevním oběhu, tzv. „cirkulujícím“ sncRNA. Cirkulující sncRNA jsou považovány za snadno dostupné potenciální biomarkery stavu onemocnění a rizika progresu.

Základem této disertační práce je několik studií zabývajících se profily sncRNA u MDS pacientů. V rámci těchto studií jsme vyšetřovali jak profily intracelulárních sncRNA z CD34+ buňek kostní dřeně, tak profily extracelulárních sncRNA z celkové krevní plasmy a z extracelulárních vesikulů vyzolovaných z plasmy. K analýze jsme využili tzv. „high-throughput“ technologie, konkrétně microarrays a sekvenování nové generace (NGS). Cílem bylo určit profily sncRNA charakterizující MDS a nalézt konkrétní molekuly, které by byly schopné předpovědět další vývoj onemocnění a kvalitu odpovědi na léčbu azacitidinem (AZA). Také jsme porovnali profily cirkulujících sncRNA ze dvou extracelulárních materiálů (tj. z celkové plasmy a extracelulárních vesikulů) s cílem zjistit, jestli jsou vhodnými zdroji sncRNA biomarkerů pro MDS.

Pomocí microarrays jsme našli významně snížené hladiny miR-27a-3p, miR-199a-5p a miR-223-3p v celkové plasmě pacientů s vysokorizikovým MDS oproti pacientům s nízkorizikovým MDS. Další analýzy ukázaly, že nízká hladina miR-223-3p předpovídá kratší dobu celkového přežití, zatímco nízká hladina miR-451 naznačuje kratší dobu do progresu onemocnění.

Pomocí NGS jsme našli další sncRNA s odlišnými hladinami mezi pacienty s časnými a pokročilými stadii MDS. Kromě miRNA jsme zachytili i jiné druhy sncRNA. U pacientů s pokročilejšími stadii MDS jsme pozorovali zvýšené hladiny mnoha cirkulujících miRNA, které se účastní regulace krvetvorby (např. miR-103a-3p, miR-103b, miR-107, miR-221-3p, miR-221-5p a miR-130b-5p) a také miRNA lokalizovaných v chromosomální oblasti 14q32 (např. miR-127-3p, miR-154-5p, miR-323b-3p, miR-382-3p, miR-409-5p a miR-485-3p).

Identifikovali jsme čtyři sncRNA (miR-1237-3p, U33, hsa_piR_019420 a miR-548av-5p), jejichž kombinované skóre vypočtené z naměřených hladin v extracelulárních vesikulech má spojitost s trváním celkového přežití pacientů. Dále jsme určili pět miRNA (miR-423-5p, miR-126-3p,

miR-151a-3p, miR-125a-5p a miR-199a-3p) z celkové plasmy, jejichž kombinované skóre předpovídá kvalitu odpovědi na léčbu AZA. V CD34+ buňkách kostní dřeně jsme pozorovali, že vysoká hladina miR-17-3p a nízké hladiny miR-100-5p a miR-133-b stanovené u pacientů před léčbou AZA ukazují na příznivou odpověď pacientů na tuto léčbu. Nízká hladina miR-100-5p před léčbou AZA navíc naznačuje delší celkové přežití léčených pacientů.

Co se týče porovnání dvou extracelulárních materiálů, tj. celkové plasmy a extracelulárních vesikulů, klastrovací analýza ukázala, že obsah RNA je více homogenní u vzorků extracelulárních vesikulů oproti vzorkům celkové plasmy. Dále jsme zaznamenali podstatně více sncRNA s odlišnými hladinami mezi těmito dvěma materiály u MDS pacientů oproti zdravým jedincům.

Z našich výsledků vyplývá, že celková plasma, extracelulární vesikuly izolované z plasmy a CD34+ buňky kostní dřeně MDS pacientů mají rozdílné profily sncRNA. Tyto profily jsou specifické pro různá stadia MDS a mohou předpovídat další vývoj onemocnění. Určili jsme několik sncRNA, většinou miRNA, jejichž deregulované hladiny souvisí s přežitím pacientů a odpovědí na léčbu AZA. Tyto sncRNA tedy mohou být považovány za potenciální biomarkery předpovídající další vývoj onemocnění u pacientů s MDS.