

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

# **Sledování změn exprese mikroRNA u karcinomu cervixu**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Helena Kovaříková, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Bc. Tereza Štveráková

## **Prohlášení**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

## **Poděkování**

Tímto bych velice ráda poděkovala mé konzultantce Ing. Heleně Kovaříkové, Ph.D. za metodické vedení, ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Ivaně Baranové za její pomoc a ochotu při práci v laboratoři. Poděkování patří mé vedoucí práce doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. Závěrem bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu v celém mém studiu.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Autor: Bc. Tereza Štveráková

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Helena Kovaříková, Ph.D.

Název diplomové práce: Sledování změn exprese mikroRNA u karcinomu cervixu

Karcinom cervixu je celosvětově čtvrtým nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u žen. Základem prevence karcinomu cervixu je rutinní screening s použitím kvalitních diagnostických testů. Tato diplomová práce se zaměřila na hledání citlivých a specifických diagnostických markerů, které by zachytily ranou fázi kancerogeneze. Vhodnými kandidáty na diagnostické markery jsou mikroRNA (miRNA), které negativně posttranskripčně regulují genovou expresi. Při kancerogenezi jsou miRNA deregulovány, čímž se podílejí na rozvoji karcinomu. Cílem této diplomové práce bylo identifikovat významně deregulované miRNA, které by mohly být potenciálními diagnostickými markery karcinomu cervixu.

V rámci této diplomové práce byla vybrána jako endogenní kontrola kombinace miR-423-5p a miR-25-3p, a to na základě výsledků analýzy real-time PCR a vyhodnocení algoritmem *RefFinder*. Dále se stanovila relativní exprese vybraných miRNA (miR-10b-5p, miR-145-5p a miR-182-5p) pomocí real-time PCR a s využitím metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Celkem bylo analyzováno 70 vzorků FFPE tkáně karcinomu cervixu a 30 kontrolních vzorků.

Pomocí statistické analýzy byla detekovaná statisticky významně snížená exprese u miR-145-5p a významně zvýšená exprese u miR-182-5p. Kombinace těchto dvou miRNA by mohla být využita jako potenciální diagnostický multimarker karcinomu cervixu.

## ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove  
Department of Biochemical Sciences

Author: Bc. Tereza Štveráková

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Consultant: Ing. Helena Kovaříková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Monitoring changes in microRNA expression in cervical cancer

Cervical cancer is the fourth most common cancer among women globally. Prevention of cervical cancer is based on routine screening using quality diagnostic tests. This diploma thesis focused on searching for sensitive and specific diagnostic markers that would detect the early stage of carcinogenesis. Suitable candidates for a diagnostic markers are microRNAs (miRNAs), which negatively post-transcriptionally regulate gene expression. In carcinogenesis, miRNAs are deregulated and may play a significant role in cancer development. The aim of this diploma thesis was to identify significantly deregulated miRNAs that could be used as diagnostic markers of cervical cancer.

In this diploma thesis, the combination of miR-423-5p and miR-25-3p was selected as the endogenous miRNA control based on the results of real-time PCR analysis and the results of the *RefFinder* algorithm. After that, the relative expression of selected miRNAs (miR-10b-5p, miR-145-5p a miR-182-5p) was determined by real-time PCR and using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. A total of 70 FFPE cervical cancer tissue samples and 30 control normal tissue were analysed.

Based on statistical analysis, significant downregulation of miR-145-5p and significant upregulation of miR-182-5p were detected. The combination of these two miRNAs could be used as potential diagnostic multimarker of cervical cancer.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>8</b>
2.1 Karcinom cervixu .....	8
2.1.1 Epidemiologie .....	8
2.1.2 Rizikové faktory .....	11
2.1.3 Diagnostika .....	11
2.1.4 Prevence .....	13
2.1.5 Léčba.....	14
2.2 Kancerogeneze cervixu.....	14
2.2.1 HPV .....	15
2.3 Epigenetika.....	18
2.3.1 mikroRNA.....	18
2.3.2 Epigenetické změny u karcinomu cervixu .....	21
<b>3 Cíle práce</b> .....	<b>25</b>
<b>4 Materiál a metodika</b> .....	<b>26</b>
4.1 Výběrový soubor .....	26
4.2 RNA extrakce a reverzní transkripce .....	28
4.3 Stanovení relativní exprese .....	30
4.4 Statistická analýza .....	34
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>35</b>
5.1 Výběr endogenní kontroly.....	35
5.2 Stanovení relativní exprese .....	38
5.2.1 miR-10b-5p .....	39
5.2.2 miR-145-5p .....	40
5.2.3 miR-182-5p .....	41
5.2.4 Kombinace miR-145-5p a miR-182-5p.....	42
5.3 Korelace exprese miRNA s klinickopatologickými daty.....	43
<b>6 Diskuse</b> .....	<b>46</b>
6.1 Výběr endogenní kontroly.....	47
6.2 Rozdílná exprese vybraných miRNA u karcinomu cervixu .....	49
<b>7 Závěr</b> .....	<b>52</b>
<b>8 Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>53</b>
<b>9 Seznam obrázků</b> .....	<b>55</b>
<b>10 Seznam tabulek</b> .....	<b>56</b>
<b>11 Seznam použité literatury</b> .....	<b>57</b>

# 1 ÚVOD

Karcinom cervixu je zhoubný nádor děložního hrdla, který je celosvětově čtvrtým nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u žen (*Small et al. 2017*). Globální strategie k eliminaci karcinomu cervixu zahrnuje komplexní přístup k prevenci a léčbě: očkování proti HPV, screening za použití vysoce citlivých testů, efektivní léčbu prekancerózních stavů a účinnou léčbu invazivního karcinomu (*WHO 2019*). Tato diplomová práce se zaměřuje na vývoj kvalitního screeningu. Screeningové testy používané v dnešní době mají svá omezení a k dosažení uspokojivé citlivosti se doporučuje vzájemně je kombinovat (*Bhatla et al. 2018*). Z tohoto důvodu je potřeba vyvinout efektivní diagnostický test, zajišťující dostatečnou citlivost a včasnou detekci počínající kancerogeneze.

Epigenetika je rozvíjející se podobor genetiky zabývající se změnami, které pozitivně či negativně regulují genovou expresi (*Weinhold et al. 2006*). Mezi tyto změny patří negativní posttranskripční genová regulace pomocí mikroRNA (miRNA). Expresní profily miRNA jsou specificky pozměněny u jednotlivých karcinomů (*Alfaro-Mora et al. 2020*). Základní profilování exprese miRNA u karcinomu cervixu může být klinicky významné a relevantní pro vývoj nových diagnostických postupů.

V úvodní části této práce jsou shrnuty základní poznatky o karcinomu cervixu včetně epidemiologie, diagnostiky, prevence a léčby. Dále základní informace o HPV viru a mechanismu působení miRNA. V metodické části je charakterizován výběrový soubor a jsou popsány principy a postupy použitých metod včetně výběru endogenní miRNA kontroly. V rámci této studie se stanovila strategie pro výběr nejvhodnější endogenní kontroly. Na základě výsledků analýzy a statistického vyhodnocení byla vybrána jako endogenní kontrola kombinace miR-423-5p a miR-25-3p. Následně se stanovila relativní exprese vybraných miRNA (miR-10b, miR-145 a miR-182) pomocí kvantitativní real-time PCR a s využitím metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Pomocí statistické analýzy byly porovnány rozdíly exprese miRNA mezi nádorovou a kontrolní skupinou včetně korelace s klinickopatologickými daty pacientek s karcinomem cervixu. V závěru se analyzovala potenciální kombinace markerů, za účelem efektivnější diagnostiky.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Karcinom cervixu

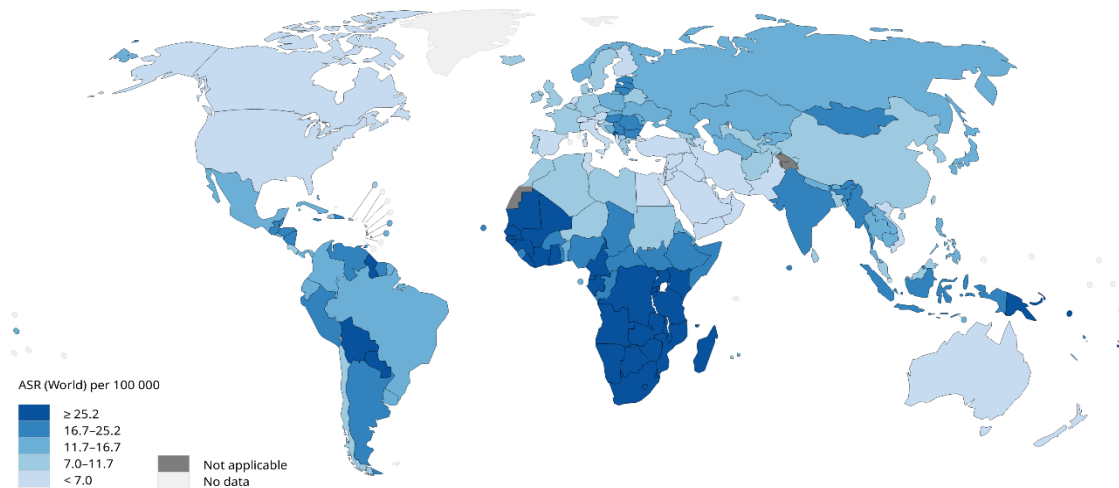
Cervix (děložní hrdlo, děložní krček) je heterogenní orgán nacházející se v koncové části dělohy. Cervix se skládá ze dvou vrstev (ektocervix a endocervix). Ektocervix je vnější část, která tvoří sliznici a je vystlána nekeratinizovaným vrstevnatým dlaždicovitým epitelem. Endocervix je tvořen cylindrickým hlenotvorným epitelem. Cylindrický epitel invaginuje do cervikálního stromatu, čímž se tvoří endocervikální krypty. Tyto krypty procházejí 5-8 mm od povrchu cervixu. Hranice mezi těmito epitelami se nazývá skvamokolumnární junkce (SCJ). Umístění SCJ se mění v závislosti na věku ženy, hormonálním stavu, porodním traumatu a užívání orální antikoncepce (*Grover a Pandey 2017*). Právě v místě SCJ je největší riziko virové neoplastické transformace a onkogenních změn. Karcinomy ektocervixu tvoří přibližně 75 % případů invazivních karcinomů cervixu (spinocelulární karcinom – SCC). Karcinomy vznikající z endocervixu, nejčastěji adenokarcinomy (zhoubný nádor ze žláзовého epitelu), tvoří přibližně 25 % případů invazivních karcinomů cervixu (*Small et al. 2017*). Pro zhoubný novotvar hrdla děložního (*cervicis uteri*) se používá kód diagnózy C53.

Funkcí cervixu je produkce sekretu řízená vysokou koncentrací estrogenu. Tento sekret napomáhá pohybu spermií reprodukčním traktem. Během těhotenství a porodu prochází cervix rozsáhlými změnami. Jde o unikátní chlopeň odpovědnou za udržení plodu uvnitř dělohy až do konce gestace a následný bezpečný průchod plodu během porodu (*Ludmir a Sehdev 2000*).

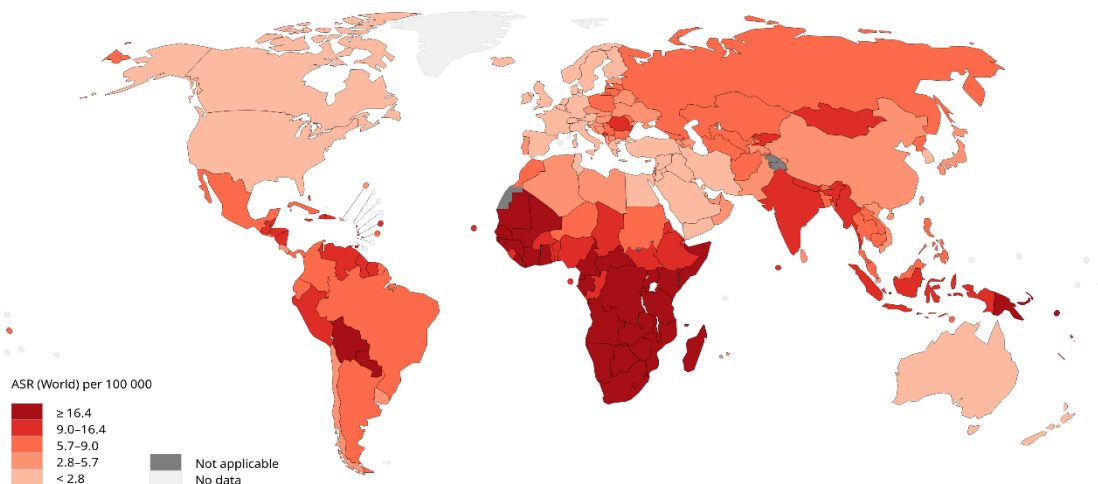
#### 2.1.1 Epidemiologie

Nádorové onemocnění děložního čípku (cervical cancer - CC) je celosvětově čtvrtým nejčastěji diagnostikovaným karcinomem u žen. Jedná se o jednu z hlavních příčin úmrtí na nádorové onemocnění u žen. Podle dat z roku 2020 byla incidence CC 604 tisíc případů (Obrázek 1) a mortalita 342 tisíc případů (Obrázek 2). Nejvyšší míra výskytu je ve střední Africe, jižní Africe a Jižní Americe. Přibližně 85-90 % celosvětových úmrtí na CC se vyskytuje v zaostalých nebo rozvojových zemích a úmrtnost je 18krát vyšší v zemích s nízkými a středními příjmy ve srovnání s bohatšími zeměmi (*Sung et al. 2021; Ferlay et al. 2021*).



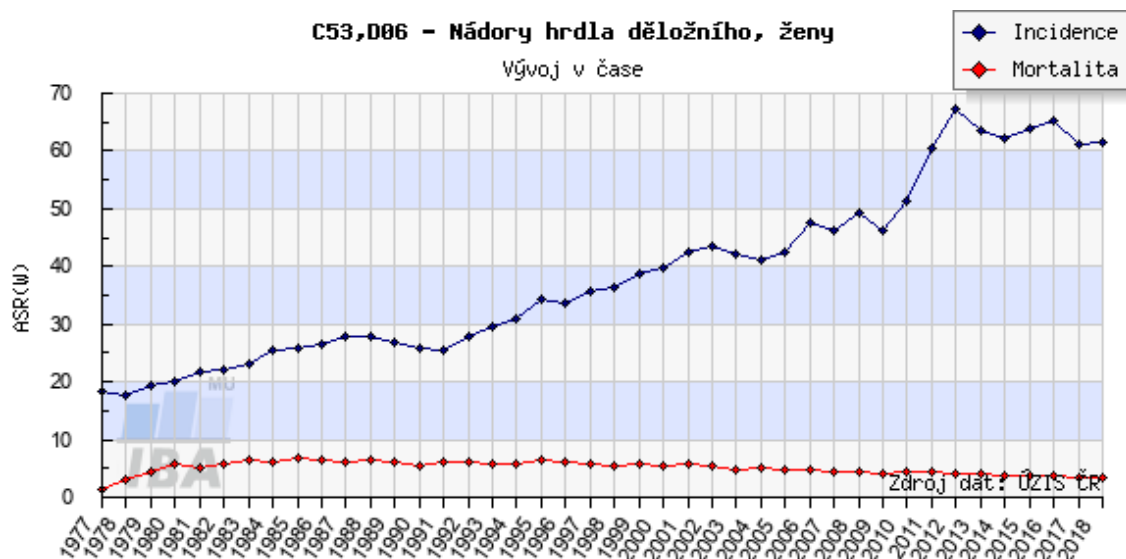


**Obrázek 1.** Celosvětová incidence karcinomu cervixu v roce 2020 (*Globocan 2020*)



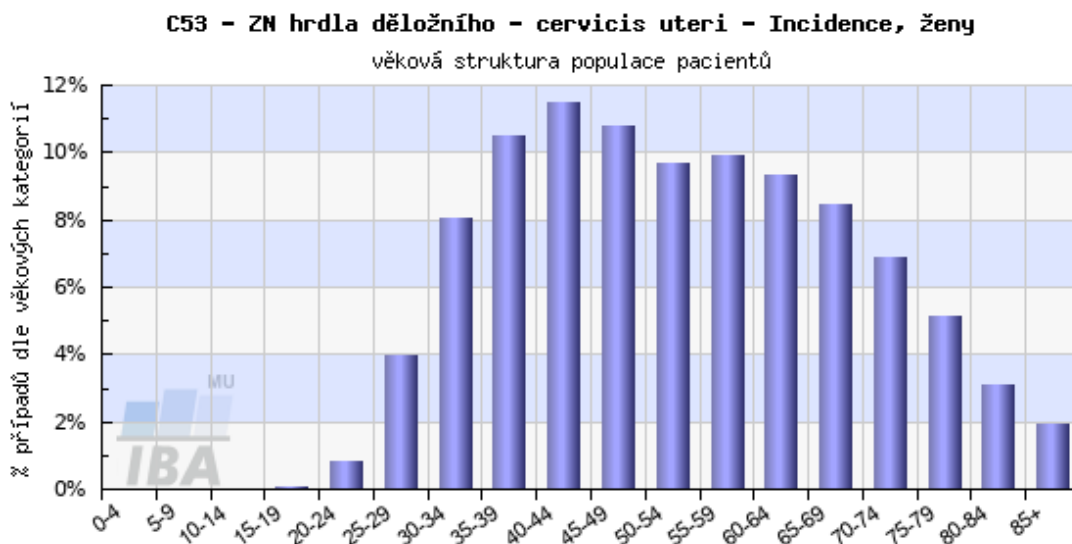
**Obrázek 2.** Celosvětová mortalita karcinomu cervixu v roce 2020 (*Globocan 2020*)

V rámci Evropy je nejvyšší výskyt v Černé hoře, Rumunsku, Srbsku a v Litvě. Naopak nejnižší výskyt CC je v Rakousku, Finsku, Španělsku nebo v Itálii. Rozdíly v incidenci souvisí s rozdílným přístupem k prevenci HPV a odlišným screeningem CC (rozdílná kvalita zdravotní péče). Česká republika patří k zemím s nižší incidencí CC. V roce 2020 bylo diagnostikováno 769 nových případů a zaznamenáno 398 úmrtí na CC (*Sung et al. 2021; Ferlay et al. 2021*). Z grafu (Obrázek 3) můžeme vidět vzrůstající incidenci CC (poslední dostupná data z roku 2018). Rostoucí trend může být způsobený nedostatečnou prevencí např. nízkým povědomím o očkování proti HPV, nepravidelnými preventivními prohlídkami u gynekologa a nedostatečně citlivými screeningovými testy na CC. Od roku 2005 můžeme pozorovat mírný pokles mortality, která je v posledních letech neměnná (*Dušek et al. 2005*).



**Obrázek 3.** Incidence a mortalita CC v České republice, vývoj v čase (Dušek et al. 2005)

Z grafu (Obrázek 4) lze vidět, že nejčastěji diagnostikovanou skupinou jsou ženy ve věku 35 let až 50 let. Vzácně se vyvine u žen mladších 20 let, oproti tomu nad 30 let riziko vzniku CC výrazně stoupá. Obecně incidence CC významně roste s věkem. Více než 20 % případů se vyskytuje u žen starších 65 let (Dušek et al. 2005).



**Obrázek 4.** Věkové rozložení patientek s CC v ČR (Dušek et al. 2005)

### 2.1.2 Rizikové faktory

Existuje několik rizikových faktorů v rozvoji CC: přetrvávající infekce HPV (i jiné pohlavně přenosné infekce; HIV, *Chlamydia trachomatis*), kouření cigaret, imunosuprese, dlouhodobé užívání orální antikoncepce, vysoké parity a časný věk prvního těhotenství, raný věk sexuálního debutu a větší počet sexuálních partnerů. Důležitým rizikovým faktorem je zanedbávání preventivních prohlídek (screening) u gynekologa, protože raná fáze je často asymptomatická (*Small et al. 2017*).

### 2.1.3 Diagnostika

Existuje několik postupů v diagnostice nádorového onemocnění. U většiny typů malignit je biopsie tkáně jediným jistým způsobem, jak lékař (patolog) nádorovou transformaci potvrdí. Při výběru diagnostického testu musí lékař zvážit následující faktory: typ suspektní malignity, symptomy, věk, zdravotní stav, fertilitu a zohlednit již provedené testy (*Marth et al. 2017*). Základem diagnostiky je vyšetření pánve. Pomocí vyšetření zrcátkem se může odhalit viditelná léze. Preventivní screening CC zahrnuje Pap test, který je celosvětovým nejvíce používaným screeningovým testem CC. Jedná se o diagnostický test, při kterém se odebere vzorek buněk z děložního čípku a umístí se na podložní sklíčko. Patolog poté pod mikroskopem analyzuje buňky a hledá abnormálně změněné buňky. Pap test nevykazuje dostatečnou citlivost, pouze okolo 50 %. (*National Cancer Institute 2019*).

Mezi další metody screeningu patří HPV test, který detekuje přítomnost infekce zejména vysoce rizikových typů HPV. Přítomnost rizikových typů HPV potvrzuje přítomnost HPV DNA. Odběr pro HPV test je stejný jako pro Pap test. Průkaz HPV DNA se může provádět různými metodami (*Bhatla a Singhal 2020*). V současné době jsou k dispozici testy hybridizace nukleových kyselin, testy amplifikace signálu a amplifikace nukleových kyselin. Mezi hybridizační testy patří: Southern blotting, In situ hybridization nebo dot blot hybridization. Metody zesílení signálu jsou založené na hybridizaci cílové HPV DNA se značenými sondami RNA v roztoku. Mezi metody amplifikace patří: microarray analýza, real-time PCR, PCR-RFLP, Abbott PCR, sekvenování genomu HPV nebo detekce HPV-mRNA. Testy HPV mRNA detekují expresi onkoproteinů E6/E7, které slouží jako markery virové integrace (*Abreu et al. 2012*). V ČR se od roku 2021 provádí průkaz HPV DNA jako součást preventivních prohlídek u žen ve věku 35 a 45 let, který je hrazený

z veřejného zdravotního pojištění (*Ministerstvo zdravotnictví ČR 2020*). Cervikální screening založený na HPV poskytuje o 40 % vyšší citlivost oproti Pap testu. V dnešní době je doporučeno oba testy kombinovat k dosažení uspokojivé citlivosti (*Marth et al. 2017*).

Významnou roli hrají v diagnostice neinvazivní biomarkery. Primárním cílem je detekce malignity v raných fázích, kdy je léčba nejefektivnější. Jak již bylo zmíněno výše, nejvýznamnějším biomarkerem je průkaz HPV DNA, ale existují i další biomarkery na bázi bílkovin séra. Zvýšené hladiny Antigenů spinocelulárního karcinomu (SCC-Ag) byly detekovány u většiny CC a bylo prokázáno, že souvisí se stádiem onemocnění a velikostí nádoru. Mezi další biomarkery patří např. Sérové fragmenty cytokeratinu (CYFRA), které jsou hlavní složkou cytoskeletu v epitelových buňkách cervixu a mohou být využity pro vyhodnocení stádia onemocnění (*Dasari et al. 2015*).

Většina HPV infekcí spontánně vymizí, ale některé infekce perzistují a vedou k rozvoji malignity. K odlišení těchto dvou fází infekce se využívá detekce metylace regulačních oblastí tumor supresorových genů (*MAL, CADM-1, miR-124-2*). Metylace regulačních oblastí způsobí jejich umlčení a tyto geny ztratí svoji anti-onkogenní funkci. Metylace je detekována pomocí kvantitativní metylačně specifické PCR (*De Strooper et al. 2014*).

Pokud jsou v Pap testu nalezeny abnormální buňky nebo vyjde pozitivní HPV test je provedena kolposkopie. Principem kolposkopie je nanesení slabého roztoku kyseliny octové na děložní hrdlo a poté kontrola kolposkopem (*Marth et al. 2017*). V případě nalezení abnormální oblasti je odebrán malý kousek tkáně (biopsie) k další analýze. Biopsie je většinou provedena v rámci primárního operačního výkonu, při kterém se odstraní abnormální tkáň. Mezi typy primárního operačního výkonu patří: kolposkopická biopsie, endocervikální kyretáž a konizace. V případě potvrzení CC se přistupuje k zobrazovacím metodám: rentgen, CT, MRI a PET sken (*Bhatla et al. 2018*).

### Klasifikace karcinomu CC

Pro určení závažnosti a progresu CC je vytvořen systém, který klasifikuje nádor podle histologického a anatomického rozsahu nádoru. Klasifikace malignit se stále vyvíjí, protože reaguje na vývoj technologií zlepšující diagnostiku a léčbu. Klasifikace by měla být univerzální a aplikovatelná i v zemích s rozdílnou kvalitou zdravotní péče (*Bhatla et*

al. 2018). Jedna z těchto klasifikací je vytvořena *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) a v roce 2018 proběhla poslední revize (Bhatla et al. 2019). Druhou klasifikací je Tumor, Node, Metastasis (TNM). Jedná se o systém vytvořený *The American Joint Committee on Cancer* (AJCC) ve spolupráci s *The Union for International Cancer Control* (UICC). TNM má tři hlavní kategorie. Kategorie T popisuje místo primárního nádoru, kategorie N popisuje rozšíření do lymfatických uzlin a kategorie M popisuje rozšíření nádoru do vzdálených částí těla (metastáze). Fáze TNM úzce odpovídají fázím FIGO, což usnadňuje převod mezi těmito systémy (Knoth et al. 2020; Bhatla et al. 2018). FIGO 2009 nezohledňoval zobrazovací metody a byl založený převážně na klinických aspektech. Z těchto důvodů se upřednostňoval více systém TNM. Po revizi v roce 2018 došlo k zohlednění výsledků zobrazovacích metod a systémy TNM a FIGO jsou si nyní velice podobné. V České republice jsou využívány a kombinovány oba systémy klasifikace (Sehna et al. 2019).

#### 2.1.4 Prevence

Komplexní prevence CC je rozdělena do tří částí: primární (očkování proti HPV infekci), sekundární (screening a léčba prekanceróz) a terciální prevence (diagnostika a léčba invazivního karcinomu děložního čípku). Základem prevence je v první řadě zabránění vzniku prekanceróz a v druhé řadě je jejich případná včasná detekce. Klíčem k prevenci CC je prevence před iniciační infekcí HPV, jelikož na samotnou infekci neexistuje žádný lék (Kessler 2017). Základem prevence infekce je očkování proti HPV. Obecně je očkování doporučeno dívkám a chlapcům ve věku od 9 let (optimálně 12-13 let). Očkování má nejvyšší účinek pro jedince, kteří se s HPV ještě nesečkali (tj. nezačali sexuální život). V současné době jsou k dispozici tři licencované profylaktické vakcíny proti HPV. *Gardasil*<sup>®</sup> je čtyřvalentní vakcína proti HPV, která cílí na HPV6, HPV11, HPV16 a HPV18. *Cervarix*<sup>®</sup>, bivalentní vakcína, účinkující proti HPV16 a HPV18. *Gardasil9*<sup>®</sup> je nonvalentní vakcína proti 9 typům HPV (Lei et al. 2020).

I když je očkování primárně zacíleno na dívky, v posledních letech se zvýšil zájem o očkování chlapců. Je to z toho důvodu, že muži jsou jednak přenašeči infekce HPV, ale zároveň jsou ohroženi sami HPV souvisejícími nemocemi. Onkogenní HPV16 je spojen s jinými anogenitálními malignitami, genitálními bradavicemi nebo s orofaryngeálními karcinomy. Podle současných odhadů až 5,2 % všech malignit

koreluje s infekcí HPV. Očkování obou pohlaví proti CC může vést ke kolektivní imunitě (Stanley 2014; Szarewski 2012).

### 2.1.5 Léčba

U většiny pacientek s časným CC se doporučuje chirurgický zákrok. Využívá se kuželová biopsie, pokud je karcinom v časných stádiích. U mladých pacientek se bere zřetel na zachování plodnosti. Další možností je pánevní radioterapie, brachyterapie popř. disekce pánevních lymfatických uzlin. V pokročilém stádiu je nevyhnutelná chemoterapie. Metastatický CC je považován za nevyléčitelný (Vu et al. 2018).

## 2.2 Kancerogeneze cervixu

Většina případů CC je důsledkem infekce HPV (přibližně u 95 % CC je identifikována HPV DNA). Většina infekcí HPV je přechodná a spontánně odstraněna. V některých případech přetrvávající infekce vede k rozvoji prekancerózy. V prekancerózním stavu dochází ke změně buněk, která zvyšuje pravděpodobnost rozvoje do nádorového stavu. Základním rysem je urychlená buněčná proliferace (vyšší riziko chyby při buněčném dělení). Na rozdíl od nádorových buněk prekancerózní buňky nenapadají blízké tkáně ani se nešíří do vzdálených částí těla. Bez léčby může přechod prekancerózy k invazivnímu karcinomu trvat roky až desetiletí. U 10 % může k tomuto přechodu dojít za méně, jak jeden rok (Small et al. 2017; Schmidt 2019). Prekancerózní léze se dříve rozlišovaly podle závažnosti do tří stupňů označované jako CIN 1, 2, 3 (tj. cervikální intraepiteliální neoplazie). Dnes je doporučována dichotomická diagnostická terminologie SIL (skvamózní intraepiteliální neoplazie). Tento dvoustupňový systém rozlišuje léze na *low - grade SIL* (LSIL) a *high - grade SIL* (HSIL). LSIL odpovídá CIN 1 a HSIL odpovídá kategoriím CIN 2 a 3. V dnešní praxi je zaveden LSIL jako diagnostická kategorie k popisu změn souvisejících s přechodnou infekcí HPV. HSIL se používá ke kategorizaci skutečných prekancerózních lézí. V některých případech se mohou vyskytnout nejednoznačné morfologické znaky (v závislosti na kvalitativních a kvantitativních faktorech), které spadají do kategorie „atypické dlaždicové buňky (ASC)“. Ty jsou dále děleny do dvou kategorií: ASC-US, tj. atypické dlaždicové buňky neurčeného významu; ASC-H, tj. atypické dlaždicové buňky - HSIL nelze vyloučit. Pouze 0,3 – 1,2 % počátečních infekcí prostoupí do invazivního karcinomu (Chen et al. 2010; Alrajjal et al. 2021).

### 2.2.1 HPV

HPV jsou malé (50 nm) dvouvláknové DNA viry patřící do rodiny *Papillomaviridae*. Jsou složené z 8 kbp velkého genomu, který je schovaný uvnitř neobaleného kapsidového proteinu. Genom zahrnuje tři části: a) časné geny (E1, E2, E4, E5, E6, E7), které regulují vegetativní a produktivní fázi virového životního cyklu; b) pozdní geny (L1, L2), které kódují kapsidový protein; c) dlouhá kontrolní oblast (LCR), která se podílí na regulaci virové replikace a transkripce. Je identifikováno více než 200 genotypů lidského a zvířecího papilomaviru. Z HPV, které napadají anogenitální trakt, bylo identifikováno 15 typů HPV označených jako vysoce rizikové (HPV typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82) korelující s invazivním karcinomem. Nejvýznamnějšími typy jsou HPV16 a HPV18, které způsobují přibližně 70 % spinocelulárních karcinomů a 90 % adenokarcinomů. Dále je 11 typů označeno jako nízkorizikové (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 81 a CP6108) a souvisí s genitálními bradavicemi a benigními cervikálními lézemi (*Soto et al. 2017*).

HPV, epiteliotropní virus, infikuje bazální epitelální buňky. Proniká do nich přes mikroskopické rány nebo mikrooděrky (proto další pohlavně přenosné infekce podporují vstup viru do buňky). V prvním kroku dochází ke konformačním změnám kapsidu a receptoru. Počátečními receptory jsou heparan sulfátové proteoglykany, které se nacházejí v extracelulárním matrix. Po úspěšném navázání HPV na receptor, virus proniká do buňky pomocí klatrinu nebo endocytózou (*Senapati et al. 2016*). Poté virový genom prostupuje přes jadernou membránu do jádra. Životní cyklus HPV je úzce spojen se stavem diferenciací stratifikovaného epitelu. Infikované buňky (nesoucí HPV genom) procházejí diferenciací a tím se přepíná také režim replikace virového genomu. Charakteristické je udržování nízkého počtu kopií v dělících se bazálních buňkách, ve kterých jsou exprimovány časné geny HPV. Naopak v terminálně diferencovaných epitelálních buňkách se nachází vysoký počet kopií. V těchto buňkách jsou exprimovány kapsidové proteiny L1 a L2 a dochází ke shromažďování virových částic. Pro další přenos jsou viriony odloučeny od mrtvých dlaždicových buněk hostitelského epitelu. Přechod epitelálních buněk infikovaných HPV k invazivní malignitě je dlouhodobý proces spojený s akumulací změn DNA v genech hostitelských buněk. Tyto změny zahrnují epigenetické i genetické změny v onkogenech a tumor supresorových genech. HPV produkované

virové onkoproteiny E6 a E7 destabilizují tumor supresorové proteiny p53 a retinoblastomový protein (pRb). Inaktivace těchto proteinů narušuje opravné mechanismy DNA a apoptózu, což vede k urychlené proliferaci buněk (*Pyeon et al. 2009*).

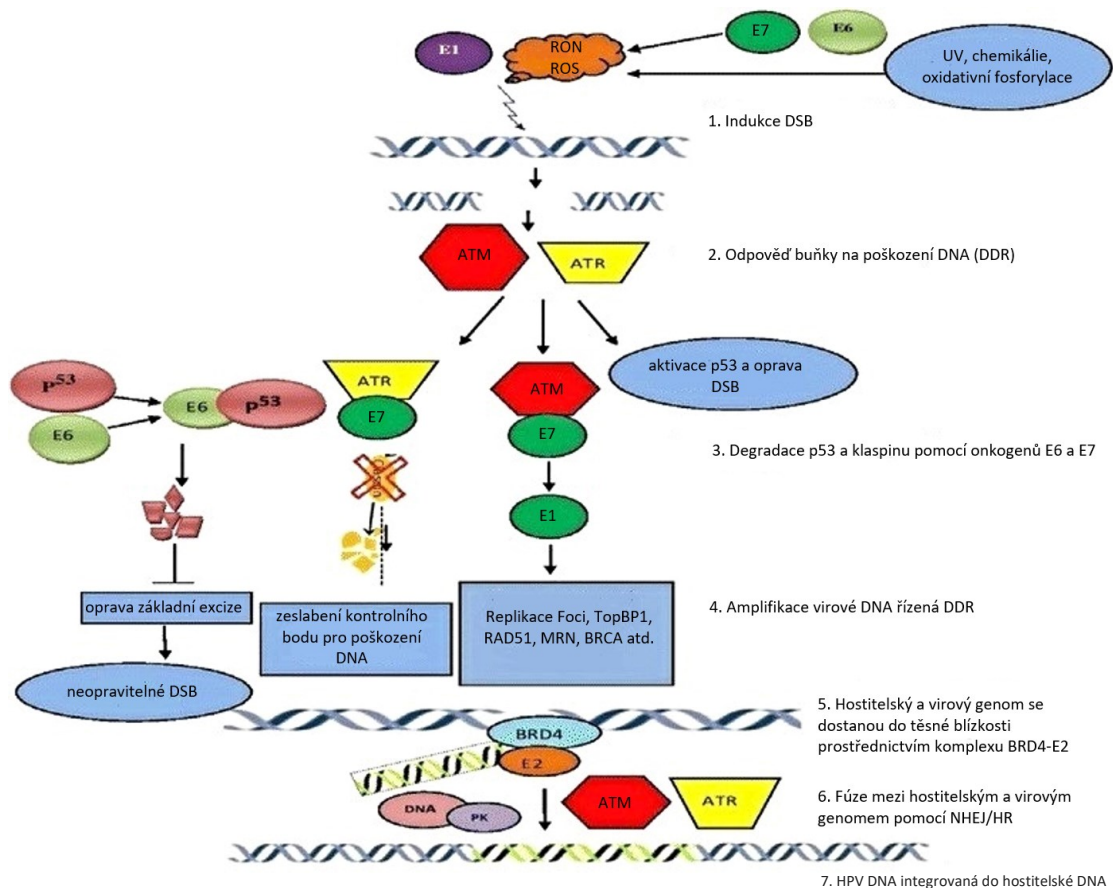
### Integrace HPV

Integrace není součástí normálního životního cyklu HPV, ale u vysoce rizikových typů HPV můžeme pozorovat integraci do lidského genomu. Předpokládá se, že integrace může způsobit progresi z LSIL k HSIL (vhodný biomarker progresu nádorového onemocnění). Retroviry používají k integraci proteinovou integrázu, ale HPV žádný takový to enzym nemá. K integraci dochází v místech, kde se nacházejí chromozomální křehká místa a jsou zde porušeny reparační mechanismy, které opravují poškozenou DNA (DNA damage response – DDR). Poškození DNA je často způsobeno oxidačními molekulami např. reaktivní formy kyslíku a dusíku nebo HPV proteiny E1, E6, E7. Za fyziologických podmínek se v případě poškození DNA kontrolní body aktivují a zastavují buněčný cyklus. Jakmile je poškození DNA opraveno, jsou kontrolní body inaktivovány a buňka se dále dělí. V případě, že nedojde k opravení, buňka přechází do apoptózy. Za patologického stavu dochází k inaktivaci fyziologické apoptózy, což vede k vytvoření míst vhodných pro integraci (Obrázek 5). Předpokladem integrace jsou neopravené body zlomu DNA (*Senapati et al. 2016; Da Silva et al. 2021*).

Virové onkoproteiny (E1, E6, E7) patří mezi molekuly, které poškozují DNA. Onkoprotein E6 narušuje funkci kontrolních bodů buněčného cyklu degradací p53, pRb a inhibicí inhibitorů cyklin dependentní kinázy (Cdk). Onkoprotein E7 tlumí kontrolní body zrychlením proteolytického obratu klaspinu. Klaspin za fyziologických podmínek zajišťuje obnovení kontrolního bodu v G2 fázi buněčného cyklu. Onkoproteiny HPV uvolňují kontrolní body, vyvolávají neplánový vstup do S fáze a podporují prostředí příznivé pro replikaci virového genomu v lidských epiteliálních buňkách (*Senapati et al. 2016*). HPV E1 způsobuje zhroucení replikační vidličky během replikace virového genomu. Vznikají dvouřetězcové zlomy, které mohou být mimo E1 způsobeny i homologní rekombinací. DDR se podílí na udržování dvouřetězcových zlomů virového genomu. HPV DNA často zůstává lineární, což zlepšuje podmínky pro integraci. Pro integraci je nutná blízkost mezi hostitelským a HPV genomem. Během životního



cyklu HPV se genom HPV svazuje k chromatinu hostitele komplexem HPV E2-BRD4 (zajišťuje mechanickou proveditelnost). Proces integrace je dokončen pomocí rekombinačně řízeného opravného mechanismu. Homologní rekombinace (HR) a nehomologické spojování konců (NHEJ) umožní závěrečnou fúzi HPV DNA a hostitelské DNA (Balasubramaniam et al. 2019; Mao et al. 2008). Virové geny E2, E5 a E7 jsou integrací narušeny, a naopak dochází k nadměrné expresi onkogenů E6 a E7. Nadměrná exprese těchto onkogenů vede k deregulaci buněčného cyklu a podporuje několik dalších cest vedoucích ke kancerogenezi. Integrovaná HPV DNA poskytuje buňce výhodu selektivního růstu (i díky ztrátě apoptického proteinu E2). Genomická nestabilita je charakteristickým znakem malignity. Dochází k častým mutagenézím v místě integrace a v blízkosti HPV integrátu. Integrace ovlivňuje genom hostitele amplifikací onkogenů a narušením tumor supresorových genů, jakož i řízením inter a intra chromozomálních přesmyků (Pyeon et al. 2009).



**Obrázek 5.** Model integrace virové DNA (HPV) do hostitelského genomu

(podle Senapati et al. 2016)

## 2.3 Epigenetika

Zdraví člověka je podmíněno genetickými vlivy a vlivy vnějšího prostředí. Chování, strava, fyzická aktivita a prostředí hrají stejně důležitou roli ve zdraví člověka jako geny. Epigenetika studuje mechanismy, které regulují expresi genů. Genová exprese udává, kdy a za jakých podmínek bude probíhat translace mRNA na výsledné proteiny. Na rozdíl od genetických změn jsou epigenetické změny reverzibilní a nemění sekvenci DNA. Některé epigenetické změny jsou v určitých oblastech genomu stabilní a mohou být předávány z jedné generace na druhou (*Topper et al. 2020; Longo a Bates 2020*). Epigenetické změny zahrnují metylaci DNA, kovalentní modifikaci histonů a posttranskripční modifikaci pomocí miRNA.

Metylace je chemická modifikace DNA, při které je připojena metylová skupina (ze substrátu *S-adenozyl-methionin*) na pozici C5 cytosinu za vzniku *5-metylcytosinu*. Tato reakce je katalyzována skupinou enzymů - *DNA methyltransferáz* (DNMT). Tyto modifikované cytosinové zbytky obvykle leží vedle guaninové báze (CpG metylace). Metylace vede k potlačení genové exprese daného genu, což může mít za následek umlčení tumor supresorových genů (*Moore et al. 2013*).

Další zmíněnou epigenetickou změnou je modifikace histonů. Histony jsou proteiny, které kondenzují a balí DNA do struktury zvané nukleozom. Modifikace těchto proteinů ovlivňuje procesy v buňce včetně aktivace/inaktivace transkripce. Mezi tyto modifikace patří acetylace, metylace, fosforylace a další. Například acetylace přidává negativní náboj lysinovým zbytkům na N-konec histonu, který vyčnívá z nukleozomu. Negativní náboj odpuzuje negativně nabitou DNA, což má za následek uvolněnou strukturu chromatinu. Otevřená konformace chromatinu umožňuje vazbu transkripčního faktoru a iniciaci transkripce (*Audia et Campbell 2016*).

### 2.3.1 mikroRNA

miRNA jsou nekódující RNA s průměrnou délkou 22 nukleotidů. miRNA jsou negativními posttranskripčními regulátory genové exprese. První miRNA byla objevena u *Caenorhabditis elegans* v roce 1993 (*Lee et al. 1993*). První lidská miRNA byla objevena v roce 2000 (*Pasquinelli et al. 2000*) a v současné době je identifikováno více než 2 500 lidských miRNA (*miRBase 2018*). Jsou významnými regulátory různých buněčných procesů, včetně buněčného růstu, diferenciaci, vývoje a apoptózy. Jeden

z mechanismů, který je zodpovědný za patologické procesy lidských chorob, včetně nádorových onemocnění, je pozměněná genová exprese. V roce 2002 byla poprvé objevena miRNA (miR-122) spojená s nádorovým onemocněním (*Calin et al. 2002*). Deregulace miRNA narušuje expresi onkogenních nebo onkosupresorových genů, což se významně podílí na kancerogenezi (*Bartel 2004*). Odhaduje se, že miRNA regulují expresi přibližně jedné třetiny genů kódujících proteiny. Jsou považovány jak za cíle epigenetických změn (např. metylace), tak za regulátory modifikátorů epigenetiky (např. DNMT). Molekuly prekurzorů miRNA procházejí jadernými a cytoplazmatickými procesy zpracování za vzniku zralých miRNA. Jediný gen miRNA může generovat více izoformamiRNA tzv. izomiRs (*Wahid et al. 2010; Saliminejad et al. 2019*).

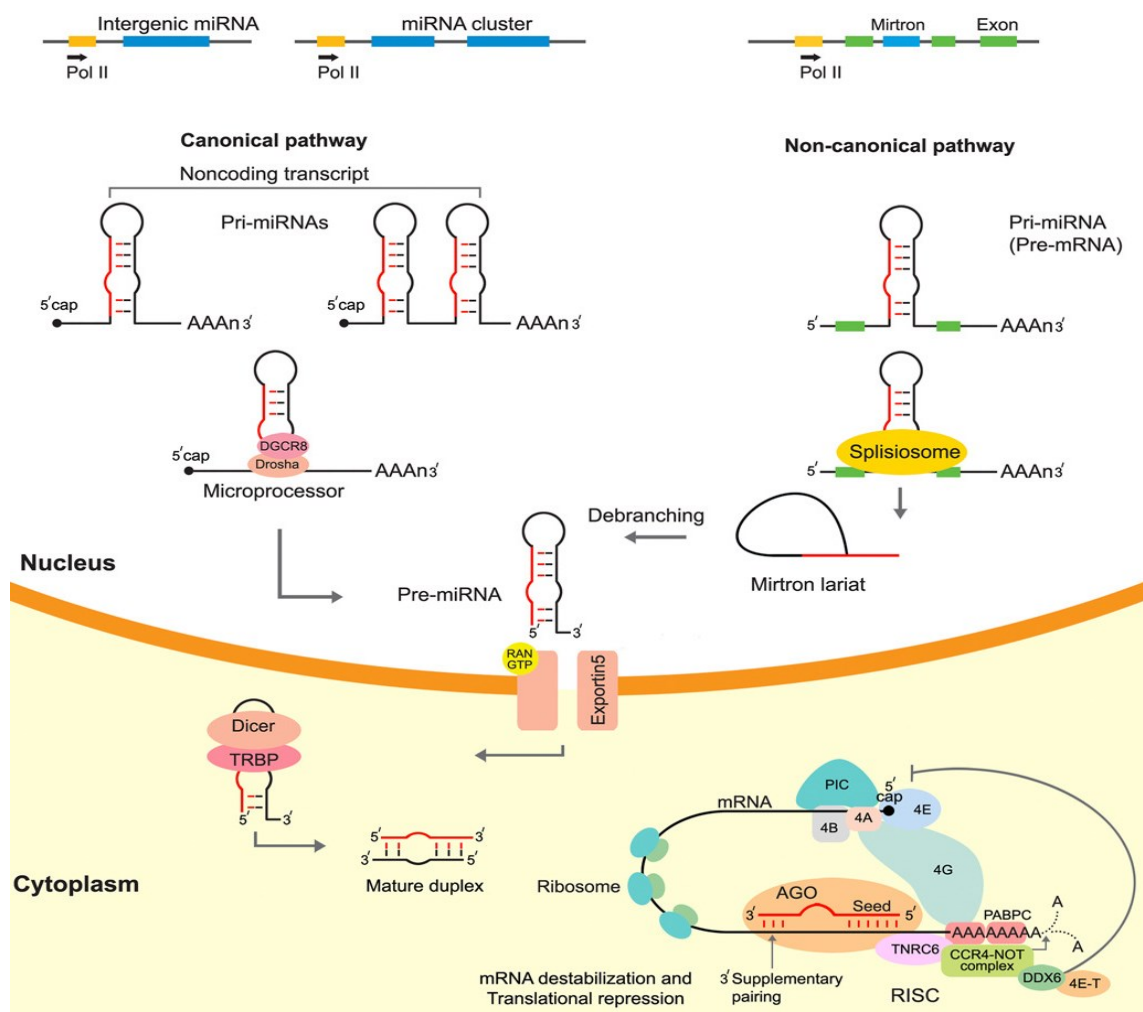
## Biogeneze

Většina zralých sekvencí miRNA se nachází v intronech nebo v exonech nekódujících RNA a v intronech pre-mRNA. Většina genů miRNA je transkribována RNA polymerázou II a zbytek je přepsán RNA polymerázou III. Transkripce vzniká velká primární miRNA (pri-miRNA), která obsahuje jednu nebo více vlásenkových struktur (*O'Brien et al. 2018*).

### Kanonická cesta biogeneze miRNA (Obrázek 6)

Intergenní miRNA jsou spolu se svými promotory nezávisle transkribovány. Alternativně mají některé z nich společný promotor se svými hostitelskými geny. Všechny kanonické pri-miRNA mají na 5'konci guanidinovou čepičku, ale nemusí mít na 3'konci polyadenylační signál (*Wahid et al. 2010*). V jádře se pri-miRNA štěpí na přibližně 70 nukleotidové fragmenty s kmenovou vlásenkou zvané pre-miRNA. Tento proces zajišťuje mikroprocesorový komplex složený z DROSHA a DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8). DROSHA je ribonukleáza III, která je specifická pro dvouvláknovou RNA a je schopna rozpoznat pri-miRNA. DGCR8 funguje jako nekatalytická podjednotka komplexu, která vyhledává místo sestřihu (*Kim et al. 2018; Dexheimer a Cochella 2020*). Pre-miRNA je následně transportována pomocí Exportinu 5 a RAN (Ras-related nuclear protein) vázající GTP do cytoplazmy. Zde jsou pre-miRNA v blízkosti vlásenky štěpeny na malé dsRNA. Toto štěpení je zprostředkováno enzymem DICER, který je spojen s TAR RNA vazebným proteinem (TRBP). Tato dsRNA se skládá z jednoho vedoucího řetězce a „passenger“ řetězce. Druhý řetězec je později degradován, zatímco vedoucí řetězec se účastní umlčování mRNA (*Valencia-Sanchez et al. 2006; Xu et al. 2016*). miRNA je vložena

do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex). Komplex RISC se skládá z mnoha proteinů včetně proteinu AGO2. RISC zprostředkovává rozpoznání cílové mRNA. Rozpoznání cíle je primárně umožněno párováním bází mezi „seed“ sekvencí miRNA a 3'UTR oblasti cílových mRNA. Stupeň komplementarity miRNA-mRNA je hlavní determinantou procesu regulačního mechanismu. Vysoký stupeň komplementarity umožňuje degradaci cílové mRNA mechanismem štěpení pomocí endonukleázy AGO2. Plná komplementarita není u savců příliš častá. Nedostatečná komplementarita brání aktivitě AGO2, a proto usnadňuje translační represivní mechanismus zprostředkovaný RISC. Jelikož dochází k neúplnému párování, vznikají v duplexu vlásenky a výdutě. Také po interakci miRNA:mRNA dochází k poly(A)deadenylaci a decappingu cílové mRNA. Tím se zabraňuje navázání podjednotky ribozomu a translace mRNA nemůže proběhnout (Ha et al. 2014; Cai et al. 2009).



Obrázek 6. Přehled biogeneze miRNA (Saliminejad et al. 2019)

### Nekanonická cesta biogeneze miRNA (Obrázek 6)

Kromě výše uvedeného mechanismu biogeneze existují i další alternativní cesty. Nekanonická cesta biogeneze obchází několik kroků kanonické dráhy. Nekanonická dráha nemusí být závislá na DROSHA/DGCR8 a DICER. Touto cestou mohou vznikat miRNA různého původu: z mirtronů, snoRNA, tRNA. Například mirtronová dráha nepotřebuje komplex DROSHA/DGCR8 v jádře. Krátké introny o velikosti pre-miRNA jsou zpracovány spliceosomy a odvětovacími enzymy v jádře, aby se vytvořily miRNA vlásenky přímo vhodné pro Dicer štěpení. Tato vlásenka je pak exportována do cytoplazmy pomocí Exportinu-5, aby byla štěpena Dicerem. Dráha mirtronu obchází mikroprocesorové zpracování a nahrazuje ho sestřihovou aktivitou. Poté se dráha spojuje s kanonickou dráhou a probíhá stejně (*Wahid et al. 2010; O'Brien et al. 2018*).

### miRNA a kancerogeneze

Deregulované miRNA u kancerogeneze se rozdělují na onkogenní (onkomiR) a tumor supresorové miRNA. OnkomiR mají zvýšenou expresi a tím utlumují své cílové tumor supresorové geny. Naproti tomu tumor supresorové miRNA mají sníženou expresi a v důsledku toho jsou jejich cílové onkogeny nadměrně exprimovány. Některé miRNA mohou fungovat jako onkogenní a zároveň tumor supresorové (*Saliminejad et al. 2019*).

### 2.3.2 Epigenetické změny u karcinomu cervixu

S progresí karcinomů cervixu nepochybně souvisí genetické změny, jako jsou mutace, delecce, aberace počtu kopií a chromozomální přestavby. Stejně velký vliv mají i epigenetické změny v HPV genomu a v genomu hostitelské buňky. Nejrozsáhleji studovanou epigenetickou změnou je metylace DNA (*Soto et al. 2017*). Během infekce HPV může docházet k metylaci pozdních virových genů L1, L2 a podpoře perzistence HPV. Perzistence HPV následně podporuje metylaci buněčné DNA a vede k transformaci infikované buňky. Hypermetylace LCR virového genomu blokuje vazebné místo virového proteinu E2. Integrace virové DNA do buněčného genomu má za následek rupturu, přerušení produkce a funkce E2. E2 reguluje funkci exprese virových onkogenů E6 a E7 za fyziologických podmínek (*Dueñas-González et al. 2005*). E6 a E7 zvyšují expresi a aktivitu DNMT1. E6 degraduje p53, který za fyziologických podmínek negativně

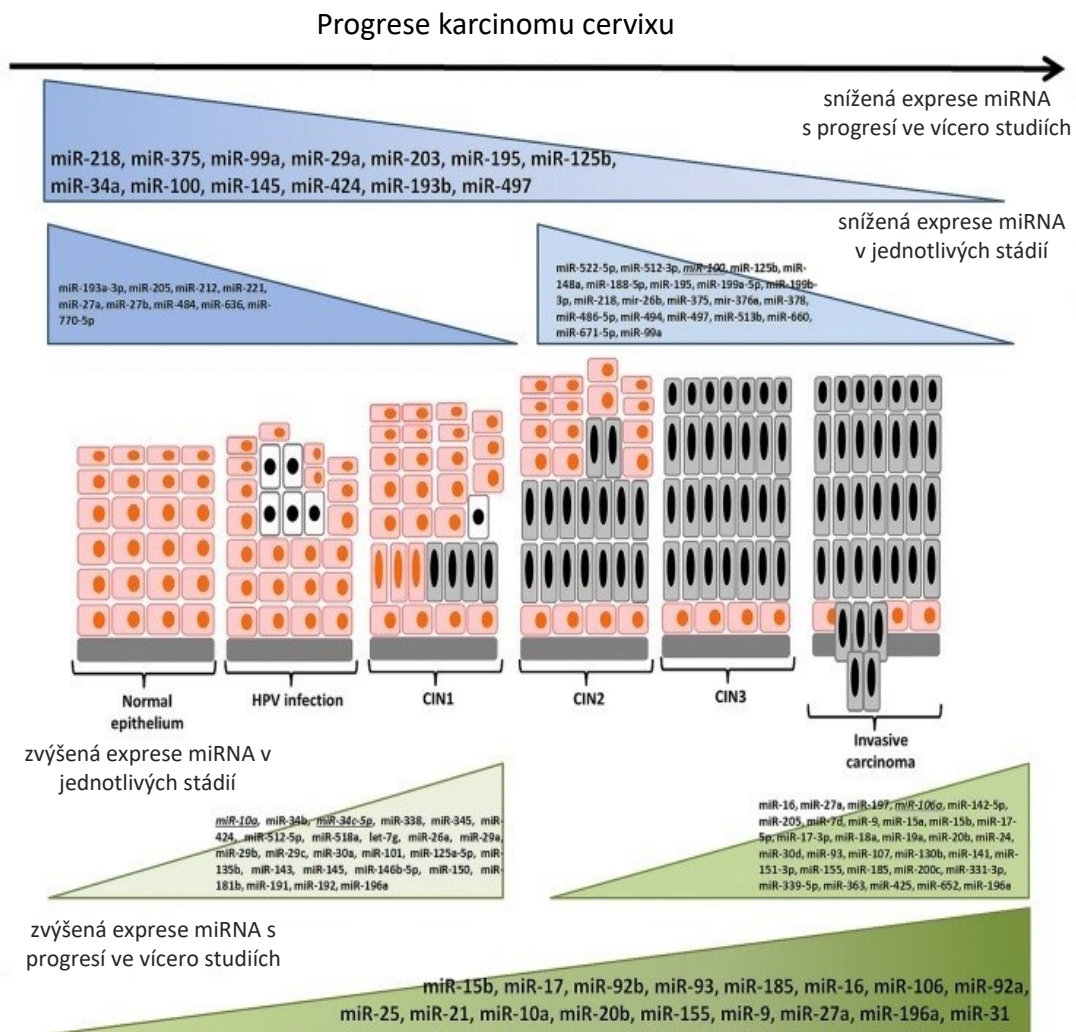
reguluje expresi DNMT1. p53 se váže ke specifickému proteinu 1 a k proteinům remodelujících chromatin. Tento komplex se následně váže na promotorovou oblast DNMT1. Modulace exprese DNMT1 pomocí E7 může probíhat dvěma různými způsoby. První možností je přímé navázání E7 na DNMT1, čímž indukuje konformační změnu v DNMT1, odhaluje jeho aktivní místo a podporuje vazbu DNMT1 na DNA. Druhá možnost je nepřímá modulace prostřednictvím vazby E7 na pRb, která uvolní transkripční faktor E2F, a to má za následek regulaci aktivity promotoru DNMT1 (*Da Silva et al. 2021; Jiménez-Wences et al. 2014*). Schopnost HPV udržovat přetrvávající infekci závisí na mechanismu úniku před imunitní odpovědí hostitele. E7 přímo inhibuje imunitní odpověď hostitele narušením signálních drah interferonu a zraní T-lymfocytů. Ke snížení imunitní odpovědi také přispívá hypermetylace MHC-1 a podjednotky HLA - E pomocí E7 (*Fang et al. 2014*).

Virové proteiny E6 a E7 mohou změnit strukturu chromatinu úpravou enzymatické aktivity nebo změnou exprese enzymů remodelujících chromatin (např. narušení rovnováhy *histondeacetylázy* a *acetyltransferázy*). Studie prokázaly přítomnost acetylovaných histonů H3 a H4 a demetylaci lysinu 4 na histonu H3 v časných a pozdních promotorech HPV. Acetylace a demetylace histonů se během diferenciacce zvyšuje (*Da Silva et al. 2021*). Proto inhibice histondeacetylázy se tak stala slibným přístupem v terapii karcinomů (*Feng et al. 2013*).

#### mikroRNA u karcinomu cervixu

Expresce miRNA hostitele je pozměněna v přítomnosti HPV DNA v tkáních CC. Onkoproteiny HPV přímo nebo nepřímo modulují expresi mnoha hostitelských miRNA a nakonec vedou k progresi onemocnění (*Soto et al. 2017*). HPV kódují i své vlastní miRNA. Jejich role není zcela objasněna, ale algoritmus pro predikci cíle naznačuje, že regulují vlastní HPV genom i určité cíle na hostitelském genomu (*Qian et al 2013*). Studie *Si et al. 2007* prokázala, že miR-21 je nadměrně exprimována u karcinomu prsu a pozdější studie (*Xu et al. 2015*) potvrdily, že miR-21 je nejčastěji nadměrně exprimována miRNA u mnoha typů malignit včetně CC. miR-21 cílí na apoptózu a její nadměrná exprese podporuje buněčnou proliferaci a může způsobit invazi CC prostřednictvím inhibice fosfatázy a tensinového homologu. Chemokinový ligand 20 je cílovým genem miR-21 a jeho hladina souvisí se stádiem diferenciacce nádoru. Jeho

hladina se postupně zvyšuje od normálních buněk, přes cervicitidu až k SCC. Také zvýšené hladiny miR-21 korelují se zvýšenou expresí IL-6, takže je pravděpodobně zapojen i do zánětlivých procesů. V imunitní odpovědi a zánětu jsou kromě miR-21 významné např.: miR-125b, miR-155 a miR-146a. Bylo prokázáno, že miR-125b může působit jako onkogenní i onkosupresorová miRNA (dva odlišné mechanismy). miR-125b má homologii pro HPV L2, takže v rámci časně infekce může inhibovat HPV replikaci a podpořit jeho eliminaci imunitním systémem. Na druhou stranu může také inaktivovat p53, čímž udržuje životaschopnost buněk s virovými genomy. Tato inaktivace může vést ke zvýšenému riziku integrace HPV genomu a rozvoji neoplastické léze (Cui et al. 2012). Pardini et al. 2018 provedli rozsáhlý přehled studií zkoumající expresi miRNA ve vztahu k progresi CC (Obrázek 7).



**Obrázek 7.** Souhrn deregulovaných miRNA s progresí u CC podle Pardini et al. 2018

Ve studii *Wang et al. 2014* bylo identifikováno 13 miRNA, které jsou regulovány vysoce rizikovými kmeny HPV 16 a HPV 18. miR-16, miR-25, miR-92a, miR-378 měly zvýšenou expresi, zatímco miR-22, miR-27a, miR-29a a miR-100 měly sníženou expresi. Kromě toho z analýzy vzorků tkáně bylo prokázáno, že miR-25, miR-92a a miR-378 mají zvyšující se expresi s progresí CC buněk. Dále miR-29a potlačuje nádorovou transformaci a je zaměřena na protein tepelného šoku 47 (HSP47). Dochází k umlčení HSP47, což způsobí buněčnou migraci a aktivaci invaze. miR-29 také inhibuje progresi buněčného cyklu a apoptózy vlivem maligní transformace HPV (*Yamamoto et al. 2013*).

*The Cancer Genome Atlas (TCGA)* je projekt jehož cílem je objevit hlavní genomické změny způsobující nádorové transformace a vytvořit komplexní atlas genomických profilů malignit. TCGA v současné době obsahuje více než 2,5 petabajtů dat s údaji o 33 různých typech malignit od více než 11 000 pacientů. V roce 2017 Výzkumná síť TCGA provedla rozsáhlou integrovanou genomickou a molekulární charakterizaci karcinomu cervixu (*TCGA 2017*). Detekovali rozdílnou expresi u miR-944, miR-767 a miR-105 mezi HPV-pozitivními a HPV-negativními vzorky. miR-375 měla významně sníženou expresi u HPV16 pozitivních vzorků ve srovnání s HPV18 pozitivních vzorků. miR-200a a miR-200b negativně korelovaly se skórem epitelo-mezenchymálního přechodu.

Na základě předchozí literární rešerše jsou miRNA vhodnými kandidáty na diagnostický marker karcinomu cervixu.



### 3 CÍLE PRÁCE

Pro tuto práci byly stanoveny následující cíle:

1. Najít optimální endogenní kontrolu pro kvantifikaci mikroRNA u karcinomu cervixu.
2. Stanovit relativní expresi vybraných mikroRNA u nádorové skupiny karcinomu cervixu a kontrolní skupiny.
3. Na základě statistické analýzy a porovnání dat nádorové a kontrolní skupiny identifikovat mikroRNA s významně rozdílnou expresí u karcinomu cervixu.
4. Zjistit případnou statisticky významnou korelaci exprese vybraných mikroRNA s klinickopatologickými daty.

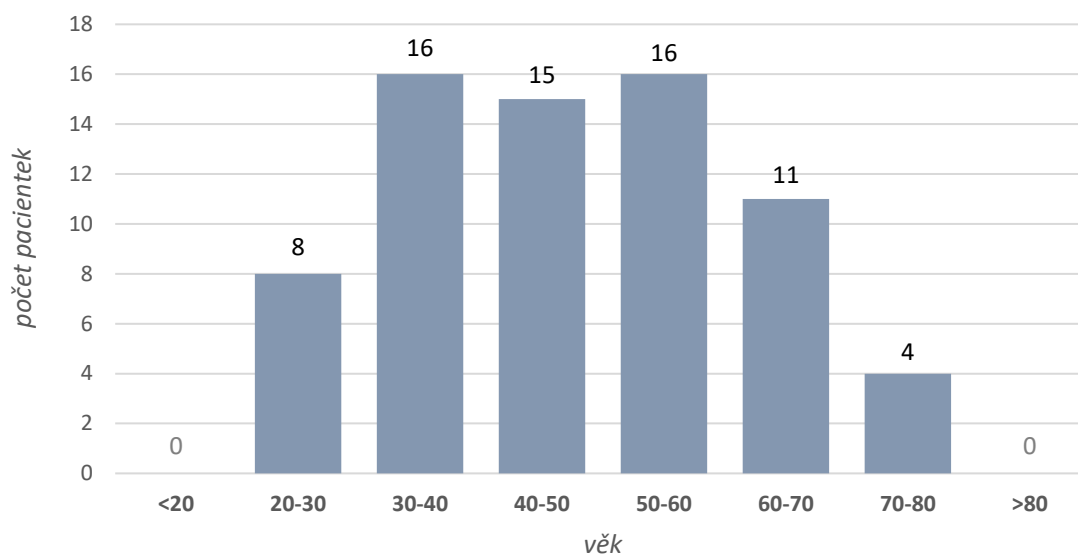
## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Výběrový soubor

Analyzovaný výběrový soubor obsahoval vzorky tkáně cervixu fixované ve formalínu a zalité v parafínu (Formalin-fixed, Paraffin-embedded - FFPE) od 70 pacientek s CC a 30 pacientek bez maligní diagnózy jako kontrolního souboru. Všechny maligní vzorky byly histologicky klasifikovány jako karcinom dlaždicových buněk (SCC). FFPE tkáně byly získány z archivu Fingerlandova ústavu patologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Od Etické komise Fakultní nemocnice v Hradci Králové bylo získáno etické schválení s projektem (číslo jednací: 202112 P02). Všechny vzorky FFPE tkáně CC byly odebrány v letech 2010-2020. U pacientek byly zaznamenány následující údaje: věk, typ vzorku, HPV typ, velikost karcinomu, *grading*, vaskulární invaze, perineurální šíření, přítomnost prekancerózy, popř. typ prekancerózy, resekcční okraj, rozsah CC podle klasifikace TNM a FIGO 2018 (Tabulka 1). Všechny vzorky byly zkontrolovány a klasifikovány podle aktuální WHO klasifikace zkušeným patologem (prof. MUDr. Jan Laco, Ph.D.). *Grading* (histogický grade) se rozdělil na jednotlivé stupně: G1 dobře diferencovaný, G2 středně diferencovaný a G3 špatně diferencovaný karcinom. V rámci HPV testu byl nejčastěji detekován HPV typ 16, což potvrzuje jeho zařazení mezi vysoce rizikové typy HPV. Klasifikace podle FIGO 2018 je rozdělena do tří základních skupin: stupeň I (karcinom je omezen na orgán původu), stupeň II (invaze okolních orgánů nebo tkáně) a stupeň III (šíření do vzdálených uzlin nebo tkáně v pánvi). V rámci klasifikace TNM jsou popsány pouze parametry T (T1/T2 rozlišují velikost nádoru) a parametr N (N<sub>x</sub> – lymfatické uzliny nelze hodnotit, N0 – žádné metastáze do regionálních uzlin a N1 – přítomna metastáze regionálních uzlin). Celkem 26 vzorků bylo odebráno při konizaci a 44 vzorků při hysterektomii. Věk pacientek byl rozdělen na tři skupiny: do 30 let, 30 až 60 let a nad 60 let. Věkové rozdělení pacientek je poměrně rovnoměrné a nejvíce postiženou skupinou jsou ženy ve věku 35 až 65 let. Věkový medián je 47 let (Obrázek 8).

**Tabulka 1.** Klinickopatologická data pacientek s CC

Klinickopatologická data		N	Počet pacientek		
Věk	< 30	70	8		
	30 - 60		47		
	> 60		15		
Grading	G1	70	3		
	G2		51		
	G3		16		
Prekanceróza	ANO	70	59		
	NE		11		
Typ prekancerózy	LSIL	59	2		
	HSIL		57		
Typ vzorku	Konizát	70	26		
	Hysterektomie		44		
Vaskulární invaze	ANO	70	43		
	NE		27		
Perineurální šíření	ANO	70	6		
	NE		64		
Resekční okraj	Pozitivní	69	14		
	Negativní		55		
FIGO 2018	I	70	A1	9	
			A2	9	
			B1	21	
			B2	14	
	B3		4		
	II		A1	2	
			B	5	
	III		B	2	
			C1	3	
			C2	1	
TNM	T1	70	T1a1	5	
			T1a2	2	
			T1b1	49	
			T1b2	4	
			T2	T2a1	2
				T2b	8
	Nx		70	20	
	N0			46	
	N1			4	



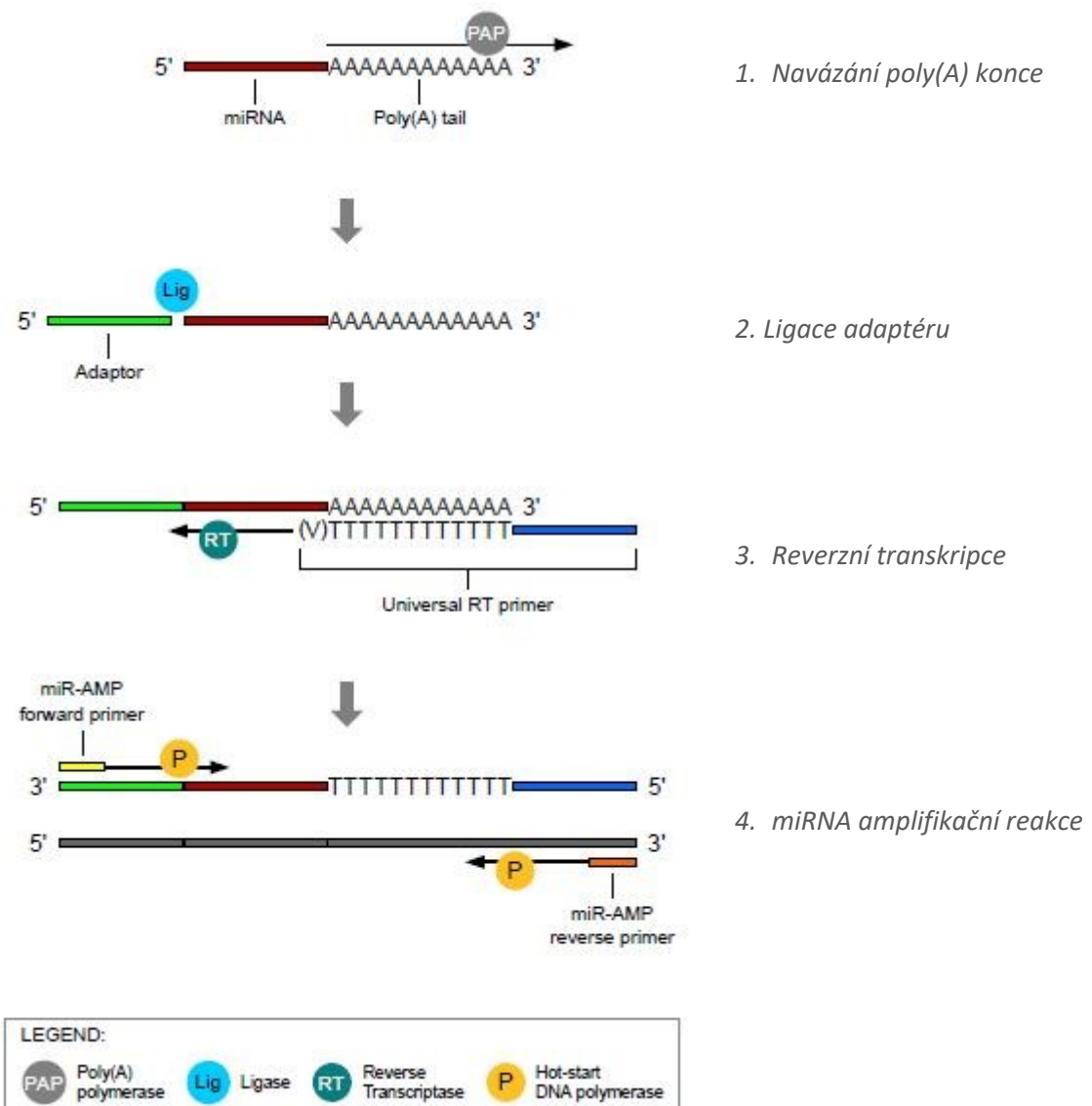
**Obrázek 8.** Věkové rozložení pacientek s CC

## 4.2 RNA extrakce a reverzní transkripce

Z FFPE bločků karcinomu cervixu byly nařezány tenké ruličky o tloušťce cca 4-5  $\mu\text{m}$ . Zhruba 4-6 těchto ruliček bylo následně deparafinizováno pomocí xylenu a přečištěno 96 % etanolem. Pomocí komerčního kitu *FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek, Thorold, Canada)* byla vyizolována celková RNA (včetně miRNA). Purifikace tohoto kitu je založena na kolonkové chromatografii s použitím speciální pryskyřice jako separační matrice (patentováno *Norgen Biotek*). Tato pryskyřice váže nukleové kyseliny na základě iontové koncentrace. RNA se naváže na kolonku a kontaminanty jsou odmyty. Izolace celkové RNA byla provedena podle protokolu výrobce. Do izolace RNA byl zařazen volitelný krok eliminující kontaminaci genomové DNA pomocí *DNázy I* (provedeno podle protokolu výrobce v příloze). Extrahovaná RNA byla eluována 30  $\mu\text{l}$  *RNase-free* vody. Vzorky byly poté skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . RNA se purifikovala bez použití fenolu a chloroformu.

Koncentrace a čistota vyizolované celkové RNA byla měřena na spektrofotometru *DS-11 FX Spektrofotometr/Fluorometr DeNovix* měřením optické hustoty při 260 nm a 280 nm (včetně poměru  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$ ). Poté byla naředěna na koncentraci 4,5 - 5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Následně byla RNA přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Pro reverzní transkripci byl využit *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific,*

Waltham, MA, USA). Vstupní množství RNA do reverzní transkripce bylo 2 µl tj. 9 – 10 ng. Tento kit je navržen pro detekci a kvantifikaci zralých miRNA v biologických vzorcích. V první fázi jsou zralé miRNA z celkové RNA modifikovány: prodloužení 3' konce přidáním poly(A) konce a prodloužení 5' konce ligací adaptéru. Poté jsou modifikované miRNA reverzně transkribovány a následně amplifikovány pro rovnoměrné zvýšení množství cDNA všech miRNA (Obrázek 9). Tento postup byl proveden podle návodu výrobce. Amplifikovaná cDNA byla následně 10x ředěna 0,1M TE puforem.



**Obrázek 9.** Příprava cDNA templátu (podle *ThermoFisher Scientific UserGuide, 2022*)

### 4.3 Stanovení relativní exprese

Na výše zmíněných řaděných cDNA vzorcích byla stanovena relativní exprese vybraných miRNA. Pro stanovení rozdílů v expresi jednotlivých miRNA v nádorové tkáni oproti kontrolní skupině byla použita metoda real-time PCR. Pro správné stanovení relativní exprese je nutné vybrat vhodnou endogenní kontrolu, na kterou jsou získaná data normalizována. Endogenní kontrola slouží pro korekci systematických proměnných, jako jsou rozdíly v množství výchozího templátu, kvalitě RNA, přítomnosti inhibitoru a v enzymatické účinnosti. Endogenní kontrola by měla vykazovat stabilní expresi napříč testovaných vzorků v daném typu tkáně včetně kontrol. Také je doporučeno, aby patřila do stejné třídy RNA jako cílové geny, tj. do třídy miRNA (*Das et al. 2016*). Standardně používané endogenní kontroly nejsou konstitutivně exprimovány ve všech typech buněk a za určených experimentálních podmínek. Z tohoto důvodu musí být stabilita endogenní kontroly ověřena před každým experimentem.

Pro výběr endogenní kontroly byla vytvořena směs testovaných vzorků a směs kontrolních vzorků. Pro prvotní orientační analýzu real-time PCR byla použita mikrofluidní karta *TaqMan™ Advanced miRNA Human Endogenous Control (ThermoFisher Scientific)*. Jedná se o mikrofluidní kartu s 384 jamkami obsahujícími 30 potenciálních endogenních miRNA (v triplicátech). Pro normalizaci vstupního množství vzorku jsou zahrnuty i dvě exogenní kontroly (cel-miR-39-3p a ath-miR-159a). Pro analýzu byl použit *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific)* s využitím přístroje ABI PRISM 7900HT (*ThermoFisher Scientific*). Pro primární analýzu dat byl využit *Thermo Fisher Connect Platform (ThermoFisher Scientific)*. Jedná se o webové uživatelské rozhraní pro analýzu, spravování a ukládání dat. Zpracovaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí webového komplexního nástroje *RefFinder (Xie et al. 2012)*. Je to nástroj vyvinutý pro hodnocení a identifikaci referenčních genů z rozsáhlých experimentálních datových souborů. Pro hodnocení a porovnání testovaných kandidátských referenčních genů využívá výpočetní programy: *NormFinder (Andersen, Jensen et Ørntoft 2004)*, *BestKeeper (Pfaffl et al. 2004)*, *geNorm (Vandesompele et al. 2002)* a *Delta Ct (Silver et al. 2006)*. Na základě algoritmu každého programu přiřadí jednotlivým genům relativní hodnotu (odrážející genovou stabilitu v testovaných vzorcích) a následně vypočítá geometrický průměr pro celkové konečné

pořadí. Z testovaných endogenních miRNA byly na základě analýzy vybrány čtyři miRNA s nejstabilnější expresí: miR-25-3p, miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-484.

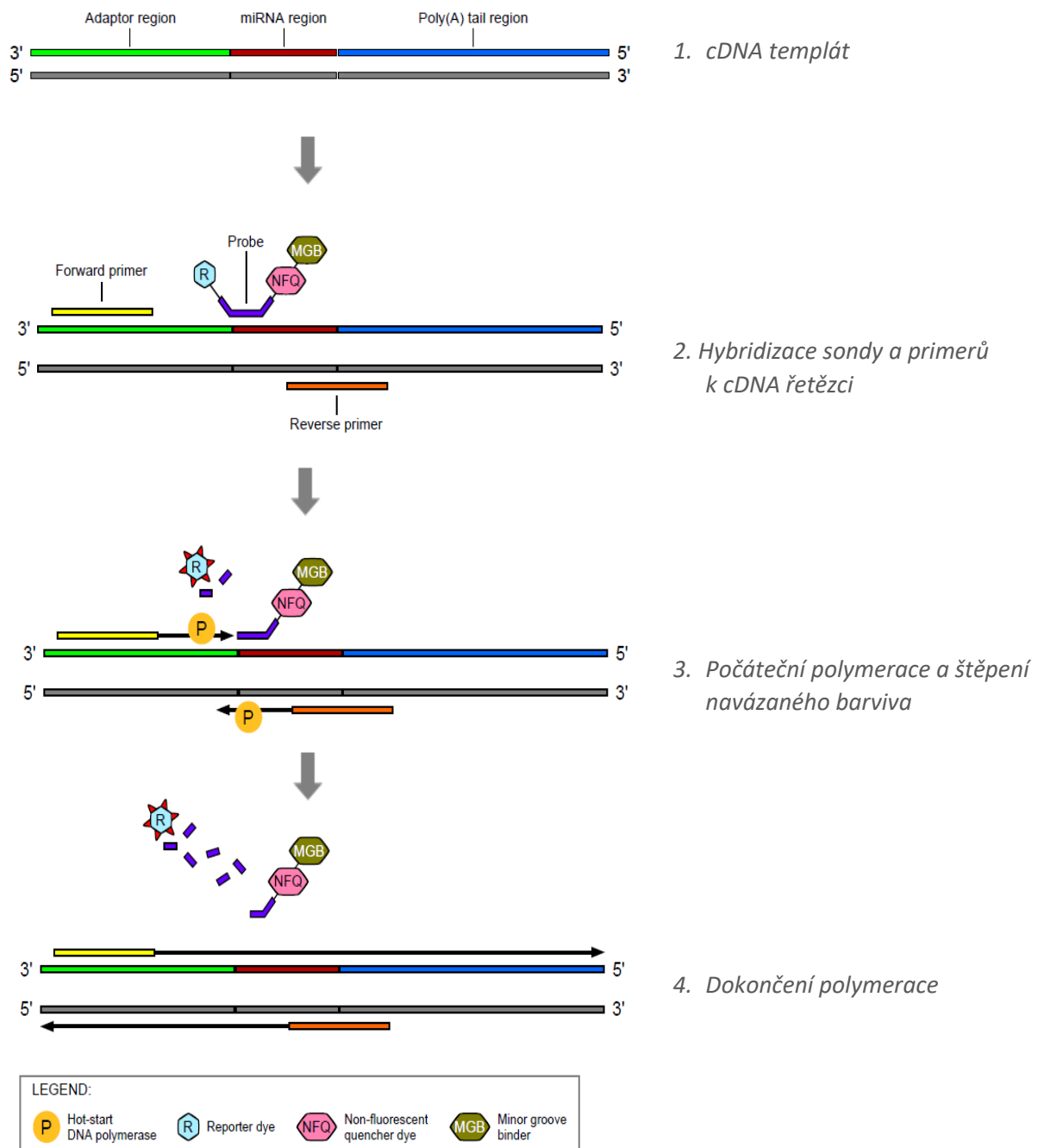
Následně se exprese těchto miRNA analyzovala na jednotlivých vzorcích zvlášť pomocí real-time PCR (Obrázek 10). Pro analýzu byly využity specifické *TaqMan™ Advanced miRNA Assay (ThermoFisher Scientific)* a *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific)*. Všechny vzorky byly analyzovány v triplikátech s celkovým reakčním objemem 10 µl tj. 2,5 µl cDNA vzorku a 7,5 µl master mixu (Tabulka 2). Analýza proběhla na přístroji *Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany)* a každý běh zahrnoval negativní kontrolu bez vzorku (NTC), kontrolu reverzní transkripce (neobsahuje enzym reverzní transkripce) a kalibrátor (směsná cDNA ze všech vzorků pro korekci rozdílů mezi běhy). Reakční podmínky se řídily protokolem výrobce (Tabulka 3).

**Tabulka 2.** Protokol přípravy reakční směsi pro real-time PCR

Master Mix (1x reakce)	Objem (µl)
<i>RNase-free voda</i>	2
<i>TaqMan™ Fast Advanced Master Mix</i>	5
<i>TaqMan™ Advanced miRNA Assay</i>	0,5
<i>cDNA</i>	2,5
<b>Celkem</b>	<b>10</b>

**Tabulka 3.** Reakční podmínky real-time PCR

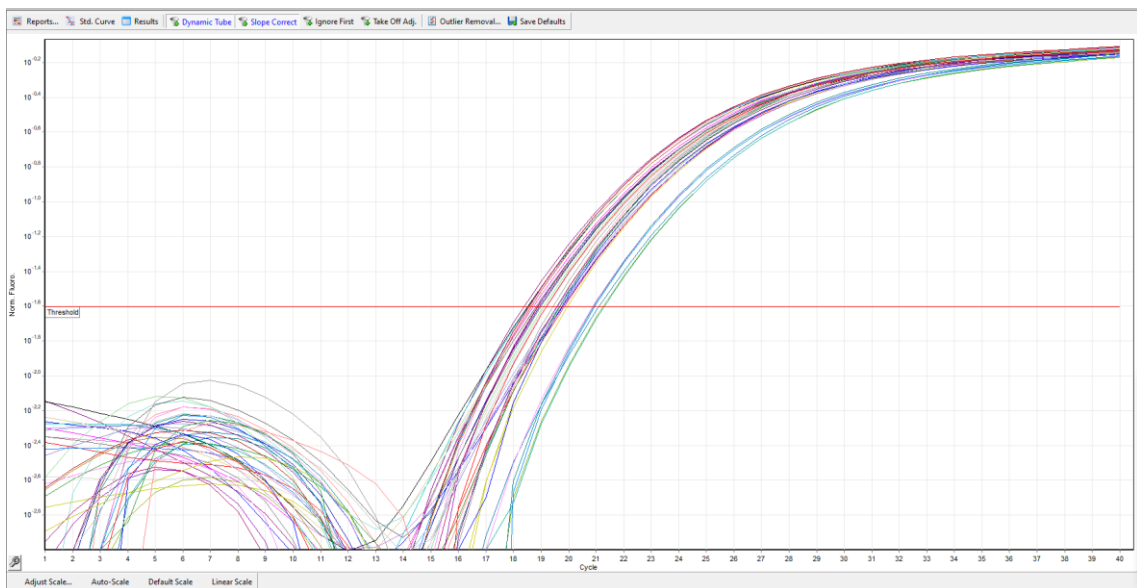
Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
<i>Aktivace enzymů</i>	95°C	20 s	1
<i>Denaturace</i>	95°C	3 s	40
<i>Annealing/Extenze</i>	60°C	30 s	



**Obrázek 10.** Průběh PCR reakce s využitím *TaqMan™ Advanced miRNA Assays* (podle *ThermoFisher Scientific User Guide (2022)*)



Fluorescenční data (Obrázek 11) byla vyhodnocena pomocí *Rotor-Gene Q Series Software* (Qiagen, Hilden, Germany) a poté korigovány kalibrátorem. Získaná data byla analyzována pomocí webového programu *RefFinder* (Xie et al. 2012). Pro detailnější analýzu byly využity statistické nástroje *BestKeeper* (Pfaffl et al. 2004) a *geNorm* (Vandesompele et al. 2002). Nástroj *geNorm* eliminuje chyby vzniklé použitím pouze jednoho genu jako endogenní kontroly a pomocí geometrického průměru přesně vypočítá nejstabilnější kombinaci genů. Pro stanovení relativní exprese byla vybrána jako endogenní kontrola kombinace miR-25-3p a miR-423-5p.



**Obrázek 11.** Záznam fluorescenčních dat z real-time PCR analyzované pomocí *Rotor-Gene Q Series Software*

Na základě literární rešerše byly vybrány potenciálně významné miRNA: miR-182-5p, miR-10b-5p a miR-145-5p. Pro stanovení hodnoty Ct každého vzorku (včetně kontrolní skupiny) se využila kvantitativní real-time PCR pomocí stejné metodiky jako byly vyšetřeny endogenní kontroly. Relativní exprese byla stanovena pomocí metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak et Schmittgen 2001). Fluorescenční data byla normalizována na endogenní kontrolu ( $\Delta Ct$ ) a poté od nich byla odečtena průměrná hodnota kontrolní skupiny ( $-\Delta\Delta Ct$ ).

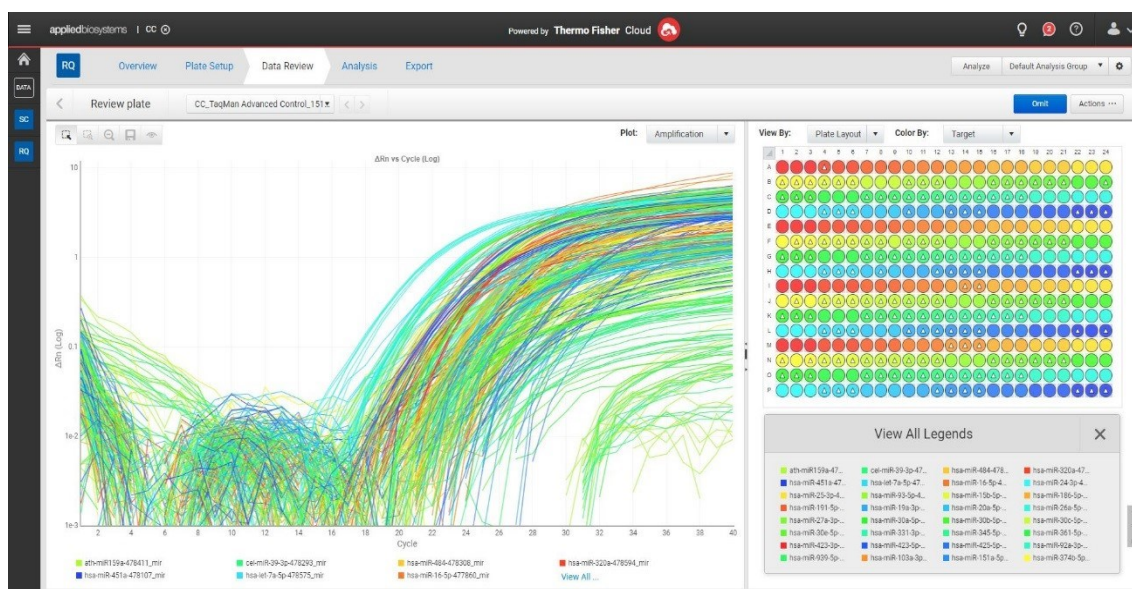
## 4.4 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 9 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA*). Expresní data byla zlogaritmována na normální distribuci dat pro použití parametrických testů. Pomocí Studentova T-testu se porovnály rozdíly v expresi nádorové a kontrolní skupiny s cílem vyvrátit nulovou hypotézu. Nulová hypotéza byla založena na teorii, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a nádorovou skupinou. Statistický test ANOVA (*one-way analysis of variance*) a Studentův T-test byly využity pro zjištění korelace mezi expresí jednotlivých miRNA a klinickopatologickými daty. Dále byla provedena regresní korelace věku s relativní expresí jednotlivých miRNA. U vybrané kombinace analyzovaných miRNA byla stanovena senzitivita a specifita pomocí logistické regrese a byla vytvořena ROC křivka. Hladina statistické významnosti byla stanovena na  $P < 0,05$ .

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výběr endogenní kontroly

Pro stanovení relativní exprese miRNA musela být nejdříve vybrána nejvhodnější endogenní miRNA kontrola s nejstabilnější expresí v cervikální tkáni. Celkem bylo testováno 30 potenciálních endogenních kontrol předem připravených na mikrofluidní kartě *TaqMan™ Advanced miRNA Human Endogenous Control (ThermoFisher Scientific)*. Z důvodu nízké exprese byly 4 sondy vyřazeny. Prvotní real-time PCR data byla analyzována v programu *ThermoFisher Connect Platform* (Obrázek 12), ze kterého byly exportovány jednotlivé Ct hodnoty pro další analýzu.



**Obrázek 12.** Analýza expresních dat miRNA pomocí webového uživatelské rozhraní *ThermoFisher Connect Platform*

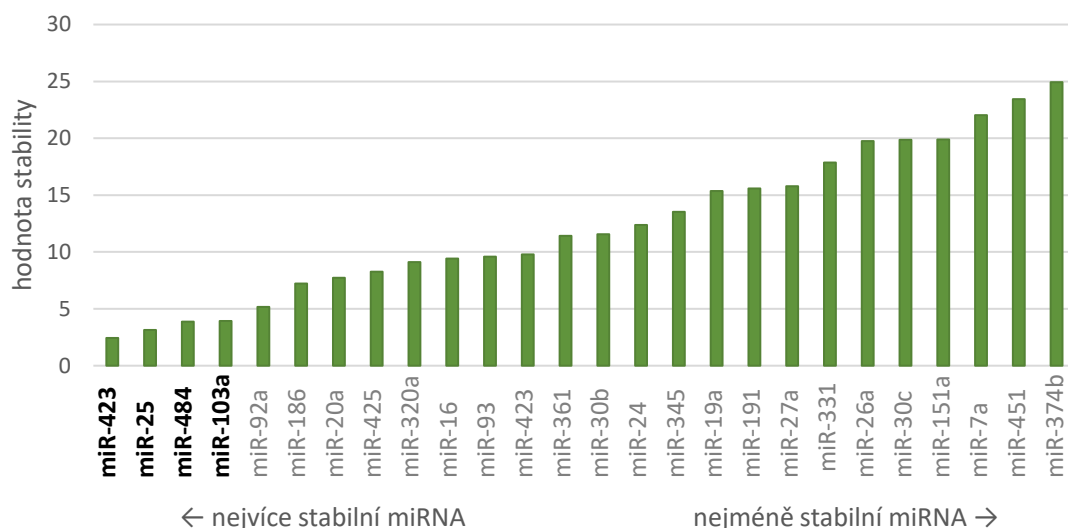
Vyexportované Ct hodnoty testovaných miRNA byly analyzovány pomocí webového softwaru *RefFinder*, který zahrnuje následující analytické nástroje: Delta Ct, BestKeeper, *NormFinder* a *GeNorm*. Výstupem této analýzy byly seřazené miRNA od největší stability exprese po nejmenší (Tabulka 4). Výsledné pořadí bylo geometrickým průměrem spojeno do jednoho komplexního žebříčku – *comprehensive ranking*. Obrázek 13 zobrazuje výsledné pořadí endogenních miRNA kontrol od miRNA s nejstabilnější expresí po nejmenší stabilitu exprese. Podle těchto dat byly vybrány čtyři miRNA s největší stabilitou exprese: miR-103a-3p, miR-484, miR-25-3p a miR-423-5p.

**Tabulka 4.** Seřazené endogenní miRNA na základě genové stability podle nástrojů: *Delta Ct*, *BestKeeper*, *NormFinder* a *geNorm*



<i>Delta Ct</i>	<i>BestKeeper</i>	<i>NormFinder</i>	<i>GeNorm</i>	<i>comprehensive ranking</i>
<b>miR-423-5p</b>	miR-320a	<b>miR-103a-3p</b>	<b>miR-25-3p   miR-423-5p</b>	<b>miR-423-5p</b>
<b>miR-484</b>	miR-20a-5p	<b>miR-484</b>	miR-92a-3p	<b>miR-25-3p</b>
<b>miR-25-3p</b>	miR-345-5p	<b>miR-25-3p</b>	<b>miR-484</b>	<b>miR-484</b>
miR-92a-3p	miR-425-5p	<b>miR-423-5p</b>	miR-186-5p	<b>miR-103a-3p</b>
<b>miR-103a-3p</b>	miR-423-3p	miR-92a-3p	<b>miR-103a-3p</b>	miR-92a-3p
miR-186-5p	miR-93-5p	miR-425-5p	miR-16-5p	miR-186-5p
miR-16-5p	miR-19a-3p	miR-186-5p	miR-361-5p	miR-20a-5p
miR-361-5p	<b>miR-103a-3p</b>	miR-20a-5p	miR-24-3p	miR-425-5p
miR-93-5p	<b>miR-423-5p</b>	miR-30b-5p	miR-30b-5p	miR-320a
miR-24-3p	miR-151a-5p	miR-16-5p	miR-191-5p	miR-16-5p
miR-30b-5p	<b>miR-25-3p</b>	miR-423-3p	miR-27a-3p	miR-93-5p
miR-423-3p	miR-92a-3p	miR-93-5p	miR-93-5p	miR-423-3p
miR-425-5p	miR-186-5p	miR-24-3p	miR-423-3p	miR-361-5p
miR-20a-5p	<b>miR-484</b>	miR-361-5p	miR-425-5p	miR-30b-5p
miR-27a-3p	miR-331-3p	miR-27a-3p	miR-20a-5p	miR-24-3p
miR-191-5p	miR-16-5p	miR-191-5p	miR-26a-5p	miR-345-5p
miR-26a-5p	miR-7a-5p	miR-331-3p	miR-30c-5p	miR-19a-3p
miR-30c-5p	miR-30b-5p	miR-19a-3p	miR-320a	miR-191-5p
miR-320a	miR-361-5p	miR-320a	miR-331-3p	miR-27a-3p
miR-331-3p	miR-24-3p	miR-30c-5p	miR-19a-3p	miR-331-3p
miR-19a-3p	miR-191-5p	miR-26a-5p	miR-451	miR-26a-5p
miR-345-5p	miR-374b-5p	miR-345-5p	miR-345-5p	miR-30c-5p
miR-451	miR-27a-3p	miR-451	miR-7a-5p	miR-151a-5p
miR-7a-5p	miR-30c-5p	miR-7a-5p	miR-151a-5p	miR-7a-5p
miR-151a-5p	miR-26a-5p	miR-151a-5p	miR-374b-5p	miR-451
miR-374b-5p	miR-451	miR-374b-5p		miR-374b-5p

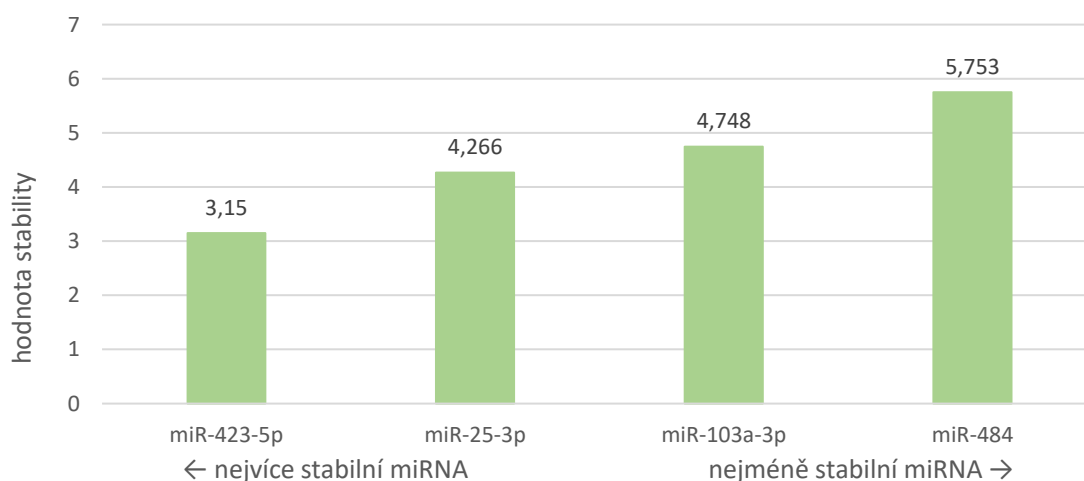
Tučně jsou zvýrazněny nejstabilnější miRNA, které byly vybrány pro další testování.



**Obrázek 13.** Pořadí endogenních miRNA kontrol podle hodnoty stability vypočtené algoritmem *RefFinder*

Vyhodnocení dat prvotní analýzy real-time PCR. Tučně jsou zvýrazněny nejstabilnější miRNA, které byly vybrány pro další testování.

Čtyři vybrané miRNA byly následně analyzovány pomocí *TaqMan™ Advanced* real-time PCR. Získaná fluorescenční data byla normalizována k hodnotě kalibrátoru mezi jednotlivými běhy. Ct hodnoty byly analyzovány pomocí analytického nástroje *BestKeeper*. miR-103a-3p a miR-484 byly vyřazeny na základě výsledků analýzy dat (Obrázek 14) a velmi nízké fluorescence. Analytický nástroj *geNorm* vyhodnotil jako nejstabilnější endogenní kontrolu kombinaci **miR-25-3p a miR-103a-3p**.



**Obrázek 14.** Pořadí vybraných endogenní miRNA kontrol podle hodnoty stability vypočtené algoritmem *BestKeeper*

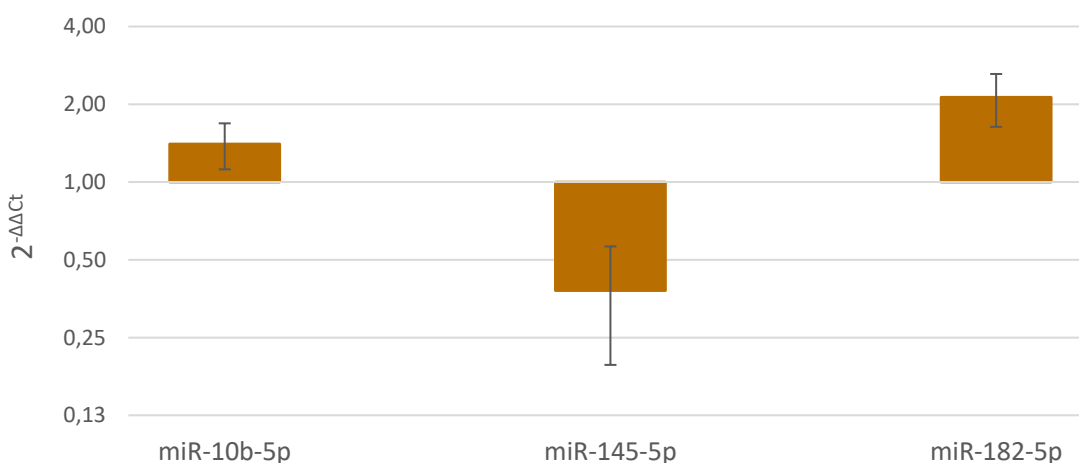
## 5.2 Stanovení relativní exprese

V rámci této práce byla stanovena relativní exprese miR-10b-5p, miR-145-5p a miR-182-5p vybraných na základě literární rešerše. Analyzováno bylo celkem 70 vzorků CC a 30 kontrolních vzorků (miR-182-5p byla analyzována na 44 vzorků CC). Vyhodnocená data relativní exprese nádorové skupiny byla porovnána s expresí kontrolního souboru. Za statisticky významnou deregulaci byl považován výsledek s  $P < 0,05$ . Za sníženou expresí byl označen výsledek  $FC < 1,0$  a za zvýšenou expresí výsledek  $FC > 2,0$ . Po vyhodnocení dat (Tabulka 5) z analýzy real-time PCR byla detekována statisticky významně snížená exprese miR-145-5p ( $P < 0,0001$ ;  $FC = 0,380$ ) a statisticky významně zvýšená exprese miR-182-5p ( $P = 0,007$ ;  $FC = 2,128$ ). miR-10b-5p byla mírně deregulována, ale výsledek nebyl statisticky významný (Obrázek 15).

**Tabulka 5.** Relativní exprese vybraných miRNA u karcinomu cervixu

miRNA	P hodnota	FC
<i>miR-10b-5p</i>	0,147	1,403
<i>miR-145-5p</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,380</b>
<i>miR-182-5p</i>	<b>0,007</b>	<b>2,128</b>

Tučně jsou zvýrazněny statisticky významné výsledky.

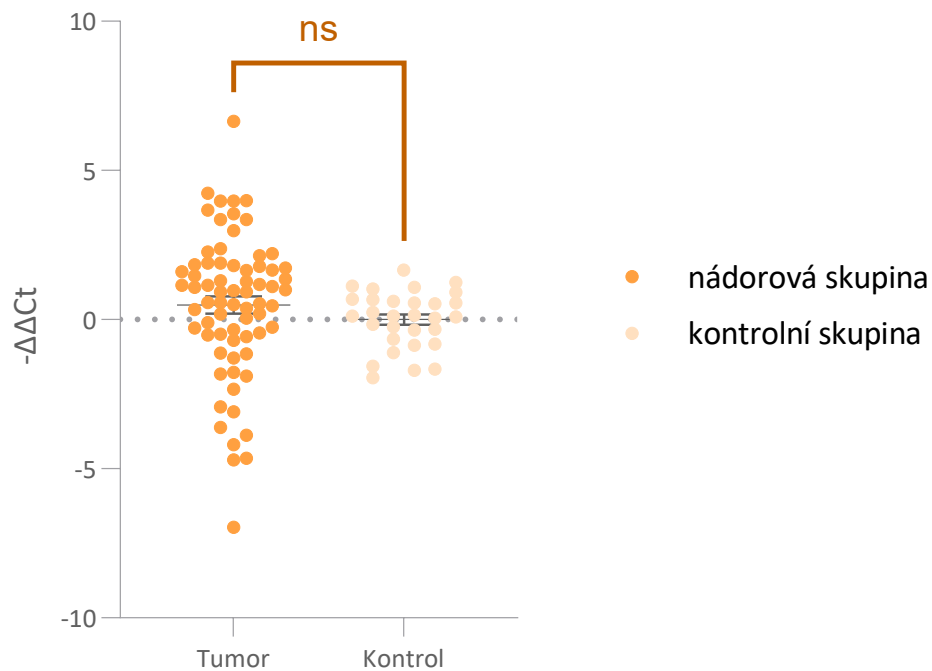


**Obrázek 15.** Porovnání relativní exprese testovaných miRNA

Do grafu jsou vyneseny hodnoty  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (*Fold change*) na logaritmickém měřítku. miR-145-5p vykazovala významně sníženou expresí a miR-182-5p zvýšenou expresí v nádorové skupině oproti kontrolní. U každé miRNA je znázorněna chybová úsečka znázorňující SEM (střední chybu průměru).

### 5.2.1 miR-10b-5p

Rozdíl exprese miR-10b-5p (Obrázek 16) tumorové a kontrolní skupiny nebyl statisticky významný ( $P = 0,147$ ). Byla detekována pouze zanedbatelná deregulace ( $FC = 1,403$ ). Průměr nádorové skupiny byl 0,489 ( $SEM = 0,284$ ). Při analýze real-time PCR vykazovala miR-10b-5p velmi nízkou fluorescenci (*Norm. Fluoro.*  $< 0,2$ ).

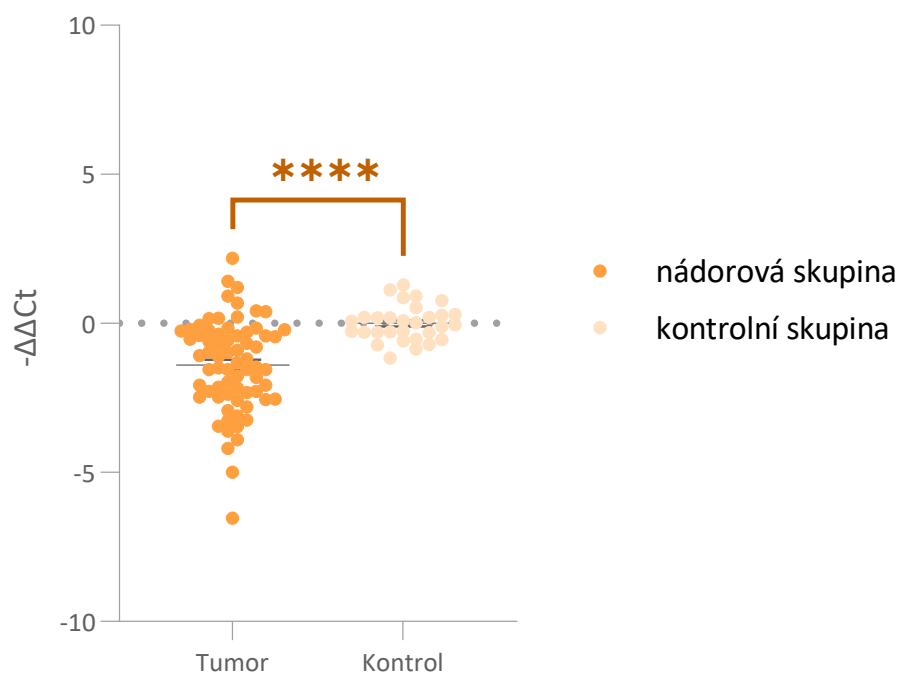


**Obrázek 16.** Porovnání exprese miR-10b-5p v nádorové a v kontrolní skupině

Na ose y jsou vyneseny hodnoty  $-\Delta\Delta Ct$  relativní exprese. Horizontální čára u jednotlivých skupin označuje průměr s vyznačenou střední chybou průměru. Rozdíl mezi nádorovou a kontrolní skupinou není signifikantní (tj. ns).

## 5.2.2 miR-145-5p

miR-145-5p vykazovala statisticky významně sníženou expresi oproti kontrolní skupině ( $P < 0,0001$ ; FC = 0,380). Při porovnání exprese mezi jednotlivými vzorky byly detekovány velmi malé rozdíly (průměr = -1,398, SEM = 0,184) v nádorové skupině (Obrázek 17).



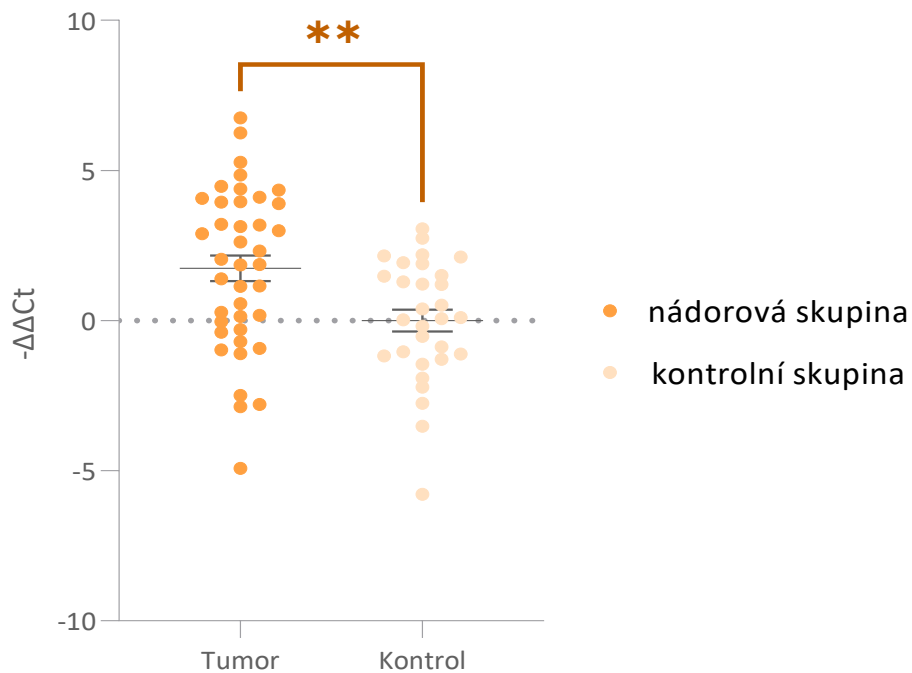
**Obrázek 17.** Porovnání exprese miR-145-5p v nádorové a v kontrolní skupině

Na ose y jsou vynesena  $-\Delta\Delta Ct$  data relativní exprese. Rozdíl mezi nádorovou a kontrolní skupinou je velmi statisticky významný (\*\*\*\* tj. hodnota  $P < 0,0001$ ). Horizontální čára u každé skupiny označuje průměr s vyznačenou střední chybou průměru.



### 5.2.3 miR-182-5p

miR-182-5p byla statisticky významně zvýšena ( $P < 0,007$ ; FC = 2,218) v porovnání s kontrolní skupinou (Obrázek 18). Z důvodu nedetekovatelné exprese bylo 26 vzorků vyřazeno z analýzy, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Při analýze real-time PCR vykazovala velmi nízkou fluorescenci (*Norm. Fluoro.* < 0,3). Exprese nádorové skupiny vykazovala větší variabilitu (průměr = 2,043, SEM = 0,492).

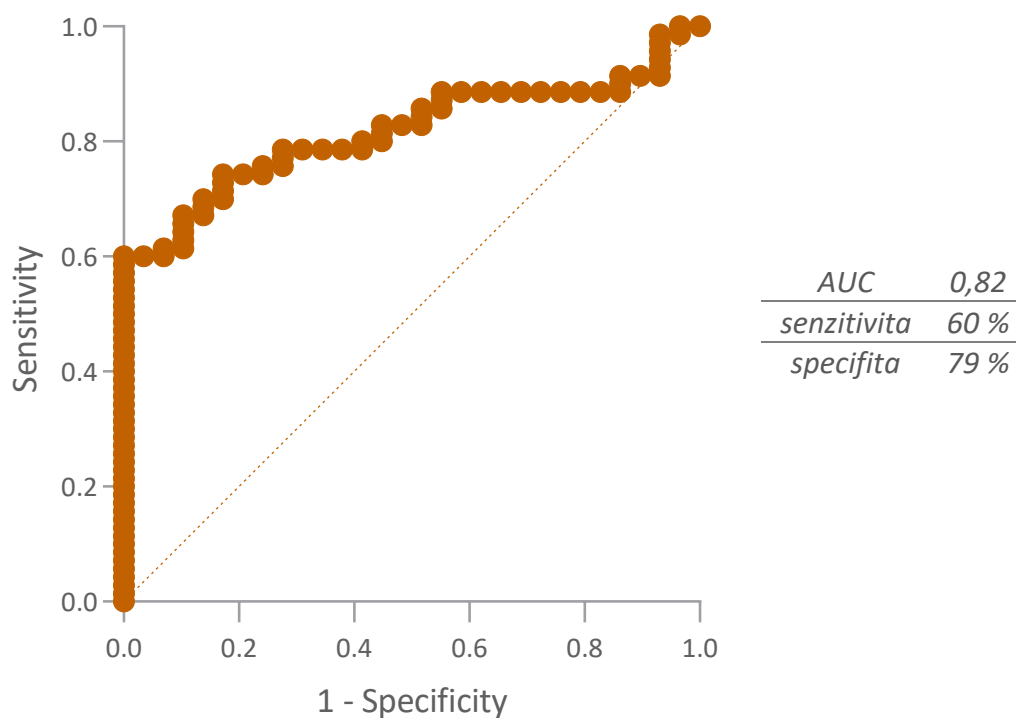


**Obrázek 18.** Porovnání exprese miR-182-5p nádorové a kontrolní skupiny

Na ose y jsou vynesena  $-\Delta\Delta Ct$  data relativní exprese. Horizontální čára u každé skupiny označuje průměr s vyznačenou střední chybou průměru. Rozdíl mezi nádorovou a kontrolní skupinou byl statisticky významný (\*\*, tj.  $P < 0,01$ ).

#### 5.2.4 Kombinace miR-145-5p a miR-182-5p

Na základě předchozí analýzy byly identifikovány miR-145-5p a miR-182-5p za statisticky významně změněné u nádorové skupiny oproti kontrolní. Pro zvýšení efektivity diagnostiky pomocí miRNA je vhodné je vzájemně zkombinovat (diagnostický multimarker). Získaná data relativní exprese byla vyhodnocena pomocí logistické regrese za účelem stanovení diagnostického biomarkerového potenciálu. Pro určení senzitivity a specifity byla vytvořena ROC křivka (Obrázek 19) s plochou pod křivkou (AUC) 0,82. Schopnost této kombinace zachytit skutečný počet pozitivních případů je 60 % (*senzitivita*) a schopnost správně detekovat skutečný počet negativních nálezů je 79 % (*specifita*).



**Obrázek 19.** ROC křivka kombinace miR-145-5p a miR-182-5p

Na svislé ose je vynesena hodnota senzitivity a na vodorovné ose je vynesena hodnota 1 - specifita, tj. relativní četnost falešně pozitivních případů. Přerušovaná čára naznačuje plochu pod křivkou rovnou 0,5.

Pro tento diagnostický multimarker byla vyhodnocena klasifikační tabulka (Tabulka 6). Tento model správně diagnostikoval přítomnost nádoru v 87 % (61 nálezů) a naopak správně vyhodnotil negativní nález ve 43 % (13 nálezů). Celkem 17 případů identifikoval falešně pozitivně a 9 případů falešně negativně.

**Tabulka 6.** Klasifikační tabulka diagnostického multimarkeru (kombinace miR-145 a miR-182)

Klasifikační tabulka	<i>Predikce zdravá</i>	<i>Predikce tumor</i>	Celkem	Správně klasifikováno
<i>Pozorováno zdravá</i>	13	17	30	<b>43,33 %</b>
<i>Pozorováno tumor</i>	9	61	70	<b>87,14 %</b>
Celkem	22	78	100	<b>74,00 %</b>

### 5.3 Korelace exprese miRNA s klinickopatologickými daty

Klinickopatologická data pacientek s CC jsou popsána v Tabulka 1. Průměrný věk pacientek byl 47 let, nejmladší pacientka byla ve věku 25 let a nejstarší ve věku 76 let. Všechny vzorky byly histologicky verifikovány jako SCC, přičemž 70 % vzorků bylo označeno jako G2 (tj. středně diferencovaný karcinom). U většiny pacientek (85 %) byl zaznamenán nález prekancerózy, nejčastěji HSIL (97 %). Vaskulární invaze byla diagnostikována u 43 % pacientek, ale perineurální šíření pouze u 9 % pacientek. 80 % pacientek mělo po chirurgické léčbě negativní resekční okraj. Většina pacientek (65 %) neměla metastáze v regionálních lymfatických uzlinách (u 30 % pacientek nebyly lymfatické uzliny hodnoceny). Celkem u 81 % pacientek byl karcinom omezen na místo původu, tj. bez přítomnosti invaze. Všechny vzorky byly klasifikovány podle aktuální TNM i FIGO 2018 stupnice. Statistickou analýzou byla porovnána klinickopatologická data s relativní expresí vybraných miRNA (Tabulka 7).

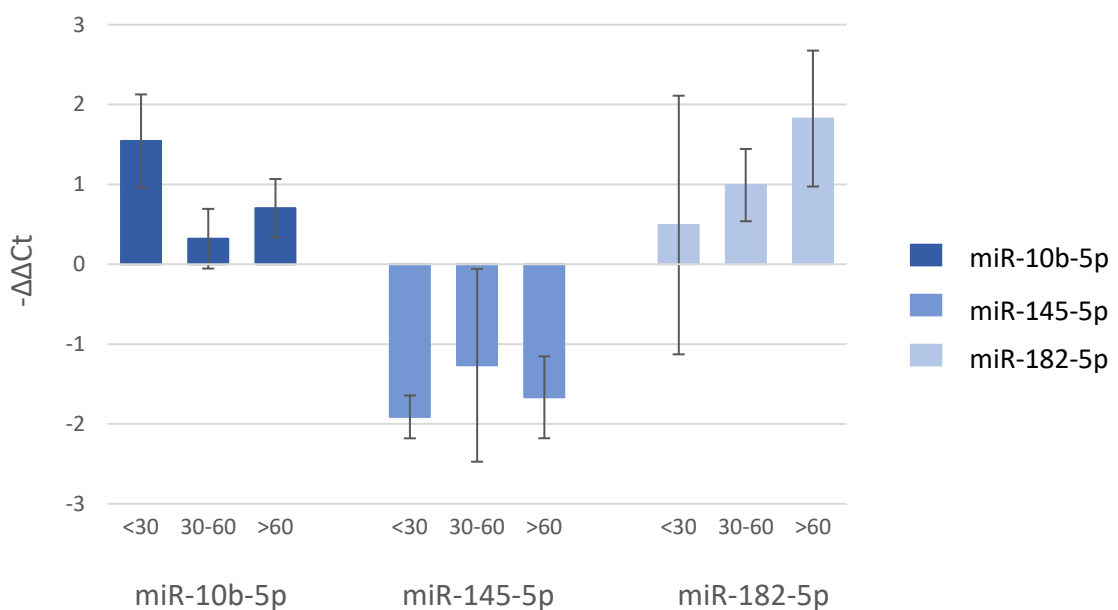
**Tabulka 7.** Korelace exprese miRNA s klinickopatologickými daty pacientek s CC

Klinickopatologická data		miR-10b-5p	miR-145-5p	miR-182-5p
		hodnota P		
Věk	< 30	0,277	0,481	0,852
	30 - 60			
	> 60			
Grading	G1	0,875	0,982	0,840
	G2			
	G3			
Prekanceróza	ANO	0,754	0,691	0,931
	NE			
Typ prekancerózy	LSIL	<b>0,004</b>	0,832	0,877
	HSIL			
Vaskulární invaze	ANO	0,244	0,852	0,390
	NE			
Perineurální šíření	ANO	0,098	0,998	<b>0,013</b>
	NE			
Resekční okraj	negativní	<b>0,039</b>	<b>0,003</b>	0,734
	pozitivní			
TNM	pN0	0,603	0,062	/
	pN1			
	pT1	0,633	0,440	0,613
	pT2			
FIGO 2018	I	0,863	0,741	0,460
	II			
	III			

Tučně jsou zvýrazněny statisticky významné výsledky.

Na základě statistické analýzy byly zaznamenány čtyři statisticky významné korelace. Každá miRNA korelovala, alespoň s jedním parametrem. U miR-10b-5p byla detekována statisticky významně zvýšená exprese u pacientek s prekancerózou typu LSIL oproti pacientkám s typem HSIL ( $P = 0,004$ ). Resekční okraj koreloval s miR-10b-5p a miR-145-5p. miR-10b-5p měla sníženou expresi v případě negativního resekcčního okraje, zatímco v případě pozitivního měla expresi zvýšenou. miR-145-5p měla statisticky významně sníženou expresi v případě negativního resekcčního okraje ve srovnání s pozitivním. miR-182-5p korelovala s přítomností perineurálního šíření. V případě přítomnosti

perineurálního šíření byla detekována statisticky významně zvýšená exprese miR-182-5p oproti skupině bez tohoto šíření. U korelace miR-182-5p s klasifikací TNM, chybí hodnota z důvodu nedostatečného počtu vzorků v porovnávací skupině. Dále byla porovnán rozdíl v expresi mezi jednotlivými věkovými skupinami (Obrázek 20). Nebyla zaznamenána korelace mezi expresí vybraných miRNA a věku pacientek s CC. Dále byla provedena regresní korelace věku s relativní expresí vybraných miRNA, ale nebyla identifikována statisticky významná závislost.



**Obrázek 20.** Vliv exprese vybraných miRNA na věk pacientek s CC

Na ose y jsou vynesena  $-\Delta\Delta C_t$  data relativní exprese. U každé skupiny je znázorněna chybová úsečka představující SEM.

## 6 DISKUSE

V současné době je karcinom cervixu celosvětově čtvrtým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen. Patří mezi hlavní příčiny úmrtí na nádorové onemocnění v rozvojových zemích světa např. subsaharská Afrika (*Canfell 2019*). V roce 2019 vyzvala Světová zdravotnická organizace (WHO) k opatřením směřujícím k dosažení globální eliminace CC. WHO vytvořila strategický plán: rozšíření očkování proti HPV a diagnostického screeningu, efektivní léčba prekanceróz a účinná léčba karcinomů (*WHO 2019*). Screening je zásadní pro úspěšnou léčbu CC, protože infekce HPV bývá často asymptomatická, progresi prekancerózních lézí může být latentní a léčba pokročilého karcinomu je značně obtížná i nákladná (*Rodriguez 2021*).

Calin et al. v roce 2002 vytvořili jednu z prvních studií potvrzujících roli miRNA při rozvoji nádorového onemocnění. Přesvědčivé důkazy ukázaly, že exprese miRNA je deregulována prostřednictvím různých mechanismů v kancerogenezi. Stále větší počet studií identifikovalo miRNA jako potenciální biomarkery pro diagnostiku a prognózu karcinomů (*Peng a Croce 2016, Calin et al. 2002*).

V současné době existuje mnoho výzkumných skupin zaměřujících se na expresi miRNA u karcinomu cervixu. Ve studii *Shao et al. 2020* detekovali výrazně zvýšenou expresi miR-210-3p a její korelaci s klasifikací FIGO, diferenciací tumoru a lymfatickými metastázemi u CC. Ve studii *Wen et al. 2021* prokázali, že miR-873-5p má významně sníženou expresi u pacientek s CC a koreluje se vzdálenými metastázemi i špatnou prognózou. Barquet-Muñoz et al. 2022 vytvořili panel miRNA spojený s přítomností metastáz lymfatických uzlin u časného stádia CC. Mnoho studií se zaměřilo na terapii CC. Ve studii *Yang et al. 2022* došli k závěru, že miR-92a-3p zvyšuje odolnost vůči cisplatině při léčbě CC. Podobně ve studii *Nilsen et al. 2022* se zaměřili na studium biomarkerů nádorové radiorezistence u CC.

V této práci se stanovila relativní exprese předem vybraných miRNA a vzájemná korelace s klinickopatologickými daty pacientek s karcinomem cervixu. Předmětem této práce byla také identifikace vhodné endogenní kontroly, která je diskutována v následující části.

## 6.1 Výběr endogenní kontroly

Pro stanovení relativní exprese je nezbytné vybrat vhodnou referenční miRNA, která umožní spolehlivou normalizaci exprese testovaných miRNA. V současné době nejsou sjednocené normalizační strategie ani žádné univerzálně uznávané referenční geny (*Chugh a Dittmer 2012*). Rozdíly v normalizační strategii vedou k nejednoznačné interpretaci dat, zkresleným závěrům a chybným biologickým předpokladům. Tyto chyby značně zhoršují vzájemnou reprodukovatelnost studií. Volba endogenní kontroly je kritickým krokem před zahájením experimentu, aby se předešlo chybné interpretaci dat a identifikovaly se skutečné změny v hladinách exprese miRNA (*Schwarzenbach et al. 2015*). Endogenní kontrola by měla vykazovat vysokou stabilitu a hojnou expresi ve všech testovaných vzorcích. Z těchto důvodů je žádoucí endogenní kontrolu optimalizovat pro každý experiment zvlášť a zajistit tak její stabilitu v daném typu tkáně a v testovaných vzorcích (*Vandesompele et al. 2002*).

Endogenní kontrola by měla vykazovat podobné vlastnosti (včetně délky) jako testovaný gen. Z těchto důvodů nelze použít standardně používané referenční geny pro stanovení exprese mRNA. Rozdíly v délce mRNA a miRNA ovlivňují výtěžek izolace, reverzní transkripci a účinnost amplifikace (*Drobna et al. 2018*). Navíc při použití *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific)* pro reverzní transkripci (jako v této práci) se mRNA do cDNA nepřepíše. Jiné malé RNA jako je snRNA a snoRNA (nejčastěji U6 snRNA) se dříve hojně používaly jako endogenní kontroly ve studiích exprese miRNA. Nicméně *Gee et al. 2011* provedli studii na využití snoRNA jako referenčního genu. V této studii porovnávali expresi vybraných miRNA a nejpoužívanějších snoRNA využívaných k normalizaci. Došli k závěru, že snoRNA vykazují stejnou variabilitu v expresi jako miRNA a jejich používání jako referenčních genů může vnést zkreslení při kvantifikaci miRNA. Stejně tak *Xiang et al. 2014* identifikovali velké výkyvy v expresi U6 snRNA u nádorové i kontrolní skupiny. Ve studii *Lamba et al. 2014* označili U6 snRNA jako nevhodnou referenční kontrolu a pomocí softwaru *NormFinder* a *geNorm* byla označena jako jedna z nejméně stabilních. Jiné typy RNA nemají stejné vlastnosti jako miRNA, proto je dnes doporučováno používat referenční gen patřící do stejné třídy RNA (*Chang et al. 2010*). *Vandesompele et al. 2002* prokázali, že využití pouze jednoho genu vede k relativně velkým chybám

a nejpřesnějších dat lze dosáhnout použitím geometrického průměru více referenčních genů.

Strategie pro výběr vhodné endogenní kontroly se v různých experimentech liší. Cílem studie *Schwarzenbach et al. 2015* bylo vytvořit ideální model výběru endogenní kontroly. Ten byl založen na výběru kandidátských miRNA na základě literární rešerše a následné validaci qRT-PCR v podskupině vzorků. Pokud by vybrané miRNA nebyly stabilní, doporučují alternativně přidat exogenní miRNA. *Peltier a Latham 2008* vytvořili globální strategii pro výběr kandidátských endogenních miRNA. Pro stanovení exprese miRNA využili techniku microarray a pro výběr kandidátních miRNA stanovili 4 kritéria, na základě kterých data vyfiltrovali a vybrali 10-15 miRNA. Následně provedli validaci qRT-PCR a získaná data analyzovali algoritmy *geNorm* a *NormFinder*.

V této práci se zvolila následující strategie pro výběr endogenní kontroly: prvotní analýza real-time PCR na mikrofluidní kartě s vybranými 30 potenciálními endogenními kontrolami (testováno na směsi vzorků a směsi kontrol); analýza webovým prohlížečem *RefFinder* (nástroje *Delta Ct*, *BestKeeper*, *NormFinder* a *geNorm*); analýza *TaqMan™ Advanced* real-time PCR čtyř nejstabilnějších miRNA na všech vzorcích nádorové i kontrolní skupiny a analýza softwarem *BestKeeper* a *geNorm*.

Při výběru endogenní kontroly se ve většině případů přistupuje k analýze dat, některým z výše zmíněných algoritmů. Z Tabulka 4 můžeme vidět, že algoritmy mohou dojít k podobným závěrům (*Delta Ct* vs. *NormFinder*) nebo velmi odlišným (*NormFinder* vs. *BestKeeper*). Z těchto důvodů byla zvolena kombinace algoritmů s využitím webového prohlížeče *RefFinder* (*Xie et al. 2012*), který integruje všechny 4 algoritmy pomocí geometrického průměru do jednoho výsledného žebříčku (*comprehensive ranking*). Stejně tak ve studiích *Zhang et al. 2016* a *Dunislawska et al. 2020* zvolili pro výběr referenčního genů kombinovaný algoritmus *RefFinder*.

V této práci byla vybrána kombinace miR-25-3p a miR-423-5p jako endogenní kontrola. Starší studie profilování miRNA u karcinomu cervixu využívají jako endogenní kontrolu U6 snRNA, například *Pereira et al. 2010*. Studie *Nilsen et al. 2019* vybrala jako nejvhodnější referenční kontrolu miR-151a, miR-152 a miR-423 pro cervikální tkáň. V porovnání se získanými daty v této práci a s výsledky analýzy (Tabulka 4) vyšla miR-



151a-5p jako jedna z nejméně stabilních, což potvrzuje doporučení optimalizace endogenní kontroly před každým experimentem. Naopak podobného výsledku dosáhla studie *Babion et al. 2017*, kteří vyhodnotili jako nejstabilnější a nejvhodnější endogenní kontrolu miR-423 pro karcinom cervixu.

## 6.2 Rozdílná exprese vybraných miRNA u karcinomu cervixu

Detekce významných deregulací miRNA exprese má velký potenciál, jelikož miRNA jsou slibnými diagnostickými markery v klinické praxi. miRNA jsou dobře detekovatelné ve vzorcích tkáně i krve, snadno extrahovatelné a odolné vůči degradaci. miRNA byly poprvé stanoveny jako biomarkery nádorového onemocnění v roce 2008 výzkumnou skupinou *Lawrie et al.* u difúzního velkobuněčného B-lymfomu. Největším potenciálem jsou multimarkerové modely miRNA pro přesnou diagnózu, řízenou léčbu a vyhodnocení citlivosti na léčbu. Například identifikace miRNA profilu v moči u lupusové nefritidy umožnila včasnou detekci renální fibrózy (*Solé et al. 2019*). U heterogenního onemocnění jako jsou karcinomy, je multimarkerový přístup velice nadějný. Použití miRNA jako biomarkerů je stále v rané fázi, protože výsledky postrádají reprodukovatelnost (*Condrat et al. 2020*). Pro vyřešení problému je nutné vyvinout standardizované postupy pro preanalytickou fázi, přepravu a skladování, analytickou fázi (z důvodu rozmanitosti používaných technologií) a výslednou analýzu získaných dat.

Pro stanovení exprese vybraných miRNA se zvolila metoda real-time PCR s využitím *TaqMan™ Advanced miRNA Assays*. Spolu se sadou *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* se jedná o rychlý a jednoduchý postup pro citlivou a specifickou kvantifikaci zralých miRNA. Pro stanovení relativní exprese se využila metoda  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (*Livak et Schmittgen 2001*). Jedná se o nejpoužívanější přístup kvantifikace miRNA, při které není potřeba stanovit standardní křivku a zároveň je dostatečně citlivá a specifická. V rámci této metody se získaná data normalizovala na endogenní kontrolu, kterou bylo třeba předem vybrat pro tento experiment (*viz. 6.1 Výběr endogenní kontroly*). Relativní exprese se stanovila u třech vybraných miRNA (miR-10b-5p, miR-145-5p, miR-182-5p). Tyto miRNA byly vybrány na základě literární rešerše a integrované genomické studie 228 karcinomů cervixu výzkumnou sítí *The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA 2017)*.

První vybranou miRNA, která by mohla mít potenciál jako diagnostický marker u CC, byla miR-10b-5p. Několik studií potvrdilo korelaci exprese miR-10b u různých typů karcinomů např.: u kolorektálního karcinomu (*Chang et al. 2011*), gliomu (*Li et al. 2019*) a jaterního karcinomu (*Zhao et al. 2020*). Několik studií také identifikovalo deregulaci miR-10b-5p přímo u karcinomu cervixu (*Zou et al. 2016, Hou et al. 2017*). V této studii se nepodařilo detekovat statisticky významnou deregulaci miR-10b-5p u CC ( $P = 0,148$ ). Při porovnání relativní exprese nádorové a kontrolní skupiny nebyly detekovány statisticky významné rozdíly (Obrázek 16). Naproti tomu byla detekována statisticky významně snížená exprese pacientek s prekancerózou LSIL oproti pacientkám s HSIL ( $P = 0,004$ ). Tyto výsledky mohou být zkreslené z důvodu malého souboru, a proto nejsou relevantní. Pro potvrzení korelace mezi typem prekancerózy a exprese miR-10b-5p je nutný další výzkum s větším výběrovým souborem a především s rovnoměrným zastoupením vzorků obou porovnávaných skupin.

Další testovanou miRNA byla miR-145-5p (Obrázek 17), u které byla detekována statisticky velmi významně snížená exprese oproti kontrolní skupině ( $P < 0,0001$ ; FC = 0,380). Ke stejným výsledkům došli *Yu et al. 2021*, kteří detekovali sníženou expresi miR-145 u CC. V souladu s výsledky této práce *Anton et al. 2017* popsali mechanismus narušení cervikální epiteliální bariéry prostřednictvím miR-145. Geny apoptózy, BCL2 a BIRC5, a proliferační geny, CDK1 a CCND2, byly potlačeny působením miR-145. miR145-5p působí jako tumor supresorový gen a v současnosti se uvádí, že miR-145-5p cílí na Fascin (*He et al. 2020*) nebo podjednotku 1 cílenou na myosin fosfatázu (*Lei et al. 2017*), čímž reguluje proliferaci, migraci a invazi karcinomu. miR-145-5p je slibným terapeutickým cílem pro léčbu karcinomu cervixu na molekulární úrovni.

Poslední testovaná miR-182-5p měla statisticky významně zvýšenou expresi,  $P < 0,007$ , FC = 2,128 (Obrázek 18). Fluorescence některých vzorků byla pod detekovatelným limitem použité metody (real-time PCR s použitím *TaqMan<sup>TM</sup> Advanced miRNA Assay*), proto byly tyto vzorky z analýzy miR-182-5p vyřazeny. Ve studii *Tang et al. 2013* došli ke stejnému výsledku a detekovali nadměrnou expresi miR-182 u CC. miR-182-5p působí jako onko-miRNA a její inhibice by mohla vyvolat regresi růstu nádoru. Množství studií zaměřujících se na expresi miR-182-5p u CC není pro porovnání výsledků mnoho, ale i u jiných typů karcinomů byla potvrzena zvýšená exprese miR-182. Ve studii *Krishnan et al.*

2013 odhalili, že miR-182-5p reguluje biochemickou reakci na poškození DNA a zaměřuje se na síť genů zapojených do opravy DNA u karcinomu prsu. *Hirata et al. 2013* potvrdili korelaci exprese miR-182-5p s prognózou karcinomu prostaty, čímž by mohla být potenciálně využita jako prognostický marker. V rámci této práce se exprese miR-182-5p porovnávala se zaznamenanými klinickopatologickými daty a byla nalezena statisticky významná korelace exprese miR-182-5p se zaznamenaným perineurálním šířením ( $P = 0,013$ ). Významná korelace může být zkrácená z důvodu nerovnoměrného zastoupení vzorků v porovnávaných skupinách. Pro potvrzení korelace je nutný další výzkum s větším výběrovým souborem.

Na základě stanovení relativní exprese a statistického vyhodnocení se identifikovaly miR-145 a miR-182 jako potenciální diagnostické markery. Pro zvýšení diagnostického potenciálu je vhodné tyto miRNA vzájemně zkombinovat do diagnostického panelu a pro zvýšení senzitivity a specifity přidat do tohoto panelu další miRNA, na což se může navázat dalším výzkumem. Studie *Zhang et al. 2015* vytvořili miRNA panel v séru pro detekci karcinomu cervixu, skládající se z miR-16, miR-195, miR-2861 a miR-497. Podobně ve studii *Aftab et al. 2021* navrhli panel šesti miRNA v moči (miR-21-5p, miR-155-5p, miR-199a-5p, miR-145-5p, miR-218-5p a miR-34a-5p) pro diagnostiku a prognózu karcinomu cervixu. Problémem diagnostických miRNA panelů je, že nevykazují dostatečnou specifitu, jelikož sdílejí stejné expresní profily s karcinomem prsu nebo vaječnicků. Pro stanovení efektivnosti navržených diagnostických panelů je třeba kromě porovnávání nádorové a kontrolní skupiny daného karcinomu, ověřovat i specifitu mezi příbuznými karcinomy.

## 7 ZÁVĚR

Karcinom cervixu je často se vyskytující malignita u žen, jehož raná fáze bývá latentní. Z důvodu málo citlivých a specifických screeningových metod pro časnou diagnostiku karcinomu cervixu bylo cílem této diplomové práce stanovit relativní expresi vybraných miRNA jako potenciálních diagnostických markerů. V návaznosti na dříve stanovené cíle v této diplomové práci se došlo k následujícím závěrům.

V rámci této práce se nejdříve navrhla normalizační strategie pro výběr nejvhodnější endogenní kontroly. Na základě výsledků dat analýzy real-time PCR a statistických algoritmů se úspěšně podařilo vybrat nejvhodnější endogenní kontrolu, která vykazovala největší stabilitu napříč testovanými vzorky v daném typu tkáně. Jako endogenní kontrola byla vybrána kombinace miR-25-3p a miR-423-5p.

Celkem bylo testováno 70 vzorků karcinomu cervixu a 30 kontrolních vzorků pro stanovení relativní exprese miR-10b-5p, miR-145-5p a miR-182-5p. Pomocí statistické analýzy získaných dat se identifikovala statisticky významně snížená exprese u miR-145-5p a významně zvýšená exprese u miR-182-5p. Kombinace těchto dvou miRNA by mohla být využita jako potenciální diagnostický marker karcinomu cervixu.

Statisticky významná korelace byla zaznamenána u miR-10b-5p v souvislosti s typem prekancerózy a miR-182-5p v souvislosti s perineurálním šířením. Z důvodu malého výběrového souboru v jednotlivých porovnávaných skupinách nelze tyto výsledky považovat za relevantní, ale dávají podnět pro další výzkum. Podnětem pro další výzkum by mohla být také identifikace epigenetických změn podílejících se na přechodu prekancerózních buněk do invazivního karcinomu. To by mohlo být využito pro vývoj preventivních diagnostických testů ještě v premaligním stádiu karcinomu cervixu.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ASC-US	atypical squamous cells of undetermined significance
ASC-H	atypical squamous cells, cannot rule out HSIL
CC	cervical cancer
Cdna	complementary DNA
Ct	cycle treshold
CIN	cervical intraepithelial neoplasia
DDR	DNA damage respond
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DNMT	DNA methyltransferase
FC	fold change
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
dsDNA	double-stranded DNA molecule
GTP	guanosine triphosphate
HPV	human papillomavirus
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesion
miRBase	microRNA Registry
miRNA	mikroRNA
mRNA	messenger RNA
NIH	National Cancer Institute
Pap test	test by Papanicolaou
PCR	polymerase chain reaction
pRb	retinoblastoma protein
pre-miRNA	precursor miRNA
pri-miRNA	primary miRNA transcript
RAN	ras-related nuclear protein
RISC	RNA-induced silencing complex
SCC	squamous cell carcinoma
SCJ	squamocolumnar junction

SEM	standard error of the mean
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
TCGA	The cancer Genome Atlas
TNM	Tumour, Node, Metastasis
WHO	World Health Organization

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1.</b> Celosvětová incidence karcinomu cervixu v roce 2020 ( <i>Globocan 2020</i> ) .....	9
<b>Obrázek 2.</b> Celosvětová mortalita karcinomu cervixu v roce 2020 ( <i>Globocan 2020</i> ) .....	9
<b>Obrázek 3.</b> Incidence a mortalita CC v České republice, vývoj v čase ( <i>Dušek et al. 2005</i> ) .....	10
<b>Obrázek 4.</b> Věkové rozložení pacientek s CC v ČR ( <i>Dušek et al. 2005</i> ) .....	10
<b>Obrázek 5.</b> Model integrace virové DNA (HPV) do hostitelského genomu (podle <i>Senapati et al. 2016</i> ) .....	17
<b>Obrázek 6.</b> Přehled biogeneze miRNA ( <i>Saliminejad et al. 2019</i> ) .....	20
<b>Obrázek 7.</b> Souhrn deregulovaných miRNA s progresí u CC podle <i>Pardini et al. 2018</i> .....	23
<b>Obrázek 8.</b> Věkové rozložení pacientek s CC .....	28
<b>Obrázek 9.</b> Příprava cDNA templátu (podle <i>ThermoFisher Scientific UserGuide, 2022</i> ).....	29
<b>Obrázek 10.</b> Průběh PCR reakce s využitím <i>TaqMan™ Advanced miRNA Assays</i> (podle <i>ThermoFisher Scientific User Guide (2022)</i> ) .....	32
<b>Obrázek 11.</b> Záznam fluorescenčních dat z real-time PCR analyzované pomocí <i>Rotor-Gene Q Series Software</i> .....	33
<b>Obrázek 12.</b> Analýza expresních dat miRNA pomocí webového uživatelské rozhraní <i>ThermoFisher Connect Platform</i> .....	35
<b>Obrázek 13.</b> Pořadí endogenních miRNA kontrol podle hodnoty stability vypočtené algoritmem <i>RefFinder</i> .....	37
<b>Obrázek 14.</b> Pořadí vybraných endogenní miRNA kontrol podle hodnoty stability vypočtené algoritmem <i>BestKeeper</i> .....	37
<b>Obrázek 15.</b> Porovnání relativní exprese testovaných miRNA .....	38
<b>Obrázek 16.</b> Porovnání exprese miR-10b-5p v nádorové a v kontrolní skupině .....	39
<b>Obrázek 17.</b> Porovnání exprese miR-145-5p v nádorové a v kontrolní skupině .....	40
<b>Obrázek 18.</b> Porovnání exprese miR-182-5p nádorové a kontrolní skupiny .....	41
<b>Obrázek 19.</b> ROC křivka kombinace miR-145-5p a miR-182-5p .....	42
<b>Obrázek 20.</b> Vliv exprese vybraných miRNA na věk pacientek s CC .....	45

## 10 SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1.</b> Klinickopatologická data pacientek s CC.....	27
<b>Tabulka 2.</b> Protokol přípravy reakční směsi pro real-time PCR .....	31
<b>Tabulka 3.</b> Reakční podmínky real-time PCR .....	31
<b>Tabulka 4.</b> Seřazené endogenní miRNA na základě genové stability podle nástrojů: <i>Delta Ct</i> , <i>BestKeeper</i> , <i>NormFinder</i> a <i>geNorm</i> .....	36
<b>Tabulka 5.</b> Relativní exprese vybraných miRNA u karcinomu cervixu.....	38
<b>Tabulka 6.</b> Klasifikační tabulka diagnostického multimarkeru (kombinace miR-145 a miR-182) .....	43
<b>Tabulka 7.</b> Korelace exprese miRNA s klinickopatologickými daty pacientek s CC .....	44



## 11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABREU, A. L. P., R. P. SOUZA, F. GIMENES a M. E. L. CONSOLARO. A review of methods for detect human Papillomavirusinfection. *Virology Journal*. 2012, 9(1). ISSN 1743-422X. Dostupné z: doi:10.1186/1743-422X-9-262
2. AFTAB, M., S. S. POOJARY, V. SESHAN, S. KUMAR, P. AGARWAL, S. TANDON, V. ZUTSHI a B. C. DAS. Urine miRNA signature as a potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarker in cervical cancer. *Scientific Reports*. 2021, 11(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-89388-w
3. ALFARO-MORA, Y., L. A. HERRERA, R. CÁCERES-GUTIÉRREZ, M. A. ANDONEGUI-ELGUERA, G. DOMINGUEZ-GÓMEZ a J. DÍAZ-CHÁVEZ. The Role of Epigenetics in Cervical Cancer. *Gynaecological Malignancies - Updates and Advances*. IntechOpen, 2020, 2020-6-17. ISBN 978-1-83880-305-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.89819
4. ALRAJJAL, A., V. PANSARE, M. S. R. CHOUDHURY, M. Y. A. KHAN a V. B. SHIDHAM. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *Cytojournal*. 2021, 18. ISSN 0974-5963. Dostupné z: doi:10.25259/Cytojournal\_24\_2021
5. ANDERSEN, C. L., J. L. JENSEN a T. F. ØRNTOFT. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*. 2004, 64(15), 5245-5250. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
6. ANTON, L., A. DEVINE, L. J. SIERRA, A. G. BROWN a M. A. ELOVITZ. MiR-143 and miR-145 disrupt the cervical epithelial barrier through dysregulation of cell adhesion, apoptosis and proliferation. *Scientific Reports*. 2017, 7(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-03217-7
7. AUDIA, J. E. a R. M. CAMPBELL. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016, 8(4). ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a019521
8. BABION, I., B. C. SNOEK, M. A. VAN DE WIEL, S. M. WILTING a R. D.M. STEENBERGEN. A Strategy to Find Suitable Reference Genes for miRNA Quantitative PCR Analysis and Its Application to Cervical Specimens. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2017, 19(5), 625-637. ISSN 15251578. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmoldx.2017.04.010
9. BALASUBRAMANIAM, S. D., V. BALAKRISHNAN, C. E. OON a G. KAUR. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina*. 2019, 55(7). ISSN 1648-9144. Dostupné z: doi:10.3390/medicina55070384
10. BARTEL, D. P. MicroRNAs. *Cell*. 2004, 116(2), 281-297. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-
11. BARQUET-MUÑOZ, S. A., A. PEDROZA-TORRES, C. PEREZ-PLASENCIA, S. MONTAÑO, L. GALLARDO-ALVARADO, D. PÉREZ-MONTIEL, L. A. HERRERA-MONTALVO a D. CANTÚ-DE LEÓN. MicroRNA Profile Associated with Positive Lymph Node Metastasis in Early-Stage Cervical Cancer. *Current Oncology*. 2022, 29(1), 243-254. ISSN 1718-7729. Dostupné z: doi:10.3390/curroncol29010023
12. BHATLA, N., D. AOKI, D. N. SHARMA a R. SANKARANARAYANAN. Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2018, 143(S2), 22-36. ISSN 00207292. Dostupné z: doi:10.1002/ijgo.12611
13. BHATLA, N., J. S. BEREK, M. CUELLO FREDES, et al. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2019, 145(1), 129-135. ISSN 0020-7292. Dostupné z: doi:10.1002/ijgo.12749
14. BHATLA, N. a S. SINGHAL. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2020, 65, 98-108. ISSN 15216934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008
15. CAI, Y., X. YU, S. HU a J. YU. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. 2009, 7(4), 147-154. ISSN 16720229. Dostupné z: doi:10.1016/S1672-0229(08)60044-3

16. CALIN, G. A., C. D. DUMITRU, M. SHIMIZU, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, 99(24), 15524-15529. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.242606799
17. CANFELL, Karen. Towards the global elimination of cervical cancer. *Papillomavirus Research*. 2019, 8. ISSN 24058521. Dostupné z: doi:10.1016/j.pvr.2019.100170
18. CHANG, K. H., P. MESTDAGH, J. VANDESOMPELE, M. J. KERIN a N. MILLER. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010, 10(1). ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-10-173
19. CHANG, K. H., N. MILLER, E. A. H. KHEIRELSEID, et al. MicroRNA signature analysis in colorectal cancer: identification of expression profiles in stage II tumors associated with aggressive disease. *International Journal of Colorectal Disease*. 2011, 26(11), 1415-1422. ISSN 0179-1958. Dostupné z: doi:10.1007/s00384-011-1279-4
20. CHEN, E. Y., A. TRAN, C. J. RAHO, C. M. BIRCH, C. P. CRUM a M. S. HIRSCH. Histological 'progression' from low (LSIL) to high (HSIL) squamous intraepithelial lesion is an uncommon event and an indication for quality assurance review. *Modern Pathology*. 2010, 23(8), 1045-1051. ISSN 0893-3952. Dostupné z: doi:10.1038/modpathol.2010.85
21. CHUGH, P. a D. P. DITTMER. Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2012, 3(5), 601-616. ISSN 17577004. Dostupné z: doi:10.1002/wrna.1120
22. CONDRAT, C. E., D. C. THOMPSON, M. G. BARBU, et al. MiRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*. 2020, 9(2). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9020276
23. CUI, F., X. LI, X. ZHU, et al. MiR-125b Inhibits Tumor Growth and Promotes Apoptosis of Cervical Cancer Cells by Targeting Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit Delta. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2012, 30(5), 1310-1318. ISSN 1421-9778. Dostupné z: doi:10.1159/000343320
24. DA SILVA, M., B. DE ALBUQUERQUE, T. ALLYRIO, et al. The role of HPV-induced epigenetic changes in cervical carcinogenesis (Review). *Biomedical Reports*. 2021, 15(1). ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2021.1436
25. DAS M.K., Andreassen R., Haugen T.B., Furu K. Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016 Jan-Feb, 13(1), 63-8. PMID: 26708600.
26. DASARI, S., R. WUDAYAGIRI a L. VALLURU. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clinica Chimica Acta*. 2015, 445, 7-11. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2015.03.005
27. DE STROOPER, L. M. A., M. VAN ZUMMEREN, R. D. M. STEENBERGEN, et al. CADM1 , MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2014, 67(12), 1067-1071. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jclinpath-2014-202616
28. DEXHEIMER, P. J. a L. COCHELLA. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020, 8. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2020.00409
29. DROBNA, M., B. SZARZYŃSKA-ZAWADZKA, P. DACA-ROSZAK, M. KOSMALSKA, R. JAKSIK, M. WITT a M. DAWIDOWSKA. Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(10). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19102858
30. DUEÑAS-GONZÁLEZ, A., M. LIZANO, M. CANDELARIA, L. CETINA, C. ARCE a E. CERVERA. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer*. 2005, 4(1). ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/1476-4598-4-38
31. DUNISLAWSKA, A., A. SLAWINSKA a M. SIWEK. Validation of the Reference Genes for the Gene Expression Studies in Chicken DT40 Cell Line. *Genes*. 2020, 11(4). ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11040372

32. DUŠEK, L., J. MUŽÍK, M. KUBÁSEK, J. KOPTÍKOVÁ, J. ŽALOUDÍK a R. VYZULA. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, 2005, verze 7.0 [2007] [cit. 2022-01-03]. ISSN 1802 – 8861. Dostupné z: <http://www.svod.cz>
33. FANG, J., H. ZHANG a S. JIN. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumor Biology*. 2014, 35(6), 5083-5093. ISSN 1010-4283. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-014-1737-z
34. FENG, T., H. WANG, H. SU, H. LU, L. YU, X. ZHANG, H. SUN a Q. YOU. Novel N-hydroxyfurylacrylamide-based histone deacetylase (HDAC) inhibitors with branched CAP group (Part 2). *Bioorg Med Chem*. 2013, 21(17), 5339-5354. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2013.06.009
35. FERLAY, J., M. COLOMBET, I. SOERJOMATARAM, D. M. PARKIN, M. PIÑEROS, A. ZNAOR a F. BRAY. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. 2021, 149(4), 778-789. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.33588
36. GEE, H. E., F. M. BUFFA, C. CAMPS, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *British Journal of Cancer*. 2011, 104(7), 1168-1177. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjc.6606076
37. GROVER, A. a D. PANDEY. Anatomy and Physiology of Cervix. *Colposcopy of Female Genital Tract*. Springer Singapore, 2017, 2017-02-02, s. 3-16. ISBN 978-981-10-1704-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-1705-6\_1
38. HA, M. a V. N. KIM. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014, 15(8), 509-524. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3838
39. HE, S., G. YU, K. PENG a S. LIU. MicroRNA-145-5p suppresses fascin to inhibit the invasion and migration of cervical carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*. 2020, 22(6), 5282-5292. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2020.11592
40. HIRATA, H., K. UENO, V. SHAHRYARI, et al. MicroRNA-182-5p Promotes Cell Invasion and Proliferation by Down Regulating FOXF2, RECK and MTSS1 Genes in Human Prostate Cancer. *PLoS ONE*. 2013, 8(1). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0055502
41. JIMÉNEZ-WENCES, H., O. PERALTA-ZARAGOZA a G. FERNÁNDEZ-TILAPA. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncology Reports*. 2014, 31(6), 2467-2476. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2014.3142
42. KIM, J., F. YAO, Z. XIAO, Y. SUN a L. MA. MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2018, 37(1), 5-15. ISSN 0167-7659. Dostupné z: doi:10.1007/s10555-017-9712-y
43. KESSLER, T. A. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. *Seminars in Oncology Nursing*. 2017, 33(2), 172-183. ISSN 07492081. Dostupné z: doi:10.1016/j.soncn.2017.02.005
44. KNOTH, J., R. PÖTTER, I.M. JÜRGENLIEMK-SCHULZ, et al. Clinical and imaging findings in cervical cancer and their impact on FIGO and TNM staging – An analysis from the EMBRACE study. *Gynecologic Oncology*. 2020, 159(1), 136-141. ISSN 00908258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2020.07.007
45. KRISHNAN, K., A. L. STEPTOE, H. C. MARTIN, et al. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA*. 2013, 19(2), 230-242. ISSN 1355-8382. Dostupné z: doi:10.1261/rna.034926.112
46. LAMBA, V., Y. GHODKE-PURANIK, W. GUAN a J. K. LAMBA. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Research Notes*. 2014, 7(1). ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-7-129
47. LAWRIE, C. H., S. GAL, H. M. DUNLOP, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. 2008, 141(5), 672-675. ISSN 0007-1048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x

48. LEE, R. C., R. L. FEINBAUM a V. AMBROS. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993, 75(5), 843-854. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
49. LEI, C., F. DU, L. SUN, et al. MiR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6. 2017, 8(10), e3101-e3101. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2017.493
50. LEI, J., A. PLONER, K. M. ELFSTRÖM, et al. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020, 383(14), 1340-1348. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1917338
51. LI, W., C. LI, Q. XIONG, X. TIAN a Q. RU. MicroRNA-10b-5p downregulation inhibits the invasion of glioma cells via modulating homeobox B3 expression. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2019.7506
52. LIVAK, K. J. a T. D. SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001, 25(4), 402-408. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1006/meth.2001.1262
53. LONGO, D. L. a S. E. BATES. Epigenetic Therapies for Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020, 383(7), 650-663. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1805035
54. LUDMIR, J. a H. M. SEHDEV. Anatomy and Physiology of the Uterine Cervix. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2000, 43(3), 433-439. ISSN 0009-9201. Dostupné z: doi:10.1097/00003081-200009000-00003
55. MAO, Z., M. BOZZELLA, A. SELUANOV a V. GORBUNOVA. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair*. 2008, 7(10), 1765-1771. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.018
56. MARTH, C., F. LANDONI, S. MAHNER, M. MCCORMACK, A. GONZALEZ-MARTIN a N. COLOMBO. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017, 28(suppl\_4), 72-83. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdx220
57. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. *Ministerstvo zdravotnictví prosazuje rozšíření prevence karcinomu děložního čípku* [online]. 2020 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://www.mzcr.cz/tiskove-centrum-mz/ministerstvo-zdravotnictvi-prosazuje-rozsireni-prevence-karcinomu-delozniho-cipku>
58. MiRBase: the microRNA database [online]. version 22.1: University of Manchester, 2018 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://www.mirbase.org/>
59. MOORE, L. D., T. LE a G. FAN. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 2013, 38(1), 23-38. ISSN 0893-133X. Dostupné z: doi:10.1038/npp.2012.112
60. National Cancer Institute. HPV and Pap testing [online]. 2019 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/types/cervical/pap-hpv-testing-fact-sheet>
61. NILSEN, A., T. HILLESTAD, V. E. SKINGEN, et al. MiR-200a/b/-429 downregulation is a candidate biomarker of tumor radioresistance and independent of hypoxia in locally advanced cervical cancer. *Molecular Oncology*. 2022, 16(6), 1402-1419. ISSN 1574-7891. Dostupné z: doi:10.1002/1878-0261.13184
62. NILSEN, A., M. JONSSON, E.-K. AARNES, G. B. KRISTENSEN a H. LYNG. Reference MicroRNAs for RT-qPCR Assays in Cervical Cancer Patients and Their Application to Studies of HPV16 and Hypoxia Biomarkers. *Translational Oncology*. 2019, 12(3), 576-584. ISSN 19365233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2018.12.010
63. O'BRIEN, J., H. HAYDER, Y. ZAYED a C. PENG. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*. 2018, 9. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2018.00402

64. PARDINI, B., D. DE MARIA, A. FRANCAVILLA, C. DI GAETANO, G. RONCO a A. NACCARATI. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. *BMC Cancer*. 2018, 18(1). ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/s12885-018-4590-4
65. PASQUINELLI, A. E., B. J. REINHART, F. SLACK, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000, 408(6808), 86-89. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35040556
66. PELTIER, H. J. a G. J. LATHAM. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008, 14(5), 844-852. ISSN 1355-8382. Dostupné z: doi:10.1261/rna.939908
67. PENG, Y. a C. M. CROCE. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2016, 1(1). ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/sigtrans.2015.4
68. PEREIRA, P. M., J. P. MARQUES, A. R. SOARES, L. CARRETO, M. A. S. SANTOS a A. BRANDSTAETTER. MicroRNA Expression Variability in Human Cervical Tissues. *PLoS ONE*. 2010, 5(7). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0011780
69. PYEON, D., S. M. PEARCE, S. M. LANK, P. AHLQUIST, P. F. LAMBERT a K. MÜNGER. Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLoS Pathogens*. 2009, 5(2). ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1000318
70. QIAN, K., T. PIETILÄ, M. RÖNTY, et al. Identification and Validation of Human Papillomavirus Encoded microRNAs. *PLoS ONE*. 2013, 8(7). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0070202
71. RODRIGUEZ, N. M. Participatory innovation for human papillomavirus screening to accelerate the elimination of cervical cancer. *The Lancet Global Health*. 2021, 9(5), e582-e583. ISSN 2214109X. Dostupné z: doi:10.1016/S2214-109X(20)30522-2
72. SALIMINEJAD, K., H. R. KHORRAM KHORSHID, S. SOLEYMANI FARD a S. H. GHAFARI. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*. 2019, 234(5), 5451-5465. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.27486
73. SCHMIDT, D. Plattenepitheliale Präkanzerosen der Cervix uteri. *Der Pathologe*. 2019, 40(1), 7-12. ISSN 0172-8113. Dostupné z: doi:10.1007/s00292-018-0561-4
74. SCHWARZENBACH, H., A. M. DA SILVA, G. CALIN a K. PANTEL. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clinical Chemistry*. 2015, 61(11), 1333-1342. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2015.239459
75. SEHNAL, B., E. KMONÍČKOVÁ, J. SLÁMA, V. TOMANCOVÁ a M. ZIKÁN. Current FIGO Staging for Carcinoma of the Cervix Uteri and Treatment of Particular Stages. *Klinická Onkologie*. 2019, 32(3). ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko2019224
76. SENAPATI, R., N. N. SENAPATI a B. DWIBEDI. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infectious Agents and Cancer*. 2016, 11(1). ISSN 1750-9378. Dostupné z: doi:10.1186/s13027-016-0107-4
77. SHAO, M. X., AZ QU a YY ZHONG. Expression level of miRNA-210-3p in cervical cancer and its prognostic potential. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020, 24(12), 6583-6588. Dostupné z: doi:10.26355/eurrev\_202006\_21643
78. SI, M. L., S. ZHU, H. WU, Z. LU, F. WU a Y-Y MO. MiR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007, 26(19), 2799-2803. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1210083
79. SILVER, N., S. BEST, J. JIANG a S. L. THEIN. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 2006, 7(1). ISSN 1471-2199. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2199-7-33
80. SMALL, W., M. A. BACON, A. BAJAJ, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017, 123(13), 2404-2412. ISSN 0008543X. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.30667

81. SOLÉ, C., T. MOLINÉ, M. VIDAL, J. ORDI-ROS a J. CORTÉS-HERNÁNDEZ. An Exosomal Urinary miRNA Signature for Early Diagnosis of Renal Fibrosis in Lupus Nephritis. *Cells*. 2019, **8**(8). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8080773
82. SOTO, D., C. SONG a M. E. MCLAUGHLIN-DRUBIN. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. *Viruses*. 2017, **9**(9). ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v9090248
83. STANLEY, M. HPV vaccination in boys and men. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014, **10**(7), 2109-2111. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.4161/hv.29137
84. SUNG, H., J. FERLAY, R. L. SIEGEL, M. LAVERSANNE, I. SOERJOMATARAM, A. JEMAL a F. BRAY. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021, **71**(3), 209-249. ISSN 0007-9235. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21660
85. SZAREWSKI, A. HPV Vaccination and Cervical Cancer. *Current Oncology Reports*. 2012, **14**(6), 559-567. ISSN 1523-3790. Dostupné z: doi:10.1007/s11912-012-0259-3
86. TANG, T., H. K. WONG, W. GU, et al. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2013, **129**(1), 199-208. ISSN 00908258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2012.12.043
87. THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK (TCGA). Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. 2017, **543**(7645), 378-384. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature21386
88. ThermoFisher Scientific. TaqMan® Advanced miRNA Assays: USER GUIDE. Publication Number: 100027897 (Revision C), Catalog Number: A25576. [cit. 2022-04-19].
89. TOPPER, M. J., M. VAZ, K. A. MARRONE, J. R. BRAHMER a S. B. BAYLIN. The emerging role of epigenetic therapeutics in immuno-oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020, **17**(2), 75-90. ISSN 1759-4774. Dostupné z: doi:10.1038/s41571-019-0266-5
90. VALENCIA-SANCHEZ, M. A., J. LIU, G. J. HANNON a R. PARKER. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs: Table 1. 2006, **20**(5), 515-524. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1399806
91. VANDESOMPELE, J., K. DE PRETER, F. PATTYN, B. POPPE, N. VAN ROY, A. DE PAEPE a F. SPELEMAN. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002, **3**(7), 1-12. ISSN 14656906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
92. VU, M., J. YU, O. A. AWOLUDE a L. CHUANG. Cervical cancer worldwide. *Current Problems in Cancer: Case report*. 2018, **42**(5), 457-465. ISSN 01470272. Dostupné z: doi:10.1016/j.currproblcancer.2018.06.003
93. WAHID, F., A. SHEHZAD, T. KHAN a Y. Y. KIM. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2010, **1803**(11), 1231-1243. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.013
94. WANG, X., H. K. WANG, Y. LI, et al. MicroRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, **111**(11), 4262-4267. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1401430111
95. WEINHOLD, Bob. Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspectives*. 2006, **114**(3). ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.114-a160
96. WHO. "Draft: global strategy towards the elimination of cervical cancer as a public health problem." Geneva, 2019.
97. WEN, C. X., H. L. TIAN, E. CHEN, J. F. LIU a X. X. LIU. MiRNA-873-5p Acts as a Potential Novel Biomarker and Promotes Cervical Cancer Progression by Regulating ZEB1 via Notch Signaling Pathway. *Dose-Response*. 2021, **19**(1). ISSN 1559-3258. Dostupné z: doi:10.1177/15593258211001255

98. XIANG, M., Y. ZENG, R. YANG, et al. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014, 454(1), 210-214. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.064
99. XIE, F., P. XIAO, D. CHEN, L. XU a B. ZHANG. MiRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*. 2012, 80(1), 75-84. ISSN 0167-4412. Dostupné z: doi:10.1007/s11103-012-9885-2
100. XU, J., W. ZHANG, Q. LV a D. ZHU. Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN. *Oncology Reports*. 2015, 33(6), 3108-3116. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2015.3931
101. XU, K., J. LIN, R. ZANDI, J. A. ROTH a L. JI. MicroRNA-mediated target mRNA cleavage and 3'-uridylation in human cells. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep30242
102. YAMAMOTO, N., T. KINOSHITA, N. NOHATA, et al. Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*. 2013, 43(6), 1855-1863. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2013.2145
103. YANG, J., J. HAI, X. DONG, M. ZHANG a S. DUAN. MicroRNA-92a-3p Enhances Cisplatin Resistance by Regulating Krüppel-Like Factor 4-Mediated Cell Apoptosis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cervical Cancer. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, 12. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021.783213
104. Yu F., Liu J., Dong W., Xie J., Zhao X. The diagnostic value of miR-145 and miR-205 in patients with cervical cancer. *Am J Transl Res*. 2021;13(3):1825-1832.
105. ZHANG, X., Z. C. XU, J. XU, et al. Selection and validation of reference genes for normalization of quantitative real-time reverse transcription PCR analysis in *Poria cocos* (Schw.) Wolf (Fuling). *Chinese Medicine*. 2016, 11(1). ISSN 1749-8546. Dostupné z: doi:10.1186/s13020-016-0079-8
106. ZHANG, Y., D. ZHANG, F. WANG, D. XU, Y. GUO a W. CUI. Serum miRNAs panel (miR-16-2\*, miR-195, miR-2861, miR-497) as novel non-invasive biomarkers for detection of cervical cancer. *Scientific Reports*. 2016, 5(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep17942
107. ZHAO, X., J. DOU, J. CAO, et al. Uncovering the potential differentially expressed miRNAs as diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma based on machine learning in The Cancer Genome Atlas database. *Oncology Reports*. 2020. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2020.7551
108. ZOU, D., Q. ZHOU, D. WANG, L. GUAN, L. YUAN a S. LI. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2016, 24(2), 99-108. ISSN 0965-0407. Dostupné z: doi:10.3727/096504016X14611963142173