

Stanovení cirkulujících mikroRNA u pacientů s melanomem

Zuzana Nováčková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 3. ročník

Školitelé: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Ústav Biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

Východisko: V posledních letech celosvětově narůstá počet pacientů s nádorovým onemocněním pigmentových buněk kůže, maligním melanomem. Ačkoliv mezi nejčastěji používané metody diagnostiky maligního melanomu patří chirurgická biopsie, mnohé výzkumy poukazují na výhody tekuté biopsie a využití cirkulujících molekul mikroRNA z periferní krve jako nových biomarkerů. Díky svým vlastnostem lze molekuly miRNA zvažovat za nové biomarkery kromě včasné detekce onemocnění maligní melanom, také při volbě vhodné léčby a detekci případné recidivy onemocnění.

Cíl: Cílem této práce je izolace molekul RNA ze vzorků plazmy periferní krve pacientů léčených pro melanom, zjištění výtěžnosti metody a čistoty izolované RNA. Součástí je také stanovení hladin exprese izolované miRNA metodou RT real-time PCR a zhodnocení, zda některé z vybraných mikroRNA vykazují specifický vztah k době celkového přežití (OS) a bezpříznakového období (DFI) u pacientů s melanomem.

Metodika: 50 anonymizovaných vzorků plazmy mužů i žen léčených pro maligní melanom bylo izolováno kolonkovou metodou s využitím soupravy QIAGEN miRNeasy Serum/Plazma Kit. Následně byla získaná RNA měřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 od firmy NanoDrop Technologies. Kromě získaných hodnot koncentrace RNA byla vypočtena čistota poměrem absorbcí při 260 a 280 nm, tedy A_{260}/A_{280} . Dále bylo u 44 vzorků provedeno stanovení hladin exprese panelu miRNA metodou RT real-time PCR. První částí metody byla reverzní transkripce, pro kterou byla použita souprava Taq man MicroRNA Reverse Transcription Kit. Následně byla získaná RT-cDNA využita jako templát pro druhou část metody, kterou byla analýza Real-time PCR s pomocí Taq Man Universal Master Mix II a Taq Man MicroRNA Assay.

Výsledky: Po statistickém zhodnocení získaných hodnot koncentrace RNA bylo zjištěno, že 29 vzorků (tj. 58 %) odpovídá koncentraci 10–20 ng/μl, což je dostatečná koncentrace pro následnou analýzu metodou RT real-time PCR. Zbýlých 21 vzorků (tj. 42 %) jsou pro následné stanovení více než uspokojivé, neboť se pohybují v rozmezí 20–100 ng/μl. Žádný vzorek neměl koncentraci nižší než 10 ng/μl.

Po statistickém zhodnocení získaných hodnot čistoty RNA bylo zjištěno, že 1 vzorek má hodnotu čistoty nižší než 1,30, tedy nevhodnou k dalšímu stanovení. Zbýlých 49 vzorků (tj. 98 %) se pohybovalo hodnotami čistoty v rozmezí 1,30 – 1,80, což je dle zkušeností laboratoře čistota dostačující pro následné stanovení.

Analýza metodou RT real-time PCR byla provedena u 44 vzorků, které byly vybrány na základě klinických parametrů pacientů. Hladiny expresí sledovaných mikroRNA se pohybovaly průměrně mezi hodnotami 30–33, z čehož vyplývá, že reakce byly ve většině případů pozitivní, avšak množství amplifikované miRNA se pohybovalo ve středních hodnotách.

Z celého panelu 25 mikroRNA byly získány významné hodnoty expresí u 5 miRNA, jejichž před a pooperační hladiny vykazují signifikantní vztah s délkou bezpříznakového období (viz Tabulka 1) a 6 miRNA, jejichž před a pooperační hladiny vykazují signifikantní vztah s délkou celkového přežití pacienta (viz Tabulka 2):

Tabulka 1: Významné miRNA a jejich hladiny exprese v souvislosti s délkou bezpříznakového období (DFI).

Významné miRNA	Hladiny jejich exprese	Odhad DFI [měsíce]	P hodnota
miR-320	Nízká	40,1	0,009
	Vysoká	17,2	
miR-494	Nízká	43	0,018
	Vysoká	17,3	
miR-1980	Nízká	40,6	0,001
	Vysoká	15	
miR-4487	Nízká	36,2	0,048
	Vysoká	23,7	
miR-99a	Nízká	41,6	0,008
	Vysoká	15,4	

Tabulka 2: Významné miRNA a jejich hladiny exprese v souvislosti s délkou celkového přežití (OS).

Významné miRNA	Hladiny jejich exprese	Odhad OS [měsíce]	P hodnota
miR-221	Nízká	40,8	0,026
	Vysoká	27,9	
miR-320	Nízká	44,4	0,016
	Vysoká	21,9	
miR-494	Nízká	Nehodnotitelné	0,009
	Vysoká	15	
miR-1260	Nízká	40,8	0,026
	Vysoká	28	
miR-1980	Nízká	40,9	0,024
	Vysoká	22	
miR-99a	Nízká	42,2	0,017
	Vysoká	20,7	

Závěr: Získané výsledky představují přínosné informace pro výzkum Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Pokud by se po provedení analýzy všech stovek vzorků zařazených do výzkumu potvrdily výsledky prezentované v bakalářské práci, mohly by výše jmenované molekuly mikroRNA nalézt v budoucnu uplatnění jako prognostické markery při rozhodování o adjuvantní léčbě pacientů léčených pro melanom.