

Received: 05.11.2019
Accepted: 20.08.2020
Published: 18.01.2021

Rola miRNA w rozwoju wybranych nowotworów – potencjalne zastosowanie w diagnostyce*

The role of miRNA in selected tumors development: Potential use in diagnostics

Patrycja Paciorek, Mariusz Żuberek, Agnieszka Grzelak

Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

*Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2017–2019, jako projekt badawczy w ramach programu „Diamantowy Grant”.

Streszczenie:

MikroRNA (miRNA) są małymi cząsteczkami kwasu rybonukleinowego, które mimo że nie podlegają procesowi translacji, pełnią ważną funkcję regulacyjną w komórkach eukariotycznych. Ich fizjologiczną funkcją jest utrzymywanie homeostazy komórek. Zaburzona ekspresja miRNA może spowodować rozwój wielu chorób, w tym chorób nowotworowych. Działanie miRNA polega na hamowaniu tworzenia się białek, w tym białek o właściwościach onkogennych i antyonkogennych. Mutacje w miejscach kodowania miRNA mogą prowadzić do nadmiernego lub zmniejszonego wytwarzania wspomnianych białek. Odkrycie miRNA i poznanie ich roli w komórce otworzyło nowe możliwości dla diagnostyki chorób nowotworowych. Zmiany poziomu odpowiednich miRNA, w krwiobiegu lub innych płynach ustrojowych, mogą być markerem diagnostycznym chorób. Diagnostyka onkologiczna mogłaby przebiegać na podstawie badań profilu miRNA pacjenta i porównania go z opracowanymi wcześniej profilami zmian miRNA powiązanych z występowaniem danego rodzaju choroby nowotworowej. Informacja o zmianach profilu miRNA podstawowych w regulacji ekspresji genów związanych z procesami nowotworzenia, mogłaby się przyczynić do opracowania terapii eksperymentalnych opartych na przywróceniu pierwotnego poziomu miRNA w komórkach, a tym samym, na przywróceniu prawidłowej regulacji ekspresji genów. Coraz nowsze metody wyciszania i włączania ekspresji miRNA mogą w przyszłości zaowocować skutecznymi rozwiązaniami terapeutycznymi.

Słowa kluczowe:

miRNA, nowotworzenie, diagnostyka onkologiczna

Summary:

MicroRNAs (miRNAs) are small ribonucleic acid molecules that, although not translated, perform an important regulatory function in eukaryotic cells. Their physiological function is to maintain cell homeostasis. Impaired miRNA expression can cause the development of many diseases including cancer. MiRNA biological activity is based on inhibiting the formation of proteins, including oncogenic and anti-oncogenic proteins. Mutations at the coding sites for such miRNAs can lead to overproduction or reduction of the production of the above-mentioned proteins. The discovery of miRNAs and understanding their role in the cell opened new ways for diagnosing cancer. Therefore, changes in the level of relevant miRNAs in the bloodstream or other bodily fluids can be a diagnostic marker of disease. Oncological diagnostics could be based on examining the patient's miRNA profile and comparing it with previously developed profiles of miRNAs changes associated with the occurrence of a given type of cancer. Information on changes in miRNA profiles that are key to regulating gene expression associated with tumorigenic processes could contribute to the development of experimental therapies based on restoring the original level of miRNA in cells and thereby restoring normal regulation of gene expression. New methods of silencing and enabling miRNA expression may, in the future, result in effective therapeutic solutions.

Keywords:	miRNA, neoplasia, oncological diagnostics
GICID	01.3001.0014.6578
DOI:	10.5604/01.3001.0014.6578
Word count:	4 275
Tables:	2
Figures:	–
References:	120
Adres autorki:	mgr Patrycja Paciorek, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: patrycja.paciorek@edu.uni.lodz.pl

BUDOWA I DOJRZEWANIE mikroRNA

MikroRNA (miRNA) występują w komórkach zwierzęcych i roślinnych; składają się zazwyczaj z 19–25 nukleotydów i regulują ekspresję ponad 30% genomu u ssaków [76]. Zapewniają homeostazę wewnątrzkomórkową przez negatywną regulację ekspresji genów.

Cząsteczki miRNA odkryto pod koniec XX w., kiedy naukowcy wprowadzili do petunii (*Petunia hybryda*) kopię genu odpowiedzialnego za kodowanie syntazy chalkonowej, w celu wywołania jej nadekspresji. Wprowadzona kopia genu spowodowała zablokowanie biosyntezy antocyjanin, a stężenie mRNA odpowiedzialnego za powstawanie syntazy chalkonowej w powstałych roślinach spadł 50-krotnie; a eksperyment nazwano „kosupresją” [66]. Mechanizm tego procesu poznano ostatecznie na zwierzęcym modelu badawczym nicienia *Caenorhabditis elegans*. Opisane przez Fire i Melo doświadczenie wytłumaczyło proces, a nazwano go „interferencją RNA” [23].

Przełom XX i XXI w. był okresem intensywnych badań nad strukturą i pochodzeniem miRNA. Wysiłki naukowców skoncentrowały się na wyjaśnieniu mechanizmu powstawania tych swoistych cząsteczek oraz określeniu ich znaczenia w utrzymywaniu homeostazy organizmu.

Ekspresja genów miRNA jest ściśle kontrolowana przez swoje i nieswoiste dla miRNA czynniki transkrypcyjne. Każde miRNA wywodzi się z pierwotnego RNA (primary miRNA, pri-miRNA) o strukturze pętli, które jest transkrybowane przez polimerazę II RNA. Przechodzi przez dwuetapową fazę dojrzewania. Pierwszy etap odbywa się w jądrze komórkowym, gdzie enzym Drosha o aktywności rybonukleazy i pri-miRNA łączą endonukleazę DGCR8, a to powoduje cięcie podwójnej nici pri-miRNA i wytworzenie 70-nukleotydowego pre-miRNA. Następnie pre-miRNA jest transportowane do cytoplazmy za pomocą eksportyny-5. W cytoplazmie rozpoczyna się drugi etap dojrzewania miRNA. Enzymy Dicer i pre-miRNA łączą się z białkiem TRBP (TAR RNA binding protein). W wyniku tego połączenia wytwarzane są 22-nukleotydowe miRNA. Dupleks miRNA przyłączony zostaje do kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex), gdzie wiodąca nić miRNA jest zachowana, a pozostała część ulega degradacji. Kompleks RISC

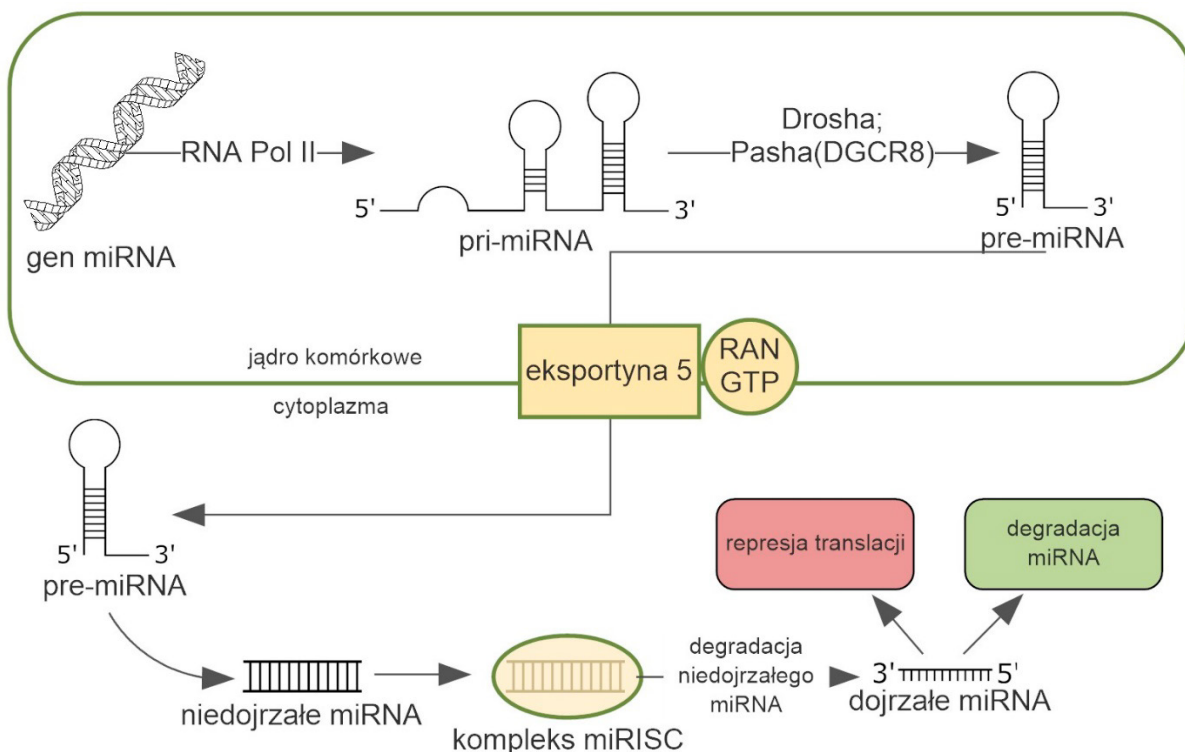
naprowadzany jest na właściwe mRNA w celu regulacji ekspresji genu, która jest przeprowadzana na dwa sposoby w zależności od poziomu dopasowania miRNA do mRNA. Przy idealnej komplementarności kompleks RISC przeprowadza degradację nici mRNA, podczas gdy nieidealne dopasowanie prowadzi do przyłączenia się końca 5' miRNA do końca 3' regionu UTR, wywołując represję translacji. Rozpoznawanie mRNA przez miRNA opiera się na komplementarności sekwencji na kilku zasadach: od końca 5, miRNA, gdzie znajduje się tzw. „region seedsequence”, na podstawie którego dopracowywana jest coraz większa liczba zaawansowanych technologicznie algorytmów bioinformatycznych do przewidywania potencjalnych genów docelowych miRNA [10]. Na ryc. 1 przedstawiono proces dojrzewania miRNA.

Początkowo przypuszczano, że z jednego łańcucha pre-miRNA powstaje jedna dojrzała cząsteczka miRNA. Obecnie wiadomo, że poza podstawowym miRNA, nazywanym miRNA referencyjnym, ten sam gen może kodować również inne miRNA wywodzące się z tego samego ramienia pre-miRNA. Mają nieco zmienioną długość łańcucha, który powstaje przez addycję, delecję lub obie mutacje nukleotydów na końcach 5' i 3'. Takie cząsteczki nazywane są iso-miRNA i mogą obierać za cel inne łańcuchy mRNA, niż miRNA referencyjne [10]. Ponadto iso-miRNA mogą działać jako wzmacniacze połączeń między referencyjnym mikroRNA, a jego docelową nicią jest mRNA i dzięki nim nawet kilka komplementarnych nukleotydów między miRNA a mRNA może spowodować blokowanie powstawania białkowego produktu [30].

Następstwem odkrycia miRNA są intensywne badania nad ich rolą w powstawaniu chorób. Powiązanie między patologią chorób a miRNA stało się pewne, kiedy odkryto specyfikę tkankową ekspresji miRNA oraz wskazano na ich rolę w kontroli procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach.

FUNKCJA miRNA W REGULACJI PROCESÓW NOWOTWOROWYCH

Choroby nowotworowe, mimo istnienia rokujących terapii, są nadal jedną z najgroźniejszych chorób. Według raportu WHO w 2018 r., są drugą najczęstszą przyczyną zgonów. Wśród nowotworów powodujących największą



Ryc. 1. Proces dojrzewania miRNA

śmiertelność wśród ludzi wymienia się głównie nowotwory płuca, wątroby, piersi oraz układu pokarmowego [96]. W tabeli 1 zestawiono miRNA z ich rolą w metabolizmie komórki nowotworowej.

Tezę o zaangażowaniu mikroRNA w proces nowotworzenia zweryfikowano pozytywnie. Dowiedziono, że ekspresja ponad 30% genów ludzkich jest kontrolowana przez miRNA. Wiadomo również, że jednym z czynników, które przyczyniają się do nowotworzenia są zmiany w poziomie ekspresji miRNA zarówno w tkance zmienionej nowotworowo, jak i w otaczających ją tkankach.

Komórki nowotworowe, bez względu na pochodzenie tkankowe, charakteryzują się niskim stopniem zróżnicowania, zwiększoną proliferacją, szybszym wzrostem i zmianami w systemach odpowiedzialnych za śmierć komórkową. Badania wykazują, że miRNA są zdolne do kontroli tych procesów [81]. Wiele genów miRNA jest umiejscowionych w wrażliwych (szczególnie podatnych na uszkodzenia) miejscach genomu, które ulegają częstej amplifikacji lub delecji w procesie kancerogenezy [75].

ROLA miRNA W POWSTAWANIU NOWOTWORÓW PIERSI

Nowotwory piersi są drugą najczęstszą przyczyną zgonów wywołanych przez nowotwory na świecie [96]. Powodem tak dużej śmiertelności jest wysoki stopień złośliwości guzów, a następnie przerzuty w całym organizmie. Guzy mogą się tworzyć tylko w jednym obszarze, jednak najczęściej komórki nowotworowe wydostają się poza obręb gruczołów i kanałów, w których zwykle dojrzewają i migrują

do sąsiadujących tkanek. Badanie zmian w profilu miRNA stwarza nowe możliwości diagnostyczne. Ocenia się, że miRNA, które są stabilne i wykrywane w krwiobiegu można uznać za markery rozwoju choroby nowotworowej. Analizując profil ekspresji miRNA w krwi pobranej od pacjentów z nowotworem piersi oraz od grupy kontrolnej, wykazano zwiększony poziom ekspresji miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-145, miR-155, miR-191 i miR-382 u pacjentów z rozwijającym się nowotworem [59]. Różnice w ekspresji między tymi grupami wskazują, że miRNA mogą być wykorzystane w niedalekiej przyszłości w diagnostyce i ocenie stopnia zaawansowania tej choroby.

Równie ważne jak diagnostyczne możliwości, jakie dają miRNA, są badania nad opracowywaniem terapii antynowotworowych bądź poprawiania terapii już istniejących. Przykładem miRNA, które może pełnić istotną rolę w diagnostyce nowotworów piersi, jest miR-203. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały zwiększoną ekspresję miR-203 w tkankach nowotworu piersi w porównaniu do jego poziomu w komórkach prawidłowych oraz ujawniły, że białko SOCS3 może podlegać regulacji przez miR-203. SOCS3 to białko antyonkogenne; w nowotworach piersi potwierdzono jego antyproliferacyjne działanie. W opisywanych badaniach sprawdzono, czy wyciszenie miR-203 będzie miało wpływ na oporność komórek nowotworowych na powszechnie stosowany chemioterapeutyk – cisplatynę. Okazało się, że zahamowanie ekspresji miR-203 uwrażliwia komórki na cisplatynę. Jest to spowodowane podwyższeniem ekspresji SOCS3, którego powstawanie było wcześniej hamowane przez miR-203. Hamowanie ekspresji miR-203 przyczyniało

Tabela 1. Rola miRNA w metabolizmie komórek ulegających transformacji nowotworowej [29, 47]

Regulowany proces	miRNA
Hamowanie proliferacji	<i>klaster miR17-92, miR-21</i>
Hamowanie działania antyapoptozy	<i>miR-21, miR-126</i>
Unikanie eliminacji przez komórki układu odpornościowego	<i>miR-21, miR-155, klaster miR17-92</i>
Nieśmiertelność replikacyjna	<i>let-7, miR-10b, miR-16, miR-21, miR-221/222</i>
Promowanie stanu zapalnego	<i>let-7d, miR-21, miR-23b, miR-126, miR-155, miR-200c</i>
Aktywacja przerzutowania	<i>let-7d, miR-10b, miR-15b, miR-21, miR-29</i>
Odkrycie, że miRNA pełni rolę w regulacji prawie wszystkich etapów cyklu komórkowego umożliwiło powiązanie stężenia miRNA w komórkach z procesem transformacji nowotworowej. Indukcja angiogenezy	<i>let-7, miR-15b, miR-21, miR-125, miR155, miR-200, miR17/20/106</i>
Gromadzenie mutacji, niestabilność materiału genetycznego	<i>miR-21, miR-15b, miR-155</i>
Zapobieganie śmierci komórki	<i>let-7, miR-15b, miR-16, miR-21, miR-34a</i>
Zaburzenia metabolizmu energetycznego	<i>let-7, miR-15b, miR-21, miR-23a/b, miR-155</i>

się do indukcji przez cisplatynę apoptozy w komórkach nowotworu płuca [73].

Rola miR-203 jako „onkogenu” w komórkach raka piersi została potwierdzona przez liczne badania. Dowiedziono, że cząsteczka ta nie tylko wycisza SOCS3, lecz także zwiększa ekspresję pStat3 i pERK i c-Myc, które stymulują proliferację komórek raka piersi z nadekspresją receptora estrogenowego. Ponadto hamowanie miR-203 w komórkach raka piersi z ekspresją receptora estrogenowego hamuje proliferację komórek przez hamowanie cykliny D1 i pStat3, przez co wstrzymany jest wzrost guza [64].

Eksperymenty dotyczące izomiRów zaangażowanych w powstawanie i przerzutowanie nowotworów piersi wykazały, jak ważną rolę mogą one pełnić w terapiach i rozpoznaniu nowotworu. Dowiedziono, że dzięki profilowaniu izomiRów można precyzyjniej niż za pomocą profilowania miRNA referencyjnych rozróżnić komórki nowotworu piersi od komórek niezmienionych. Diagnostyka oparta na profilowaniu izomiRów ma również ograniczenia. W badaniach prowadzonych w Stanach Zjednoczonych odkryto, że inne grupy izomiRów pojawiają się u Afroamerykanek, a inne u kobiet o pochodzeniu europejskim, więc przy diagnozie nowotworu piersi, badając ekspresję różnych izomiRów, należy to uwzględnić [84].

Działanie izomiRNA i miRNA kanonicznych może wykazywać synergii; czasem ich wspólne działanie jest intensywniejsze, niż każdego miRNA osobno. Naukowcy z Niemieckiego Centrum Badań nad Rakiem w Heidelbergu przeprowadzili analizę danych sekwencjonowania linii komórkowych wywodzących się z raka piersi. Na ich podstawie stwierdzono, że 5'isomiR-140-3p wywodzący się z hsa-miR-140-3p, oraz kanoniczny miRNA mają znacznie wyższą ekspresję w komórkach raka piersi niewykazujących ekspresję receptora estrogenowego, niż w komórkach

prawidłowych. Natomiast odwrotną sytuację zauważono u pacjentów z maszynymi przerzutami, gdzie ich był znacznie mniejszy w tkankach nowotworu piersi niż w tkankach zdrowych. Hsa-miR-140-3p kontroluje proliferację i regenerację komórek raka piersi, a więc i jego ekspresja jest skorelowana z nowotworzeniem w obrębie gruczołów sutkowych. Zwiększona ekspresja 5'isomiR-140-3p zmniejsza żywotność komórek, prawdopodobnie przez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1, czego nie zaobserwowano w przypadku kanonicznego miRNA. 5'isomiR-140-3p pełni ważną rolę w przejściu epitelialno-mezenchymalnym. Zwiększenie jego ekspresji zmniejsza zdolność komórki do migracji. 5'isomiR-140-3p kontroluje ekspresję COL4A1, ITGA6 oraz MARCKSL1. Zmniejszenie ekspresji COL4A1 i ITGA6 zmniejsza żywotność komórek i zatrzymuje cykl komórkowy, natomiast MARCKSL1 zmniejsza potencjał migracyjny komórek. Analizy miRNA na komórkach MCF10A, MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468 wskazują korzystny wpływ wyższej ekspresji 5'isomiR-140-3p oraz miRNA kanonicznego na organizm. Zwiększona ekspresja hsa-miR-140-3p i 5'isomiR-140-3p powoduje zatrzymanie proliferacji komórek nowotworowych przez negatywną regulację produktów białkowych wspomnianych genów [74]. Wzmaganie działania tych dwóch miRNA mogłoby przynieść dobre rezultaty w raku piersi lub mogłoby wzmacniać skutki znanych do tej pory terapii.

Możliwości zastosowań miRNA w diagnostyce i leczeniu jest wiele i prawdopodobnie będą coraz szerzej stosowane w celu zwalczania chorób nowotworowych.

ROLA miRNA W POWSTAWANIU NOWOTWORÓW PŁUCA

Według danych WHO z 2018 r. powodem największej liczby zgonów wśród chorób nowotworowych jest nowotwór płuca. Na 8,8 mln zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi, 1,69 mln zgonów było z powodu

raka płuca [96]. Powodem tak wysokiej śmiertelności jest zwykle późne rozpoznanie i brak możliwości skutecznego leczenia. Pacjenci z zaawansowanym stadium guza najczęściej mogą liczyć jedynie na pomoc paliatywną i wielu z nich umiera kilka miesięcy po otrzymaniu diagnozy. Dlatego bardzo potrzebne jest więc opracowanie markerów, dzięki którym można by wcześniej wykryć guz oraz rozróżnić podtypy nowotworów płuca. Pozwoliłoby to na prognozowanie kierunków ich dalszego rozwoju i pomogło przy wyborze odpowiedniego leczenia [15].

Dowiedziano, że w wielu schorzeniach płuca, takich jak mukowiscydoza, astma, przewlekła obturacyjna choroba płuca, idiopatyczne zwłóknienie płuca czy nowotwory płuca ekspresja miRNA ulega zmianie, co potwierdza możliwość ich wykorzystania w diagnostyce [17].

85% przypadków występowania raka płuca obejmuje niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC: non-small-cell lung carcinoma). W DNA izolowanym z guzów pacjentów, u których zdiagnozowano NSCLC mogą występować mutacje przyczyniające się do wywołania lekooporności guza. Najpopularniejszymi mutacjami w tym schorzeniu są mutacje genu *EGFR* (epidermal growth factor receptor) i *ALK* (anaplastic lymphoma kinase). W terapii tego rodzaju nowotworów stosuje się substancje chemiczne działające na zasadzie inhibitorów produktów białkowych tych genów. Przez występowanie w komórkach zjawiska lekooporności, terapia nie zawsze jest skuteczna. Szanse na przeżycie pacjenta zmniejsza przekształcanie się komórek nabłonkowych w mezenchymalne (EMT- epithelial-mesenchymal transition), a to przyczynia się do rozwoju guza oraz do pojawiania się przerzutów. Wykryto, że miRNA mają swój udział w zjawisku lekooporności oraz indukcji przejścia epithelialno-mezenchymalnego komórek. Zaobserwowano, że miRNA-134 i miRNA-487b mają udział w rozwoju nowotworów płuca. Zwiększona ekspresja tych miRNA jest skorelowana z indukcją przejścia EMT. Ponadto, wspomniane miRNA powodują pojawienie się lekooporności na gefitinib – lek stosowany w NSCLC przy występowaniu mutacji *EGFR* [57].

MiRNA również korzystnie działają w terapii NSCLC, np. miR-150 wzmacnia przeciwnowotworowe działanie Crizotinibu, leku stosowanego w NSCLC przy występowaniu mutacji *ALK* [113].

Odkrycie, że zręb guza jest częściowo formowany przez fibroblasty CAF (cancer associated fibroblasts) wytwarzające substancje, takie jak czynnik wzrostu hepatocytów (HGF – hepatocyte growth factor), który uczestniczy w promowaniu wzrostu, mobilności i morfogenezy raka, zapoczątkowało badania nad profilem ekspresji miRNA w tego rodzaju komórkach [28]. Udowodniono, że ekspresja miR-200a i HGF odbywa się głównie w cytoplazmie komórek zrębu guza, wysunięto więc tezę zakładającą zależność między tymi cząsteczkami. Wykazano, że zwiększony poziom miR-200a w komórkach zmniejsza stężenie HGF, co może być szansą na przeciwdziałanie progresji NSCLC [12].

ROLA miRNA W POWSTAWANIU NOWOTWORÓW WĄTROBY

Nowotwory wątroby są piątą na liście najczęściej rozwijających się nowotworów wśród mężczyzn i siódme wśród kobiet. Najczęściej występującym rodzajem nowotworu wątroby jest rak wątrobowokomórkowy (HCC – hepatocellular carcinoma) [38], który jest trzecim pod względem wywoływanej śmiertelności nowotworem [31]. Głównymi przyczynami powstawania nowotworów wątroby jest nadmierne spożywanie alkoholu, zapalenie wątroby typu B i C oraz niealkoholowe stłuszczenie wątroby. 50% przypadków HCC jest skorelowane z wirusem HBV, a 25% z wirusem HCV [38]. Zmiany w profilu miRNA są związane z wszystkimi stadiami kancerogenezy. Profil ekspresji miRNA może umożliwić diagnostykę pacjentów cierpiących na HCC, jak i tych cierpiących na inne choroby wątroby. Oprócz potencjalnej roli w diagnostyce nowotworów wątroby miRNA mogą służyć do monitorowania odpowiedzi na terapię, jak i być celem leków przeciwnowotworowych [31].

MiR-122 jest głównym miRem regulującym homeostazę w komórkach wątroby [8]. W nowotworach wątroby występuje zwiększone stężenie białka PEG10. Zasocjowane z białkiem SIAH1 hamuje apoptozę komórek, promując przeżycie komórek nowotworowych, co niekorzystnie rokuje dla pacjenta [68]. Pojawienie się zwiększonego stężenia PEG10 w komórce jest skorelowane ze spadkiem poziomu ekspresji miR-122. Taki wzór jest charakterystyczny przy występowaniu HCC [78]. Mimo że ekspresja miR-122 w komórkach nowotworowych pacjentów z HCC jest zmniejszona, w ich krwiobiegu poziom miR-122 ulega zwiększeniu. Jest to najprawdopodobniej spowodowane uwalnianiem miRNA z komórek guza do krwiobiegu. MiR-122 wykazuje zmiany ekspresji nie tylko w nowotworach wątroby, ale i w innych jej schorzeniach i wydaje się obiecującym markerem diagnostycznym [31].

Badania naukowców z Stanford University School of Medicine wykazały, że w przypadku HCC przywrócenie poziomu dwóch miRNA jednocześnie może korzystnie wpłynąć na proces leczenia. Uzupełnianie miR-122 i dostarczanie cząsteczek antymiR-21 hamuje lekooporność i zwiększa skuteczność terapii przez hamowanie przerzutowania komórek nowotworowych. Dzieje się tak przez hamowanie miR-21 będącego „onkogenem” oraz przywrócenie odpowiedniego poziomu miR-122 [65].

Innym „anty-onkogennym” miRNA jest miR-7. Udowodniono, że w komórkach HCC jest on hamowany na poziomie pri-miR-7-1 przez kompleks czynników transkrypcyjnych: NF90-NF45 (nuclear factor 90, 45). Wyeliminowanie tych czynników i zwiększenie poziomu miR-7 przyczynia się do hamowania proliferacji komórek nowotworowych wątroby [33].

ROLA miRNA W POWSTAWANIU NOWOTWORÓW PRZEWODU POKARMOWEGO

Nowotwory jelita grubego są drugim najczęściej diagnozowanym nowotworem u kobiet, trzecim u mężczyzn [87].

Wdrożenie profilowania miRNA w ramach diagnostyki może pomóc w jej usprawnieniu i skuteczniejszym doborze terapii, a więc poprawić rokowania u osób chorych.

Jednym z miRów zaangażowanych w powstawanie nowotworów jelita grubego jest miR-193-5p; działa jako „gen supresorowy”. W komórkach nowotworów jelita grubego zauważono spadek poziomu miR-193-5p. Przywrócenie naturalnego poziomu tego miRNA hamowało proliferację oraz apoptozę i migrację komórek [62].

Zbadano również potencjał diagnostyczny miR-210. Po wprowadzeniu do komórek nowotworu jelita grubego oligonukleotydów o sekwencji prekursora miR-210, zauważono zmniejszenie proliferacji komórek, spadek odsetka komórek w fazie G1 i zwiększenie frakcji komórek w fazie G2. W komórkach ze zwiększoną ekspresją miR-210 zmniejszony poziom ekspresji białka MCL1 (białka anty-apoptotycznego) i zwiększone stężenie białek BIM (białka proapoptotycznego) świadczy o działaniu proapoptotycznym, ponadto obecność miR-210 stymuluje generację wolnych rodników tlenowych [83].

Udowodniono, że za pomocą miRNA można wyróżnić również podtypy nowotworów. Jednym z typów nowotworów jelita grubego, jest gruczolakorak śluzowy, który charakteryzuje się obfitym wydzielaniem mucyny. Takie nadmierne wydzielanie śluzu jest związane ze zmianami mikroflory jelitowej i indukcją reakcji zapalnych, co sprzyja rozwojowi nowotworu. Występowanie gruczolakoraka śluzowego jest związane z zaawansowanymi stadiami nowotworowymi, przez co szanse na przeżycie pacjenta w chwili diagnozy są gorsze niż u pacjentów z innymi typami nowotworów jelita grubego. W gruczolakoraku śluzowym zaobserwowano zwiększoną ekspresję miR-205 i miR-373. miR-205 decyduje o różnicowaniu się nabłonka jelitowego w zdolny do wytwarzania mucyny, a miR-373 zmniejsza adhezję międzykomórkową i zwiększa zdolność komórek do przerzutowania. Profil tych miRNA nie tylko odbiega od profilu komórek prawidłowych, ale i od profilu innych typów nowotworów jelita grubego [20].

Nowotwory żołądka są czwartym typem najczęściej występujących nowotworów na świecie [22]. Mimo że częstość występowania raka żołądka się zmniejsza, rokowania pacjentów, u których stwierdzono ten nowotwór pozostają złe z powodu braku skutecznych biomarkerów, które pomogłyby w wykrywaniu raka żołądka we wczesnych stadiach jego powstawania [98].

Niedawne badania wykazały, że zmiany w profilu miR-164a, mają znaczenie w kancerogenezie komórek żołądka. Zwykle przy powstawaniu tego typu nowotworu można zaobserwować wzrost poziomu miR-164a, który jest zaangażowany w regulację genów o podstawowych dla organizmu funkcjach. To zjawisko, czyli wzrost ilości tego miRNA, powoduje pośrednie hamowanie białka p21 przez łączenie się z mRNA SMAD4 i w wyniku zahamowania jego ekspresji następuje wzmocnienie proliferacji komórek nowotworowych [103]. Natomiast zwiększony poziom miR-146a

hamuje receptor EGFR i IRAK1, co zmniejsza możliwość proliferacji i przerzutowania guza [45].

Szlak sygnalizacyjny Wnt/ β -katenina bierze udział w regulacji różnicowania i proliferacji komórek [69], a wzrost aktywacji tego szlaku jest zaangażowany w powstawanie nowotworu żołądka [80]. Przeprowadzone badania dowiodły, że miRNA mogą wpływać na regulację tego szlaku. Takim miRNA jest miR-194, który łączy się z inhibitorem Wnt-SUFU, przez co następuje aktywacja szlaku Wnt/ β -katenina, co promuje rozwój nowotworu żołądka. Szlak ten aktywują również inne miRNA, takie jak miR-200a, miR-27 czy miR-130a przyczyniając się do powstawania nowotworu.

Innym miRNA, które może w przyszłości odgrywać ważną rolę w nowotworze żołądka, jest miR-518. U pacjentów z tym typem nowotworu stwierdzono zmniejszony poziom miR-518. Próby przeprowadzone na liniach komórkowych związane z przywróceniem naturalnego poziomu tego miRNA wykazały, że miR-518 hamuje rozwój nowotworu i przyspiesza apoptozę komórek, przez przyłączanie się do nici transkryptu genu MDM2. Białko MDM2 hamuje ekspresję genu p53, którego jednym z głównych zadań jest indukcja apoptozy. Przywrócenie prawidłowego poziomu tego miRNA działa więc przeciwnowotworowo. Ponadto naturalny poziom miR-518 obniża ekspresję białka BCL-2 działającego antyapoptotycznie i promuje ekspresję proapoptotycznych białek BAX [21].

Powyższe eksperymenty świadczą o możliwości wykorzystania modulacji poziomu miRNA w nowotworze żołądka.

miRNA O POTENCJALE DIAGNOSTYCZNYM

Jeden rodzaj miRNA może regulować ekspresję setek, a przypuszcza się, że w niektórych przypadkach nawet tysięcy genów. Ponadto jedna cząsteczka mRNA może być regulowana przez różne miRNA. Za złożonością regulacyjnej funkcji miRNA przemawia również to, że jeden miRNA może regulować różne mRNA na dwa sposoby: przez ich degradację lub represję translacji. MiRNA może również regulować, w zależności od typu nowotworu, onkogeny i geny supresorowe [70], a także sam może się zachowywać jak onkogen lub supresor. W chorobach nowotworowych obniżony poziom ekspresji miRNA regulujących powstawanie onkogenów prowadzi do ich nadmiernego wytwarzania, podczas gdy wzrost poziomu innych miRNA, takich które są zaangażowane w regulację ekspresji genów supresorowych, prowadzi do hamowania powstawania tych antyonkogenów [63]. Profile ekspresji wielu miRNA uzyskanych z tkanek nowotworowych i prawidłowych dowodzą, że można ich stosować w prognozowaniu i diagnostyce nowotworów u pacjentów. Badając profile miRNA wykazano obecność stałego stężenia miRNA w ludzkiej krwi obwodowej. Różnice w ekspresji miRNA w krwi obwodowej zauważono u pacjentów z takimi nowotworami jak: szpiczak mnogi, rak nosowej części gardła, żołądka, gruczołu krokowego, gruczołu sutkowego, jelita grubego, trzustki, chłoniak rozlany z dużych komórek B, rak płaskonabłonkowy, płuca,

Tabela 2. Zestawienie krążących miRNA z uwzględnieniem miejsca występowania w organizmie oraz potencjału diagnostycznego i prognostycznego

Typ nowotworu	Typ markera		
	diagnostyczny	prognostyczny	
Nowotwór piersi	let-7c [50], miR-10 [2] miR-16 [35] miR-18a [43], mir-106b [118], miR-200c/141 [3], miR-21 [4, 19, 46, 60], miR29a [100, 101], miR-34a [72], miR34b/c [55], miR-125b [60], miR-155 [53, , 82, 90]	miR-10 [2, 85], miR-18a [43], miR-106b [118], miR-21 [4, 91], miR-34a [72], miR-125a [95], miR-125b [60], miR-210 [40], miR-375 [102], miR-155 [18, 72], miR-200c/141 [3]	
Nowotwór płuca	let-7a [32], let-7c [16], let-7f [79], miR-10 [72], miR-19a [51], miR-19b [97], miR-21 [26, 41, 106, 117], miR29c [119], miR-30a [9], miR-30c [71], miR-34c [52], mir-125a [95], miR-155 [24, 32], miR-200c [56]	Let-7a/7b [32], let-7f [79], let-7i [36], miR-10 [85], miR-19a [51], miR-19b [97], miR-21 [26, 106, 117], miR-30d [34, 48], miR1-25b [14, 112], miR-200c [56], miR-375 [110], miR-429 [119]	
Nowotwór wątroby	miR-16 [25], miR-17 [25], miR-106b [39, 116, 118], miR-21 [1, 92, 109, 120], miR-30c [48]	miR-21 [92, 109]	
Nowotwory przewodu pokarmowego	żołądka	Let-7a [88], let-7c/i/f [54], miR-16 [93, 115], miR17/106a/b [88], miR-17/106b [114], miR-18a [89], miR-106a [111], miR-106b [116], miR-21 [58, 88, 99]	miR-16 [93, 115], miR-106 [116] miR106a [111], miR-21 [42, 58, 77]
	jelita	Let-7a [67], let-7f [27], miR-18a [107], miR-19a [61], miR-20a [108], miR-19, miR-92 [13], miR-92a [37], miR-106a [11, 44], miR-21 [5, 7], mi-29a [37, 94], miR-29b [6], miR-221 [107], miR-375 [104]	miR-19a [61], miR17, miR-92 [13], miR-21 [7, 86], miR-29b [6], miR-29c [105], miR-106a [49]

jajnika czy nowotwory występujące w obrębie ośrodkowego układu nerwowego [47]. Obserwacja takich różnic może być pomocna w diagnostyce tych nowotworów.

Wszystkie komórki nowotworowe cechuje zwiększona zdolność do wzrostu i podziałów. W procesie transformacji nowotworowej pojawiają się również zmiany w systemach kontrolujących śmierć komórkową, co może się zdarzyć m.in. pod wpływem modulacji profilu ekspresji genów. MikroRNA kontrolują poziom ekspresji genów, przez co stały się obiecującym obiektem badań w nowatorskich celowanych terapiach. Postuluje się, że miRNA przyczyniają się do powstawania nowotworów, pełniąc funkcję onkogenów lub supresorów i są zdolne do przywracania prawidłowego profilu ekspresji genów, w celu powstrzymania rozwoju guza [81].

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na powiązanie zaburzeń regulacji w ekspresji odpowiednich miRNA z występowaniem różnych typów nowotworów. Dzięki rozwojowi badań nad mikroRNA pojawiła się możliwość typowania nowotworów. Procedura jest oparta na identyfikacji profilu miRNA w tkankach nowotworowych oraz niezmiennych chorobowo. Profil zróżnicowania i ekspresji miRNA pozwala na określenie stopnia rozwoju guza, co uściśla możliwości terapeutyczne i pozwoliłoby zastosować najodpowiedniejszą do danego przypadku terapię.

Niezwykle obiecujące w diagnostyce jest odkrycie, że miRNA, będące markerami procesu nowotworowego, nie wymaga inwazyjnych procedur diagnostycznych. Trwają intensywne badania nad wykorzystaniem miRNA obecnego w płynach ustrojowych (takich jak: osocze, płyn mózgowo-rdzeniowy, ślina, moczu, płyn nasienny) jako markera

diagnostycznego bądź markera prognostycznego nowotworów (tabela 2).

Początkowo uważano, że miRNA obecne w krwiobiegu dostają się tam z tkanek nowotworowych w wyniku obumierania komórek i uwalniania się z ich wnętrza cząsteczek miRNA. Obecnie wiadomo, że możliwe jest też wydzielanie miRNA na zewnątrz komórki w pęcherzykach sekrecyjnych lub też połączenie ich z białkami bądź z lipoproteinami (ryc.2).

PODSUMOWANIE

Badania funkcji i regulacji miRNA trwają stosunkowo krótko, a już można stwierdzić, że pełnią bardzo ważną rolę regulacyjną w wielu procesach zachodzących w organizmie. Odkrycie zjawiska interferencji RNA zostało z powodzeniem wykorzystane w hamowaniu ekspresji wybranych genów. W tym krótkim czasie zaproponowano wiele skutecznych rozwiązań mających na celu wyrównanie zmienionego poziomu miRNA spowodowanego lub powodującego zaburzenie prawidłowej homeostazy organizmu. MiRNA spełniają istotną rolę w patogenezie wielu chorób, m.in. w nowotworach, gdzie są zaangażowane w proces ich powstawania, proliferacji oraz przerzutowania. Cząsteczki te mogą przyjmować rolę „supresorów” oraz „onkogenów” w chorobach nowotworowych. Wiadomo już, że zarówno ich zbyt wysoka ekspresja, jak i niedobór w organizmie mogą być bardzo szkodliwe. Wysiłki współczesnej nauki koncentrują się na ustaleniu norm oraz sposobów modelowania ilości miRNA w organizmie. Mimo trudności w badaniu tak wieloaspektowo działających cząsteczek naukowcy starają się wyjaśnić i opisać mechanizmy działania miRNA w organizmie. Nie wyklucza się, że miRNA są „złotym środkiem”

pozwalającym zwalczać choroby nowotworowe, a w przyszłości zostaną opracowane szybkie testy diagnostyczne, które mogłyby wykrywać typy nowotworów na podstawie profili odpowiednich miRNA, oraz terapie celowane,

w których modulacja lub przywrócenie naturalnego poziomu miRNA pozwoliłoby na skuteczne zwalczanie nowotworu, bez potrzeby stosowania leków działających niekorzystnie na komórki prawidłowe.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Amr K.S., Ezzat W.M., Elhosary Y.A., Hegazy A.E., Fahim H.H., Kamel R.R.: The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gene*, 2016; 575: 66–70
- [2] Anfossi S., Giordano A., Gao H., Cohen E.N., Tin S., Wu Q., Garza R.J., Debeb B.G., Alvarez R.H., Valero V., Hortobagyi G.N., Calin G.A., Ueno N.T., Woodward W.A., Reuben J.M.: High serum miR-19a levels are associated with inflammatory breast cancer and are predictive of favorable clinical outcome in patients with metastatic HER2+ inflammatory breast cancer. *PLoS One*, 2014; 9: e83113
- [3] Antolin S., Calvo L., Blanco-Calvo M., Santiago M.P., Lorenzo-Patiño M.J., Haz-Conde M., Santamarina I., Figueroa A., Antón-Aparicio L.M., Valladares-Ayerbes M.: Circulating miR-200c and miR-141 and outcomes in patients with breast cancer. *BMC Cancer*, 2015; 15: 297
- [4] Asaga S., Kuo C., Nguyen T., Terpenning M., Giuliano A.E., Hoon D.S.: Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin. Chem.*, 2011; 57: 84–91
- [5] Basati G., Emami Razavi A., Abdi S., Mirzaei A.: Elevated level of microRNA-21 in the serum of patients with colorectal cancer. *Med. Oncol.*, 2014; 31: 205
- [6] Basati G., Razavi A.E., Pakzad I., Malayeri F.A.: Circulating levels of the miRNAs, miR-194, and miR-29b, as clinically useful biomarkers for colorectal cancer. *Tumour Biol.*, 2016; 37: 1781–1788
- [7] Beckett E.L., Martin C., Choi J.H., King K., Niblett S., Boyd L., Duesing K., Yates Z., Veysey M., Lucock M.: Folate status, folate-related genes and serum miR-21 expression: Implications for miR-21 as a biomarker. *BBA Clin.*, 2015; 4: 45–51
- [8] Branch A.D., Rice C.M.: Antisense gets a grip on miR-122 in chimpanzees. *Sci. Transl. Med.*, 2010; 2: 13ps1
- [9] Cazzoli R., Buttitta F., Di Nicola M., Malatesta S., Marchetti A., Rom W.N., Pass H.I.: microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2013; 8: 1156–1162
- [10] Chen L., Heikkinen L., Wang C., Yang Y., Sun H., Wong G.: Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief. Bioinform.*, 2019; 20: 1836–1852
- [11] Chen W.Y., Zhao X.J., Yu Z.F., Hu F.L., Liu Y.P., Cui B.B., Dong X.S., Zhao Y.S.: The potential of plasma miRNAs for diagnosis and risk estimation of colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015; 8: 7092–7101
- [12] Chen Y., Du M., Wang J., Xing P., Zhang Y., Li F., Lu X.: MiRNA-200a expression is inverse correlation with hepatocyte growth factor expression in stromal fibroblasts and its high expression predicts a good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2016; 7: 48432–48442
- [13] Conev N.V., Donev I.S., Konsoulova-Kirova A.A., Chervenkov T.G., Kashlov J.K., Ivanov K.D.: Serum expression levels of miR-17, miR-21, and miR-92 as potential biomarkers for recurrence after adjuvant chemotherapy in colon cancer patients. *BioSci. Trends*, 2015; 9: 393–401
- [14] Cui E.H., Li H.J., Hua F., Wang B., Mao W., Feng X.R., Li J.Y., Wang X.: Serum microRNA 125b as a diagnostic or prognostic biomarker for advanced NSCLC patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2013; 34: 309–313
- [15] Del Vescovo V., Grasso M., Barbareschi M., Denti M.A.: MicroRNAs as lung cancer biomarkers. *World J. Clin. Oncol.*, 2014; 54: 604–620
- [16] Dou H., Wang Y., Su G., Zhao S.: Decreased plasma let-7c and miR-152 as noninvasive biomarker for non-small-cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015; 8: 9291–9298
- [17] Ebrahimi A., Sadroddiny E.: MicroRNAs in lung diseases: Recent findings and their pathophysiological implications. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2015; 34: 55–63
- [18] Eichler C., Flesch-Janys D., Chang-Claude J., Pantel K., Schwarzenbach H.: Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin. Chem.*, 2013; 59: 1489–1496
- [19] Erbes T., Hirschfeld M., Rücker G., Jaeger M., Boas J., Iborra S., Mayer S., Gitsch G., Stickeler E.: Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer*, 2015; 15: 193
- [20] Eyking A., Reis H., Frank M., Gerken G., Schmid K.W., Cario E.: MiR-205 and MiR-373 are associated with aggressive human mucinous colorectal cancer. *PLoS One*, 2016; 11: e0156871
- [21] Feng C., Xian Q., Liu S.: Micro RNA-518 inhibits gastric cancer cell growth by inducing apoptosis via targeting MDM2. *Biomed. Pharmacother.*, 2018; 97: 1595–1602
- [22] Ferro A., Peleteiro B., Malvezzi M., Bosetti C., Bertuccio P., Levi F., Negri E., La Vecchia C., Lunet N.: Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980–2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur. J. Cancer*, 2014; 50: 1330–1344
- [23] Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391: 806–811
- [24] Gao F., Chang J., Wang H., Zhang G.: Potential diagnostic value of miR-155 in serum from lung adenocarcinoma patients. *Oncol. Rep.*, 2014; 31: 351–357
- [25] Ge W., Yu D.C., Li Q.G., Chen X., Zhang C.Y., Ding Y.T.: Expression of serum miR-16, let-7f, and miR-21 in patients with hepatocellular carcinoma and their clinical significances. *Clin. Lab.*, 2014; 60: 427–434
- [26] Geng Q., Fan T., Zhang B., Wang W., Xu Y., Hu H.: Five microRNAs in plasma as novel biomarkers for screening of early-stage non-small cell lung cancer. *Respir. Res.*, 2014; 15: 149
- [27] Ghanbari R., Mosakhani N., Sarhadi V.K., Armengol G., Nouraei N., Mohammadkhani A., Khorrami S., Arefian E., Paryan M., Malekzadeh R., Knuutila S.: Simultaneous underexpression of let-7a-5p and let-7f-5p microRNAs in plasma and stool samples from early stage colorectal carcinoma. *Biomark. Cancer*, 2015; 7: 39–48

- [28] Hale M.D., Hayden J.D., Grabsch H.L.: Tumour-microenvironment interactions: Role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cell Oncol.*, 2013; 36: 95–112
- [29] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*, 2011; 144: 646–674
- [30] Haseeb A., Makki M.S., Khan N.M., Ahmad I., Haqqi T.M.: Deep sequencing and analyses of miRNAs, isomiRs and miRNA induced silencing complex (miRISC)-associated miRNome in primary human chondrocytes. *Sci. Rep.*, 2017; 7: 15178
- [31] Hayes C.N., Chayama K.: MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016; 17: 280
- [32] Heegaard N.H., Schetter A.J., Welsh J.A., Yoneda M., Bowman E.D., Harris C.C.: Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2012; 130: 1378–1386
- [33] Higuchi T., Todaka H., Sugiyama Y., Ono M., Tamaki N., Hatano E., Takezaki Y., Hanazaki K., Miwa T., Lai S., Morisawa K., Tsuda M., Taniguchi T., Sakamoto S.: Suppression of microRNA-7 (miR-7) biogenesis by nuclear factor 90-nuclear factor 45 complex (NF90-NF45) controls cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *J. Biol. Chem.*, 2016; 291: 21074–21084
- [34] Hu Z., Chen X., Zhao Y., Tian T., Jin G., Shu Y., Chen Y., Xu L., Zen K., Zhang C., Shen H.: Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 1721–1726
- [35] Hu Z., Dong J., Wang L.E., Ma H., Liu J., Zhao Y., Tang J., Chen X., Dai J., Wei Q., Zhang C., Shen H.: Serum microRNA profiling and breast cancer risk: The use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*, 2012; 33: 828–834
- [36] Huang J., Wu J., Li Y., Li X., Yang T., Yang Q., Jiang Y.: Deregulation of serum microRNA expression is associated with cigarette smoking and lung cancer. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 364316
- [37] Huang Z., Huang D., Ni S., Peng Z., Sheng W., Du X.: Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 2010; 127: 118–126
- [38] Janevska D., Chaloska-Ivanova V., Janevski V.: Hepatocellular carcinoma: Risk factors, diagnosis and treatment. *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, 2015; 3: 732–736
- [39] Jiang L., Li X., Cheng Q., Zhang B.H.: Plasma microRNA might as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma and chronic liver disease screening. *Tumour Biol.*, 2015; 36: 7167–7174
- [40] Jung E.J., Santarpia L., Kim J., Esteva F.J., Moretti E., Buzdar A.U., Di Leo A., Le X.F., Bast R.C., Jr., Park S.T., Pusztai L., Calin G.A.: Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*, 2012; 118: 2603–2614
- [41] Kim J.O., Gazala S., Razzak R., Guo L., Ghosh S., Roa W.H., Bédard E.L.: Non-small cell lung cancer detection using microRNA expression profiling of bronchoalveolar lavage fluid and sputum. *Anticancer Res.*, 2015; 35: 1873–1880
- [42] Kim S.Y., Jeon T.Y., Choi C.I., Kim D.H., Kim D.H., Kim G.H., Ryu D.Y., Lee B.E., Kim H.H.: Validation of circulating miRNA biomarkers for predicting lymph node metastasis in gastric cancer. *J. Mol. Diagn.*, 2013; 15: 661–669
- [43] Kodahl A.R., Lyng M.B., Binder H., Cold S., Gravgaard K., Knoop A.S., Ditzel H.J.: Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: A case control study. *Mol. Oncol.*, 2014; 8: 874–883
- [44] Koga Y., Yamazaki N., Yamamoto Y., Yamamoto S., Saito N., Kakugawa Y., Otake Y., Matsumoto M., Matsumura Y.: Fecal miR-106a is a useful marker for colorectal cancer patients with false-negative results in immunochemical fecal occult blood test. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2013; 22: 1844–1852
- [45] Kogo R., Mimori K., Tanaka F., Komune S., Mori M.: Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 4277–4284
- [46] Kumar S., Keerthana R., Pazhanimuthu A., Perumal P.: Over-expression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2013; 50: 210–214
- [47] Larrea E., Sole C., Manterola L., Goicoechea I., Armesto M., Arstein M., Caffarel M.M., Araujo A.M., Araiz M., Fernandez-Mercado M., Lawrie C.H.: New concepts in cancer biomarkers: Circulating miRNAs in liquid biopsies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016; 17: 627
- [48] Le H.B., Zhu W.Y., Chen D.D., He J.Y., Huang Y.Y., Liu X.G., Zhang Y.K.: Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients. *Med. Oncol.*, 2012; 29: 3190–3197
- [49] Li J., Liu Y., Wang C., Deng T., Liang H., Wang Y., Huang D., Fan Q., Wang X., Ning T., Liu R., Zhang C.Y., Zen K., Chen X., Ba Y.: Serum miRNA expression profile as a prognostic biomarker of stage II/III colorectal adenocarcinoma. *Sci. Rep.*, 2015; 5: 12921
- [50] Li X.X., Gao S.Y., Wang P.Y., Zhou X., Li Y.J., Yu Y., Yan Y.F., Zhang H.H., Lv C.J., Zhou H.H., Xie S.Y.: Reduced expression levels of let-7c in human breast cancer patients. *Oncol. Lett.*, 2015; 9: 1207–1212
- [51] Lin Q., Chen T., Lin Q., Lin G., Lin J., Chen G., Guo L.: Serum miR-19a expression correlates with worse prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *J. Surg. Oncol.*, 2013; 107: 767–771
- [52] Liu F., Wang X., Li J., Gu K., Lv L., Zhang S., Che D., Cao J., Jin S., Yu Y.: miR-34c-3p functions as a tumour suppressor by inhibiting eIF4E expression in non-small cell lung cancer. *Cell Prolif.*, 2015; 48: 582–592
- [53] Liu J., Mao Q., Liu Y., Hao X., Zhang S., Zhang J.: Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin. J. Cancer Res.*, 2013; 25: 46–54
- [54] Liu W.J., Xu Q., Sun L.P., Dong Q.G., He C.Y., Yuan Y.: Expression of serum let-7c, let-7i, and let-7f microRNA with its target gene, pepsinogen C, in gastric cancer and precancerous disease. *Tumour Biol.*, 2015; 36: 3337–3343
- [55] Liu X., Feng J., Tang L., Liao L., Xu Q., Zhu S.: The regulation and function of miR-21-FOXO3a-miR-34b/c signaling in breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015; 16: 3148–3162
- [56] Liu X.G., Zhu W.Y., Huang Y.Y., Ma L.N., Zhou S.Q., Wang Y.K., Zeng F., Zhou J.H., Zhang Y.K.: High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med. Oncol.*, 2012; 29: 618–626
- [57] Lu J., Zhan Y., Feng J., Luo J., Fan S.: MicroRNAs associated with therapy of non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Sci.*, 2018; 14: 390–397
- [58] Ma G.J., Gu R.M., Zhu M., Wen X., Li J.T., Zhang Y.Y., Zhang X.M., Chen S.Q.: Plasma post-operative miR-21 expression in the prognosis of gastric cancers. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2013; 14: 7551–7554
- [59] Mar-Aguilar F., Mendoza-Ramirez J.A., Malagón-Santiago I., Espino-Silva P.K., Santuario-Facio S.K., Ruiz-Flores P., Rodríguez-Padilla C., Reséndez-Pérez D.: Serum circulating microRNA profil-

ing for identification of potential breast cancer biomarkers. *Dis. Markers*, 2013; 34: 163–169

[60] Matamala N., Vargas M.T., Gonzalez-Cámpora R., Miñambres R., Arias J.I., Menéndez P., Andrés-León E., Gómez-López G., Yanowsky K., Calvete-Candenas J., Inglada-Pérez L., Martínez-Delgado B., Benítez J.: Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. *Clin. Chem.*, 2015; 61: 1098–1106

[61] Matsumura T., Sugimachi K., Iinuma H., Takahashi Y., Kurashige J., Sawada G., Ueda M., Uchi R., Ueo H., Takano Y., Shinden Y., Eguchi H., Yamamoto H., Doki Y., Mori M. i wsp.: Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 2015; 113: 275–281

[62] Mazzocchi G., Colangelo T., Panza A., Rubino R., Tiberio C., Palumbo O., Carella M., Trombetta D., Gentile A., Tavano F., Valvano M.R., Storlazzi C.T., Macchia G., De Cata A., Bisceglia G. i wsp.: Analysis of clock gene-miRNA correlation networks reveals candidate drivers in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016; 7: 45444–45461

[63] Mishra A.K., Yadav P., Mishra A.: A systemic review on staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS): A rare and critical disease of neonates. *Open Microbiol. J.*, 2016; 10: 150–159

[64] Muhammad N., Bhattacharya S., Steele R., Ray R.B.: Anti-miR-203 suppresses ER-positive breast cancer growth and stemness by targeting SOCS3. *Oncotarget*, 2016; 7: 58595–58605

[65] Mullick Chowdhury S., Wang T.Y., Bachawal S., Devulapally R., Choe J.W., Abou Elkacem L., Yakub B.K., Wang D.S., Tian L., Paulmurugan R., Willmann J.K.: Ultrasound-guided therapeutic modulation of hepatocellular carcinoma using complementary microRNAs. *J. Control Release*, 2016; 238: 272–280

[66] Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990; 2: 279–289

[67] Ogata-Kawata H., Izumiya M., Kurioka D., Honma Y., Yamada Y., Furuta K., Gunji T., Ohta H., Okamoto H., Sonoda H., Watanabe M., Nakagama H., Yokota J., Kohno T., Tsuchiya N.: Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One*, 2014; 9: e92921

[68] Okabe H., Satoh S., Furukawa Y., Kato T., Hasegawa S., Nakajima Y., Yamaoka Y., Nakamura Y.: Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. *Cancer Res.*, 2003; 63: 3043–3048

[69] Peng Y., Zhang X., Ma Q., Yan R., Qin Y., Zhao Y., Cheng Y., Yang M., Wang Q., Feng X., Huang Y., Huang W., Zhao Z., Wang L., Wei Y. i wsp.: MiRNA-194 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer by targeting the negative Wnt regulator, SUFU. *Cancer Lett.*, 2017; 385: 117–127

[70] Price C., Chen J.: MicroRNAs in cancer biology and therapy: Current status and perspectives. *Genes Dis.*, 2014; 1: 53–63

[71] Rani S., Gately K., Crown J., O'Byrne K., O'Driscoll L.: Global analysis of serum microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.*, 2013; 14: 1104–1112

[72] Roth C., Kasimir-Bauer S., Pantel K., Schwarzenbach H.: Screening for circulating nucleic acids and caspase activity in the peripheral blood as potential diagnostic tools in lung cancer. *Mol. Oncol.*, 2011; 5: 281–291

[73] Ru P., Steele R., Hsueh E.C., Ray R.B.: Anti-miR-203 upregulates SOCS3 expression in breast cancer cells and enhances cisplatin chemosensitivity. *Genes Cancer*, 2011; 2: 720–727

[74] Salem O., Erdem N., Jung J., Münstermann E., Wörner A., Wilhelm H., Wiemann S., Körner C.: The highly expressed 5'isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration. *BMC Genomics*, 2016; 17: 566

[75] Sassen S., Miska E.A., Caldas C.: MicroRNA: Implications for cancer. *Virchows Arch.*, 2008; 452: 1–10

[76] Setoyama T., Ling H., Natsugoe S., Calin G.A.: Non-coding RNAs for medical practice in oncology. *Keio J. Med.*, 2011; 60: 106–113

[77] Shiotani A., Murao T., Kimura Y., Matsumoto H., Kamada T., Kusunoki H., Inoue K., Uedo N., Iishi H., Haruma K.: Identification of serum miRNAs as novel non-invasive biomarkers for detection of high risk for early gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 2013; 109: 2323–2330

[78] Shyu Y.C., Lee T.L., Lu M.J., Chen J.R., Chien R.N., Chen H.Y., Lin J.F., Tsou A.P., Chen Y.H., Hsieh C.W., Huang T.S.: miR-122-mediated translational repression of PEG10 and its suppression in human hepatocellular carcinoma. *J. Transl. Med.*, 2016; 14: 200

[79] Silva J., García V., Zaballos Á., Provencio M., Lombardía L., Almonacid L., García J.M., Domínguez G., Peña C., Díaz R., Herrera M., Varela A., Bonilla F.: Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur. Respir. J.*, 2011; 37: 617–623

[80] Song X., Xin N., Wang W., Zhao C.: Wnt/ β -catenin, an oncogenic pathway targeted by *H. pylori* in gastric carcinogenesis. *Oncotarget*, 2015; 6: 35579–35588

[81] Stahlhut Espinosa C.E., Slack F.J.: The role of microRNAs in cancer. *Yale J. Biol. Med.*, 2006; 79: 131–140

[82] Sun Y., Wang M., Lin G., Sun S., Li X., Qi J., Li J.: Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One*, 2012; 7: e47003

[83] Tagscherer K.E., Fassl A., Sinkovic T., Richter J., Schecher S., Macher-Goeppinger S., Roth W.: MicroRNA-210 induces apoptosis in colorectal cancer via induction of reactive oxygen. *Cancer Cell Int.*, 2016; 16: 42

[84] Telonis A.G., Loher P., Jing Y., Londin E., Rigoutsos I.: Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Res.*, 2015; 43: 9158–9175

[85] Teplyuk N.M., Mollenhauer B., Gabriely G., Giese A., Kim E., Smolsky M., Kim R.Y., Saria M.G., Pastorino S., Kesari S., Krichevsky A.M.: MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro. Oncol.*, 2012; 14: 689–700

[86] Toiyama Y., Takahashi M., Mur K., Nagasaka T., Tanaka K., Inoue Y., Kusunoki M., Boland C.R., Goel A.: Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2013; 105: 849–859

[87] Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A.: Global cancer statistics. 2012. *CA Cancer J. Clin.*, 2015; 65: 87–108

[88] Tsujiura M., Ichikawa D., Komatsu S., Shiozaki A., Takeshita H., Kosuga T., Konishi H., Morimura R., Deguchi K., Fujiwara H., Okamoto K., Otsuji E.: Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br. J. Cancer*, 2010; 102: 1174–1179

[89] Tsujiura M., Komatsu S., Ichikawa D., Shiozaki A., Konishi H., Takeshita H., Morimura R., Nagata H., Kawaguchi T., Hirajima S., Arita T., Fujiwara H., Okamoto K., Otsuji E.: Circulating miR-18a in plasma contributes to cancer detection and monitoring in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2015; 18: 271–279

- [90] Wang F., Hou J., Jin W., Li J., Yue Y., Jin H., Wang X.: Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: A meta-analysis. *Molecules*, 2014; 19: 6282–6293
- [91] Wang G., Wang L., Sun S., Wu J., Wang Q.: Quantitative measurement of serum microRNA-21 expression in relation to breast cancer metastasis in Chinese females. *Ann. Lab. Med.*, 2015; 35: 226–232
- [92] Wang H., Hou L., Li A., Duan Y., Gao H., Song X.: Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 864894
- [93] Wang H., Wang L., Wu Z., Sun R., Jin H., Ma J., Liu L., Ling R., Yi J., Wang L., Bian J., Chen J., Li N., Yuan S., Yun J.: Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening. *Med. Oncol.*, 2014; 31: 298
- [94] Wang L.G., Gu J.: Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis. *Cancer Epidemiol.*, 2012; 36: e61–e67
- [95] Wang R.J., Zheng Y.H., Wang P., Zhang J.Z.: Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015; 8: 765–771
- [96] WHO: Cancer Fact Sheets. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (31.10.2018)
- [97] Wu C., Cao Y., He Z., He J., Hu C., Duan H., Jiang J.: Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2014; 232: 85–95
- [98] Wu H.H., Lin W.C., Tsai K.W.: Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: miRNAs as emerging novel cancer markers. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2014; 16: e1
- [99] Wu J., Li G., Wang Z., Yao Y., Chen R., Pu X.Y., Wang J.: Circulating microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker in gastric cancer. *Dis. Markers*, 2015; 2015: 435656
- [100] Wu Q., Lu Z., Li H., Lu J., Guo L., Ge Q.: Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011; 2011: 597145
- [101] Wu Q., Wang C., Lu Z., Guo L., Ge Q.: Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clin. Chim. Acta*, 2012; 413: 1058–1065
- [102] Wu X., Somlo G., Yu Y., Palomares M.R., Li A.X., Zhou W., Chow A., Yen Y., Rossi J.J., Gao H., Wang J., Yuan Y.C., Frankel P., Li S., Ashing-Giwa K.T. i wsp.: De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J. Transl. Med.*, 2012; 10: 42
- [103] Xiao B., Zhu E.D., Li N., Lu D.S., Li W., Li B.S., Zhao Y.L., Mao X.H., Guo G., Yu P.W., Zou Q.M.: Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis. *Oncol. Rep.*, 2012; 27: 559–566
- [104] Xu L., Li M., Wang M., Yan D., Feng G., An G.: The expression of microRNA-375 in plasma and tissue is matched in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2014; 14: 714
- [105] Yang I.P., Tsai H.L., Huang C.W., Huang M.Y., Hou M.F., Juo S.H., Wang J.Y.: The functional significance of microRNA-29c in patients with colorectal cancer: A potential circulating biomarker for predicting early relapse. *PLoS One*, 2013; 8: e66842
- [106] Yang J.S., Li B.J., Lu H.W., Chen Y., Lu C., Zhu R.X., Liu S.H., Yi Q.T., Li J., Song C.H.: Serum miR-152, miR-148a, miR-148b, and miR-21 as novel biomarkers in non-small cell lung cancer screening. *Tumour Biol.*, 2015; 36: 3035–3042
- [107] Yau T.O., Wu C.W., Dong Y., Tang C.M., Ng S.S., Chan F.K., Sung J.J., Yu J.: microRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2014; 111: 1765–1771
- [108] Yau T.O., Wu C.W., Tang C.M., Chen Y., Fang J., Dong Y., Liang Q., Ng S.S., Chan F.K., Sung J.J., Yu J.: MicroRNA-20a in human faeces as a non-invasive biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016; 7: 1559–1568
- [109] Yin J., Bai Z., Song J., Yang Y., Wang J., Han W., Zhang J., Meng H., Ma X., Yang Y., Wang T., Li W., Zhang Z.: Differential expression of serum miR-126, miR-141 and miR-21 as novel biomarkers for early detection of liver metastasis in colorectal cancer. *Chin. J. Cancer Res.*, 2014; 26: 95–103
- [110] Yu H., Jiang L., Sun C., Li Guo L., Lin M., Huang J., Zhu L.: Decreased circulating miR-375: A potential biomarker for patients with non-small-cell lung cancer. *Gene*, 2014; 534: 60–65
- [111] Yuan R., Wang G., Xu Z., Zhao H., Chen H., Han Y., Wang B., Zhou J., Hu H., Guo Z., Shen H., Xue X.: Up-regulated circulating miR-106a by DNA methylation promised a potential diagnostic and prognostic marker for gastric cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2016; 16: 1093–1100
- [112] Yuxia M., Zhennan T., Wei Z.: Circulating miR-125b is a novel biomarker for screening non-small-cell lung cancer and predicts poor prognosis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2012; 138: 2045–2050
- [113] Zang H., Wang W., Fan S.: The role of microRNAs in resistance to targeted treatments of non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2017; 79: 227–231
- [114] Zeng Q., Jin C., Chen W., Xia F., Wang Q., Fan F., Du J., Guo Y., Lin C., Yang K., Li J., Peng X., Li X., Cao K.: Downregulation of serum miR-17 and miR-106b levels in gastric cancer and benign gastric diseases. *Chin. J. Cancer Res.*, 2014; 26: 711–716
- [115] Zhang J., Song Y., Zhang C., Zhi X., Fu H., Ma Y., Chen Y., Pan F., Wang K., Ni J., Jin W., He X., Su H., Cui D.: Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as two novel potential biomarkers to indicate progression of gastric cancer. *Theranostics*, 2015; 5: 733–745
- [116] Zhang R., Wang W., Li F., Zhang H., Liu J.: MicroRNA-106b-25 expressions in tumor tissues and plasma of patients with gastric cancers. *Med. Oncol.*, 2014; 31: 243
- [117] Zhao W., Zhao J.J., Zhang L., Xu Q.F., Zhao Y.M., Shi X.Y., Xu A.G.: Serum miR-21 level: A potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015; 8: 14759–14763
- [118] Zheng R., Pan L., Gao J., Ye X., Chen L., Zhang X., Tang W., Zheng W.: Prognostic value of miR-106b expression in breast cancer patients. *J. Surg. Res.*, 2015; 195: 158–165
- [119] Zhu W., He J., Chen D., Zhang B., Xu L., Ma H., Liu X., Zhang Y., Le H.: Expression of miR-29c, miR-93, and miR-429 as potential biomarkers for detection of early stage non-small lung cancer. *PLoS One*, 2014; 9: e87780
- [120] Zhuang C., Jiang W., Huang D., Xu L., Yang Q., Zheng L., Wang X., Hu L.: Serum miR-21, miR-26a and miR-101 as potential biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, 2016; 40: 386–396

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.