



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Vliv kouření na vybrané regulační faktory zánětu v moči

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Buchtová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno autora	Bc. Kateřina Buchtová
Název práce	Vliv kouření na vybrané regulační faktory zánětu v moči
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav patologické fyziologie
Vedoucí práce	Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Klíčová slova	miRNA, kouření, moč, RT-qPCR
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český
Abstrakt	<p>Byly zkoumány a korelovány dva v dnešní době zajímavé trendy – miRNA a kouření. Kouření je celosvětově rozšířený zlovyk, který je významným faktorem ovlivňujícím vznik a vývoj chorob. MiRNA je RNA o velikosti přibližně 22 nukleotidů s regulačním potenciálem. Díky svým vlastnostem, rozličným funkcím a výskytu v různých lidských tekutinách jako je krev, moč, sliny, jsou ideálním kandidátem na biomarkery.</p> <p>V provedeném skříninku u kuřáků bylo nalezeno pět miRNA, jejichž exprese byla vlivem kouření změněna. Tuto hypotézu se snažila tato práce potvrdit. Na větším vzorku jedinců (43) byla měřena relativní exprese čtyř vybraných miRNA v moči pomocí metody RT-qPCR. Jedinci byli rozděleni na kuřáky a nekuřáky. Kuřáci byli jedinci, kteří se chtěli vyléčit se ze závislosti na nikotinu a přišli do Centra pro léčbu závislosti na tabáku. Byly u nich provedeny celkem tři odběry: na začátku odvykací kúry, po třech týdnech a po roce odvykání.</p> <p>Zjištěná relativní exprese testovaných miRNA nebyla významně statisticky ovlivněna kouřením. Ukazuje se, že kouření je jen další z faktorů, který minoritně ovlivňuje hladiny miRNA v moči. Vzorek moči je ve svém složení velice nestálý a bývá ovlivněn mnoha faktory. Zároveň se potvrdila relevance potvrzení skříninku jinou metodou na větším počtu vzorků. Přes negativní výsledky práce lze i nadále souhlasit s budoucím potenciálem miRNA a s pokračováním v jejich dalším výzkumu.</p>

Bibliographical identification

Author's name	Bc. Kateřina Buchtová
Title of thesis	Effect of smoking on selected regulatory factors of inflammation in the urine
Type of thesis	Master
Department	Institute of Pathological Physiology
Supervisor	Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Keywords	miRNA, smoking, urine, RT-qPCR
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

Abstract

Nowadays are studied and tied two striking trends – miRNA and smoking. Smoking is a worldwide dangerous habit. It is a significant factor with influence on the genesis and development of disease. MiRNA is RNA with a length of about 22 nucleotides with regulatory ability. Thanks to their nature, diverse functions, and existence in varied human fluids like blood, urine, saliva there are the ideal candidate for biomarkers. In executed screening by smokers was founded five miRNAs, which expression was changed under the effect of smoking. This thesis was tested to be confirmed by these theses. By RT-qPCR was measured relative expression of four selected miRNAs on a greater sample of individuals (43). People are divided between smokers and nonsmokers. Smokers were a person who would like to end their nicotine addiction. Thus, they came to the Centre for therapy of nicotine addiction. There was three urine collection: on the start of withdrawal therapy, after three weeks and after year.

Found relative expression of measured miRNA wasn't substantially influenced by smoking. It turns out that it's another factor with minority influence on the surface of miRNA in urine. A urine sample had a volatile composition and was affected by many aspects. Together, with more samples, was confirmed that screening by other method was relevant. Through negative results of this these, it can further agree with a future potential of miRNAs and continue with their later study.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce Mgr. Zdeňce Navrátilové, Ph.D. (Ústav patologické fyziologie a Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci) za odborné vedení mé diplomové práce, velkou vstřícnost, trpělivost a podnětné rady při zpracování práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Sikorové a Mgr. Veronice Žižkové za pomoc v laboratoři při testování miRNA a také za korekce v diplomové práci. Poděkování patří také prof. MUDr. Martinu Petřekovi, CSc. za možnost zpracovávat práci na Katedře patologické fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Tato práce byla vytvořena za grantové podpory IGA UP: LF_2020_004, IGA UP: LF_2021_014 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Kouření.....	10
2.1.1 Choroby vzniklé v důsledku kouření	11
2.2 microRNA	13
2.2.1 Objevení miRNA	14
2.2.2 Výskyt miRNA	15
2.2.3 MiRNA jako biomarkery	17
2.3 Exosomy.....	19
2.4 Real-time PCR	22
2.4.1 TaqMan™ microRNA assays	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Materiál a metody	30
3.1.1 Chemikálie	30
3.1.2 Biologický materiál.....	30
3.1.3 Metody	31
3.1.4 Přístroje a zařízení	35
3.2 Výsledky	36
3.2.1 miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094	36
3.3 Diskuze.....	48
3.3.1 miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094	48
4 ZÁVĚR	53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

SEZNAM ZKRATEK

BAL	bronchoalveolární laváž
CEVal	adukt akrylonitrilu hemoglobinu
Ct	cycle threshold – prahová hodnota cyklu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FEV ₁	objem vzduchu vydechnutý za první vteřinu usilovného výdechu po maximálním nádechu
CHOPN	Chronická obstrukční choroba
IL-1	interleukin 1
IL-8	interleukin 8
ILV	intraluminální vezikuly
MVB	multivezikulární těla
MVE	multivezikulární elementy
PCR	polymerázová řetězová reakce
PSA	prostatický specifický antigen
qPCR	quantitative PCR
RIN	RNA integrity number
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT	reverzní transkripce
TE	Tris/EDTA pufr
T _m	melting temperature (teplota tání)
TNEQ	celkový ekvivalent nikotinu v moči
UTRs	untranslated regions

1 ÚVOD

Kouření je celosvětově rozšířené bez ohledu na věk, pohlaví, rasu, národnost. Jeho vliv na zdraví člověka je stále monitorován a o velikosti negativních důsledků kouření u kuřáků se stále vede diskuze.

Nepříznivý vliv kouření byl prokázán mnoha studiemi. Ve 40 let prováděné studii byl zjištěn častější výskyt onemocnění jako rakovina jícnu, horních cest dýchacích a plic u těžkých kuřáků oproti nekuřákům. Bylo dokázáno, že kuřák si průměrně zkrátil svoje dožití o 7,5 let (Doll et al., 1994). Kouření lze tak posuzovat jako jeden z faktorů negativně ovlivňující zdraví člověka. Přesto samotní kuřáci, ať už si vědomi samotného faktu, či nikoli, zvyšují u sebe riziko vzniku chorob spojených s kouřením. Z toho důvodu nabývá na důležitosti prevence a s ní spojená včasná diagnostika prvního stádia onemocnění.

Neustále jsou tak kladeny požadavky na přesnější diagnostiku nemocí. Především se hledají neinvazivní způsoby, které by odhalily danou chorobu, a případně její stádium. Zachycení nemoci v raném stádiu je prioritou, protože může být zahájena okamžitá léčba.

Z těchto důvodů se stále hledají vhodné metody stanovení, a také dostatečně robustní markery. Je potřeba, aby tyto markery měly detekovatelné hladiny v rámci měřitelného rozsahu použitých přístrojů a vyskytovaly se ve zvoleném vzorku. Další podmínkou je, že bude marker ovlivněn pouze malým množstvím faktorů. Celkové stanovení nesmí být nákladné, a tudíž dostupné pro všechny laboratoře (Weber et al., 2010).

Jedním z používaných markerů jsou miRNA. Přínosem pro stanovení je jejich téměř kosmopolitní výskyt, neboť se kromě mateřského mléka, slin, slz, plodové vody, bronchiální laváže (BAL), mozkomíšního moku, peritoneální a pleurální tekutiny, spermatu nachází také v plasmě a moči (Weber et al., 2010). Moč sama představuje ideální vzorek, neboť ji lze jednoduše získat, a to i ve velkém množství.

MiRNA jsou poměrně novodobý objev. První miRNA byla objevena v roce 1993 (Lee et al., 1993) a stále jsou objevovány další miRNA. Výzkum se také zabývá jejich rolí v regulaci reakcí probíhajících v lidském těle a jejich možném zapojení v patologických procesech. Jelikož je rozsah výskytu miRNA natolik široký, nebyla zatím stanovena standardní metoda, pro jejich stanovení. Ovšem o qPCR se mluví jako o zlatém standardu pro stanovení miRNA (Becker et al., 2010; Hunt et al., 2015). Přesto i stanovení touto metodou má svá úskalí. Jejich velikost představuje jeden z problémů jejich stanovení. Navzdory všemu reprezentují miRNA směr, kterým by se v budoucnu mohla diagnostika v klinické praxi vydat.

Cílem této práce bylo přispět k ostatním studiím zabývajících se miRNA a pomoci v dalším výzkumu. Kouření je celosvětově rozšířeným zlozvykem. Z toho důvodu je důležité zjistit, zdali má kouření vliv na expresi miRNA využívaných jako markery. Pokud ano, je nutné kouření zohledňovat ve studiích, v nichž jsou miRNA využívány jako markery. Výsledky tohoto zkoumání by měly potvrdit hypotézu vytvořenou na základě skríninku, že exprese těchto čtyř miRNA – miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094, v moči je ovlivněna kouřením. Pozorování tak mohou přispět k hlubšímu poznání podmínek, které mohou působit na expresi miRNA.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kouření

Složek obsažených v tabákovém kouři je přibližně 4 700 (Borgerding and Klus, 2005; Thielen et al., 2008). Talhout a kolegové (2011) ve svém článku představili 98 potenciálně rizikových látek, které jsou součástí cigaretového kouře. Jedná se například o acrolein, anilín, benzen, beryllium, 1,3-butadien, kadmium, rtuť, kobalt, formaldehyd a oxid uhelnatý. Hecht (1999) hovoří o 55 karcinogenech vyskytujících se v cigaretovém kouři.

Škodlivost kouření souvisí právě s karcinogeny a mutageny. Kouřící člověk je dobrovolně těmto látkám vystavován. Poškození je způsobeno metabolity polycyklických aromatických hydrokarbonů, *N*-nitrosaminů a pravděpodobně také aromatických aminů. Dochází k němu mutagenézí, nebo oxidačním poškozením DNA. V konečném důsledku mohou karcinogeny a mutageny v cigaretovém kouři způsobit vícenásobné genetické defekty, rezistenci na následnou terapii, nebo zvýšení buněčné proliferace. Je tedy překvapivé, že pouze desetina těžkých kuřáků onemocní rakovinou plic (Shields, 1999).

Může se zdát, že množství karcinogenů obsažených v jedné cigaretě nemůže uškodit. Ovšem v horizontu let, kdy kuřák kouří, se může toto množství násobit a výsledný efekt již nebude bezvýznamný. Problém není nikotin obsažený v cigaretách, ale právě karcinogeny, které ho doprovází. Touha po nikotinu bohužel překoná i rizika kouření, se kterými je kuřák obeznámen (Hecht, 1999; Pfeifer et al., 2002). Tato touha souvisí s potřebou kouřit. A dle studií provedených na lidech a zvířatech jsou dlouhodobým vystavením nikotinu vyvolány změny v dopaminové signalizaci (Laviolette and van der Kooy, 2004).

Během kouření (spalování) vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), které se vyskytují převážně v plynné formě. Bylo zjištěno, že jim v průchodu dostatečně nebrání ani cigaretové filtry. ROS tak jdou během kouření kuřákovi přímo do plic (Huang et al., 2005). Mezi ROS patří také hydroxylový radikál. Jeho tvorba souvisí s tvorbou dehtu při kouření. Dehet obsahuje drobné částice, které se při kouření dostávají do plicních sklípků. Zde přicházejí do kontaktu s krví ve vlasečnicích, která odvádí ve vodě rozpustné látky. Superoxid pak vzniká reakcí semichinonového radikálu s kyslíkem. Následnou dismutací superoxidu vzniká peroxid vodíku, který reaguje s kovy (železnatý kationt) za tvorby velmi reaktivního hydroxylového radikálu. Pokud tyto reakce probíhají v buněčném jádru může být poškozena DNA (Valavanidis et al., 2009). Na rozdíl od cigaretového kouře samotné cigaretové listy nejsou škodlivé, neboť před spalováním obsahovaly jen velmi malé množství ROS. Stejný výsledek byl po spalování také u cigaretového popela (Huang et al., 2005).

Negativnímu vlivu jsou primárně vystaveny plíce. Tento fakt byl pozorován při patologickém výzkumu tkáně bronchiolů, terminálních bronchiolů a respiračních bronchiolů. Zánětlivý proces byl zformován spojením cigaretového kouře se změnami epitelu, buněčného infiltrátu, pojivové tkáně a s také ukládáním uhlíkového pigmentu (Hogg et al., 1994). Inhalace cigaretového kouře byla rizikový faktor chronické obstrukční choroby (CHOPN) (Scanlon et al., 2000).

Kouření podporuje tvorbu cytokinů a zvyšuje také množství buněk v BAL, které jsou do vzniku zánětu zapojeny. Studie BAL prokázala, že množství vykouřených cigaret zvyšuje přítomnost cytokinů IL-1 a IL-8. Se zvyšující se dávkou vykouřených cigaret byl pozorován vzestup množství makrofágů, ale i neutrofilů. Ty jsou navíc atrahovány IL-8, což bylo potvrzeno (Kuschner et al., 1996). Koncentrace lymfocytů v periferní krvi žen kuřáček byly rozdílné ve dnech, kdy kouřily, oproti dnům, kdy nekouřily. Kouřením byl snižován přirozený vzestup koncentrace lymfocytů v průběhu dne. Koncentrace eozinofilů byla kouřením snížena (Winkel and Statland, 1981).

S ohledem na výše zmíněné informace představuje kouření riziko, které může podporovat vznik řady onemocnění u kuřáků. Jedná se o CHOPN (Higgins et al., 1984), rakovinu plic (Doll and Hill, 1950), nebo astma (Ulrik and Lange, 2001).

2.1.1 Choroby vzniklé v důsledku kouření

Kouření potenciálně navyšuje výskyt chorob vedoucích ke smrti, což bylo ukázáno u skupiny kouřících britských lékařů pozorovaných po dobu 40 let. Jedná se především o rakovinu jícnu, horních cest dýchacích a plic. Jejich výskyt byl značně zvýšen u těžkých kuřáků oproti nekuřákům. Menší riziko, než u předešlých onemocnění bylo oproti nekuřákům u rakoviny slinivky břišní a močového měchýře. Rakovina žaludku byla další z nemocí vyskytujících se častěji u kuřáků. U těžkých kuřáků byly kromě rakoviny častěji pozorovány i další onemocnění – CHOPN, cor pulmonale, astma a aneurysma aorty (Doll et al., 1994).

Právě u chronické obstrukční choroby bylo kouření jedním z negativně působících faktorů. Přispívalo ke zvýšení rizika vedoucího k vyššímu výskytu CHOPN (Higgins et al., 1984). U dál kouřících kuřáků, kteří již měli problémy s dýcháním, byla jednovteřinová vitální kapacita plic (FEV_1) za pět let poloviční než u exkuřáků, kteří vydrželi nekouřit. Celková funkce plic byla u těžkých kuřáků zhoršena oproti těm, kteří kouřili méně (Scanlon et al., 2000). Již zvýšením spotřeby o jeden balíček cigaret bylo riziko CHOPN dvojnásobné (Higgins et al., 1984). Také významný nárůst rizika meningokové choroby

u dětí souvisel s vyšším množstvím vykouřených balíčků cigaret denně a počtem kuřáků v domácnosti, kteří je kouřili. Dospělí jedinci, kteří byli pasivně nadměrně vystaveni cigaretovému kouři měli větší riziko vzniku meningokové nemoci (Fischer et al., 1997).

Výše zmíněná potence již probíhajícího zánětu cigaretovým kouřem (Hogg et al., 1994) by mohla pro astma představovat zhoršení stavu a také negativně ovlivnit budoucí vývoj nemoci. Navzdory tomu nebylo aktivní kouření shledáno jako dostatečně silný a nezávislý faktor. Přesto může přispívat ke zvýšení možnosti budoucí hospitalizace a případné smrti (Ulrik and Lange, 2001).

Rakovina plic představuje další onemocnění související s kouřením. Doll a Hill (1950) zkoumali nárůst tohoto onemocnění ve správní oblasti Velký Londýn. Byla zjištěna spojitost mezi kouřením a rakovinou plic. Ovšem byly vzneseny pochybnosti o velikosti vlivu kouření na vznik nemoci. Právě tomu byla věnována pozornost v podobné studii, ale s jinou metodologií. Také zde byl pozorován vliv kouření na vznik rakoviny plic, ale vliv byl pouze vedlejší. A byl směřován u sledovaných případů pouze na určité skupiny (Doll and Hill, 1954). Wynder (1950) pak poukázal na souvislost kouření také s vyšším výskytem bronchogenního karcinomu.

Nadpolovičních hodnot dosáhlo kouření jako suverénní faktor u invazivní pneumokokové choroby. Studovanou populací byli starší imunokompetentní dospělí ve věku 18-64 let trpící touto nemocí. Více než polovina pacientů byla tvořena současnými kuřáky. Dalšími rizikovými faktory byly pasivní kouření a u pacienta se již vyskytující chronická choroba (Nuorti et al., 2000).

Je obecně známo, že kouření není zdraví prospěšné. Během čtyřiceti let byla sledována četnost úmrtí mezi kuřáky a nekuřáky ve věkovém rozmezí 35-69 let. Úmrtí kuřáků bylo o 21 % vyšší a další zvýšení o 9 % bylo spojeno s kouřením 25 a více cigaret denně (Doll et al., 1994). Za následujících deset let byl výsledek předchozího pozorování stejný. Prevence a zkvalitnění léčby bylo nejspíše důsledkem růstu přežití u nekuřáků. Navzdory tomu u kuřáků nebyla zjištěna žádná změna v přežití (Doll et al., 2004). Kuřák své přežití mohl ovlivnit, jestliže přestal kouřit. Ovšem benefity vycházející z ukončení kouření byly ovlivněny věkem zastavení kouření (Doll et al., 1994). Čím dříve kuřák skončil s kouřením, tím více bylo jeho přežití blíže nekuřákovi. Jestliže kuřák nekouřil již od středních let, bylo očekávané přežití zvýšeno o 10 let (Doll et al., 2004). Největší benefit mělo zastavení kouření ve věku 30 let, neboť došlo k redukcí pozdějších rizik vzniku rakoviny plic o více než 90 %. Menší snížení rizika bylo při zastavení kouření v 50 nebo 60 letech. Přesto nejvíce snížili riziko nekuřáci (Peto, 2000).

Druhým extrémem bylo, jestliže kuřák pokračoval v kouření. Svým počínáním si byl kuřák schopen snížit svou délku života o 7,5 let. Jednalo-li se o těžké kuřáky, bylo to až 10 let (Doll et al., 1994). Tento stav nebyl změněn kouřením menšího počtu cigaret, nebo výměnou za jiný typ tabákového výrobku. Nejvíce kuřáci prospěli svému zdraví, když vůbec nekouřili (Peto, 2000).

Stav kuřáků trpících výše zmíněnými nemocemi, které byly více či méně ovlivněny kouřením, byl nekouřením zlepšen. Příkladem byla chronická obstrukční choroba a její další zhoršení při pokračování v kouření (Scanlon et al., 2000).

Kromě samotného aktu kouření, byla pro stav nemoci podstatná také spotřeba cigaret. Riziko rozvoje rakoviny plic bylo 50násobně zvyšováno u osob nad 45 let se spotřebou cigaret denně 25 a více (Doll and Hill, 1950). Stejná situace byla u invazivní pneumokokové nemoci. Zde kromě zvýšeného množství vykouřených cigaret za den byly důležité i pack-years, po které kuřák kouřil (Nuorti et al., 2000). Právě u těžkých kuřáků kouřících více než 20 let bylo vysoké procento výskytu bronchogenního karcinomu (Wynder, 1950).

Kromě doby kouření byl významný i začátek kouření. Studie provedené ve Velké Británii v roce 1950 a 1990 poukázaly na kumulativní efekt rizika spojený s kouřením. Druhá zmiňovaná studie zjistila, že pokud jedinci zahájili kouření před 15. rokem života, měli později až dvojnásobné riziko vzniku rakoviny než skupiny, které začaly kouřit o pět či více let později. Nejnižší riziko rakoviny plic budou mít vždy nekuřáci. Přesto u současných kuřáků na odvykací kúře bylo pozorováno, že čím byla doba nekouření delší, tím je poměr rizika vzniku rakoviny plic nižší (Peto, 2000). Po zhruba 13 letech nekouření, kdy roční pokles rizika u exkuřáků byl o 14 % za rok, bylo budoucího riziko vzniku invazivní pneumokokové nemoci na úrovni nekuřáků (Nuorti et al., 2000). Naopak Wynder (1950) vyslovil předpoklad, že k manifestaci nemoci, bronchogenního karcinomu, může dojít až po desetiletém a víceletém nekouřením (Wynder, 1950).

2.2 microRNA

MiRNA představuje skupinu RNA o velikosti zhruba 22 nukleotidů. Jedná se o jednořetězcové, malé, endogenně exprimované RNA, které nekódují žádný protein. Jejich regulační potenciál představuje posttranskripční regulaci exprese genů u zvířat a rostlin (Bartel, 2004; Dong et al., 2013). Právě regulace genů je stále předmětem výzkumu. Lze předpokládat, že regulace jednoho genu probíhá prostřednictvím více miRNA, a naopak více genů může být díky nedokonalému párování cílem jedné miRNA (Dong et al., 2013).

Regulace genové exprese probíhá posttranskripčně potlačením translace nebo ovlivněním degradace mRNA. MiRNA působí na mRNA ve spojení s umlčovacím komplexem indukovaným RNA (Hunt et al., 2015)

Samotný název miRNA vznikl díky jejich velikosti a byl použit současně ve třech článcích vydaných v publikaci Science v roce 2001. Tento termín byl užíván k popisu stRNA a jiných malých RNA s analogickými vlastnostmi, avšak neznámou funkcí (Bartel, 2004; Lagos-Quintana, 2001; Lau, 2001; Lee, 2001).

Všechny dosud objevené a publikované miRNA lze vyhledat v miRBase registru. Každá miRNA má svůj specifický název složený z písmen a čísel. Přirazení miRNA ke druhu organismu vyjadřují 3-4 písmena před samotným názvem. Například „hsa“ představuje zkratku pro *Homo sapiens*. Za touto předponou následuje název miRNA znázorněný zkratkou pro zralou miRNA - „miR“, a sekvenčně přiřazené jedinečné identifikační číslo. Poslední částí názvu jsou přípony. Jestliže se miRNA odlišuje 1 nebo 2 bázemi, je k názvu přidáno písmeno (miR-10b). Číselná přípona bývá přidávána, pokud mají miRNA stejnou sekvenci, ale liší se jejich primární transkripty, ze kterých vznikly. Pokud je miRNA odvozena z 5' ramene pre-miRNA, přidává se přípona 5p. Naopak vznik z 3' ramene pre-miRNA je označen příponou 3p (Bartels and Tsongalis, 2009).

2.2.1 Objevení miRNA

První objevenou miRNA byla *lin-4* v roce 1993 v *Caenorhabditis elegans*. Její konzervované sekvenční části byly nalezeny také v dalších třech druzích *Caenorhabditis*. U detekovaného genu *lin-4* nebyla v jeho genové sekvenci zjištěna sekvence kódující protein. Jeho produkty byly dva transkripty *lin-4L* RNA (61 nukleotidů) a *lin-4S* RNA (22 nukleotidů). Spekulovalo se, že by tyto genové produkty *lin-4* mohly být aktivními. U obou transkriptů byla nalezena komplementarita k úseku 3'UTR *lin-14*. Regulace *lin-14* pravděpodobně probíhá na základě přímé RNA-RNA interakce mRNA nejspíše s *lin-4S*. Dochází k ovlivnění translace a je snižováno množství proteinu LIN-14. Regulace tímto způsobem představuje vysoce efektivní a specifické ovlivnění vývoje (Lee et al., 1993).

Později byla v *C. elegans* objevena miRNA *let-7*. Byl nalezen 21 nukleotidů dlouhý transkript, u kterého se předpokládalo, že nebude translatován. Důvodem byl chybějící start kodon AUG a konzervovanost sekvence. Velikost tohoto transkriptu byla dle pozorování konečná. Neočekával se jeho další sestřih a vznik většího transkriptu. Stejná sekvence *let-7*

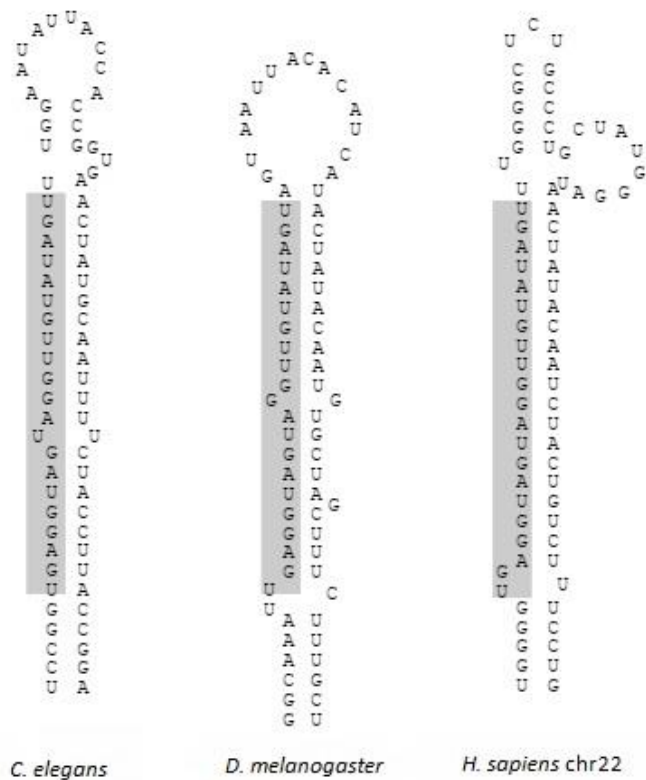
RNA byla nalezena také u *C. briggsae*. Mutace vyvolané v *let-7* DNA byly přeneseny do nalezeného *let-7* RNA transkriptu. Na základě zjištěných faktů byl vysloven názor, že *let-7* je RNA molekula. Zároveň byla zjištěna a potvrzena komplementarita mezi *let-7* a oblastmi 3'UTR mRNA genů *lin-14*, *lin-28* a *lin-41*. Tyto oblasti na mRNA se nachází vedle oblastí, které jsou komplementární k regulační RNA *lin-4*, případně se překrývají. Dle tohoto pozorování lze konstatovat, že se obě tyto RNA mohou podílet na regulaci těchto genů (Reinhart et al., 2000).

Samotná velikost miRNA *let-7* může být důležitý parametr pro funkci miRNA, neboť obdobnou velikost, 21-25 nukleotidů, mají také RNA během RNA interference (RNAi). Další paralela miRNA s RNAi je ve výskytu dlouhých regionů duplexové RNA, což poukazuje na případnou analogii jejich drah zpracování a amplifikace (Pasquinelli et al., 2000).

2.2.2 Výskyt miRNA

MiRNA jsou evolučně konzervovanou RNA (Dong et al., 2013). Jejich exprese a evoluční konzervace může souviset s jejich funkcí. MiRNA jako možné riboregulátory mohou plnit funkci posttranskripční regulace genů navázáním se na specifické sekvence mRNA. Zároveň mohou díky své nadměrné a různorodé genové expresi figurovat v rozličných regulačních drahách (Lau, 2001). Geny miRNA byly nalezeny jak v exonech, tak i mezi geny kódujícími proteiny (Ambros, 2001).

MiRNA jsou genová rodina pocházející ze starověkého předka RNA genu. Důkazy byly nalezeny u miRNA *let-7* (Ambros, 2001). Dle analýzy bylo zjištěno, že u velkého množství živočichů je její velikost a sekvence neměnná (viz obr. 1) (Pasquinelli et al., 2000). Dále byla také prokázána podobnost vzniku *let-7* v rámci živočišné říše a byl objeven cíl *let-7* (*lin-41*) kromě háďátka také u hmyzu, nebo obratlovců (Ambros, 2001). Důvodem konzervace sekvence *let-7* je pravděpodobně schopnost cílit na více sekvencí. Proto u ní nedocházelo kovariací k častému evolučnímu driftu a její sekvence zůstala zachována nezměněna. Naopak ke značné evoluci nejspíše došlo u miR-6 u *D. melanogaster* a miR-27 u HeLa. Mezi těmito dvěma miRNA byl shodný pouze krátký úsek a nebyly zjištěny již další podobnosti. Právě menší počet cílových sekvencí může znamenat větší kovariací (Lagos-Quintana, 2001). Ovšem kvůli zachování částečné homologie u sekvencí miRNA, a tedy i párování v sekundární záhybové struktuře, vede vzniklá změna ke kompenzační změně na druhém rameni záhybu. Tento fakt z pohledu fylogenetiky reprezentuje relevanci sekundární záhybové struktury (Lau, 2001).



Obr. 1: Genová sekvence *let-7* u *C. elegans*, *D. melanogaster* a *H. sapiens* na chr22 se zvýrazněnými konzervovanými úseky (převzato z Pasquinelli et al., 2000)

Výskyt miRNA u člověka byl potvrzen objevením transkriptu *let-7* RNA o velikosti 21 nukleotidů v lidské tkáni. Její exprese se v jednotlivých tkáních lišila, což teoreticky naznačuje buněčně regulovanou expresi (Pasquinelli et al., 2000). MiRNA byly nalezeny v plazmě a séru (Mitchell et al., 2008), v moči (Hanke et al., 2010) a slinách (Park et al., 2009). MiRNA se podařilo nalézt celkem ve 12 tělesných tekutinách – moči, pleurální tekutině, mozkomíšním moku, bronchiální laváži, slzách, plazmě, plodové vodě, mlezivu, peritoneální tekutině, mateřském mléce, spermatu a slinách. Právě u slin, ale i mateřského mléka a spermatu bylo nalezeno větší spektrum miRNA. Naopak v moči, mozkomíšním moku a pleurální tekutině byla různorodost miRNA nejmenší (Weber et al., 2010).

Některé miRNA byly pozorovány ve více tělesných tekutinách. To může odkazovat na jejich společnou funkci nebo původ. Naopak jiné miRNA byly pro určité tělesné tekutiny specifické. Nejméně jedinečných miRNA bylo objeveno v moči, bronchiální laváži a mozkomíšním moku oproti plazmě obsahující nejvíce specifických miRNA (Weber et al., 2010).

Weber a kolegové (2010) srovnávali vzorky od tří zdravých pacientů, tří pacientů s uroteliálním karcinomem horních močových cest a tří pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře. Výsledky prokázaly více různých miRNA u pacientů s uroteliálními karcinomy. Na základě výsledků lze předpokládat, že měnící se spektrum miRNA v moči může odpovídat probíhajícím patofyziologickým procesům. Toto pozorování předpovídá možné budoucí využití miRNA jako biomarkerů pro určení a sledování různých patofyziologií.

2.2.3 MiRNA jako biomarkery

Využití miRNA jako biomarkerů předpokládá, že budou splňovat charakteristiky ideálního biomarkeru. Takový typ biomarkeru lze kvantifikovat neinvazivně a za nízké náklady. Především pak je důležitá specifita pro studované onemocnění a spolehlivé včasné zjištění příznaků nemoci před její manifestací (Weber et al., 2010).

Nyní má většina používaných markerů proteinový základ a jejich použití může být problémové. Ne všechny proteiny se mohou vyskytovat v dostatečném množství v plazmě a séru. Navíc je v těchto vzorcích problém celkové zastoupení proteinů. Dále mohou proteinové biomarkery podléhat posttranslačním modifikacím a jejich afinita není vždy vysoká. Z tohoto pohledu se pak miRNA jeví jako výhodné řešení. Jejich specifita i limit detekce lze jednoduše zajistit. Metody pro jejich samotnou detekci a amplifikaci pak jsou jednoduché. Výhodou je jejich nízká komplexita a také nejsou známy žádné změny po zpracování. Jsou pro určité tkáně specifické a jejich sekvence jsou mezi lidmi a modelovými organismy konzervované. (Weber et al., 2010).

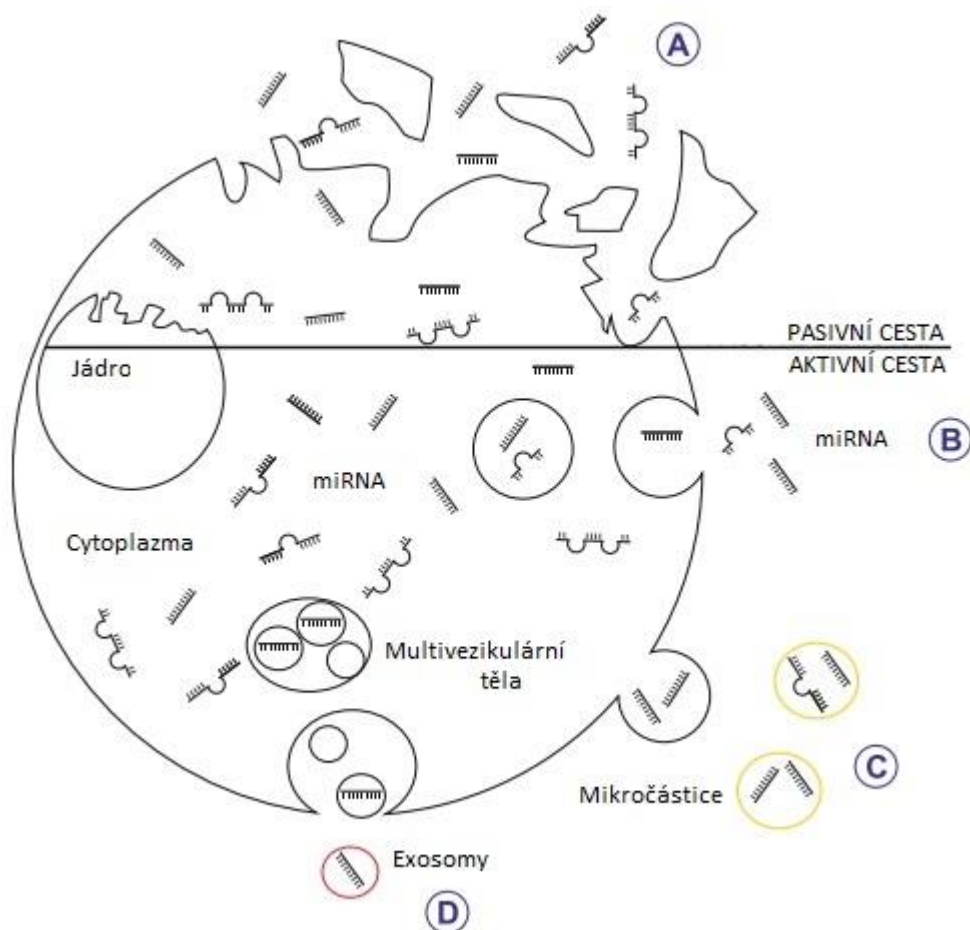
Dalším důležitým mezníkem pro využití miRNA jako markerů bylo jejich objevení v exosomech. Valadi a kolegové (2007) zjistili, že se v exosomech vyskytuje RNA, ale i miRNA. Důkaz o tom poskytlo srovnání mezi kontrolními a RNAsou ošetřenými skupinami exosomů linií myších žírných buněk (MC/9). U ošetřené skupiny nebyla pozorována žádná degradace RNA. K ní došlo pouze v případě, kdy byla ke vzorku RNA externě přidána. Exosomy chránily RNA i před účinky trypsinu, což jen potvrdilo, že se RNA nenachází vně exosomu na jeho vnějších strukturách či makromolekulách (Valadi et al., 2007).

MiRNA byly nalezeny také v cirkulujících nádorových exosomech v séru pacientek, kterým byl diagnostikován serózní papilární adenokarcinom vaječnicků. Provedené srovnání hladin miRNA pocházejících z nádorových buněk a miRNA z nádorových exosomů cirkulujících v periferní krvi prokázalo jejich vzájemnou korelaci. Hladiny vybraných

miRNA byly zvýšeny v exosomech pocházejících ze séra pacientek s rakovinou, na rozdíl od miRNA v exosomech ze séra pacientek s benigním onemocněním. U kontrol pak nebyly tyto miRNA detekovány (Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Korelace v hladinách miRNA u nádorových buněk a cirkulujících exosomů v periferní krvi ukazuje, že miRNA obsažené v exosomech mohou být selektivně vybírány (Simpson et al., 2009)

Nalezené miRNA v těchto dvou zmíněných studiích (Taylor and Gercel-Taylor, 2008; Valadi et al., 2007) byly společně s miRNA zjištěných v další studii (Hunter et al., 2008) porovnány. Byl zjištěn překryv pouze v osmi miRNA. Lze předpokládat, že důvodem nízkého překryvu je buněčná specifita nalezených miRNA, nebo jejich náhodné zařazení. Vliv mohly mít i rozdílné metody použité při izolaci a purifikaci miRNA. Přesto objev miRNA v exosomech a jejich změny exprese mají nesmírný potenciál pro diagnostiku (Simpson et al., 2009).

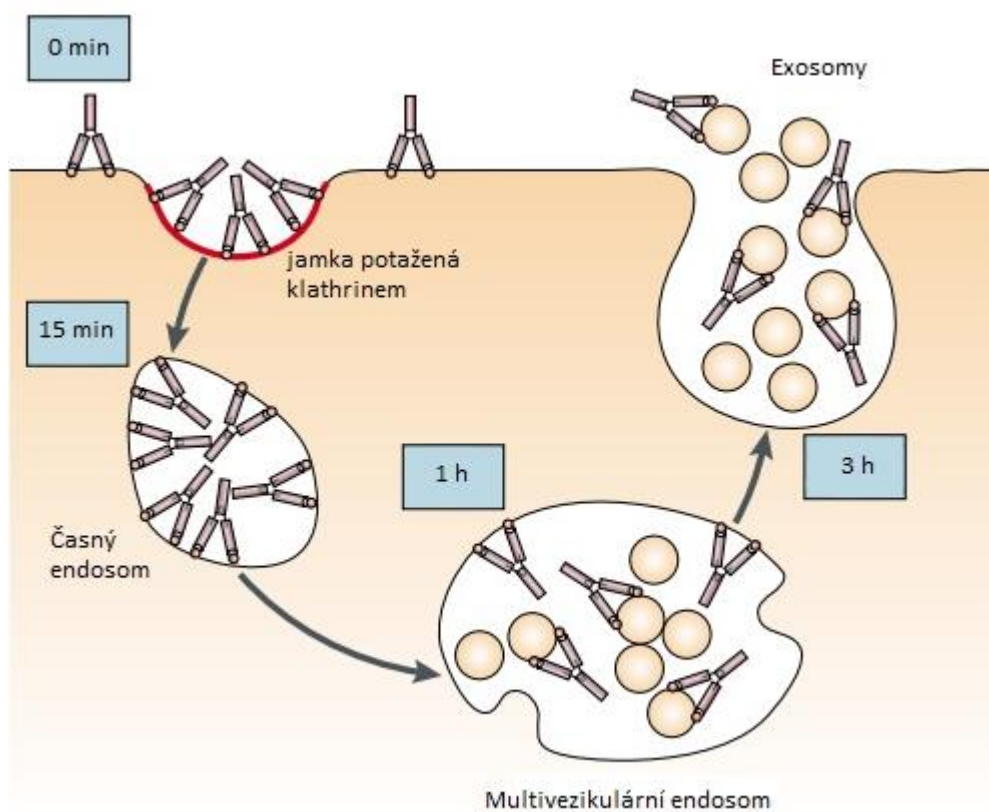
MiRNA se v moči mohou vyskytnout dvěma způsoby – pasivním a aktivním (viz obr. 2). Rozdíl je nejen v potřebě energie, ale i původu samotných miRNA. Pasivní cestou jsou miRNA uvolňovány z buněk poškozené tkáně, nebo z buněk v apoptóze. Ovšem za standardních podmínek je důležitější cesta aktivní. Za spotřeby energie jsou sekretovány mikrováčky, mezi které patří i mikročástice a exosomy. Sekrece se děje za normálních i patologických podmínek (Mlcochova et al., 2014).



Obr. 2: Mechanismus sekrece miRNA v moči. (A) Pasivní cesta, (B) aktivní sekrece exocytózou sekrečních váčků, (C) sekrece cestou plazmatických mikročastic, (D) sekrece cestou MVB a exosomů (převzato z Mlcochova et al., 2014)

2.3 Exosomy

Jedná se o malé váčky o průměru 50-90 nm. Označení exosomy vyjadřuje podstatu jejich vzniku, který představuje exocytózu váčků do extracelulárního prostředí (Johnstone et al., 1987). Naopak pokud jsou uvnitř multivezikulárních endosomů (MVE) nazývají se intraluminální vezikuly (ILVs) (Février and Raposo, 2004). MVE bývají také označovány jako multivezikulární těla (MVB) (Sotelo and Porter, 1959).



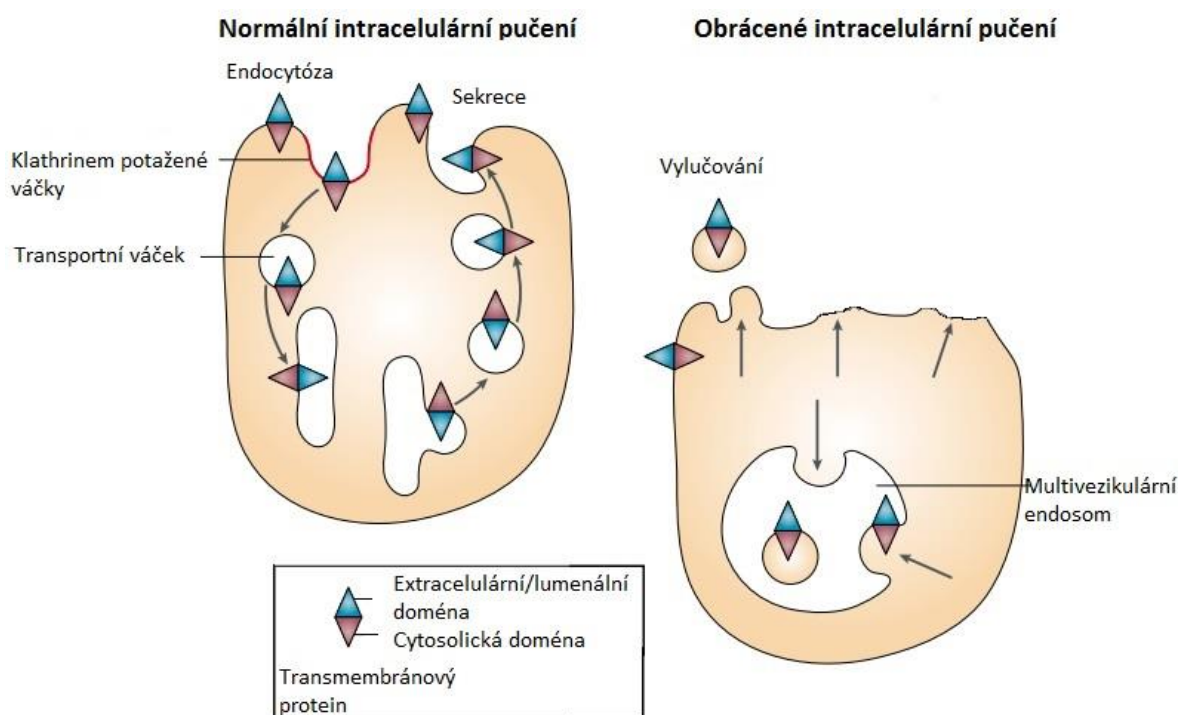
Obr. 3: Proces vzniku exosomů (převzato z Théry et al., 2002)

Výzkumy zrání retikulocytů ukázaly proces vytváření exosomů (viz obr. 3). Bylo použito značení zlatem. Byl značen samotný transferinový receptor pocházejícího z lidského séra (Harding et al., 1983), nebo značená králičí protilátka IgG proti ovčímu transferinovému receptoru (Pan et al., 1985). Označené receptory byly endocytózou pohlceny do malých endosomů. Poté se tvořily multivezikulární elementy/endosomy (MVE) o průměru 200-400 nm. Uvnitř nich se začaly formovat malé váčky o velikosti 50 nm. Po spojení membrány MVE a plazmatické membrány buňky došlo k exocytóze vezikulů. Ty na svém povrchu nesly značený transferrinový receptor (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985). Původ exosomů z ovčích retikulocytů a červených krvinek potvrdilo také jejich podobající se složení fosfolipidů membrány (Johnstone et al., 1987).

Exosomy jsou lipoproteinové struktury (Johnstone et al., 1987). Skladba proteinů vyskytujících se v exosomech je různorodá. Objevují se zde proteiny z cytosolu, součásti endocytů a také plazmatické membrány (Théry et al., 2002). To bylo potvrzeno výzkumem na myších dendritických buňkách odvozených ze sleziny. Byly srovnávány proteiny vyskytující se v exosomech s proteiny dendritických buněk, jejich cytosolu a plazmatické membrány. Srovnání ukázalo, že u exosomů na rozdíl od srovnávaných skupin jsou určité proteiny více či méně přítomné, nebo nepřítomné (Théry et al., 1999).

Exosomy tedy nejsou jen vezikuly, které představují části plazmatické membrány. Poukázalo na to odlišné složení proteinů membrány exosomů a plazmatické membrány (Raposo et al., 1996; Théry et al., 2002). Naopak přítomnost proteinů endocytů v exosomech, potvrzovala jejich mechanismus vzniku (Théry et al., 2002). Tvorba exosomů, jak bylo již výše zmíněno, je spojena s endocytózou a vznikem multivezikulárních elementů (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985).

Právě schéma vzniku exosomů ukazuje na společnou vlastnost exosomů a apoptických mikrovezikul. Proces lze označit za tzv. „pučení dovnitř“ (viz obr. 4). Dochází k tvorbě vezikulů uvnitř MVE. Ty se odlišují orientací své membrány a v ní obsažených transmembránových proteinů od původních endosomů a tedy celého vnitřního vezikulového transportního systému (Pan et al., 1985; Théry et al., 2002).



Obr. 4: Rozdíl mezi tvorbou vezikulů normálním intracelulárním a obráceným intracelulárním pučením (převzato z Théry et al., 2002)

Exosomy jsou sice produkovány živými buňkami (Théry et al., 2002), přesto se v jistém ohledu podobají apoptickým mikrovezikulům (Aupeix et al., 1997). Jejich společným znakem je uspořádání membrány – lumenální strana membrány je vně a cytosolická uvnitř vezikulu. Na liniích myších dendritických buněk D1 odvozených ze sleziny byla ukázána částečná shoda ve skladbě proteinů exosomů a mikrovezikul vznikajících při apoptóze. Částečná shoda mezi exosomy a mikrovezikuly vznikající při apoptóze buňky panuje také ve skladbě proteinů, což bylo ukázáno na liniích myších

dendritických buněk D1 odvozených ze sleziny. Ovšem celkové proteinové schéma exosomů a apoptických vezikulů se odlišovalo. Další rozdíly byly pozorovány také ve velikosti, hustotě a tvaru (tvar šálku je typický pro exosomy). Současně u těchto linií nebyla nalezena absolutní shoda ve spektru membránových proteinů exosomů a endocytů. Vznik exosomů je tak teoreticky doprovázen nějakým třídícím mechanismem určujícím výsledné složení exosomů (Théry et al., 2001).

Sekrece exosomů není pouze spojena s retikulocyty, ale mohou být sekretovány B-lymfocyty, dendritickými buňkami. Exosomy byly nalezeny také v T-lymfocytech, žírných buňkách, krevních destičkách, v některých buňkách nádorových linií a ve střevních epitelálních buňkách (Février and Raposo, 2004).

Dalším vzorkem, ve kterém byly nalezeny exosomy je moč. Jednalo se o exosomy z epitelia renálního tubulu a byly velké 35-40 nm. Jejich způsob vzniku spojený s orientací membrány cytoplazmickou stranou dovnitř je odlišil od endosomů, nebo jiných sekrečních váčků. Složení proteinů v nalezených exosomech se shodoval s teorií vzniku exosomů pučením dovnitř. Na základě pozorování se předpokládalo, že exosomy v moči jsou tvořeny endocytickou cestou. K ní dochází spojením membrán MVB a buněk renálního epitelu. Cytosol a v něm obsažené proteiny uvnitř exosomu mohou v dalších letech pomoci při neinvazivním testování. Mohou být sledovány možné změny exprese proteinů odehrávající se v buňkách renálního tubulu (Pisitkun et al., 2004).

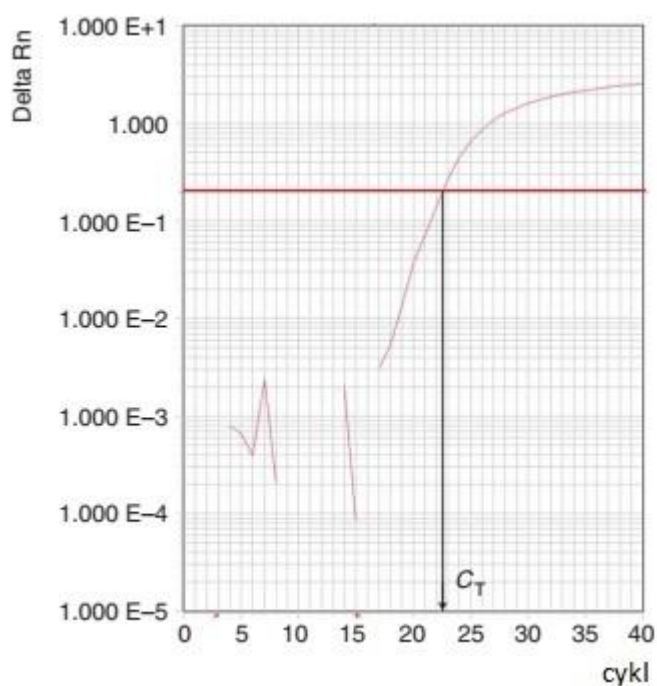
Obecně jsou exosomy dobrými kandidáty pro využití v diagnostice a terapii. Důvodem je, že se jedná o neživé, z tekutin jednoduše izolovatelné částice, ve kterých jsou obsaženy molekuly zapojené v nejrůznějších procesech uvnitř buňky a zároveň jsou schopny přenášet antigenní informace (van Niel et al., 2006). Patologické, ale i fyziologické změny renálního systému, tak mohou být identifikovány díky tomu, že moč přijde do kontaktu s celým renálním systémem. Zároveň se v ní vyskytují zbytky cytosolu z buněk renálního epitelu (Pisitkun et al., 2004). Ovšem i přes tato pozitiva je podstatné hledat v exosomech také nástroj invaze nádorových buněk do zdravé tkáně, ale i patogenů pro zvýšení schopnosti svého šíření mezi buňkami (van Niel et al., 2006).

2.4 Real-time PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je široce rozšířenou metodou a má nejrůznější aplikace. Byla objevena Kary Muliss v roce 1983. Název odkazuje na využití DNA polymerázy a růstu množství DNA řetězovou řadou.

Důvodem jejího širokého využití je jednoduchost a vysokou míru úspěchu stanovení. Nejzákladnější uspořádání PCR využívá vzorek DNA, ke kterému jsou přidány oligonukleotidové primery, deoxynukleotid trifosfáty a termostabilní *Taq* DNA polymeráza ve vhodném pufru. Následně dochází ke střídání teplot směsi několik hodin, a dochází k amplifikaci vzorku (Saiki, 1989).

Výhodné spojení reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce umožnilo hodnotit expresi genů v posuzovaném vzorku (Murphy et al., 1990; Noonan et al., 1990). Výstupní hodnotou měření metodou real-time PCR je číslo cyklu, při kterém dosáhne fluorescence prahové hodnoty (C_t) – v PCR reakci nastane stav, při kterém během probíhajícího cyklu přesáhne fluorescence barviva reportéru její libovolně nastavenou hladinu (viz obr. 5). Číselně vyjádřená hodnota C_t je převrácená k množství amplikonu v reakci (čím nižší hodnota C_t je, tím je více amplikonu) (Schmittgen and Livak, 2008).



Obr. 5: Typický výstup real-time PCR, výpočet C_t . Počet cyklů PCR reakce je 40. C_t označuje bod, ve kterém křivka dosáhla prahové hodnoty (červená čára) (převzato z Schmittgen and Livak, 2008).

Real-time PCR je považována za metodu s nižší hustotou, jelikož je prováděna na 96- nebo 384-jamkové destičce. Nicméně díky její jedinečné citlivosti je možné profilovat několik stovek genů, přestože nedosahuje výkonnosti jako cDNA microarray (Schmittgen and Livak, 2008).

Expresi genu, například miRNA, lze hodnotit metodou absolutní kvantifikace, která zahrnuje standardní křivku pro každou miRNA. Ta je vytvořena na základě postupného

ředění původně známého množství cDNA. S ohledem na to, že při této kvantifikaci není vyžadována endogenní kontrola, nachází tato varianta uplatnění v diagnostice (Moldovan et al., 2014). Dále lze absolutní kvantifikaci využít, jestliže zjišťujeme absolutní počet kopií transkriptů (Livak and Schmittgen, 2001). Pokud ale není tato informace nezbytná a tvorba standardní křivky může být v této situaci složitá, přistupujeme k možnosti relativní kvantifikace (Schmittgen and Livak, 2008). Ta hodnotí poměr Ct hodnot mezi sledovaným genem a vnitřní kontrolou (Moldovan et al., 2014). Ta by měla být neměnná vůči podmínkám experimentu (Schmittgen and Livak, 2008). Současně je nutné, aby byla vnitřní kontrola také univerzální, ale zároveň aby se vyskytovala a stabilně exprimovala při různých podmínkách a patologiích. V případě endogenních kontrol je důležité, aby měli velikost, ale i účinnost zesílení podobnou se zkoumanými miRNA (Moldovan et al., 2014).

Jestliže chceme vyhodnotit výsledky real-time PCR pomocí relativní kvantifikace, je jednou z možností $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (komparativní Ct) metoda, s jejíž pomocí vypočítáme relativní změny v genové expresi pozorovaného vzorku vůči kontrolnímu vzorku. Výtěžnost amplifikace by měla být u referenčního a měřeného vzorku zhruba totožná, jinak je vhodné použít absolutní kvantifikaci. Je důležité normalizovat množství RNA přicházející do PCR, k čemuž slouží vnitřní kontrola. K tomuto účelu lze využít housekeeping gen, který nesmí být nikterak ovlivněn nakládáním se vzorkem. Jako kalibrátor se nejčastěji používá neošetřený vzorek (Livak and Schmittgen, 2001).

Pokud je použita komparativní Ct metoda, tak u neošetřené kontroly je změna genové exprese rovna jedné. Naopak u ošetřených vzorků dochází ke změně genové exprese v porovnání s neošetřenou kontrolou (Livak and Schmittgen, 2001). Jistou překážkou v aplikaci $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metody je nutnost zachovat předpokládanou účinnost PCR, protože pokud není, přichází na řadu její optimalizace.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{[(C_t \text{ testovaného genu} - C_t \text{ vnitřní kontroly}) \text{ošetřený vzorek}]}{[(C_t \text{ testovaného genu} - C_t \text{ vnitřní kontroly}) \text{neošetřená kontrola}]}$$

Není podstatné, které ΔCt bude ve vzorci první, nebo druhé, vliv to má pouze na konečný výklad vypočteného výsledku. Vzorec v této podobě říká, že je porovnávána exprese testovaného genu vztažena na vnitřní kontrolu v ošetřeném vzorku s neošetřenou kontrolou (Schmittgen and Livak, 2008).

Stanovení miRNA metodou qPCR má své výhody ve srovnání s microarray. Lze jí provádět rychle a senzitivní stanovení velkého dynamického rozsahu za použití nanogramového množství výchozího materiálu (Benes and Castoldi, 2010). Navzdory tomu stanovení miRNA představuje do budoucna výzvu.

Pro detekci miRNA je podstatná specifita a citlivost (Hunt et al., 2015), neboť frakce miRNA zaujímá pouze 0,01 % z celkové RNA izolované ze vzorku (Dong et al., 2013). Jakékoli neočekávané zvýšení množství miRNA, může znamenat záměnu miRNA za nedefinované RNA fragmenty. Ale riziko možného rozpoznání a degradace nukleázami by mělo být sníženo malou velikostí miRNA. Měla by tak být zaručena její větší stabilita a vliv degradace celkové RNA by neměl být na rozdíl od mRNA tak výrazný (Becker et al., 2010). Přesto může degradace celkové RNA ovlivnit analýzu exprese miRNA. Z toho důvodu je důležitý kvalitní výchozí materiál (Hunt et al., 2015; Ibberson et al., 2009) a integrita RNA by měla být sledována již ve fázích předcházejících samotné analýze genové exprese (Becker et al., 2010; Hunt et al., 2015). Parametrem integrity RNA je hodnota RIN (RNA integrity number). Pro spolehlivé výsledky při analýze miRNA by mělo nebývat hodnot $RIN = 5$ (Becker et al., 2010), nebo $RIN = 7$ (Ibberson et al., 2009).

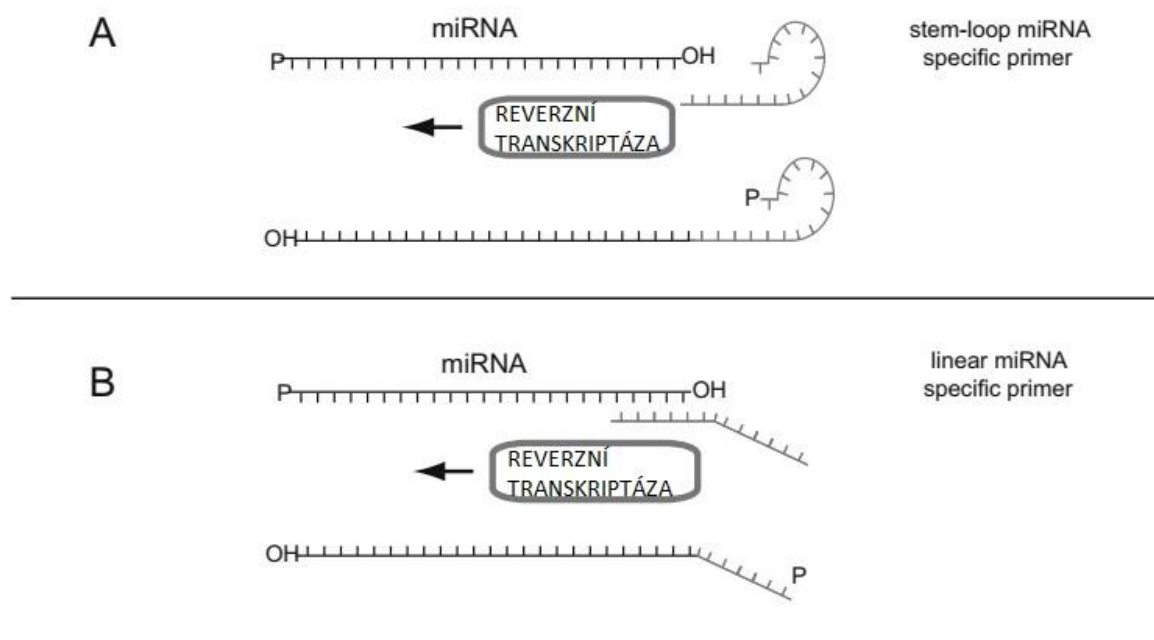
Jak již bylo výše zmíněno Becker a kolegové (2010) přisuzovali větší stabilitu miRNA oproti mRNA. Stabilita miRNA byla zkoumána v moči zdravých osob po dobu 5 dnů za pokojové teploty 25 °C a při teplotě 4 °C. Byl sledován také vliv na stabilitu miRNA po deseti zamrazeních při -80 °C a následných rozmrazeních (Mall et al., 2013). Navzdory tomu, že moč obsahuje nukleázy včetně RNAs (Hanke et al., 2010), byla prokázána relativní stabilita miRNA za uvedených podmínek (Mall et al., 2013). Důvodem mohla být jejich malá velikost (Hanke et al., 2010), nebo jejich výskyt v exosomech, mikročasticích, mikrovezikulech a multivezikulech (Schwarzenbach et al., 2011), případně obě vlastnosti zároveň. Přesto byla nakonec po čase pozorována degradace. Ovšem hodnoty u testovaných miRNA byly stále u horní hranice detekce (Mall et al., 2013) na prahové hodnotě cyklu 35 (Ji et al., 2009). Rychlost, s jakou k degradaci došlo, byla u testovaných miRNA shodná a nezávisela na sekvencích reprezentativních miRNA. Pro nejlepší výsledky bylo doporučeno měřit miRNA v moči během 24 hodin (Mall et al., 2013).

K podobným závěrům dospěl i Yun a kolegové (2012). Stabilita miRNA byla sledována celkem u čtyř vzorků supernatantu moči zdravých dobrovolníků. Vzorky byly podrobeny sedmi cyklům zmrazení a rozmrazení, nebo byly ponechány 72 hodin při pokojové teplotě. Všechny vzorky měly za všech zkoumaných podmínek stabilní množství miRNA. Na základě tohoto pozorování bylo potvrzeno, že se miRNA v supernatantu moči nacházejí ve stabilní formě.

2.4.1 TaqMan™ microRNA assays

Používání metod využívajících klonování, Northern blotting a prodlužování primerů pro stanovení miRNA má své limity. Jejich senzitivita a specifita není dostatečná. Naopak Taqman PCR assay upravenou pro stanovení miRNA byly vyřešeny problémy předchozích metod. Například amplifikace miRNA o velikosti pouhých 22 nukleotidů a falešně pozitivní signál. Ten byl vyvoláván podobnými miRNA, prekurzory a genomickými sekvencemi. Taqman PCR analýzou byla spojena zvýšená specifita reportérů Taqman assay, senzitivita PCR a možnost sledovat velký dynamický rozsah v reálném čase. Schéma reakce TaqMan miRNA assays se skládá ze dvou kroků: reverzní transkripce pomocí stem-loop primerů následované real-time PCR (Chen, 2005).

TaqMan™ microRNA assays patří mezi kvantitativní RT-PCR assays, kterými lze stanovit zralé miRNA. Oproti klasické Taqman™ RT-PCR assay využívá TaqMan™ microRNA assay během reverzní transkripce stem-loop primery (viz obr. 6) (Schmittgen et al., 2008).



Obr. 6: Srovnání reverzní transkripce zralé miRNA využívající (A) stem-loop specifického miRNA primeru, (B) lineárního specifického miRNA primeru (převzato z Benes and Castoldi, 2010)

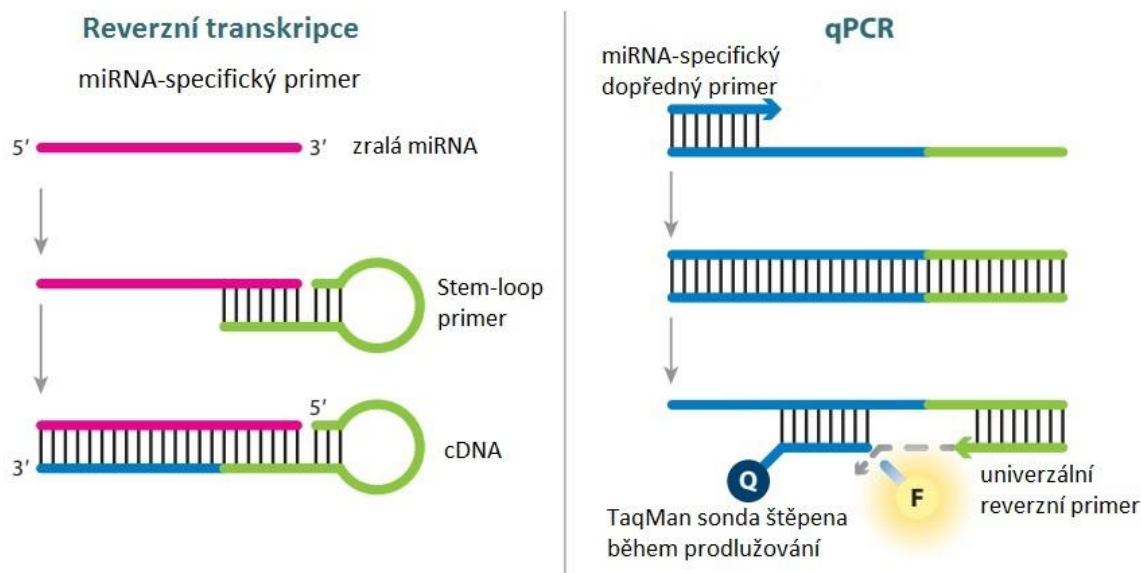
Touto modifikací RT primeru byla až 100násobně zvýšena účinnost reverzní transkripce. Zároveň bylo možné na základě ΔC_t hodnot odlišit miRNA lišící o dvě báze (Chen, 2005). Stem-loop primery jsou dlouhé oligonukleotidy. Váží se na stem-loop místa

miRNA (Chugh and Dittmer, 2012) k jejich 3' koncům, čímž je umožněno odlišení podobné miRNA. Struktura stem-loop primerů zabraňuje případné vazbě na prekurzory miRNA, nebo další dlouhé RNA (Schmittgen et al., 2008).

Výhodou stem-loop primerů je jejich schopnost přesného zacílení na zralé formy miRNA. Pozadí je sníženo a specifita je naopak zvýšena (Hunt et al., 2015). Pro strukturu stem-loop primeru je důležitý počet bází, které jsou komplementární k 3' konci antisense (protisměrného) vlákna. Nejlepší výsledky byly u primerů s velikostí vazebné části 5 a 6 bází (Jung et al., 2013).

Stem-loop primerem je také zajištěna stabilita miRNA a heteroduplexu DNA při reverzní transkripci. A to připojením bází nacházejících se za očkem (loop) stem-loop primeru. Díky tomu je účinnost reverzní transkripce zajištěna, i když jsou RT primery krátké. Po reverzní transkripci je zvětšen produkt rozbalením stem-loop primeru a přidáním sekvence po směru miRNA. Výsledkem je zlepšení následné TaqManTM assay (Schmittgen et al., 2008).

Během miRNA TaqManTM assay speciálně navržená smyčka na RT primeru interaguje se zralými miRNA. Vazbou vzniká chiméra a při prodlužování miRNA ve směru 3' dochází reverzní transkriptázou k tvorbě produktu (viz obr. 7). Vlákno produktu je poté schopno vázat specifické primery a sondu při PCR (Moldovan et al., 2014). Po reverzní transkripci je RT produkt kvantifikován TaqMan PCR za použití dopředného primeru specifického pro miRNA, reverzního primeru a barvivem označené TaqMan sondy (viz obr. 7). Krátký úsek nacházející se na dopředném primeru na jeho 5' konci zajišťuje zvýšení T_m (teplota tání) s ohledem na sekvenci miRNA molekuly (Chen, 2005). Teploty tání miRNA nabývají různých hodnot. Důvodem je jejich malá velikost, která odpovídá velikosti standardního PCR primeru (Hunt et al., 2015), ale i různorodost v obsahu guaninu a cytosinu (Benes and Castoldi, 2010). Z technického hlediska je tak senzitivní a specifické stanovení miRNA ve vzorku obtížné (Benes and Castoldi, 2010) a při detekci je výzvou optimalizovat souběžně probíhající reakce (Hunt et al., 2015).



Obr 7: Schéma TaqManTM microRNA assays (převzato z Hunt et al., 2015)

Komplikací při stanovení je i složitost selektivního čištění zralých miRNA, neboť nemají společný znak. Současně se hledaná cílová sekvence nemusí vyskytovat pouze ve zralé miRNA, ale i v primárním transkriptu (pri-miRNA) a prekurzoru (pre-miRNA). Jestliže miRNA pocházejí ze stejné miRNA rodiny, může být analýza komplikována jejich analogickými sekvencemi lišícími se pouze v jednom nukleotidu (Benes and Castoldi, 2010).

Reverzní transkripce je následována qPCR a amplifikované produkty jsou detekovány a kvantifikovány v reálném čase (Gibson et al., 1996). Je sledováno zvýšení fluorescenčního signálu reportéru odpovídající množství DNA vznikající během každého cyklu PCR (Nolan et al., 2006). Jedním ze zdrojů fluorescenčního signálu mohou být TaqMan sondy. Jedná se o dvojité označené hydrolyzační sondy obsahující na jednom konci fluorescenční reportér a na druhém konci zhášec. Právě blízkost zhášec je překážkou v emisi fluorescence reportéru. TaqMan sondy se hybridizují na vnitřní úsek ampliconu. *Taq* polymerázou je od primeru prodlužován řetězec cDNA, až dosáhne 5' konce TaqMan sondy. Zatímco exonukleázovou aktivitou *Taq* polymerázy je ve směru 5' → 3' hydrolyzována TaqMan sonda. Následně již není fluorescenční reportér v blízkosti zhášec a dochází k emisi fluorescence. Intenzita fluorescence je úměrná množství vznikajících produktů PCR reakce. Z tohoto důvodu je možné přesně kvantifikovat amplifikované cíle při probíhající reakci. Je nutné mít na zřeteli i možný vznik dimerů primerů, nebo vznik dalších nespecifických amplifikačních produktů. U nich není emitována fluorescence, čímž může být snižována citlivost a účinnost qPCR reakce (Benes and Castoldi, 2010).

Taqman sondami, které jsou využity při real-time amplifikaci, jsou ovlivněny prahové hodnoty v počtu cílových a referenčních molekul. Proto je při jejich použití důležité sledovat tyto faktory – barvivo reportéru na sondě, účinnost štěpení a čistota sondy, dále nastavení prahu fluorescence a vlivu sekvenčního kontextu na fluorescenci sondy (Livak and Schmittgen, 2001).

Dále je také důležité zhodnotit, jaké informace jsou o miRNA hledány. Stanovení aktivní, zralé miRNA je upřednostňováno před inaktivní pre-miRNA. Ale jestliže chceme určit konkrétní místa možné regulace pomocí miRNA, je potřeba stanovit zralou miRNA i prekurzor (Schmittgen et al., 2008). Analýza meziproductů v průběhu zrání miRNA poskytne rozdílné informace o buňce. Informace o delecích, amplifikacích nebo SNPs v genu miRNA jsou získány analýzou genového lokusu miRNA pomocí qPCR. Více o regulaci transkripce lze zjistit testováním pri-miRNA a pre-miRNA. Naopak informace o funkci, specifitě cíle, změnách ve zpracování a exportu miRNA, případně její stabilitě, budou poskytnuty analýzou zralé miRNA (Chugh and Dittmer, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

β -mercaptoethanol, 96% ethanol, miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids (Exiqon A/S, Vedbaek, Dánko), Nuclease-free water, primery: RNU6B (RT 001093), hsa-miR-337-3p (RT 002157), hsa-miR-3613-5p (RT 463197_mat), hsa-miR-3921 (RT 462722_mat), hsa-miR-5094 (RT 475625_mat) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), TaqMan® MicroRNA Assay – hsa-miR-337-3p (TM 002157), hsa-miR-3613-5p (TM 463197_mat), hsa-miR-3921 (TM 462722_mat), hsa-miR-5094 (TM 475625_mat), TaqMan® MicroRNA Control Assay – RNU6B (TM 001093) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Tris/EDTA pufr, Urine microRNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Kanada)

3.1.2 Biologický materiál

Byla použita moč 43 zdravých jedinců (Tab. 1 a 2). 18 z nich byli nekuřáci, kteří za rok vykouřili 1 nebo méně cigaret. Ve skupině kuřáků bylo 25 jedinců, kteří přišli do Centra pro léčbu závislosti na tabáku (součástí Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice Olomouc). U kuřáků byly provedeny celkem tři odběry: první na začátku odvykací kúry (současní kuřáci), druhý po 3–8 týdnech (třítýdenní exkuřáci) a třetí po roce odvykání (roční exkuřáci). Všichni testovaní byli českého původu.

Odběry vzorku moči probíhaly od 11–15 hodin v poradně pro odvykání kouření u pana prim. MUDr. Stanislava Losse. Jedinci byli před odběrem seznámeni s použitím vzorku k vědeckým účelům a podepsali informovaný souhlas s účastí ve výzkumné studii. Vyplnili také Fagerströmův test závislosti na nikotinu a bylo jim vypočteno skóre. Moč byla odebírána do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Ke zpracování vzorku došlo nejpozději 2 hodiny po odběru.

Tab. 1: Hodnocení 43 jedinců – 25 kuřáků a 18 nekuřáků

	Pohlaví	Charakteristika osob	Průměr ±SD	Maximum	Minimum
Kuřáci	15 mužů	Věk	47 ±11,8	69	25
	10 žen	Skóre*	5 ±2,5	9	0
		První cigareta (věk)	15 ±3,4	23	7
		Pravidelného kouření (věk)	18 ±3,3	25	11
Nekuřáci	9 mužů 9 žen	Věk	48 ±6	59	38

*Fagerströmův test závislosti na nikotinu

Tab. 2: Vyhodnocení pack-year u kuřáků

	Počet cigaret/den	Doba pravidelného kouření	Pack-year*
Průměr ±SD	22 ±18,8	28,7 ±12,5	34,5 ±34,7
Maximum	100	49	170
Minimum	6	8	5

*Pack-year = (počet cigaret/20 (počet cigaret v krabičce = „pack“) · doba kouření

3.1.3 Metody

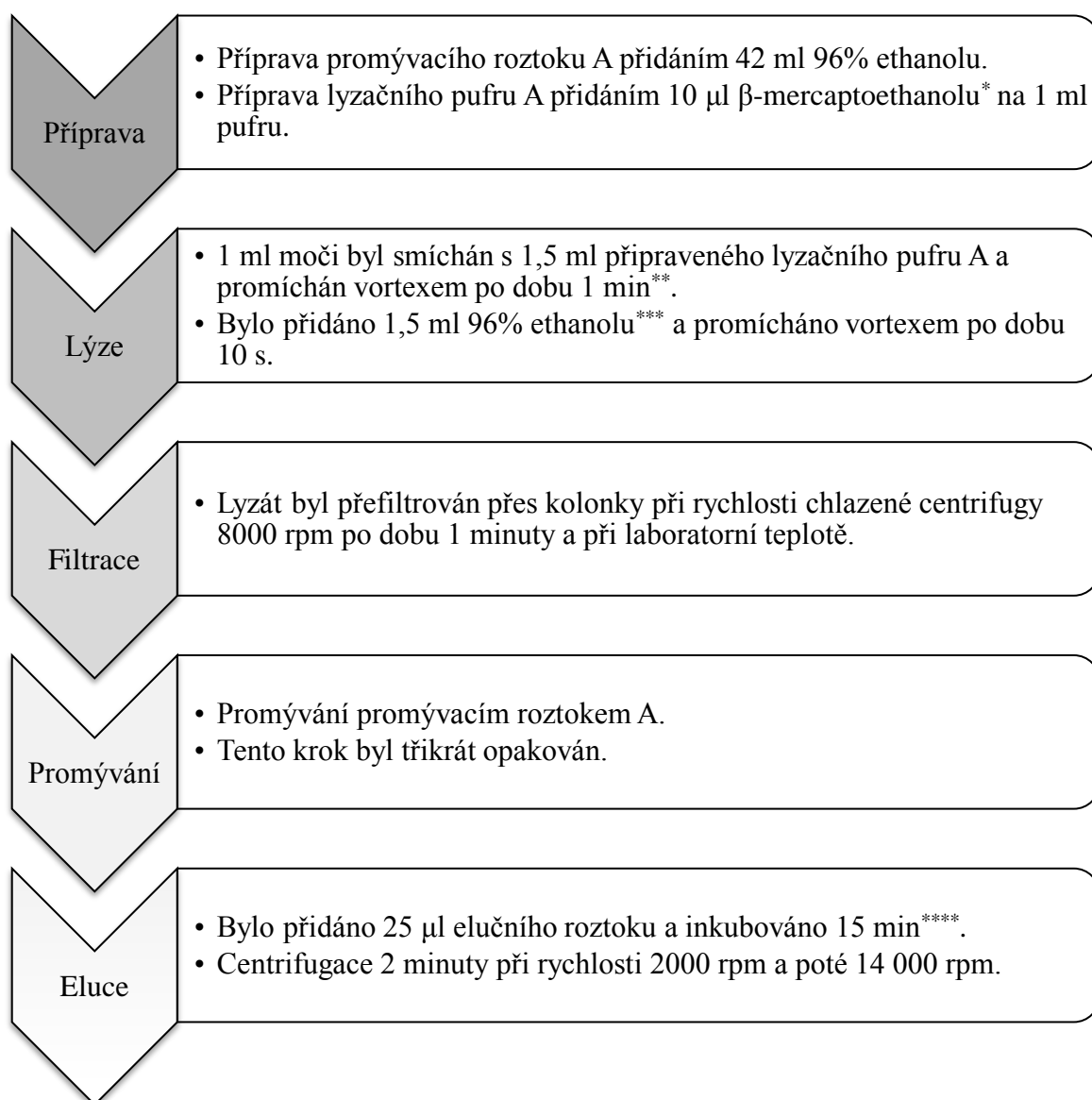
Zpracování moči

Zkumavka s odebranou močí byla vložena do centrifugy a stočena při 1700 rpm po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Ve flowboxu byla tekutina bez peletu rozdělena do 10 aliquotů o objemu 1 ml. Aliquoty byly uchovány při teplotě -80°C .

Izolace miRNA z moči

Izolace miRNA z moči probíhaly při pokojové teplotě a při práci byly používány špičky s filtrem.

K izolaci miRNA byl použit purifikační kit Urine microRNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Kanada). Během izolace byly dodržovány RNA free podmínky.



* β -mercaptoethanol silně, ale pouze dočasně inhibuje intracelulární RNAsy, které se uvolňují během lýze. Dochází k redukcí disulfidických můstků a je pozměněna přirozená konformace enzymu důležitá pro jeho aktivitu.

**V původním návodu 15 s. Zvýšeno pro zlepšení homogenizace.

***Ethanol vytvořil podmínky, za kterých byla RNA specificky vázána k membráně kolonky, a kontaminanty byly odmyty.

****Byl změněn původní eluční objem (50 μ l) a byla přidána inkubace 15 minut s ohledem na dosažení vyšší výtěžnosti miRNA z moči.

RNA byla uchována na mrazícím stojánku a byla změřena její koncentrace na Nanodropu 2000 (Thermo Scientific). Při měření byl jako blank použit eluční roztok. Objem měřené RNA byl 2 μ l. Koncentrace vzorku RNA byla průměrně 10,2 ng/ μ l (minimum 3,5 ng/ μ l, maximum 26,6 ng/ μ l). RNA byla následně uchovávána při teplotě -80 °C.

Reverzní transkripce

Cílem reverzní transkripce bylo připravit ze získané RNA cDNA. Práce na přípravu reverzní transkripce probíhaly na ledu a byly používány špičky s filtrem.

MasterMix byl vytvořen přidáváním látek z kitu TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) v pořadí a množství podle níže uvedené tabulky (Tab. 3) s 20% přesahem. Celý obsah byl nakonec promíchán.

Tab. 3: Složení MasterMixu a množství látek pro 1 vzorek

Látky	1 vzorek (μl)
DEPC voda	4,16
10X Reverse Transcription Buffer	1,50
dNTP Mix w/dTTP (100 mM)	0,15
RNAse Inhibitor (20 U/μl)	0,19
MultiScribe [™] Reverse Transcriptase (50 U/μl)	1,00

Pro každý vzorek bylo do zkumavky napipetováno 7 μl připraveného MasterMixu. Do reakce bylo přidáno 5 μl RNA izolované z moči, jejíž koncentrace byla 10 ng/μl RNA. Mix byl promíchán vortexem a centrifugován. Poté byly přidány 3 μl poolovaného RT primeru. Ten byl připraven spojením 10 μl z každého z pěti primerů (RNU6B, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-3613-5p, hsa-miR-3921 a hsa-miR-5094). Obsah byl znovu opatrně promíchán vortexem a centrifugován. Následovala inkubace na ledu po dobu 5 minut. Na termocykleru byl nastaven program s následujícími podmínkami (Tab. 4).

Tab. 4: Cyklizační schéma reverzní transkripce v termocykleru

	1. krok	2. krok	3. krok	Chlazení
Teplota (°C)	16	42	85	4
Čas (min)	30	30	5	∞

Preamplifikace

Práce probíhala na ledu a byly používány špičky s filtrem. Pro každý vzorek byly do zkumavek pipetovány látky v množství podle níže uvedené tabulky (Tab. 5). Pooled assay mix byl připraven napipetováním 5 μl 5 poolovaných TaqMan[®] MicroRNA Assay (RNU6B, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-3613-5p, hsa-miR-3921 a hsa-miR-5094) a objem byl doplněn TE puforem na 500 μl.

Tab. 5: Složení preamplifikačního mixu a množství látek pro 1 vzorek

Látky	1 vzorek (μl)
TaqMan [®] PreAmp Master Mix (2X)	12,50
Pooled assay mix	6,25
cDNA	6,25

Obsah byl promíchán pomocí vortexu a centrifugován. Vzorky byly vloženy do termocykleru a preamplifikace probíhala podle cyklizačního schématu znázorněného níže v tabulce (Tab. 6).

Tab. 6: Cyklizační schéma preamplifikace v termocykleru

	Počáteční denaturace	14 cyklů		Chlazení
		Denaturace	Annealing, elongace	
Teplota (°C)	95	95	60	4
Čas	10 min	15 sec	4 min	∞

Real-time PCR

Veškerá práce probíhala na ledu a byly používány špičky s filtrem. TaqMan[®] MicroRNA Assay (RNU6B, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-3613-5p, hsa-miR-3921, hsa-miR-5094) byly vytaženy a ponechány pomalu rozmraznout v chladícím stojánku. Do každé zkumavky bylo napipetováno množství látek podle níže uvedené tabulky (Tab. 7).

Tab. 7: Množství látek přidávaných do reakce pro 1 sondu a pro triplikát 1 sondy

Látky	1 sonda (μl)	Triplikát (μl), přesah 12,5 %
Nuclease-free voda	2,0	6,75
TaqMan 2X Universal PCR MasterMix	5,0	16,90
TaqMan [®] MicroRNA Assay	0,5	1,69
Vzorek (ředění 1:10)	2,5	8,44

Obsah byl promíchán vortexem a centrifugován. Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno v triplikátu 10 μl připraveného roztoku. Destička byla utěsněna fólií, zcentrifugována a vložena do přístroje LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Švýcarsko). Real-time PCR probíhala podle cyklizačního schématu uvedeného níže v tabulce (Tab. 8).

Tab. 8: Cyklizační schéma real-time PCR v LightCycleru[®] 480 Real-Time PCR System

	Počáteční denaturace	40 cyklů	
		Denaturace	Anneal/extend
Teplota (°C)	95	95	60
Čas	10 min	15 sec	60 sec

Analýza a vyhodnocení dat

Z výsledků triplikátů vzorků byly vybrány dva hodnotově nejbližší duplikáty, které byly následně zprůměrovány.

Získaná data byla hodnocena podle níže uvedeného vzorce a byla vypočítána relativní exprese genu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) určité miRNA u konkrétního jedince. Jako vnitřní kontrola byl použit housekeeping gen RNU6B a neošetřenou kontrolou byl vzorek od jedince, který byl nekuřák (není zahrnut ve vyhodnocených datech).

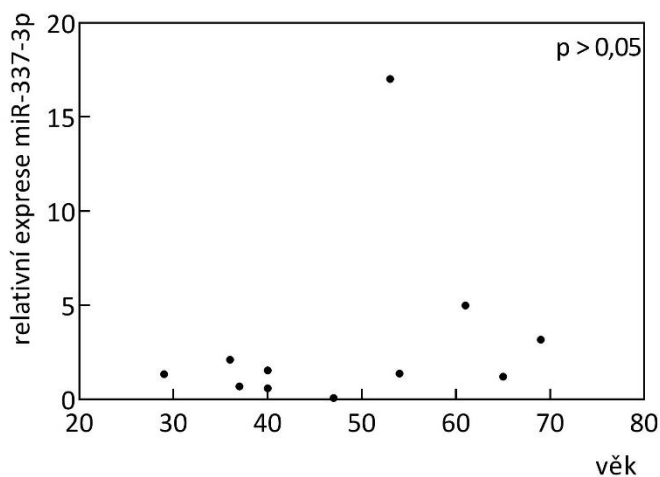
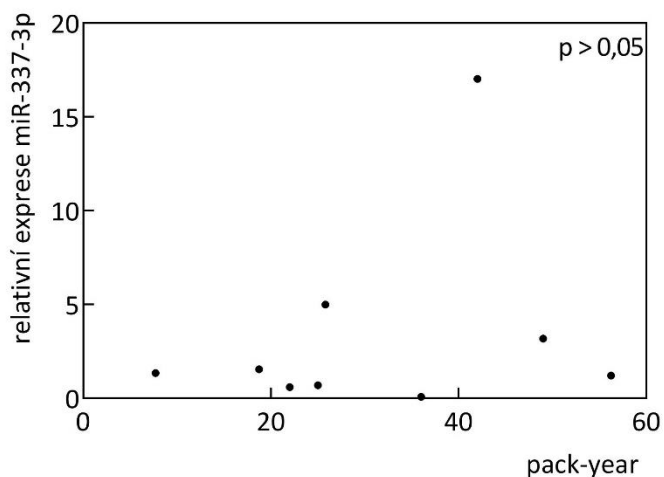
$$2^{-\Delta\Delta C_t} = [(C_t \text{ testovaného genu} - C_t \text{ vnitřní kontroly}) \text{ošetřený vzorek}] \\ - [(C_t \text{ testovaného genu} - C_t \text{ vnitřní kontroly}) \text{neošetřená kontrola}]$$

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 7. Mezi sebou byly srovnány skupiny současných kuřáků a nekuřáků. Další srovnání bylo mezi skupinou nekuřáků a ročních exkuřáků. V obou případech byl pro vyhodnocení dat použit Mann-Whitney test (nepárový, neparametrický). Při vzájemném porovnání současných kuřáků, třítydenních exkuřáků a ročních exkuřáků byl užit Wilcoxon test (párový, neparametrický). V programu GraphPad Prism 7 byla provedena také korelační analýza s daty relativní exprese testovaných miRNA a charakteristikami současných kuřáků.

3.1.4 Přístroje a zařízení

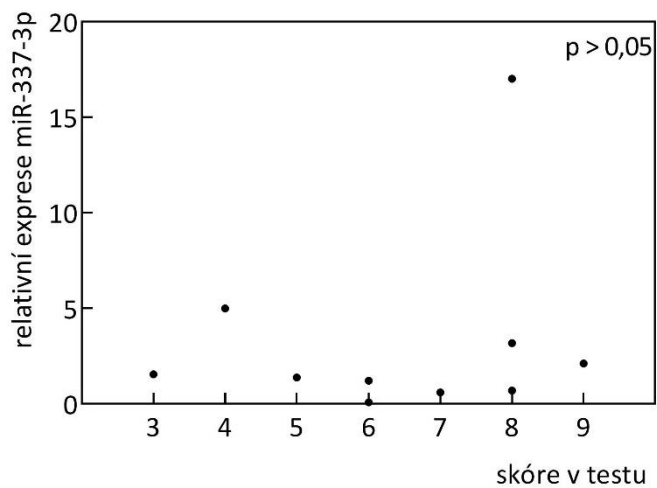
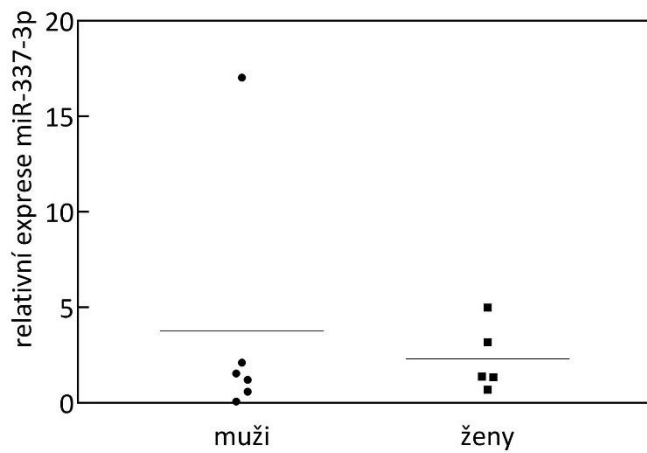
centrifuga Jouan MR 1812 (Jouan, Francie), centrifuga Z233MK-2 (Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Německo), Eppendorf 6325 Vapo.Protect MasterCycler Pro-S w/ 6320 Control Panel (Eppendorf, Německo), flowbox Topsafe 1.2 (EuroClone S.p.A., Itálie), LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Švýcarsko), mini centrifuga SpectrafugeTM (Labnet International, Inc.; USA), Thermo ScientificTM Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), vortex Mixer (Labnet International, Inc.; USA)

Data relativní exprese miR-337-3p byla u jednotlivých skupin porovnána (Graf 1). Relativní exprese miR-337-3p mezi nekuřáky a současnými kuřáky se nelišila ($p > 0,05$). Třítýdenní odvykací kúra nezměnila relativní expresi miR-337-3p ($p > 0,05$). Žádná změna v relativní expresi miR-337-3p nebyla zjištěna ani po ročním odvykání ($p > 0,05$). Relativní exprese miR-337-3p se u nekuřáků a ročních exkuřáků nelišila ($p > 0,05$).



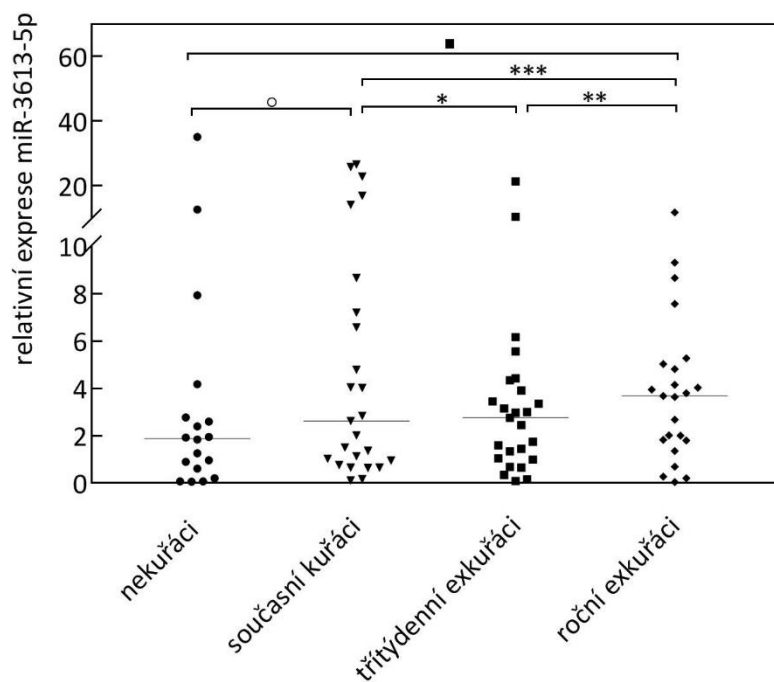
Graf 2a, b: Vliv hodnoty pack-year a věku na relativní expresi miR-337-3p u současných kuřáků před odvykací kúrou ($p > 0,05$; $p > 0,05$)

Relativní exprese miR-337-3p byla změřena jen u 11 současných kuřáků, z toho u dvou nebyl zjištěn pack-year. U současných kuřáků hodnota pack year nekorelovala s relativní expresí miR-337-3p ($p > 0,05$; Graf 2a). Relativní exprese miR-337-3p současných kuřáků nekorelovala s jejich věkem ($p > 0,05$; Graf 2b).



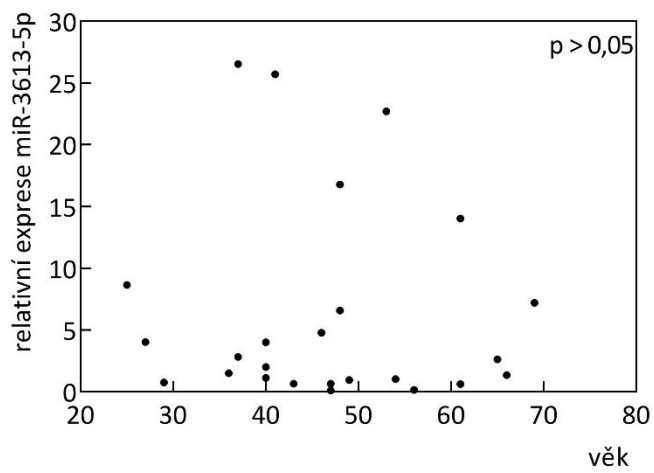
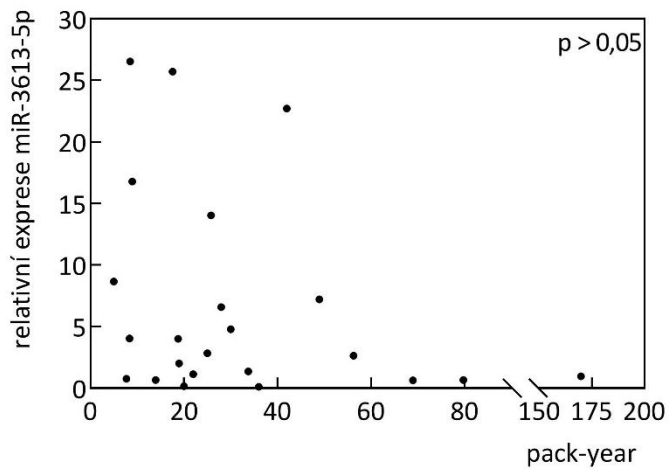
Graf 3a, b: Vliv pohlaví a skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu ($p > 0,05$) na relativní expresi miR-337-3p u současných kuřáků před odvykací kúrou

Relativní expresi miR-337-3p současných kuřáků se nelišila podle pohlaví (Graf 3a). Skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu nekorelovalo s relativní expresí miR-337-3p ve skupině současných kuřáků ($p > 0,05$; Graf 3b).



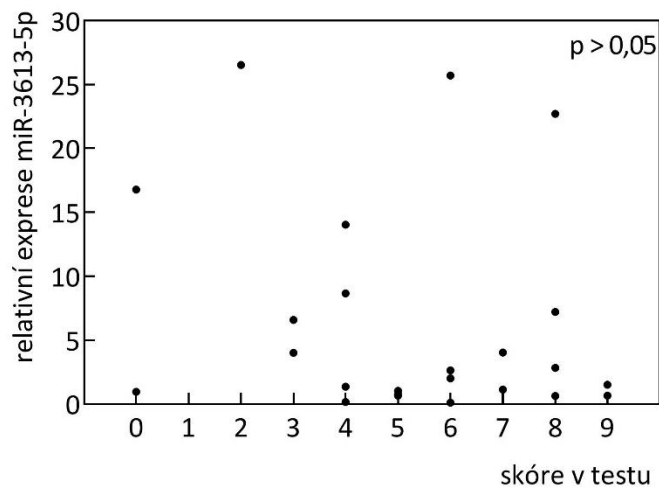
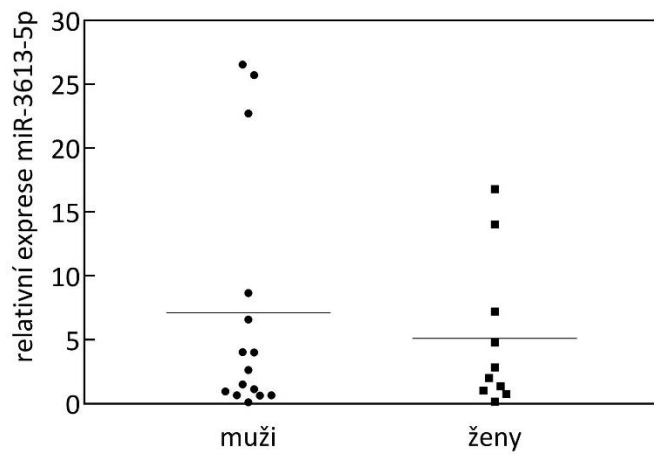
Graf 4: Statistické srovnání výsledků relativní exprese miR-3613-5p u skupin nekuřáků (kontrolní), současných kuřáků, třítýdenních exkuřáků a ročních exkuřáků (○ $p > 0,05$; ■ $p > 0,05$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,05$; *** $p > 0,05$)

Data relativní exprese miR-3613-5p byla u jednotlivých skupin porovnána (Graf 4). Relativní exprese miR-3613-5p mezi nekuřáky a současnými kuřáky se nelišila ($p > 0,05$). Třítýdenní odvykací kúra nezměnila relativní expresi miR-3613-5p ($p > 0,05$). Žádná změna v relativní expresi miR-3613-5p nebyla zjištěna ani po ročním odvykání ($p > 0,05$). Relativní exprese miR-3613-5p se u nekuřáků a ročních exkuřáků nelišila ($p > 0,05$).



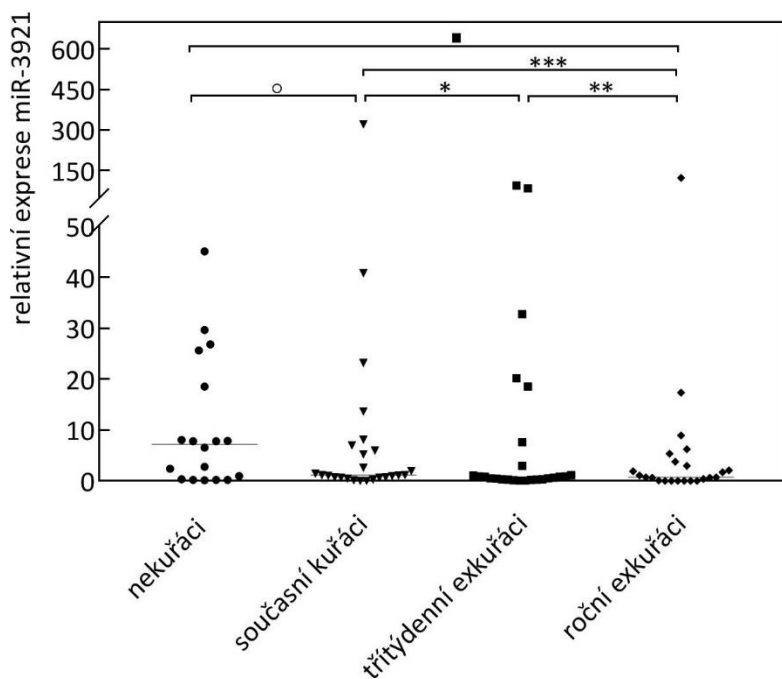
Graf 5a, b: Vliv hodnoty pack-year a věku na relativní expresi miR-3613-5p u současných kuřáků před odvykací kúrou ($p > 0,05$; $p > 0,05$)

U současných kuřáků hodnota pack year nekorelovala s relativní expresí miR-3613-5p ($p > 0,05$; Graf 5a). Relativní exprese miR-3613-5p současných kuřáků nekorelovala s jejich věkem ($p > 0,05$; Graf 5b).



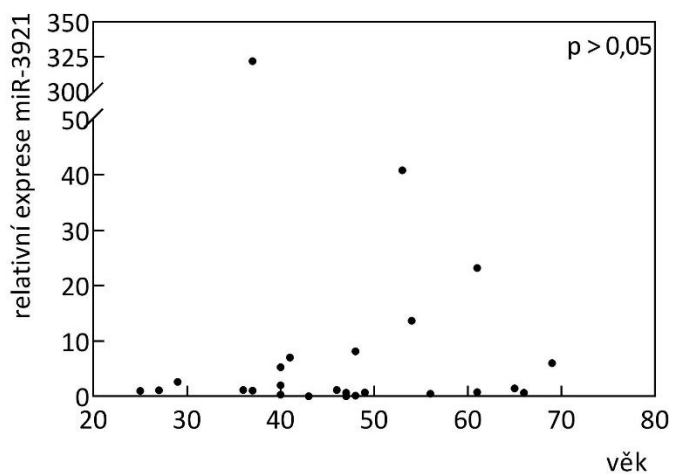
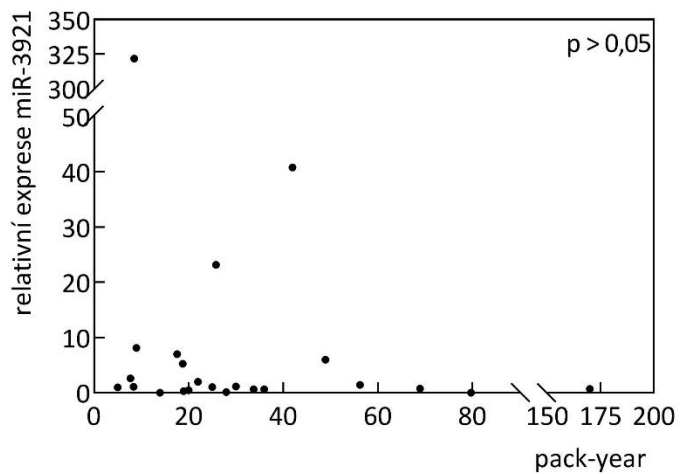
Graf 6a, b: Vliv pohlaví a skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu ($p > 0,05$) na relativní expresi miR-3613-5p u současných kuřáků před odvykací kúrou

Relativní exprese miR-3613-5p současných kuřáků se nelišila podle pohlaví (Graf 6a). Skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu nekorelovalo s relativní expresí miR-3613-5p ve skupině současných kuřáků ($p > 0,05$; Graf 6b).



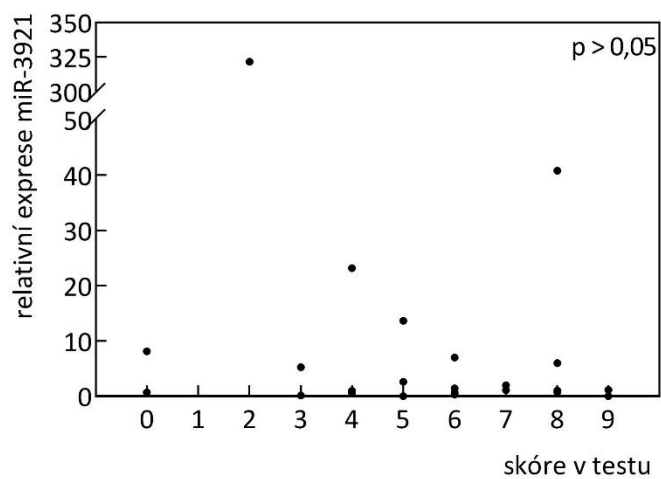
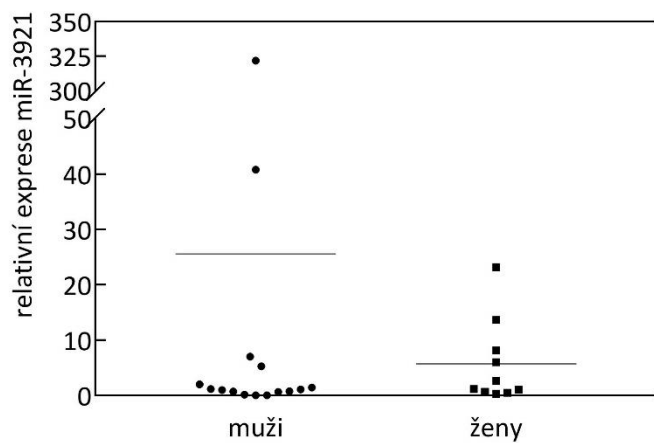
Graf 7: Statistické srovnání výsledků relativní exprese miR-3921 u skupin nekuřáků (kontrolní), současných kuřáků, třítýdenních exkuřáků a ročních exkuřáků (○ $p > 0,05$; ■ $p = 0,03$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,05$; *** $p > 0,05$)

Data relativní exprese miR-3921 byla u jednotlivých skupin porovnána (Graf 7). Relativní exprese miR-3921 mezi nekuřáky a současnými kuřáky se nelišila ($p > 0,05$). Třítýdenní odvykací kúra nezměnila relativní expresi miR-3921 ($p > 0,05$). Žádná změna v relativní exprese miR-3921 nebyla zjištěna ani po ročním odvykání ($p > 0,05$). Ve srovnání s nekuřáky byla relativní exprese miR-3921 u kuřáků po jednoroční odvykací kúře snížena ($p = 0,03$).



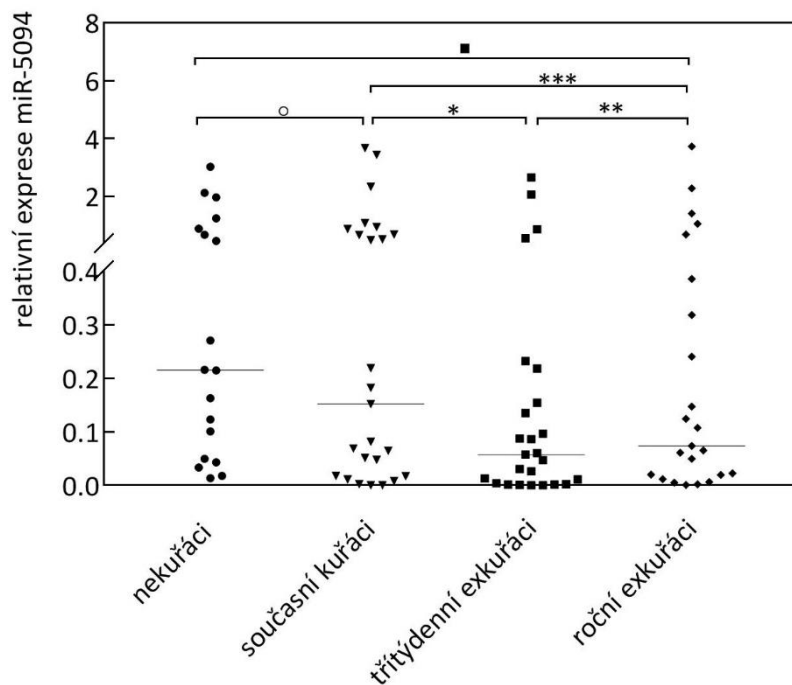
Graf 8a, b: Vliv hodnoty pack-year a věku na relativní expresi miR-3921 u současných kuřáků před odvykací kúrou ($p > 0,05$; $p > 0,05$)

U současných kuřáků hodnota pack year nekorelovala s relativní expresí miR-3921 ($p > 0,05$; Graf 8a). Relativní exprese miR-3921 současných kuřáků nekorelovala s jejich věkem ($p > 0,05$; Graf 8b).



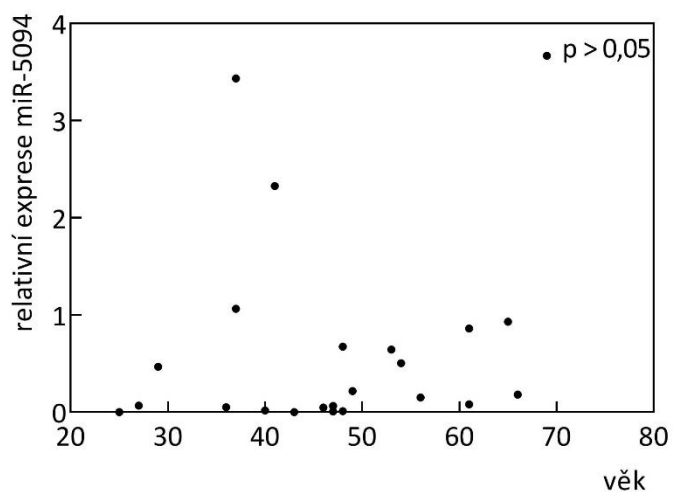
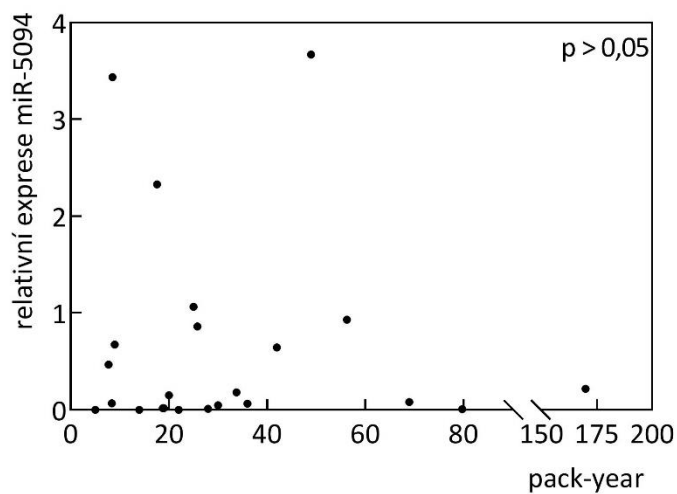
Graf 9a, b: Vliv pohlaví a skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu ($p > 0,05$) na relativní expresi miR-3921 u současných kuřáků před odvykací kúrou

Relativní exprese miR-3921 současných kuřáků se nelišila podle pohlaví (Graf 9a). Skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu nekorelovalo s relativní expresí miR-3921 ve skupině současných kuřáků ($p > 0,05$; Graf 9b).



Graf 10: Statistické srovnání výsledků relativní exprese miR-5094 u skupin nekuřáků (kontrolní), současných kuřáků, třítýdenních exkuřáků a ročních exkuřáků (○ $p > 0,05$; ■ $p > 0,05$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,05$; *** $p > 0,05$)

Data relativní exprese miR-5094 byla u jednotlivých skupin porovnána (Graf 10). Relativní exprese miR-5094 mezi nekuřáky a současnými kuřáky se nelišila ($p > 0,05$). Třítýdenní odvykací kúra nezměnila relativní expresi miR-5094 ($p > 0,05$). Žádná změna v relativní expresi miR-5094 nebyla zjištěna ani po ročním odvykání ($p > 0,05$). Relativní exprese miR-5094 se u nekuřáků a ročních exkuřáků nelišila ($p > 0,05$).



Graf 11a, b: Vliv hodnoty pack-year a věku na relativní expresi miR-5094 u současných kuřáků před odvykací kúrou ($p > 0,05$; $p > 0,05$)

U současných kuřáků hodnota pack year nekorelovala s relativní expresí miR-5094 ($p > 0,05$; Graf 11a). Relativní exprese miR-5094 současných kuřáků nekorelovala s jejich věkem ($p > 0,05$; Graf 11b).

3.3 Diskuze

Byl proveden skrínink na 9 jedincích, který ukázal, že hladiny pěti miRNA byly ovlivněny kouřením testovaných osob. A předpokládalo se jejich využití jako biomarkerů.

Na základě těchto zjištění bylo provedeno podrobnější testování u čtyř miRNA – miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921, miR-5094, které mělo potvrdit, případně zamítnout možnost dalšího zkoumání miRNA.

Celkem bylo otestováno 43 jedinců. 25 jedinců přišlo znovu na odběry po 3 týdnech a po roce. Zbývající jedinci představovali kontrolní skupinu. Byla snaha dosáhnout dostatečné různorodosti ve věku a také stejného poměru pohlaví. Přesto se nejedná o reprezentativní vzorky.

Kvůli výše zmíněným důvodům nejsou získané hodnoty, ale i závěry dostatečně statisticky důležité, ale pro testování hypotézy lze považovat množství a různorodost vzorků za dostačující.

3.3.1 miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094

Na začátku celého měření se vycházelo z výše uvedeného skríninku, který poukázal na ovlivnění exprese čtyř miRNA kouřením testovaných jedinců. Další zkoumání tohoto fenoménu, které bylo náplní této práce, neukázalo souvislost mezi kouřením a relativní expresí miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094. Je tedy důležité, aby po primárním skríninku a nalezení možného biomarkeru následovalo další testování na větší skupině vzorků. A pro budoucí využití biomarkerů by měla být pomocí validační studie ověřena vyslovená hypotéza jejich rozdílné exkrece v rámci srovnávaných skupin. Vhodné je zařadit srovnání se skupinou jedinců představujících kontroly, nebo případně také zařadit vzájemné srovnání v rámci podskupin (Hoorn et al., 2005). V tomto případě se projevila zavádějící vlastnost skríninku, který lze použít pouze jako primární zdroj vyhledávání iregulovaných, či jinak pozměněných složek systému. Je podstatné, aby bylo poté zařazeno další rozsáhlejší měření, které potvrdí, anebo vyvrátí předchozí zjištění (Banerjee et al., 2015).

Statisticky představuje nalezení odlišně exprimovaných genů problém, neboť kromě zjištěné změny exprese genu, chceme o této změně shromáždit s nějakou pravděpodobností důkazy. Lze si pomoci testováním vícenásobných hypotéz. To představuje realizaci testu pro každý gen nulové hypotézy současně bez asociace mezi hladinami exprese a odpověďmi, nebo kovariacemi. Srovnávání exprese tak velkého množství genů vede k problému násobného testování hypotéz a jednou ze dvou chyb je chyba typu I. A proto přestože byl

výsledek srovnání exprese miR-3921 mezi skupinami nekuřáků a ročních exkuřáků statisticky významný, jedná se o falešně pozitivní výsledek. Pokud použijeme nejvíce používané řešení – Bonferroniho proceduru, která zamítne každou hypotézu s hodnotou $p \leq \alpha/m$ (α – zvolená hladina významnosti testu, m – počet zároveň provedených testů), výsledek již nedosahuje statisticky významných hodnot (Ge et al., 2003).

U současných kuřáků byly výsledky jejich prvního odběru vztaženy na další proměnné, který mohly modifikovat celkový vliv kouření na expresi miRNA – pack-year, věk, pohlaví a skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu. Korelace dat relativní exprese miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094 se zmíněnými faktory neukázala, že jimi byla hladina miRNA ovlivněna.

Výzkum těchto miRNA demonstroval, že data jsou náhodně distribuována, a nepotvrdilo se spojení těchto miRNA s kouřením a jeho negativním dopadem na jejich expresi. Lze předpokládat, že pack-year, věk, pohlaví a skóre ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu se neřadí mezi majoritní faktory ovlivňující expresi sledovaných miRNA.

Dosud nebyly provedeny výzkumy, ve kterých by byly sledovány rozdíly v hladinách exosomální miRNA v moči mezi současnými kuřáky, třítydenními exkuřáky a ročními exkuřáky. Důvodem může být, že moč je komplikovaný vzorek, protože oproti krvi a séru se jedná o odpadní produkt těla. Jednotlivé složky moči se u jednotlivců mohou vzájemně velmi lišit a ztěžovat tak vyšetření. Na stejné téma byly provedeny studie pouze na plasmě (Banerjee et al., 2015; Takahashi et al., 2013). Ovšem i se vzorky plazmy může být problém, kterým je hemolýza, která následně může mít vliv na hladiny miRNA (Kirschner et al., 2011; McDonald et al., 2011; Pritchard et al., 2012).

Banerjee a kolegové (2015) se snažili nalézt mezi miRNA nové potenciální biomarkery a zároveň hledali miRNA s různou expresí u zdravých kuřáků, nekuřáků a exkuřáků. Vzorky byly stejně jako v této studii testovány v duplikátech. Hledala se korelace mezi hladinami miRNA a celkového ekvivalentu nikotinu v moči (TNEQ) a efektivní dávky kyanoethylvalinu (CEVal – adukt akrylonitrilu hemoglobinu). Na základě TNEQ bylo možné monitorování rutinního kouření během pár dní a CEVal odpovídalo rutinnímu kouření za několik měsíců. Celkem bylo testováno více jedinců, a to konkrétně 70. Byla stanovena také jasná kritéria pro jednotlivé skupiny, které byly monitorovány po kratší dobu 6 měsíců. Byly odebrány dva vzorky plazmy. Použití plazmy vyžadovalo použití jiné metodiky. Rozdíl se týkal rovněž i detekční technologie – SYBR[®] green-based, a přístroje – Applied Biosystems[®] 7500 Fast Real-Time PCR systém.

Získaná data byla normalizována matematickým korekčním faktorem a průměrem obvykle exprimovaných cílů miRNA u všech vzorků. Změna exprese byla počítána obdobným způsobem, který vychází ze vzorce $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Výsledky ukázaly pouze na mir-124, jejíž exprese byla kouřením zvýšena. Snížení její hladiny u exkuřáků bylo pravděpodobně spojeno s odvykáním kouření. Regresní analýza pak poukázala na vztah dávky a účinku mezi expresí mir-124 a biomarkerem CEVal. Ovšem při zahrnutí dalších souvisejících faktorů – věk, pohlaví, pack-year, nebyl vztah již signifikantní. MiRNA let-7a, jako další z možných miRNA ovlivněných kouřením, naopak prokázala korelaci až při zahrnutí dalších faktorů, a to pouze u biomarkeru TNEQ (Banerjee et al., 2015).

Vliv kouření na hladiny miRNA v plazmě byl předmětem i další studie. Cílem výzkumu bylo zjistit, jakým způsobem změny v hladinách miRNA vystihují patogenní působení různých chorob. Počet zkoumaných osob byl nižší, jednalo se o 11 kuřáků a 7 zdravých nekuřáků. Jedinci byli všichni muži a byli charakterizováni na základě věku, výšky a váhy. Kuřáci byli dále definováni také obsahem nikotinu v plazmě, věkem na začátku kouření, počtem cigaret za den, lety kouření, pack-year a oblíbenou značkou cigaret. Průměry charakteristik jedinců byly v porovnání s tímto výzkumem nižší. Použitá metodika byla rozdílná s ohledem na využití plazmy jako testovaného vzorku. K analýze pomocí kvantitativní real-time PCR byla využita Taqman Human MicroRNA Array. Měření probíhalo na 7900HT Fast Real-Time PCR systému. Kromě exprese miRNA byla sledována i koncentrace nikotinu a kotininu v plazmě. Statistické zhodnocení rozdílů v rámci skupin kuřáků a nekuřáků bylo provedeno pomocí nepárového oboustranného t-testu (Takahashi et al., 2013).

Podařilo se nalézt změny u 44 miRNA, které se lišily svými hladinami u kuřáků a nekuřáků. Zároveň nebyla shledána spojitost mezi expresí miRNA a hladinami nikotinu a kotininu v plazmě, ani spojení s předešlým kouřením u kuřáků. Diference výsledků pouze čtyř osob vyšetřovaných v době kouření a v době odvykání vedla k závěru, že kouření rozhodně ovlivňuje expresi miRNA v plazmě. Jejich srovnání s nekuřáky pak ukázalo, že hladiny miRNA se po zastavení kouření vrátily na úroveň nekuřáků. V závěru studie bylo poukázáno na nutnost zohlednění faktoru kouření při hledání miRNA jako potenciálních biomarkerů různých onemocnění (Takahashi et al., 2013).

Výzkum Takahashi a kolegů (2013) byl kritizován Banerjee a kolegy (2015) za nízký počet dobrovolníků vedoucí k možným falešně pozitivním hodnotám u některých miRNA. Zároveň u znovu testovaných 17 miRNA se neprokázala v článku deklarovaná změna exprese na základě kouření. Toto zjištění přisuzovali použití malého počtu vzorků, či špatnému statistickému vyhodnocení. Navíc poukázali na vhodnost využití metody

mircoarray pro vysoce účinný skrínink. Ovšem získaná data, zvláště ta odchýlená, podle nich poté musí být potvrzena pomocí specifitější a citlivější metody qRT-PCR (Banerjee et al., 2015). Výsledky této práce jen potvrzují závěr tohoto článku.

Vliv různých faktorů na hladiny miRNA v plazmě a séru zatím není zcela zřejmý. Je otázkou, jestli je u klinických studií prováděných u člověka nutné faktory zohledňovat. Jedná se například o životní styl, sport, spánek, doplňky stravy, pohlaví, spotřebu alkoholu a cigaret, stres, nebo životní prostředí (Takahashi et al., 2013). Je těžké nalézt ideální kandidáty do studie, a proto je nezbytné dělat kompromisy a zahrnovat do studie jen faktory, které zásadním způsobem ovlivní pozorování. Výstupem této práce může být i jakési snížení proměnných, které je nutné zohledňovat při vytváření experimentálních studií u člověka. Jednou z nich může být právě kouření.

Výzkumy (Butz et al., 2016; Delić et al., 2016; Foj et al., 2017; Güllü Amuran et al., 2020; Hirschfeld et al., 2020; Khurana et al., 2017) testovaly vzorky moči a hledaly možnosti využití miRNA jako biomarkeru při stanovení různých onemocnění. Kouření nebylo u testovaných jedinců zohledňováno.

Ve studii (Delić et al., 2016) byla zkoumána deregulace exprese exosomální miRNA v moči a její souvislost s diabetickou nefropatií. V první skupině bylo kontrolních jedinců 8 a ve druhé 6. Zdravou kontrolou byli jedinci, kteří neměli diabetes a odhadovaná glomerulární filtrace nebyla > 90 . Dalšími informacemi pak byl věk, pohlaví a poměr mg albuminu/ g kreatinin v moči.

Foj a kolegové (2017) zkoumali možnost využití miRNA v močovém peletu a exosomech při detekci a prognóze rakoviny prostaty. Celkem u 10 zdravých dobrovolníků byly sledovány tyto faktory – negativní digitální rektální vyšetření a hladina PSA (prostatický specifický antigen) byla nižší než $4 \mu\text{g/l}$ (Foj et al., 2017).

Třetí z představených studií (Hirschfeld et al., 2020) sestávala ze 40 žen jako kontrolních jedinců. Byl hledán potenciál miRNA v moči jako neinvazivních biomarkerů při detekci rakoviny prsu. U kontrolních jedinců byl proveden skrínink rakoviny prsu, nebo souvisejících příznaků. Byla provedena prohlídka a prohmatání prsu včetně regionálních lymfatických uzlin.

U všech tří studií se u zdravých kontrolních jedinců zaměřovali především na vyloučení onemocnění u zkoumané osoby, která pak byla označena za zdravou kontrolu. Nebyly zde zohledňovány další faktory ovlivňující zdravotní stav člověka, přestože kouření je rizikový faktor u řady onemocnění (Takahashi et al., 2013). Ovšem díky této práci, v níž nebyl potvrzen zásadní vliv kouření na hladiny exprese miRNA v moči, nemusí být kouření zahrnuto do studií jako faktor, který by mohl pozměnit získaná data.

Bylo zjištěno, že kouření neovlivňuje hladiny relativní exprese miRNA v moči natolik, aby jejich případná změna mohla vést k dalším vyšetřením a brzké diagnostice chorob spojených s kouřením jako rizikovým faktorem. Na druhé straně je nyní možné přiklonit se k názoru, že kouření rozšířené v rámci celosvětové populace ovlivňuje relativní expresi miRNA málo. Jsou nutné další studie na stejné téma, přesto lze již nyní hovořit o nepatrném vlivu kouření na výsledky exprese miRNA ve výzkumech. Žádná z testovaných miRNA – miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094, není vhodná pro další výzkum.

4 ZÁVĚR

Hypotéza stanovená na začátku práce nebyla potvrzena. Bylo zjištěno, že kouření neovlivňuje žádnou miRNA vybranou ve skríninku – miR-337-3p, miR-3613-5p, miR-3921 a miR-5094, natolik, aby byla zahrnuta do dalších výzkumů miRNA v moči. Expze jednotlivých miRNA u současných kuřáků byla srovnávána i s jejich hodnotami pack-year, věkem, pohlavím a skórem ve Fagerströmově testu závislosti na nikotinu. Žádné spojení mezi těmito proměnnými a hladinou expze jednotlivých miRNA nebylo objeveno.

Ukázalo se, že tyto miRNA nejsou vhodné jako biomarkery pro choroby, u nichž je kouření podstatným faktorem při vzniku. Přestože měly tyto čtyři miRNA dle skríninku největší pravděpodobnost ovlivnitelnosti své expze kouřením, lze po zobecnění jejich výsledků prohlásit, že není potřeba při testování miRNA sledovat, zdali testování jedinci kouří.

Výsledky samotného skríninku se lišily od následného testování, což potvrzuje důležitost ověřovacího výzkumu na větším množství vzorků kvůli doložení důkazu o správnosti předchozích výsledků.

Zkoumaná skupina kouřících byla složena z 15 mužů a 10 žen a kontrolní skupina z 9 mužů a 9 žen. Kontrolní skupina byla tedy menší, což mohlo ovlivnit výsledky. Pohlaví bylo v obou skupinách zastoupeno rovnoměrně. Naopak všechny věkové kategorie zastoupeny nebyly. Tyto skutečnosti společně s faktem, že bylo testováno pouze 43 jedinců, mohou vypovídat o nízkém statistickém významu. Ovšem pro potvrzení, nebo vyvrácení hypotézy byl tento stav dostačující.

MiRNA svými vlastnostmi a výskytem představují dokonalý prototyp pro neinvazivní testování. Celkově práce potvrzuje a podporuje další zkoumání miRNA a jejich využití jako biomarkeru. Naznačuje, že stanovení miRNA, například i moči, se v budoucnu možná stane nedílnou součástí vyšetření u některých onemocnění. Bohužel je výzkum nyní teprve na začátku, a je potřeba hledat odpovědi na mnohé otázky a nalézt případná řešení některých problémů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ambros, V., 2001. microRNAs. *Cell* 107, 823–826. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00616-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00616-X)
- Aupeix, K., Hugel, B., Martin, T., Bischoff, P., Lill, H., Pasquali, J.L., Freyssinet, J.M., 1997. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* 99, 1546–1554. <https://doi.org/10.1172/JCI119317>
- Banerjee, A., Waters, D., Camacho, O.M., Minet, E., 2015. Quantification of plasma microRNAs in a group of healthy smokers, ex-smokers and non-smokers and correlation to biomarkers of tobacco exposure. *Biomarkers* 20, 123–131. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2014.1000970>
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs. *Cell* 116, 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartels, C.L., Tsongalis, G.J., 2009. MicroRNAs: Novel Biomarkers for Human Cancer. *Clin. Chem.* 55, 623–631. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112805>
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., Pfaffl, M.W., 2010. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 50, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.010>
- Benes, V., Castoldi, M., 2010. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.026>
- Borgerding, M., Klus, H., 2005. Analysis of complex mixtures – Cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 43–73. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.05.010>
- Butz, H., Nofech-Mozes, R., Ding, Q., Khella, H.W.Z., Szabó, P.M., Jewett, M., Finelli, A., Lee, J., Ordon, M., Stewart, R., Krylov, S., Yousef, G.M., 2016. Exosomal MicroRNAs Are Diagnostic Biomarkers and Can Mediate Cell–Cell Communication in Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol. Focus* 2, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2015.11.006>
- Chen, C., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179–e179. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
- Chen, Y., Gelfond, J.A., McManus, L.M., Shireman, P.K., 2009. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics* 10, 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-407>
- Chugh, P., Dittmer, D.P., 2012. Potential pitfalls in microRNA profiling: Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 601–616. <https://doi.org/10.1002/wrna.1120>
- Delić, D., Eisele, C., Schmid, R., Baum, P., Wiech, F., Gerl, M., Zimdahl, H., Pullen, S.S., Urquhart, R., 2016. Urinary Exosomal miRNA Signature in Type II Diabetic Nephropathy Patients. *PLOS ONE* 11, e0150154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150154>
- Doll, R., Hill, A.B., 1954. The Mortality of Doctors in Relation to Their Smoking Habits. *BMJ* 1, 1451–1455. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4877.1451>
- Doll, R., Hill, A.B., 1950. Smoking and Carcinoma of the Lung. *BMJ* 2, 739–748. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4682.739>
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J., Sutherland, I., 2004. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 328, 1519. <https://doi.org/10.1136/bmj.38142.554479.AE>
- Doll, R., Peto, R., Wheatley, K., Gray, R., Sutherland, I., 1994. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ* 309, 901–911. <https://doi.org/10.1136/bmj.309.6959.901>

- Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., Zhang, X., 2013. MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem. Rev.* 113, 6207–6233. <https://doi.org/10.1021/cr300362f>
- Février, B., Raposo, G., 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.003>
- Fischer, M., Hedberg, K., Cardosi, P., Plikaytis, B.D., Hoesly, F.C., Steingart, K.R., Bell, T.A., Fleming, D.W., Wenger, J.D., Perkins, B.A., 1997. Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease: *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, 979–983. <https://doi.org/10.1097/00006454-199710000-00015>
- Foj, L., Ferrer, F., Serra, M., Arévalo, A., Gavagnach, M., Giménez, N., Filella, X., 2017. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis: Urinary miRNAs in Prostate Cancer. *The Prostate* 77, 573–583. <https://doi.org/10.1002/pros.23295>
- Ge, Y., Dudoit, S., Speed, T.P., 2003. Resampling-based multiple testing for microarray data analysis. *Test* 12, 1–77. <https://doi.org/10.1007/BF02595811>
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995–1001. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995>
- Güllü Amuran, G., Tinay, I., Filinte, D., Ilgin, C., Peker Eyüboğlu, I., Akkiprik, M., 2020. Urinary micro-RNA expressions and protein concentrations may differentiate bladder cancer patients from healthy controls. *Int. Urol. Nephrol.* 52, 461–468. <https://doi.org/10.1007/s11255-019-02328-6>
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., Sczakiel, G., 2010. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 28, 655–661. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.01.027>
- Harding, C., Heuser, J., Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Hecht, S.S., 1999. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1194–1210. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>
- Higgins, M.W., Keller, J.B., Landis, J.R., Beaty, T.H., Burrows, B., Demets, D., Diem, J.E., Higgins, I.T., Lakatos, E., Lebowitz, M.D., 1984. Risk of chronic obstructive pulmonary disease. Collaborative assessment of the validity of the Tecumseh index of risk. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 380–385. <https://doi.org/10.1164/arrd.1984.130.3.380>
- Hirschfeld, M., Rücker, G., Weiß, D., Berner, K., Ritter, A., Jäger, M., Erbes, T., 2020. Urinary Exosomal MicroRNAs as Potential Non-invasive Biomarkers in Breast Cancer Detection. *Mol. Diagn. Ther.* 24, 215–232. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00453-y>
- Hogg, J.C., Wright, J.L., Wiggs, B.R., Coxson, H.O., Opazo Saez, A., Pare, P.D., 1994. Lung structure and function in cigarette smokers. *Thorax* 49, 473–478. <https://doi.org/10.1136/thx.49.5.473>
- Hoorn, E.J., Pisitkun, T., Zietse, R., Gross, P., Frokiaer, J., Wang, N.S., Gonzales, P.A., Star, R.A., Knepper, M.A., 2005. Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers (Review Article). *Nephrology* 10, 283–290. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2005.00387.x>
- Huang, M.-F., Lin, W.-L., Ma, Y.-C., 2005. A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. *Indoor Air* 15, 135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2005.00330.x>

- Hunt, E.A., Broyles, D., Head, T., Deo, S.K., 2015. MicroRNA Detection: Current Technology and Research Strategies. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 8, 217–237. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040343>
- Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., Nana-Sinkam, S.P., Jarjoura, D., Marsh, C.B., 2008. Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE* 3, e3694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>
- Ibberson, D., Benes, V., Muckenthaler, M.U., Castoldi, M., 2009. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnol.* 9, 102. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-102>
- Ji, X., Takahashi, R., Hiura, Y., Hirokawa, G., Fukushima, Y., Iwai, N., 2009. Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. *Clin. Chem.* 55, 1944–1949. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.125310>
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.
- Jung, U., Jiang, X., Kaufmann, S.H.E., Patzel, V., 2013. A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA. *RNA* 19, 1864–1873. <https://doi.org/10.1261/rna.040501.113>
- Khurana, R., Ranches, G., Schaffner, S., Lukasser, M., Rudnicki, M., Mayer, G., Hüttenhofer, A., 2017. Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease. *RNA* 23, 142–152. <https://doi.org/10.1261/rna.058834.116>
- Kirschner, M.B., Kao, S.C., Edelman, J.J., Armstrong, N.J., Vallely, M.P., van Zandwijk, N., Reid, G., 2011. Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma. *PLoS ONE* 6, e24145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024145>
- Kuschner, W.G., D'Alessandro, A., Wong, H., Blanc, P.D., 1996. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur. Respir. J.* 9, 1989–1994. <https://doi.org/10.1183/09031936.96.09101989>
- Lagos-Quintana, M., 2001. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lau, N.C., 2001. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1065062>
- Laviolette, S.R., van der Kooy, D., 2004. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 55–65. <https://doi.org/10.1038/nrn1298>
- Lee, R.C., 2001. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mall, C., Rocke, D.M., Durbin-Johnson, B., Weiss, R.H., 2013. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark. Med.* 7, 623–631. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.44>
- McDonald, J.S., Milosevic, D., Reddi, H.V., Grebe, S.K., Algeciras-Schimnich, A., 2011. Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clin. Chem.* 57, 833–840. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.157198>

- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Mlcochova, H., Hezova, R., Stanik, M., Slaby, O., 2014. Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 32, 41.e1-41.e9. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.04.011>
- Moldovan, L., Batte, K.E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C.B., Piper, M., 2014. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 371–390. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12236>
- Murphy, L.D., Herzog, C.E., Rudick, J.B., Fojo, A.T., Bates, S.E., 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of MDR-1 gene expression. *Biochemistry* 29, 10351–10356. <https://doi.org/10.1021/bi00497a009>
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1, 1559–1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A., Chin, J.E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Gazdar, A.F., Willman, C.L., Griffith, B., Von Hoff, D.D., Roninson, I.B., 1990. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 7160–7164. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7160>
- Nuorti, J.P., Butler, J.C., Farley, M.M., Harrison, L.H., McGeer, A., Kolczak, M.S., Breiman, R.F., 2000. Cigarette Smoking and Invasive Pneumococcal Disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 681–689. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003093421002>
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
- Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E., Wong, D.T., 2009. Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clin. Cancer Res.* 15, 5473–5477. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0736>
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>
- Peto, R., 2000. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* 321, 323–329. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7257.323>
- Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., Hainaut, P., 2002. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21, 7435–7451. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205803>
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>
- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., Tewari, M., 2012. Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 5, 492–497. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370>

- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Saiki, R.K., 1989. The Design and Optimization of the PCR, in: Erlich, H.A. (Ed.), *PCR Technology*. Palgrave Macmillan UK, London, pp. 7–16. https://doi.org/10.1007/978-1-349-20235-5_1
- Scanlon, P.D., Connett, J.E., Waller, L.A., Altose, M.D., Bailey, W.C., Sonia Buist, A., e Lung Health Study Research Group, D.P.T. for th, 2000. Smoking Cessation and Lung Function in Mild-to-Moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The Lung Health Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 381–390. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.9901044>
- Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T.S., Chen, C., 2008. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 44, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2007.09.006>
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B., Pantel, K., 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* 11, 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrc3066>
- Shields, P.G., 1999. Molecular epidemiology of lung cancer. *Ann. Oncol.* 10, S7–S11. https://doi.org/10.1093/annonc/10.suppl_5.S7
- Simpson, R.J., Lim, J.W., Moritz, R.L., Mathivanan, S., 2009. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev. Proteomics* 6, 267–283. <https://doi.org/10.1586/epr.09.17>
- Sotelo, J.R., Porter, K.R., 1959. An Electron Microscope Study of the Rat Ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 327–342. <https://doi.org/10.1083/jcb.5.2.327>
- Takahashi, K., Yokota, S., Tatsumi, N., Fukami, T., Yokoi, T., Nakajima, M., 2013. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.018>
- Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., Van Benthem, J., Wester, P., Opperhuizen, A., 2011. Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 613–628. <https://doi.org/10.3390/ijerph8020613>
- Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 110, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.033>
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., Amigorena, S., 2001. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J. Immunol.* 166, 7309–7318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>
- Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S., 1999. Molecular Characterization of Dendritic Cell-Derived Exosomes. *J. Cell Biol.* 147, 599–610. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.599>
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Thielen, A., Klus, H., Müller, L., 2008. Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 141–156. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.01.014>
- Ulrik, C.S., Lange, P., 2001. Cigarette smoking and asthma. *Monaldi Arch. Chest Dis. Arch. Monaldi Mal. Torace* 56, 349–353.

- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., 2009. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 6, 445–462. <https://doi.org/10.3390/ijerph6020445>
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., Raposo, G., 2006. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *J. Biochem. (Tokyo)* 140, 13–21. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj128>
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D.J., Wang, K., 2010. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin. Chem.* 56, 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Winkel, P., Statland, B.E., 1981. The Acute Effect of Cigarette Smoking on the Concentrations of Blood Leukocyte Types in Healthy Young Women. *Am. J. Clin. Pathol.* 75, 781–785. <https://doi.org/10.1093/ajcp/75.6.781>
- Wynder, E.L., 1950. TOBACCO SMOKING AS A POSSIBLE ETIOLOGIC FACTOR IN BRONCHIOGENIC CARCINOMA: A Study of Six Hundred and Eighty-Four Proved Cases. *J. Am. Med. Assoc.* 143, 329. <https://doi.org/10.1001/jama.1950.02910390001001>
- Yun, S.J., Jeong, P., Kim, W.-T., Kim, T.H., Lee, Y.-S., Song, P.H., Choi, Y.-H., Kim, I.Y., Moon, S.-K., Kim, W.-J., 2012. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *Int. J. Oncol.* 41, 1871–1878. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1622>