

Received: 2016.04.27
Accepted: 2017.05.23
Published: 2017.08.09

Krążące miRNA jako nieinwazyjne biomarkery diagnostyczne, prognostyczne oraz predykcyjne w terapii niedrobnokomórkowego raka płuca

Circulating miRNAs as non-invasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis, prognosis and prediction of treatment response

Weronika Zofia Świtlik, Janusz Szemraj

Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Odkrycie nowej klasy cząsteczek, jakimi są krótkie, 22-24-nukleotydomy RNA, zapoczątkowało nowy rozdział badań nad regulacją ekspresji informacji genetycznej. Szczególnie dużą uwagę skupiono na zewnątrzkomórkowe, krążące miRNA, których poziom ekspresji w różnych płynach fizjologicznych jest zróżnicowany i może ulegać zmianie zarówno pod wpływem czynników patologicznych jak i fizjologicznych. Intensywne badania są prowadzone pod kątem ich potencjału diagnostycznego. Podejmowane są próby określenia konkretnych profili miRNA skorelowanych z chorobą. Obiecujące wyniki pozwalają wierzyć, że w niedalekiej przyszłości miRNA będą mogły być stosowane jako diagnostyczne i prognostyczne biomarkery w różnych chorobach. Zastosowanie krążących miRNA może się okazać szczególnie przydatne w diagnozowaniu raka płuca – choroby nowotworowej, której bardzo wysoka śmiertelność wynika głównie ze zbyt późnej diagnozy. Obfite w cząsteczki miRNA krew i płwocina są doskonałym materiałem diagnostycznym u chorych na ten typ nowotworu, a zwłaszcza u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca – NSCLC. Dzięki prostym procedurom pozyskiwania materiału i relatywnie łatwej analizie poziomu ekspresji miRNA, cząsteczki te będą mogły zostać wykorzystane jako biomarkery diagnostyczne, prognostyczne oraz predykcyjne w terapii NSCLC. W artykule przedstawiono informacje dotyczące miRNA oraz ich swoistych właściwości. Ponadto omówiono krążące miRNA, których poziom ekspresji uległ zmianie w płynach fizjologicznych chorych na NSCLC.

Słowa kluczowe:

krążące miRNA • biomarkery • diagnostyka • prognostyka • niedrobnokomórkowy rak płuca

Summary

The discovery of a new class of molecules, the 22-24 nucleotides long RNA, has initiated a new chapter in genetic information regulation studies. These molecules have a significant impact on the functioning of cells by means of negative regulation of expression of targeted mRNA. Special attention is given to exogenous, circulating miRNAs, whose levels of expression in different body fluids varies and can be deregulated by pathological, as well as physiological conditions. Extensive studies on the diagnostic potential of miRNAs are currently conducted. Attempts are made to determine specific profiles of miRNAs that will correlate with disease entity. The preliminary data gives hope that in the near future miRNAs will be applied as a diagnostic and prognostic biomarkers in many diseases. One of their most significant applications can be in

the diagnosis of lung cancer – the most deadly form of cancer, due to its too late diagnosis. Abundant in miRNA molecules, blood and sputum constitute excellent diagnostic material for patients with lung cancer, especially those with non-small-cell lung cancer NSCLC. Easy procedures for obtaining this diagnostic material from patients and relatively easy analysis of miRNA expression, make these molecules promising in their use in diagnosis, predicting of therapy effects and prognosis for patients with NSCLC. This work presents information related to miRNA and their specific attributes. Moreover level of deregulated circulating miRNAs occurring in body fluids of patients with NSCLC is also discussed.

Key words: circulating miRNA • biomarkers • diagnostics • prognosis • non-small-cell lung cancer

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1244813>

DOI: 10.5604/01.3001.0010.3845

Word count: 3580

Tables: 4

Figures: –

References: 75

Adres autorki: mgr Weronika Zofia Świtlik, Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, e-mail: wswitlik@gmail.com

Wykaz skrótów: **ABs** – ciała apoptotyczne (apoptotic bodies); **AC** – rak gruczolowy (adenocarcinoma); **AGO2** – białko argonautowe 2 (argonaute 2); **ALK** – kinaza chłoniaka anaplastycznego (anaplastic lymphoma kinase); **DLBCL** – chłoniak rozlany z dużych komórek B (diffuse large B-cell lymphoma); **EGFR** – receptor czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor receptor); **HDL** – lipoproteina wysokiej gęstości (high density lipoprotein); **LCC** – rak wielkokomórkowy płuca (large cell carcinoma); **LOH** – utrata heterozygotyczności (loss of heterozygosity); **MPs** – mikrocząsteczki (microparticles); **MVs** – mikropęcherzyki (microvesicles); **NPM1** – białko wiążące RNA (nucleophosmin 1); **NSCLC** – niedrobnokomórkowy rak płuca (non-small cell lung cancer); **ORF** – otwarta ramka odczytu (open reading frame); **PKD1** – enzym należący do klas transferaz (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1); **PET** – pozytonowa tomografia emisyjna (positron emission tomograph); **RBP**s – białka wiążące RNA (RNA-binding proteins); **RISC** – kompleks wyciszający ekspresję genu (RNA-induced silencing complex); **RTG** – zdjęcie rentgenowskie; **SCC** – rak płaskonabłonkowy (squamous cell carcinoma); **SCLC** – rak drobnokomórkowy płuca (small cell lung cancer); **SNP** – polimorfizm pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphism); **TK** – tomografia komputerowa (computed tomography); **UTR** – obszar mRNA nieulegający translacji (untranslated region).

WSTĘP

Rak płuca jest najczęściej diagnozowanym nowotworem u mężczyzn i stanowi aż 21% diagnozowanych przypadków, natomiast u kobiet zajmuje drugie miejsce (9%) po nowotworach piersi (22%). W Polsce, w 2010 r. średnia zapadalność na ten typ nowotworu, jak i liczba zgonów były wyższe od średniej w pozostałych krajach UE. Współczynnik umieralności, w porównaniu z innymi chorobami nowotworowymi jest najwyższy: u mężczyzn wynosi około 31%, natomiast u kobiet 15% [więcej niż w przypadku raka piersi (13%)] [11]. Głównym czynnikiem tego stanu jest zbyt późna diagnoza. Wpływ na to mają m.in.: brak wczesnych objawów, duża heterogenność w obrębie histologicznych podtypów oraz wciąż ograniczona wiedza z zakresu biologii nowotworów [29].

Złośliwe nowotwory płuca charakteryzują się dużą heterogennością, dlatego nie powinno się ich traktować jed-

nakowo. Najczęściej występującym nowotworem płuca jest nowotwór sklasyfikowany jako niedrobnokomórkowy rak płuca – NSCLC (non-small cell lung cancer), który stanowi aż 80% wszystkich przypadków. W tej grupie znajdują się typy histologiczne raków: płaskonabłonkowy SCC (squamous cell carcinoma; 40-50%), gruczolowy AC (adenocarcinoma; 30%) oraz wielkokomórkowy LCC (large cell carcinoma; 5-10%). Drugą grupę tworzy drobnokomórkowy rak płuca SCLC (small cell lung carcinoma), którego udział wynosi około 15% [40].

W celu potwierdzenia lub wykluczenia nowotworu są wykonywane badania przedmiotowe (fizykalne), zdjęcia radiologiczne (RTG) oraz tomografia komputerowa (TK) klatki piersiowej i jamy brzusznej. W razie diagnozy potwierdzającej, następnym krokiem w diagnostyce jest ustalenie stopnia zaawansowania nowotworu. W tym celu przeprowadza się badania mikroskopowe i histopatologiczną obserwację bioptatów. Metody pozyskiwania

biopłatów cechują się relatywnie niewielką inwazyjnością, jednak ze względu na trudno dostępne umiejscowienie zabiegi wymagają starannego zaplanowania. W wybranych przypadkach przeprowadza się m.in. pozytonową tomografię emisyjną (PET) lub rezonans magnetyczny. Nie ma jeszcze programu badań przesiewowych do wczesnego wykrywania raka płuca, a standardowe zdjęcia rentgenowskie klatki piersiowej oraz cytologiczne badania płwociny nie wpływają istotnie na spadek umieralności [40]. Duże nadzieje wiąże się z niskodawkową tomografią komputerową klatki piersiowej, jednak zwiększona skuteczność tej metody w porównaniu do RTG klatki piersiowej nie jest wciąż potwierdzona. Metoda generuje dużą liczbę wyników fałszywie dodatnich przyczyniających się do niepotrzebnego leczenia chorych (wykrywa niezłośliwe guzki płuca), a ponadto jest kosztowna i może negatywnie wpływać na zdrowie. Wszystkie wymienione aspekty sprawiają, że nie stosuje się jej rutynowo [2,35].

Prawie 2/3 NSCLC można sklasyfikować podczas badania patomorfologicznego tradycyjnymi metodami z użyciem mikroskopu świetlnego. Pozostałe 30% NSCLC wymaga jednak pomocniczych technik, przede wszystkim immunohistochemicznych. Szczegółowa klasyfikacja słabo zróżnicowanych nowotworów jest ogromnym wyzwaniem, które często utrudnia ograniczona ilość materiału diagnostycznego. Przy pojawiających się coraz nowszych strategiach terapii, aby były skuteczne, niezbędne jest odpowiednie dopasowanie ich do profilu molekularnego danego nowotworu. Wszystkie te czynniki powodują, że poszukuje się nowych, skuteczniejszych biomarkerów, które byłyby dokładniejsze i tym samym przyczyniły się do bardziej skutecznego leczenia [48].

Idealny biomarker powinien być łatwo dostępny za pomocą nieinwazyjnych procedur, niedrogi w pomiarze oraz bardzo swoisty i czuły w diagnozowaniu choroby. Najważniejsze, aby rzetelnie wskazywał chorobę, najlepiej jeszcze przed pojawieniem się jej klinicznych symptomów. Ponadto, nie może być podatny na techniczne zmienne oraz inne patologiczne stany niezwiązane z badaną chorobą, a występujące u chorych [34].

Bardzo istotnym, choć niełatwym zadaniem jest zidentyfikowanie biomarkerów umożliwiających przewidywanie skutków leczenia i odpowiedzi na terapię, które pozwolą na dobór odpowiedniej – „skrojonej na miarę” terapii. Markery molekularne stwarzają nowe możliwości w diagnostyce i wydają się łatwiejsze w interpretacji, a dzięki krążącym miRNA, jako nieinwazyjnym biomarkerom, istnieje szansa stworzenia programu badań przesiewowych oraz programu identyfikacji osób z wyższym ryzykiem NSCLC. Tym samym, osoby te mogłyby być objęte odpowiednią opieką medyczną już we wczesnym etapie.

miRNA

W 1993 r. Victor Ambros oraz Gary Ruvkun pracując nad *Caenorhabditis elegans* dokonali odkrycia, które zrewolu-

cjonizowało i zapoczątkowało nową erę. Zaobserwowali zależność między ilością białka LIN14 a 22 nukleotydowym RNA, kodowanym przez gen *LIN-4*, który bierze udział w rozwoju *C. elegans*. Odkrycie tego potranskrypcyjnego wyciszania docelowego mRNA przez małe cząsteczki RNA zmieniło rozumienie systemu kontroli ekspresji informacji genetycznej [27,66]. W kilkanaście lat później, w 2005 r. zasugerowano udział cząsteczek miRNA w procesie nowotworowym oraz możliwość ustalenia konkretnych profili miRNA, które w przyszłości będą mogły posłużyć jako markery diagnostyczne [31].

W przełomowych badaniach na mysim ksenogenicznym modelu raka stercza, ujawniona została zależność między ilością miRNA we krwi a rozmiarem nowotworu, jaki został przeszczepiony [36]. Inne badania potwierdziły tezę, że zewnątrzkomórkowe miRNA są wykrywalne w surowicy krwi w powtarzalny sposób oraz że ich stężenie jest na podobnym poziomie u zdrowych osób. Zmiany poziomu cząsteczek miRNA mogą natomiast być następstwem różnorodnych fizjologicznych stanów, takich jak ciąża (w surowicy krwi ciężarnych kobiet są obecne łożyskowe miRNA, które mogą być wykorzystywane do określenia wieku ciąży) czy różnego typu schorzeń, infekcji wirusowych, a także chorób nowotworowych. Zasugerowano, że swoisty wzorec miRNA (podwyższenie lub obniżenie ekspresji względem kontroli), zarówno we krwi, jak i w tkance, może być charakterystyczny dla danej choroby, a to umożliwia zastosowanie wybranych miRNA do monitorowania stanu fizjologicznego chorych. Zastosowanie miRNA w diagnostyce znacznie się poszerzyło dzięki odkryciu ich obecności także w innych płynach ustrojowych, m.in. w moczu, krwi, płynie z płukania oskrzelowego, mazi stawowej, mleku, ślinie, a także płynie mózgowo-rdzeniowym [16,36,64].

Dotąd zidentyfikowano 2588 dojrzałych miRNA transkrybowanych w ludzkim genomie (miRBase, 21.0, czerwiec 2014). Pojedynczy miRNA może modulować nawet tysiące genów przez rozpoznawanie komplementarnych sekwencji na końcu 3' UTR docelowego mRNA. Szacuje się, że około 30% ludzkich mRNA znajduje się pod ścisłą regulacją miRNA, jednak liczba ta zwiększa się po uwzględnieniu doniesień wskazujących na możliwość łączenia się pewnych miRNA także z regionem 5' UTR oraz z regionem ORF (open reading frame) (jednak w takich przypadkach występują rzadziej i działają mniej efektywnie) [32]. Endogenne miRNA wpływają na procesy zachodzące w komórkach, takie jak proliferacja, naprawa DNA, różnicowanie komórek, metabolizm i apoptoza, jednak biologiczna funkcja krążących miRNA wymaga zbadania. Przypuszcza się, iż niektóre zewnątrzkomórkowe miRNA mogą być nośnikami informacji między komórkami podczas wielu fizjologicznych i patologicznych procesów [56]. W zależności na jakie geny wpływają, miRNA mogą funkcjonować jako onkomiry – prokancerogenne lub jako miRNA supresorowe – działające hamująco na onkogeny [10]. Mechanizmy, np. zmiany genetyczne (mutacje punktowe i polimorfizm pojedynczych nukleotydów SNP) oraz

epigenetyczne w obrębie genów miRNA mogą wpływać na ich ekspresję, a tym samym doprowadzić do zmian w ekspresji docelowych genów. Geny kodujące miRNA często są umiejscowione w obrębie łamliwych miejsc chromosomów, obszarów utraty heterozygotyczności LOH oraz minimalnych regionów amplifikacji, co potwierdza teorię związku miRNA z procesem nowotworowym. Zmiany ilościowe dojrziałych cząsteczek miRNA mogą być także spowodowane nieprawidłowościami związanymi z białkami biorącymi udział w biogenezie cząsteczek miRNA [4].

KRĄŻĄCE miRNA: STABILNOŚĆ ORAZ TEORIE POCHODZENIA

Pierwsze krążące miRNA wykryto w układzie krwionosnym osób chorych na chłoniaka rozlanego z dużych komórek B DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma). Lawrie i wsp. ustalili, że miR-21, miR-10 oraz miR-155 mogą być rzetelnie oznaczane w surowicy krwi i pozwalają na odróżnianie osób chorych od zdrowych, a ponieważ wykazują dużą stabilność zasugerowali również, że można je zastosować w diagnostyce klinicznej [25]. Wraz z rozwojem badań zaczęto dostrzegać coraz większy potencjał cząsteczek miRNA w określaniu stopnia złośliwości nowotworu czy przewidywaniu skutków konkretnych terapii, a także w leczeniu chorych z nowotworami płuca i wykrywaniu wczesnego stadium NSCLC [29].

miRNA – w przeciwieństwie do mRNA – zarówno w osoczu, surowicy, świeżo mrożonych tkankach, bloczkach parafinowych, jak i ślinie, cechują się odpornością na działanie endo- i egzogennych RNaz, ekstremalnych temperatur i pH. Odznaczają się dużą stabilnością przez długi okres, nawet pozostawione w temperaturze pokojowej. Z punktu widzenia diagnostyki klinicznej wymienione cechy determinują cząsteczki miRNA, jako doskonałe biomarkery, zwłaszcza, gdy zwróci się uwagę na potrzebę wielokrotnego mrożenia i rozmrażania materiału diagnostycznego, co dość często zdarza się podczas przetwarzania próbek laboratoryjnych [7,16,36]. Ponieważ syntetyczne oraz uzyskane z krwi, a następnie oczyszczone miRNA, po ponownym wpuszczeniu do ludzkiego osocza były podatne na działanie endogennych RNaz i ulegały natychmiastowej degradacji, zaczęto badać przyczyny ich swoistej stabilności [36]. Dotychczas powstało wiele hipotez wyjaśniających pochodzenie oraz właściwości krążących miRNA, które ściśle wiążą się ze sobą i najprawdopodobniej nie wykluczają wzajemnie. Wymienia się trzy wiodące teorie. Pierwsza, opiera się na twierdzeniu, że występowanie miRNA we krwi jest działaniem niepożądanym zniszczenia komórki i następuje wskutek niewymagającego dostarczenia energii przeciekania komórkowych miRNA. Nastąpić to może w wyniku uszkodzenia tkanki charakterystycznego dla poszczególnych etapów kancerogenezy, wejścia komórki w stan zapalny, apoptozy czy podczas tworzenia przerzutów. Drugą hipotez zakłada aktywny proces uwalniania miRNA z komórki w sposób zależny od mikropęcherzyków MVs (microvesicles). Natomiast trzecia teoria, mówi o aktywnym i selektywnym wydzielaniu miRNA w postaci niezależnej i wolnej

od MVs, będącym następstwem odpowiedzi komórki na różnorodne bodźce [71].

Mikropęcherzyki są pochodzenia komórkowego i przez fuzję z błoną komórkową mogą zostać uwolnione z komórki. Zalicza się do nich MPs (microparticles) (>100 nm średnicy) i egzosomy (50-90 nm średnicy), a także większych rozmiarów ciała apoptotyczne ABs (apoptotic bodies), wytwarzane w odpowiedzi na apoptotyczne bodźce. MVs wykryto zarówno w osoczu, moczu, jak i innych płynach fizjologicznych, a zdolność uwalniania miRNA przez MVs ma większość komórek funkcjonujących w patologicznych, jak i fizjologicznych warunkach [71]. Valdi i wsp. [59] w pionierskiej pracy jako pierwsi poinformowali o transporcie miRNA za pośrednictwem egzosomów, które funkcjonując jako wehikuł transportujący miRNA między komórkami, mogą wpływać na ich aktywność i wytwarzanie białek. Jedną z strategii badania krążących miRNA polega na izolowaniu miRNA związanego z egzosomami. W badaniach z udziałem osób chorych na NSCLC, przeprowadzonych przez Rabinowitsa i wsp. [46] stwierdzono podwyższony poziom wybranych egzosomalowych miRNA w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w badaniach Silva i wsp. [54] odnotowano obniżony poziom miR-let-7f, miR-30e-3p oraz miR-20b związanych z MVs względem zdrowych osób.

Za dużą stabilność cząsteczek miRNA, oprócz wymienionych wyżej czynników, mogą odpowiadać także białka wiążące RNA RBPs (RNA-binding proteins) oraz lipoproteiny. Funkcją białek wiążących miRNA jest nie tylko ochrona cząsteczki miRNA przed degradacją, ale też czynny udział w kontrolowanym upakowywaniu swoistych miRNA w egzosomy oraz ich eksport poza komórkę. Do głównych RBPs zalicza się białko AGO2 (Argonaute 2) należące do kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex) oraz NPM1 (Nucleophosmin 1). Kompleks miRNA-AGO2 cechuje się dużą stabilnością. Wymagane są jednak dalsze badania, aby określić wielkość skali na jaką może być uwalniany z komórki. Szacuje się, że ta frakcja może się składać nawet z 90% wszystkich krążących miRNA [15,57,70].

Arroyo i wsp. [1] zasugerowali, że na podstawie analizy konkretnych miRNA obecnych we krwi oraz formy jaką przybrały, możliwe jest określenie z jakiego typu komórki pochodzą i tym samym odzwierciedlenie komórkowo swoistych miRNA bądź też swoistych metod ich uwalniania przez dany typ komórki. Badanie miRNA pod kątem swoistej frakcji, może znacząco zwiększyć zarówno czułość, jak i swoistość wyselekcjonowanych krążących miRNA jako nieinwazyjnych biomarkerów.

Vickers i wsp. [60] donoszą o znaczącej roli, jaką może pełnić lipoprotein o dużej gęstości HDL (high density lipoprotein) w zapewnianiu stabilności oraz podczas uwalniania miRNA z komórki. Badania *in vitro* i *in vivo* potwierdzają rolę kompleksu HDL-miRNA w transporcie miRNA między

komórkami, co może spowodować wystąpienie znacznych zmian w ekspresji genów w tych komórkach [60].

KRAŻĄCE MI RNA JAKO NIEINWAZYJNE BIOMARKERY NSCLC

Możliwość nieinwazyjnego wykrywania nowotworów, zwłaszcza w ich wczesnym stadium rozwoju, jest dużym wyzwaniem. Uzyskane rezultaty są różne między poszczególnymi badaniami, niemniej jednak wszyscy zgodnie donoszą o występowaniu istotnych zmian w poziomie krążących miRNA u chorych na NSCLC. Dotychczasowe wyniki są obiecujące i przybliżają do odnalezienia odpowiednich profili miRNA, które pozwolą na bardziej szczegółowe diagnozowanie chorych.

Istotnym ograniczeniem badań nad krążącymi miRNA jest zawężona liczba chorych biorących udział w poszczególnych eksperymentach. Duże zróżnicowanie podtypów NSCLC znacząco utrudnia dobór odpowiednich przypadków do konkretnych analiz. W badaniach dotyczących identyfikacji biomarkerów do wczesnego wykrywania NSCLC wyniki analizowane są najczęściej w porównaniu do zdrowych dawców. Optymalne dobranie chorych z grupą kontrolną jest istotne, a oprócz wieku i płci powinno się również uwzględniać liczbę wypalonych papierosów w ciągu życia, mierzoną w paczkolatach. Największym problemem jest jednak ciągłe dobór odpowiedniego referencyjnego miRNA w badaniach z użyciem metody qRT-PCR (quantitative real-time PCR). Aby wyniki z różnych badań można było analizować i porównywać, najważniejsze jest ujednoczenie ich przez określenie odpowiedniej i uniwersalnej normalizacji. Najczęściej stosowanymi genami referencyjnymi są RNU6B [13,17,22,37,42,55] oraz miR-16 [20,26,51,65], jednak sygnalizuje się o ich nieadekwatności, a nieścisłości związane z wyborem odpowiedniej normalizacji pojawiają się często. Wang i wsp. [63] donoszą o potencjalnej prognostycznej funkcji miR-16, którego podwyższony poziom we krwi jest związany z korzystnym rokowaniem chorych z zaawansowanym stadium NSCLC, natomiast Keller i wsp. [24] zanotowali obniżony poziom tego miRNA we krwi pobranej od osób chorych na NSCLC jeszcze przed zdiagnozowaniem choroby. Binachi i wsp. [3] do normalizacji wyników użyli miR-197 oraz miR-24, jednak kilkoro innych badaczy donosi o zmianach w poziomie ekspresji zarówno miR-24 u chorych na NSCLC [8,13,26], jak i o podwyższonym poziomie ekspresji miR-197 u chorych, u których pojawiły się przerzuty [74].

DIAGNOSTYCZNE KRAŻĄCE MI RNA W NSCLC

Odkrycie rzetelnych biomarkerów wykrywających nowotwór we wczesnym i bezobjawowym stadium choroby, mogłoby zrewolucjonizować stosowane procedury i byłoby przełomem w klinicznym postępowaniu i diagnozowaniu chorych z bezobjawowym NSCLC. Przewadzone są intensywne prace, które być może w przyszłości przyczynią się zarówno do rozwoju diagnostyki,

jak i pogłębienia wiedzy dotyczącej procesów nowotworowych. Podstawowym zadaniem związanym z krążącymi miRNA jest jak najwcześniejsze diagnozowanie choroby. W wyselekcjonowaniu idealnego biomarkera z wszystkich miRNA, dużą rolę mogą odegrać badania metaanalizy. Jedną z nielicznych metaanaliz dotyczących krążących miRNA przeprowadzili Chen i Jin [6]. Wykazali, że w porównaniu do pojedynczego miRNA większą diagnostyczną moc ma jednoczesna analiza poziomu ekspresji kilku miRNA. Stwierdzili również, że analiza ekspresji miRNA obecnych we krwi jest bardziej wiarygodna niż w badaniu ekspresji miRNA w płwocinie. W tabeli 1 przedstawiono zbiór krążących miRNA, które mogą być przydatne w diagnozowaniu NSCLC.

Chen i wsp. [8] w badaniach obejmujących aż 400 chorych z NSCLC ustalili profil składający się z 10 miRNA występujących w surowicy krwi (miR-20a, miR-222, miR-221, miR-320, miR-152, miR-145, miR-223, miR-199a-5p, miR-4, miR-25), umożliwiający detekcję NSCLC. Już wcześniej raportowali o podwyższonej ekspresji miR-25 i miR-223 również w surowicy osób z nowotworem płuca [7]. Badania Jeonga i wsp. [21] wskazały na obniżony poziom miRNA let-7a we krwi chorych z NSCLC w porównaniu ze zdrowymi osobami. Zheng i wsp. [74] zauważyli, że poziom miR-155, miR-97 oraz miR-182 był znacznie podwyższony w osoczu osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych dawców. Stwierdzono, że te miRNA mogą posłużyć do rozróżniania nowotworu w każdym stadium. Panel 12 egzosomalych miRNA (miR-155, miR-21, miR-17-3p, miR-106a, miR-146, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212, miR-214) opracowany przez Rabinowitsa i wsp. [46] może posłużyć w testach do wykrywania AC. Foss i wsp. [12] zaobserwowali podwyższony poziom w surowicy miR-1254 oraz miR-574-5p u chorych na NSCLC. Keller i wsp. [24] przeprowadzili ważne badania na surowicach krwi osób chorych na nowotwór płuca, pobranych na długo przed wystąpieniem objawów choroby. Największe zmiany w ekspresji miRNA wykryto gdy odstęp między zdiagnozowaniem choroby a pobraniem krwi był mniejszy. Sugerowano jednak, że dzięki badaniu ekspresji miRNA przewidzenie choroby jest możliwe nawet na kilka lat przed jej zdiagnozowaniem.

Powrózek i wsp. [43] zaobserwowali, że w wykrywaniu wczesnego stadium NSCLC duże znaczenie mogą mieć krążące miRNA-448 oraz miR-4478, których poziom – w porównaniu ze zdrowymi dawcami – określono jako znacznie podwyższony u chorych we wczesnym stadium choroby. Bianchi i wsp. [3] opracowali test surowicy obejmujący panel 34 miRNA, który pozwala identyfikować chorych we wczesnym i bezobjawowym stadium NSCLC. Natomiast Shen i wsp. [51] wykryli, że ekspresja krążących miR-21 i miR-210 była podwyższona, a miR-126 i miR-486-5p obniżona u chorych z NSCLC. Dotyczy to również chorych w I stadium nowotworu, a zmiany w ekspresji wymienionych miRNA są analogiczne również w tkance nowotworowej u tych osób. Qi i wsp. [45] odnotowali zwiększoną ekspresję miR-17, miR-21, miR-192

Tabela 1. Diagnostyczne krążące miRNA w NSCLC

Lp.	miRNA	Materiał badawczy	Zastosowanie	Piśmiennictwo
1	miR-92a, miR-484, miR-486-5p, miR-328, miR-191, miR-376a, miR-342, miR-331-3p, miR-30c, miR-28-5p, miR-98, miR-17-5p, miR-26b, miR-374, miR-30b miR-26a, miR-142-3p, miR-103, miR-126, let7a, let-7d, let7b, miR-22, miR-148b, miR-139, miR-32, miR-133b, miR-566, miR-432-3p, miR-223, miR-29a, miR-148a, miR-142-5p, miR-140-5p	Surowica krwi	Diagnozowanie wczesnego, bezobjawowego stadium NSCLC u osób wysokiego ryzyka	[3]
2	miR-378a, miR-379, miR-139-5p, miR-200b-5p miR-151a-5p, miR-30a-3p, miR-200b-5p, miR-629, miR-100, miR-154-3p	Egzosomy osocza krwi	Diagnozowanie AC i ziarniniaka względem zdrowych dawców Diagnozowanie AC względem ziarniniaka	[5]
3	miR-20a, miR-24, miR-25, miR-145, miR-152, miR-199a-5p, miR-221, miR-222, miR-223, miR-320	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC	[8]
4	miR-1254, miR-574-5p	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC	[12]
5	miR-22, miR-24, miR-34a	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC	[13]
6	miR-138 (wraz z PDK1)	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC	[17]
7	miR-15b i miR-27b	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC	[18]
8	Let-7a	Pełna krew	Diagnozowanie NSCLC	[21]
9	miR-205-3p, miR-205-5p, miR-21-3p	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC względem zdrowych dawców i nienowotworowych chorób płuca	[22]
10	miR-16, miR-518a-5p, miR574-5p, miR-593, miR-663, miR-718, miR-1228, miR-1972, miR-2114	Surowica krwi	Wczesne diagnozowanie NSCLC	[24]
11	miR-21, miR-205, miR-30d, miR-24	Surowica krwi	Diagnozowanie wczesnego stadium NSCLC	[26]
12	miR-21-5p, miR-335-3p	Osocze krwi	Diagnozowanie NSCLC	[33]
13	miR-92a-3p, miR-30b-5p, miR-191-5p, miR-484, miR-328-3p, miR-30c-5p, miR-374a-5p, let-7d-5p, miR-331-3p, miR-29a-3p, miR-148a-3p, miR-223-3p, miR-140-5p	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC u osób wysokiego ryzyka	[38]
14	miR-21, miR-486	Osocze krwi i kondensat wydechanego powietrza	Diagnozowanie NSCLC	[39]
15	miR-190b, miR-630, miR-942, miR-1284	Pełna krew	Diagnozowanie AC względem zdrowych dawców	[41]
16	miR-448, miR-4478	Osocze krwi	Diagnozowanie nowotworu płuca (NSCLC i SCLC) oraz wczesnego stadium NSCLC	[43]

Tabela 1. cd

17	miR-944, miR-3662	Osocze krwi	Diagnozowanie nowotworu płuca (NSCLC i SCLC)	[44]
18	miR-17, miR-21, miR-192	Surowica krwi	Diagnozowanie wczesnego stadium NSCLC	[45]
19	miR-155, miR-21, miR-17-3p, miR-106a, miR-146, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212, miR-214	Egzosomy osocza krwi	Diagnozowanie AC względem zdrowych dawców	[46]
20	miR-21, miR-143, miR-155, miR-210, miR-372	Plwocina	Diagnozowanie NSCLC	[47]
21	miR-361-3p, miR-625*	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC względem zdrowych dawców i chorych z nienowotworowymi chorobami płuca	[49]
22	miR-31 miR-210	Plwocina	Diagnozowanie NSCLC	[50]
23	miR-21, miR-210 miR-126, miR-486-5p	Osocze krwi	Diagnozowanie wczesnego stadium NSCLC	[51]
24	miR-21, miR-155 miR-145	Osocze krwi	Diagnozowanie wczesnego stadium NSCLC	[55]
25	miR-328, miR-339, miR-18a, miR-140	Pełna krew	Diagnozowanie NSCLC	[58]
26	miR-125a-5p, miR-145, miR-146a	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC	[62]
27	miR-21	Osocze krwi	Diagnozowanie wczesnego stadium NSCLC	[66]
28	miR-148a, miR-148b, miR-152, miR-21	Surowica krwi	Diagnozowanie NSCLC	[67]
29	miR-21, miR-486, miR-375, miR-200b	Plwocina	Diagnozowanie AC we wczesnym stadium względem zdrowych dawców	[68]
30	miR-25, miR-122, miR-195, miR-21, miR-125b	Osocze krwi	Diagnozowanie NSCLC	[72]
31	miR-155, miR-197 miR-182	Osocze krwi	Diagnozowanie wczesnego stadium NSCLC	[74]
32	miR-29c, miR-429	Surowica krwi	Diagnozowanie wczesnego stadium NSCLC	[75]

AC – rak gruczolowy; NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuca; PDK1 – enzym należący do klas transferaz (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1); SCLC – rak drobnokomórkowy płuca.

w surowicy krwi chorych we wczesnym stadium nowotworu płuca. Według Zhu i wsp. [75] jednoczesna analiza miR-429 oraz miR-29c, których poziomy są odpowiednio obniżone i podwyższone, umożliwia rozróżnianie osób chorych w I stopniu NSCLC względem zdrowych.

W badaniach nad krążącymi miRNA w plwocinie chorych na NSCLC, Yu i wsp. [68] oraz Roa i wsp. [47] niezależnie zanotowali diagnostyczny potencjał krążącego miR-21, natomiast Shen i wsp. [50] informują o zmianach w poziomie ekspresji miR-31 oraz miR-210.

PROGNOSTYCZNE KRĄŻĄCE miRNA W NSCLC

Mierząc poziom ekspresji konkretnych krążących miRNA, możliwe jest prognozowanie chorych z NSCLC. Ekspresja niektórych krążących miRNA ulega zmianie z chwilą usunięcia guza i ma tendencje do zwiększenia się lub zmniejszenia. Leidinger i wsp. [28] stwierdzili obecność większych zmian w poziomie krążących miRNA po resekcji guza u chorych bez przerzutów w porównaniu do chorych, u których przerzuty pojawiły się. W tabeli 2 przedstawiono wybrane krążące miRNA,

Tabela 2. Prognostyczne krążące miRNA w NSCLC

Lp.	miRNA	Materiał badawczy	Zastosowanie	Piśmiennictwo
1	miR-147	Surowica krwi	Rokowanie	[9]
2	miR-138 (wraz z PDK1)	Surowica krwi	Rokowanie	[17]
3	miR-486, miR-30d, miR-1 miR-499	Surowica krwi	Rokowanie	[19]
4	miR-21, miR-24, miR-30d	Surowica krwi	Rokowanie	[26]
5	miR-1290	Surowica krwi	Rokowanie	[37]
6	miR-486-5p	Surowica krwi	Rokowanie	[42]
7	miR-let-7f, miR-30e-3p,	Osoczowe MVs	Rokowanie	[54]
8	miR-16, miR-30e-3p, miR-106a, miR-148b, miR-26a, miR-27a, miR-106b, miR- 301a, miR-27b, miR-152, miR-20a, miR-30a-5p, miR-148a, miR-145, miR-92a, let-7c, let-7b	Surowica krwi	Rokowanie chorych z zaawansowanym stadium NSCLC	[63]
9	miR-125b	Surowica krwi	Rokowanie	[69]
10	miR-21	Surowica krwi	Rokowanie	[73]
11	miR-429	Surowica krwi	Rokowanie	[75]

MVs – mikropęcherzyki; NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuca; PDK1 – enzym należący do klas transferaz (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1).

które mogą się okazać niezwykle przydatne w prognozowaniu u osób chorych na NSCLC.

Hu i wsp. [19] dostrzegli, że analiza stopnia deregulacji ekspresji miR-486, miR-30d, miR-1 oraz miR-499 pozwala określić wskaźnik przeżyć chorych na NSCLC. W badaniach porównano grupę chorych z wyższym wskaźnikiem przeżycia z grupą o niższym wskaźniku przeżycia. Stwierdzono, że chorzy, u których deregulacji uległy co najmniej dwa z grupy wyselekcjonowanych miRNA mają gorsze rokowania niż osoby, u których nastąpiła deregulacja tylko jednego lub żadnego miRNA. Z badań Yuxia i wsp. [69] wynika, iż poziom ekspresji miR-125b w surowicy krwi jest powiązany z krótkim przeżyciem osób chorych na NSCLC. Analiza ekspresji tego miRNA nie umożliwia zdiagnozowanie wczesnego stadium choroby, jednak stwierdzono jego znacznie podwyższony poziom w stopniu III i IV NSCLC w porównaniu do stopnia I i II NSCLC. Profil 17 miRNA wyselekcjonowany przez Wang i wsp. [63] istotnie jest powiązany z dwuletnim przeżyciem chorych na NSCLC. Natomiast Han i wsp. [17] donoszą, że obniżony poziom krążącego miR-138 u chorych na NSCLC w połączeniu z podwyższoną ekspresją PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1) jest wiarygodnym wskaźnikiem przewidyującym niekorzystne rokowanie i krótszy czas przeżycia.

PREDYKCYJNE KRĄŻĄCE miRNA W OKREŚLANIU CECH KLINICZNO-PATOLOGICZNYCH

Jak już wspomniano, wraz z rozwojem nowych strategii i terapii w leczeniu chorych z NSCLC jest wymagana coraz bardziej szczegółowa klasyfikacja nowotworów płuca. Różne są swoiste profile ekspresji miRNA, w zależności od podtypu nowotworu, a relatywna łatwość i prostota pomiaru krążących miRNA we krwi może znacznie przyspieszyć procedury diagnostyczne. Deregulacja poziomu ekspresji miRNA występuje także w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu oraz występowania przerzutów. Możliwość nieinwazyjnego określenia tych cech znacznie poprawiłaby jakość leczenia chorych z nowotworem płuca i zwiększyłaby ich szansę na otrzymanie możliwie jak najlepszej terapii. W tabeli 3 przedstawiono wybrane wyniki badań, w których odnotowano korelację cech kliniczno-patologicznych z poziomem ekspresji wybranych cząsteczek miRNA.

Jiang i wsp. [22] donoszą o podwyższonych poziomach miR-205-5p oraz miR-205-3p we krwi, co umożliwia różnicowanie chorych z SCC od chorych z AC. Roth i wsp. [49] zaobserwowali obniżony poziom miR-625* w surowicy krwi chorych z LCC oraz chorych z NSCLC palących papierosy w porównaniu do chorych z AC i chorych

Tabela 3. Predykcyjne krążące miRNA określające cechy kliniczno-patologiczne

Lp.	miRNA	Materiał badawczy	Zastosowanie	Piśmiennictwo
1	miR-147	Surowica krwi	Wskaźnik występowania przerzutów w węzłach chłonnych	[9]
2	miR-138 (wraz z PDK1)	Surowica krwi	Wskaźnik występowania przerzutów i stopnia zaawansowania nowotworu	[17]
3	let-7i-3p, miR-154-5p	Surowica krwi	Wskaźnik występowania NSCLC skorelowanego z paleniem	[20]
4	205-3p i 205-5p	Surowica krwi	Rozróżnianie AC od SCC	[22]
5	miR-126, miR-183	Surowica krwi	Rozróżnianie I i II stopnia od IV stopnia NSCLC, wskaźnik występowania przerzutów	[30]
6	miR-944	Osocze krwi	Rozróżnianie wczesnego stadium SCC względem zdrowych dawców	[44]
	miR-3662		Rozróżnianie wczesnego stadium AC względem zdrowych dawców	
7	miR-361-3p, miR-625*	Surowica krwi	Rozróżnianie LCC od AC oraz chorych z NSCLC palących papierosy od chorych niepalących	[49]
8	miR-let-7f, miR-30e-3p,	Osoczone MVs	Określenie stopnia zaawansowania nowotworu	[54]
	miR-20b		Wskaźnik występowania przerzutów w węzłach chłonnych i zaawansowanego stadium choroby	
9	miR-423	Pełna krew	Rozróżnianie SCC od AC	[58]
10	miR-125b	Surowica krwi	Rozróżnianie III i IV stopnia od I i II stopnia NSCLC	[69]
11	miR-25, miR-122, miR-195, miR-21, miR-125b	Osocze krwi	Rozróżnianie AC od SCC, rozróżnianie stopnia klinicznego I i II od III i IV, wskaźnik występowania przerzutów w węzłach chłonnych, określanie statusu palenia	[72]
12	miR-155, miR-197	Osocze krwi	Wskaźnik występowania przerzutów	[74]

AC – rak gruczołowy; LCC – rak wielkokomórkowy; MVs – mikropęcherzyki; NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuca; PDK1 – enzym należący do klas transferaz (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1); SCC – rak płaskonabłonkowy.

niepalących. Powrózek i wsp. [44] określili przydatność krążących miR-944 i miR-3662 w diagnozowaniu odpowiednio SCC oraz AC: poziom tych cząsteczek w osoczu krwi był u osób chorych podwyższony. Wskazują również na udział tych cząsteczek w rozwoju histologicznych podtypów nowotworu. U chorych, u których pojawiły się przerzuty, Zheng i wsp. [74] odnotowali podwyższoną ekspresję miR-155 oraz miR-197.

KRĄŻĄCE MI RNA JAKO CZYNNIK POMOCNICZY W DOBORZE ODPOWIEDNIEJ TERAPII

Ponieważ krążące miRNA mogą być pomocne w przewidywaniu swoistych mutacji dla danego typu nowotworu, umożliwia to ich zastosowanie do ustalenia odpowiedniej terapii. Mutacje wpływające na EGFR (epidermal growth

factor receptor) występują w 40-80% NSCLC i wskazują na niekorzystne rokowanie u chorych oraz wystąpienie oporności na działanie leku Gefitinib, który jest inhibitorem kinazy tyrozynowej EGFR. Gefitinib jest powszechnie używany w NSCLC z dobrym skutkiem, niestety nie u wszystkich chorych. Wyselekcjonowanie kandydatów do leczenia Gefitinibem przyniosłoby ogromne korzyści, a analiza mutacji wpływających na EGFR w zaawansowanych stadiach NSCLC umożliwiłaby chorym optymalną terapię celowaną [72]. Zhao i wsp. [72] wyselekcjonowali 5 krążących miRNA (miR-195, miR-122, miR-125b, miR-21 oraz miR-25), które potwierdzają obecność mutacji wpływającej na EGFR i mogą posłużyć do oceny skuteczności działania leku Gefitinib. Shen i wsp. [52] opisują także prognostyczne możliwości krążącego miR-21. W wyniku przeprowadzonych badań zauważyli, że cho-

Tabela 4. Krążące miRNA pomocne w wyborze odpowiedniej terapii

Lp.	miRNA	Materiał badawczy	Zastosowanie	Piśmiennictwo
1	miR-22	Surowica krwi	Rokowanie w terapii z udziałem leku Pemetrexed	[13]
2	miR-21	Osocze krwi	Rokowanie w terapii opartej na platynie	[14]
3	miR-29a, miR-542-5p, miR-502-3p, miR-376a, miR-500a, miR-424	Pełna krew	Rokowanie chorych z zaawansowanym niepłaskonabłonkowym NSCLC po otrzymaniu terapii bazującej na lekach Bewacizumab/Erlotynib i chemioterapii opartej na platynie	[23]
4	miR-21, miR-10b	Osocze krwi	Rokowanie w terapii z udziałem leku Gefitinib	[52]
5	miR-25, miR-145, miR-210	Surowica krwi	Rokowanie w terapii z udziałem leku Pemetrexed	[53]
6	miR-21	Osocze krwi	Rokowanie w terapii opartej na platynie	[65]
7	miR-25, miR-122, miR-195, miR-21, miR-125b	Osocze krwi	Wskaźnik obecności mutacji w genie EGFR	[73]
8	miR-155, miR-197, miR-182	Osocze krwi	Wskaźnik odpowiedzi na chemioterapię	[74]

EGFR – receptor czynnika wzrostu naskórka; NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuca.

rzy, którym usunięto nowotwór z mutacją wpływającą na EGFR, mieli podwyższony – w porównaniu z osobami bez tej mutacji – poziom ekspresji miR-21 we krwi. U osób, u których poziom miR-21 oraz miR-10b był podwyższony, stwierdzono niższy wskaźnik przeżycia, ale lepszą odpowiedź na Gefitinib, w porównaniu do chorych z niższą ekspresją wspomnianych miRNA.

W leczeniu chorych z NSCLC często stosuje się chemioterapię bazującą na leku Pemetrexed. Franchina i wsp. [13] zauważyli zależność odpowiedzi na leczenie Pemetrexedem chorych, u których ekspresja krążącego miR-22 była wyższa. Chorzy nie odpowiadali na leczenie, a choroba była u nich postępująca. Shi i wsp. [53] natomiast sugerują znaczącą rolę miR-25, miR-145 oraz miR-210 w określaniu skuteczności leczenia u chorych na AC, u których nie stwierdzono translokacji genu *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) ani mutacji w genie *EGFR*.

Według Gao i wsp. [14] chorzy po całkowitym usunięciu guza, którzy wykazywali relatywnie niższą ekspresję miR-21, zarówno krążących, jak i obecnych w tkance nowotworowej, lepiej – w porównaniu z chorymi, u których stwierdzono wyższą ekspresję tego miRNA – odpowiadali na chemioterapię opartą na cisplatynie. W określaniu stopnia złośliwości nowotworu oraz rokowania u chorych Han i wsp. [17] stwierdzili, że pomocne może być badanie poziomu

krążącego miR-138 z PDK1. Badania *in vitro* ujawniły, że miR-138 wpływa na wrażliwość komórek nowotworowych na cisplatynę, co wskazuje rolę miRNA w rozwoju oporności u chorych leczonych tym chemioterapeutykami [61].

W tabeli 4 przedstawiono wybrane krążące miRNA, które mogą w istotny sposób wpływać na występowanie oporności na leczenie chorych na NSCLC.

PODSUMOWANIE

Od czasu odkrycia cząsteczek miRNA zainteresowanie nimi jest coraz większe. Ich rola dalej nie jest w pełni poznana, jednak nie ulega wątpliwości, iż mają ogromny wpływ na komórkę i jej fizjologię. Deregulacje poziomu ekspresji miRNA obecnych w tkankach, jak i we krwi, są stwierdzane prawie we wszystkich chorobach, co uwiadcza ich znaczący udział w procesach patologicznych. Obecność oraz stabilność krążących miRNA w łatwej do pobrania krwi oraz płwocinie sprawiają, że użycie tych cząsteczek jako nieinwazyjnych biomarkerów jest bardzo obiecujące. Już teraz dotychczasowe wyniki pozwalają przypuszczać, że cząsteczki miRNA mogą się przyczynić do rozwoju badań przesiewowych do wczesnego wykrywania NSCLC, a dzięki określeniu poziomu ryzyka, które stanowi olbrzymią troskę w dobie spersonalizowanej medycyny, miRNA może znacznie poprawić jakość leczenia chorych na NSCLC.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K., Pritchard C.C., Gibson D.F., Mitchell P.S., Bennett C.F., Pogosova-Agadjanyan E.L., Stirewalt D.L., Tait J.F., Tewari M.: Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 5003-5008
- [2] Bach P.B., Mirkin J.N., Oliver T.K., Azzoli C.G., Berry D.A., Brawley O.W., Byers T., Colditz G.A., Gould M.K., Jett J.R., Sabichi A.L., Smith-Bindman R., Wood D.E., Qaseem A., Detterbeck F.C.: Benefits and harms of CT screening for lung cancer: a systematic review. *JAMA*, 2012; 307: 2418-2429
- [3] Bianchi F., Nicassio F., Marzi M., Belloni E., Dall'olio V., Bernard L., Pelosi G., Maisonneuve P., Veronesi G., Di Fiore P.P.: A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol. Med.*, 2011; 3: 495-503
- [4] Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M.: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2999-3004
- [5] Cazzoli R., Buttitta F., Di Nicola M., Malatesta S., Marchetti A., Rom W.N., Pass H.L.: MicroRNAs derived from circulating exosomes as non-invasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2013; 8: 1156-1162
- [6] Chen L., Jin H.: MicroRNAs as novel biomarkers in the diagnosis of non-small cell lung cancer: a meta-analysis based on 20 studies. *Tumour Biol.*, 2014; 35: 9119-9129
- [7] Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X., Li Q., Li X., Wang W., Zhang Y., Wang J. i wsp.: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*, 2008; 18: 997-1006
- [8] Chen X., Hu Z., Wang W., Ba Y., Ma L., Zhang C., Wang C., Ren Z., Zhao Y., Wu S., Zhuang R., Zhang Y., Hu H., Liu C., Xu L. i wsp.: Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis. *Int. J. Cancer*, 2012; 130: 1620-1628
- [9] Chu G., Zhang J., Chen X.: Serum level of microRNA-147 as diagnostic biomarker in human non-small cell lung cancer. *J. Drug Target*, 2015; 10: 1-5
- [10] Croce C.M.: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 704-714
- [11] Didkowska J., Wojciechowska U.: Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie. [http://onkologia.org.pl/k/epidemiologia/\(09.04.2016\)](http://onkologia.org.pl/k/epidemiologia/(09.04.2016))
- [12] Foss K.M., Sima C., Ugolini D., Neri M., Allen K.E., Weiss G.J.: miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2011; 6: 482-488
- [13] Franchina T., Amodeo V., Bronte G., Savio G., Ricciardi G.R., Picciotto M., Russo A., Giordano A., Adamo V.: Circulating miR-22, miR-24 and miR-34a as novel predictive biomarkers to pemetrexed-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *J. Cell Physiol.*, 2014; 229: 97-99
- [14] Gao W., Lu X., Liu L., Xu J., Feng D., Shu Y.: MiRNA-21: a biomarker predictive for platinum-based adjuvant chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 2012; 13: 330-340
- [15] Gibbins D.J., Ciaudo C., Erhardt M., Voinnet O.: Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 1143-1149
- [16] Gilad S., Meiri E., Yogev Y., Benjamin S., Lebanony D., Yerushalmi N., Benjamin H., Kushnir M., Cholakh H., Melamed N., Bentwich Z., Hod M., Goren Y., Chajut A.: Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 2008; 3: e3148
- [17] Han L., Zhang G., Zhang N., Li H., Liu Y., Fu A., Zheng Y.: Prognostic potential of microRNA-138 and its target mRNA PDK1 in sera for patients with non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.*, 2014; 31: 129
- [18] Hennessey P.T., Sanford T., Choudhary A., Mydlarz W.W., Brown D., Adai A.T., Ochs M.F., Ahrendt S.A., Mambo E., Califano J.A.: Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 2012; 7: e32307
- [19] Hu Z., Chen X., Zhao Y., Tian T., Jin G., Shu Y., Chen Y., Xu L., Zen K., Zhang C., Shen H.: Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 1721-1726
- [20] Huang J., Wu J., Li Y., Li X., Yang T., Yang Q., Jiang Y.: Dereglulation of serum microRNA expression is associated with cigarette smoking and lung cancer. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 364316
- [21] Jeong H.C., Kim E.K., Lee J.H., Lee J.M., Yoo H.N., Kim J.K.: Aberrant expression of let-7a miRNA in the blood of non-small cell lung cancer patients. *Mol. Med. Rep.*, 2011; 4: 383-387
- [22] Jiang M., Zhang P., Hu G., Xiao Z., Xu F., Zhong T., Huang F., Kuang H., Zhang W.: Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients. *Mol. Cell Biochem.*, 2013; 383: 67-75
- [23] Joerger M., Baty F., Früh M., Droege C., Stahel R.A., Betticher D.C., von Moos R., Oschsenbein A., Pless M., Gautschi O., Rothschild S., Brauchli P., Klingbiel D., Zappa F., Brutsche M.: Circulating microRNA profiling in patients with advanced non-squamous NSCLC receiving bevacizumab/erlotinib followed by platinum-based chemotherapy at progression (SAKK 19/05). *Lung Cancer*, 2014; 85: 306-313
- [24] Keller A., Leidinger P., Gislesfoss R., Haugen A., Langseth H., Staehler P., Lenhof H.P., Meese E.: Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis. *RNA Biol.*, 2011; 8: 506-516
- [25] Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M., Pushkaran B., Liggins A.P., Pulford K., Banham A.H., Pezzella F., Boulwood J., Waincoat J.S., Hatton C.S., Harris A.L.: Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 2008; 141: 672-675
- [26] Le H.B., Zhu W.Y., Chen D.D., He J.Y., Huang Y.Y., Liu X.G., Zhang Y.K.: Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-129 in pre- and post-operative lung carcinoma patients. *Med. Oncol.*, 2012; 29: 3190-3197
- [27] Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993; 75: 843-854
- [28] Leidinger P., Galata V., Backes C., Stähler C., Rheinheimer S., Huwer H., Meese E., Keller A.: Longitudinal study on circulating miRNAs in patients after lung cancer resection. *Oncotarget*, 2015; 6: 16674-16685
- [29] Lin P.Y., Yu S.L., Yang P.C.: MicroRNA in lung cancer. *Br. J. Cancer*, 2010; 103: 1144-1148
- [30] Lin Q., Mao W., Shu Y., Lin F., Liu S., Shen H., Gao W., Li S., Shen D.: A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2012; 138: 85-93
- [31] Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R., Golub T.R.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005; 435: 834-838

- [32] Lytle J.R., Yario T.A., Steitz J.A.: Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 9667-9672
- [33] Ma J., Li N., Guarnera M., Jiang F.: Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. *Biomark Insights*, 2013; 8: 127-136
- [34] MacLellan S.A., MacAulay C., Lam S., Garnis C.: Pre-profiling factors influencing serum microRNA levels. *BMC Clin. Pathol.*, 2014; 14: 27
- [35] Manser R., Lethaby A., Irving L.B., Stone C., Byrnes G., Abramson M.J., Campbell D.: Screening for lung cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2013; 6: CD001991
- [36] 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. i wsp.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 10513-10518
- [37] Mo D., Gu B., Gong X., Wu L., Wang H., Jiang Y., Zhang B., Zhang M., Zhang Y., Xu J., Pan S.: miR-1290 is a potential prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.*, 2015; 7: 1570-1579
- [38] Montani F., Marzi M.J., Dezi F., Dama E., Carletti R.M., Bonizzi G., Bertolotti R., Bellomi M., Rampinelli C., Maisonneuve P., Spaggiari L., Veronesi G., Nicassio F., Di Fiore P.P., Bianchi F.: miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 2015; 107: djv063
- [39] Mozzoni P., Banda I., Goldoni M., Corradi M., Tiseo M., Acampa O., Balestra V., Ampollini L., Casalini A., Carbognani P., Mutti A.: Plasma and EBC microRNAs as early biomarkers of non-small-cell lung cancer. *Biomarkers*, 2013; 18: 679-686
- [40] Nowotwory płuca i opłucnej. [http://onkologia.org.pl/nowotwory-pluca-oplucnej-tchawicy/\(09.04.2016\)](http://onkologia.org.pl/nowotwory-pluca-oplucnej-tchawicy/(09.04.2016))
- [41] Patnaik S.K., Yendamuri S., Kannisto E., Kucharczuk J.C., Singhal S., Vachani A.: MicroRNA expression profiles of whole blood in lung adenocarcinoma. *PLoS One*, 2012; 7: e46045
- [42] Petriella D., De Summa S., Lacalamita R., Galetta D., Catino A., Logroscino A.F., Palumbo O., Carella M., Zito F.A., Simone G., Tommasi S.: miRNA profiling in serum and tissue samples to assess noninvasive biomarkers for NSCLC clinical outcome. *Tumor Biol.*, 2016; 37: 5503-5513
- [43] Powrózek T., Krawczyk P., Kowalski D.M., Kuźnar-Kaminska B., Winiarczyk K., Olszyna-Serementa M., Batura-Gabryel H., Milanowski J.: Application of plasma circulating microRNA-448, 506, 4316, and 4478 analysis for non-invasive diagnosis of lung cancer. *Tumor Biol.*, 2016; 37: 2049-2055
- [44] Powrózek T., Krawczyk P., Kowalski D.M., Winiarczyk K., Olszyna-Serementa M., Milanowski J.: Plasma circulating microRNA-944 and microRNA-3662 as potential histologic type-specific early lung cancer biomarkers. *Transl. Res.*, 2015; 166: 315-323
- [45] Qi Z., Yang D.Y., Cao J.: Increased micro-RNA 17, 21, and 192 gene expressions improve early diagnosis in non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.*, 2014; 31: 195
- [46] Rabinowits G., Gercel-Taylor C., Day J.M., Taylor D.D., Kloecker G.H.: Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer*, 2009; 10: 42-46
- [47] Roa W.H., Kim J.O., Razzak R., Du H., Guo L., Singh R., Gazala S., Ghosh S., Wong E., Joy A.A., Xing J.Z., Bedard E.L.: Sputum microRNA profiling: a novel approach for the early detection of non-small cell lung cancer. *Clin. Invest. Med.*, 2012; 35: E271-E281
- [48] Rossi G., Pelosi G., Barbareschi M., Graziano P., Cavazza A., Pappotti M.: Subtyping non-small cell lung cancer: relevant issues and operative recommendations for the best pathology practice. *Int. J. Surg. Pathol.*, 2013; 21: 326-336
- [49] Roth C., Stückerath I., Pantel K., Izbicki J.R., Tachezy M., Schwärzenbach H.: Low levels of cell-free circulating miR-361-3p and miR-625* as blood-based markers for discriminating malignant from benign lung tumors. *PLoS One*, 2012; 7: e38248
- [50] Shen J., Liao J., Guarnera M.A., Fang H., Cai L., Stass S.A., Jiang F.: Analysis of microRNAs in sputum to improve computed tomography for lung cancer diagnosis. *J. Thorac. Oncol.*, 2014; 9: 33-40
- [51] Shen J., Todd N.W., Zhang H., Yu L., Lingxiao X., Mei Y., Guarnera M., Liao J., Chou A., Lu C.L., Jiang Z., Fang H., Katz R.L., Jiang F.: Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab. Invest.*, 2011; 91: 579-587
- [52] Shen Y., Tang D., Yao R., Wang M., Wang Y., Yao Y., Li X., Zhang H.: microRNA expression profiles associated with survival, disease progression, and response to gefitinib in completely resected non-small-cell lung cancer with EGFR mutation. *Med. Oncol.*, 2013; 30: 750
- [53] Shi S.B., Wang M., Tian J., Li R., Chang C.X., Qi J.L.: MicroRNA 25, microRNA 145, and microRNA 210 as biomarkers for predicting the efficacy of maintenance treatment with pemetrexed in lung adenocarcinoma patients who are negative for epidermal growth factor receptor mutations or anaplastic lymphoma kinase translocations. *Transl. Res.*, 2016; 170: 1-7
- [54] Silva J., Garcia V., Zaballos A., Provencio M., Lombardia L., Almonacid L., Garcia J.M., Dominguez G., Peña C., Diaz R., Herrera M., Varela A., Bonilla F.: Vesicle-related microRNAs in plasma of non-small cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur. Respir. J.*, 2011; 37: 617-623
- [55] Tang D., Shen Y., Wang M., Yang R., Wang Z., Sui A., Jiao W., Wang Y.: Identification of plasma microRNAs as novel noninvasive biomarkers for early detection of lung cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2013; 22: 540-548
- [56] Turchinovich A., Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Burwinkel B.: Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front. Genet.*, 2013; 4: 119
- [57] Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B.: Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: 7223-7233
- [58] Ulivi P., Foschi G., Mengozzi M., Scarpi E., Silvestrini R., Amadori D., Zoli W.: Peripheral blood miR-328 expression as a potential biomarker for the early diagnosis of NSCLC. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 10332-10342
- [59] Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O.: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 654-659
- [60] Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T.: MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, 2011; 13: 423-433
- [61] Wang Q., Zhong M., Liu W., Li J., Huang J., Zheng L.: Alterations of microRNAs in cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells (A549/DDP). *Exp. Lung. Res.*, 2011; 37: 427-434
- [62] Wang R.J., Zheng Y.H., Wang P., Zhang J.Z.: Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015; 8: 765-771
- [63] Wang Y., Gu J., Roth J.A., Hildebrandt M.A., Lippman S.M., Ye Y., Minna J.D., Wu X.: Pathway-based serum microRNA profiling and survival in patients with advanced stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 2013; 73: 4801-4809
- [64] Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K.: The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.*, 2010; 56: 1733-1741
- [65] Wei J., Gao W., Zhu C.J., Liu Y.Q., Mei Z., Cheng T., Shu Y.Q.: Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection

and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin. J. Cancer*, 2011; 30: 407-414

[66] Wightman B., Ha I., Ruvkun G.: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993; 75: 855-862

[67] Yang J.S., Li B.J., Lu H.W., Chen Y., Lu C., Zhu R.X., Liu S.H., Yi Q.T., Li J., Song C.H.: Serum miR-152, miR-148a, miR-148b, and miR-21 as novel biomarkers in non-small cell lung cancer screening. *Tumor Biol.*, 2015; 36: 3035-3042

[68] Yu L., Todd N.W., Xing L., Xie Y., Zhang H., Liu Z., Fang H., Zhang J., Katz R.L., Jiang F.: Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int. J. Cancer*, 2010; 127: 2870-2878

[69] Yuxia M., Zhennan T., Wei Z.: Circulating miR-125b is a novel biomarker for screening non-small-cell lung cancer and predicts poor prognosis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2012; 138: 2045-2050

[70] Zampetaki A., Willeit P., Drozdov I., Kiechl S., Mayr M.: Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc. Res.*, 2012; 93: 555-562

[71] Zen K., Zhang C.Y.: Circulating microRNAs: a novel class of bio-

markers to diagnose and monitor human cancers. *Med. Res. Rev.*, 2012; 32: 326-348

[72] Zhao Q., Cao J., Wu Y.C., Liu X., Han J., Huang X.C., Jiang L.H., Hou X.X., Mao W.M., Ling Z.Q.: Circulating miRNAs is a potential marker for gefitinib sensitivity and correlation with EGFR mutational status in human lung cancers. *Am. J. Cancer Res.*, 2015; 5: 1692-1705

[73] Zhao W., Zhao J.J., Zhang L., Xu Q.F., Zhao Y.M., Shi X.Y., Xu A.G.: Serum miR-21 level: a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015; 8: 14759-14763

[74] Zheng D., Haddadin S., Wang Y., Gu L.Q., Perry M.C., Freter C.E., Wang M.X.: Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2011; 4: 575-586

[75] Zhu W., He J., Chen D., Zhang B., Xu L., Ma H., Liu X., Zhang Y., Le H.: Expression of miR-29c, miR-93, and miR-429 as potential biomarkers for detection of early stage non-small lung cancer. *PLoS One*, 2014; 9: e87780

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.