

Hungarian Medical Journal

„A „szabad” nukleinsavak jelentősége a nem-invazív diagnosztikában--Manuscript Draft--

Manuscript Number: HMJ-D-16-00211R1

Full Title: „A „szabad” nukleinsavak jelentősége a nem-invazív diagnosztikában

Article Type: Összefoglaló közlemény

Keywords: „szabad” nukleinsavak, mRNS, mikroRNS, folyadék biopszia, diagnosztika

Corresponding Author: Bálint Nagy, Ph.D., D.Sc.

Debreceni Egyetem

Debrecen, HUNGARY

Corresponding Author Secondary

Information:

Corresponding Author's Institution: Debreceni Egyetem

Corresponding Author's Secondary

Institution:

First Author: Bálint Nagy, Ph.D., D.Sc.

First Author Secondary Information:

Order of Authors: Bálint Nagy, Ph.D., D.Sc.

Zoltán Csanádi, MD., Ph.D., D.Sc.

Róbert Póka, MD., Ph.D., D.Sc.

Order of Authors Secondary Information:

Abstract: Napjainkban nagy az érdeklődés a „szabad” nukleinsavak pontos élettani szerepének és klinikai diagnosztikai felhasználásának a meghatározására. A „szabad nukleinsavak” lehetnek DNS, mRNS, mikroRNS és hosszú nem-kódoló RNS (lnRNS) molekulák, amelyek megtalálhatók a testfolyadékokban, így pl. a szérumban, a nyálban, a könnyben. Az élettani szerepük kiderítése napjainkban is folyik, viszont egyre

jelentősebb a diagnosztikai alkalmazhatóságuk. A magzati diagnosztikában a nem-invazív módon történő mintavétel után nyert „szabad” DNS-t felhasználva több tesztet forgalomba hoztak, ezek specificitása és szenzitivitása eléri a 99,9 %-ot. A szív és keringési betegek korai diagnosztizálásában a „szabad” nukleinsavak meghatározása biztató eredményekkel szolgál. Az onkológiában a „folyadék biopsziával” kapcsolatos közlemények megjelenése a más területen dolgozó egészségügyi szakemberek és a közvélemény figyelmét is felkeltette. Folytak a mikroRNS szerepének és diagnosztikai alkalmazhatóságának a meghatározásai is. A „szabad nukleinsavak” újgenerációs szekvenálással történő felhasználására a korai diagnosztikában óriási az érdeklődés, de egyelőre nincs elég klinikai adat a lehetséges tesztek megbízhatóságáról és klinikai hasznosságáról.

Címoldal (WORD dokumentum)

„A „szabad” nukleinsavak jelentősége a nem-invazív diagnosztikában.

The importance of „free” nucleic acids in the non-invasive diagnostics.

Nagy Bálint dr., Csanádi Zoltán dr., Póka Róbert dr.

Debreceni Egyetem, Általános Orvosi Kar, Humángenetikai Tanszék, Debrecen

Debreceni Egyetem, Általános Orvosi Kar, Kardiológiai Intézet, Debrecen

Debreceni Egyetem, Általános Orvosi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet, Debrecen

Levelező szerző: Dr. Nagy Bálint

4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

E-mail: nagy.balint@med.unideb.hu

A kézirat más folyóiratban nem jelent meg és nincs elbírálás alatt sem.

A levelező szerző elolvasta az Útmutatót.

Anyagi támogatás: nincs

Szerzői munkamegosztás: a szerzők együtt szerkesztették a kéziratot. Minden szerző elolvasta és jóváhagyta a végleges változatot.

Érdekeltség: nincs

Napjainkban nagy az érdeklődés a „szabad” nukleinsavak pontos élettani szerepének, valamint klinikai diagnosztikai felhasználhatóságának a meghatározására. A „szabad nukleinsavak” lehetnek DNS, mRNS, mikroRNS és hosszú nem-kódoló RNS (lnRNS) molekulák, amelyek megtalálhatók a testfolyadékokban, így pl. a szérumban, a nyálban, a könnyben. Az élettani szerep meghatározása napjainkban is folyik, de egyre jelentősebb a diagnosztikai alkalmazhatóság. A magzati diagnosztikában a nem-invazív módon történő mintavétel után nyert „szabad” DNS-t felhasználva több tesztet már forgalomba hoztak, ezek specificitása és szenzitivitása eléri a 99,9 %-ot. A szív és keringési betegek korai diagnosztizálására is több „szabad” nukleinsav meghatározása biztató eredményekkel szolgál. Az onkológiában a „folyadék biopsziával” kapcsolatos közlemények megjelenése a más területen dolgozó egészségügyi szakemberek és a közvélemény figyelmét is felkeltette. Folynak a mikroRNS szerepének és diagnosztikai alkalmazhatóságának a meghatározásai is. A „szabad nukleinsavak” újgenerációs szekvenálással történő felhasználására a korai diagnosztikában óriási az érdeklődés, de eddig még nincs elég klinikai adat a lehetséges tesztek megbízhatóságáról és klinikai hasznosságáról.

Kulcsszavak: „szabad” nukleinsavak, DNS, mRNS, mikroRNS, folyadék biopszia, diagnosztika

## Summary

The importance of „free” nucleic acids in the diagnostics.

There is a great interest to determine the physiological role of „free” nucleic acids, and to use them in the clinical diagnostics. These could be DNA, mRNA, microRNA and long noncoding RNA molecules, they are in the body fluids, like serum, tear, saliva, etc. Their exact role in the normal and pathological physiological processes is still in the focus of the research, while their use in the diagnostics becoming more and more important. The use of „free” DNA in the non-invasive prenatal diagnosis is the first clinical application of the new generation sequencers, these methods able to reach the 99.9% specificity and sensitivity for the detection of the most common trisomies. There are promising results in their use in the diagnosis and classification of heart and cardiovascular diseases. In the oncology the possibility of the use of „liquid biopsy” called the attention not only the researchers and clinicians, but the whole general community. There is not enough data until today for the clinical utility and applicability of these methods.

Key words: „free” nucleic acids, DNA, mRNA, microRNA, liquid biopsy, diagnostics

A magyarországi halálozási statisztikában a szív és keringési betegségek 59%-os aránnyal, a tumoros megbetegedések 26%-kal vezetnek a listát. Az utóbbi időszakban folyamatosan növekszik mindkét megbetegedés száma. A tumoros megbetegedések esetében az új esetek száma a világon 2012-ben elérte a 14 milliót, a halálozások száma a 8,2 milliót. Az új betegek száma várhatóan 70%-kal fog növekedni a következő két évtizedben (WHO Cancer Reports 2014). Ezek az adatok mutatják, hogy a korai diagnosztikában és kezeléseket monitorizálása során is lépéseket kell tenni a rohamosan növekvő számú beteg populáció korszerű, hatékony ellátására. De az olyan élettani folyamat, mint a várandósság kapcsán végzett genetikai diagnosztikai eljárások is egyre több házaspárt érintenek, főként a késői gyermekvállalás kapcsán mutatózó gyakoribb genetikai betegségek kimutatása.

Erre a molekuláris genetikai eredmények klinikai alkalmazása nyújt kiváló lehetőséget. A „szabad” nukleinsavak felhasználása a diagnosztikában és a terápiában forradalmian új eljárásokat tesz lehetővé. A szérumban, vagy a plazmában fellelhető „szabad” nukleinsavak a betegtől egy egyszerű vérvétellel nyert mintából (elegánsan „folyadék biopszia”) felhasználva az új genetikai módszerek kiterjesztésével óriási jelentőséggel bír.

A naponta százával megjelenő közlemények nyomon követése még a témával foglalkozó szakemberek számára is kihívás, új fogalmak jelennek meg, régi dogmák dőlnek meg egyik pillanatról a másikra. Egyre bonyolultabbak és komplikáltabbak lesznek az élettani

működésekről kapott ismereteink. Összefoglalónkban a „szabad” nukleinsavakról és azok

felhasználásáról a klinikai gyakorlatba próbálunk betekintést nyújtani.

A „szabad” nukleinsavak

## „Szabad” DNS

A „szabad” DNS jelenlétét Mandel és Métais már 1948-ban leírta, de felfedezésük sokáig nem keltett különösebb érdeklődést [1]. Tan és mtsai az autoimmun betegségekkel már 1966ban

összefüggésbe hozták, majd később megint a tumorokkal [2, 3, 4]. Leon és mtsai a „szabad” DNS-t 1977-ben elkezdték alkalmazni a tumor diagnosztikában és a kezelés monitorizálásban, de az utóbbi évtizedig nem történt áttörés ezen a területen [5]. Ellenben Dennis Lo a magzati diagnosztikában sikeresen alkalmazta az anyai vérben 5-10%-ban jelenlévő „szabad” DNS-t a magzat nemének és RhD vércsoportjának meghatározására a

nem-invazív módon nyert mintákból már 1997-ben [6,7]. Az anyai vérkeringésben lévő magzati sejtek és a „szabad” DNS felhasználhatósága párhuzamosan kerültek vizsgálatra. Kezdetben a magzati sejtek és azok alkalmazása az amplifikációs eljárások során tűnt a biztatóbb módszernek [8]. Bianchi és munkacsoportja végzett jelentős kutatásokat ezen a területen [9]. Napjainkban a figyelem inkább a „szabad” nukleinsavakra irányul. Nagy volt az érdeklődés a magzati triszómiák kimutatására, ezeket megbízhatóan csak az újgenerációs szekvenálási módszerek (NGS) bevezetése adta meg a lehetőséget [10, 11]. Yaron számol be 2016-ban az irodalomban eddig közölt vizsgálatok számáról, 370.348 esetet gyűjtött össze tömeges paralel szekvenálással és 27.195 esetet kromoszóma specifikus szekvenálással végzett meghatározásokról [12]. Az NGS a klinikai gyakorlatba a magzati diagnosztika során már bevezetésre került, a NIPT (Non-Invasive Prenatal Testing) néven. Annak ellenére, hogy több százezer mintáról állnak rendelkezésre klinikai adatok és a módszer specificitása, szenzitivitása eléri a 99,9%-ot a 21. kromoszóma triszómiájának a kimutatására, az NIPT még nem diagnosztika, azaz a pozitív eredményeket a hagyományos invazív módon nyert (amniocentesis, méhlepény-biopszia) minták kariotipizálásával meg kell erősíteni, mert még mindig ez az „arany standard” módszer. A különböző tesztek forgalmazó cégek által megadott magas specificitás és szenzitivitás félrevezetheti még a szakembereket is, a pozitív prediktív érték (PPV) és a negatív prediktív érték (NPV) több információt szolgáltatnak. Az előbbi annak a valószínűségét fejezi ki, hogy egy pozitív szűrési teszttel rendelkező személy valóban beteg, az utóbbi pedig azt, hogy a negatív szűrési teszttel rendelkező személy nem beteg [13].

A betegek szérumában megjelenő tumor eredetű „szabad” DNS rendkívüli lehetőséget biztosít a tumor specifikus mutációk és egyéb genetikai eltérések kimutatására és a kezelés nyomon követésére. DNS metilációs eltéréseket és vírus eredetű nukleinsavakat is ki lehet mutatni különböző tumorokban [14, 15]. Napjainkban különböző PCR alapú módszereket



alkalmaznak a microszatelliták és a jellemző mutációk detektálására [16, 17]. Ezeknél érzékenyebb és pontosabb meghatározásokat biztosít a tömeges parallel (MPS) szevenálás új biomarkerek kimutatásának a lehetőségével, de a teljes genom is lefedhető [18, 19].

„Szabad” mRNS

Az emberi genomban kb. 25.000 gén található, amelyek ha aktívak, bekapcsolt állapotba kerülnek, mRNS íródik át róluk. A különböző szövetek egyedi mRNS profillal rendelkeznek, ezek a szérumba is kikerülnek, ahonnan kimutatható a jelenlétük. Várandóság során placenta

specifikus markerek mutatkoznak, amelyek alkalmasak lehetnek a diagnosztikában. Az egyik ilyen lehetőség az egynukleotidos polimorfizmus (single nucleotide polymorphism, SNP) felhasználása, az egyes allélok aránya mutatja, hogy hány kópiában van jelen az adott allél,

1:1 arány diallélikus, 1:2, vagy 2:1 arány triszómiás magzatot jelez [20, 21, 22].

A keringésbe kerülő mRNS meglepő módon stabil, és kimutatható a szérumból, vagy plazmából, annak ellenére, hogy magas az RNáz aktivitás. Ezt az exoszómákba és mikrovezikulomokba való csomagolással éri el a szervezet [23].

### „Szabad” mikroRNS

A mikroRNS-ek a nem-kódoló RNS molekulák csoportjába tartozó 19-25 bázispár hosszú molekulák, amelyek hosszabb 70-100 nukleotidból álló prekurzorokból keletkeznek. Jelentős részük a kromoszómák törékeny részén kódolódik, amely régióknak jelentős szerepe van a DNS amplifikációkban, deléciókban és transzlokációkban a tumorok fejlődése során.

A mikroRNS felfedezése az RNS interferencia leírásával kezdődött 1990-ben petúniáknál. Később Fire és Mello elvégezte az első kísérleteiket *C. elegans*-nál és leírták a kis interferáló RNS-t 1998-ban, amiért nyolc évvel később Nobel díjjal tüntették ki őket [24, 25]. Csak jóval később 2010-ben derült ki, hogy a szöveteken kívül a mikroRNS jelen van a különböző testfolyadékokban is, így a vérben, székletben, nyálban, tejben [26]. A mikroRNS keletkezhet passzívan nekrosis és fertőzések következtében, vagy aktív módon az extracelluláris részecskék és makromolekula komplexekben (Ago, LDL, HDL) történő kiválasztással [27].

Az egyes betegségekben mért mikroRNS koncentrációk sokszor ellentétesek, ennek az oka a standardizált kimutatási módszerek hiánya [28].

## Klinikai alkalmazhatóság

### A „szabad” nukleinsavak mérete

A legegyszerűbb eljárásnak a szérumból, vagy a plazmából izolált szabad nukleinsavak méret meghatározása tűnt, de ezzel kapcsolatban sok ellentmondó közlemény jelent meg, amely félreértésre adott okot. Ezek az ellentmondások főként technikai okokra vezethetők vissza, a módszerek fejlődése, az eljárások standardizálása segített a régebbi megfigyelések megmagyarázására. A szérumban, vagy plazmában sokféle „szabad” nukleinsav található, ezeket az alábbiakban összegezzük.

## Magzati „szabad” DNS

Az anyáktól nem-invazív módon levett mintákból már a kezdeti munkák kimutatták, hogy a magzati „szabad” DNS rövidebb az anyainál, ez a különbség első rátekintésre elég nagynak tűnt (> 200 bp, vs. > 1000 bp), de nem volt alkalmazható a klinikai diagnosztikában [29]. Gélelektroforézist,

majd ezt követően a kvantitatív PCR-t használták a méretek meghatározására,

sok ellentmondással tarkítva [30]. A pontosabb méret meghatározást csak a tömeges parallel szekvenálás (MPS) tette lehetővé, ami alapján meghatározták, hogy az anyai plazmából izolált DNS-ből egy 166 bp és egy 143 bp nagyságú lényeges fragmentum mutatható ki, de ezek után vannak kisebb csúcsok is 10 bp különbségekkel [31]. Ezek alapján azt feltételezik, hogy az

anyai eredetű fragmentum esetén létezik egy becsomagolt nukleoszóma egység (146 bp) és

egy kapcsoló fragment régió (20 bp), magzati DNS-nél ez a kapcsoló fragment hiányzik. A 10 bp különbséggel mutatkozó kisebb fragmentumok azon dinukleotid ismétlődő egységekből eredhetnek, amelyek a hisztonokkal vannak kapcsolatban [32].

## Tumor eredetű „szabad” DNS

Ellentmondóak az adatok a tumor eredetű DNS fragmentumok méretével kapcsolatban is, a tumor típusától függően különböző méretűnek határozták meg. A kezdeti kvantitatív PCR-on alapuló tanulmányok azt sugallták, ezek hosszabbak, később viszont rövidebbnek találták őket [33, 34]. A tömeges parallel szekvenálás lehetőséget biztosított ezen ellentmondás feloldására, Jiang és mtsai tanulmányozták a fragmentumok méretét hepatoceluláris karcinómában [35].

Ezeknél a betegeknél is a várandós nők szérumában kimutatott 166 bp nagyságú csúcs volt a

legnagyobb mértékben megjelenő a szérumból izolált DNS-ben, ami az apoptózissal történő keletkezésre utal. A fragmentumok méret profilja viszont azt mutatja, hogy a kisebbek tartalmazzák a tumorra specifikus kópiaszám veszteségeket és felszaporodásokat (CNA, copy number gains). A hosszabb fragmentumok megjelenése, amelyek kisebb mértékben mutathatók ki, a nekrozissal hozhatók összefüggésbe, ezek viszont nem tartalmazzák a tumorról kapcsolatos kópiaszám eltéréseket [35]. Ez a megfigyelés arra hívta fel a figyelmet, hogy a kisebb frakcióra kell koncentrálni, és a kezelés folyamatát is az ebben a mérettartományban megfigyelhető változások alapján lehet jól monitorizálni.

### Mitokondriális DNS

A sejtmag eredetű DNS-el ellentétben a mitokondriális DNS vizsgálata során nem a nukleoszómákra jellemző 166 bp nagyságú fragmentum a jellemző, hanem a rövidebbek. Ez azzal magyarázható, hogy nincsenek hisztonok a mitokondriális DNS-en, amelyek védelmet

biztosítanak az enzimatis leontással szemben. Ez a DNS fajta a koncentrációja tumoros betegek estében lényegesen magasabbnak bizonyult [35].

## miRNS

A mikroRNS mérete 19-25 bp között változik, a gén regulációban van fontos szerepük. Az utóbbi időben kerültek a tanulmányok központjába.

## Hosszú nem-kodoló RNS

A hosszú nem-kodoló RNS (long non-coding RNA, LncRNA) 200 bp-nál hosszabb fehérjét nem kódoló nukleinsav molekulák, a gének közötti és az intronok közötti régiókban, vagy az adott gén szensz és antiszensz száláról íródnak át [36, 37]. A sejten belül a nukleuszban és a kromatinban helyezkednek el, de a szérumba is kikerülnek. Az élettani szerepük az átírás utáni szabályozásban, valamint a telomer replikációjában, RNS interferenciában van [38].

## A diagnosztikai felhasználás jelenlegi állása

### Magzati diagnosztika

A jelenlegi magzati diagnosztika Magyarországon főként az államilag finanszírozott invazív mintavételek (méhlepény, magzatvíz) során nyert minták kariotipizálásán alapul. Ez az elfogadott, „arany” standard módszer. Az utóbbi években a nem-invazív módon nyert mintákból, tehát anyai vérből izolált DNS felhasználásával az újgenerációs szekvenáláson alapuló módszerek felhasználásával is történik a leggyakoribb triszómiák kimutatása. A várandósok azonban saját maguk fizetik ki az árát ennek a vizsgálatnak az erre szakosodott magánvállalkozásoknak. A módszerrel kapott pozitív eredményeket minden esetben a

hagyományos módszerrel meg kell erősíteni.

Az anyai plazmából nyert „szabad” DNS amely az anyainak 5-10%-a tömeges parallel szekvenáláson alapuló módszerrel 99,9%-os biztonsággal ki tudja mutatni a Down szindrómát, de a 18-as és a 13-as kromoszóma triszómiáját is hasonló pontossággal. A téves pozitív eredmények 0,5% alatt vannak [39, 40]. A legutóbbi eredmények alapján a módszer már alkalmas a magzati RhD vércsoport, a gén mutációk, a nemi kromoszóma rendellenességek, mikrodélációk, mikroduplikációk és egyéb kromoszóma eltérések kimutatására is [41, 42]. A Magyar Humángenetikai Társaság állásfoglalását már 2014-ben megfogalmazta az eljárással kapcsolatban, a többi nemzetközi genetikai társasághoz hasonlóan. Jelenleg teszt-ként és nem diagnosztikai módszerként javasolja a vizsgálat eredményének az elfogadását. A módszerről történő tájékoztatás és az eredmény kiadása

genetikai tanácsadáson keresztül kell, hogy történjen. A módszer előnyei kétség kívül, hogy nem-invazív mintavételen alapul, csökkenti az invazív beavatkozások számát, nagyon gyors, egy héten belül elkészül az eredmény. Alkalmos a családon belül lévő mutációk kimutatására is. Lehetséges olyan minor kromoszóma rendellenességek kimutatása, amelyek hagyományos kariotipizálással nem lehetségesek. Arra azonban fel kell hívni a figyelmet, hogy a különböző cégek által forgalmazott NIPT termékek nem egyformák, különböző a kimutatási alapjuk és nem egyformák a kimutatási lehetőségeik.

Szív és keringési betegségek

miRNS

Az akut miokardiális infarktus (AMI) diagnosztikában a troponin meghatározás terjedt el. Újabb vizsgálatok szerint legalább 20 mikroRNS szintje mutat összefüggést az AMI-val és ezekből legalább 9 a troponin szintekkel [43]. A miR-1, miR-133, miR-208 és a miR499 a legjobban tanulmányozott molekulák koszorúér betegségekben és akut miokardiális infarktusban [44, 45]. A sérült miokardiumból kiáramló mikroRNS-ek mellett az akut esemény után emelkedett szintet mutató miRNS-ek részben extracardiális eredetűek mint pl. a miR-30c, miR-145, amelyek ugyanakkor összefüggést mutattak az infarktus méretével. Emellett találtak 20 olyan mikroRNS-t, amelyek nagyfokú specificitással és szenzitivitással előrejelzik a MI-t [46]. Több tanulmány a miR-208 és miR-499 szintjeit vizsgálta, használhatóságukat a klinikai rutinban nagyobb beteg számon alapuló elemzések alapján lehet megítélni [47, 48].

A szívelégtelenség (SzE) laboratóriumi diagnosztikájában jelenleg a legtöbb segítséget és információt az N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) szint meghatározása jelenti. A szívelégtelenségen belüli két entitás, a megtartott bal kamrai



ejekciós frakcióval (EF) járó SZE (heart failure with preserved EF: HFpef) és a csökkent EFval

járó (heart failure with reduced EF: HFref) elkülönítése képalkotó eljárások nélkül

nehézséget jelent, mivel e két SZE entitás klinikai tünetei hasonlóak és az NT-proBNP szint alapján sem lehet differenciálni a kettő között. A miRNS-ek diagnosztikus használhatóságáról

HEFpef és HEF ref valamint nem szívelégtelen beteg kohorszokban a közelmúltban számoltak

be [49]. Öt miRNS-t találtak, amelyek potenciálisan használhatónak tűntek mind a nem szívelégtelen versus SZE-ben szenvedő betegek, mind a HEFpef és HEF ref entitások

elkülönítésében: miRNS-30c, -146a, -221, -328 és -375. Az öt miRNS közül bármelyik kettő

az NT-proBNP-vel együtt szignifikánsan javította a diagnosztikus model pontosságát a csak BNP meghatározáshoz képest.

A szív reszinkronizációs pacemaker terápia bevezetése a szívelégtelen betegek kezelésében az egyik legfontosabb előrelépést jelentette az utóbbi 20 évben. Az optimális betegkiválasztás számos szempontját sikerült azonosítani, köztük olyan pozitív válasz prediktorokat, mint a típusos bal Tawara-szárblock mintázat, a minél szélesebb (>150 msec) QRS szélesség, a nem iszkémiás szívelégtelenség etiológia és a női nem [50]. Igazolódott, hogy a szívelégtelen betegek prognózisának felmérésére kifejlesztett Seattle Heart Failure Model a reszinkronizált betegeken is használható [51]. Mindezek ellenére, az ajánlásoknak megfelelő betegkiválasztás mellett sem alakul ki a várt terápiás hatás a betegek mintegy 20-40 %-ban. Szükség van tehát további prediktív markerek azonosítására, amelyek használatával ez a szám lejjebb szorítható.

Egy közelmúltban megjelent tanulmány a miRNS-ek használhatóságát vizsgálta a reszinkronizáció hatásának előrejelzésében [52]. Első lépésben 6-6 CRT kezelés után reszponder és non-reszponder betegen elemezték 766 különböző miRNS plazma szintjének összefüggését a terápiás válasszal. Négy olyan miRNS-t (miR-409-3p, miR-30d, miR-99b, és miR-766) találtak, amely korrelált a reszponderitással. Ezt a 4 miRNS-t a továbbiakban prospektíven vizsgálták további 40 betegen, akiket legalább 6 hónapig követték a reszinkronizáció hatásának felmérésére valamint egészséges (nem szívelégtelen) kontrol egyéneknél. A reszponderitás kritériuma a kiinduláshoz képest legalább 10%-os bal kamrai ejekciós frakció növekedés volt. Több változós lineáris statisztikai modellezéssel végül a reszponderitás legjobb prediktorának a terápia előtt emelkedett miR-30d plazma szintet találtak. Reszponder betegeken az miR-30d plazma szintje 6 hónappal a reszinkronizációs kezelés után csökkent, míg a terápia-refrakter esetekben szignifikánsan nem változott. További fontos megfigyelés volt, hogy az miR-30d plazma koncentrációja a sinus

coronariusban 18-szoros volt a perifériás mintához képest, ami a szívizom sejtekből történő felszabadulásra utal, feltételezések szerint a mechanikai stressznek kitett területről. A miRd30 magas kiindulási értéke eszerint a súlyos aszinkronia jele, csökkenése pedig a sikeres reszinkronizációs hatásra, következményesen a miokardium stressz megszűnésére utal.

A pitvarfibrilláció (PF) a teljes népességen belüli 1-2%-os előfordulásával szintén korunk egyik kardiovaszkuláris pandemiája. A betegséghez társuló magas morbiditás, mortalitás és az egészségi ellátó rendszerre rótt terhek indokolják azokat a nagyon jelentős

erőfeszítéseket, amelyeket alapkutatók és klinikusok a mechanizmus megértése, a mielőbbi felismerés és hatékonyabb gyógyítás, a szövődmények megelőzése érdekében tesznek. Ez utóbbiak közül a legsúlyosabb következmény a PF-hoz társuló stroke, ami megfelelő alvadásgátló kezeléssel többnyire megelőzhető lenne. Ezért is jelent különösen nagy problémát, hogy az esetek pontosan nem ismert, de bizonyosan jelentékeny hányadában a PF tünetmentessége miatt észrevétlen (néma) marad, és az első tünet a következményes stroke.

Ez különösen igaz a ritmuszavar paroxizmális formáira, hiszen ilyenkor még az ekg vizsgálat

is megtévesztő (negatív) eredményt adhat, ha éppen nem zajló PF alatt készül. Bármely, egyszerű vérvizsgálattal kimutatható eltérés, ami PF előfordulására utal éppen ezért fontos segítséget jelentene azoknak a kiválasztásában, akiknél fokozott erőfeszítés, tartós monitorozási technikák (Holter vizsgálatok, transztelefonos ekg, implantálható aritmia monitor) használata indokolt a PF dokumentálására. Lu és mtsai [53] aritmia-mentes, paroxizmális és perzisztens pitvarfibrilláló betegeken végzett miRNS vizsgálatok során az miRNS-150 szintjét PF-ban jelentősen alacsonyabbnak mérték, paroxizmális csoportban 1/17nek,

a perzisztáló betegek között 1/20-nak a kontrolokhoz képest, és fordított arányban korreláltak a CRP értékekkel. Egy másik vizsgálat [54], amellyel, hogy megerősítette a miRNS-150-nel kapcsolatban leírtakat, szintén csökkent expressziót muttott ki a miRNS-21

vonatkozásában. A PF miatt végzett katéterablációt követően mindkét miRNS szintje a

kiindulási érték háromszorosára emelkedett.

lncRNS

A hosszú nem-kódoló RNS alkalmazásának az egyik érdekes lehetősége a szív és keringési betegségek. Számos közlemény mutatta ki az elmúlt években, hogy a lncRNS fontos szerepet tölt be a szív fejlődésében. Ilyen pl. a Braveheart (Bvht), amely felül expresszált a szívben, de nem kódol fehérjét., de hatással van a MESP1-re, amely fontos differenciálódási faktor, embrionális őssejtekből szívizomsejteket képez [55]. Másik hasonló molekula a Fendrr, amely az átírási hálózathoz szükséges, a hiszton módosító komplexekkel lép kapcsolatba, deléciója kamrai elváltozásokat okoz [56]. Legújabbban három lncRNS-t írtak le az embrionális őssejtekből az endothel sejtek fejlődését segítik elő, ezek a TERMINATOR, ALIEN és PUNISHER [57]. De más kardiovaszkuláris betegség modellezésekor megtalálták e molekulák szerepét [58]. Például a CARL, amely szív-apoptózissal hozható összefüggésbe, kapcsolódik a miR-539-hez, amely gátolja annak hatását a mitokondrium hasadásra, hasonló hatású az lncRNS MDRL, amely a miR-361-et alul szabályozza [36, 59, 60].

## Tumor diagnosztika

A tumorok diagnosztikája bonyolultabb és kevés adat áll rendelkezésre a „folyadék biopsziával” nyert minták feldolgozása során nyert eredményekről és klinikai tapasztalatokról. Az NIPT-vel elért 99,9%-os specificitástól és szenzitivitástól még nagyon messze vagyunk a tumor diagnosztika területén. A hagyományos invazív eljárással nyert tumorok szövettani és molekuláris diagnosztikai vizsgálata a standard elfogadott diagnosztikai eljárás napjainkban. Ez lehetőséget nyújt olyan genotipizálások elvégzésére is, amelyek segítik a célzott terápia kiválasztását. Az elmúlt években a „folyadék biopszia” nagy reményeket nyújt a keringő tumor-DNS (ctDNS) molekulák felhasználásával a korai tumor diagnosztika és a terápia felállításához. Ezek a nukleinsavak az apoptotizáló tumor sejtekből és a keringő tumor sejtekből származnak.

A ctDNS a tumor sejtekből jut a vérbe és az eredeti tumor mutációit tartalmazza. Az újgenerációs szekvenálók kifejlesztésével napjainkban lehetőség nyílik a genetikai eltérések specifikus és érzékeny kimutatására, a nem-inazív módon vett mintákból. Ez a jelenlegi tumor diagnosztikát jelentősen segítheti, lehetőséget nyújthat a tumor korai kimutatására, a prognózis és a kezelés meghatározására. Lehetőséget ad a személyre szabott gyógyítás bevezetésére.

A tumorok genotipizálása nagyon fontossá vált a kezelések során, főként az immunoterápia alkalmazásakor. A klinikai gyakorlatban a genotipizálás szöveti biopsziákból történik, ez a minta azonban nem alkalmas a tumor heterogenitásának és állandó változásainak valósidejű monitorizálására, erre jobban megfelel a vérből izolált ctDNS. Számos tanulmány bizonyította, hogy a ctDNS gyorsan képes előjelezni a terápia kimenetelét és fontos információt nyújt a klinikusnak a következő kezelések megtervezéséhez.

Súlyos probléma a terápia rezisztencia kialakulása, amely a kezelések sikertelenségének a legfőbb oka. A legújabb eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy a folyadék biopsziával nyert minták felhasználásával a tumor rezisztencia jóval korábban már jelezhető.

A folyadék biopsziával nyert mintákból izolált ctDNA lehetőséget nyújthat a jövőben a

tumorok korai diagnosztizálásához és a genotipizálások eredményeinek felhasználásával a kezelések hatékonyabbá tételéhez, a kezelés hatékonyságának a monitorizálásához, a személyre szabott terápia bevezetéséhez.

A módszer elterjedéséhez és elfogadtatásához szükséges a ctDNS keletkezésének, a sejtekből történő kibocsátás és véráramba kerülés biológiájának a jobb és pontosabb megismerésére. Napjainkban még kevés adat áll rendelkezésre a klinikai és analitikai validitásról, továbbá a klinikai hasznosságról.

### Patogenezis és diagnosztika

A humán genom 76%-a fehérjét nem kódoló, 200 bázispárt meghaladó méretű RNS szakaszokban íródik át (long non-coding RNS; lncRNS) [60]. 2003-ban Rangel és mtsai írtak le első ízben egy petefészekrákra specifikus (human ovarian cancer specific transcript-2, HOST-2), a 10-es kromoszómához köthető 2,9 kb méretű RNS-t, mely nem rendelkezik olvasási kerettel és fehérjét sem kódol [61]. A HOST-2 expresszió gátlása a petefészekrákból izolált OVCAR-3 sejtvonal migrációját, proliferációját és invázióját egyaránt gátolta. Ennek a mechanizmusa máig sem tisztázott, de egy közelmúltbeli vizsgálat szerint a HOST-2 molekuláris szivacsaként köti a let-7b miRNS-t, s ezáltal gátolja annak működését. A let-7b miRNS-ről már korábban ismert volt, hogy a HMGA2, c-myc, Dicer és Imp3 onkogének expresszióját gátolja, így let-7b szintjének csökkenése fokozza azok expresszióját [62]. A fehérjét nem kódoló RNS-ek a templátként szolgáló DNS elhelyezkedése szerint nem csak intronokban, hanem exonokban és akár ezek antiszensz szálán is képződhetnek. Ennek egyik példája a HOX transzkripciós antiszensz RNS (HOTAIR). A 6232 bp méretű lncRNS 12-es kromoszóma q13.13 szakaszán képződik. A HOX géncsalád C tagjának transzkriptumaként a H3 hiszton metilációját idézi elő, s ezáltal a 2-es kromoszómán elhelyezkedő HOXD gén epigenetikus blokkolását eredményezi [63]. Epitheliális petefészekrákban a HOTAIR expressziója jelentősen emelkedett és a tumor progresszióban kifejtett hatása az apoptózisban szerepet játszó gének (cyclin E, BCL-2, caspase-9, caspase-3 és BRCA1) szabályozásán keresztül érvényesül. Egy sor további lncRNS-ről igazolódott, hogy különböző jelátviteli



utakon keresztül vesznek részt a petefészekrákos sejtek proliferációjának, migrációjának, inváziójának, áttétképzésének és kemoterápiával szembeni érzékenységének szabályozásában [60].

Szemben a hosszú nem kódoló RNS-ekkel, a mikroRNS-ek mindössze 19-25 bázispárból állnak, intronokról íródnak át és hatásukat közvetlenül target DNS-en vagy RNS-en fejtik ki. Dahiya és mtsai 2008-as tanulmányában 56 különböző miRNS szerepét igazolta a petefészekrák patogenezisében, s közülük 16 mutatott átfedést más tanulmányokban már feltételezett jelentőségükkel. A 16 miRNS közül 9-nél a kontrollhoz képest csökkent

expresszió (let-7d, miR-106b, miR-122a, miR-141, miR-183, miR-195, miR-200a, miR-335, mir424), 7-nél pedig megnövekedett expresszió (miR-100, miR-199a, miR-296, miR-29a, miR-29c, miR-99a, mir-494) volt jellemző [64]. A let-7 miRNS család olyan konzekvens változásai jellemzőek petefészekrákban, melyek szuppresszor funkcióra utalnak [58]. Bár a miR-21 túlexpresszióját számos daganattípusban kimutatták, petefészekrákban ez a típus bizonyult a legkifejezettebben alul reguláltnak. Nem meglepő, hogy a miR-21 az apoptózissal és a csökkent sejtproliferációval asszociált miRNS marker. A miR-221 és miR-222 a CDKN1C expresszió befolyásolása révén játszik szerepet a petefészekrák patogenezisében [65]. Klinikai vizsgálatok szerint a kettő aránya szignifikáns korrelációt mutat a túléléssel. A 3,7 alatti expressziós arányú esetek median túlélése 35 hónap alatti, míg a 3,7 fölötti expressziós arányú esetek median túlélése 35 hónap fölötti volt. A miR152 expressziója petefészekrákos sejtekben lényegesen alacsonyabb, mint a normál sejtekben. A miR-122-t korábban már tumor szuppresszorként jellemezték, ami emlőrákban a IGF1F-et célozva szabályozza a PI3K/Akt/mTOR/p70S6K jelátviteli útvonal működését. Langhe és mtsai tanulmánya petefészekrákban is hasonló funkciót igazolt a miR-122 szintjei alapján [65].

### Prognosztika és onkoterápia

A miR-152 magas expressziója petefészekrákban a cisplatinnal szembeni érzékenységgel jó korrelációt mutat [65]. Ennek a felismerésnek a jelentőségét az okozza, hogy bár a többnyire előrehaladott stádiumban felismert petefészekrák gyógyulási eredményeiben gyökeres változást hozott a műtéti technológia és az első vonalbeli platina-taxán kombinációs terápia, a betegek túlélését ma már jelentős részben a platinarezisztencia kialakulása korlátozza. A petefészekrák gyógyulási eredményeinek javításában prioritást élvez a platinarezisztens folyamatok ellen irányuló hatékony modalitások kifejlesztése. Számos új kemoterápiás,

immunterápiás és célzott biológiai kezelési módszer kifejlesztése van folyamatban, de a

platinaérzékenység előre jelzése továbbra sem megoldott. A tumormarker és képalkotó

vizsgálatok csak egy-két hónap vagy néhány hónap elteltével képesek a platinarezisztencia kialakulásának igazolására. A miR-93 magas szintje szintén platinarezisztenciával hozható összefüggésbe. A miR-214 a miR-93-mal azonos útvonalon hat [66, 67]. Yu és mtsai (2014) kimutatták, hogy a miR-29(a/b/c) csökkent expressziója cisplatinrezisztenciát jelez, és kísérletes körülmények között miR-29 knock-out alkalmazásával a platinaérzékenység

visszaállítható [68]. A szekvencia analízis technológiai fejlődése a teljes humán genom feltérképezésével 2001-ben megnyitotta az utat a széles palettával végzett genom-asszociációs klinikai vizsgálatok előtt [69]. 2010-re már több száz olyan közlemény jelent meg amelyek 70-50-30 génre tudták szűkíteni azokat a mintázatokat, amelyek egyes daganattípusokra vonatkozó fogékonyságot, egyes altípusok jelenlétét vagy kedvező és kedvezőtlen prognózis előrejelzésében alkalmazhatónak bizonyultak. Petefészekrákkal kapcsolatban több száz beteg klinikai és egyenként mintegy 1000 különböző miRNS expressziójára vonatkozó adataiból robusztus számítástechnikai elemzéssel sikerült egy 35 egyedi miRNS-re vonatkozó

mintázatot kialakítani, melyből egyszerű algoritmussal klinikailag releváns prognosztikai

index határozható meg [70]. Az algoritmust egy szintén több száz klinikai esetet tartalmazó adatbázison validálva a szerzők meggyőzően igazolták az alacsony és magas rizikójú ( $HR > 3$ ) esetek elkülönítésének lehetőségét a miRNS mintázat alapján.

## Irodalom

- [1] Mandel, P., Metais, P.: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C. R. Seances Soc. Biol. Fil., 1948, 142, 241-243.
- [2] Tan, E.M., Schur, R.J., Carr, R.I., és mtsai: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 1966, 45, 1732-1740.
- [3] Rumore, P.M., Steinman, C.R.: Endogeneous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. J. Clin. Invest., 1990, 86, 69-74.
- [4] Stroun M, Anker P, Lyautey J, és mtsai.: Isolation and characterisation of DNA from the plasma of cancer patients. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 1987, 23, 707-712.
- [5] Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., és mtsa: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res., 1977, 37, 646-650.
- [6] Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., és mtsai: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet, 1997, 350: 485-487.
- [7] Lo, Y.M., Bowell, P.J., Selinger, M., és mtsai: Prenatal determination of fetal rhesus D status by DNA amplification of peripheral blood of rhesus-negative mothers. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1994, 731, 229-236.
- [8] Bianchi, D.W., Flint, A.F., Pizzimenti, M.F., és mtsai: Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1990, 87, 3279-3283.
- [9] Bianchi, D.W., Klinger, K.W., Vadnais, T.J., és mtsai: Development of model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. Prenat. Diagn., 1996, 16, 289-298.
- [10] Palomaki, G.E., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., és mtsai: DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. Genet.

Med., 2011, 13, 913-920.

[11] Chiu, R.W.K., Chan, KC, Gao, Y, és mtsai: Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by massive parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2008, 105, 20458-20463.

[12] Yaron, Y.: The implications of non-invasive prenatal testing failures: review of an underdiscussed phenomenon. Prenat. Diagn., 2016, 36, 391-396.

[13] Morai, S, Grene, F.M., Mello, M.M.: A new era in non-invasive prenatal testing. The New Eng. J. Medicine, 2013, 369, 499-501.

- [14] Begun, S., Brait, M, Dasgupta, S., és mtsai.: An epigenetic marker panel for detection of lung cancer using cell-free serum DNA. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17, 4494-4503.
- [15] Lo, Y. M. D., Chan, L. Y. S., Lo, K. W., és mtsai.: Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 199, 59, 1188-1191.
- [16] Newroz, H., Koch, W., Anker, P., és mtsai.: Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat. Med.*, 1996, 2, 1035-1037.
- [17] Yung, T. K., Chan, K. C. A., Mok, T. K., és mtsai.: Single molecule detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma by microfluidics digital PCR in nonsmall cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15, 2076-2084.
- [18] Leary, R. J., Kinde, I., Diehl, F., és mtsai.: Development of personalized tumor biomarker using massive parallel sequencing. *Sci. Transl. Med.* 2010, 2, 14-20.
- [19] McBride, D. J., Orpana, A. K., Sotiriou, C., és mtsai.: Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49, 1062-1069.
- [20] Tsui, N.B., Wong, B.C., Leung, T.Y., és mtsai: Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat. Diagn.* 2009, 29, 1731-1037.
- [21] Go, A.T., van Vugt, J.M., Oudejans, C.B., és mtsai: Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum. Reprod. Update.* 2011, 17, 218-223.
- [22] Lo, Y.M., Tsui, N.B., Chiu, R.W., és mtsai: Plasma placental ratio permits non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat. Med.* 2007, 13, 218-223.
- [23] Orozco, A. F, Lewis, D. E.: Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry A.* 2010, 77, 502-514.
- [24] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene

into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell*. 1990, 2, 279-289.

[25] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., és mtsai.: Potent and specific genetic interference by

double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998, 391, 806-811.

[26] Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., és mtsai.: The microRNA spectrum of 12 body fluids. *Methods*, 2010, 1741, 1733-1741.

[27] Nagy, Z., Igaz, P.: Introduction to microRNAa: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy –

The concept of Circulating



microRNAs. In: *Circulating microRNAs in Disease and their Potential Biological Relevance*. Ed. Igaz, P., Springer, Basel, 2015, 4-30.

[28] Kosaka, N., Iguchi, H., Ochiya, T.: Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.*, 2010, 101, 2087-2092.

[29] Chan, K.C., Zhang, J., Hui, A.B., és mtsai.: Size distribution of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 88-92.

[30] Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C., és mtsai.: Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 1002-1011.

[31] Lo, Y.M., Chan, K. C., Sun, H., és mtsai.: Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci. Transl. Med.*, 2010, 2, 61ra91

[32] Mouliere F., Robert B, Arnau Peyrotte E, és mtsai.: High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One.*, 2011, 6, e23418.

[33] Elinger, J., Wittkamp, V., Albers, P., és mtsai.: Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J. Urol.*, 2009, 181, 363-371.

[34] Chandrananda, D., Thorne, P. N., Bahlo, M.: High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA. *BMC Med. Genomics*, 2015, 8, 29.

[35] Jiang, P., Chan, M.W.C., és mtsai.: Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2015, 112, E1317-E1325.

[36] Boon, A.R., Jaé, N., Holdt, L., és mtsa.: Long non-coding RNAs. From clinical genetics to therapeutic target? *J. Amer. Coll. Cardiol.*, 2016, 87, 1214-1226.

[37] Ma, L., Bajic, B.V., Zhang, Z.: On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 2013, 10, 24-933.

[38] des Andres-Pablo, A., Morillon, A., Wery, M.: LncRNAs, lost in translation or licence to regulate? *Curr. Genet.*, DOI 10.1007/s00294-016-0615-1.

[39] Bianchi, D.W., Platt, L.D., Goldberg, J.D., és mtsai.: Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.*, 2012, 119, 890-901.

[40] Norton, M.E., Brar, H., Weiss, J., és mtsai.: Non-invasive chromosomal evaluation (NICE) study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 2012, 207, 137 e1-e8.

[41] Lench, N., Barrett, A., Fielding, S. és mtsai.: The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders: challenges and progress made. *Prenat. Diagn.*, 2013, 33, 555-562.

- [42] Zhao, C., Tynan, J., Ehrich, M., és mtsai.: Detection of subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clin. Chem.*, 2015, 61, 608616.
- [43] Sayed, M.S.A., Xia, K., Yang, T-L., és mtsa.: Circulating microRNAs: A potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Disease Markers*, 2013, 35, 561-566.
- [44] Devaux, Z., Selemon, H., Goretti, E., és mtsai.: Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 2012, 58, 559-567.
- [45] D'Alessandra, Z., Devanna, P., Limana, F., és mtsai.: Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur. Heart J.*, 2010, 31, 2765-2773.
- [46] Meder, B., Keller, A., Vogel, B., és mtsai.: Micro RNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.*, 2011, 106, 1323.
- [47] Wang, K.G., Zhu, Q.J., Thang, T., és mtsai.: Circulating miRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.*, 2010, 31, 659-666.
- [48] Devaux, Y., Vaosurt, M., Goretti, E., és mtsai.: Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 2012, 58, 559-567.
- [49] Wattson, C.J., Gupta, S.K., O'Connell, E.O., és mtsai.: MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur. J. Hear Fail.*, 2015, 17: 405-415.
- [50] Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., és mtsai.: 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 2016; DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>
- [51] Clemens, M., Szegedi, Z., Kardos, L., és mtsai.: The Seattle Heart Failure Model Predicts Survival in Patients With Cardiac Resynchronization Therapy: A Validation Study. *J. Cardiac. Fail.*, 2012, 18: 682-687.
- [52] Melman, Y.F., Shah, R., Danielson, K., és mtsai.: Circulating microRNA-30d is

associated with response to cardiac resynchronization therapy in heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis: A translational pilot study. *Circulation* 2015, 131: 2202-2216.

[53] Lu, Z., Zhou, C., Liu, Y., és mtsai: The Expression Levels of Plasma microRNAs in Atrial Fibrillation Patients. *Plos One*, 2012, 7, e44906

[54] McManus, D.D., Lin, H., Tanriverdi, K., és mtsai: Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: data from the Framingham Offspring Study.

*Heart Rhythm*. 2014, 11, 663–669.

[55] Klattenhoff, C.A., Scheuermann, J.C., Surface, L.E., és mtsai.: Braveheart, a long noncoding

RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 2013, 152, 570-583.

- [56] Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., és mtsai.: The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in mouse. *Dev. Cell.*, 2013, 24, 206214.
- [57] Kurian, L, Aguirre, A, Sancho-Martinez, I, és mtsai.: Identification of novel long noncoding RNAs underlying vertebrate cardiovascular development. *Circulation*, 2015, 131, 1278-1290.
- [58] Uchida, S., Dimmeler, S.: Long non-coding RNAs in cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 2015, 116, 737-750.
- [59] Wang, K., Sun, T., Li, N., és mtsai.: MDRL lncRNA regulates the processing of miR-484 primary transcript by targeting miR-361. *PLoS Genet.*, 2014, 10:e1004467.
- [60] Zhong Y, Gao D, He S és mtsai: Dysregulated expression of long non-coding RNA sin ovarian cancer. *Int.J.Gynecol.Cancer* Published ahead of print. August, 2016. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000828
- [61] Rangel LB, Sherman-Baust CA, Wernyj RP és mtsai: Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene*, 2003, 22, 7225-7232.
- [62] Gao Y, Meng H, Liu S, és mtsai: LncRNA-HOST2 regulates cell biological behaviors in epithelial ovarian cancer through a mechanism involving microRNA let-7b. *Hum. Mol. Genet.*, 2015, 24, 841-852.
- [63] Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A és mtsai: The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol.*, 2005, 205,154-171.
- [64] Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang T-L és mtsai: MicroRNA Expression and Identification of Putative miRNA Targets in Ovarian Cancer. *PLoS ONE.*, 2008, 3. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002436>
- [65] Langhe R, Norris L, Saadeh FA és mtsai: A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease. *The cancer letters.*, 2014, 356, 628-636. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383514005989>

[66] Katz B, Tropé CG, Reich R és mtsa: MicroRNAs in Ovarian Cancer. *Human Pathology*, 2015, 46, 1245-1256. [http://www.humanpathol.com/article/S0046-8177\(15\)00218-X/abstract](http://www.humanpathol.com/article/S0046-8177(15)00218-X/abstract)

[67] Fu X, Tian J, Zhang L és mtsai: Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS letters*, 2012, 586: 1279-1286.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.febslet.2012.03.006/abstract>

[68] Yu P-N, Yan M-D, Lai H-C és mtsai: Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 2014, 134: 542-551.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.28399/epdf>

[69] Hartman M, Loy EZ, Ku CS és mtsai: Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management, *Lancet Oncol.*, 2010, 11, 383-390.

[70] Bagnoli M, Canevan S, Califano D és mtsai: Development and validation of a microRNA-based signature (MiROvaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.*, Published online 2016 July 8.  
[http://dxdoi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30108-5](http://dxdoi.org/10.1016/S1470-2045(16)30108-5).

Napjainkban nagy az érdeklődés a „szabad” nukleinsavak pontos élettani szerepének és klinikai diagnosztikai felhasználásának meghatározására. A „szabad nukleinsavak” lehetnek DNS, mRNS, mikroRNS és hosszú nem-kódoló RNS (lnRNS) molekulák, amelyek megtalálhatók a testfolyadékokban, így pl. a szérumban, a nyálban, a könnyben. Az élettani szerepük kiderítése napjainkban is folyik, viszont egyre jelentősebb a diagnosztikai alkalmazhatóságuk. A magzati diagnosztikában a nem-invazív módon történő mintavétel után nyert „szabad” DNS-t felhasználva több tesztet forgalomba hoztak, ezek specificitása és szenzitivitása eléri a 99,9 %-ot. A szív és keringési betegek korai diagnosztizálásában a „szabad” nukleinsavak meghatározása biztató eredményekkel szolgál. Az onkológiában a „folyadék biopsziával” kapcsolatos közlemények megjelenése a más területen dolgozó egészségügyi szakemberek és a közvélemény figyelmét is felkeltette. Folytak a mikroRNS szerepének és diagnosztikai alkalmazhatóságának meghatározásai is. A „szabad nukleinsavak” újgenerációs szekvenálással történő felhasználására a korai diagnosztikában óriási az érdeklődés, de egyelőre nincs elég klinikai adat a lehetséges tesztek megbízhatóságáról és klinikai hasznosságáról.

Kulcsszavak: „szabad” nukleinsavak, DNS, mRNS, mikroRNS, folyadék biopszia, diagnosztika



## Summary

The importance of „free” nucleic acids in the diagnostics.

There is a great interest to determine the physiological role of „free” nucleic acids, and to use them in the clinical diagnostics. These could be DNA, mRNA, microRNA and longnoncoding RNA molecules, they are in the body fluids, like serum, tear, saliva, etc. Their exact role in the normal and pathological physiological processes is still in the focus of the research, while their use in the diagnostics becoming more and more important. The use of „free” DNA in the non-invasive prenatal diagnosis is the first clinical application of the new generation sequencers, these methods able to reach the 99.9% specificity and sensitivity for the detection of the most common trisomies. There are promising results in their use in the diagnosis and classification of the heart and cardiovascular diseases. In the oncology the possibility to use the „liquid biopsy” called the attention not only for the researchers and clinicians, but the whole community. There is not enough data until today for the clinical utility and applicability of these methods.

Key words: „free” nucleic acids, DNA, mRNA, microRNA, liquid biopsy, diagnostics

A magyarországi halálozási statisztikában a szív és keringési betegségek 59%-os aránnyal, a tumoros megbetegedések 26%-kal vezetnek a listát (1.sz. ábra). Az utóbbi időszakban folyamatosan növekszik mindkét megbetegedés száma. A tumoros megbetegedések esetében az új esetek száma a világon 2012-ben elérte a 14 milliót, a halálozások száma a 8,2 milliót. Az új betegek száma várhatóan 70%-kal fog növekedni a következő két évtizedben (WHO Cancer Reports 2014). Ezek az adatok mutatják, hogy a korai diagnosztikában és kezeléseknél a monitorizálása során is lépéseket kell tenni a rohamosan növekvő számú beteg populáció korszerű, hatékony ellátására. De az olyan élettani folyamat, mint a várandósság kapcsán végzett genetikai diagnosztikai eljárások is egyre több házaspárt érintenek, főként a késői gyermekvállalás kapcsán mutatkozó gyakoribb genetikai betegségek kimutatása.

Erre a molekuláris genetikai eredmények klinikai alkalmazása nyújt kiváló lehetőséget. A „szabad” nukleinsavak felhasználása a diagnosztikában és a terápiában forradalmian új eljárásokat tesz lehetővé. A szérumban, vagy a plazmában fellelhető „szabad” nukleinsavak a betegtől egy egyszerű vérvétellel nyert mintából (elegánsan „folyadék biopszia”) felhasználva az új genetikai módszerek kiterjesztésével óriási jelentőséggel bír.

A naponta százával megjelenő közlemények nyomon követése még a témával foglalkozó szakemberek számára is kihívás, új fogalmak jelennek meg, régi dogmák dőlnek meg egyik pillanatról a másikra. Egyre bonyolultabbak és komplikáltabbak lesznek az élettani

működésekről kapott ismereteink. Összefoglalónkban a „szabad” nukleinsavakról és azok

felhasználásáról a klinikai gyakorlatba próbálunk betekintést nyújtani.

**A „SZABAD” NUKLEINSAVAK ÁLTALÁNOS JELLEMZŐI**

A szabad nukleinsavak típusait és méret jellemzőit az 1. sz. táblázatban foglaltuk össze.

„Szabad” DNS

A „szabad” DNS jelenlétét Mandel és Métais már 1948-ban leírta, de felfedezésük sokáig nem keltett különösebb érdeklődést [1]. Tan és mtsai az autoimmun betegségekkel már 1966ban

összefüggésbe hozták, majd később megint a tumorokkal [2]. Leon és mtsai a „szabad” DNS-t 1977-ben elkezdték alkalmazni a tumor diagnosztikában és a kezelés monitorizálásban,

de az utóbbi évtizedig nem történt áttörés ezen a területen [3]. Ellenben Dennis Lo a magzati diagnosztikában sikeresen alkalmazta az anyai vérben 5-10%-ban jelenlévő „szabad” DNS-t a magzat nemének és RhD vércsoportjának meghatározására a nem-invazív módon nyert mintákból már 1997-ben [4]. Az anyai vérkeringésben lévő magzati sejtek és a „szabad” DNS felhasználhatósága párhuzamosan kerültek vizsgálatra. Kezdetben a magzati sejtek és azok alkalmazása az amplifikációs eljárások során tűnt a biztatóbb módszernek [5]. Bianchi és munkacsoportja végzett jelentős kutatásokat ezen a területen [6]. Napjainkban a figyelem inkább a „szabad” nukleinsavakra irányul. Nagy volt az érdeklődés a magzati triszómiák kimutatására, ezeket megbízhatóan csak az újgenerációs szekvenálási módszerek (NGS) bevezetése adta meg a lehetőséget [7]. Yaron számol be 2016-ban az irodalomban eddig közzétett vizsgálatok számáról, 370.348 esetet gyűjtött össze tömeges paralel szekvenálással és 27.195 esetet kromoszóma specifikus szekvenálással végzett meghatározásokról [8]. Az NGS a klinikai gyakorlatba a magzati diagnosztika során már bevezetésre került, a NIPT (Non-Invasive Prenatal Testing) néven. Annak ellenére, hogy több százezer mintáról állnak rendelkezésre klinikai adatok és a módszer specificitása, szenzitivitása eléri a 99,9%-ot a 21. kromoszóma triszómiájának a kimutatására, az NIPT még nem diagnosztika, azaz a pozitív eredményeket a hagyományos invazív módon nyert (amniocentesis, méhlepény-biopszia) minták kariotipizálásával meg kell erősíteni, mert még mindig ez az „arany standard” módszer. A különböző tesztek forgalmazó cégek által megadott magas specificitás és szenzitivitás félrevezetheti még a szakembereket is, a pozitív prediktív érték (PPV) és a negatív prediktív érték (NPV) több információt szolgáltatnak. Az előbbi annak a valószínűségét fejezi ki, hogy egy pozitív szűrési teszttel rendelkező személy valóban beteg, az utóbbi pedig azt, hogy a negatív szűrési teszttel rendelkező személy nem beteg [9]. A betegek szérumában megjelenő tumor eredetű „szabad” DNS rendkívüli lehetőséget biztosít a tumor specifikus mutációk és egyéb genetikai eltérések kimutatására és a kezelés nyomon

követésére. DNS metilációs eltéréseket és vírus eredetű nukleinsavakat is ki lehet mutatni különböző tumorokban [10]. Napjainkban különböző PCR alapú módszereket alkalmaznak a microszatelliták és a jellemző mutációk detektálására [11]. Ezeknél érzékenyebb és pontosabb meghatározásokat biztosít a tömeges parallel (MPS) szekvenálás új biomarkerek kimutatásának a lehetőségével, de a teljes genom is lefedhető [12].

## „Szabad” mRNS

Az emberi genomban kb. 25.000 gén található, amelyek ha aktívak, bekapcsolt állapotba kerülnek, mRNS íródik át róluk. A különböző szövetek egyedi mRNS profillal rendelkeznek, ezek a szérumba is kikerülnek, ahonnan kimutatható a jelenlétük. Várandóság során placentaszpecifikus

markerek mutatkoznak, amelyek alkalmasak lehetnek a diagnosztikában. Az egyik ilyen lehetőség az egynukleotidos polimorfizmus (single nucleotide polymorphism, SNP) felhasználása, az egyes allélok aránya mutatja, hogy hány kópiában van jelen az adott allél,

1:1 arány diallélikus, 1:2, vagy 2:1 arány triszómiás magzatot jelez [13].

A keringésbe kerülő mRNS meglepő módon stabil, és kimutatható a szérumól, vagy plazmából, annak ellenére, hogy magas az RNáz aktivitás. Ezt az exoszómákba és mikrovezikulomokba való csomagolással éri el a szervezet [14].

## „Szabad” mikroRNS

A mikroRNS-ek a nem-kódoló RNS molekulák csoportjába tartozó 19-25 bázispár hosszú molekulák, amelyek hosszabb 70-100 nukleotidból álló prekurzorokból keletkeznek. Jelentős részük a kromoszómák törékeny részén kódolódik, amely régióknak jelentős szerepe van a DNS amplifikációkban, deléciókban és transzlokációkban a tumorok fejlődése során.

A mikroRNS felfedezése az RNS interferencia leírásával kezdődött 1990-ben petúniáknál. Később Fire és Mello elvégezte az első kísérleteiket *C. elegans*-nál és leírták a kis interferáló RNS-t 1998-ban, amiért nyolc évvel később Nobel díjjal tüntették ki őket [15, 16]. Csak jóval később 2010-ben derült ki, hogy a szöveteken kívül a mikroRNS jelen van a különböző testfolyadékokban is, így a vérben, székletben, nyálban, tejben [17]. A mikroRNS

keletkezhet passzívan nekrózis és fertőzések következtében, vagy aktív módon az extracelluláris részecskék és makromolekula komplexekben (Ago, LDL, HDL) történő kiválasztásukkal [18].

Az egyes betegségekben mért mikroRNS koncentrációk sokszor ellentétesek, ennek az oka a standardizált kimutatási módszerek hiánya [19].

## A „SZABAD” NUKLEINSAVAK KLINIKAI ALKALMAZHATÓSÁGA

Prenatalis magzati diagnosztika

Magzati „szabad” DNS

A legegyszerűbb lehetőségnek a kezdetekben a szérumból, vagy a plazmából izolált szabad nukleinsavak méret meghatározása tűnt, mivel a magzati „szabad” DNS-t rövidebbnek

határozták meg. Ezzel kapcsolatban sok ellentmondó közlemény jelent meg, amely számos félreértésre adott okot. Ezek az ellentmondások főként technikai okokra vezethetők vissza, a módszerek fejlődése, az eljárások standardizálása segítette a régebbi megfigyelések megmagyarázására.

Az anyáktól nem-invazív módon levett mintákból már a kezdeti munkák kimutatták, hogy a magzati „szabad” DNS rövidebb az anyainál, ez a különbség első rátekintésre elég nagy tűnt (> 200 bp, vs. > 1000 bp), de nem volt alkalmazható a klinikai diagnosztikában [20]. Gél-elektroforézist, majd ezt követően a kvantitatív PCR-t használták a méretek meghatározására, sok ellentmondással tarkítva [21]. A pontosabb méret meghatározást csak a tömeges parallel szekvenálás (MPS) tette lehetővé, ami alapján meghatározták, hogy az anyai plazmából izolált DNS-ből egy 166 bp és egy 143 bp nagyságú lényeges fragmentum mutatható ki, de ezek után vannak kisebb csúcsok is 10 bp különbségekkel [22]. Ezek alapján azt feltételezik, hogy az anyai eredetű fragmentum esetén létezik egy becsomagolt nukleoszóma egység (146 bp) és egy kapcsoló fragment régió (20 bp), magzati DNS-nél ez a kapcsoló fragment hiányzik. A 10 bp különbséggel mutatkozó kisebb fragmentumok azon dinukleotid ismétlődő egységekből eredhetnek, amelyek a hisztonokkal vannak kapcsolatban [23].

#### Tumor eredetű „szabad” DNS

Ellentmondóak az adatok a tumor eredetű DNS fragmentumok méretével kapcsolatban is, a tumor típusától függően különböző méretűnek határozták meg. A kezdeti kvantitatív PCR-on alapuló tanulmányok azt sugallták, ezek hosszabbak, később viszont rövidebbnek találták őket [24]. A tömeges parallel szekvenálás lehetőséget biztosított ezen ellentmondás feloldására, Jiang és mtsai tanulmányozták a fragmentumok méretét hepatoceluláris karcinómában [25].



Ezeknél a betegeknél is a várandós nők szérumban kimutatott 166 bp nagyságú csúcs volt a legnagyobb mértékben megjelenő a szérumból izolált DNS-ben, ami az apoptózissal történő keletkezésre utal. A fragmentumok méret profilja viszont azt mutatja, hogy a kisebbek tartalmazzák a tumorra specifikus kópiaszám veszteségeket és felszaporodásokat (CNA, copy number gains). A hosszabb fragmentumok megjelenése, amelyek kisebb mértékben mutathatók ki, a nekrozissal hozható összefüggésbe, ezek viszont nem tartalmazzák a tumorról kapcsolatos kópiaszám eltéréseket [25]. Ez a megfigyelés arra hívta fel a figyelmet, hogy a kisebb frakcióra kell koncentrálni, és a kezelés folyamatát is az ebben a mérettartományban megfigyelhető változások alapján lehet jól monitorozni.

## Mitokondriális DNS

A sejtmag eredetű DNS-el ellentétben a mitokondriális DNS vizsgálata során nem a nukleoszómákra jellemző 166 bp nagyságú fragmentum a jellemző, hanem a rövidebbek. Ez azzal magyarázható, hogy nincsenek hisztonok a mitokondriális DNS-en, amelyek védelmet biztosítanak az enzimatis lebonntással szemben. Ez a DNS fajta a koncentrációja tumoros betegek estében lényegesen magasabbnak bizonyult [25].

## miRNS

A mikroRNS mérete 18-24 bp között változik, a gén regulációban van fontos szerepük. Az utóbbi időben kerültek a tanulmányok központjába. A leggyakoribb triszómiák kimutatására is történtek próbálkozások miRNS felhasználásával, de az NGS alapú módszerek megbízhatósága miatt kisebb az érdeklődés ezekre. Viszont vannak jóval gyakoribb, a várandóság kapcsán jelentkező betegségek, mint a gesztációs diabetes, a préeklampszia és a kongenitális szívbetegségek, ahol még nagyobb jelentőségük lehet.

A gesztációs diabetes a várandósok 6-8%-ban jelentkezik, a betegség kimutatása a 26

28. terhességi héten végzett glükóz-tolerancia teszten alapul a rutin terhességi ellátás során. A kezelés korai megkezdése megelőzheti a szövődmények kialakulását. Erre alkalmasak a miRNS molekulák, amelyeket anyai vérből, már a 12. héten kimutatók, pl. a miR-16, miR-17, miR-19a, miR-19b és miR-20 [26].

A préeklampszia a várandósok 3-5 %-ban mutatkozik, eddig nem sikerült olyan biomarkert találni, amely megbízhatóan előre jelezné a súlyos kórkép kialakulását. A miR146a-

5p, miR-199a-5p és a miR-221-3p mutat alacsonyabb expressziót és összefüggést a kórkép kialakulásával [27]. További vizsgálatok szükségesek az alkalmazhatóság pontos megállapítására.

A várandósok 1%-ban jelentkeznek a congenitalis szívbetegségek, ezek kimutatása jelenleg ultrahangvizsgálaton alapul, azonban a korai diagnosztikában, akár már a 12. héttől alkalmasnak tűnnek a miR-99a; let-7c; miR-152b-2; miR-155; miR-802 [28].

### Hosszú nem-kodoló RNS

A hosszú nem-kodoló RNS (long non-coding RNA, LncRNA) 200 bp-nál hosszabb fehérjét nem kódoló nukleinsav molekulák, a gének közötti és az intronok közötti régiókban, vagy az adott gén szensz és antiszensz száláról íródnak át [29]. A sejten belül a nukleuszban és a kromatinban helyezkednek el, de a szérumba is kikerülnek. Az élettani szerepük az átírás utáni szabályozásban, valamint a telomer replikációjában, RNS interferenciában van [30].

## A DIAGNOSZTIKAI ALKALMAZHATÓSÁG JELENLEGI HELYZETE

### Magzati diagnosztika

A jelenlegi magzati diagnosztika Magyarországon főként az államilag finanszírozott invazív mintavételek (méhlepény, magzatvíz) során nyert minták kariotipizálásán alapul. Ez az elfogadott, „arany” standard módszer. Az utóbbi években a nem-invazív módon nyert mintákból, tehát anyai vérből izolált DNS felhasználásával az újgenerációs szekvenáláson alapuló módszerek felhasználásával is történik a leggyakoribb triszómiák kimutatása. A várandósok azonban saját maguk fizetik ki az árát ennek a vizsgálatnak az erre szakosodott magánvállalkozásoknak. A módszerrel kapott pozitív eredményeket minden esetben a hagyományos módszerrel meg kell erősíteni.

Az anyai plazmából nyert „szabad” DNS amely az anyainak 5-10%-a tömeges parallel szekvenáláson alapuló módszerrel 99,9%-os biztonsággal ki tudja mutatni a Down szindrómát, de a 18-as és a 13-as kromoszóma triszómiáját is hasonló pontossággal. A téves pozitív eredmények 0,5% alatt vannak [31, 32]. A legutóbbi eredmények alapján a módszer már alkalmas a magzati RhD vércsoport, a gén mutációk, a nemi kromoszóma rendellenességek, mikrodélációk, mikroduplikációk és egyéb kromoszóma eltérések kimutatására is [33]. A Magyar Humán-genetikai Társaság állásfoglalását már 2014-ben megfogalmazta az eljárással kapcsolatban, a többi nemzetközi genetikai társasághoz hasonlóan. Jelenleg teszt-ként és nem diagnosztikai módszerként javasolja a vizsgálat eredményének az elfogadását. A módszerről történő tájékoztatás és az eredmény kiadása genetikai tanácsadáson keresztül kell, hogy történjen. A módszer előnyei kétség kívül, hogy nem-invazív mintavételen alapul, csökkenti az invazív beavatkozások számát, nagyon gyors, egy héten belül elkészül az eredmény. Alkalmas a családon belül lévő mutációk kimutatására is. Lehetséges olyan minor kromoszóma rendellenességek kimutatása, amelyek hagyományos

kariotipizálással nem lehetségesek. Arra azonban fel kell hívni a figyelmet, hogy a különböző cégek által forgalmazott NIPT termékek nem egyformák, különböző a kimutatási alapjuk és nem egyformák a kimutatási lehetőségeik.

Szív és keringési betegségek

Akut miokardiális infarktus

Az akut miokardiális infarktus (AMI) diagnosztikában a troponin meghatározás terjedt el. Újabb vizsgálatok szerint legalább 20 mikroRNS szintje mutat összefüggést az AMI-val és ezekből legalább 9 a troponin szintekkel [34]. A miR-1, miR-133, miR-208 és a miR499 a

legjobban tanulmányozott molekulák koszorúér betegségekben és akut miokardiális infarktuszban [35]. A sérült miokardiumból kiáramló mikroRNS-ek mellett az akut esemény után emelkedett szintet mutató miRNS-ek részben extracardiális eredetűek mint pl. a miR-30c, miR-145, amelyek ugyanakkor összefüggést mutattak az infarktus méretével. Emellett találtak 20 olyan mikroRNS-t, amelyek nagyfokú specificitással és szenzitivitással előrejelzik a MI-t [46]. Több tanulmány a miR-208 és miR-499 szintjeit vizsgálta, használhatóságukat a klinikai rutinban nagyobb beteg számon alapuló elemzések alapján lehet megítélni [38].

### Szívelégtelenség

A szívelégtelenség (SzE) laboratóriumi diagnosztikájában jelenleg a legtöbb segítséget és információt az N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) szint meghatározása jelenti. A szívelégtelenségen belüli két entitás, a megtartott bal kamrai ejekciós frakcióval (EF) járó SzE (heart failure with preserved EF: HFpef) és a csökkent EFval járó (heart failure with reduced EF: HFref) elkülönítése képalkotó eljárások nélkül nehézséget jelent, mivel e két SzE entitás klinikai tünetei hasonlóak és az NT-proBNP szint alapján sem lehet differenciálni a kettő között. A miRNS-ek diagnosztikus használhatóságáról HEFpef és HEF ref valamint nem szívelégtelen beteg kohorszokban a közelmúltban számoltak be [39]. Öt miRNS-t találtak, amelyek potenciálisan használhatónak tűntek mind a nem szívelégtelen versus SzE-ben szenvedő betegek, mind a HEFpef és HEF ref entitások elkülönítésében: miRNS-30c, -146a, -221, -328 és -375. Az öt miRNS közül bármelyik kettő az NT-proBNP-vel együtt szignifikánsan javította a diagnosztikus model pontosságát a csak BNP meghatározáshoz képest.

A szív reszinkronizációs pacemaker terápia bevezetése a szívelégtelen betegek

kezelésében az egyik legfontosabb előrelépést jelentette az utóbbi 20 évben. Az optimális betegkiválasztás számos szempontját sikerült azonosítani, köztük olyan pozitív válasz prediktorokat, mint a típusos bal Tawara-szárblock mintázat, a minél szélesebb (>150 msec) QRS szélesség, a nem iszkémiás szívelégtelenség etiológia és a női nem [40]. Igazolódott, hogy a szívelégtelen betegek prognózisának felmérésére kifejlesztett Seattle Heart Failure Model a reszinkronizált betegeken is használható [41]. Mindezek ellenére, az ajánlásoknak megfelelő betegkiválasztás mellett sem alakul ki a várt terápiás hatás a betegek mintegy 20-40 %-ban. Szükség van tehát további prediktív markerek azonosítására, amelyek használatával ez a szám lejjebb szorítható.

Egy közelmúltban megjelent tanulmány a miRNS-ek használhatóságát vizsgálta a reszinkronizáció hatásának előrejelzésében [42]. Első lépésben 6-6 CRT kezelés után reszponder és non-reszponder betegen elemezték 766 különböző miRNS plazma szintjének összefüggését a terápiás válasszal. Négy olyan miRNS-t (miR-409-3p, miR-30d, miR-99b, és miR-766) találtak, amely korrelált a reszponderitással. Ezt a 4 miRNS-t a továbbiakban prospektíven vizsgálták további 40 betegen, akiket legalább 6 hónapig követték a reszinkronizáció hatásának felmérésére valamint egészséges (nem szívelégtelen) kontrol egyéneknél. A reszponderitás kritériuma a kiinduláshoz képest legalább 10%-os bal kamrai ejekciós frakció növekedés volt. Több változós lineáris statisztikai modellezéssel végül a reszponderitás legjobb prediktorának a terápia előtt emelkedett miR-30d plazma szintet találtak. Reszponder betegeken az miR-30d plazma szintje 6 hónappal a reszinkronizációs kezelés után csökkent, míg a terápia-refrakter esetekben szignifikánsan nem változott. További fontos megfigyelés volt, hogy az miR-30d plazma koncentrációja a sinus coronariusban 18-szoros volt a perifériás mintához képest, ami a szívizom sejtekből történő felszabadulásra utal, feltételezések szerint a mechanikai stressznek kitett területről. A miR-30d magas kiindulási értéke eszerint a súlyos aszinkronia jele, csökkenése pedig a sikeres reszinkronizációs hatásra, következményesen a miokardium stressz megszűnésére utal.

## Pitvarfibrilláció

A pitvarfibrilláció (PF) a teljes népességen belüli 1-2%-os előfordulásával szintén korunk egyik kardiovaszkuláris pandemiája. A betegséghez társuló magas morbiditás, mortalitás és az egészségi ellátó rendszerre rótt terhek indokolják azokat a nagyon jelentős erőfeszítéseket, amelyeket alapkutatók és klinikusok a mechanizmus megértése, a mielőbbi felismerés és hatékonyabb gyógyítás, a szövődmények megelőzése érdekében tesznek. Ez utóbbiak közül a legsúlyosabb következmény a PF-hoz társuló stroke, ami megfelelő alvadásgátló kezeléssel többnyire megelőzhető lenne. Ezért is jelent különösen nagy



problémát, hogy az esetek pontosan nem ismert, de bizonyosan jelentékeny hányadában a PF tünetmentessége miatt észrevétlen (néma) marad, és az első tünet a következményes stroke.

Ez különösen igaz a ritmuszavar paroxizmális formáira, hiszen ilyenkor még az ekg vizsgálat

is megtévesztő (negatív) eredményt adhat, ha éppen nem zajló PF alatt készül. Bármely, egyszerű vérvizsgálattal kimutatható eltérés, ami PF előfordulására utal éppen ezért fontos segítséget jelentene azoknak a kiválasztásában, akiknél fokozott erőfeszítés, tartós monitorozási technikák (Holter vizsgálatok, transztelefonos ekg, implantálható aritmia monitor) használata indokolt a PF dokumentálására. Lu és mtsai [43] aritmia-mentes,

paroxizmális és perzisztens pitvarfibrilláló betegeken végzett miRNS vizsgálatok során az miRNS-150 szintjét PF-ban jelentősen alacsonyabbnak mérték, paroxizmális csoportban 1/17nek,

a perzisztáló betegek között 1/20-nak a kontrolokhoz képest, és fordított arányban korreláltak a CRP értékekkel. Egy másik vizsgálat [44], amellyel, hogy megerősítette a miRNS-150-nel kapcsolatban leírtakat, szintén csökkent expressziót mutatott ki a miRNS-21

vonatkozásában. A PF miatt végzett katéterablációt követően mindkét miRNS szintje a

kiindulási érték háromszorosára emelkedett.

### Szívfejlődési rendellenességek

A hosszú nem-kódoló RNS alkalmazásának az egyik érdekes lehetősége a szív és keringési betegségek. Számos közlemény mutatta ki az elmúlt években, hogy a lncRNS fontos szerepet tölt be a szív fejlődésében. Ilyen pl. a Braveheart (Bvht), amely felül expresszált a szívben, de nem kódol fehérjét, de hatással van a MESP1-re, amely fontos differenciálódási faktor, embrionális őssejtekkel szívizomsejteket képez [45]. Másik hasonló molekula a Fendrr, amely az átírási hálózathoz szükséges, a hiszton módosító komplexekkel lép kapcsolatba, delécioja kamrai elváltozásokat okoz [46]. Legújabbban három lncRNS-t írtak le az embrionális őssejtekkel az endothel sejtek fejlődését segítik elő, ezek a TERMINATOR, ALIEN és PUNISHER [47]. De más kardiovaszkuláris betegség modellezésekor megtalálták e

molekulák szerepét [48]. Például a CARL, amely szív-apoptózissal hozható összefüggésbe, kapcsolódik a miR-539-hez, amely gátolja annak hatását a mitokondrium hasadásra, hasonló hatású az lncRNS MDRL, amely a miR-361-et alul szabályozza [49].

### Tumor diagnosztika

A tumorok diagnosztikája bonyolultabb és kevés adat áll rendelkezésre a „folyadék biopsziával” nyert minták feldolgozása során nyert eredményekről és klinikai tapasztalatokról. Az NIPT-vel elért 99,9%-os specificitástól és szenzitivitástól még nagyon messze vagyunk a tumor diagnosztika területén. A hagyományos invazív eljárással nyert tumorok szövettani és molekuláris diagnosztikai vizsgálata a standard elfogadott diagnosztikai eljárás napjainkban. Ez lehetőséget nyújt olyan genotipizálások elvégzésére is, amelyek segítik a célzott terápia kiválasztását. Az elmúlt években a „folyadék biopszia” nagy reményeket nyújt a keringő tumor-DNS (ctDNA) molekulák felhasználásával a korai tumor diagnosztika és a terápia felállításához. Ezek a nukleinsavak az apoptotizáló tumor sejtekből és a keringő tumor sejtekből származnak.

A 2. sz. ábra az invazív műtétek során és a nem-invazív „folyadék biopsziával” nyert minta feldolgozási eljárásokat hasonlítja össze, mutatva azt is, hogy melyek a leggyakoribb daganatok a férfiaknál és a nőknél. A műtét alkalmával eltávolított tumor szövettani és molekuláris diagnosztikai vizsgálaton megy keresztül, ami hosszadalmas, nem reprezentálja a szervezetben megtalálható összes daganatot. Ellenben a vérben keringő DNS segítségével feltérképezhető a daganatok összes árulkodó jele, amely a teljes szervezetben mutatkozik, nem csak az eltávolított tumor szövetben. Kimutatható, hogy mely DNS szakaszok fordulnak elő a vártnál magasabb, vagy alacsonyabb arányban, vagy milyen mutációk találhatók meg. Noha jelenleg a tumorok hagyományos invazív eljárással nyert szövettani és molekuláris diagnosztikai vizsgálata az elfogadott eljárás, számolni kell azzal, hogy amikor már elegendő adat áll rendelkezésre a nem-invazív módon nyert minták feldolgozásáról ez változni fog.

A ctDNS a tumor sejtekből jut a vérbe és az eredeti tumor mutációit tartalmazza. Az újgenerációs szekvenálók kifejlesztésével napjainkban lehetőség nyílik a genetikai eltérések specifikus és érzékeny kimutatására, a nem-invazív módon vett mintákból. Ez a jelenlegi tumor diagnosztikát jelentősen segítheti, lehetőséget nyújthat a tumor korai kimutatására, a prognózis és a kezelés meghatározására. Lehetőséget ad a személyre szabott gyógyítás bevezetésére.

A tumorok genotipizálása nagyon fontossá vált a kezelések során, főként az immunoterápia alkalmazásakor. A klinikai gyakorlatban a genotipizálás szöveti biopsziákból történik, ez a minta azonban nem alkalmas a tumor heterogenitásának és állandó változásainak valósidejű monitorizálására, erre jobban megfelel a vérből izolált ctDNS. Számos tanulmány bizonyította, hogy a ctDNS gyorsan képes előjelezni a terápia kimenetelét és fontos információt nyújt a klinikusnak a következő kezelések megtervezéséhez.

Súlyos probléma a terápia rezisztencia kialakulása, amely a kezelések sikertelenségének a legfőbb oka. A legújabb eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy a folyadék biopsziával nyert minták felhasználásával a tumor rezisztencia jóval korábban már jelezhető.

A folyadék biopsziával nyert mintákból izolált ctDNA lehetőséget nyújthat a jövőben a

tumorkorai diagnosztizálásához és a genotipizálások eredményeinek felhasználásával a kezelések hatékonyabbá tételéhez, a kezelés hatékonyságának a monitorizálásához, a személyre szabott terápia bevezetéséhez.

A 2. sz. Táblázat mutatja a „szabad” DNS alkalmazhatóságát a különböző tumorok

diagnosztikájában és prognózis megállapításában. Látható, hogy hol alkalmas a metiláció, a DNS integritás, a mikroszatellita eltérés, vírus DNS jelenléte és a mitokondriális DNS markerként. A módszer elterjedéséhez és elfogadtatásához szükséges a ctDNS keletkezésének, a sejtekből történő kibocsátás és véráramba kerülés biológiájának a jobb és pontosabb megismerésére. Napjainkban még kevés adat áll rendelkezésre a klinikai és analitikai validitásról, továbbá a klinikai hasznosságról.

### Patogenezis és diagnosztika

A humán genom 76%-a fehérjét nem kódoló, 200 bázispárt meghaladó méretű RNS szakaszokban íródik át (long non-coding RNS; lncRNS) [50]. 2003-ban Rangel és mtsai írtak le első ízben egy petefészekrákra specifikus (human ovarian cancer specific transcript-2, HOST-2), a 10-es kromoszómához köthető 2,9 kb méretű RNS-t, mely nem rendelkezik olvasási kerettel és fehérjét sem kódol [51]. A HOST-2 expresszió gátlása a petefészekrákból izolált OVCAR-3 sejtvonal migrációját, proliferációját és invázióját egyaránt gátolta. Ennek a mechanizmusa máig sem tisztázott, de egy közelmúltbeli vizsgálat szerint a HOST-2 molekuláris szivacsként köti a let-7b miRNS-t, s ezáltal gátolja annak működését. A let-7b miRNS-ről már korábban ismert volt, hogy a HMGA2, c-myc, Dicer és Imp3 onkogének expresszióját gátolja, így let-7b szintjének csökkenése fokozza azok expresszióját [52]. A fehérjét nem kódoló RNS-ek a templátként szolgáló DNS elhelyezkedése szerint nem csak intronokban, hanem exonokban és akár ezek antiszensz szálán is képződhetnek. Ennek egyik példája a HOX transzkripció antiszensz RNS (HOTAIR). A 6232 bp méretű lncRNS 12-es kromoszóma q13.13 szakaszán képződik. A HOX géncsalád C tagjának transzkriptumaként a H3 hiszton metilációját idézi elő, s ezáltal a 2-es kromoszómán elhelyezkedő HOXD gén

epigenetikus blokkolását eredményezi [53]. Epitheliális petefészekrákban a HOTAIR expressziója jelentősen emelkedett és a tumor progresszióban kifejtett hatása az apoptózisban szerepet játszó gének (cyclin E, BCL-2, caspase-9, caspase-3 és BRCA1) szabályozásán keresztül érvényesül. Egy sor további lncRNS-ről igazolódott, hogy különböző jelátviteli utakon keresztül vesznek részt a petefészekrákos sejtek proliferációjának, migrációjának, inváziójának, áttétképzésének és kemoterápiával szembeni érzékenységének szabályozásában [50].

Dahiya és mtsai 2008-as tanulmányában 56 különböző miRNS szerepét igazolta a petefészekrák patogenezisében, s közülük 16 mutatott átfedést más tanulmányokban már

feltételezett jelentőségükkel. A 16 miRNS közül 9-nél a kontrollhoz képest csökkent expresszió (let-7d, miR-106b, miR-122a, miR-141, miR-183, miR-195, miR-200a, miR-335, miR-424), 7-nél pedig megnövekedett expresszió (miR-100, miR-199a, miR-296, miR-29a, miR-29c, miR-99a, miR-494) volt a jellemző [54]. A let-7 miRNS család olyan konzervált változásai jellemzőek petefészekrákban, melyek szuppresszor funkcióra utalnak [48]. Bár a miR-21 túlexpresszióját számos daganattípusban kimutatták, petefészekrákban ez a típus bizonyult a legkifejezettebben alul reguláltnak. Nem meglepő, hogy a miR-21 az apoptózissal és a csökkent sejtproliferációval asszociált miRNS marker. A miR-221 és miR-222 a CDKN1C expresszió befolyásolása révén játszik szerepet a petefészekrák patogenezisében [65]. Klinikai vizsgálatok szerint a kettő aránya szignifikáns korrelációt mutat a túléléssel. A 3,7 alatti expressziós arányú esetek median túlélése 35 hónap alatti, míg a 3,7 fölötti expressziós arányú esetek median túlélése 35 hónap fölötti volt. A miR152 expressziója petefészekrákos sejtekben lényegesen alacsonyabb, mint a normál sejtekben. A miR-122-t korábban már tumor szuppresszorként jellemezték, ami emlőrákban a IGF1F-et célozva szabályozza a PI3K/Akt/mTOR/p70S6K jelátviteli útvonal működését. Langhe és mtsai tanulmánya petefészekrákban is hasonló funkciót igazolt a miR-122 szintjei alapján [55].

### Prognosztika és onkoterápia

A miR-152 magas expressziója petefészekrákban a cisplatinnal szembeni érzékenységgel jó korrelációt mutat [55]. Ennek a felismerésnek a jelentőségét az okozza, hogy bár a többnyire előrehaladott stádiumban felismert petefészekrák gyógyulási eredményeiben gyökeres változást hozott a műtéti technológia és az első vonalbeli platina-taxán kombinációs terápia, a betegek túlélését ma már jelentős részben a platinarezisztencia kialakulása korlátozza. A petefészekrák gyógyulási eredményeinek javításában prioritást élvez a platinarezisztens folyamatok ellen irányuló hatékony modalitások kifejlesztése. Számos új kemoterápiás,



immunterápiás és célzott biológiai kezelési módszer kifejlesztése van folyamatban, de a

platinaérzékenység előre jelzése továbbra sem megoldott. A tumormarker és képalkotó

vizsgálatok csak egy-két hónap vagy néhány hónap elteltével képesek a platinarezisztencia kialakulásának igazolására. A miR-93 magas szintje szintén platinarezisztenciával hozható összefüggésbe. A miR-214 a miR-93-mal azonos útvonalon hat [56, 57]. Yu és mtsai (2014) kimutatták, hogy a miR-29(a/b/c) csökkent expressziója cisplatinrezisztenciát jelez, és

kísérletes körülmények között miR-29 knock-out alkalmazásával a platinaérzékenység visszaállítható [58]. A szekvencia analízis technológiai fejlődése a teljes humán genom feltérképezésével 2001-ben megnyitotta az utat a széles palettával végzett genom-asszociációs klinikai vizsgálatok előtt [59]. 2010-re már több száz olyan közlemény jelent meg amelyek 70-50-30 génre tudták szűkíteni azokat a mintázatokat, amelyek egyes daganattípusokra vonatkozó fogékonyságot, egyes altípusok jelenlétét vagy kedvező és kedvezőtlen prognózis előrejelzésében alkalmazhatónak bizonyultak. Petefészekrákkal kapcsolatban több száz beteg klinikai és egyenként mintegy 1000 különböző miRNS expressziójára vonatkozó adataiból robusztus számítástechnikai elemzéssel sikerült egy 35 egyedi miRNS-re vonatkozó mintázatot kialakítani, melyből egyszerű algoritmussal klinikailag releváns prognosztikai index határozható meg [60]. Az algoritmust egy szintén több száz klinikai esetet tartalmazó adatbázison validálva a szerzők meggyőzően igazolták az alacsony és magas rizikójú (HR>3) esetek elkülönítésének lehetőségét a miRNS mintázat alapján.

## Konklúzió

A „szabad” nukleinsavak felhasználása az elkövetkező időszakban nemcsak a nem-invazív prenatalis, hanem a „folyadék biopszián” alapuló diagnosztikában is jelentősen növekedni fog. Folyik a biológiai szerepük pontos meghatározása és a különböző betegségek differenciál diagnosztikájában való alkalmazhatóságuk vizsgálata. Az NIPT elterjedése várhatóan kiszorítja a méhlepény-biopsziát és a magzatvízvételt, amint lesz annyi klinikai adat, hogy a klinikai alkalmazhatóság és hasznosság pontosan meghatározható lesz.

A szív-, és keringési betegségek diagnosztikájában, valamint az egyes kezelések várható

hatékonyságának az előrejelzésével kapcsolatban sok közlemény jelenik meg, de jelenleg a klinikai gyakorlatban még nem alkalmazzák a „szabad” nukleinsavakon alapuló

meghatározásokat, de néhány éven belül itt is komoly áttörés várható.

Az onkológiai betegségek diagnosztizálása lesz valószínű a következő terület, amely a magzati diagnosztika után a legnagyobb mértékben használja majd fel a „szabad” nukleinsavakat. Várható olyan új generációs gyógyszerek bevezetése, amely az interferenciát kihasználva új típusú gyógyszerek kifejlesztését teszi lehetővé.

## Irodalom

- [1] Mandel, P., Metais, P.: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C. R. Seances Soc. Biol. Fil., 1948, 142, 241-243.
- [2] Tan, E.M., Schur, R.J., Carr, R.I., et al.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 1966, 45, 1732-1740.
- [3] Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., et al.: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res., 1977, 37, 646-650.
- [4] Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., et al.: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet, 1997, 350: 485-487.
- [5] Bianchi, D.W., Flint, A.F., Pizzimenti, M.F., et al.: Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1990, 87, 3279-3283.
- [6] Bianchi, D.W., Klinger, K.W., Vadnais, T.J., et al.: Development of model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. Prenat. Diagn., 1996, 16, 289-298.
- [7] Palomaki, G.E., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., et al.: DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. Genet. Med., 2011, 13, 913-920.
- [8] Yaron, Y.: The implications of non-invasive prenatal testing failures: review of an underdiscussed phenomenon. Prenat. Diagn., 2016, 36, 391-396.
- [9] Morai, S, Grene, F.M., Mello, M.M.: A new era in non-invasive prenatal testing. The New Eng. J. Medicine, 2013, 369, 499-501.
- [10] Lo, Y. M. D., Chan, L. Y. S., Lo, K. W., et al.: Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 199, 59, 1188-1191.

- [11] Yung, T. K., Chan, K. C. A., Mok, T. K., et al.: Single molecule detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15, 2076-2084.
- [12] McBride, D. J., Orpana, A. K., Sotiriou, C., et al.: Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49, 1062-1069.
- [13] Go, A.T., van Vugt, J.M., Oudejans, C.B., et al.: Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum. Reprod. Update*. 2011, 17, 218-223.
- [14] Orozco, A. F, Lewis, D. E.: Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry A*. 2010, 77, 502-514.

- [15] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell*. 1990, 2, 279-289.
- [16] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., et al.: Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998, 391, 806-811.
- [17] Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., et al.: The microRNA spectrum of 12 body fluids. *Methods*, 2010, 1741, 1733-1741.
- [18] Nagy, Z., Igaz, P.: Introduction to microRNAs: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy – The concept of Circulating microRNAs. In. *Circulating microRNAs in Disease and their Potential Biological Relevance*. Ed. Igaz, P., Springer, Basel, 2015, 4-30.
- [19] Kosaka, N., Iguchi, H., Ochiya, T.: Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010, 101, 2087-2092.
- [20] Chan, K.C., Zhang, J., Hui, A.B., et al.: Size distribution of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem*. 2004, 50, 88-92.
- [21] Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C., et al.: Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin. Chem*. 2004, 50, 1002-1011.
- [22] Lo, Y.M., Chan, K. C., Sun, H., et al.: Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci. Transl. Med*. 2010, 2, 61ra91
- [23] Mouliere F., Robert B, Arnau Peyrotte E., et al.: High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011, 6, e23418.
- [24] Elinger, J., Wittkamp, V., Albers, P., et al.: Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J. Urol*. 2009, 181, 363-371.
- [25] Jiang, P., Chan, M.W.C., et al.: Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2015, 112, E1317-E1325.
- [26] Zhu Y., Tian, F., Li, H., et al.: Profiling maternal plasma microRNA expression in early

pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *Int. J. Gyn. Obst*, 2015, 130, 49–53.

[27] Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Hympanova, L., et al.: Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. *Thromb. Res.* 2016, 137, 126-140.

[28] Zhu, S.,Chao L, Zhu J., et al.: Identification of maternal serum microRNAs as novel noninvasive

biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clin. Chim. Acta*

2013, 424, 66-72. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.010.

- [29] Ma, L., Bajic, B.V., Zhang, Z.: On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 2013, 10, 24-933.
- [30] des Andres-Pablo, A., Morillon, A., Wery, M.: LncRNAs, lost in translation or licence to regulate? *Curr. Genet.* DOI 10.1007/s00294-016-0615-1.
- [31] Bianchi, D.W., Platt, L.D., Goldberg, J.D., és mtsai.: Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012, 119, 890-901.
- [32] Norton, M.E., Brar, H., Weiss, J., et al.: Non-invasive chromosomal evaluation (NICE) study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obst. Gynecol.* 2012, 207, 137 e1-e8.
- [33] Lench, N., Barrett, A., Fielding, S. et al.: The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders: challenges and progress made. *Prenat. Diagn.* 2013, 33, 555-562.
- [34] Sayed, M.S.A., Xia, K., Yang, T-L., et al.: Circulating microRNAs: A potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Disease Markers* 2013, 35, 561-566.
- [35] Devaux, Z., Selemon, H., Goretti, E., et al.: Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 2012, 58, 559-567.
- [36] Meder, B., Keller, A., Vogel, B., et al.: Micro RNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol*, 2011, 106, 13-23.
- [37] Wang, K.G., Zhu, Q.J., Thang, T., et al.: Circulating miRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.* 2010, 31, 659-666.
- [38] Devaux, Y., Vaosurt, M., Goretti, E., et al.: Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 2012, 58, 559-567.
- [39] Wattson, C.J., Gupta, S.K., O'Connell, E.O., et al.: MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur. J. Hear Fail.*, 2015, 17: 405-415.
- [40] Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., et al.: 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.



Eur. Heart J. 2016; DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>

[41] Clemens, M., Szegedi, Z., Kardos, L., et al.: The Seattle Heart Failure Model Predicts Survival in Patients With Cardiac Resynchronization Therapy: A Validation Study. *J. Cardiac. Fail.* 2012, 18, 682-687.

[42] Melman, Y.F., Shah, R., Danielson, K., et al: Circulating microRNA-30d is associated with response to cardiac resynchronization therapy in heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis: A translational pilot study. *Circulation* 2015, 131, 2202-2216.

[43] Lu, Z., Zhou, C., Liu, Y., et al.: The Expression Levels of Plasma microRNAs in AtrialFibrillation Patients. *Plos One*, 2012, 7, e44906

- [44] McManus, D.D., Lin, H., Tanriverdi, K., et al.: Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: data from the Framingham Offspring Study. *Heart Rhythm*. 2014, 11, 663–669.
- [45] Klattenhoff, C.A., Scheuermann, J.C., Surface, L.E., et al.: Braveheart, a long non-coding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 2013, 152, 570-583.
- [46] Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., et al.: The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in mouse. *Dev. Cell.*, 2013, 24, 206214.
- [47] Kurian, L, Aguirre, A, Sancho-Martinez, I, et al.: Identification of novel long noncoding RNAs underlying vertebrate cardiovascular development. *Circulation* 2015, 131, 1278-1290.
- [48] Uchida, S., Dimmeler, S.: Long non-coding RNAs in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2015, 116, 737-750.
- [49] Wang, K., Sun, T., Li, N., et al.: MDRL lncRNA regulates the processing of miR-484 primary transcript by targeting miR-361. *PLoS Genet.* 2014, 10:e1004467.
- [50] Zhong, Y., Gao, D., He S., et al.: Dysregulated expression of long non-coding RNA in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* Published ahead of print. August, 2016. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000828
- [51] Rangel, L.B., Sherman-Baust, C.A., Wernyj, R.P., et al.: Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene* 2003, 22, 7225-7232.
- [52] Gao, Y., Meng H., Liu S., et al.: LncRNA-HOST2 regulates cell biological behaviors in epithelial ovarian cancer through a mechanism involving microRNA let-7b. *Hum. Mol.*

Genet., 2015, 24, 841-852.

[53] Grier, D.G., Thompson, A., Kwasniewska, A., et al.: The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol.*, 2005, 205,154-171.

[54] Dahiya, N., Sherman-Baust, C.A., Wang, T-L., et al.: MicroRNA Expression and Identification of Putative miRNA Targets in Ovarian Cancer. *PLoS ONE* 2008, 3.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002436>

[55] Langhe, R., Norris, L., Saadeh, F.A., et al.: A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease. *The Cancer Letters* 2014, 356, 628-636.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383514005989>

[56] Katz, B., Tropé, C.G., Reich, R., et al.: MicroRNAs in Ovarian Cancer. *Human Pathology* 2015, 46, 1245-1256. [http://www.humanpathol.com/article/S0046-8177\(15\)00218X/](http://www.humanpathol.com/article/S0046-8177(15)00218X/)

abstract

[57] Fu, X., Tian, J., Zhang, L., et al.: Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Letters* 2012, 586: 1279-1286. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.febslet.2012.03.006/abstract>

[58] Yu, P-N., Yan, M-D., Lai, H-C., et al.: Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer* 2014, 134: 542-551. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.28399/epdf>

[59] Hartman, M., Loy, E.Z., Ku, C.S., et al.: Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management, *Lancet Oncol.*, 2010, 11, 383-390.

[60] Bagnoli, M., Canevan, S., Califano, D., et al.: Development and validation of a microRNA-based signature (MiROvaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* Published online 2016 July 8. [http://dxdoi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30108-5](http://dxdoi.org/10.1016/S1470-2045(16)30108-5).

1.sz Ábra (PPT, JPG, TIF) [Click here to download Ábra \(PPT, JPG, TIF\) meta-chart.jpeg](#)

2.sz Ábra (PPT, JPG, TIF)

2.sz. ábra.

Tumorszövet-és folyadék-biopszia technológiai összehasonlítása

Műtét/Biopszia

Fixálás

Beágyazás

Tumorszövet

DNS

Véna punkció

Vér

Bőr

Tüdő

Vastagbél

Vastagbél

Centrifugálás

Hólyag

Méhtest

ProsztataBőrEmlőTüdőDNS

1. sz. Táblázat

1. sz. Táblázat

A „szabad” nukleinsavak típusai és méretei

A „szabad” nukleinsav Méret

DNS 166 bp

mRNS változó

mikroRNS 18-24 bp

mitokondriális DNS > 166 bp

hosszú nem-kódoló RNS < 200 bp



2. sz. Táblázat

2. sz. Táblázat

A különböző tumorok és a „szabad” DNS felhasználhatósága a diagnosztikában és a prognózisban

Tumor „szabad” DNS Diagnosztikus Prognosztikus

marker marker

Cervix

Methiláció ..

Vírus DNS .

Colorectalis

Mutáció ..

DNS integritás .

Metiláció ..

Hepatocellularis carcinoma

Metiláció ..

Mikroszatellita eltérés .

Mutáció ..

DNS integritás ..

Vírus DNS .

Húgyhólyag

DNS integritás ..

Metiláció .

Mikroszatellita eltérés .

Mell

Metiláció ..

Mikroszatellita eltérés ..

DNS integritás .

Mutáció .

Mitokondrium .

Petefészek

Metiláció ..

DNS integritás .

Mutáció .

Prostata

Metiláció ..

Mikroszatellita eltérés .

DNS integritás ..

Mitokondrium .

