

ОЦЕНКА ЗНАЧИМОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА miR-146A В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

А. Н. Ширшова¹, Д. А. Шамовская¹, У. А. Боярских¹, С. В. Апалько², Л. С. Лесков³, А. В. Соколов³, С. А. Коваленко², С. Г. Щербак², И. В. Пикалов⁴, А. Э. Кель¹, М. Л. Филипенко^{1,5} ✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

² Городская больница № 40, Санкт-Петербург

³ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

⁵ Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Колоректальный рак (КРР) — один из наиболее распространенных видов рака в мире. Эффективные методы скрининга для своевременного выявления КРР и аденоматозных полипов могут значительно снизить смертность от этого заболевания. МикроРНК — новый класс потенциальных биомаркеров для широкого круга заболеваний человека, включая онкопатологии. В статье оценивается диагностическая значимость концентрации микроРНК miR-146a в плазме крови человека с КРР. В опытную группу включили пациентов с колоректальным раком стадий I–III (n = 102), а в контрольную — пациентов с хроническим колитом, неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона (n = 58) и условно здоровых людей (n = 42). Количество микроРНК определяли при помощи ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией результатов в «реальном времени». Было показано, что концентрация miR-146a статистически значимо выше в образцах плазмы крови пациентов с КРР в сравнении с пациентами контрольной группы (p < 0,0001). Оптимальное значение диагностической чувствительности, определенное с помощью ROC-анализа, составило 47,3 %, специфичности — 91,5 %, AUC = 0,79 ± 0,018. Исследуемый подход обладает недостаточно высокой специфичностью, но показано, что miR-146a в будущем может быть включена в состав диагностических профилей на основе нескольких микроРНК с улучшенной специфичностью.

Ключевые слова: онкология, колоректальный рак, скрининг, биомаркер, микроРНК, miR-146a, cel-238, полимеразная цепная реакция, обратная транскрипция

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (Соглашение № 14.604.21.0101, идентификатор RFMEFI60414X0101).

✉ **Для корреспонденции:** Филипенко Максим Леонидович
Пр-т Ак. Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090; max@niboch.nsc.ru

Статья получена: 25.08.2017 **Статья принята к печати:** 30.08.2017

SIGNIFICANCE OF MIR-146A QUANTIFICATION IN HUMAN BLOOD PLASMA FOR THE DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

Shirshova AN¹, Shamovskaya DA¹, Boyarskikh UA¹, Apalko SV², Leskov LS³, Sokolov AV³, Kovalenko SA², Scherbak SG², Pikalov IV⁴, Kel AE¹, Filipenko ML^{1,5} ✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² City Hospital No. 40, Saint Petersburg, Russia

³ City Clinical Hospital No.1, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

⁵ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancer types in the world. Timely diagnosis of CRC and adenomatous polyps aided by effective screening techniques can considerably reduce mortality from this disease. MicroRNAs constitute a new class of promising biomarkers for a range of human diseases including cancer. The following article assesses the diagnostic significance of miR-146a concentrations in the blood plasma of patients with colorectal cancer. The main group included patients with stages I to III colorectal cancer (n = 102); the control group comprised patients with chronic colitis, nonspecific ulcerative colitis and Crohn's disease (n = 58) and healthy individuals (n = 42). MicroRNA levels were quantified by reverse-transcription real-time PCR, revealing significantly higher miR-146a concentrations in the samples of patients with CRC than in the controls (p < 0.0001). The optimal diagnostic sensitivity determined by ROC analysis was 47.3 %, specificity was 91.5 %, with AUC = 0.79 ± 0.018. Our findings demonstrate that the studied approach does not have sufficient specificity, but still suggest that miR-146a can be included into screening tests based on quantification of other microRNAs with improved specificity.

Keywords: cancer research, colorectal cancer, screening, biomarker, microRNA, miR-146a, cel-238, polymerase chain reaction, reverse transcription

Funding: this works was supported by the Federal Targeted Program for Research and Development in Priority Areas of Advancement of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014–2020 (Grant No. 14.604.21.0101, ID RFMEFI60414X0101).

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim Filipenko
Prospekt Ak. Lavrentieva, d. 8, Novosibirsk, Russia, 630090; max@niboch.nsc.ru

Received: 25.08.2017 **Accepted:** 30.08.2017

Колоректальный рак — одно из самых распространенных онкологических заболеваний и наиболее часто встречающаяся форма злокачественных опухолей кишечника. При выявлении заболевания на стадии I и адекватной терапии выживаемость пациентов составляет 90 %, тогда как для пациентов со стадией IV — не более 6 %. В связи с этим своевременная диагностика — залог сохранения жизни пациенту. Одним из перспективных направлений исследований является поиск неинвазивных молекулярных маркеров, обнаруживаемых в крови, кале и других доступных биоматериалах.

В 2008 г. Tewari и соавт. обнаружили, что некоторые микроРНК присутствуют в плазме крови человека в удивительно стабильной форме, которая защищает их от действия эндогенных РНКаз [1]. Это стало отправной точкой начала исследований циркулирующих микроРНК в качестве потенциальных биомаркеров. МикроРНК обнаружены в плазме крови, слюне, моче, желчи, грудном молоке и других жидкостях организма человека. Накоплены многочисленные данные о специфическом изменении профиля экспрессии циркулирующих микроРНК при различных патологических состояниях, таких как онкологические, сердечно-сосудистые, воспалительные заболевания, старение и др. [2–5].

Для опухолей различного происхождения характерны как специфические, так и неспецифические изменения экспрессии микроРНК. Например, большинство опухолей ассоциировано с увеличением экспрессии микроРНК miR-21 и снижением экспрессии микроРНК семейства let-7. Специфическими могут быть изменения для различных гистологических типов новообразований, профилей экспрессии генов в клетках опухоли, стадии TNM.

В исследованиях разных исследователей для колоректального рака значимыми в патогенезе и прогнозе описаны опухоль-специфичные микроРНК miR-21, miR-9, miR-155, miR-17, miR-19, let-7 и miR-24, а также циркулирующие miR-181b, miR-21, miR-183, let-7g, miR-17 и miR-126 [6]. Первое исследование изменения профиля экспрессии микроРНК при колоректальном раке, выполненное в 2003 г., показало снижение экспрессии опухоль-супрессорных

микроРНК miR-143 и miR-145 и при аденоматозе, и в злокачественных новообразованиях в сравнении с нормой [7]. К настоящему времени описано несколько десятков микроРНК, экспрессия которых изменяется при КРП [8].

Возможность использования мониторинга микроРНК в плазме крови в качестве неинвазивной диагностики КРП была показана в 2008–2009 гг. [9, 10]. Исследования в этой области остаются крайне актуальными и сегодня [11, 12].

Ранее нами были проанализированы данные проекта SysCol (Systems Biology of Colorectal cancer) [13], содержащие результаты профилирования микроРНК с помощью секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), в результате чего для miR-146a (ENSG00000253522) было получено статистически значимое увеличение уровня экспрессии в ткани колоректальной аденокарциномы ($\log_{2}FC = 1,742$ для изменения экспрессии микроРНК в опухолях против контрольных образцов, скорректированное значение $p = 5,57E^{-79}$). Целью настоящей работы являлась оценка диагностической значимости определения уровня miR-146a в плазме крови человека для диагностики колоректального рака.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты, проходившие обследование по поводу заболевания толстого кишечника в Городской клинической больнице № 1 (Новосибирск), Центре новых медицинских технологий (Новосибирск) и Городской больнице № 40 (Санкт-Петербург). В экспериментальную группу включили 102 человека с аденокарциномой толстой кишки стадий I–III, в контрольную — 100 человек с воспалительными заболеваниями кишечника (хронический колит, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, $n = 58$) или без патологий ($n = 42$). Включение в контрольную группу пациентов с воспалением кишечника обусловлено тем, что прогрессия опухоли всегда сопровождается воспалением в прилегающих тканях. Обе группы подробно охарактеризованы в табл. 1 и 2. Исследование было одобрено этическим комитетом Центра

Таблица 1. Характеристика выборки пациентов с колоректальным раком ($n = 102$)

Стадия заболевания	Пол	Возраст, лет	Число пациентов
I–II	М	54,3 ± 16,4	13
	Ж	62,1 ± 11,2	8
III	М	59,3 ± 14,2	49
	Ж	58,9 ± 14,0	32

Таблица 2. Характеристика выборки пациентов без онкологических заболеваний кишечника ($n = 100$)

Заболевание	Пол	Возраст, лет	Число пациентов
Хронический колит	М	36,5 ± 19,3	10
	Ж	38,4 ± 10,8	16
Неспецифический язвенный колит	М	26,5 ± 8,3	4
	Ж	42,2 ± 11,7	20
Болезнь Крона	М	31,5 ± 6,3	4
	Ж	28,4 ± 4,8	4
Без патологии кишечника	М	46,5 ± 17,1	15
	Ж	49,4 ± 19,2	27

новых медицинских технологий в Новосибирске (протокол № 18 от 24.10.2014). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в эксперименте.

Для исследования получали периферическую кровь. Кровь (около 10 мл) отбирали из вены в пробирку Vacutainer с антикоагулянтом ЭДТА, тщательно, но мягко перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 1 600 g и комнатной температуре. Полученную плазму (около 4–5 мл) осторожно отбирали, не захватывая осадка, и переносили в пробирки с коническим дном объемом 15 мл. Центрифугировали еще раз, плазму переносили в пробирки объемом 1,5 мл, замораживали и хранили при –80 °С. Для получения пулов объединяли по 50 мкл 10 образцов плазмы из одной группы.

МикроРНК для анализа выделяли из замороженной плазмы крови. Перед этим к каждому образцу добавляли внутренний контроль — синтетическую микроРНК cel-238, 5 x 10⁷ копий на образец. Он позволял следить за качеством экстракции РНК и полимеразной цепной реакции (ПЦР), например за отсутствием в образце ингибиторов реакции. Количество копий cel-238 использовали в качестве нормировочного коэффициента при вычислении количества копий тестируемых микроРНК в образце.

Количество микроРНК определяли при помощи добавления поли-А тракта поли-А-полимеразой и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией результатов в «реальном времени». Для реакции ОТ использовали праймер, содержащий на 3'-конце 5–6 оснований, комплементарных 3'-концу микроРНК, затем последовательность из 11 тиминов и области для посадки гидролизуемого флуоресцентно меченного зонда и универсального обратного праймера (табл. 3).

Полученные в реакции обратной транскрипции кДНК, разведенные в 5 раз для исключения ингибирования, амплифицировали методом ПЦР с детекцией результатов в «реальном времени» при помощи специфичного прямого и универсального обратного праймеров и универсального зонда. Использовали термоциклер с оптическим блоком для детекции флуоресценции CFX96 (Bio-Rad, США). Схема амплификации: первичная денатурация — 15 мин при 96 °С; амплификационный цикл (x40): денатурация — 10 с при 96 °С, отжиг праймеров — 20 с при 56 °С, элонгация — 10 с при 72 °С, съём сигнала — 10 с. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 65 мМ Tris-HCl (pH 8,9), 3 мМ MgCl₂, 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2 мМ dNTP, 300 нМ праймеров и 100 нМ гидролизуемого флуоресцентно меченного зонда, 0,5 ед. акт. Taq-полимеразы с «горячим стартом» (Biosan, ИХБФМ СО РАН) и 2 мкл кДНК.

Представленность микроРНК определяли в условных единицах по калибровочной кривой, построенной на основе 4 последовательных 4-кратных разведений тестовой кДНК, представляющей собой сконцентрированную в 5 раз смесь кДНК 5 случайных образцов (при этом наименьшая концентрация образцов калибровочной кривой принята за 1 усл. ед.). Коэффициент корреляции между ожидаемым и эмпирическим уравнениями калибровочной кривой был не менее 0,99. Эффективность ПЦР рассчитывали как угол наклона калибровочной кривой. Эффективность ПЦР, определенная методом построения калибровочной кривой для miR-146a, составила 82 %, а для cel-238 — 93 %. Во всех случаях измеряемые значения попадали в линейную область калибровочной кривой. Для оценки воспроизводимости значений порогового цикла (Ct) образец кДНК с каждой парой праймеров амплифицировался в двух повторностях. В целом мы старались не проводить измерений при Ct > 37.

Нормальность распределения полученных нормированных значений концентрации микроРНК проверяли с помощью Anderson–Darling Normality Test. Для определения статистической значимости различий значений концентрации микроРНК в группах использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для ROC-анализа воспользовались программным обеспечением Web-based Calculator for ROC Curves [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами было проведено выделение микроРНК, синтез кДНК и определение концентраций микроРНК miR-146a и cel-238 в индивидуальных образцах плазмы крови и в их пулах. Для удобства мы обозначили опытную группу буквой Т, а контрольную — К.

Медиана нормированного уровня miR-146a в условных единицах составила 9,7 в группе Т против 4,65 в группе К при анализе пулов (табл. 4, рис. 1) и 7,6 против 2,5 соответственно при анализе индивидуальных образцов (табл. 4, рис. 2). Уровень miR-146a был достоверно выше как в пулах, так и в индивидуальных образцах пациентов с колоректальным раком.

Для оценки диагностического потенциала теста нами был проведен ROC-анализ, который показал следующие значения: AUC = 0,79, SD = 0,018, оптимальные значения диагностической чувствительности — 47,3 %, специфичности — 91,5 % при выставлении порогового уровня miR-146a 4 условных единицы (рис. 3).

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных праймеров и гидролизующихся флуоресцентно меченных зондов использованных в работе.

МикроРНК	Олигонуклеотид	Последовательность
miR-146a	U	5'- ggctgagaactgaattccat-3'
	R	5'-gagcaggggtccgaggt-3'
	Зонд	5'-HEX-accaccgcaccacgccc-BHQ-3'
	RT	5'-gagcaggggtccgaggtaccaccgcaccacgccccttttttttaaccca -3'
cel-238	U	5' -ttgtactccgatgcc-3'
	R	5'-gagcaggggtccgaggt-3'
	Зонд	5'-FAM-tcgacagaccaccgccc-BHQ-3'
	RT	5'-gagcaggggtccgaggtatcgacagaccaccgcccctttttttctctgaa-3'

Таблица 4. Анализ ассоциации концентрации микроРНК miR-146a в плазме крови пациентов с колоректальным раком (Т) и пациентов контрольной группы (К)

Показатель	Т (пул)	К (пул)	Т	К
Размер выборки	10	10	102	100
Среднее значение	10,28	4,8	7,40	2,58
Стандартное отклонение	3,98	2,23	3,04	0,97
Медиана	9,7	4,65	7,6	2,5
P-value (критерий Манна–Уитни)	0,0019		< 0,0001	

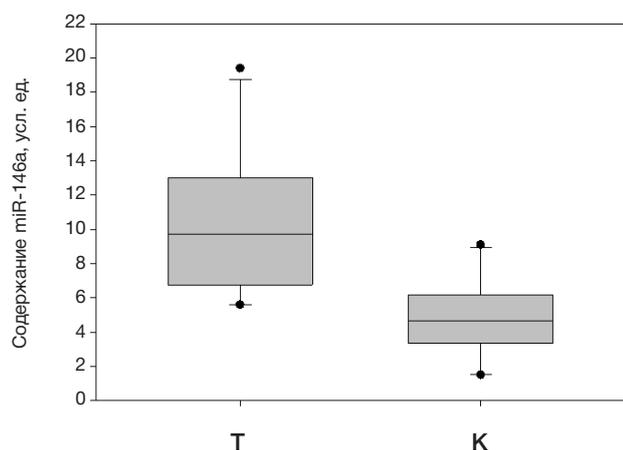


Рис. 1. Распределение нормированных значений содержания miR-146a в условных единицах в 10-ти пулах плазм от пациентов с колоректальным раком (Т) и без него (К)

Сравнение группы условно здоровых людей ($n = 42$) и пациентов с гранулематозным и язвенным колитом ($n = 58$) показало, что пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника имеют повышенный уровень miR-146a в плазме крови (в среднем $3,1 \pm 1,61$ против $2,33 \pm 0,67$ соответственно), однако различия менее выраженные и имеют значительно меньшую статистическую значимость (критерий Манна–Уитни, $p = 0,01$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Циркулирующие микроРНК как биомаркеры колоректального рака находятся в фарватере поиска новых методов диагностики онкологических заболеваний [15]. МикроРНК miR-146a рассматривалась в этом аспекте только однажды и не показала диагностической значимости [16]. В то же время есть несколько причин для включения этой микроРНК в список потенциальных биомаркеров для диагностики КРР. Ранее рядом авторов было показано, что miR-146a вовлечена в супрессию воспаления посредством угнетения сигнального пути NF- κ B [17], по крайней мере — за счет супрессии генов *TRAF6* и *IRAK1* [18]. Повышенная концентрация miR-146a в плазме крови наблюдается при ряде воспалительных заболеваний, например при сепсисе [19]. Это может быть следствием сверхстимуляции молекулярных механизмов, ограничивающих воспаление. Вместе с тем пока мы не можем определенно указать как типы клеток, так и конкретные молекулярные механизмы, приводящие к увеличению количества miR-146a в циркуляции при некоторых онкологических заболеваниях, в том числе колоректальном раке. Ассоциативные исследования показали, что полиморфный вариант *rs2910164* в гене miR-

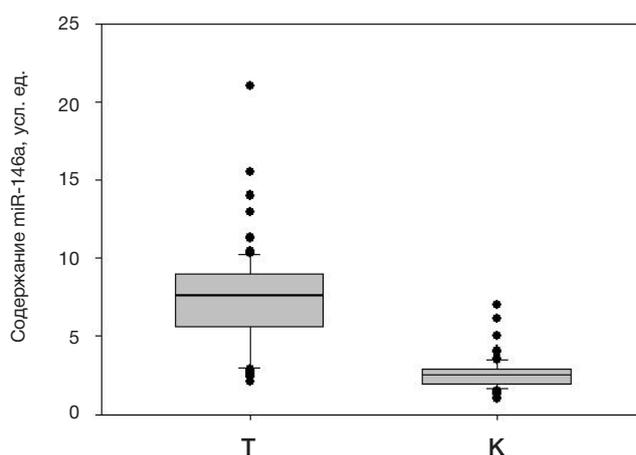


Рис. 2. Распределение нормированных значений содержания miR-146a в условных единицах в плазме пациентов с колоректальным раком (Т) и без него (К)

146a ассоциирован с ростом риска развития рака пищеварительной системы различных типов [19, 20], что также обосновывает наш выбор.

В нашем исследовании показана статистически значимая ассоциация ($p < 0,0001$) повышенной концентрации miR-146a с раком толстого кишечника. Более того, измерение количества miR-146a в пулах показало меньшую, но также статистически значимую ассоциацию. Формирование пулов образцов ранее неоднократно было

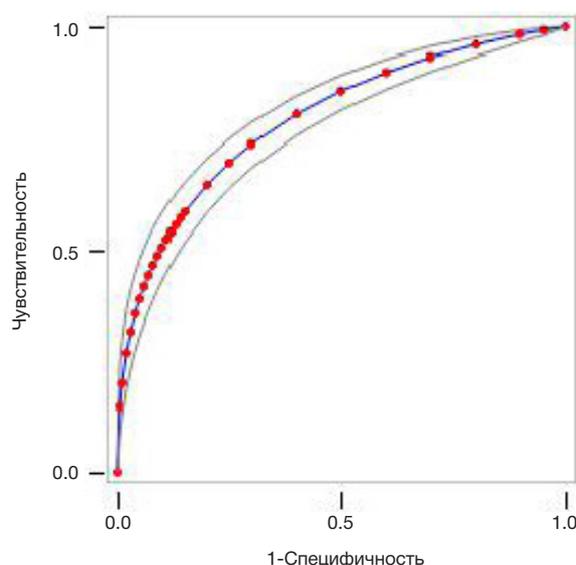


Рис. 3. ROC — кривая (голубой цвет), построенная на данных распределения измеренного уровня miR-146a в условных единицах в плазме пациентов с колоректальным раком и без него. Доверительные интервалы представлены в виде кривых серого цвета

использовано в качестве метода прескрининга для повышения производительности и снижения стоимости исследований [21, 22]. Однако работ по валидации такого подхода немного. В настоящем исследовании мы показали возможность редукции тестируемых образцов с помощью формирования пулов по 10 образцов плазмы крови для первичного скрининга.

Несмотря на статистически значимое повышенное содержание miR-146a в плазме крови пациентов с колоректальным раком в сравнении с пациентами без этой онкопатологии, ROC-анализ показал довольно умеренный AUC, равный $0,79 \pm 0,018$, с неудовлетворительной диагностической чувствительностью (47,3 %). Более того, концентрация miR-146a была достоверно повышена и у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, что неудивительно, учитывая важную роль miR-146a в регуляции воспаления. Ранее увеличение количества miR-146 в плазме крови наблюдали у пациентов с аутоиммунным

тиреоидитом [24], при сепсисе [19] и других заболеваниях с воспалительным компонентом.

ВЫВОДЫ

По результатам исследования можно сделать вывод о достаточно низкой специфичности изолированной количественной детекции miR-146a в плазме крови как метода диагностики при колоректальном раке. Специфичность и чувствительность использованного подхода могут быть уточнены только в проспективных исследованиях, которых сейчас крайне мало. Вместе с тем функциональная связь miR-146a, воспаления и колоректального канцерогенеза, а также высокая значимость полученной ассоциации повышенной концентрации miR-146a в плазме крови и КРР, делают эту микроРНК кандидатом на включение в состав диагностических профилей на основе нескольких микроРНК с улучшенной специфичностью.

Литература

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29; 105 (30): 10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
- Olivieri F, Rippo MR, Monsurrò V, Salvioli S, Capri M, Procopio AD, Franceschi C. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev*. 2013 Sep; 12 (4): 1056–68. DOI: 10.1016/j.arr.2013.05.001.
- Dlouhá D, Hubáček JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res*. 2017 Apr 5; 66 (Supplementum 1): S21–S38.
- Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016 Oct; 30 (5): 665–76. DOI: 10.1016/j.beem.2016.11.010.
- Victoria B, Nunez Lopez YO, Masternak MM. MicroRNAs and the metabolic hallmarks of aging. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Jan 5; 455: 131–47. DOI: 10.1016/j.mce.2016.12.021.
- Moridikia A, Mirzaei H, Sahebkar A, Salimian J. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2017 Jan 16. DOI: 10.1002/jcp.25801.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct; 1 (12): 882–91.
- Li HG, Zhao LH, Bao XB, Sun PC, Zhai BP. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18 (14): 2048–57.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct; 18 (10): 997–1006. DOI: 10.1038/cr.2008.282.
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009 Oct; 58 (10): 1375–81. DOI: 10.1136/gut.2008.167817.
- Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2015; 15 (2): 103–13. DOI: 10.3233/CBM-140456.
- Yuan Z, Baker K, Redman MW, Wang L, Adams SV, Yu M et al. Dynamic plasma microRNAs are biomarkers for prognosis and early detection of recurrence in colorectal cancer. *Br J Cancer*. Epub 2017 Aug 15. DOI: 10.1038/bjc.2017.266.
- SysCol [Internet]. Huddinge, Sweden: Karolinska Institutet [cited 2017 Aug]. Available from: <http://syscol-project.eu>.
- Eng J. ROC analysis: web-based calculator for ROC curves. Baltimore: Johns Hopkins University [updated 2014 Mar 19; cited 2017 Aug]. Available from: <http://www.jrocf.it.org>.
- Yang Y, Gu X, Zhou M, Xiang J, Chen Z. Serum microRNAs: A new diagnostic method for colorectal cancer. *Biomed Rep*. 2013 Jul; 1 (4): 495–8. DOI: 10.3892/br.2013.109.
- Zekri AR, Youssef AS1, Lotfy MM, Gabr R, Ahmed OS, Nassar A et al. Circulating Serum miRNAs as Diagnostic Markers for Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016 May 2; 11 (5): e0154130. DOI: 10.1371/journal.pone.0154130.
- Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in immunity and disease. *Mol Biol Int*. 2011; 2011: 437301. DOI: 10.4061/2011/437301.
- Magilnick N, Reyes EY, Wang WL, Vonderfecht SL, Gohda J, Inoue JI et al. miR-146a-Traf6 regulatory axis controls autoimmunity and myelopoiesis, but is dispensable for hematopoietic stem cell homeostasis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 22; 114 (34): E7140–9. DOI: 10.1073/pnas.1706833114.
- Han Y, Li Y, Jiang Y. The Prognostic Value of Plasma MicroRNA-155 and MicroRNA-146a Level in Severe Sepsis and Sepsis-Induced Acute Lung Injury Patients. *Clin Lab*. 2016 Dec 1; 62 (12): 2355–60. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160511.
- Xie M, Li Y, Wu J, Wu J. A risk of digestive tract neoplasms susceptibility in miR-146a and miR-196a2. *Fam Cancer*. 2015 Jun; 14 (2): 229–39. DOI: 10.1007/s10689-014-9776-6.
- Sun Y, Li M. Genetic polymorphism of miR-146a is associated with gastric cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Mar; 26 (2). DOI: 10.1111/ecc.12355.
- Zhou X, Zhu W, Li H, Wen W, Cheng W, Wang F et al. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Sci Rep*. 2015 Jun 10; 5: 11251.
- Pihlström L, Rengmark A, Björnarå KA, Toft M. Effective variant detection by targeted deep sequencing of DNA pools: an example from Parkinson's disease. *Ann Hum Genet*. 2014 May; 78 (3): 243–52. DOI: 10.1111/ahg.12060.
- Otsu H, Watanabe M, Inoue N, Masutani R, Iwatani Y. Intraindividual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1; 55 (5): 626–35. DOI: 10.1515/cclm-2016-0449.

References

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29; 105 (30): 10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
- Olivieri F, Rippo MR, Monsurrò V, Salvioli S, Capri M, Procopio AD, Franceschi C. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev*. 2013 Sep; 12 (4): 1056–68. DOI: 10.1016/j.arr.2013.05.001.
- Dlouhá D, Hubáček JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res*. 2017 Apr 5; 66 (Supplementum 1): S21–S38.
- Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016 Oct; 30 (5): 665–76. DOI: 10.1016/j.beem.2016.11.010.
- Victoria B, Nunez Lopez YO, Masternak MM. MicroRNAs and the metabolic hallmarks of aging. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Jan 5; 455: 131–47. DOI: 10.1016/j.mce.2016.12.021.
- Moridkia A, Mirzaei H, Sahebkar A, Salimian J. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2017 Jan 16. DOI: 10.1002/jcp.25801.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct; 1 (12): 882–91.
- Li HG, Zhao LH, Bao XB, Sun PC, Zhai BP. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18 (14): 2048–57.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct; 18 (10): 997–1006. DOI: 10.1038/cr.2008.282.
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009 Oct; 58 (10): 1375–81. DOI: 10.1136/gut.2008.167817.
- Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2015; 15 (2): 103–13. DOI: 10.3233/CBM-140456.
- Yuan Z, Baker K, Redman MW, Wang L, Adams SV, Yu M et al. Dynamic plasma microRNAs are biomarkers for prognosis and early detection of recurrence in colorectal cancer. *Br J Cancer*. Epub 2017 Aug 15. DOI: 10.1038/bjc.2017.266.
- SysCol [Internet]. Huddinge, Sweden: Karolinska Institutet [cited 2017 Aug]. Available from: <http://syscol-project.eu>.
- Eng J. ROC analysis: web-based calculator for ROC curves. Baltimore: Johns Hopkins University [updated 2014 Mar 19; cited 2017 Aug]. Available from: <http://www.jrocfits.org>.
- Yang Y, Gu X, Zhou M, Xiang J, Chen Z. Serum microRNAs: A new diagnostic method for colorectal cancer. *Biomed Rep*. 2013 Jul; 1 (4): 495–8. DOI: 10.3892/br.2013.109.
- Zekri AR, Youssef AS1, Lotfy MM, Gabr R, Ahmed OS, Nassar A et al. Circulating Serum miRNAs as Diagnostic Markers for Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016 May 2; 11 (5): e0154130. DOI: 10.1371/journal.pone.0154130.
- Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in immunity and disease. *Mol Biol Int*. 2011; 2011: 437301. DOI: 10.4061/2011/437301.
- Magilnick N, Reyes EY, Wang WL, Vonderfecht SL, Gohda J, Inoue JI et al. miR-146a-Traf6 regulatory axis controls autoimmunity and myelopoiesis, but is dispensable for hematopoietic stem cell homeostasis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 22; 114 (34): E7140–9. DOI: 10.1073/pnas.1706833114.
- Han Y, Li Y, Jiang Y. The Prognostic Value of Plasma MicroRNA-155 and MicroRNA-146a Level in Severe Sepsis and Sepsis-Induced Acute Lung Injury Patients. *Clin Lab*. 2016 Dec 1; 62 (12): 2355–60. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160511.
- Xie M, Li Y, Wu J, Wu J. A risk of digestive tract neoplasms susceptibility in miR-146a and miR-196a2. *Fam Cancer*. 2015 Jun; 14 (2): 229–39. DOI: 10.1007/s10689-014-9776-6.
- Sun Y, Li M. Genetic polymorphism of miR-146a is associated with gastric cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Mar; 26 (2). DOI: 10.1111/ecc.12355.
- Zhou X, Zhu W, Li H, Wen W, Cheng W, Wang F et al. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Sci Rep*. 2015 Jun 10; 5: 11251.
- Pihlström L, Rengmark A, Bjørnå KA, Toft M. Effective variant detection by targeted deep sequencing of DNA pools: an example from Parkinson's disease. *Ann Hum Genet*. 2014 May; 78 (3): 243–52. DOI: 10.1111/ahg.12060.
- Otsu H, Watanabe M, Inoue N, Masutani R, Iwatani Y. Intraindividual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1; 55 (5): 626–35. DOI: 10.1515/cclm-2016-0449.