

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Anne Mari Roost

**Plasma mikroRNAd kui potentsiaalsed endometriooosi mitteinvasiivsed
biomarkerid**

Magistritöö

Juhendajad
Maire Peters, Ph.D
Kadri Rekker, M.Sc
Prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D

TARTU 2014

SISUKORD	
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Lühülevaade mikroRNAdest	7
1.1.1 mikroRNAd.....	7
1.1.2 miRNAd biogenees	8
1.1.3 Vereplasma mikroRNAd mitteinvasiivsete biomarkeritena	10
1.1.4 miRNAd määramise meetodid	13
1.1.4.1 Kvantitatiivne reaalaeg PCR.....	13
1.1.4.2 miRNAd mikrokiibid	16
1.1.4.3 In situ hübridiseerimine (ISH).....	17
1.1.4.4 Süvasekveneerimine.....	18
1.1.4.5 Nanostring nCounter tehnoloogia.....	18
1.1.5 miRNAd ekspressiooni mõjutavad füsioloogilised tegurid.....	19
1.2 Endometriosis	21
1.2.1 Endometriosisi kujunemismehhanismid	21
1.2.2 Endometriosisikolded	23
1.2.3 Endometriosisi staadiumid.....	25
1.2.4 Endometriosisi diagnostika.....	26
1.2.4.1 Biomarkerid endometriosisi mitteinvasiivses diagnostikas	26
1.2.4.1.1 Tsütokiinid	27
1.2.4.1.2 Proteoomika markerid.....	27
1.2.4.1.3 miRNAd.....	28
1.2.5 Endometriosis ja miR-200 perekond	29
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	31
2.1 Töö eesmärgid	31
2.2 Materjal ja meetodika	31
2.2.1 Valimi kirjeldus.....	31
2.2.1.1 Üldvalim	31
2.2.1.2 Tsirkaadse rütmi katse valim.....	33
2.2.2 Vereproovide töötlemine.....	33
2.2.3 RNA eraldamine.....	33
2.2.3.1 RNA eraldamine vereplasmast	33
2.2.3.2 RNA eraldamine koest	34
2.2.3.3 RNA eraldamine eksosoomidest	34
2.2.3.4 RNA eraldamine tuumaga vererakkude fraktsioonist.....	34

2.2.4. miRNA ekspressioonitaseme määramine	34
2.2.5 Andmeanalüüs	36
2.3 Tulemused.....	38
2.3.1 Endometrioosiga ja endometrioosita naiste plasma miR-200 perekonna taseme analüüs.....	38
2.3.1.1 miR-200 perekonna ekspressioonitaseme sõltuvus vereproovi võtmise ajast ...	40
2.3.1.2 miR-200 perekonna ekspressioonitaseme sõltuvus tsirkaadsest rütmist.....	41
2.3.1.3 miR-200 perekonna markerite sensitiivsus ja spetsiifilisus.....	42
2.3.2 Vereplasmast detekteeritavate miRNAde ekspressioonitasemete erinevuse päritolu analüüs	44
2.3.2.1 miR-200 perekonna ekspressioon endomeetriumi koes.....	44
2.3.2.2 miR-200 perekonna ekspressioon eksosoomides.....	44
2.3.2.3 Tuumaga vererakkudest eraldatud miR-200 liikmete ekspressioonitaseme seos tsirkaadse rütmiga	45
2.4 Arutelu	45
2.4.1 Käesoleva töö seosed varasemate samateemaliste uurimustöödega	50
2.4.2 Uurimustöö limitatsioonid	51
KOKKUVÕTE	53
SUMMARY	55
TÄNUAVALDUSED	57
KASUTATUD KIRJANDUS.....	58

KASUTATUD LÜHENDID

AUC – kurvi alune pindala (*area under the curve*)

cDNA – RNA põhjal pöördtranskriptsioonil saadud DNA (*complementary DNA*)

CCL-2 – kemokiini ligand 2 (*chemokine ligand 2*)

CCL-5 – kemokiini ligand 5 (*chemokine ligand 5*)

DGCR8 – kaheaheelalise RNAga seonduv valk (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*)

EMT – epiteelial-mesenhümaalne transitsioon (*epithelial-to-mesenchymal transition*)

ER – östrogeeni retseptor (*estrogen receptor*)

IL-8 – α - kemokiin Interleukiin- 8 (CXCL8)

ISH – *in situ* hübridisatsioon (*in situ hybridization*)

KMI – kehamassiindeks

LNA – LNA ahel koosneb modifitseeritud riboosidega RNA nukleotiididest (*locked nucleic acid*)

MET – mesenhümaal-epiteelialne transitsioon (*mesenchymal-to-epithelial transition*)

miRNA – mikroRNA

mlncRNAd – mRNA sarnased mittekodeerivad RNAd (*mRNA-like noncoding RNAs*)

PR – progesterooni retseptor (*progesterone receptor*)

pre-miRNA – prekursor miRNA

pri-miRNA – primaarne transkript, mis tehakse miRNA geenide pealt

qRT-PCR – kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative real-time polymerase chain reaction*)

RISC – mitmest valgust koosnev struktuur, mis miRNAga seondunult osaleb geeniekspressiooni regulatsioonis (*RNA-induced silencing complex*)

RNAi – RNA interferents (mehhanism, mille käigus RNA molekulid suruvad

posttranslatsiooniliselt geenide aktiivuse ja ekspressiooni maha)

RNU – väike nukleolaarne RNA (snoRNA- *small nucleolar RNA*)

ROC – (*receiver operating characteristic curve*)

SD – standardhälve (*standard deviation*)

SELDI-TOF MS – pinna-täiustatud ioniseerival kiirgusel ehk laseril põhinev desorptsioon-ioniseerimise lennuaja massispektromeetria (ingl. k. *surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*)

sRNA – väike-RNA (*small RNA*)

TGF – tuumori kasvufaktor (*tumor growth factor*)

UTR – mittekodeeriv regioon (*untranslated region*)

ZEB valgud – "tsink-sõrmed" tüüpi transkriptsioonifaktorid (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*)

SISSEJUHATUS

Endometrioos on sage põletikuline krooniline haigus, mida põhjustab endomeetriumi sarnase koe paiknemine väljaspool emakat ja mis võib tugevalt langetada nii naise elukvaliteeti kui viljakust. Endometrioosi täpseks diagnoosimiseks kasutatakse laparoskoopilist läbivaatust, mille käigus hinnatakse endometrioosikollete olemasolu ja levikut. Samas on laparoskoopilise operatsiooni näol siiski tegemist naise tervisele potentsiaalselt ohtliku protseduuriga ning seetõttu suunatakse operatsioonile eelkõige kindlalt endometrioosile viitavate kaebustega patsiendid. Paraku on näidatud, et kuni 20% endometrioosijuhtudest kulgeb kergete sümptomitega või on asümptomaatilised, omades ainukese kaebusena viljatust ning sellised patsiendid jäävad sageli laparoskoopia sihtgrupist välja. Sellistel juhtudel oleks palju kasu biomarkeritest, mille abil saaks endometrioosi tuvastada mitteinvasiivsel meetodil, näiteks verest või uriinist.

Juba mõnda aega on uuritud rakuvaba DNA ja RNA esinemist vereplasmas ja -seerumis ning on leitud, et nende ekspressiooni on võimalik mitmesuguste meetodite abil määrata. Üheks enim huvipakkuvaks võimalike biomarkerite grupiks peetakse mikroRNAsid ehk miRNAsid, mis on lühikesed üheaheelised mittekodeerivad RNAd. miRNAd osalevad väga paljude rakuliste protsesside reguleerimises üle organismi. Tsirkuleerivad miRNAd on stabiilsed ning vastupidavad mitmesugustele välistele teguritele ja mõjutustele, mis muudab nad sobilikeks potentsiaalseteks biomarkeri kandidaatideks.

Mitmesuguste haiguste puhul on näidatud miRNAd ekspressioonitaseme muutuseid ning selliseid haigusspetsiifilisi avaldumisprofiile saaks kasutada ka endometrioosi usaldusväärseks diagnoosimiseks. Oma töös valisime uuritavateks miRNAd rühmaks miR-200 perekonna, kuna varasemalt on näidatud nende muutunud ekspressioonitasemeid endometrioosihaigete endomeetriumis ja endometrioosikolletes.

Käesoleva magistritöö eesmärk oli uurida, kas miR-200 perekonna liikmete hulgas leidub sobivaid mitteinvasiivseid biomarkereid endometrioosi diagnoosimiseks. Uurimus viidi läbi Reproduktiivmeditsiini TAK AS-s.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Lühiülevaade mikroRNAdest

1.1.1 mikroRNAd

mikroRNAd (miRNAd) on lühikesed (~22 nukleotiidsed) üheaahelised mittekodeerivad RNAd, mis mõjutavad valke kodeerivate geenide avaldumist transkriptsioonijärgselt. miRNA seostub komplementaarselt märklaud-mRNA (ingl. k. *messenger RNA*) 3'mittetransleeritavale (ingl.k. UTR – *untranslated region*) järjestusele, mis viib mRNA lagundamiseni või translatsioonilise repressioonini (ülevaateartiklist Bartel, 2004).

Tänapäevaste analüüsiprogrammidega on tuvastatud suur hulk miRNAsid ja nende gene nii inimese kui paljude loomade, taimede ja viiruste genoomides (ülevaateartiklist Zhang jt., 2007). Kõigi nende puhul on näidatud, et miRNA geenide arv jääb arvatavasti umbes 1-5% lähedale organismi ennustatud geenide koguarvust (ülevaateartiklist Zhang jt., 2007). miRBase andmebaasi (www.mirbase.org) andmetel on inimesel praeguseks (seisuga 22. mai 2014) leitud 2578 miRNA prekursor järjestust.

miRNAd reguleerivad imetajates hinnanguliselt kuni 30% valke kodeerivate geenide aktiivsusest (Filipowicz jt., 2008). Funktsionaalsete uuringute põhjal arvatakse, et miRNAd osalevad peaaegu kõikide senini uuritud rakuliste protsesside regulatsioonis ning on leitud, et nende ekspressioon on muutunud erinevate patoloogiliste seisundite korral (Kloosterman jt., 2006; Chang ja Mendell, 2007). Muuhulgas on näidatud miRNAd olulist rolli arengu kontrollis, apoptoosis, raku proliferatsioonis, organite arengus, hematopoeetilises rakkude diferentseerumises ning patogeen-peremees interaktsioonides (ülevaateartiklist Bartel, 2004; Nair ja Zavolan, 2006).

Alates 2000. aastast on erinevates organismides pidevalt avastatud uusi miRNAsid ja nende gene, mille puhul saab rääkida ekspressioonist nii organismi erinevates arenguetappides kui ka erinevates rakutüüpides (ülevaateartiklist Bartel, 2004). miRNAd ruumilise paiknemise analüüsid on näidanud, et miRNAd ekspresseeruvad arengu jooksul väga koespetsiifiliselt, mis viitab sellele, et miRNAd osalevad koespetsiifika ja -identiteedi määramisel ning säilitamisel (Kloosterman jt., 2006b; Wienholds jt., 2005). Lisaks koespetsiifilisele lähenemisele on tehtud uurimusi, mis rõhutavad ühe miRNA potentsiaali

osaleda selgelt eristatavates radades mitmes koes ehk omada rohkem kui ühte rolli (Chang ja Mendell, 2007). Seda võimaldab asjaolu, et üks miRNA võib interakteeruda rohkem kui ühe märklauaga, kuna miRNA ja mRNA vaheline paardumine ei pea olema täielikult komplementaarne. Ka vastupidi, ühte märklauda võivad reguleerida erinevad miRNAd (Dong jt., 2013).

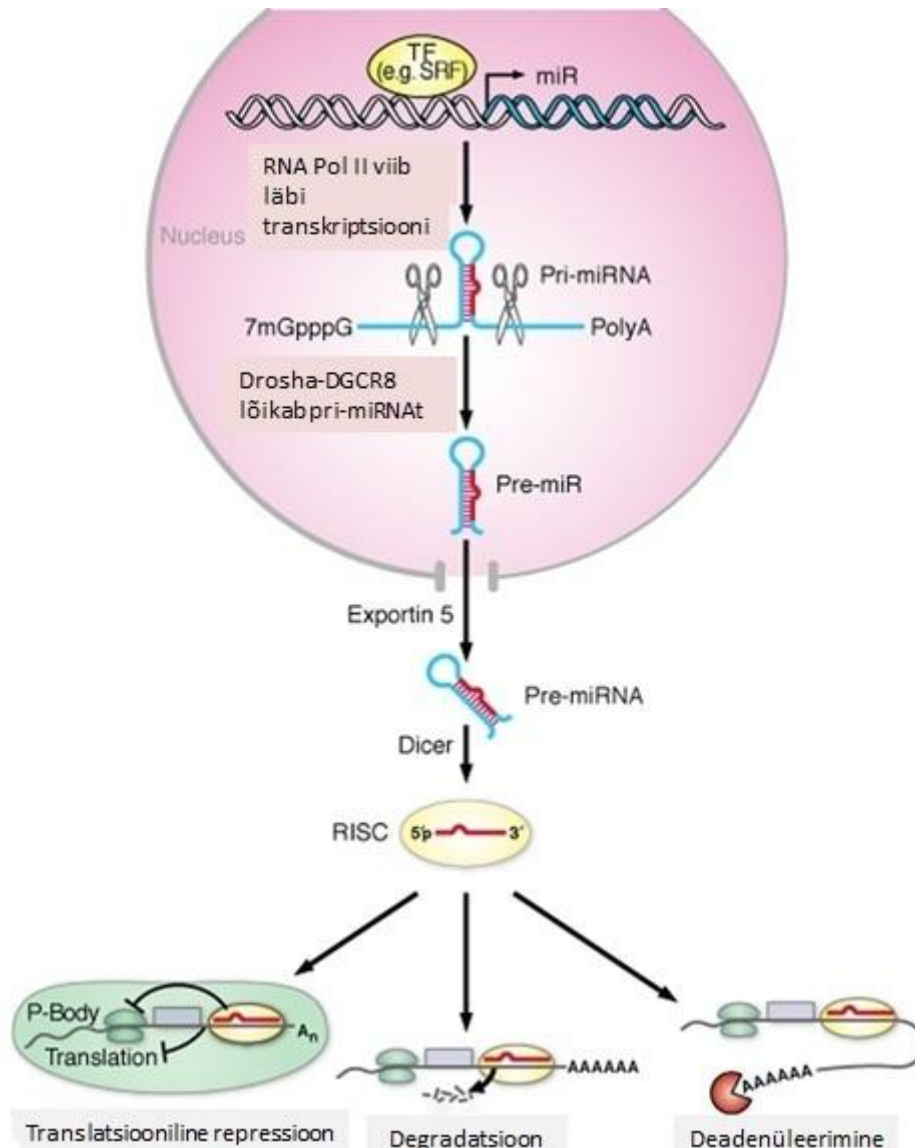
Lisaks osalemisele mitmesugustes organismide normaalseks elutegevuseks vajalikes protsessides on miRNAd seotud paljude haigustega, erilist tähelepanu on pööratud miRNade ja vähi vaheliste interaktsioonide uurimisele (Chang ja Mendell, 2007). Praeguseks on näidatud miRNade osalust peaaegu kõigi vähitüüpide puhul (Li jt., 2009). Lisaks sellele on teadlased katsete ja assotsiatsiooniuringute käigus leidnud muutuseid miRNA ekspressioonis näiteks kardiovaskulaarsete haiguste (van Rooij jt., 2006; Edwards jt., 2010), autoimmuunhaiguste (Sonkoly jt., 2007; Stanczyk jt., 2008) ja neurodegeneratiivsete haiguste (Christensen ja Schratt, 2009) korral.

1.1.2 miRNade biogenees

miRNade geenid võivad olla ühtlaselt üle genoomi laiali jaotunud või olla koondatud klastritesse, kust neid ilmselt transkribeeritakse multitsistronse primaarse transkriptina (Lagos jt., 2001; Lau jt., 2001; Baskerville ja Bartel, 2005). On näidatud, et sellistesse klastritesse kuuluvatel miRNadel võib olla üksteisega funktsionaalne seos (Baskerville ja Bartel, 2005). Üle poole miRNadest asub oma peremeesgeenide intronites ning koekspresserub neid ümbritsevate valke kodeerivate järjestustega, aga mõned võivad pärineda ka primaarsetest transkriptidest ning jagada nendega promooterit (Baskerville ja Bartel, 2005; Rodriguez jt., 2004; Osokine jt., 2008). Oluline osa miRNA geene paikneb intergeenses regioonis (Lagos jt., 2001; Lee jt., 2001; Bartel, 2004), mis viitab sellele, et tõenäoliselt moodustavad nad iseseisva promooteriga transkriptsiooniühiku (ülevaateartiklist Bartel, 2004; Kim, 2005). Umbes 10% miRNadest transkribeeritakse valke mittekodeerivate RNAd (*mlncRNAd- mRNA-like noncoding RNAs*) eksonitelt (Erdmann jt., 2000).

Loomset päritolu miRNade transkriptsioon toimub tuumas RNA polümeraas II (Pol II) (Yoontae jt., 2004) abil (joonis 1), pri-miRNA protsessib väiksemaks vaheühendiks RNAs III endonukleas Drosha, mis lõikab mõlemat RNA ahelat juuksenõel-struktuuri (ingl.k.

stem-loop) basaalse osa lähedalt (Lee jt., 2003). Selle tulemusena moodustub 60-70 (110) nt pikkune juuksenõel-struktuuriga prekursor-miRNA (pre-miRNA) (Lee jt., 2002; Almeida jt., 2011). Drosha moodustab kompleksi koos DGCR8-ga (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*), millel on kaks kaheaheelist RNAd (dsRNA) siduvat domääni (Jinju jt., 2004). Ilma DGCR8 osaluseta pri-miRNA küpsemist ei toimu (Landthaler jt., 2004).



Joonis 1. RNA polümeeras II viib läbi transkriptsiooni, tekib pri-miRNA. Drosha lõikab moodustunud transkripti lühemaks juuksenõel-struktuuriga pre-miRNAks. Viimase transpordib Ekspordiin-5 tuumast välja tsütoplasmasse. Seal lõikab endonukleas Dicer pre-miRNAd nii, et tekib 3' üleulatuvate otstega miRNA-miRNA* dupleks, millel pole enam lingu küljes. Dupleksi juhtiv ahel seondub RISC kompleksiga. RISC kompleksiga seondunult võib miRNA regulatsiooniline aktiivsus märklauad-mRNAle avalduda kolmel moel: translatsiooniline repressioon, märklaua degradatsioon või deadenüleerimine. Millise mehhanismi kaudu toimub geeniekspressiooni kontroll, sõltub miRNA ja märklauad-mRNA vahelise komplementaarsuse ulatusest.

Joonise algallikas: Cordes jt., 2010, modifitseeritud.

Eksportiin-5 ja Ran-GTP transpordivad pre-miRNA tuumast tsütoplasmasse (Yi jt., 2003; Lund jt., 2004), kus ensüüm Dicer (RNAas III) tunneb ära pre-miRNA kaheahelalise osa ning lõikab dupleksi mõlemat ahelat, nii et selle küljest vabaneb pre-miRNA lünga osa ning basaalsed aluspaarid. Alles jääb 5' fosfaatide ja 3' üleulatuvate otstega ebatäielik miRNA dupleks, mille ahelate eristamiseks kasutatakse järelliiteid -3p ja -5p (kasutatud on ka tähistust miRNA-miRNA*). Dupleks sisaldab küpset miRNAd ning sellega sarnast fragmenti, mis tuleneb pre-miRNA teisest õlast (Bartel, 2004). Organismis koguneb see dupleksi ahel, mis ühineb RISC (*RNA-induced silencing complex*) kompleksiga (Khvorova jt., 2003; Schwarz jt., 2003) – sisaldab Dicerit, Argonautide perekonda kuuluvat valku ning veel mitmeid komponente (Hutvagner ja Zamore, 2002). Varem arvati, et dupleksi teine ahel enamasti lagundatakse. Viimase aja uurimused on aga näidanud, et sageli võivad mõlemad dupleksi ahelad olla funktsionaalsed ning osaleda geeniekspressiooni regulatsioonis (Yang jt., 2011). Oma bioloogilise funktsiooni täitmiseks peab miRNA seonduma mRNAle. Reeglina toimub märklauaga paardumine mRNA 3' UTR kaudu, aga on üksikuid andmeid, et seondumine võib toimuda ka 5' UTR või kodeerivale järjestusele (Jopling jt., 2005; Tay jt., 2008). RISC kompleksiga ühinenud miRNA määrab märklaud-mRNA degradatsiooni, kui nende vahel on piisav komplementaarsus, ning translatsiooni inhibitsiooni, kui ahelate paardumine pole küllalt täielik, kuid mRNA on siiski miRNAga komplementaarseid järjestusi (Hutvagner ja Zamore, 2002; Zeng jt., 2002, 2003; Doench jt., 2003). Guo jt. kasutasid 2010. aastal ribosoomi profiile määramaks, milline on vahekord mRNA degradatsiooni ja translatsiooni inhibitsiooni vahel. Teadlased võrdlesid üleüldist mõju valkude tootmisele ning efekti mRNAde tasemele ning järeldasid katsest, et translatsiooni inhibitsiooni mõju (miRNA märklaud-mRNAde tase ei muutunud) valkude taseme kontrollimisel on väike ning domineerib mRNA degradatsiooni mehhanism.

1.1.3 Vereplasma mikroRNAd mitteinvasiivsete biomarkeritena

Mitmete haiguste uurimisel, näiteks erinevate vähitüüpide puhul, on üheks eesmärgiks leida rutiinselt ning lihtsalt mõõdetavad stabiilsed biomarkerid. Eelistatud on biomarkerid, mille proovidest tuvastamine põhjustaks patsiendile võimalikult vähe ebameeldivusi. Võrreldes biopsiaga on vere või mõne muu kehavedeliku proovi võtmine lihtne ning väheinvasiivne meetod. Uuringutega on näidanud, et vereseerumis ja teistes kehavedelikes on võimalik detekteerida rakuvaba DNA ja RNA olemasolu (Mandel ja Métais, 1948; Stroun jt., 1977; Haas jt., 2008). Vastupidiselt rakuvabale mRNAle on kehavedelikes

esinevad miRNAd väga stabiilsed, pidades vastu ka mitmetele äärmuslikele tingimustele, nagu keetmine, mitmekordne külmutamine ja ülessulatamine, madal ja kõrge pH (ülevaateartiklist Brase jt., 2010).

Veres tsirkuleerivad miRNAd pärinevad enamasti vererakkudest endist (Duttagupta jt., 2011; Pritchard jt., 2011), kuid rakuvaba miRNA allikaks võivad olla ka teistest kudedest või organitest pärit rakud. Seerumis ja plasmas leiduvad miRNAd võivad pärineda mitmesugustest allikatest ning enamik rakuvaba miRNAd on seotud kandjamolekulidega (ülevaateartiklist Mo jt., 2012). Ühe teooria kohaselt vabaneb rakuvaba RNA passiivselt kahjustatud või vigastatud koest. Näiteks on pärast südamekoe vigastust tuvastatud seerumis ainuomaselt südames ekspresseeruv miR-208 (Ji jt., 2009). Teiseks on näidatud, et mRNAde ja miRNAde rakkudevaheline ülekande võib toimuda mikrovesiikulite, apoptootiliste kehakeste ja eksosoomide abil (Valadi jt., 2007; Hunter jt., 2008; Zernecke jt., 2009). Eksosoomid on keskmiselt 30-100 nm läbimõõduga, mitmesuguse funktsiooni ja ülesandega osakesed, mis paiknevad multivesikulaarse keha (MVK) ehk hilise endosoomi sees ning selle fuseerumisel plasmamembraaniga vabanevad rakuvälisesse ruumi ning sealt edasi vereringesse (Turchinovich jt., 2011; Raposo ja Stoorvogel, 2013). Mikrovesiikulid on suuremad, 50 nm kuni 1 µm läbimõõduga raku välismembraanilt punguvad osakesed (Koska jt., 2013). Apoptootilised kehakesed võivad olla kuni 5 µm läbimõõduga ning vabastatakse apoptootiliste signaalide toimel ebakorrapärastest raku väljasopististest (Akers jt., 2013; Dong jt., 2013). Selline membraanidega osakeste süsteem aitab miRNAsid kaitsta ekstratsellulaarses ruumis esinevate RNAaside eest ning seeläbi suurendab nende stabiilsust (Dong jt., 2013). Eksosoomide produtseerivad peaaegu kõik rakutüübid, nii hematopoeetilist ja neuraalset päritolu rakud kui ka immuun- ja kasvajakud jt (They jt., 2009; ülevaateartiklist Brase jt., 2010). Lisaks on täheldatud, et miRNAd võivad veres olla mitte-vesikulaarselt, seotuna lipoproteiinide (Vickers jt., 2011) või RNAd siduvate valkudega. miRNAsid transpordivad näiteks Argonaut valkude perekonna esindajad, mis neid ekstratsellulaarses ruumis degradatsiooni eest kaitsevad ning stabiilsuse tagavad (Arroyo jt., 2011).

Tervetel indiviididel on seerumile omaste miRNAde tase stabiilne (Chen jt., 2008; Gilad jt., 2008) ning nende profiil sarnane neid ümbritsevate vererakkude omaga (Chen jt., 2008). Filtreerimised ja erinevad tsentrifuugimise eksperimendid on näidanud, et seerumi miRNAd ei pärine siiski ainult neid ümbritsevatest vereringes tsirkuleerivatest rakkudest

(Mitchell jt., 2008). Chen jt. analüüsisid 2008. aastal tervete ja vähihaigete vereseerumi ja -rakkude miRNA sisaldust ja leidsid, et vähihaigetel patsientidel on rakkude ja seerumi miRNA profiil teineteisest oluliselt erinev. See viis järelduseni, et mõned spetsiifilised vähihaigete seerumi miRNAd ei pärine ilmselt verest, vaid tõenäoliselt kasvajakude või neoplastiliste muutustega koest. Muutused seerumi miRNAd tasemetes on detekteeritavad ja võivad olla märgiks mitmesugustest füsioloogilistest või patoloogilistest muutustest.

Esimesed uurimused tsirkuleerivate miRNAd võimalikust kasutamisest biomarkeritena avaldati 2008. aastal. Lawrie jt. võrdlesid difuusse suurearakulise B-raku lümfoomi patsientide ja tervete kontrollide vereseerumis miR-155, miR-210 ja miR-21 tasemeid ning leidsid, et vastavate miRNAd tase oli vähihaigete seerumis tõusnud (Lawrie jt., 2008). Chen jt. uurisid oma töös nii tervete inimeste miRNA profiile kui ka ekspresioonimuutuseid vähi ja II tüüpi diabeedi korral ning pakkusid välja, et miRNAd näol võiks tegemist olla uute lootustandvate biomarkeri kandidaatidega (Chen jt., 2008). Sellest ajast peale on analüüsitud seerumi ja plasma miRNAd taset väga mitmete haiguste puhul, näiteks osteoartriit, erinevad vähitüübid, mitmesugused neurodegeneratiivsed haigused ja aju patoloogiad nagu Parkinsoni ja Alzheimeri tõbi, autism ja skisofreenia (Almeida ja Calin, 2011; Suryawanshi jt., 2013; ülevaateartiklist Sheinerman ja Umansky, 2013).

Üha kasvav trend on miRNAd diagnostiline skriinimine ka günekoloogiliste patoloogiate korral. Günekoloogilistest haigustest ühe osa moodustavad pahaloomulised kasvajakud ja endometriosis. Palju tähelepanu pööratakse nii endometriosis kui ka vähkidest sageli esinevate endomeetriumi ja emakakaela kasvajakute uurimisele ja nende diagnoosimiseks biomarkerite otsimisele (Moreno-Moya jt., 2013). miRNAd hulgast otsitakse nende haiguste jaoks markerikandidaate mitmel põhjusel. Esiteks on teada, et osadel miRNAdel on oluline reguleeriv funktsioon vähi patogeneesis, kus nad toimivad tuumorsupressorite või onkogeenidena (Volinia jt., 2006; Calore ja Fabbri, 2011). Endometriosis on healoomuline haigus, kuid endometriosisikolletel on vähikolletega nii arengulisi kui molekulaarseid sarnasusi (ülevaateartiklist Varma jt., 2004). Teiseks on praeguseks korduvalt näidatud miRNAd muutunud ekspressiooni mitmete günekoloogiliste haiguste puhul, seal hulgas ka eelmainitud endometriosisi ja endomeetriumi vähi korral (Gilbert-Estellès jt., 2012).

1.1.4 miRNAde määramise meetodid

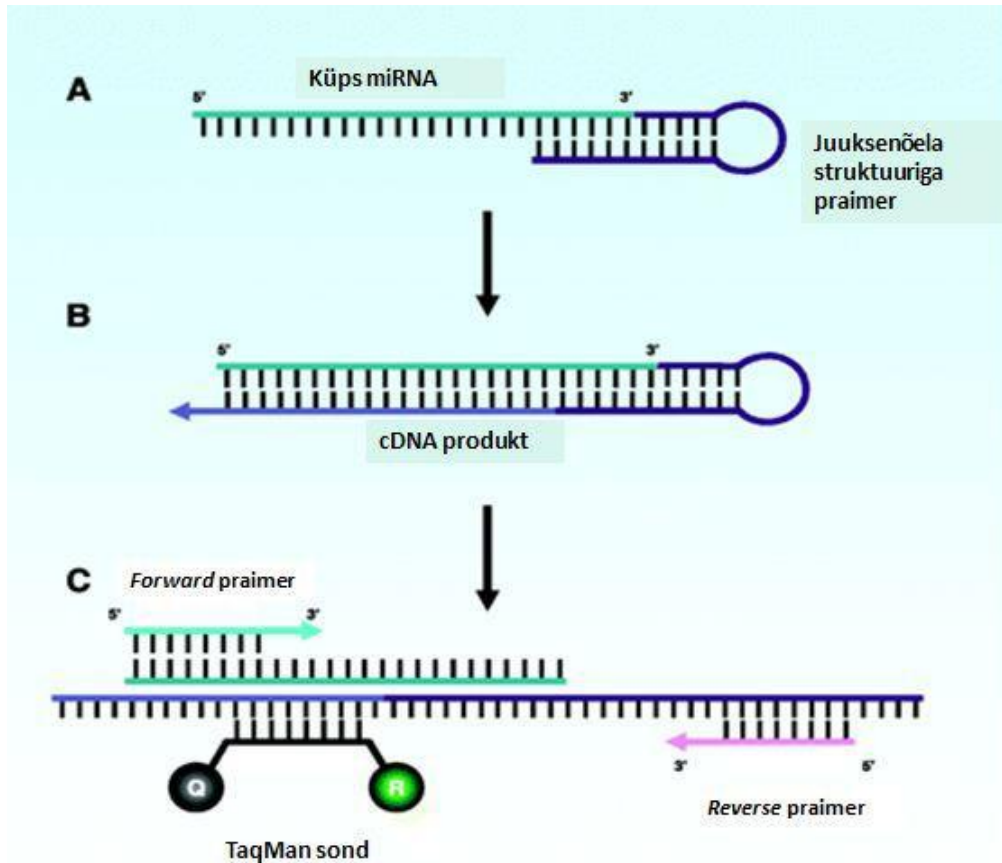
miRNAde kasutamiseks mitteinvasiivsete markeritena peab olema võimalik neid kliinilistest proovidest, näiteks vereplasmast või -seerumist, täpselt ja usaldusväärselt määrata (Andreasen jt., 2010). Määrata saab nii miRNAde esinemise koosseisu kui ka suhtelist rohkest proovis. Tänapäeval kasutatakse miRNAde ekspressiooni tuvastamiseks ja analüüsiks põhiliselt kvantitatiivset reaal-aja PCRi (qRT-PCR) ja mikrokiibi tehnoloogiat (Jensen jt., 2011), aga ka miRNAde *in situ* hübridiseerimist ning süvasekvenerimist (Zhang ja Zeng, 2011). Uus tehnoloogia on Nanostring nCounter, mis kasutab fluorokroomidega märgistatud sünteetilisi RNA segmente, mille põhjal luuakse spetsiifilised molekulaarsed triipkoodid (Geiss jt., 2008).

Küpsete miRNAde hulka proovis on tehniliselt raske määrata mitmel põhjusel. Esiteks on nende tase võrreldes totaalse RNAga üsna madal, seda eriti vereplasma proovides. Teiseks on nad lühikesed, mis raskendab PCR ja hübridisatsioonipõhiste meetodite kasutamist, kuna klassikalised PCR praimerid on miRNAdega sarnase pikkusega ning hübridisatsioonireaktsioonides on lühikest sondi selektiivseks detekteerimiseks raske märgistada (Abraham jt., 2010). Lisaks esineb homoloogiat miRNA rühmade vahel ning küpse miRNA järjestus esineb ka pri-miRNA ja pre-miRNA transkriptis (Jensen jt., 2011). Viimase asjaolu tõttu peab kvantifitseerimisel kasutatav miRNAde äratundev järjestus olema spetsiifiline just küpse vormi suhtes. Nii qRT-PCR kui ka mikrokiibid põhinevad küpsete miRNAde määramisel (Benes jt., 2010; Jensen jt., 2011).

1.1.4.1 Kvantitatiivne reaal-aja PCR

Reaal-aja PCR (qRT-PCR) on üks põhilisi miRNAde kvantifitseerimiseks kasutatavaid meetodeid. qRT-PCR põhimõte on registreerida fluorestseeruva värviga märgistatud nukleiinhappe produkti akumulereerimist PCR reaktsiooni iga tsükli vältel. Antud tehnoloogia plussideks on lihtsus, spetsiifilisus ja tundlikkus. Samuti detekteerimise ja amplifitseerimise etappide ühendamine ühtseks analüüsiks, vältimaks vajadust viia läbi täiendav geelelektroforeesi etapp produktide tuvastamiseks (Bustin jt., 2005). Kvantitatiivse RT-PCR kasutamisel tuleb silmas pidada, et cDNA loomiseks on mitu erinevat meetodit. Seega saab qRT-PCR tulemusi omavahel võrrelda vaid siis, kui on kasutatud sama praimerite süsteemi ja reaktsiooni tingimused on olnud ühesugused (Stahlberg jt., 2004). Samuti on puuduseks see, et küpsete miRNAde sarnane pikkus ja

standardsete praimerite kasutamine limiteerivad klassikaliste qRT-PCR protokollide otsest rakendamist miRNAde detekteerimisel (ülevaateartiklist Li ja Ruan, 2009). Selle probleemi lahendamiseks töötas Applied Biosystems Co. qRT-PCR jaoks välja juuksenõela struktuuriga (ingl.k. *stem loop*) praimer (Joonis 2).



Joonis 2. miRNA amplifitseerimine. A) Juuksenõela struktuuriga praimeriligeerimine küpsele miRNAle. B) Pöördtranskriptsioon ja cDNA moodustumine. C) cDNA amplifitseerimine reaaliajaga PCR-ga, kasutades *forward* ja *reverse* primereid ning TaqMan sondi detekteerimiseks.

Joonise algallikas: Bartels ja Tsongalis, 2009, modifitseeritud.

miRNAde tase vereplasma või -serumi proovides on väga madal ning plasmast eraldatud RNA võib sisaldada inhibiitoreid, mis mõjutavad qRT-PCR efektiivsust. Nende probleemide lahendamiseks on püütud välja töötada erinevaid meetodeid qRT-PCR tundlikkuse ja spetsiifilisuse optimaalse kombinatsiooni saavutamiseks, samuti reprodutseeritavaks miRNAde isolatsiooniks (Andreasen jt., 2010). Üldiselt paistavad qRT-PCR põhised platvormid olema kõrgema tundlikkusega kui mikrokiipidel baseeruvad miRNAde kvantifitseerimisplatvormid, võimaldades tuvastada ka väga madala kontsentratsiooniga miRNAsid (Jensen jt., 2011). Praeguseks on meetod arendatud

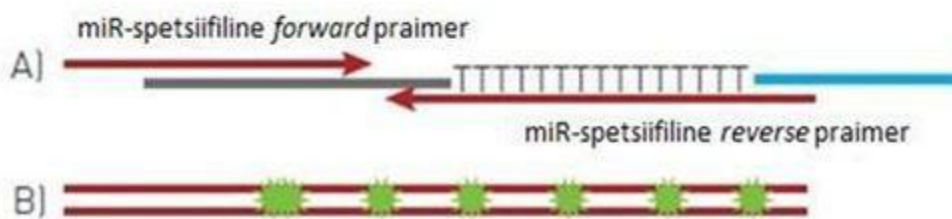
tundlikkuseni, mis võimaldab miRNAsid detekteerida mõnest nanogrammist totaalsest RNAs (Gaur jt., 2007; Moreno-Moya jt., 2013).

Pöördtranskriptsioonil saab miRNAsid transkribeerida individuaalselt, nii et iga miRNA jaoks on spetsiifiline praimer või lisatakse kõikidele miRNAdele mingi ühine järjestus ning pöördtranskriptsioonil kasutatakse universaalseid primereid (Jensen jt., 2011). Universaalse pöördtranskriptsiooni etapi kasutamine erinevalt geenispetsiifilisest võimaldab sadade märklaudade kvantifitseerimist samast cDNA sünteesist, mis tähendab, et väheneb vajadus suure proovi hulga järele (Andreasen jt., 2010). Universaalsete praimerite kasutamisel on meetodi tundlikkus väiksem kui geenispetsiifiliste praimerite puhul, sest madalate kontsentratsioonidega miRNAd võivad jääda tuvastamata. Andreasen jt. (2010) on välja töötanud uue meetodi miRNAde uurimiseks qRT-PCRga. Selles protsessis on cDNA süntees ja polüadenüleerimine ühendatud ühiseks pöördtranskriptsiooni etapiks, millele järgneb miRNAde amplifitseerimine kahe miRNA-spetsiifilise LNA-ga (ingl.k. LNA – *Locked Nucleic Acid*) rikastatud praimeriga (Joonis 3). LNA monomeeriks on modifitseeritud RNA nukleotiid, mille riboosi 2' hapnik on seotud 4' süsinikuga lisasideme kaudu. LNAGA rikastatud oligonukleotiididel on kõrge hüdriidiseerumise afiinsus komplementaarse DNA ja RNA vastu (Kaur jt., 2006). LNA lisamine võimaldab lühikeste ja samal ajal väga spetsiifiliste *forward* praimerite konstrueerimist, mis katavad enamiku miRNA järjestusest. LNAGA on rikastatud ka *reverse* praimerid, mis sobituvad miRNA 3' järjestusega. Tänu unikaalsele kahe miRNA-spetsiifilise praimeriga kombinatsioonile saab süsteem olla üheaegu nii spetsiifiline kui ka tundlik, viimast tänu universaalse pöördtranskriptsiooni ja LNA-rikastatud PCR ühendamisele (Andreasen jt., 2010).

Samm 1: Esimese ahela süntees (RT)



Samm 2: Reaal-aja PCR amplifikatsioon



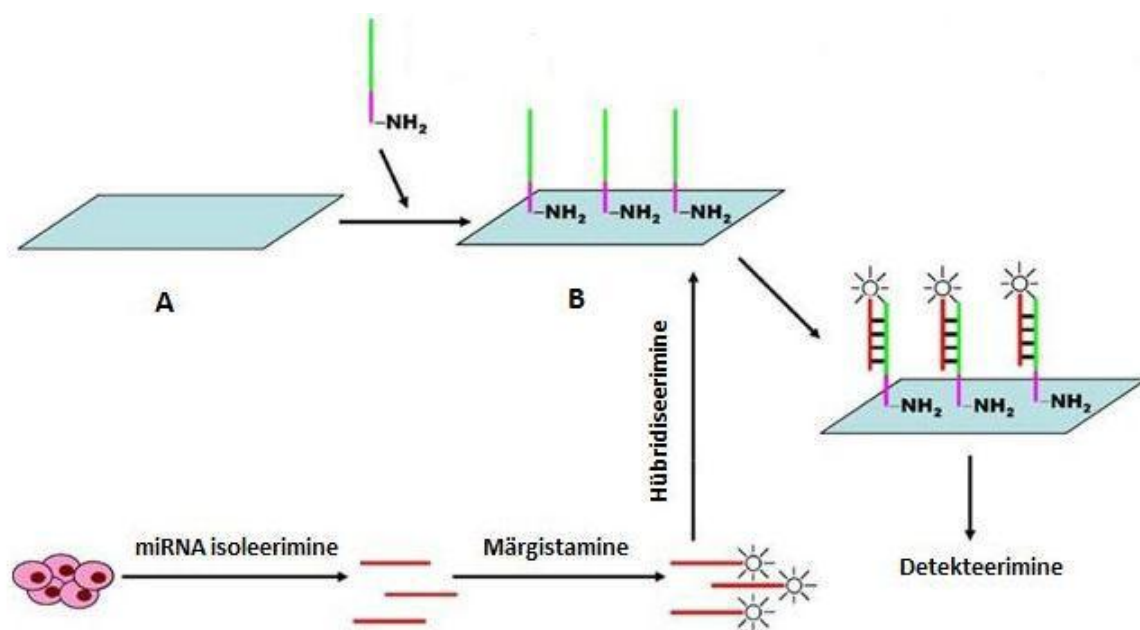
Joonis 3. miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR süsteemi põhimõte. 1A) Küpsele miRNA ahelale lisatakse polü-A saba. 1B) cDNA süntees kasutades polü-T praimerit. 2A) cDNA amplifitseeritakse kasutades miRNA-spetsiifisi ja LNA-ga rikastatud *forward* ja *reverse* praimereid. 2B) Detektsiooniks kasutatakse SYBR Green-i. Joonise algallikas: www.exiqon.com, modifitseeritud.

1.1.4.2 miRNAde mikrokiibid

miRNAde mikrokiibi tehnoloogia on laialt levinud tänu võimalusele samaaegselt mõõta sadade miRNAde ekspressioonitaset (Sah jt., 2010) ning seetõttu kasutatakse seda sageli skriininguteks (Dong jt., 2013). Samuti on see meetod suhteliselt odav võrreldes qRT-PCR ja süvasekveneerimisega (Zhang ja Zeng, 2011). Miinuseks on analüüsiks vajamineva RNA suur hulk (Brase jt., 2010), samuti keerukas andmeanalüüs ning vajadus tulemusi qRT-PCR-ga valideerida (Moreno-Moya jt., 2013).

Mikrokiipide tehnoloogia põhimõte seisneb uuritava proovi hübridiseerimisel mikrokiibile, mis sisaldab kindla valimi teadaolevate miRNAde sonde. Uuritav märklaud-miRNA isoleeritakse totaalsest RNAST ning märgistatakse seejärel fluorestseeruva värviga. Enne hübridiseerimist lisatakse RNA-le kontrolli mõttes referents DNA, mis näitab kiibi ja hübridisatsiooni kvaliteeti ning mida kasutatakse hilisemalt tulemuste normaliseerimisel.

Värviga märgistatud miRNAD hübridiseeruvad spetsiifiliselt mikrokiibil olevate sondidega. Erinevatele positsioonidele seondunud märgistatud miRNAd fluorestsentsi emissiooni on võimalik detekteerida. Fluorestsentsi signaalide abil on võimalik hinnata proovis leiduvaid miRNAsid ja nende suhtelist hulka (ülevaateartiklist Li ja Ruan, 2009) (Joonis 4). Teine võimalus on teha pöördtranskriptsiooni abil RNA põhjal cDNA ja hübridiseerida seda DNA oligonukleotiid sondidega, mis on disainitud RNA järjestuste põhjal (Liu jt., 2004; Castoldi jt., 2006).



Joonis 4. Mikrokiibi tehnoloogia põhimõte. A) Amiin-reaktiivne klaasplaat. B) Klaasplaadile on amiin-rühmade kaudu kinnitatud miRNAd sondid, millel on *linker* järjestus (lillat värvi) ja *capture* järjestus (rohelist värvi). Viimastele saavad seonduda komplementaarsed uuritavad miRNAd. Hiljem saab fluorestseeruvate märgiste abil seondumise signaale tuvastada.

Joonise algallikas: Li ja Ruan, 2009, modifitseeritud.

1.1.4.3 *In situ* hübridiseerimine (ISH)

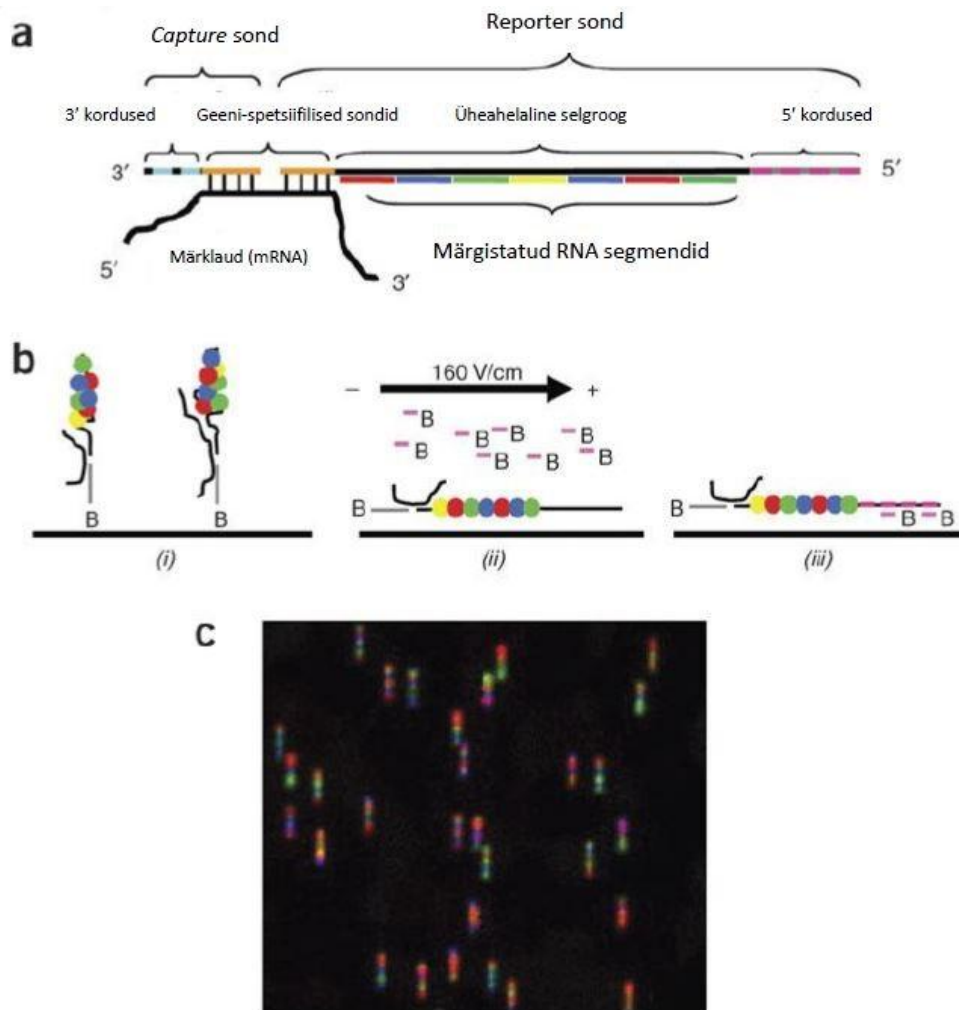
In situ hübridiseerimine on meetod, mille abil saab informatsiooni koes või rakkudes ekspresseeruva miRNA asukoha ning ekspressioonitaseme kohta kuni ühe molekuli tasemel (Moreno-Moya jt., 2013). Koe tasemel miRNA profiili loomisel ei ole paraku võimalik kindlaks teha, millistes rakkudes neid miRNAsid ekspresseeritakse, kui kude sisaldab erinevaid rakutüüpe. Miinuseks on võrdlemisi suur töömahukus ja madal läbilaskevõime (Nelson ja Wilfred, 2009).

1.1.4.4 Süvasekveneerimine

Süvasekveneerimist kasutades on võimalik mõõta miRNAde absoluutset hulka proovis ning avastada uusi miRNAsid ja teisi väikseid RNAsid. Üheaegselt on võimalik sekveneerida kuni miljoneid RNA molekule. Samas on sekveneerimine kallim kui näiteks mikrokiipide kasutamine, aga sel puuduvad mõned mikrokiipidele omased probleemid nagu rist-hübridiseerumine (Balwierz jt., 2009). Süvasekveneerimise juures on probleemiks ka väikese hulga kõrge koopiaarvuga miRNAde domineerimine, samal ajal kui madalama koopiaarvuga miRNAd võivad jääda alaesindatuteks (Creighton jt., 2009).

1.1.4.5 Nanostring nCounter tehnoloogia

2008. aastast alates kommertsiaalselt saadaolev tehnoloogia, mis võimaldab tuvastada nii DNA, mRNA kui miRNA märklaudu. Põhineb erinevat värvi fluorokroomidega märgistatud sünteetiliste RNA segmentide kasutamisel, mis moodustavad spetsiifilised molekulaarsed triipkoodid (Joonis 5). Iga mRNA 3' otsa on ligeeritud spetsiifiline miRTag sond. miRNA ja miRTag sond on omavahel ühenduses sillana toimiva järjestusega, mis on komplementaarne nende mõlemaga ning eemaldatakse järgmises etapis. miRNA-miRTag seondub seejärel identifitseeriva triipkoodiga ja hiljem biotiini sisaldava sondiga, mis kinnitab huvipakkuvad RNA molekulid streptavidiiniga kaetud kandjale. Pärast ligeerimisetappi loeb spetsiaalne skanner triipkoodid digitaalselt üle. Meetodi eeliseks on see, et antud tehnoloogia ei vaja amplifikatsiooni ega pöördtranskriptsiooni etappi (Moreno-Moya jt., 2013). Lisaks sellele loendatakse koguseid digitaalselt, seega on võimalik mõõta vaid ühte RNA koopiat raku kohta või raku tasemel. RNA ekspressioonitaset näitab arv, mitu korda sellele RNAle spetsiifilist triipkood-järjestust detekteeriti (Kulkarni, 2011). Tundlikkuse poolest on Nanostring nCounter tehnoloogia sarnane kvantitatiivse qRT-PCR meetodiga (Geiss jt., 2008).



Joonis 5. Nanostring nCounter meetodi põhimõte. A) Hübridisatsioonikompleksi skeem. *Capture* ja reporter järjestused hübridiseeruvad lahuses oleva komplementaarse märklaud-mRNAga geenispetsiifiliste järjestuste kaudu. Pärast hübridisatsiooni puhastatakse kolmeosaline molekuli afiinsuse alusel esmalt 3' korduste ning seejärel 5' korduste abil, et eemaldada vastavalt üleliigsed *capture* ja reporter järjestused. B) Seondumise, elektroforeesi ja immobilisatsiooni skeem. i) Puhastatud kompleksid seotakse biotiini sisaldavate *capture* järjestuste vahendusel streptavidiiniga kaetud kandjale. ii) Pinge rakendamisel molekulid pikenevad ja joonduvad. Lisatakse biotiiniga seotud anti-5' oligonukleotiidid, mis hübridiseeruvad 5'- kordusjärjestustega. iii) Reporter järjestused immobiliseeritakse tänu anti-5' oligonukleotiidide kinnitumisele pinnale. Pinge võetakse maha ning immobiliseeritud reporterid valmistatakse ette visualiseerimiseks ning loendamiseks. C) Pilt immobiliseeritud reporter järjestustest. Joonise algallikas: Geiss jt., 2008, modifitseeritud.

1.1.5 miRNAde ekspressiooni mõjutavad füsioloogilised tegurid

Patoloogilistele seisunditele iseloomulike miRNA profiilide võimalikult täpseks hindamiseks tuleb arvesse võtta, millised füsioloogilised tegurid ja protsessid võivad

miRNAde avaldumist mõjutada terve inimese organismis. Nendeks võivad olla nii tavalised füsioloogilised parameetrid kui ka raskemini defineeritavad individuaalsed erinevused. Mitteinvasiivse biomarkeri kontseptsiooni seisukohast on eriti olulised muutused, mis kajastuvad tsirkuleerivate miRNAde tasemes. Uurimuste käigus on leitud, et miRNAde avaldumise profiili ja taset mõjutavad vanus (Sredni jt., 2011), sugu (Dutttagupta jt., 2011), kehamassiindeks (Ortega jt., 2013; Nardelli jt., 2013) ja etniline päritolu (Huang jt., 2011). Peale selle leidsid Shlomit jt. 2010. aastal läbiviidud katses, et tsirkuleerivates neutrofiilides muutus 38 miRNA ekspressioonitase lühikese kehalise koormuse sooritamise järgselt (Shlomit jt., 2010).

Reproduktiivses eas naise organismi mõjutavad kaks olulist füsioloogilist protsessi – menstruatsioonitsükkel ja rasedus. Nende protsesside käigus toimuvate mitmesuguste hormonaalsete ja morfoloogiliste muutustega kaasnevad ka muutused miRNAde ekspressioonis. Näiteks kajastub raseduse aegne platsenta-spetsiifiline miRNA profiil ka vereplasmas (Morales-Prieto jt., 2012). Korduvalt on näidatud, et endomeetriumi koes toimuvad miRNAde profiilis menstruatsioonitsükli jooksul muutused (Kuokkanen jt., 2010; Sha jt., 2011), aga uuringus, kus vaadeldi plasma miRNAde profiili menstruaaltsükli neljas erinevas ajapunktis, ei leitud tsüklifaaside vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei miRNAde tasemes ega keskmises hulgas (Rekker jt., 2013). Seetõttu võib arvata, et tsükli jooksul endomeetriumis toimuvad muutused ei kajastu plasma miRNAde koosseisus või on detekteerimiseks liiga väikesed. Küll aga leiti statistiliselt oluline varieeruvus uuringus osalenud indiviidide miRNA tasemete vahel (Rekker jt., 2013).

Lisaks mitmetele eelnevalt kirjeldatud inimorganismi eripärast tulenevatele füsioloogilistele teguritele võivad katsetulemusi mõjutada ka proovide kvaliteet, kogumine ja käitlemine, RNA eraldamise efektiivsus ning muud meetodikast tulenevad asjaolud (Ibberson jt., 2009; Kim jt., 2012).

Tsirkuleerivate miRNAde uurimisel ning potentsiaalsete biomarkerite valikul tuleb seega arvesse võtta nii proovide käsitlemisega seotud aspekte kui ka erinevaid tervele organismile omaseid füsioloogilisi tegureid, mis võivad miRNAde taset ja koosseisu mõjutada.

1.2 Endometriosis

Endometriosis on östrogeen-sõltuv haigus, mida iseloomustab emaka limaskestast ehk endomeetriumi sarnase koe esinemine väljaspool emakaõõnt. See on sage günekoloogiline probleem, mida põeb erinevatel andmetel 6-10% reproduktiivses eas naistest. Tegemist on kroonilise põletikulise protsessiga, millega kaasnevad sageli alakõhuvalud ja viljatus. Lisaks võivad sümptomitest esineda düsmenorröa (valulik menstruatsioon), düspareunia (valulik vahekord) ning düsuuria (valulik urineerimine).

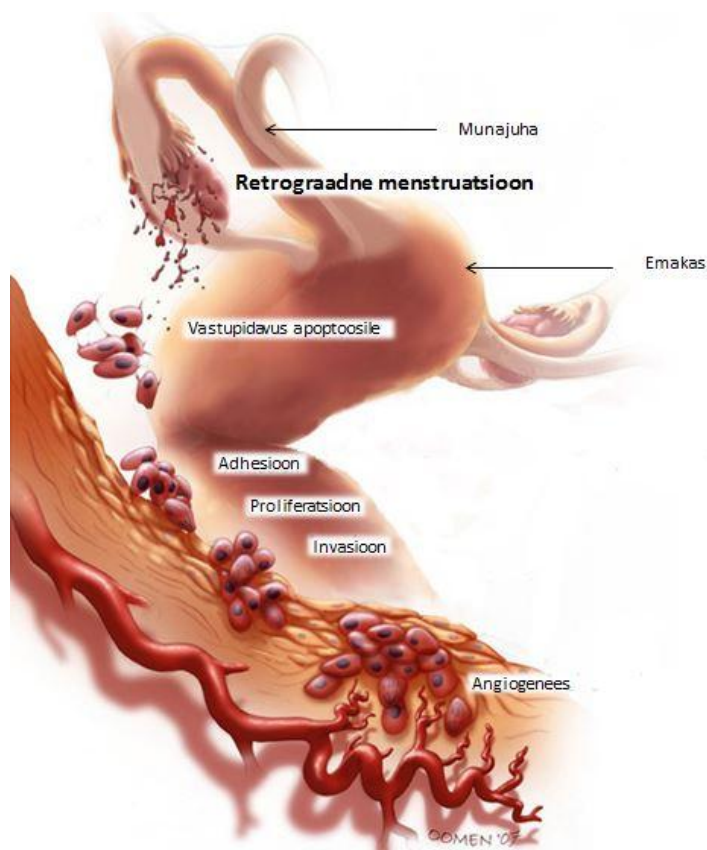
Endometriosisiga kaasnedavad valu ja viljatus on sageli põhjuseks, miks arsti juurde pöörduakse ning mis võivad patsiendi elukvaliteeti tugevalt langetada. Seetõttu on endometriosis suure tähelepanu all nii diagnostika kui ravi parandamise seisukohast, samuti haiguse põhjuste paremaks tundmaõppimiseks. Ravi ja diagnostika rakendamist raskendab asjaolu, et umbes 20% patsientidest on asümptomaatilised (Raffi ja Amer, 2010). Teiseks ei võimalda praegused ravimeetodid haigust lõpuni välja ravida ning endometriosisi operatsioonijärgse taastekke osakaal 2-aastase perioodi jooksul on keskmiselt 19,1 % (Guo, 2009).

Endometriosis on multifaktoriaalne haigus, mille väljakujunemisel osalevad nii geneetilised, epigeneetilised, hormonaalsed, immunoloogilised kui keskkonnast tulenevad faktorid (Suresh jt., 2013; Giudice jt., 2012). Vaatamata sellele, et haigus on teadusele tuntud üle 100 aasta (Knapp, 1999), on endometriosisi kujunemise põhjused ja patogeneesimehhanismid siiani ebaselged.

1.2.1 Endometriosisi kujunemismehhanismid

Endometriosisi tekkepõhjuste kohta esineb paralleelselt mitu teooriat, mis seletavad haiguse etioloogiat erineval viisil, kuid üksteist ei välista. Kõige levinum teooria endometriosisi põhjustavatest mehhanismidest on retrograadne menstruatsioon, mida kirjeldati aastal 1927 (Sampson, 1927) (joonis 6). Retrograadne menstruatsioon on füsioloogiline nähtus, mille puhul emaka kokkutõmmete tõttu satub osa menstruatsiooni käigus erituvast voolusest koos endomeetriumi rakkudega munajuhade kaudu peritoneaalõõnde, kus rakud kinnituvad ja hakkavad jagunema (Sampson, 1927; Bulletti jt., 2004). Endomeetriumi pärinevaid osakesi on kõhuõõnest leitud kuni 59% nii

endometriooosi põdevatel kui ka tervetel naistel (Giudice jt., 2012). Sampsoni teooria kinnituseks on korduvalt näidatud, et sellised osakesed sisaldavad elusaid rakke, mis ekspresseerivad adhesiooniks vajalikke molekule. Endometriooisihaigete endomeetriumi pärinevatel epiteelirakkudel on suurenenud võime migreeruda, jaguneda ja ellu jääda, samuti on leitud, et selliste rakkude diferentseerumise aste on väiksem ning neil on tüvirakkudele omaseid jooni (Ulukus jt., 2006; Giudice jt., 2012). Kõik need tegurid aitavad kaasa kollete tekkimisele, püsimisele ja kasvamisele.



Joonis 6. Retrograadse menstruatsiooni teooria põhimõte. Menstruatsiooni käigus satuvad endomeetriumi rakud retrograadselt koos verrega munajuhade kaudu kõhuõõnde, kus rakud kinnituvad peritoneumile ning asuvad seejärel mesoteelil prolifereruma ning sügavamale tungima. Protsessi käigus toimub ka angiogenees ehk veresoonestiku loome, mis tagab kolde arengu ja püsijäämiseks vajaliku verevarustuse. Joonise algallikas: Anger ja Foster, 2008, modifitseeritud.

Kuna reproduktiivses eas naiste retrograadse menstruatsiooni esinemissagedus ei korreleeru endometriooisi sagedusega, siis osalevad haiguse kujunemisel tõenäoliselt lisaks mitmed teised tegurid. Endometriooisikollete teket on seostatud näiteks muutustega

peritoneaalvedelikus, seejuures makrofaagide vähenenud fagotsütoosivõime ja muutunud aktiivsusega (Sharpe-Timms jt., 2002) ning mitmete põletiku mediaatorite kõrge tasemega (Ziegler jt., 2010).

Lisaks retrograadse menstruatsiooni ehk transplantatsiooni teooriale on laiemalt aktsepteeritud algselt Iwanoffi ja Meyeri poolt 19. sajandi lõpul välja pakutud tsöloomi metaplaasia teooria (Linden, 1996). See põhineb teadmisel, et endomeetrium, munasarjade pinnaepiteel ning peritoneum pärinevad ühtsest embrüonaalsest eellasest – tsöloomi epiteelist. Küpsed kõhuõõnes või munasarjadel asuvad mesoteeli rakud lähevad spontaanselt või puberteedi alguses östrogeeni taseme tõusu poolt indutseerituna transformatsiooni ja muutuvad endometroidseteks rakkudeks (Fritz ja Speroff, 2012). Tsöloomi metaplaasia võib aidata seletada ebaharilikes kohtades leiduvate kollete päritolu ning seda, miks endometrioosi võib leida ka naistel, kellel on menopaus või pole menstruatsioonid alanud. Lisaks kahele eelmisele teooriale kasutatakse teatud kollete päritolu seletamiseks Mülleri juhade või induktsiooniteooriat. Esimese kohaselt võivad loote organogeneesi käigus migreeruvad Mülleri juhade rakud valessti diferentseeruda või migreeruda ning hakata hiljem jagunema ning koldeid põhjustama (ülevaateartiklist Vercellini jt., 2013). Sellel teooria toetuseks pole palju tõendeid ning vastukaaluks on ka tõsiasi, et endometrioosi leidub organismis väga mitmetes paikades, mis pole Mülleri juhadega lähedases kontaktis. Induktsiooniteooria on sarnane tsöloomi metaplaasia kontseptsioonile ning väidab, et endomeetriumist pärinevad ektoopilised rakud eritavad biokeemilisi faktoreid, mis indutseerivad diferentseerumata mesenhüümi rakke transformeeruma endomeetriumiks koeks (Vinatier jt., 2001).

Ükski teooriatest eraldi ei ole piisav seletamiseks kõigi erinevate koldetüüpide ja – asukohtade päritolu. Võimalik, et erinevate kollete tekke taga on erinevad patogeneesimehhanismid, mis kokku lubavad seletada nii vaagnapiirkonna kui ka vaagnapiirkonna välist ehk "mittegünekoloogilist" endometrioosi (Augoulea jt., 2008; ülevaateartiklist Vercellini jt., 2013).

1.2.2 Endometrioosikolded

Kollete asukohta ja patoloogilise eripära alusel jagatakse endometrioos põhiliselt kolmeks makroskoopiliselt eristatavaks alamtüübiks:

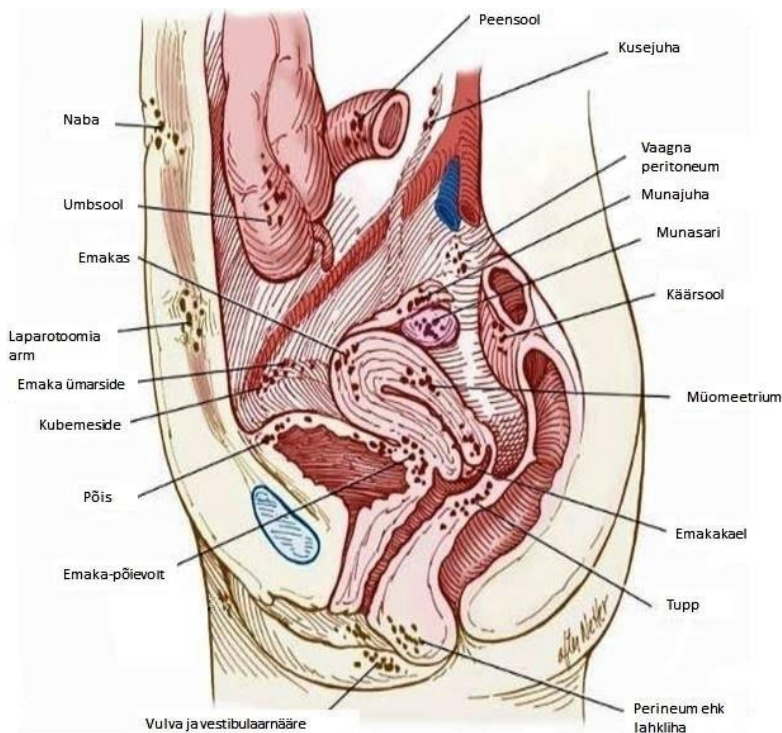
- pindmine peritoneaalne endometriosis
- sügav infiltreruv sõlmeline endometriosis
- munasarja pseudotsüstid ehk endometrioomid

(ülevaateartiklist Vercellini jt., 2013; Raffi ja Amer, 2010).

Valdaval osal patsientidest esinevad pindmised peritoneaalsed kolded, mis varieeruvad värvuselt aktiivsetest punakatest vesikulaarsetest kolletest tavapärase tumepruunide, sinakate ja mustade ning hiliste fibrootiliste valgeteni (Kennedy jt., 2005). Lisaks sellele on endometriosisile iseloomulikud organite limaskesta lihaskihti tungivad sõlmelised kolded, mis põhjustavad kolletest enim valu (Ziegler jt., 2010). Munasarjade endometriosisi all mõistetakse enamasti tumeda vana vere ja rakumassiga täidetud kapsleid, mida nimetatakse nende välimuse tõttu ka šokolaaditsüstideks. Mõnede uurimuste põhjal ei oma peritoneaalsed kolded munasarja endometrioomidega sarnast patogeneesimehhanismi ning on olemuslikult täiesti erinevad (Nisolle ja Donnez, 1997).

Kõige sagedamini paiknevad mitmesuguse kuju ja suurusega kolded väikevaagna sidekudedel, munasarjades, munajuhadel, kusepõie pinnal, Douglase õõnes (joonis 7), väga harva ka muudes organites, näiteks maksas või kopsus (ülevaateartiklist Vercellini jt., 2013). Sarnaselt normaalsele endomeetriumi koosnevad endometriosisikolded stroomast ja näärmetest ning alluvad teatud määral suguhormoonide tsüklilistele kõikumistele, kuid erinevalt endomeetriumist ei läbi enamik kolletest täielikke menstruaatsioonsüklile omaseid normaalseid muutuseid (Metzger jt., 1988).

Kolletest pärinev veri, mis satub kõhuõõnde, võib põhjustada alakõhuvalusid. Valu võivad põhjustada ka haiguse süvenemisel lisanduvad sidekoelised liidused ja kudede armistumine, samuti suured munasarja endometrioomid. Sõltuvalt valu põhjustavast tegurist on tegemist tsüklilise või mitte-tsüklilise valuga, selle tugevnemist võivad initsieerida ovulatsioon, menstruaatsioon, teatud liigutused (sageli seostatakse adhesioonide ehk sidekoeliste liidustega), urineerimine jne (Raffi ja Amer, 2010).



Joonis 7. Endometriosisikollete võimalikud paiknemiskohad.

Joonise algallikas: Berek, 2007, modifitseeritud.

1.2.3 Endometriosisi staadiumid

Klassikaliselt jagatakse endometriosis Ameerika Reproduktiivmeditsiini Ühingu (ASRM- *American Society for Reproductive Medicine*) poolt välja antud ja 1996. aastal uuendatud klassifikatsiooni (ASRM, 1997) põhjal nelja staadiumisse: minimaalne (I staadium), kerge (II staadium), mõõdukas (III staadium) ja raske aste (IV staadium). Klassifikatsioon lähtub operatsiooni käigus visuaalselt munajuhade läbitavuse, kollete suuruse ja hulga ning adhesioonide olemasolu kvantitatiivsest hindamisest. Minimaalse ja kerge endometriosisiga patsientidel on valdavalt levinud pindmised peritoneaalsed kolded ning esineb vähesel määral adhesioone. Mõõdukat ja rasket endometriosisi iseloomustavad nn šokolaaditsüstid ning ulatuslikumad sidekoelised liited ning armistumine, mis kahjustavad munajuhasid. ASRM süsteem põhineb puhtalt kollete ja nende poolt põhjustatud vaagnapiirkonna anatoomia muutuste tuvastamisel, ega võta arvesse valu ning viljatust. Uemal ajal on välja töötatud süsteeme, mis arvestaksid ka valu ja viljatuse kriteeriume ning annaksid haigusest terviklikuma pildi.

Tuleb mainida, et endometrioosi staadiumid ei ole alati korrelatsioonis sümptomite tõsidusega ega ennusta täpselt viljatuse riski ning ART (abistava reproduktsiooni tehnoloogiad) ravijärgset rasestumise edukust (Raffi ja Amer, 2010; Dunselman jt., 2013).

1.2.4 Endometrioosi diagnostika

Endometrioosi diagnoosimine on keeruline protsess, kuna ühtegi valideeritud mitteinvasiivset biomarkerit ega markerite paneeli kasutusel pole. Ainult sümptomite põhjal on haigust raske tuvastada, sest kaebused võivad olla väga varieeruvad, puududa täiesti või kattuda näiteks ärritatud soole sündroomi või mõne vaagnapiirkonna põletikulise haigusega. Endometrioosi diagnoosimise standardiks peetakse laparoskoopilist läbivaatust, mis on kõigist saadaolevatest meetoditest täpsem ning mille käigus on võimalik saada histoloogiline proov diagnoosi kinnitamiseks (Kennedy jt., 2005). Laparoskoopia on ohutum kui avatud kõhuõõne operatsioon, aga kannab endaga siiski kaasas riske naise tervisele ning on kulukas. Ebamäärased sümptomid ja piiratud võimalused panna täpset diagnoosi on põhjuseks, miks paljud naised jõuavad sümptomite ilmnemise algusest täpse diagnoosini alles 8-11 aastaga (Hadfield jt., 1996; Giudice jt., 2012).

Diagnostikas kasutatakse ka günekoloogilist läbivaatust, kui kolded paiknevad vaginaalselt või muus nähtavas kohas. Lisaks sellele ka ultraheli ja magnetresonantstomograafiat, kuid nende meetodite täpsus ei ole laparoskoopiaga võrreldav ja kuigi ultraheliga on võimalik nähtavale tuua endometrioome, seisneb nende meetodite väärtus rohkem haiguse ulatuse hindamisel teatud juhtudel. Seetõttu oleks väga oluline leida endometrioosi mitteinvasiivsed markerid, mis võimaldaksid haigust tuvastada vereproovist. Endometrioosi tuvastamiseks kasutatav mitteinvasiivne test peaks olema kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega, et kindlasti leida üles kõik endometrioosi või muu märkimisväärse vaagnapiirkonna patoloogiaga naised, kes võiksid operatsioonist kasu saada. Teisalt peaks test andma minimaalselt valepositiivseid tulemusi, et vältida endometrioosita patsientide tarbetut saatmist laparoskoopiale (Fassbender jt., 2013).

1.2.4.1 Biomarkerid endometrioosi mitteinvasiivses diagnostikas

Seni on biomarkeri kandidaatidena uuritud mitmesuguseid faktoreid, mille oluline roll endometrioosi kujunemisel on varasemalt teada. Nendeks on nii glükoproteiinid, tsütokiinid, adhesioonimolekulid, kasvufaktorid kui ka angiogeneesi indutseerivad

ühendid. Ei saa välistada, et erinevat tüüpi endometrioosi (pindmine, infiltreeruv, endometrioomid) või ka erineva asukohaga kollete tuvastamiseks sobivad erinevad biomarkerite grupid (Rogers jt., 2009).

Kõige rohkem on uuritud kasvaja antigeeni CA-125 kõrge taset endometrioosi korral, mis tekib vastusena põletikureaktsioonile. Võrreldes laparoskoopiaga on CA-125 kui üksiku biomarkeri diagnostiline väärtus madal (Mol jt., 1998; Kennedy jt., 2005). Vodolazkaia ja kolleegid hindasid oma uurimustöös 28 plasmast tuvastatud mitteinvasiivse biomarkeri kandidaati, mis jagunesid järgmistesse bioloogilistesse grupidesse: glükoproteiinid, põletikumarkerid, mitte-põletiku markerid, adhesioonimolekulid, angiogeensed faktorid ja kasvufaktorid. Autorid leidsid viiest markerist koosneva paneeli, mis võimaldas endometrioosi detekteerida tundlikkusega 81-90% ja spetsiifilisusega 63-81% (Vodolazkaia jt., 2012).

1.2.4.1.1 Tsütokiinid

Tsüto- ja kemokiinid on valgud, mis osalevad mitmesugustes protsessides nagu rakkudevaheline signalisatsioon, põletiku- ja immuunvastus, rakkude aktivatsioon, kasv ja küpsemine (Cammack jt., 2008). Vaatamata suurele hulgale uurimustöödele puudub ühene seisukoht tsüto- ja kemokiinide väärtusest mitteinvasiivsete endometrioosi biomarkeritena. Ka Vodolazkaia ja kolleegide poolt 2012. aastal tehtud katsetes ei tõusnud põletikuga seotud tsütokiinid heade biomarkeritena esile, kuigi endometrioosi korral on korduvalt näidatud mitmesuguste põletikumediaatorite kõrge taset (Ziegler jt., 2010; Vercellini jt., 2013). Teised senised tööd on andnud vastakaid tulemusi, rohkem on uuritud interleukiin-8 (IL-8), CCL-2 (ingl. k. *chemokine ligand 2*) ja CCL5 (ingl. k. *chemokine ligand 5*) kontsentratsioone nii peritoneaalvedelikus kui ka perifeerses veres. Kuigi endometrioosipatsientide IL-8, CCL-2 ja CCL5 tasemed on umbes pooltes töödes võrreldes kontrollgrupiga muutunud, ei ole ükski neist markerikandidaatidest kasutusel (Mihalyi jt., 2010; Vodolazkaia jt., 2012; Borrelli jt., 2013).

1.2.4.1.2 Proteoomika markerid

Proteoomika on teadusharu, mis võimaldab hinnata valkude ekspressiooni rakkudes, kudedes või organismis tervikuna. Harilikult kasutatakse tänapäeva proteoomikas

kahedimensionaalset geelelektroforeesi, mille abil on näidatud endometrioosipatsientide ja kontrollgrupi erinevusi eutoopilises endomeetriumis ja seerumis (Fassbender jt., 2013). Valkude analüüsimiseks nii seerumist, peritoneaalvedelikust, eu- ja ektoopilise endomeetriumi koest kui ka endomeetriumi vedelikust kasutatakse ka SELDI-TOF MS ProteinChip (ingl. k. *surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) tehnoloogiat (Hwang jt., 2013). SELDI-TOF MS meetodi miinusteks on madal massi tuvastamise täpsus ja reprodutseeritavus, kahedimensionaalne geelelektroforees on aga töömahukas ja madala läbilaskevõimega. Vaatamata sellele on tehtud mitmeid uuringuid, kus on leitud endometrioosipatsientide perifeerse vere seerumist või plasmast muutunud valgutasemeid, mis autorite arvates võiksid endometrioosi diagnoosida piisava tundlikkuse ja spetsiifilisusega (Liu jt., 2007; Zheng jt., 2011).

Kuigi proteoomika tehnoloogiad on üldiselt väga täpsed ja tundlikud detektsioonimeetodid, vajavad antud valdkonna senised endometrioosi markerkandidaadid lisauuringuid ning ühtegi biomarkerit praegu kliinilises kasutuses pole.

1.2.4.1.3 miRNAd

miRNAd kui mitteinvasiivsed biomarkerid on teadlaste huviorbiidis, kuna nende muutunud ekspressiooni on näidatud paljude haiguste puhul, kaasa arvatud endometrioos. Korduvalt on võrreldud endometrioosipatsientide ja kontrollide ektoopilise ja eutoopilise endomeetriumi miRNA profiile ning leitud, et kolletes on nende tase muutunud (Arimoto jt., 2003; Pan jt., 2007; Ohlsson Teague jt., 2010). Need tulemused viitavad sellele, et miRNAd võivad osaleda endometrioosi tekke eest vastutavates mehhanismides ja neid võiks kasutada ka mitteinvasiivsete markeritena. Samas, selliseid uurimustöid on vähe, kus oleks endometrioosi korral vaadeldud miRNAd ekspressiooni vereplasmas või -seerumis. Ühes uurimustöös tuvastati qRT-PCR meetodil, et plasma miRNA miR-17-5p, miR-20a ja miR-22 tase oli endometrioosihaigetel võrreldes kontrollgrupiga allareguleeritud (Jia jt., 2012). Wang ja kolleegid identifitseerisid mikrokiipe ja qRT-PCR kasutades 145 seerumi miRNAd, mille ekspressioon erines endometrioosihaigete ja tervete kontrollide vahel üle kahe korra (Wang jt., 2013). Kõige olulisemaid tulemusi andsid kuus miRNAd, millest miR-199a ja miR-122 suhtelised tasemed olid endometrioosihaigetel tõusnud, ülejäänud miR-141*, miR-145*, miR-542-3p ja miR-9* tase oli patsientidel madalam kui kontrollgrupil. Lisaks sellele paistsid miR-199a ja miR-122 tasemed olevat

korrelatsioonis haiguse staadiumiga ja on autorite arvates seega kasulikud endometrioosi kerge ja raske astme eristamisel. Autorid märkisid, et leitud miRNAd võimaldasid patsiente ja kontrollgruppi eristada suure täpsusega (optimaalseim kombinatsioon miR-199a, miR-122, miR-145*, miR-542-3p sensitiivsusega 93% ja spetsiifilisusega 96%) ning üksi või erinevates kombinatsioonides võiksid leida kasutust endometrioosi mitteinvasiivsete markeritena. Veel ühes uurimustöös vaadeldi plasma miRNAsid kui endometrioosi ja endometrioosiga seotud munasarjavähi võimalikke markereid, seejuures mitte ainult tuvastamaks endometrioosi olemasolu, vaid eristamaks ka endometrioosi ja vähki (Suryawanshi jt., 2013). Andmeanalüüsi käigus leiti miR-16, miR-191 ja miR-195 kombinatsioon, mis eristas tervete ja endometrioosihaigete gruppi 88% tundlikkuse ja 60% spetsiifilisusega. miR-16, miR-191 ja miR-195 olid endometrioosi korral kõrgenenud tasemega.

Vaadates kolme eelnevalt kirjeldatud uurimustöö tulemusi, on näha, et igas töös on leitud erinevad biomarkerikandidaadid. Tõenäoliselt on selliste vastuolude taga erinevused valimis, proovide käsitlemises, meetodikas või analüüsi protsessis. Hetkel puudub ühtne standardiseeritud protokoll miRNAde detekteerimiseks endometrioosi tuvastamisel (Fassbender jt., 2013).

1.2.5 Endometrioos ja miR-200 perekond

miR-200 perekond koosneb viiest miRNAst, mis on klasterdunud kahte kromosoomi. miR-200a, miR-200b ja miR-429 asuvad 1. kromosoomis ning miR-200c ja miR-141 12. kromosoomis. miR-200 perekonna ekspressioon rakkudes on mitmesuguste vähitüüpide, näiteks munasarjavähid (Bendoraites jt., 2010) ja rinnavähk (Mongroo ja Rustgi, 2010), korral alla- või ülesreguleeritud. miR-200 perekond mängib ka olulist rolli epiteelial-mesenhümaalses transitsiooni (EMT- ingl. k. *epithelial-to-mesenchymal transition*) allasurumises, kasvajakude adhesioonis, migratsioonis ja invasioonis (Mongroo ja Rustgi, 2010). miR-200 perekonna märklaudadeks on ZEB1 ja ZEB2 valkude mRNA 3' UTRd. ZEB1 (ingl. k. *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*) ja ZEB2 (tuntud kui ka Smad-interakteeruv valk SIP1) on transmembraanse adhesioonireseptori E-kadheriini repressorid. EMT protsessi käigus väheneb epiteelialsete markerite hulk ja rakud omandavad mitmeid mesenhümaalsetele rakkudele omaseid tunnuseid nagu tiheliiduste ja apikobasaalse polaarsuse kadumine, mis on tingitud E-kadheriini ekspressiooni

väheneb. Rakud muutuvad liikuvaks ja hakkavad ekspresseerima mesenhümaalseid markereid nagu vimentiin, kollageen, fibronektiin ja ZEB valgud (Xu jt., 2009; Mongroo ja Rustgi, 2010). miR-200 perekonna madalam ekspressioon on korrelatsioonis vähirakkude suurenenud agressiivsusega, seevastu kõrge miR-200 perekonna tase on seotud suurenenud E-kadheriini hulgaga ning mesenhümaal-epiteliaalse transitsiooniga (MET- ingl. k. *mesenchymal-to-epithelial transition*) (Park jt., 2008; Mongroo ja Rustgi, 2010).

miR-200 perekond on tugevalt seotud EMT ja MET protsesside regulatsiooniga, kuna miR-200 liikmed otseselt repressivad ZEB valkude ekspressiooni (Park jt., 2008). Lisaks sellele on näidatud, et ZEB1 toimib miR-141 ja miR-200c transkriptsiooni pärssivalt ja tekitab negatiivse tagasiside ringi (Burk jt., 2008).

Endometrioosiuringutes on korduvalt leitud, et miR-200 perekonna liikmete ekspressioon on patsientidel ja kontrollgrupil erinev. Ohlsson Teague ja kolleegid leidsid paaris ektoopiliste ja eutoopiliste endomeetriumi kudede mikrokiip-analüüsil 22 muutunud ekspressiooniga miRNAd, mille hulka kuulusid ka miR-200 perekonna liikmed. miR-200a, miR-200b ja miR-141 olid ektoopilises koes üle kahe korra allareguleeritud võrreldes eutoopilise endomeetriumi koes (Ohlsson Teague jt., 2009). Sarnase disainiga katses ektoopilist ja eutoopilist endomeetriumi kudede võrrelnud Filigheddu ja kolleegid leidsid samuti, et miR-200a, miR-200b ja miR-200c on ektoopilises koes allareguleeritud (Filigheddu jt., 2010).

Hawkinsi ja kolleegid võrdlesid miRNAd ekspressiooni endometrioosipatsientidel ja kontrollgrupil, kasutades selleks järgmise põlvkonna sekveneerimist (Hawkins jt., 2011). Tulemuste analüüsil tuvastati 10 miRNAd, mille ekspressioon oli endometrioosides ülesreguleeritud ning 12 miRNAd, mille tase oli endometrioosides võrreldes kontrollgrupi endomeetriumi koes langenud. Allareguleeritud miRNAd hulgas olid ka miR-200a, miR-200b, miR-200c ja miR-141 (Hawkins jt., 2011).

Eelnevast võib järeldada, et miR-200 perekonna muutunud ekspressioon endometrioosi korral ei ole juhuslik. Kui miR-200 perekonna taseme muutused endometrioosi korral on patsientide perifeerses veres detekteeritavad sarnaselt koeuringutele, võib tegemist olla uute biomarkeri kandidaatidega endometrioosi diagnoosimisel.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli

- määrata vereplasmast detekteeritavate miR-200 perekonna liikmete tasemed endometriosisiga ja endometriosisita naistel
- uurida, kas vereplasmast detekteeritavad miR-200 perekonna miRNAd sobivad endometriosisi mitteinvasiivseteks biomarkeriteks
- uurida, millisest allikast pärinevad vereplasmas leiduvad miR-200 perekonna miRNAd.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Valimi kirjeldus

2.2.1.1 Üldvalim

Uuringus osalenud naised (n=124) jaotuvad tervete grupiks (n=30), endometriosisiga patsientideks (n=61) ja endometriosisita patsientideks (n=33). Endometriosisita patsiendid olid kaebuste põhjal (põhiliselt vaagnapiirkonna valu või viljatus) arsti poolt laparoskoopiale suunatud, kuid laparoskoopia käigus endometriosisi ei diagnoositud. Endometriosisiga patsientidest 37 (60,7%) põeb I või II staadiumi endometriosisi ja 24 (39,3%) III või IV staadiumi endometriosisi [Ameerika Reproduktiivmeditsiini Ühingu ehk ASRM (*American Society for Reproductive Medicine*) poolt välja antud klassifikatsiooni põhjal]. Tervete naiste gruppi kuulusid naised, kellel puudusid võimalikule endometriosisile viitavad kaebused ning kes polnud laparoskoopiat läbinud. Ükski uuringus osalenud naine ei olnud tarvitanud hormonaalseid preparaate vähemalt kolm kuud enne vere loovutamist. Tabelis 1 on esitatud valimigrupid koos kliiniliste andmetega.

Patsiendid on jaotatud hommikusteks ja õhtusteks lähtuvalt sellest, kas vereproovid on võetud kohe haiglasse saabumise päeva õhtul või operatsioonipäeva hommikul. Tervete grupi vereproovide võtmise täpse kellaaja kohta puuduvad andmed, kuid on teada, et enamik proove on kogutud vahemikus keskpäevast õhtuni.

Antud uuringu teostamiseks on olemas Tartu Ülikooli Inimuurigute eetika komitee luba ja kõik uuringus osalenud naised on allkirjastanud informeerimise ja teadliku nõusoleku lehe.

Tabel 1. Uuringugruppide jaotus ja kliinilised andmed.

	Endometrioosita patsiendid		Endometrioosiga patsiendid		Terved
	Hommik	Õhtu	Hommik	Õhtu	
Proovi võtmise aeg					
Valimi suurus	11	22	32	29	30
Vanus (a) Keskmine ± SD	29±5,1	31±5,7	32±5,0	33±5,3*	29±6,0
Pikkus (cm) Keskmine ± SD	167±4,3	166±5,3	168±6	168±6,5	168±3,8
Kaal (kg) Keskmine ± SD	67±15,8	64±12,7	65±10,1	64±11,6	63±9,3
KMI (kg/cm ²) Keskmine ± SD	24±6,0	23±4,4	22±3,1	23±3,9	22±3,0
Suitsetamine	4 (36%)	7 (32%)	4 (13%)	7 (24%)	5 (17%)

SD – standardhälve

KMI – kehamassiindeks

* – Õhtuse grupi endometrioosiga patsiendid versus terved, $p < 0,05$

Katsetes, milles uuriti miRNA tasemeid vereplasmas, kasutati võrdlustes kõiki kolme uuringugruppi kas täismahus või kombineeritult.

Töös kasutati ka Pipelle kateetri (Pipelle, Laboratoire CCD, Prantsusmaa) abil kogutud üheksa endometrioosiga naise ja kaheksa terve vabatahtliku endomeetriumi koeproove. Kõik antud valimi koosseisus esindatud naised kuulusid üldvalimisse. Endomeetriumi uuringus osalenud patsientide ja kontrollgrupi vahel ei olnud olulist erinevust vanuses, KMI-s ega menstruaaltsükli päevas, mil proov võeti.

2.2.1.2 Tsirkaadse rütmi katse valim

Lisaks Tabelis 1 toodud üldvalimile kaasati uurimustöösse lisavalim, mis koosnes kaheksast tervest vabatahtlikust naisest (vanuses 23-52 aastat, mittesuitsetajad), kelle plasma ja tuumaga vererakkude fraktsiooni (BC – ingl. k. *buffy coat*) proove kasutati miRNAde ekspressiooni tsirkaadse rütmi katsetes. Katse tegemiseks võeti igalt naiselt üks vereproov õhtul kella 4-5 vahel ja teine järgmisel hommikul kella 9-10 vahel. Käesolevas katses osalenud naised on andnud oma nõusoleku proovide võtmiseks ja kasutamiseks.

2.2.2 Vereproovide töötlemine

Veri võeti 9 ml EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) katsutisse, seejärel tsentrifugeeriti katsuteid $1600 \times g$ juures 10 minutit. Pealmine vereplasma fraktsioon kanti puhtasse tuubi ja tsentrifugeeriti 10 minutit $16\,000 \times g$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Katsetes kus eraldati BC fraktsioon, eraldati vereplasma ja erütrotsüütide fraktsioonide vahele jääv õhuke BC kiht puhtasse tuubi.

2.2.3 RNA eraldamine

Käesoleva uurimustöö raames eraldati RNA vereplasmast, eksosoomidest, endomeetriumi koest ja tuumaga vererakkude fraktsioonist (BC). Kõigi nelja protsessi käigus kasutati RNA eraldamiseks miRNeasy Mini Kit komplekti (Qiagen, GmbH, Saksamaa). Eraldatud RNA säilitati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

2.2.3.1 RNA eraldamine vereplasmast

RNA eraldamiseks kasutati 0,5 ml vereplasmast. Esmalt segati plasma QIAzol Lysis reagentiga (Qiagen, GmbH, Saksamaa) vahekorras 1:5 ning iga 0,75 ml QIAzoli kohta lisati 0,2 ml kloroformi. Proove segati 15 sekundit ning inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Järgnev RNA eraldamine viidi läbi miRNeasy Mini Kit protokollil alusel. RNA elueerimiseks kasutati 30 μl RNAasi vaba vett.

2.2.3.2 RNA eraldamine koest

RNA eraldamiseks kasutati -80 °C juures hoitud endomeetriumi koe proove. Kuni 50 mg kaaluv koeproov asetati 0,75 ml QIAzol Lysis reagenti sisse puhtasse tuubi. Seejärel homogeniseeriti proov kasutades TissueRuptor rootor-staator homogenisaatorit (Qiagen, GmbH, Saksamaa). Homogenisaati inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Järgmiseks lisati proovile 0,14 ml kloroformi ning segati 15 sekundit, seejärel inkubeeriti taas toatemperatuuril 5 minutit. Järgnev RNA eraldamine viidi läbi miRNeasy Mini Kit protokollil alusel. RNA elueerimiseks kasutati 50 µl RNAasi vaba vett.

2.2.3.3 RNA eraldamine eksosoomidest

Eksosoomid eraldati 1 ml vereseerumist ultratsentrifuugimise meetodil. Eraldatud eksosoomid suspendeeriti üles 0,1 ml nukleasivabas vees. Seejärel lisati eksosoomidele QIAzol reagenti vahekorras 1:5. Eksosoomid eraldas Reproduktiivmeditsiini TAK teadur Kadri Rekker.

0,6 ml eksosoomide ja QIAzoli segule lisati 0,1 ml kloroformi. Proove segati 15 sekundit ning inkubeeriti toatemperatuuril 2-3 minutit. Järgnev RNA eraldamine viidi läbi miRNeasy Mini Kit protokollil alusel. RNA eluatsiooniks kasutati 50 µl RNAasi vaba vett.

2.2.3.4 RNA eraldamine tuumaga vererakkude fraktsioonist

BC fraktsioonile lisati sellega võrdses mahus nukleasivaba vett. Saadud segule lisati järgmisena 1:3 vahekorras Trizol LS reagenti (Invitrogen, Life Technologies, USA). Iga 0,75 ml Trizol LS kohta lisati 0,2 ml kloroformi. Proove segati 15 sekundit ning inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Järgnev RNA eraldamine viidi läbi miRNeasy Mini Kit protokollil alusel. RNA eluatsiooniks kasutati 50 µl RNAasi vaba vett.

2.2.4. miRNA ekspressioonitaseme määramine

Uurimisgrupi varasemale tööle ja kirjandusele tuginedes valisime välja kolm miRNA-d, mille ekspressioonitasemed määrasime kasutades TaqMan MicroRNA süsteemi.

cDNA süntees teostati TaqMan MicroRNA Reverse Transcription komplektiga (Applied Biosystems, Foster City, USA). Iga miRNA tuvastamiseks lisati segusse spetsiifiline praimer. Kõigepealt valmistati reaktsioonisegu (Tabel 2), sellele lisati 3 µl miRNA

spetsiifilist praimerit, 3 µl totaalselt RNAd ja 6 µl ddH₂O. cDNA sünteesiks kasutati programmi: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, järgnes kohene jahutamine 4 °C-ni.

Tabel 2. cDNA sünteesi reaktsioonisegu.

Pöördtranskriptsiooni (RT) reaktsioonisegu	1× reaktsioonisegu (µl)
10 × RT puhver	1,5
dNTP segu (100 mM)	0,15
RNAasi inhibiitor (20 U/µl)	0,19
Multiscribe RT ensüüm (50 U/µl)	1
ddH ₂ O	6,16
Kogumaht	9

Järgnevalt valmistati qRT-PCR jaoks reaktsioonisegu (Tabel 3). Iga uuritava miRNA jaoks kasutati spetsiifilist TaqMan MicroRNA testi ja lisaks kahte referents miRNAd (Applied Biosystems). Koeproovide referentsina kasutati kaht väikest nukleolaarset RNAd (ingl. k. snoRNA- *small nucleolar RNA*). Uuritavad miRNAd ja referentsid on toodud Tabelis 4. Kõik qRT-PCR reaktsioonid sooritati kahes korduses.

Tabel 3. qRT-PCR reaktsioonisegu.

Reagent	1× reaktsioonisegu (µl)
TaqMan 2 × Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	10
TaqMan MicroRNA Assay (20 ×)	1
cDNA	1,3
ddH ₂ O	7,7
Kogumaht	20

Tabel 4. Töös kasutatud TaqMan MicroRNA testid.

Testi number	Nimi	Järjestus
002223	hsa-miR-30e-5p*	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
000435	hsa-miR-99a-5p*	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
000463	hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
000502	hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
002251	hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUA AUGAUGA
001094	RNU44	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAACATGAA GGTCTTAATTAGCTCTAACTGACT
001006	RNU48	GATGACCCCAGGTA ACTCTGAGTGTGTCGCTGATGCC ATCACCGCAGCGCTCTGACC

* – antud töös kasutatud referents-miRNAd

Reaktsioonid viidi läbi 7500 Fast Real-Time PCR masinal (Applied Biosystems) kasutades järgnevat programmi: 95 °C 10 min, millele järgnes 40 tsüklit: 95 °C 15 s ja 60 °C 1 min.

2.2.5 Andmeanalüüs

miRNAde ekspressioonitasemed määrati qRT-PCR meetodi abil. Saadud tulemused analüüsiti programmiga SDS2.4 (Applied Biosystems, Foster City, USA), kasutades võrdleva lävitsükli (ingl. k. *Ct-cycle threshold*) meetodit. qRT-PCR amplifikatsioonil saadud miRNA Ct väärtused normaliseeriti referents miRNAde või väikeste nukleolaarsete RNAde keskmise suhtes. miRNAde ekspressioonitaseme korduse erinevused (ingl. k. *fold change*) valimigruppide vahel arvutati kasutades $2^{-\Delta\Delta Ct}$ valemit, kus

$\Delta\Delta Ct = (\text{uuritava miRNA Ct} - \text{referents miRNA Ct}) \text{ katsegrupp X} - (\text{uuritava miRNA Ct} - \text{referents miRNA Ct}) \text{ katsegrupp Y}$,

X ja Y tähistavad valimigruppe vastavalt sellele, milliseid gruppe omavahel võrreldi.

Ekspressioonitasemete erinevuste olulisuse analüüs teostati Microsoft Excelis funktsiooniga t-test. t-testi parameeterid olid seatud nii, et t-test kasutas kahepoolset

hüpoteesi (ingl. k. *two-tailed distribution*) ning ei eeldanud keskväärtuste võrdlemisel, et üldkogumid on võrdse dispersiooniga (tüüp 3 t-test, ingl k. *two-sample unequal variance*). Tsirkaadse rütmi katsetes kasutati tüüp 1 t-testi (ingl. k. *paired*), kuna üldkogumi keskväärtuseid võrreldi sõltuvate vaatluste korral (ühe valimi hommikused ja õhtused proovid). Statistiliselt oluliseks tulemuseks loeti p-väärtust $< 0,05$.

Hindamaks uuritavate miRNAde võimekust biomarkeritena arvutati hsa-miR-141-3p, hsa-miR-200a-3p ja hsa-miR-200b-3p (edaspidi vastavalt miR-141, miR-200a ja miR-200b) markerite tundlikkus ja spetsiifilisus endometrioosi prognoosimisel. Tundlikkus näitab kliinilise testi võimet korrektselt eristada kõik haiged inividid tervetest (tõeselt positiivsete juhtude arv) ning spetsiifilisus võimet tuvastada need inividid, kellel vastav haigus puudub (tõeselt negatiivsete juhtude arv). MedCalc 13.2 statistikaprogrammi (www.medcalc.org) abil leiti ΔCt väärtuste põhjal ROC-kõverad (ingl. k. *receiver operating characteristics*) koos AUC (kurvialune pindala, ingl. k. *area under the curve*) väärtuste ja testi sensitiivsuse ja spetsiifilisusega iga miRNA jaoks. ROC-kõvera X-teljel on toodud tundlikkus ehk tõeselt positiivsete juhtude arv ning Y-teljel 1-spetsiifilisus ehk valenegatiivsete juhtude arv argumendi erinevate väärtuste korral. Käesolevas töös on ROC-kõver erinevatele ΔCt väärtustele vastavate miRNA sensitiivsuse ja spetsiifilisuse paaride graafiline esitus, mille kaudu on võimalik leida optimaalseim ΔCt piirväärtus. AUC ehk ROC-kõvera alune pindala skaalal 0,5-st 1-ni näitab testi üleüldist täpsust (Altman ja Bland, 1994), mida suurem väärtus, seda tugevam on antud juhul seos ΔCt väärtuste ja prognoosi vahel ning seda täpsemini antud test endometrioosi olemasolu suudab tuvastada. Iga miRNA optimaalseimale ΔCt -le vastavad tundlikkuse ja spetsiifilisuse väärtused on toodud töö tulemuste osas koos ROC-kõverate ja AUC väärtustega.

Lisaks eelnevale arvutati MedCalc programmi abil miR-200a, miR-200b ja miR-141 kombinatsioonide sensitiivsus ja spetsiifilisus. Selleks kasutati mitme muutujaga logistilise regressiooni mudelil põhinevat valemit, mida kasutasid Torres ja kolleegid miRNAde diagnostilist olulisust hinnates (Torres jt., 2013).

2.3 Tulemused

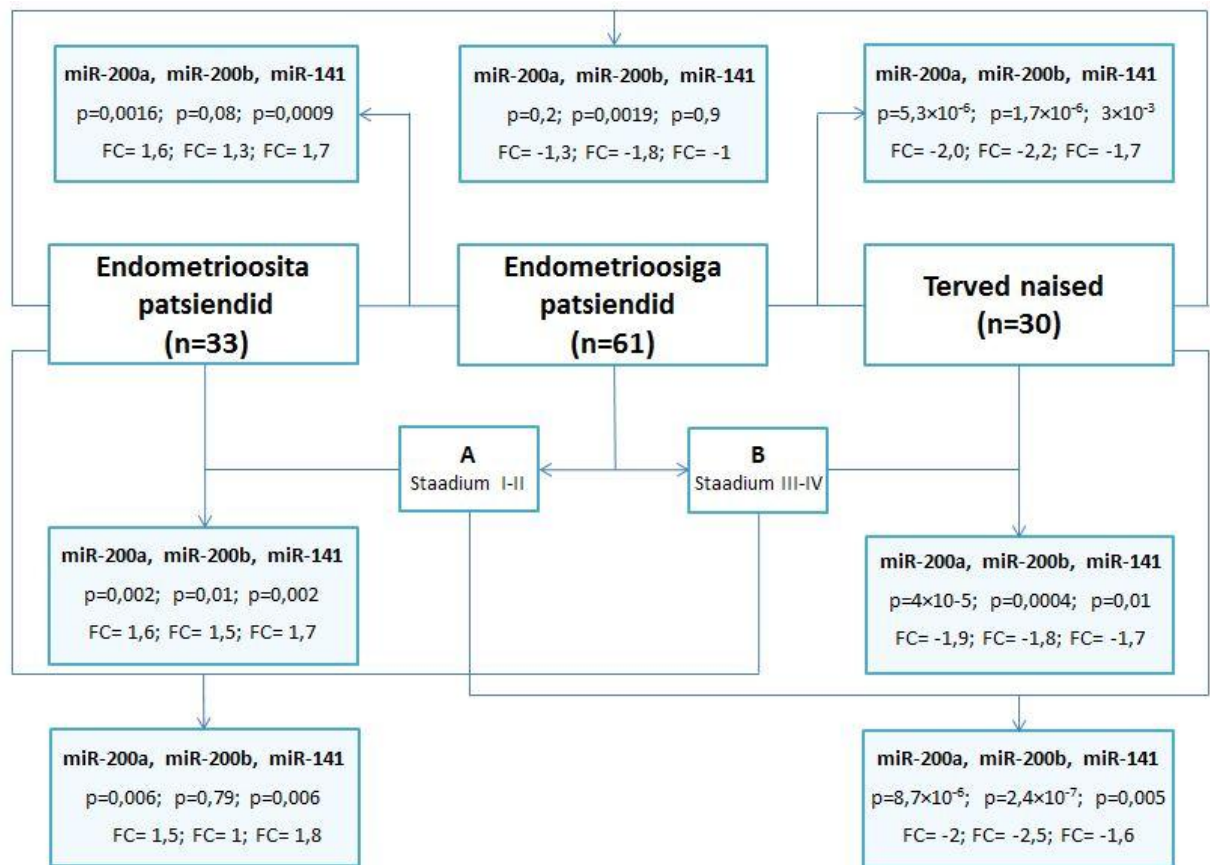
Töö esmane eesmärk oli määrata vereplasmast tuvastatavate miR-200 perekonna liikmete tasemed endometriosisiga ja endometriosisita naistel. Teiseks analüüsisime, kas antud miR-200 perekonna miRNAd võivad sobida endometriosisi mitteinvasiivseteks biomarkeriteks. Kolmandaks eesmärgiks oli selgitada vereplasma leiduvate miR-200 perekonna miRNade päritolu.

miRNade ekspresioonitaseme määramiseks valisime qRT-PCR meetodi kui ühe parima praegu kasutatavatest miRNade detekteerimise meetoditest, seda ennekõike kõrge spetsiifilisuse ja tundlikkuse tõttu. Viimased omadused on eriti olulised miRNade taseme uurimisel vereplasmast, kus enamik miRNAsid on esindatud väga madala kontsentratsiooniga. Kõrge spetsiifilisuse tagamiseks kasutasime qRT-PCR meetodi juures iga miRNA taseme määramiseks spetsiifilist TaqMan MicroRNA süsteemi.

2.3.1 Endometriosisiga ja endometriosisita naiste plasma miR-200 perekonna taseme analüüs

Töö esimeses etapis määrasime hsa-miR-141-3p, hsa-miR-200a-3p ja hsa-miR-200b-3p ekspresioonitasemed 61 endometriosisiga, 33 endometriosisita patsiendi ja 30 terve naise vereplasma (Joonis 9). Tulemused näitasid, et miR-200a, miR-200b ja miR-141 olid endometriosisiga patsientide vereplasma ligikaudu kaks korda madalamalt ekspresseeritud kui tervete naiste vereproovides. Võrreldes omavahel endometriosisita ja endometriosisiga naiste vereplasma proove, selgus et miR-200a ja miR-141 olid endometriosisiga patsientide vereplasma umbkaudu poolteist korda madalamalt ekspresseeritud kui endometriosisita patsientidel. miR-200b ei näidanud endometriosisita ja endometriosisiga patsientide võrdluses olulist ekspresioonierinevust. Joonisel 9 on näidatud qRT-PCR tulemuste analüüsimisel saadud andmed miRNade kohta ja nende ekspresioonitasemete erinevused gruppide vahel.

miR-200a ja miR-141 ekspresiooni erinevus endometriosisita patsientide ja tervete grupi vahel ei osutunud statistiliselt oluliseks, aga miR-200b tase oli endometriosisita patsientide proovides ligi kaks korda madalam kui tervetel naistel.



Joonis 9. Plasma miR-200 perekonna ekspressioonitasemete erinevused endometrioosiga patsientide, endometrioosita patsientide ja tervete vahel.

A ja B tähistavad vastavalt I ja II ning III ja IV staadiumi endometrioosiga patsiente analüüsis, kus võrreldi endometrioosiga patsiente kahe eraldi grupina sõltuvalt endometrioosi staadiumist.

FC – ekspressioonitaseme erinevuse väärtus. Võrreldud on alati vasakpoolset gruppi sellest paremal asuva grupiga. Positiivse FC väärtuse korral on vasakpoolse grupi ekspressioonitase näidatud väärtuse võrra kõrgem ja negatiivse FC väärtuse korral madalam kui parempoolses võrreldavas grupis. Näiteks endometrioosiga patsientide vereplasma miR-200a tase on kaks korda madalam kui tervetel naistel.

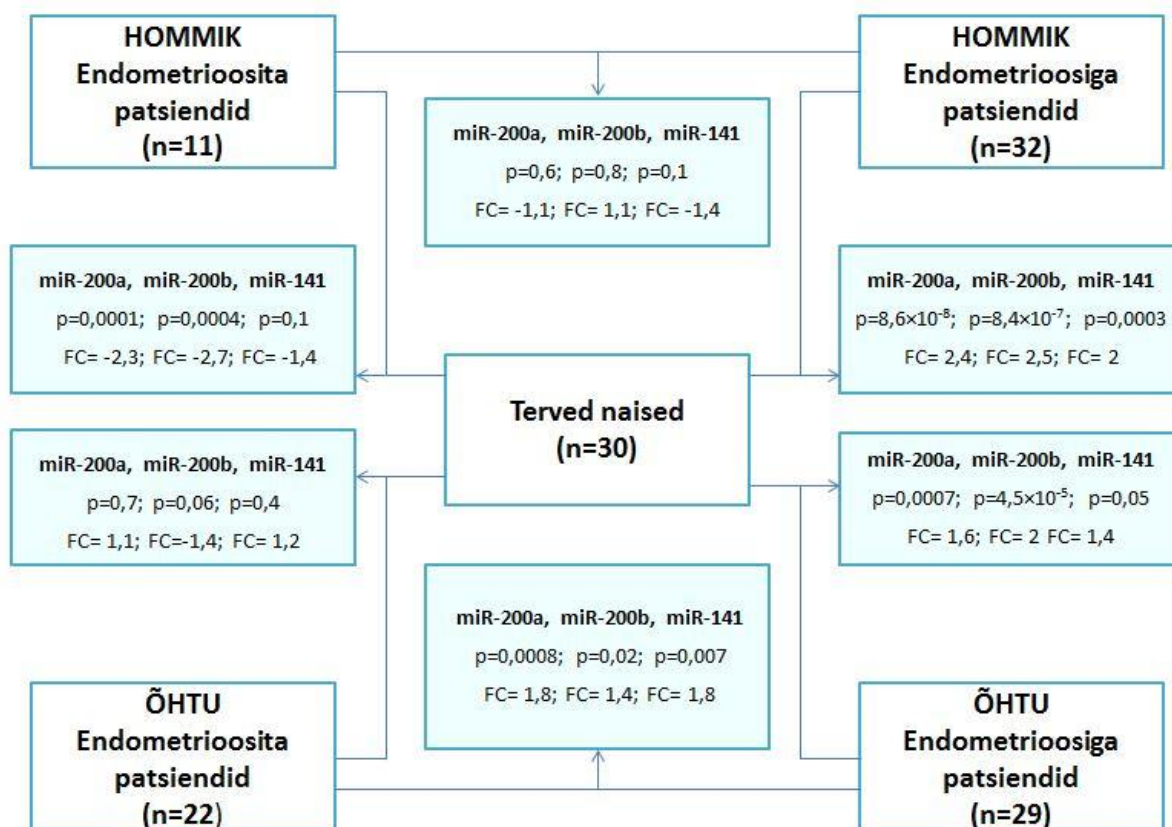
Järgnevalt vaatasime miRNAde ekspressioonitaseme sõltuvust endometrioosi staadiumist (ASRM klassifikatsioonist lähtudes). Selleks tähistasime I ja II staadiumi endometrioosiga naised tinglikult kui grupp A ning III ja IV staadiumiga naised kui grupp B. Võrdlesime endometrioosita patsientide ja tervete gruppe eraldi A ja B valimitega. miR-200a, miR-200b ja miR-141 olid nii A kui B grupi endometrioosiga patsientide vereproovides oluliselt madalamalt ekspresseeritud kui tervete naiste proovides. Kõik kolm miRNAid olid endometrioosihaigete A grupis madalamalt ekspresseeritud ka võrreldes endometrioosita patsientide vereplasma proovidega. Samas, võrdlus B grupi ja endometrioosita patsientide

vahel näitas olulist ekspressioonierinevust ainult miR-200a ja miR-141 puhul, miR-200b puhul olulist erinevust välja ei tulnud.

2.3.1.1 miR-200 perekonna ekspressioonitaseme sõltuvus vereproovi võtmise ajast

Võrreldes patsientide hommikul või õhtul kogutud vereplasma proove eraldi, saime mõnevõrra teistsugused tulemused kui kogu valimi võrdlusel (Joonis 10). miR-200a, miR-200b ja miR-141 ekspressioon oli nii endometrioosiga patsientide hommikustes kui ka õhtustes proovides sarnaselt kogu valimi võrdlusele oluliselt madalam kui tervetel naistel. Võrreldes endometrioosiga ja endometrioosita patsientide miR-200a, miR-200b ja miR-141 tasemeid hommikustes ja õhtustes proovides selgus, et hommikul kogutud vereplasmades puudub nende kahe grupi vahel erinevus. Õhtul kogutud vereplasmades olid kõik kolm miRNAd endometrioosiga patsientidel poolteist kuni kaks korda madalama tasemega kui endometrioosita patsientidel. Endometrioosita patsientide hommikuste proovide vereplasmas oli miR-200a ja miR-200b tase üle kahe korra madalam kui tervete naiste proovides, miR-141 ekspressioonitaseme erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Seevastu oli miR-200a, miR-200b ja miR-141 ekspressioon endometrioosita patsientide õhtustes proovides ja tervete naiste vereplasmas väga sarnane ega näidanud nende kahe grupi vahel statistiliselt olulist erinevust.

Tegime ka analüüsi, milles võrdlesime miRNAd tasemeid hommikul ja õhtul kogutud vereproovides sõltumatult haiguse olemasolust. Tulemused näitasid, et sõltumata patsiendigrupist on miR-200a, miR-200b ja miR-141 hommikustes vereplasma proovides ligi poolteist korda madalama ekspressioonitasemega kui õhtustes proovides. Hommikul ja õhtul kogutud proovide võrdlemine patsiendigruppide siseselt näitas samuti, et uuritud miRNAd on hommikustes proovides oluliselt madalamalt ekspresseeritud kui õhtustes proovides (p-väärtused $< 0,05$), erinevust ei näita ainult endometrioosiga patsientide grupi miR-200b (p-väärtus 0,08).



Joonis 10. Endometriosisiga patsientide, endometriosisita patsientide ja tervete grupi miR-200 perekonna ekspressioonitasemed lähtuvalt proovi võtmise ajast.

FC – ekspressioonitaseme erinevuse väärtus, võrreldud on alati vasakpoolset gruppi sellest paremal asuva grupiga. Positiivse FC väärtuse korral on vasakpoolse grupi ekspressioonitase näidatud väärtuse võrra kõrgem ja negatiivse FC väärtuse korral madalam kui parempoolses võrreldavas grupis. Näiteks õhtuste endometriosisita patsientide miR-200a tase on 1,8 korda kõrgem kui õhtuste endometriosisiga patsientide vereplasmas.

2.3.1.2 miR-200 perekonna ekspressioonitaseme sõltuvus tsirkaadsest rütmist

Patsientide hommikuste ja õhtuste proovide eraldi võrdlemise põhjal leidsime, et uuritud miRNAde tase võib olla mõjutatud tsirkaadsest rütmist. Selle hüpoteesi kontrollimiseks tegime katse, kus võrdlesime kaheksa terve naise miR-200 perekonna miRNAde ekspressiooni hommikul ja õhtul kogutud plasmaproovides. Tulemusi analüüsid selgus, et miR-200a, miR-200b ja miR-141 olid õhtustes proovides üle kahe korra kõrgemalt ekspresseeritud kui hommikustes proovides (Tabel 5).

Tabel 5. miR-200 perekonna miRNAde ekspressioonitase vereplasmas sõltuvalt proovi kogumise ajast.

miRNA	Ekspressioonitaseme erinevus kordades/ p-väärtus (õhtused vs hommikused proovid)
miR-200a	2,8 (p= 0,0007)
miR-200b	2,7 (p=0,00002)
miR-141	2,5 (p=0,007)

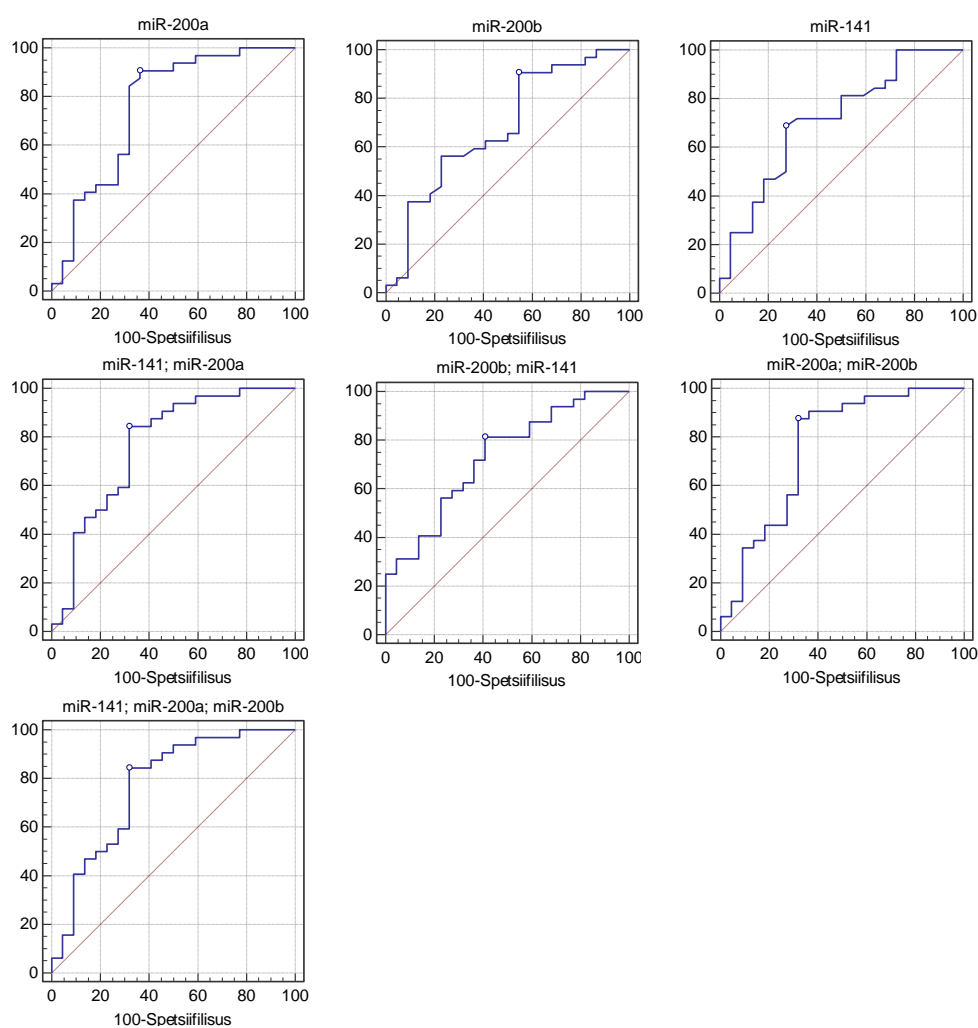
2.3.1.3 miR-200 perekonna markerite sensitiivsus ja spetsiifilisus

Töö käigus arvasime miR-200a, miR-200b ja miR-141 jaoks ka tundlikkuse ja spetsiifilisuse, millega need biomarkerikandidaadid endometriooosi tuvastada suudavad (Tabel 6).

Tabel 6. miR-200 perekonna markerite võimekus endometriooosi prognoosimisel.

miRNA	Sensitiivsus (%)	Spetsiifilisus (%)	ΔCt piirväärtus	AUC	AUC 95% usaldusintervall
miR-200a	90,6	63,6	>5,12	0,759	0,624-0,865
miR-200b	90,6	45,5	>5,76	0,680	0,539-0,801
miR-141	68,7	72,7	>6,26	0,711	0,572-0,826
miR-200a + miR-200b + miR-141	84,4	68,2	-	0,770	0,635-0,873
miR-200a + miR-200b	87,5	68,2	-	0,759	0,623-0,865
miR-200a + miR-141	84,4	68,2	-	0,767	0,632-0,871
miR-200b + miR+141	81,3	59,1	-	0,729	0,590-0,841

Valisime võrdlusgrupiks endometrioosiga ja endometrioosita patsiendid, kuna oluline on endometrioosihageid eristada sarnaste sümptomitega, kuid endometrioosita patsientidest. Kasutasime antud võrdluses ainult õhtul kogutud proove, et vältida tsirkaadsest rütmist tulenevat mõju miRNAde tasemes hommikul kogutud proovides. Arvutasime miR-200a, miR-200b ja miR-141 diagnostilise võimekuse hindamiseks nende markerite individuaalsed sensitiivsused ja spetsiifilisused ning vaatasime ka markerite kombineerimisest tulenevat efekti. Arvutamise aluseks olnud ROC-kõverad on toodud joonisel 11.



Joonis 11. miR-200 perekonna liikmete ROC-kõverad. Punkt kõveral tähistab optimaalseimat Ct piirväärtust.

Tulemuste põhjal osutus parima prognoosivõimega markeriks miR-200a sensitiivsuse ja spetsiifilisusega vastavalt 90,6% ja 63,6%, markerite kombineerimisel andis optimaalseima

sensitiivsuse ja spetsiifilisuse suhte miR-200a koos miR-200b-ga (sensitiivsus ja spetsiifilisus vastavalt 87,5% ja 68,2%).

2.3.2 Vereplasmast detekteeritavate miRNAde ekspressioonitasemete erinevuse päritolu analüüs

2.3.2.1 miR-200 perekonna ekspressioon endomeetriumi koes

Eelpool kirjeldatud katsed näitasid, et endometrioosi korral on miR-200 perekonna miRNAde tase vereplasmas muutunud. Käesolevas katses uurisime, kas need muutused võiksid tuleneda erinevustest endometrioosiga patsientide ja tervete naiste endomeetriumi miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioonitasemetest. Selleks määrasime miRNA ekspressioonitasemed üheksa endometrioosiga patsiendi ja kaheksa terve naise koeproovidest qRT-PCR meetodi abil.

Saadud Ct väärtused normaliseeriti kontroll-järjestuste RNU44 ja RNU48 vastu. RNU44 ja RNU48 on koeuuringutes sagedasti kasutatavad endogeensed kontrollid miRNAde kvantifitseerimisel qRT-PCR meetodiga (Meyer jt., 2010, Torres jt., 2013). Tulemuste analüüs näitas, et miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioonitase oli väga sarnane nii endometrioosiga kui tervete naiste endomeetriumi koes (p-väärtused olid kõik > 0,05).

2.3.2.2 miR-200 perekonna ekspressioon eksosoomides

Antud katses analüüsisime miR-200a, miR-200b ja miR-141 tasemeid vereseerumist eraldatud eksosoomides. Selleks kasutasime üldvalimisse kuuluva kaheteistkümne endometrioosiga patsiendi ja kaheteistkümne terve naise vereproove.

miRNA ekspressioonitasemed leidsime qRT-PCR meetodi abil ja saadud tulemused normaliseerisime referents-miRNAde miR-30e ja miR-99a vastu sarnaselt plasmaproovide analüüsile. Tulemused näitasid, et endometrioosiga patsientide miR-200 perekonna liikmete ekspressioonitase eksosoomides on ligikaudu kaks korda madalam kui vastavate miRNAde tase tervete naiste eksosoomides (Tabel 6).

Tabel 7. Eksosomaalsete miRNAde ekspressioonitasemed endometriosisiga patsientidel ja tervetel naistel.

miRNA	Ekspressioonitaseme erinevus kordades/ p-väärtus (endometriosisiga patsiendid vs terved naised)
miR-200a	-2,0 (p= 0,01)
miR-200b	-2,3 (p= 0,02)
miR-141	-1,9 (p= 0,02)

- märk ekspressioonitaseme väärtuse eest tähendab madalamat ekspressioonitaset.

2.3.2.3 Tuumaga vererakkudest eraldatud miR-200 liikmete ekspressioonitaseme seos tsirkaadse rütmiga

Järgmiseks otsisime vastust küsimusele, kust pärinevad tsirkaadse rütmi jooksul toimuvad miRNA ekspressioonitaseme muutused. Kuna on teada, et osa veres tsirkuleerivatest miRNAdest on pärit tuumaga vererakkudest (Dutttagupta jt., 2011; Pritchard jt., 2011), siis määrasime miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioonitasemed tuumaga vererakkude ehk BC fraktsioonist. Selleks kasutasime kuue terve naise hommikustest ja õhtustest vereproovidest eraldatud BC fraktsioone. Määrasime qRT-PCR meetodiga miRNA tasemed, referentsidena kasutasime nii miR-30e ja miR-99a keskmist kui ka RNU44 vastu normaliseerimist. Analüüs näitas, et sõltumata referentsi valikust ei esine hommikuste ja õhtuste proovide vahel statistilist erinevust, kõik p-väärtused > 0,05.

2.4 Arutelu

Endometriosis on üks levinumaid naistehaigusi, kuid selle diagnoosimiseks puuduvad käesoleval ajal mitteinvasiivsed kõrge spetsiifilisusega meetodid. Standardprotseduurina on kasutusel laparoskoopiline operatsioon, mis on ühtlasi ka üks ravivõimalustest. Laparoskoopia on invasiivne meetod ning omab seetõttu riski naise tervisele. Lisaks sellele on uuringud näidanud, et kollete hilisem histoloogiline uuring ei kinnita alati laparoskoopia käigus visuaalsel hindamisel saadud tulemusi (Marchino jt., 2005). Histoloogia on täpne

meetod (Almeida Filho jt., 2008), kuid selle kitsaskohaks on töömahukus, mistõttu ei uurita põhjalikult läbi kõiki laparoskoopia käigus leitud koldeid. See tähendab, et histoloogia käigus läbiuuritud koeproovidesse ei pruugi juhuslikkuse tõttu alati sattuda endometrioosikoldele iseloomulikke rakke ning seetõttu on haiguse diagnoosimine raskendatud (Clement, 2007).

Alternatiiviks laparoskoopiale otsivad teadlased mitteinvasiivseid biomarkerite kandidaate, mille abil saaks endometrioosi tuvastada kehavedelikest nagu veri, sülg või uriin. Ennekõike oleks sellistest diagnostikmarkeritest kasu parandamaks võimalusi endometrioosi varakult diagnoosida ja ravida. Üheks oluliseks endometrioosi mitteinvasiivse diagnostika sihtgrupiks on laparoskoopilise operatsiooni järjekorras ootavad viljatuse diagnoosiga patsiendid, kellel on ebamäärane kahtlus endometrioosile. Mitteinvasiivsed biomarkerid võimaldaksid teha kiire analüüsi ja endometrioosi leiu korral oleks põhjendatud patsiendi kiiremas korras saatmine laparoskoopiale, kuna erinevatel andmetel suurendab laparoskoopia käigus kollete eemaldamine ja sidekoeliste liiduste vabastamine loomuliku viljastumise määra kuni 50% (Ziegler jt., 2010; Senapati ja Barnhart, 2012). Igal juhul võiks mitteinvasiivse testi abil lühendada aega endometrioosi sümptomite avaldumise ja diagnoosi panemise vahel.

Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada, kas endometrioosi korral on vereplasma miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioonitasemed muutunud võrreldes tervete naiste vereplasmaga. Katsete tulemusena selgus, et kõik uuritud miR-200 perekonna kolm liiget on endometrioosipatsientide veres madalamalt ekspresseeritud kui tervetel naistel. Kuna miR-200 perekonna liikmed võimaldavad endometrioosihaigete ja tervete naiste grupe eristada vereplasma proovide alusel, võiksid miR-141, miR-200a ja miR-200b sobida endometrioosi mitteinvasiivseteks biomarkeriteks.

Võrdlesime uurimustöö käigus endometrioosiga patsiente ja terveid naisi ka endometrioosita patsientidega. Viimased on naised, kellel pole laparoskoopia käigus endometrioosi leitud, kuid on esinenud sellele viitavad kaebused, mille alusel on toimunud suunamine operatsioonile. Katsetulemuste üldise tendentsi põhjal on endometrioosita patsiendid miR-200 perekonna ekspressiooni poolest sarnased tervetele naistele (miR-141 ja miR-200a ekspressioon oli statistiliselt oluliselt erinev endometrioosita ja endometrioosiga patsientide vahel, kuid ei näidanud olulist erinevust endometrioosita

patsientide ja tervete vahel, miR-200b avaldumismuster oli mõneti erinev). Need tulemused on olulised näitamaks, et leitud biomarkerikandidaadid on tõepoolest endometrioosispetsiifilised.

Üks uurimustöö põhilisi eesmärke oli hinnata miR-200 perekonna liikmete võimet diagnoosida endometrioosi. Analüüsi käigus leitud ROC-kõverad toetasid saadud tulemusi ja näitasid selget korrelatsiooni miRNAde ekspressiooni ja endometrioosi vahel. Arvutasime ka miR-200a, miR-200b ja miR-141 sensitiivsused ja spetsiifilisused, mis näitasid, et parima ennustusvõimega marker on miR-200a või miR-200a kombineerituna miR-200b-ga. Kõrge sensitiivsus on oluline, kuna eelkõige on endometrioosi mitteinvasiivsete markerite puhul tähtis tuvastada võimalikult suure tõenäosusega kõik naised, kes haigust põevad. Põhjus, miks miR-200 perekonna liikmete omavaheline kombineerimine ei anna kõrgemaid testi tundlikkuse ja spetsiifilisuse parameetreid, seisneb arvatavasti selles, et miR-200a, miR-200b ja miR-141 ekspressioon on omavahel funktsionaalselt seotud. Tuleb silmas pidada, et toodud sensitiivsused ja spetsiifilisused kehtivad õhtul kogutud proovide korral.

Vaatasime miR-200 perekonna liikmete ekspressiooni sõltuvust ka endometrioosi staadiumist. Varase diagnoosimise ja ravi alustamise seisukohast on tähtis, et markerid oleksid kasutatavad haiguse igas staadiumis, kaasa arvatud väljakujunemise etapis. Oma töös nimetasime väikese valimi ja staadiumite vaheliste selgete piiride puudumise tõttu I ja II staadiumi endometrioosiga naised tinglikult grupiks A ning III ja IV staadiumi endometrioosiga naised grupiks B. Võrdlesime mõlemat gruppi tervete naiste proovidega ning saime tulemuseks, et miR-200 perekonna liikmed näitavad statistiliselt olulist ekspressioonierinevust tervetest sõltumata staadiumist, seejuures oli miR-200a ja miR-200b ekspressioonierinevus A grupi ja tervete naiste proovide vahel veidi suurem kui B grupi ja tervete vahel. miR-141 puhul oli erinevus just B grupi ja tervete naiste vereplasmas veidi suurem.

miR-141, miR-200a ja miR-200b näitasid statistiliselt olulist erinevust proovide vahel ka endometrioosiga patsientide A grupi ja endometrioosita patsientide vahel. B grupi ja endometrioosita patsientide vahel näitasid olulist erinevust miR-200a ja miR-141, aga mitte miR-200b. Seejuures erines miR-200b ekspressioon endometrioosipatsientide grupi siseselt A ja B staadiumi vahel. Nende andmete põhjal paistab miR-200b ekspressioon

olevat sõltuvuses endometrioosi staadiumitest. Varasemad uurimustööd on näidanud, et sõltuvalt endometrioosi staadiumist võivad domineerida erinevad protsessid, näiteks on I-II staadiumi puhul tuvastatud suurenenud põletikumarkerite sekretsiooni (Foda ja Aal, 2012). Edasistes uuringutes, kus vaadeldakse miR-200b ekspressiooni endometrioosiga patsientidel, tuleks arvesse võtta võimalust, et miR-200b ei sobi endometrioosi tuvastamiseks haiguse raskete staadiumite puhul.

Vereproovide kogumise ajalise info olemasolu põhjal võrdlesime patsientide gruppe tervetega ka lähtuvalt proovi võtmise ajast. Võrdlustulemused näitasid, et hommikul kogutud vereplasmades olid miR-200 perekonna liikmete avaldumistasemed madalamad kui õhtul kogutud plasmades, kuid oluline erinevus endometrioosiga patsientide ja tervete naiste vahel oli nähtav nii hommikul kui õhtul kogutud proovide puhul. Erinevalt sellest tuli endometrioosiga ja endometrioosita patsientide vaheline miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioonierinevus välja ainult õhtul kogutud proovides. Endometrioosita patsientide miR-200a ja miR-200b ekspressioonitase oli tervete grupi tasemest statistiliselt oluliselt madalam hommikul kogutud proovides, miR-141 erinevust ei näidanud. Õhtustes proovides endometrioosita patsientide ja tervete vahel statistiliselt oluline ekspressioonitaseme erinevus puudus.

Nende tulemuste põhjal püstitasime hüpoteesi, et miR-141, miR-200a ja miR-200b on tsirkaadsest rütmist sõltuvad ja tegime selle kontrollimiseks ka eraldi katse. Tsirkaadse rütmi katsest, kus vaatasime kaheksa terve naise plasmas uuritavate miRNAde taset hommikul ja õhtul võetud proovides, selgus, et miR-200 perekonna kolm liiget on ööpäevasest rütmist mõjutatud. Sarnaselt patsiendigruppide põhjal saadud tulemustele oli ka siin miR-200 perekonna ekspressioon hommikustes vereplasmades madalam. See tähendab, et miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioon on lisaks endometrioosile mõjutatud ka tsirkaadest rütmist. Kuigi ööpäevane miRNAde taseme kõikumine on endometrioosist sõltumatu tegur, mõjutab see kahtlemata saadud tulemusi. Katsetulemuste põhjal on endometrioosi korral patsientide miR-141, miR-200a ja miR-200b avaldumistasemed madalamad kui tervetel naistel, kuid ka hommikul kogutud vereplasmades on miR-200 perekonna ekspressioon madalam. Endometrioosist ja tsirkaadsest rütmist tulenevad ekspressioonitaseme muutused on samasuunalised ja käesoleva uurimustöö raames võib tsirkaadse rütmi mõju varjutada endometrioosispetsiifilist ekspressiooni, kuna miRNAde üldine madal tase hommikustes

proovides võib anda petliku tulemuse, et tegemist on endometrioosihaigetega. Sellest teadmisest lähtudes on usaldusväärsemad eelkõige õhtustest proovidest saadud tulemused, kus gruppidevahelised erinevused on suure tõenäosusega tõepoolest endometrioosist tingitud. Selles kontekstis tuleb esile statistiliselt olulise erinevuse puudumine endometrioosita patsientide ja tervete grupi õhtuste proovide vahel, mis näitab, et miR-200 perekonna alusel moodustavad endometrioosiga patsiendid eraldiseisva grupi endometrioosita patsientidest ja tervetest.

miR-200 perekonna ekspressioonitasemete sõltuvus tsirkaadsest rütmist on oluline tegur, mida tuleks arvesse võtta käesoleva uurimustöö tulemuste tõlgendamisel ning antud miRNAde edasisel uurimisel. Lisaks sellele peaks ka tulevastes teiste vereplasma miRNAde ekspressiooni määramates töödes jälgima tsirkaadse rütmi võimalikku mõju nende miRNAde avaldumisele ja pöörama tähelepanu proovide kogumise ajale.

Tsirkaadse rütmi päritolu täpsemaks väljaselgitamiseks vaatasime miR-200 perekonna tasemeid tervete naiste BC fraktsiooni hommikul ja õhtul kogutud proovides. Varasematest uurimustöödest on teada, et osa tsirkuleerivatest miRNAdest pärineb tuumaga vererakkudest. Tsirkuleerivate immuunrakkude hulk omakorda muutub ööpäevas (Born jt., 1997) ning seega oli alust arvata, et miRNAde tase võib muutuda koos rakkudega. Tulemused näitasid, et miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioonitaseme ööpäevased kõikumised ei tulene tõenäoliselt tuumaga vererakkudest.

Uurisime miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressiooni ka endometrioosipatsientide ja tervete naiste eksosoomides. Eksosoomide tasemel olid miR-141, miR-200a ja miR-200b endometrioosiga patsientidel kõik ligi kaks korda madalamalt ekspresseeritud kui tervetel naistel, mis tähendab, et tõenäoliselt on miR-200 perekonna liikmed vähemalt osaliselt vereplasmasse sattunud eksosomaalse transpordi käigus, kuid välistada ei saa ka teisi päritoluallikaid. Seetõttu uurisime, kas miR-200 perekonna ekspressioonitaseme erinevused endometrioosipatsientide ja tervete vahel on nähtavad ka endomeetriumi koes. Katsete tulemuste põhjal võib öelda, et miR-200 perekonna ekspressioonitasemete muutus endometrioosi korral ei tulene endomeetriumi koest. Koelise päritolu kohta ei ole antud töö tulemuste raames seega võimalik täpsemaid järeldusi teha.

2.4.1 Käesoleva töö seosed varasemate samateemaliste uurimustöödega

Praeguseks on tehtud väga vähe uurimustöid plasmast või seerumist tuvastatavate miRNAde kui endometrioosi mitteinvasiivsete biomarkerite kohta. Avaldatud töodes (Tabel 7) on kõigis kasutatud erinevaid tehnoloogiaid, validatsiooni kriteeriume ja referents miRNAsid. See on suure tõenäosusega põhjuseks, miks nende kolme töö tulemused ei kattu omavahel, ega ka meie tulemustega. Väärrib ka märkimist, et Jia ja kolleegide 2012. aasta töös referentsina kasutatud miR-16 näitas Suryawanshi jt., 2013 töös endometrioosiga patsientide ja tervete naiste vahel olulist ekspressioonitaseme erinevust.

Tabel 8. miRNAd endometrioosi biomarkeritena varasemates töodes.

Uuring	Materjal	Uuritavad	Meetod	Referents	Tulemus
Jia jt., 2012	plasma	III-IV staadiumiga patsiendid (23) ja laparoskoopiliselt kinnitatud endometrioosita naised (23)	1205 miRNA prooviga mikrokiip, valideerimine reaalaaja qRT-PCR-ga	miR-16	miR-17-5p↓ miR-20a↓ miR-22↓
Wang jt., 2013	seerum	Patsiendid (60) ja laparoskoopiliselt kinnitatud endometrioosita naised (25)	765 miRNA profiil TaqMan miRNA süsteemiga, validatsioon reaalaaja qRT-PCR-ga	U6	miR-199a↑ miR-122↑ miR-9*↓ miR-145*↓ miR-141*↓ miR-542-3p↓
Suryawanshi jt., 2013	plasma	Endometrioosiga patsiendid (33), endometrioosiseotud munasarja vähiga patsiendid (14), seroosse munasarja vähiga patsiendid (21) ja kinnitamata endometrioosita naised (20)	1113 miRNA ülegenoomne profiil reaalaaja qRT-PCR-ga, 23 miRNA validatsioon reaalaaja qRT-PCR-ga	miR-132	miR-15b↑ miR-16↑ miR-191↑ miR-195↑ miR-1973↑ miR-1974↑ miR-1978↑ miR-1979↑ miR-4284↑ miR-362-5p↑

2.4.2 Uurimustöö limitatsioonid

Tulemuste põhjal järelduste tegemisel tuleb arvestada mitmeid tegureid, mis võisid uurimise käiku ja tulemusi mõjutada. Valisime oma varasema töö ja kirjanduse põhjal uuritavateks miR-200 perekonna kolm liiget, aga ei saa välistada, et endometrioosi korral muutunud ekspresioonitasemega vereplasma miRNAsid on rohkem, mida näitavad ka varasemad miRNA põhised biomarkerite uuringud (Jia jt., 2012, Suryawanshi jt., 2013).

Teiseks ei saa täielikult välistada füsioloogilisi või patoloogilisi tegureid, mis lisaks endometrioosile võivad antud miRNAd taset mõjutada. Siiski, käesolevasse töösse kuulunud uuringugrupid ei eristunud füsioloogiliste parameetrite, nagu vanus ja KMI, poolest.

miR-200 perekonna ekspresioonitasemed endometrioosiga ja endometrioosita grupi patsientidel olid teatud võrdlustes omavahel sarnasemad kui kõrvutades patsiente tervete naistega. Üheks põhjuseks võib olla fakt, et uuringus osalenud endometrioosiga ja endometrioosita naistest suur osa olid viljatud. Kuigi endometrioos on üks viljatuse võimalikest põhjustest, võivad viljatust põhjustada veel väga mitmed munasarju, -juhasid või emakat kahjustavad patoloogilised seisundid (Honoré, 1997) ja ka miR-200b erinev avaldumismuster võis sellest kahe grupi vahelisest ühisosast tuleneda.

Endometrioosiuuringute üks põhilisi probleeme on objektiivse kontrollgrupi puudumine. Ühest küljest ei saa endometrioosihaigete võrdlemiseks kaasatavate tervete vabatahtlike puhul välistada endometrioosi puudumist, kui nad pole läbinud laparoskoopiat. Teisalt, kasutades kontrollgrupina naisi, kellel pole laparoskoopia käigus endometrioosi leitud, võib grupisisest esineda teisi patoloogiaid, mille kahtlus on olnud aluseks laparoskoopiale suunamiseks (Zondervan jt., 2002).

Metoodilisest küljest seab teatud piirangud uurimustulemuste tõlgendamisele referentsgeenide valik. Oma varasema töö põhjal valisime referentsgeenideks miR-30e ja miR-99a, sest nende ekspresioon oli proovide lõikes kõige ühtlasem. Üldtunnustatud referents-miRNAd, mille vastu proovide miRNA hulka normaliseerida, plasma jaoks puuduvad ning sageli leiab iga töögrupp eksperimentide käigus oma stabiilsed referentsid (D'haene jt., 2012). Tsirkuleerivate miRNAd normaliseerimiseks on kasutatud väikest mittekodeerivat nukleaarset RNAd U6, kuid osad autorid on leidnud, et seerumi U6 tase

kõigub indiviidide vahel märgatavalt ning ei sobi seetõttu referentsiks (Benz jt., 2013). RNU44 ja RNU48 on kasutusel stabiilse ekspresiooni tõttu paljudes kudedes, kuid nende ekspressioon plasmas ega seerumis pole alati detekteeritav ning samuti on viiteid sellele, et need snoRNAd on seotud patofüsioloogiliste seisunditega, mis võivad nende avaldumist mõjutada (Wang jt., 2012, Sahu, 2013). Kuigi normaliseerimisel vaadeldakse suhtelist ekspressioonitaset referentsidega, siis võib paljude erinevate referentside kasutamine muuta uurimustööde tulemused raskesti võrreldavaks, kuna uuringutulemused sõltuvad otseselt referentside valikust.

KOKKUVÕTE

Endometriosis on sage põletikuline günekoloogiline haigus, mille esinemine populatsioonis võib ulatuda 10%-ni. Siiani puuduvad endometriosisi diagnoosimiseks mitteinvasiivsed markerid, mille abil saaks haigust kiiresti ja ohutult tuvastada ning samuti lühendada diagnoosimisest ravi alustamiseni kuluvat aega. Potentsiaalsete mitteinvasiivsete biomarkeritena on uurimise all miRNAd, mille muutunud ekspressioonitasemeid on ka varem endometriosisi korral näidatud.

Käesolevas töös uuriti miR-200 perekonna liikmete miR-141, miR-200a ja miR-200b ekspressioonitasemeid endometriosisiga ja endometriosisita naiste vereplasmas kasutades qRT-PCR meetodit. Eesmärk oli välja selgitada, kas miR-141, miR-200a ja miR-200b on sobivad mitteinvasiivsed biomarkerid endometriosisi tuvastamiseks. Tulemused näitasid, et miR-141, miR-200a ja miR-200b on endometriosisiga patsientide vereplasmas oluliselt madalamalt ekspresseeritud kui endometriosisita patsientidel ja tervetel kontrollidel.

Lähtudes patsiendigruppide võrdlemisel vereproovide võtmise kellaajast, näitasime esmakordselt, et uuritud miRNAd ekspressioon muutub ööpäeva jooksul ning on seega tsirkaadsest rütmist sõltuv. Käesolevas töös võis tsirkaadsest rütmist tulenev miRNAd hommikune madal tase varjutada endometriosisi korral nähtava madala ekspressioonitaseme ning seetõttu kasutasime järeltule tegemisel eelkõige õhtul kogutud proovide põhjal saadud tulemusi. Avastus, et need miRNAd on ööpäevasest rütmist mõjutatud, on oluliseks alustadmiseks edasistes uurimustöodes, mis käsitlevad miRNAd ekspressiooni.

Lisaks eelnevale uurisime, kust pärinevad vereplasma miR-200 perekonna ekspressioonitaseme muutused endometriosisi korral. Tulemused näitasid, et miR-200a, miR-200b ja miR-141 ekspressioonitaseme muutused endometriosisi korral ei ole tuvastatavad endometriiumi koes, kuid on vähemalt osaliselt sattunud vereplasmasse eksosomaalse transpordi käigus.

Uurimustöö põhitulemusena näitasime, et miR-200a, miR-200b ja miR-141 on potentsiaalsed endometriosisi mitteinvasiivsed biomarkerid. Need miRNAd on vereplasmast kergesti detekteeritavad ning nende ekspressioonitaseme langus

endometrioosi korral on selle haiguse spetsiifiline, lisaks sellele suudavad antud markerikandidaadid endometrioosi prognoosida üsna kõrge tundlikkusega. Tulemused näitasid, et miR-200a-l põhinev test on eeltoodud miRNAde hulgast parima prognoosivõimega. miR-200a sensitiivsus ja spetsiifilisus endometrioosi tuvastamisel on vastavalt 90,6% ja 63,6%, miR-200a ja miR-200b kombinatsioonil vastavalt 87,5% ja 68,2%.

SUMMARY

Anne Mari Roost

Plasma microRNAs as potential non-invasive biomarkers for endometriosis

Endometriosis, a chronic inflammatory disease frequently associated with pelvic pain and infertility, is believed to affect up to 10% of women in reproductive age. It is a complex condition characterized by the presence of ectopic endometrial tissue outside the uterine cavity. Laparoscopic surgery is currently the gold standard for the diagnosis of endometriosis, however, laparoscopy still carries health risks associated to the procedure. In addition, patients with asymptomatic or mild endometriosis may not be addressed to surgery as they do not belong to the primary target group. Thus, those women would benefit from easier and safer non-invasive diagnostic methods for endometriosis.

Most promising sources for non-invasive disease biomarkers are believed to be blood serum and plasma or urine samples. Glycoproteins, cytokines, adhesion molecules, and growth factors have been investigated as potential endometriosis biomarkers. However, neither a single biomarker nor a panel of biomarkers has been validated as a reliable non-invasive test for endometriosis. Recently, microRNAs (miRNAs) have been proposed as a new class of possible disease biomarkers. miRNAs are ~ 22 nucleotide long single-stranded non-coding RNAs that regulate most cellular processes. It has been shown that miRNAs circulating in blood are stable and can be detected with several methods, including qRT-PCR. Furthermore, an altered expression of circulating miRNAs has been observed in various pathological states, therefore miRNA profiles in blood can potentially be used to differentiate individuals with and without the disease.

The aim of the current work was to determine the levels of miR-200 family miRNAs (miR-200a, miR-200b and miR-141) in blood plasma of women with and without endometriosis and to evaluate their potential as non-invasive endometriosis biomarkers. We used qRT-PCR method to measure miR-200a, miR-200b and miR-141 levels in blood plasma samples and found that all three miRNAs were down-regulated in women with endometriosis compared to women without the disease. Statistical analysis showed that miR-200a alone or in combination with miR-200b can predict endometriosis with a high sensitivity (90,6% and 87,5%, respectively) but with a relatively modest specificity (63,6% and 68,2%, respectively).

We also found that the expression levels of plasma miR-200a, miR-200b and miR-141 are dependent upon the circadian rhythm being significantly lower in blood samples collected in the morning. The fluctuations in miRNA levels should be taken into account when using these miRNAs as biomarkers in the future.

In conclusion, we propose that miR-200a, miR-200b and miR-141 are promising new non-invasive biomarkers for endometriosis.

This study was conducted in the Competence Centre on Reproductive Medicine and Biology.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada Reproduktiivmeditsiini TAK teadurit Merli Saaret abi eest praktilise töö läbiviimisel. Kõige suuremad tänud juhendajatele Maire Petersile ja Kadri Rekkerile igakülge nõu ja väga hea juhendamise eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abraham J.Q., Jared T.K., Ryan C.B. (2010). Sizing up the future of microRNA analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (6): 2535-2549

Adamson G.D. (2011). Endometriosis classification: an update. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 23 (4): 213-20

Akers J., Gonda D., Kim R., Carter B.S., Chen C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 113: 1-11

Almeida M.I., Reis R.M., Calin G.A. (2011). MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research* 717: 1-8

Almeida Filho D.P., Oliveira L.J., Amaral V.F. (2008). Accuracy of laparoscopy for assessing patients with endometriosis. *Sao Paulo Med. J.* 126 (6): 305-308

Altman D.G., Bland J.M. (1994). Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 309 (6948): 188

American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. (1997). *Fertil. Steril.* 67: 817-821

Andreasen D., Fog J.U., Biggs W., Salomon J., Dahlsveen I.K., Baker A., Mouritzen P. (2010). Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. Elsevier

Anger D.L., Warren G.F. (2008). The link between environmental toxicant exposure and endometriosis. *Frontiers in Bioscience* 13: 1578-1593

Arimoto T., Katagiri T., Oda K., Tsunoda T., Yasugi T., Osuga Y., Yoshikawa H., Nishii O., Yano T., Taketani Y. (Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int. J. Oncol.* 22: 551-560

Augoulea A., Lambrinoudaki I., Christodoulakos G. (2008). Thoracic endometriosis syndrome. *Respiration* 75 (1): 113-119

Balwierz P.J., Carninci P., Daub C.O., Kawai J., Hayashizaki Y., Belle W.V., Biesel C., Nimwegen E.v. (2009). Methods for analyzing deep sequencing expression data: constructing the human and mouse promoterome with deepCAGE data. *Genome Biology* 10: R79

Barnhart K., Dunsmoor-Su R., Coutifaris C. (2002) Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 77 (6): 1148-1155

Bartel D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297

Baskerville S., Bartel D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighbouring miRNAs and host genes. *RNA* 11: 241-247

- Bendoraitė A., Knouf E.C., Tewari M. (2010). Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecol. Oncol.* 116 (1): 117-125
- Benz F., Roderburg C., Cardenas D.V., Vucur M., Gautheron J., Koch A., Zimmermann H., Janssen J., Nieuwenhuijsen L., Luedde M., Frey N., Tacke F., Trautwein Luedde T. (2013). U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Experimental & Molecular Medicine* 45: e42
- Benes V., Castoldi M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50 (4): 244-249
- Born J., Lange T., Hansen K., Mölle M., Fehm H.-L. (1997). Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *The Journal of Immunology* 158 (9): 4454-4464
- Borrelli G.M., Abrão M.S., Mechsner S. (2013). Can chemokines be used as biomarkers for endometriosis? A systematic review. *Human Reproduction* 29 (2): 253-266
- Brase J.C., Wuttig D., Kuner R., Sülthmann H. (2010). Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular Cancer* 9: 306
- Bulletti C., Ziegler D.E., Setti P.L., Cicinelli E., Polli V., Flamigni C. (2004). The patterns of uterine contractility in normal menstruating women: from physiology to pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1034: 64-83
- Burk U., Schubert J., Wellner U., Schmalhofer O., Vincan E., Spaderna S., Brabletz T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 9 (6): 582-589
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601
- Calore F., Fabbri M. (2011). MicroRNAs and cancer. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*
- Cammack R., Altwood T., Campell P., Parish H., Smith A., Vella F., Stirling J. (2006/2008). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (2ed). Oxford University Press
- Castoldi M., Schmidt S., Benes V., Noerholm M., Kulozik A., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. (2006). A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 12 (5): 913-920
- Chang T.-C., Mendell J.T. (2007). microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8: 215-39
- Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X. et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18: 997-1006
- Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X., Li Q., Li X., Wang W., Zhang Y., Wang J., Jiang X., Xiang Y., Xu C., Zheng P., Zhang J., Li

R., Zhang H., Shang X., Gong T., Ning G., Wang J., Zen K., Zhang J., Zhang C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18: 997-1006

Christensen M. ja Schrott G.M. (2009). microRNA involvement in developmental and functional aspects of the nervous system and in neurological diseases. *Neurosci Lett* 466 (2): 55-62

Clement P.B. (2007). The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Adv. Anat. Pathol.* 14 (4): 241-260

Creighton C.J., Reid J.G., Gunarante P.H. (2009). Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform.* 10 (5): 490-497

de Ziegler D., Borghese B., Chapron C. (2010). Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 376: 730-738

D'haene B., Mestdagh P., Hellemans J., Vandesompele J. (2012). miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol. Biol.* 822: 261-272

Dong H., Lei J., Ding L., Wen Y., Ju H., Zhang X. (2013). MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chem. Rev.* 113: 6207-6233

Donnez J., Pirard C., Smets M., Jadoul P., Squifflet J. (2004). Surgical management of endometriosis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18 (2): 329-348

Dunselman G.A.J., Vermeulen N., Becker C., Calhaz-Jorge C., D'Hooghe T., De Bie B., Heikinheimo O., Horne A.W., Kiesel A.W., Nap A., Prentice A., Saridogan E., Soriano D., Nelen W. (2013). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction* 0 (0): 1-14

Duttgupta R., Jiang R., Gollub J., Getts R.C., Jones K.W. (2011). Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PloS One* 6 (6): e20769

Edwards J.K., Pasqualini R., Arap W., Calin G.A. (2010). MicroRNAs and ultraconserved genes as diagnostic markers and therapeutic targets in cancer and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Transl Res* 3 (3): 271-279

Fassbender A., Waelkens E., Verbeeck N., Kyama C.M., Bokor A., Vodolazkaia A., Van de Plas R., Meuleman C., Peeraer K., Tomassetti C., Gevaert O., Ojeda F., De Moor B., D'Hooghe T. (2012). Proteomics analysis of plasma for early diagnosis of endometriosis. *Obstet. Gynecol.* 119 (2): 276-285

Fassbender A., Vodolazkaia A., Saunders P., Lebovich D., Waelkens E., De Moor B., D'Hooghe T. (2013). Biomarkers of endometriosis. *Fertil. Steril.* 99: 1135-1145

Filigheddu N., Gregnanin I., Porporao P.E., Surico D., Perego B., Galli L., Patrigani C., Graziani A., Surico N. (2010). Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J. Biomed. Biotechnol.* 1-29

- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* 9(2): 102-114
- Foda A.A., Aal I.A.A. (2012). Role of some biomarkers in chronic pelvic pain for early detection of endometriosis in infertile women. *Middle East Fertility Society Journal* 17 (3): 187-194
- Fritz M.A., Speroff L. (2012). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 8th Ed, Lippincott Williams & Wilkins
- Gaur A., Jewell D.A., Liang Y., Ridzon D., Moore J.H., Chen C., Ambros V.R., Israel M.A. (2007). Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67: 2456
- Geiss G.K., Bumgarner R.E., Birditt B., Dahl T., Dowidar N., Dunaway D.L., Fell H.P., Ferree S., George R.D., Grogan T., James J.J., Maysuria M., Mitton J.D., Oliveri P., Osborn J.L., Peng T., Ratcliffe A.L., Webster P.J., Davidson E.H., Hood L., Dimitrov K. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology* 26: 317-325.
- Gilabert-Estellès J., Braza-Boïls A., Ramón L.A., Zorio E., Medina P., Espana F., Estellès A. (2012). Role of microRNAs in gynecological pathology. *Current Medicinal Chemistry* 19: 2406-2413
- Giudice L.C., Evers Johannes L.H., Healy D.L. (2012). *Endometriosis: Science and Practice*. Wiley-Blackwell
- Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S., Bartel D.B. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466 (7308): 835-840
- Guo S.-W. (2009). Recurrence of endometriosis and its control. *Human Reproduction Update* 15 (4): 441-461
- Haas C., Klessner B., Maake C., Bär W., Kratzer A. (2008). mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Science International: Genetics* 3: 80-88
- Haas D., Shebl O., Shamiyeh A., Oppelt P. (2012). The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 91
- Hadfield R., Mardon H., Barlow D., Kennedy S. (1996). Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Human Reproduction* 11 (4): 878-880
- Hawkins S.M., Creighton C.J., Han D.Y., Zariff A., Anderson M.L., Gunaratne P.H., Matzuk M.M. (2011). Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol. Endocrinol.* 25 (5): 821-832

- Honoré L.H. (1997). Pathology of female infertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 9 (1): 37-43
- Huang R.S., Gamazon E.R., Ziliak D., Wen Y., Im H.K., Zhang W., Wing C., Duan S., Bleibel W.K., Cox N.J., Dolan M.E. (2011). Population differences in microRNA expression and biological implications. *RNA Biol.* 8 (4): 692-701
- Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L., Xiao T., Schafer J., Lee M.L., Schmittingen T.D., Nana-Sinkam S.P., Jarjoura T.D., Marsh C.B. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE* 3: e3694
- Hwang J.-H., Oh J.-J., Wang T., Jin Y.-C., Lee J.-S., Choi J.-R., Lee K.-S., Joo J.-K., Lee H.-G. (2013). Identification of biomarkers for endometriosis in eutopic endometrial cells from patients with endometriosis using a proteomics approach. *Molecular Medicine Reports* 8 (1): 183-194
- Ibberson D., Benes V., Muckenthaler M.U., Castoldi M. (2009). RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnology* 9: 102
- J.Berek (2007). *Berek & Novak's Gynecology*. Lippincott Williams & Wilkins, 935
- Jensen S.G., Lamy P., Rasmussen M.H., Ostenfeld M.S., Dyrskjøt L., Ørntoft T., Andersen C.L. (2011). Evaluation of two commercial global miRNA expression profiling platforms for detection of less abundant miRNAs. *BMC Genomics* 12 (435): 1471-2164
- Ji X., Takahashi R., Hiura Y., Hirokawa G., Fukushima Y., Iwai N. (2009). Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin. Chem.* 55: 1944-1949
- Jia S.-Z., Yang Y., Lang J., Sun P., Leng J. (2012). Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are downregulated in women with endometriosis. *Human Reproduction* 0: 1-9
- Jinju H., Yoontae L., Kyu-Hyun Y., Young-Kook K., Hua J., Narry K.V. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes. Dev.* 18 (24): 3016-3027
- Jopling C.L., Yi M., Lancaster A.M., Lemon S.M., Sarnow P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309 (5740): 1577-1581
- Kaur H., Arora A., Wengel J., Maiti S. (2006). Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry* 45 (23): 7347-55
- Kennedy S., Bergqvist A., Chapron C., D'Hooghe T., Dunselman G., Greb R., Hummelshoi L., Prentice A., Saridogan E. (2005). ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum. Reprod.* 20 (10): 2698-2704
- Kim D.J., Linnstaedt S., Palma J., Park J.C., Ntrivalas E., Kwak-Kim J.Y., Gilman-Sachs A., Beaman K., Hastings M.L., Martin J.N., Duelli D.M. (2012). Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J. Mol. Diagn.* 14 (1): 71-80

- Kloosterman W.P., Wienholds E., de Bruijn E., Kauppinen S., Plasterk R.H. (2006b). In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* 3: 27-29
- Knapp V.J. (1999). How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertility and Sterility* 72 (1)
- Koska N., Yoshioka Y., Hagiwara K., Tominga N., Katsuda T., Ochiya T. (2013). Trash or treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Frontiers in Genetics* 4: 173
- Kulkarni M.M. (2011). Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. *Current Protocols in Molecular Biology*, 94: 25B.10.1–25B.10.17.
- Kuokkanen S., Chen B., Ojalvo L., Benard L., Santoro N., Pollard J.W. (2010). Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol. Reprod.* 82 (4): 791-801
- Lai E.C., Tomancak P., Williams R.W., Rubin G.M. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol.* 4: R42, 1-20
- Landthaler M., Yalcin A., Tuschl T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D.melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 14 (23): 2162-7
- Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M., Pushkaran B., Liggins A.P., Pulford K., Banham A.H., Pezzella F., Boulwood J., Wainscoat J.S., Hatton C.S., Harris A.L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 141 (5): 672-675
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419
- Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663-4670
- Li C., Feng Y., Coukos G., Zhang L. (2009). Therapeutic microRNA strategies in human cancer. *AAPS J* 11(4): 747-757
- Li W., Ruan K. (2009). MicroRNA detection by microarray. *Anal. Bioanal. Chem.* 394: 1117-1124
- Liu C.-G., Calin G.A., Meloon B., Gamlie N., Sevignani C., Ferracin M., Dumitru C.D., Shimizu M., Zupo S., Dono M., Alder H., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M. (2004). A nucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (26): 9740-9744
- Liu H., Lang J., Zhou Q., Shan D., Li Q. (2007). Detection of endometriosis with the use of plasma protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Fertility and Sterility* 87 (4): 988-990

- Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 297: 2053-2056
- Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C.R.Acad. Sci. Paris* 142: 241-243
- Marchino G.L., Gennarelli G., Enria R., Bongioanni F., Lipari G., Massobrio M. (2005). Diagnosis of pelvic endometriosis with use of macroscopic versus histologic findings. *Fertility and Sterility* 84 (1): 12-15
- Metzger D.A., Olive D.L., Haney A.F. (1988). Limited hormonal responsiveness of ectopic endometrium: histologic correlation with intrauterine endometrium. *Hum. Pathol.* 19 (12): 1417-24
- Meyer S., Pfaffi M.W., Ulbrich S.E. (2010). Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a "normal" way to a hidden layer of complexity? *Biotechnology Letters*
- Mihalyi A., Gevaert O., Kyama C.M., Simsa P., Pochet N., De Smet F., De Moor B., Meuleman C., Billen J., Blanckaert N. (2010). Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum. Reprod.* 25: 654-664
- Mo M.-H., Chen L., Fu L., Wang W., Fu S.W. (2012). Cell-free circulating miRNA biomarkers in cancer. *J. Cancer* 3: 432-448
- Mongroo P.S., Rustgi A.K. (2010). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol. Ther.* 10 (3): 219-222
- Morales-Prieto D.M., Ospina-Prieto S., Chaiwangyen W., Schoenleben M., Markert U.R. (2012). Pregnancy-associated miRNA-clusters. *Journal of Reproductive Immunology* 97 (1): 51-61
- Moreno-Moya J.M., Vilella F., Simón C. (2013). MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertility and Sterility*. In press
- Nair V., Zavolan M. (2006). Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends in Microbiology* vol 14 (4)
- Nardelli C., Iaffaldano L., Ferrigno M., Labruna G., Maruotti G.M., Quaglia F., Capobianco V., Di Noto R., Del Vecchio L., Martinelli P., Pastore L., Sacchetti L. (2013). Characterization and predicted role of the microRNA expression profile in amnion from obese pregnant women. *Int. J. Obes.* 121
- Nelson P.T., Wilfred B.R. (2009). In situ hybridization is a necessary experimental complement to microRNA (miRNA) expression profiling in the human brain. *Neurosci. Lett.* 466 (2): 69-72
- Nisolle M., Donnez J. (1997). Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.* 68 (4): 585-596

- Ohlsson Teague E.M., Print C.G., Hull M.L. (2010). The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Human Reproduction Update* 16 (2): 142-165
- Ohlsson Teague E.M., Van der Hoek K.H., Van der Hoek M.B., Perry N., Wagaarachchi P., Robertson S.A., Print C.G., Hull M.L. (2009). MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol. Endocrinol.* 23 (2): 265-275
- Olive D.L., Stohs G.F., Metzger D.A., Franklin R.R. (1985). Expectant management and hydrotubations in the treatment of endometriosis-associated infertility. *Fertil. Steril.* 44 (1): 35-41
- Ortega F.J., Mercader J.M., Catalan V., Moreno-Naverrete J.M., Pueyo N., Sabater M., Gomez-Ambrosi J., Anglada R., Fernandez-Formoso J.A., Ricart W., Frühbeck G., Fernandez-Real J.M. (2013). Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clinical Chemistry* 59 (5): 781-792
- Osokine I., Hsu R., Loeb G.B., McManus M.T. (2008). Unintentional miRNA ablation is a risk factor in gene knockout studies: a short report. *PLoS Genet* 4 (2): e34
- Pan Q., Luo X., Toloubeydokhti T., Chegini N. (2007). The expression profile of microRNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol. Hum. Reprod.* 13: 797-806
- Park S.M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes. Dev.* 22 (7): 894-907
- Pritchard C.C., Kroh E., Wood B., Arroyo J.D., Dougherty K.J., Miyaji M.M., Tait F., Tewari M. (2011). Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev. Res.* 5: 492
- Raffi F., Amer S. (2010). Endometriosis. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine* 21: 4
- Raposo G., Stoorvogel W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200 (4): 373-383
- Rekker K., Saare M., Roost A.M., Salumets A., Peters M. (2013). Circulating microRNA profile throughout the menstrual cycle. *PLoS One* 8 (11): e81166
- Rodrigues A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14 (10A): 1902-10
- Rogers P.A., D'Hooghe T.M., Fazeleabas A., Gargett C.E., Giudice L.C., Montgomery G.W. (2009). Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod. Sci.* 16: 335-346
- Sah S., McCall M.N., Eveleigh D., Wilson M., Irizarry R.A. (2010). Performance evaluation of commercial miRNA expression array platforms. *BMC Research Notes* 2: 80
- Sahu S.C. (2013). *microRNAs in toxicology and medicine*. John Wiley & Sons

- Sampson J.A. (1927). Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 14: 422
- Senapati S., Barnhart K. (2012). Managing endometriosis associated infertility. *Clin. Obstet. Gynecol.* 54 (4): 720-726
- Sha A.-G., Liu J.-L., Jiang X.-M., Ren J.-Z., Ma C.-H., Lei W., Su R.-W., Yang Z.-M. (2011). Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertility and Sterility* 96 (1): 150-155
- Sharpe-Timms K.L., Zimmer R.L., Ricke E.A., Piva M., Horowitz G.M. (2002). Endometriotic haptoglobin binds to peritoneal macrophages and alters their function in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 78 (4): 810-819
- Sheinerman K.S., Umansky S.R. (2013). Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front. Cell Neurosci.* (7): 150
- Shlomit R.-A., Zaldivar F., Oliver J.S., Galassetti P., Cooper D.M. (2010). Evidence for microRNA involvement in exercise-associated neutrophil gene expression changes. *J. Appl. Physiol.* 109: 252-261
- Sonkoly E., Wei T., Janson P.C., Sääf A., Lundeberg L., Tengvall-Linder M., Norstedt G., Alenius H., Homey B., Scheynius A., Stahle M., Pivarsci A. (2007). MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PloS One* 2 (7) e610
- Sredni S.T., Gadd S., Jafari N., Huang C.C. (2011). A parallel study of mRNA and microRNA profiling of peripheral blood in young adult women. *Front. Genet.* 2: 49
- Stahlberg A., Hakansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry* 50: 509-515
- Stanczyk J., Pedrioli D.M., Brentano F., Sanchez-Pernaute O., Kolling C., Gay R.E., Detmar M., Gay S., Kyburz D. (2008). Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58 (4): 1001-1009
- Stroun M., Anker P., Maurice P., Gahan P.B. (1977). Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int. Rev. Cytol.* 51: 1-48
- Suresh P.V., Venkatesh T., Rajan T., Tsutsumi R. (2013). Molecular pathology and therapy of endometriosis: revisited. *Androl. Gynecol: Curr. Res.* 1 (3)
- Suryawanshi S.M., Vlad A.M., Lin H.-M. (2013). Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*
- Suryawanshi S.M., Vlad A.M., Lin H.-M. (2013). Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*
- Torres A., Torres K., Pesci A., Ceccaroni M., Paszkowski T., Cassandrini P., Zamboni G., Maciejewski R. (2013). Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in

tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *International Journal of Cancer* 132: 1633-1645

Torres A., Torres K., Wdowiak P., Paszkowski T., Maciejewski R. (2013). Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecology Oncology* 130 (3): 588-594

Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101 (1): 25-33

Zernecke A., Bidzhekov K., Noels H., Shaqdaruren E., Gan L., Denecke B., Hristov M., Köppel T., Jahantigh M.N., Lutgens E., Wang S., Olson E.N., Schober A., Weber C. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* 8; 2 (100): ra81

Zhang B., Wang Q., Pan X. (2007). MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *Journal of Cellular Physiology* 210 (2): 279-289

Zhang X., Zeng Y. (2011). Performing Custom MicroRNA Microarray Experiments. *J. Vis. Exp.*

Zheng N., Pan C., Liu W. (2011). New serum biomarkers for detection of endometriosis using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Int. Med. Res.* 39 (4): 1184-1192

Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., Lim B., Riquotsos I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 455 (7216), 1124-1128 (Erratum in *Nature* (2009) 458 (7237): 538

Thery C., Ostrowski M., Segura E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9 (8): 581-593

Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNAs. *Nucl. Acids Res.* 39 (16): 7223-7233

Ulukus M., Cakmak H., Arici A. (2006). The role of endometrium in endometriosis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13: 467

Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjorstrand M., Lee J.J. Lotvall J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* : 9654-659

van der Linden P.J.Q. (1996). Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction* 11 (3)

van Rooij E., Sutherland L.B., Liu N., Williams A.H., McAnally J., Gerard R.D., Richardson J.A., Olson E.N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (48): 18255-18260

- Varma R., Rollason T., Gupta J.K., Maher E.R. (2004). Endometriosis and neoplastic process. *Reproduction* 127: 293-304
- Vercellini P., Viganò P., Somigliana E., Fedele L. (2013). Endometrisis: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*: doi:10.1038
- Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T. (2011). microRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13 (4): 423-433
- Vinatier D., Orazi G., Cosson M., Dufour P. (2001). Theories of endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 96 (1): 21-34
- Vodolazkaia A., El-Aalamat Y., Popovic D., Mihalyi A., Bossuyt X., Kyama C.M., Fassbender A., Bokor A., Schols D., Huskens D., Meuleman C., Peeraer K., Tomassetti C., Gevaert O., Waelkens E., Kasran A., De Moor A., D'Hooghe T.M. (2012). Evaluation of a panel of 28 biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Human Reproduction* 27 (9): 2698-2711
- Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R.L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C.C., Croce C.M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (7): 2257-2261
- Wang K., Yuan Y., Cho J.-H., McClarty S., Baxter D., Galas D.J. (2012). Comparing the microRNA spectrum between serum and plasma. *PloS ONE* 7 (7): e41561
- Wang W.-T., Zhao Y.-N., Han B.-W., Hong S.-J., Chen Y.-Q. (2013). Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (1)
- Wienholds E., Kloosterman W.P., Miska E., Alvarez-Saavedra E., Berezikov E., de Bruijn E., Horvitz H.R., Kauppinen S., Plasterk R.H. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309: 310-311
- Wightman B., Ha I., Ruvkun G., Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C.elegans*. (1993). *Cell* 75 (5): 855-862
- Zondervan K.T., Cardon L.R., Kennedy S.H. (2002). What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such as endometriosis. *Human Reproduction* 17 (6): 1415-1423
- Xu J., Lamouille S., Derynck R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19 (2): 156-172
- Yoontae L., Minju K., Jinju H., Kyu-Hyun Y., Sanghyuk L., Sung Hee B., V Narry K. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23: 4051-4060
- Ziegler D., Borghese B., Chapron C. (2010). Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *The Lancet* 376 (9742): 730-738

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.exiqon.com>

<http://www.mirbase.org>

<http://www.medcalc.org>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anne Mari Roost
(sünnikuupäev 11.04.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Plasma mikroRNAd kui potentsiaalsed endometriooosi mitteinvasiivsed biomarkerid

mille juhendajad on Maire Peters, Kadri Rekker ja Andres Metspalu

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.12.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 23.05.2014 (kuupäev)

