

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Nikola Kročilová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Minimální reziduální choroba u karcinomu prsu

Bakalářská práce

Nikola Kročilová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Andrea Prokopová

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 2. Května 2014

.....
podpis

Především bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Andree Prokopové za odborné vedení, cenné připomínky, kladný přístup a čas, který mi věnovala při vypracovávání bakalářské práce a hodnocení výsledků. Dále bych chtěla poděkovat Věře Růžkové za pomoc při práci v laboratoři a v neposlední řadě svým blízkým za podporu.

Souhrn

V České republice je karcinom prsu nejčastějším typem nádorového onemocnění u žen. Vznik metastáz je pro pacientky většinou fatální a k výskytu dochází obvykle u pacientek v remisi. Z tohoto důvodu je včasná a dostatečně citlivá detekce nových zhoubných ložisek velmi důležitá. Jedním z potenciálních diagnostických nástrojů se v posledních letech stává vyšetření přítomnosti minimální reziduální choroby (minimal residual disease, MRD) založené na detekci cirkulujících nádorových buněk (circulating tumour cells, CTCs) v těle pacientky po vyjmutí primárního nádoru, která je bez zjevných příznaků nemoci. Tyto CTCs, které jsou považovány za prekuzory mikrometastáz, lze detekovat celou řadou metod, z nichž jednou z nejcitlivějších a nejvyužívanějších je kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (real-time RT-PCR).

V předložené studii byly jako markery vhodné pro detekci MRD u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR testovány karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen, CEA) a mammaglobin (MAM). Ve vzorcích sentinelových uzlin byla kvantifikována exprese markerů a na základě experimentálně stanovených cut-off hodnot byla určena pozitivita či negativita uzliny na přítomnost CTCs. Prokázali jsme vhodnost markerů CEA a MAM pro vyšetření přítomnosti CTCs ve vzorcích sentinelových uzlin u pacientek s karcinomem prsu. Dále byla provedena analýza přežití bez relapsu (relapse free survival, RFS) a vyhodnocen její vztah k přítomnosti CTCs. Pacientky s přítomností CTCs v sentinelové uzlině vykazovaly kratší přežití než pacientky s negativními uzlinami. Pokud byly ze souboru vyloučeny pacientky s obecně horší prognózou (tj. pacientky s tumorem vyššího stádia, s postižením uzlin, s metastázami, s negativními estrogenovými a progesteronovými receptory a s pozitivní amplifikací HER2) tento vztah se již neprokázal.

V rámci studie byla připravena diluční řada standardů pro glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH). Tento gen se řadí mezi referenční neboli „housekeepingové“ geny a ve studii byl použit k ověření správného průběhu izolace RNA a reverzní transkripce.

Summary

Breast cancer is the most frequent type of cancer in women in Czech republic. Formation of metastases is usually fatal for the patients and usually occurs in patients in remission. For this reason the early and sufficiently sensitive detection of the new malignant bearings is very important. One of the potential diagnostic tools in recent years is becoming an examination of presence of minimal residual disease (MRD) based on detection of circulating tumor cells (CTCs) in the body of patient after removal of the primary tumor, which is without obvious symptoms of the disease. These CTCs, which are considered to be precursors of micrometastases can be detected by a variety of methods, one of the most sensitive and used is a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (real time RT-PCR).

In the propounded study carcinoembryonic antigen (CEA) and mammaglobin (MAM) were tested as markers suitable for MRD detection in breast cancer by real-time RT-PCR method. Expression of the markers was quantified in the samples of sentinel nodes and based on experimentally determined cut-off values, were determined according to positivity or negativity of nodes for the presence of CTCs. We have proved the suitability of CEA and MAM markers to investigate the presence of CTCs in samples of sentinel nodes in patients with breast cancer. Furthermore, the analysis of relapse free survival (RFS) was also performed and it was evaluated it's relationship with presence of CTCs. Patients with the presence of CTCs in the sentinel node demonstrated a shorter survival than patients with negative nodes. When patients with a generally worse prognosis (patients with higher tumor stage, with afflicted nodes, with metastases, with negative estrogen and progesterone receptor and with positive HER2 amplification) were excluded from the set of patients, this relationship hasn't been proved again.

Within the study the preparation of a dilution series of standards for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also performed. This gene belongs to reference or "housekeeping" genes and it was used to verify the correct operation of RNA isolation and reverse transcription in the study.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	11
2.1	Prsy	11
2.1.1	Stavba a popis	11
2.1.2	Vývoj a změny	12
2.1.3	Karcinom prsu	13
2.1.3.1	Klasifikace a druhy nádorů	13
2.1.3.2	Epidemiologie	15
2.1.3.3	Etiologie	16
2.1.3.4	Klinické projevy	18
2.1.3.5	Diagnostika a staging	19
2.1.3.6	Léčba	21
2.2	Minimální reziduální choroba a její detekce	24
2.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
2.4	Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)	29
2.5	Real-time reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Real-time RT-PCR)	31
2.5.1	Způsoby detekce amplikonů získaných metodou Real-time RT-PCR	32
2.5.1.1	DNA-interkalační barviva	32
2.5.1.2	Hydrolytické próby	32
2.5.1.3	Hybridizační próby	33
2.5.1.4	Další typy používaných prób	33
2.6	Detekce minimální reziduální choroby karcinomu prsu metodou Real-time RT-PCR	36
2.6.1	Nejčastěji používané markery k detekci cirkulujících nádorových buněk u karcinomu prsu	37
2.6.1.1	Mammaglobin (MAM)	38
2.6.1.2	Karcinoembryonální antigen (CEA)	39

3	Experimentální část	40
3.1	Metodika.....	40
3.1.1	Izolace RNA a reverzní transkripce.....	40
3.1.1.1	Vyšetřovaný materiál	40
3.1.1.2	Chemikálie a spotřební materiál	41
3.1.1.3	Přístroje a pomůcky.....	41
3.1.1.4	Pracovní postup	42
3.1.2	Real-time PCR	45
3.1.2.1	Chemikálie a spotřební materiál	45
3.1.2.2	Přístroje a pomůcky.....	45
3.1.2.3	Pracovní postup	46
3.1.2.4	Primery a próby	47
3.1.2.4.1	Mammaglobin (MAM)	47
3.1.2.4.2	Karcinoembryonální antigen (CEA).....	48
3.1.2.4.3	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH).....	49
3.1.2.4.4	Ředění primerů a prób	50
3.1.2.4.5	Thermo-Start polymeráza.....	50
3.1.2.4.6	MgCl ₂ a reakční pufr	51
3.1.2.5	Negativní kontrola, pozitivní kontrola a specifické standardy	51
3.1.2.5.1	Negativní kontrola	51
3.1.2.5.2	Pozitivní kontrola	51
3.1.2.5.3	Specifické standardy	51
3.1.3	Příprava standardů referenčního genu GAPDH.....	52
3.1.3.1	Chemikálie a spotřební materiál	53
3.1.3.2	Přístroje a pomůcky.....	54
3.1.3.3	Pracovní postup	54
3.1.4	Pacienti	55
3.2	Výsledky.....	56
3.2.1	Stanovení přítomnosti CTCs pomocí vyšetření exprese nádorových markerů MAM a CEA ve vzorcích sentinelových uzlin u souboru pacientek s karcinomem prsu	56
3.2.2	Ředění a příprava standardů GAPDH.....	60
3.3	Diskuze	64

3.4	Závěr.....	66
4	Seznam použité literatury	67
5	Seznam použitých zkratek	76

Cíle práce

Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice karcinomu prsu a minimální reziduální choroby (MRD) u solidních nádorů, získat teoretické i praktické znalosti PCR metodiky, naučit se pracovat s patřičnými databázemi a softwarem (PubMed, OMIM, Rotor-Gene 6, aj.)

Naučit se izolaci RNA z tkání a stanovit expresi vybraných markerů ve vzorcích pacientek s karcinomem prsu metodikou kvantitativní RT-PCR.

Zkorelovat výsledky s dostupnými klinickými daty, v tomto ověření a v dalším sledování vybraných pacientů event. pokračovat v rámci diplomové práce.

1 Úvod

Nádorové onemocnění neboli dělení a růst buněk, jejichž cyklus se vymknul kontrolním mechanismům organismu, provázejí lidstvo již od jeho vzniku. Znamky změn způsobených tímto typem onemocnění byly dokonce nalezeny i na kosterních pozůstatcích dinosaurů (Petruželka *et al.*, 2003).

Zhoubná nádorová onemocnění patří po kardiovaskulárních k nejčastější příčině úmrtí v populaci a řadí se mezi civilizační choroby. V současnosti celosvětově výskyt rakoviny narůstá, což lze připsat i měnícím se podmínkám prostředí a životního stylu populace.

Celosvětově bylo v roce 2012 hlášeno 32,4 milionu lidí s diagnostikovanou rakovinou, 14,1 milionu nových případů a 8,2 milionu úmrtí. Dle pohlaví byla incidence o 25 % vyšší u mužů než u žen. U mortality byl zaznamenán nižší nárůst než v případě incidence, kdy u mužů došlo ke zvýšení o 15 % a u žen o 8 %. Tento fakt byl zaznamenán v rozvinutých oblastech, což zřejmě poukazuje i na vliv prostředí (www.globocan.iarc.fr).

V Evropě byla pro rok 2012 zaznamenána nejvyšší incidence u mužů u karcinomu prostaty a u žen u karcinomu prsu, který následoval karcinom tlustého střeva a karcinom plic. Nejvyšší mortalita však byla zjištěna u karcinomu plic (www.eco.iarc.fr).

Každý čtvrtý člověk v České republice umírá příčinou maligního nádorového onemocnění (Adam, Vorlíček, Koptíková, 2003) a dle Národního onkologického registru ČR bylo v roce 2010 zaznamenáno 82 606 nových zhoubných novotvarů a novotvarů *in situ* (preinvazivní nádory). Z tohoto celkového počtu bylo 42 933 případů u mužů a 39 673 u žen. Vzhledem k roku 2009 se zvýšil výskyt nových nádorů o 4 %. Zatímco incidence dlouhodobě narůstá, mortalita naopak klesá a konkrétně v roce 2010 zemřelo na následek zhoubného nádoru 27 834 osob (www.uzis.cz).

Mezi nejčastější nádorová onemocnění u obou pohlaví patří tzv. „jiný zhoubný novotvar kůže“, nádor kolorekta a nádor průdušnice, průdušek a plic. Častým typem rakoviny výhradně u mužského pohlaví je karcinom prostaty, jehož incidence za posledních 20 let výrazně vzrostla. U žen se nejvíce vyskytuje karcinom prsu, u kterého se mortalita a incidence v roce 2010 zvýšila o 32,1 % oproti roku 2009. (www.uzis.cz).

Nárůst nových případů zhoubných novotvarů může být podmíněn stárnutím české populace, zvýšením množství znečišťujících látek v prostředí, ale také rozvojem diagnostických metod. Účinnější terapie a nové přístupy k léčbě mají naopak vliv na snižování úmrtnosti (www.uzis.cz).

Velmi přínosným se stává monitoring nádorových markerů (velmi citlivých nádorově specifických molekul, jejichž množství závisí na povaze nádoru) z periferní krve, kostní dřeně, ale i tkáně, např. sentinelové uzliny u karcinomu prsu (Petruželka *et al.*, 2003). Pomocí těchto markerů může být detekována také tzv. minimální reziduální choroba, která poukazuje již na malé množství zhoubných nádorových buněk (tzv. mikrometastázu) v těle v období po odstranění nádoru a ukončení léčby u pacienta v remisi. Detekce minimální reziduální choroby je důležitá pro záchyt možné recidivy nádorového onemocnění či ověření účinnosti léčby, kdy lze dle výsledků pacienta podrobit buď další léčbě či se naopak vyhnout jeho zbytečné zátěži (Hauwel, Matthes, 2014).

2 Teoretická část

2.1 Prsy

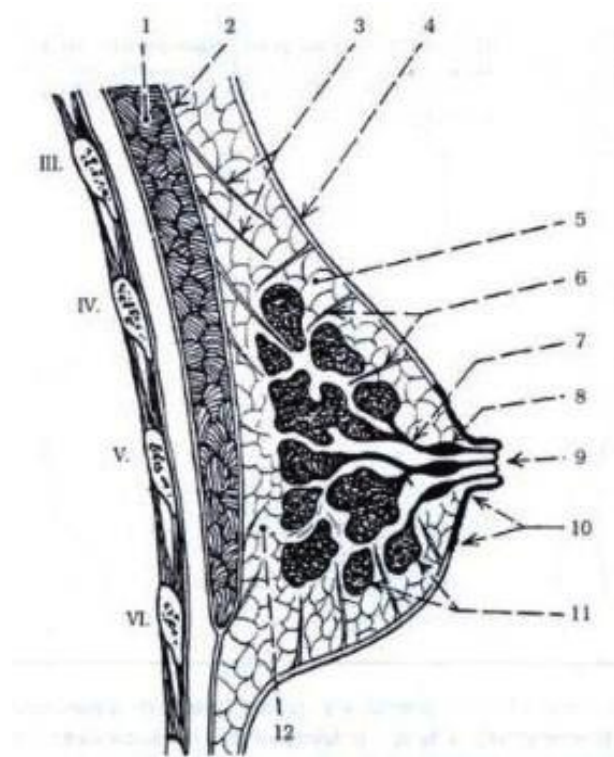
Prsy (*mammae*) jsou párová vyvýšení v přední části hrudníku tvořená zejména mléčnými žlázami, které jsou zároveň největšími kožními žlázami v těle. Prsy jsou přítomny u obou pohlaví, ale pouze u žen se mléčné žlázy dále vyvíjejí a zvětšují (u mužů zůstávají rudimentární). Jejich hlavním významem je tvorba mateřského mléka v laktačním období (Čihák, Druga, Grim, 2004). Plně vyvinutý prs se nachází v rozmezí 3. až 6. žebra a jeho průměrná velikost je zhruba 12 cm horizontálně a 11 cm vertikálně. Velikost prsů se však značně různí a mohou vykazovat asymetrii i navzájem k sobě (Petrovický, Druga, Seichert, 2002).

2.1.1 Stavba a popis

Prs se skládá z kůže, tukového polštáře a mléčné žlázy. Na vrcholu prsu se nachází prsní dvorec (kulatý, 3 – 6 cm, růžové až tmavě hnědé pigmentace) s drobnými výstupky (rudimentární Montgomeryho žlázy), ze kterého vystupuje prsní bradavka. Tukový polštář vyplňuje prohlubně a nerovnosti mezi žlázovými laloky (tvarování prsu). Základem mléčné žlázy je žlázové těleso tvořené 15 - 20 lalůčky (lobuly, dělí se na alveoly), do kterých se spojují mlékovody (dukty). Hlavní dukty vyústí do prsní bradavky. Tepny a žíly zajišťující krevní zásobení tvoří paprscitou a kruhovou síť. Prsy jsou také bohatě protkány nervy a lymfatickou sítí. Právě axilární lymfatické uzliny jsou častou lokalitou vzniku metastáz. Vnímavost dvorce (smrštění) a bradavky (vyvýšení) na vnější podněty je zajištěna svaly upínajícími se ke kůži (Čihák, Druga, Grim, 2004; Petrovický, Druga, Seichert, 2002; Abrahámová *et al.*, 2000).

2.1.2 Vývoj a změny

Mléčná žláza se vyvíjí z tzv. mléčné lišty embrya (od podpaží ke tříslům). U mužského pohlaví jsou mléčné žlázy zakrnělé díky testosteronu, který tento vývoj potlačuje. U žen dochází v průběhu života ke změnám prsu a mléčné žlázy. Prsní bradavka je po narození orientována směrem dovnitř a po pár dnech se začne vyvyšovat. Mezi zásadní změny patří - vyvýšení a zvětšení prsu (v preadolescentním období), strukturní změny mléčné žlázy (během menstruačního cyklu), výrazný růst vývodů a lobulů a tvorba mateřského mléka (v průběhu gravidity) a snížení množství lobulů (úbytkem pohlavních hormonů při menopauze) (Čihák, Druga, Grim, 2004; Petrovický, Druga, Seichert, 2002; Abrahámová *et al.*, 2000).



Obr. č. 1: Schematické znázornění prsu na sagitálním řezu: 1 – velký prsní sval, 2 – fascie velkého prsního svalu, 3 a 6 – vazivové pruhy (soubor pruhů), 4 – kůže prsu, 5 – premammární tuk, 7 a 8 – mlékovody, 9 – prsní bradavka, 10 – prsní dvorec, 11 – žlázové laloky a 12 – retromammární tuk (Upraveno dle: Šmarda *et al.*, 2005)

2.1.3 Karcinom prsu

Karcinom prsu lze definovat jako různá zhoubná bujení buněk epitelu mléčné žlázy (Adam, Vaníček, 2002). Rakovina prsu je nejzávažnějším a nejfrekventovanějším typem nádorového onemocnění v ženské populaci. V ČR se v roce 2012 nádor prsu podílel 25,47 % na předpokládané incidenci a 13,35 % na mortalitě u pacientek (www.eco.iarc.fr). Tento druh malignity se objevuje také u mužů, avšak tvoří pouze 1 % případů karcinomu prsu (Abrahámová *et al.*, 2000).

2.1.3.1 Klasifikace a druhy nádorů

Nádory (tumory, blastomy) jsou útvary vzniklé akumulací abnormálních a samostatných populací buněk, čímž dochází k ireverzibilním změnám ve tkáních. Pro vznik nádoru je klíčové vyřazení kontrolních pochodů, což vede ke změně genetického materiálu buňky (5 až 6 mutací důležitých genů). Ke změnám dochází častěji u kmenových buněk a spouštěcími podněty mohou být chemické látky, fyzikální vlivy, genetické faktory, virové částice, hormony, životní styl aj. (Mačák, Mačáková, 2004; Petruželka *et al.*, 2003)

Nádory lze rozdělit dle různých kritérií. Primárně se rozlišují nádory pravé a nepravé. Mezi nepravé nádory patří cysty, hypertrofie, hyperplazie, zánětlivé pseudotumory, uložené patologické látky, poruchy embryonálního vývoje apod. Pravé nádory lze rozlišit na základě vlastností a původu. Dle vlastností rozlišujeme nádory maligní (agresivního růstu, metastazující), benigní (vytyčené a často opouzdřené) a intermediární. Dle původu se nádory dělí na epitelové, mezenchymové, trofoblastové, teratomy, z nervové tkáně a smíšené (Mačák, Mačáková, 2004; Horyna, Houdek, 2008).

Nádory prsu lze rozdělit na benigní, fibroadenomy, fyloidní a maligní. Benigní nádory mají zejména epitelový původ a patří sem papilomy a adenomy (laktační, tubulární, pleomorfní a apokrinní). Fibroadenomy jsou hojně se vyskytujícím typem benigních nádorů u žen do 30 let, jsou pevné a ostře ohraničené a nejvíce se objevují v horním kvadrantu prsu. Fyloidní nádory se vyskytují v pozdějším věku než fibroadenomy, jsou drobných i velkých rozměrů a vzácně tvoří i maligní metastazující útvary (Mačák, Mačáková, 2004; Schmitt, Gruliow, 2010).

Nádory maligního typu mohou být invazivní a neinvazivní. Lobulární karcinom *in situ* (LCIS) je neinvazivním zhoubným nádorem. Vyskytuje se častěji u mladých žen a tvoří 80 až 90 % případů před klimakteriem. LCIS se dělí na typ A, který sestává z diploidních buněk bez jadérek a typ B s hyperploidními buňkami, které mají výrazná polymorfní jádra s jadérky. Buňky spojuje ztráta exprese adhezního proteinu E-cadherinu, který je potřebný pro kohezi zdravých epitelových buněk. Zasaženy jsou terminální duktotubulární jednotky (Mačák, Mačáková, 2004; Schmitt, Gruliow, 2010).

Invazivní duktální karcinom tvoří až 80 % všech prsních nádorů. Morfologicky se jedná o tuhý útvar nepravidelného ohraničení (kolem 2 cm). Vysoce diferenciované nádory běžně vytvářejí tubuly, buňky obsahují malá okrouhlá jádra. Středně diferenciované karcinomy formují shluky či jednotlivé metastazující buňky. Slabě diferenciované karcinomy proliferují jako pevné útvary či rozptýlená ohniska a tvoří nekrózy. Nádory jsou ukotveny vazivem k podkladu či způsobují vtažení kůže a bradavky. Metastázy lze najít v kostech nebo uzlinách v podpaží. Příznakem se tak v některých případech stává lymfedém paže (Mačák, Mačáková, 2004; Schmitt, Gruliow, 2010).

Intraduktální karcinom *in situ* (DCIS) je druhým typem neinvazivního nádoru a zasahuje do duktálně-lobulárního systému. Dnes má tento nádor přibližně 15-30% zastoupení. U DCIS lze rozlišit 5 subtypů: pevný, komedonový (s nekrózami), papilární (proliferující do fibrovaskuárních jader), mikropapilární (s intraduktálními útvary) a kribriformní (s rovnoměrným rozložením intraepiteliárních prostor). Buňky mají více jader, nápadná jadérka a orientují se kolmo na přemostňující trabektuly. V případě nekomedonových nádorů může vzniknout i vzácná Pagetova choroba prsní bradavky charakteristická světlými buňkami v pokožce bradavky (Mačák, Mačáková, 2004; Abrahámová *et al.*, 2000; Schmitt, Gruliow, 2010).

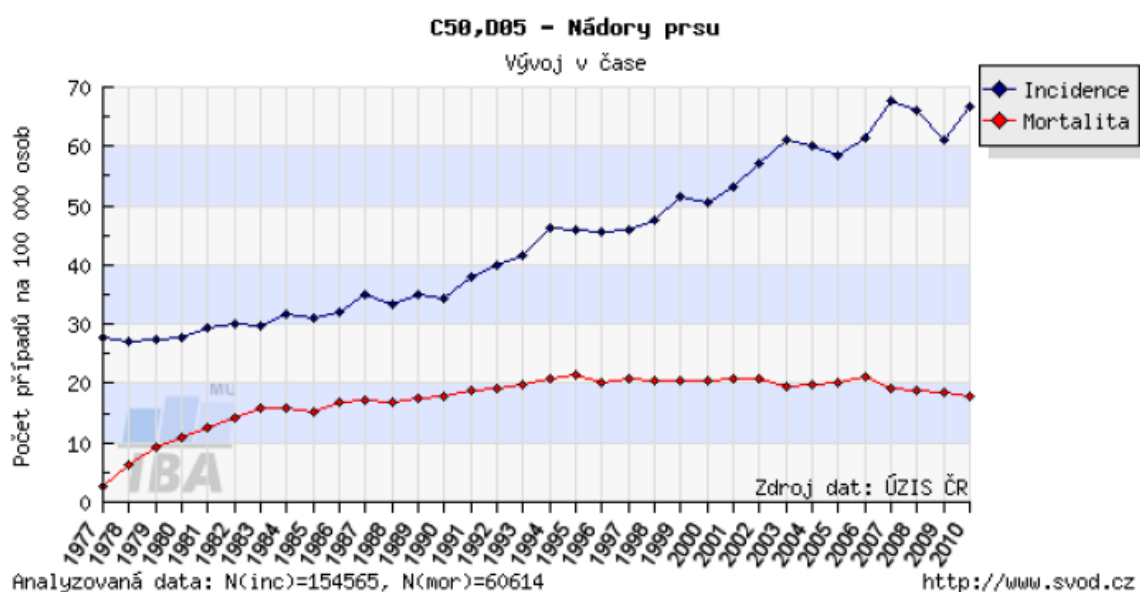
Asi 10% nádorů představuje invazivní lobulární karcinom, který má nejvyšší podíl na oboustranných typech nádorů. Buněčný rozsev probíhá formou souborů či volných klastrů. U tohoto typu nádoru je náročné identifikovat primární místo vzniku (vyznačuje se multicentrickými ložisky) od metastáz, které se tvoří v gastrointestinálním traktu, vaječnicích, děloze, mozku, kostech apod. (Mačák, Mačáková, 2004; Schmitt, Gruliow, 2010)

Tubulární karcinomy jsou malé (menší než 1 cm), většinou diploidní a tvoří 10 % všech prsních nádorů. (Schmitt, Grulíow, 2010).

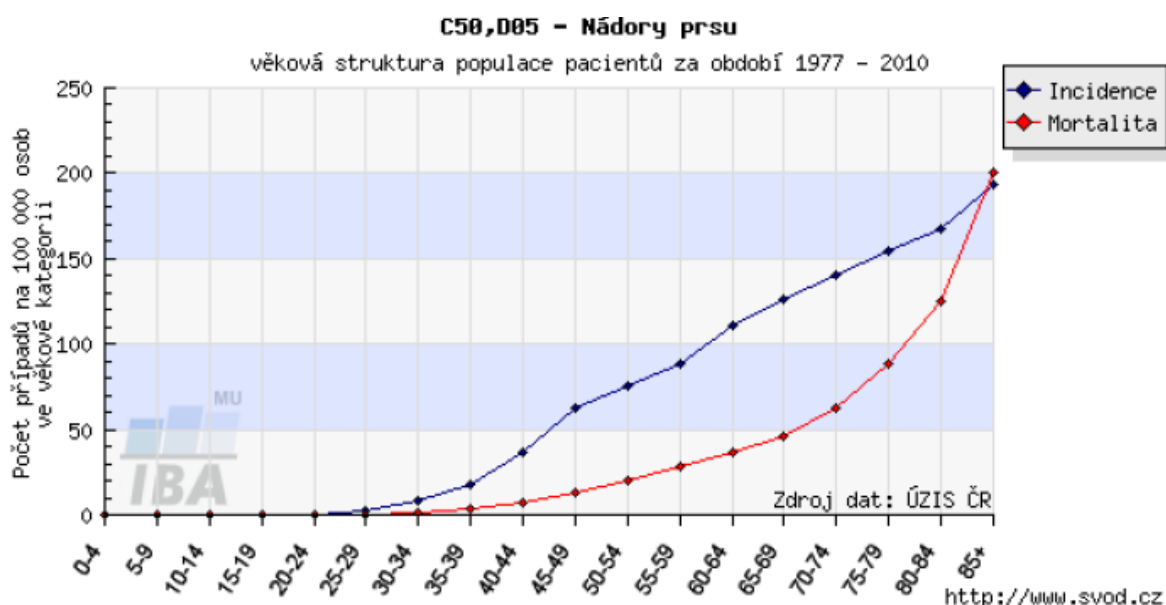
Za zmínku stojí ještě medulární karcinom, který tvoří ohraničené měkké útvary a podílí se jen 1-5 % na karcinomech prsu. Nádor sestává z velkých buněk, které obsahují pleomorfní jádra. Tvoří se lymfoplazmocytní filtrát a nedochází k průniku do obklopujících tkání prsu. Mucinózní karcinomy jsou diploidní a vyskytují se u starších žen a mají želatinovou konzistenci. Invazivní papilární karcinomy jsou vzácné, tvoří maximálně 1 % a méně než 1 % tvoří metaplastické karcinomy (Mačák, Mačáková, 2004; Schmitt, Grulíow, 2010).

2.1.3.2 Epidemiologie

Ač všeobecně incidence u nádorových onemocnění dlouhodobě stoupá a úmrtnost naopak klesá, u karcinomu prsu stoupá jak incidence, tak úmrtnost (www.uzis.cz). Výskyt tohoto onemocnění je ovlivněn věkem (rizikový faktor), přičemž nejčastější nález je kolem 50. roku. Rakovina prsu se začíná v posledních letech více objevovat i v nižších věkových skupinách (nad 30 let), kdy do 30 let se často nevyskytuje a pod 20 let vzácně (Abrahámová *et al.*, 2000; Adam, Vorlíček, 2002).



Obr. č. 2: Časový vývoj hrubé incidence a mortality v počtu případů na 100 000 žen pro diagnózy C50 – maligní karcinom a D05 – karcinom *in situ* (Upraveno dle: www.svod.cz)



Obr. č. 3: Věkově specifická incidence a mortalita v počtu případů na 100 000 žen pro diagnózy C50 – maligní karcinom a D05 – karcinom *in situ* (Upraveno dle: www.svod.cz).

2.1.3.3 Etiologie

U karcinomu prsu byla prokázána řada rizikových faktorů podněcujících jeho vznik. Mezi nejvýznamnější patří věk, genetické, hormonální a benigní změny, nutriční faktory a faktory vnějšího prostředí. I přes tato známá rizika dochází u více jak poloviny pacientek ke vzniku nádoru bez zjevných důvodů (Petruželka *et al.*, 2003).

Rozhodujícím a podstatným faktorem pro vývoj nádoru prsu je věk. Výskyt karcinomu prsu stoupá kolem 30. roku a po 45. roce tvoří až 85 % všech nádorů (Adam, Vorlíček, 2002).

Vznik geneticky podmíněných nádorů je na rozdíl od sporadických (vznikajících spontánně) zapříčiněn odlišným původem mutací mezi alelami tumorsupresorového genu. Mutace u jedné z alel byla zděděna (predispozice) a u

druhé alely se vytvořila až druhotně (spontánně) vlivem jiných než genetických faktorů. Takto vzniklé nádory lze rozlišit na hereditární a familiární. V případě hereditárních forem je mutace přenášena z předchozí do další generace v ženské linii jako dominantní znak, kdežto u familiární formy dochází k multifaktoriálnímu a polygennímu původu nádorového onemocnění. Geny, jejichž mutace přispívají ke vzniku nádorového procesu, se dělí na onkogeny, které jsou buď amplifikovány anebo zvyšují svoji expresi (např. receptor epidermálního růstového faktoru, cykliny E a D1, gen ptačí myelocytomatózy aj.) a tumorsupresorové geny, které naopak kontrolují buněčné dělení a jsou při vzniku nádorového bujení inaktivovány např. gen karcinomu prsu 1 a 2 (breast cancer gene, BRCA1 a 2), gen pro nádorový protein (p53) aj. U hereditárních nádorů jsou významné mutace genů BRCA1 ležícího na 17. chromozomu a podmiňujícího 55-85% riziko vzniku nádoru prsu a BRCA2 ležícího na 13. chromozomu. Ke vzniku syndromů dochází často u familiárních typů nádorů, například Li-Fraumeniho syndromu (mutace p53) a vzácného Cowdenova syndromu vznikajícího mutací genu pro fosfatázový a tenzinový homolog (phosphatase and tensin homolog, PTEN) (Adam, Vorlíček, 2002; Petruželka *et al.*, 2003; Abrahámová *et al.*, 2000).

Z hormonálních faktorů jsou klíčové estrogény a jejich metabolity, které při delším působení zvyšují riziko karcinomu, např. při graviditě po 30. roce, kratší době kojení, bezdětnosti (nuliparita), pozdní menopauze či naopak brzké menarche (Adam, Vorlíček, 2002; Petruželka *et al.*, 2003).

Benigní změny jako třeba duktální hyperplazie, lobulární hyperplazie a karcinomy *in situ* se mohou podílet na zvýšeném riziku nádorového bujení (Adam, Vorlíček, 2002).

Stravovací návyky jsou také poměrně podstatné ve vztahu k rakovině prsu. U pacientek s nadváhou a nadbytkem tuků v potravě (zejména mastných kyselin) bylo prokázáno o 45 % více viscerálního tuku než u kontrolní skupiny (estrogény se tvoří z tukových zásob). Dalším rizikovým faktorem může být požívání alkoholu (Adam, Vorlíček, 2002; Petruželka *et al.*, 2003; Fentiman, 1998).

V neposlední řadě jsou významným rizikovým faktorem podmínky prostředí, zejména fyzikální a chemické vlivy. K rizikovým fyzikálním faktorům patří různé druhy záření z vnějšího prostředí či záření aplikované v rámci léčby jiného onemocnění (např. u pacientek s Hodgkinovým lymfomem), u kterých byla prokázána 20-30% šance vzniku nádoru prsu. K nebezpečným chemickým faktorům patří

zplodiny v ovzduší a zejména organochloridy (DDT - dichlordifenyltrichlorethan, DDE - dichlordifenyldichlorethen, PCBs - polychlorované bifenyly), které mohou přímo působením na estrogenové receptory buněk podporovat nádorové bujení (Schmitt, Gruliow, 2010; Fentiman, 1998).

2.1.3.4 Klinické projevy

K nejběžněji se vyskytujícím symptomům karcinomu prsu patří hmatatelný útvar (bulka) uvnitř prsu, bolest a sekrece z bradavky (Schmitt, Gruliow, 2010).

Mezi hmatatelné útvary se řadí zejména fibroadenomy, maligní nádory a cysty. Největší výskyt těchto útvarů je zaznamenán u žen před klimakteriem, s věkem invazivnost roste. Zhruba polovina nádorů se tvoří v horním kvadrantu prsu (Schmitt, Gruliow, 2010).

Bolest může být cyklická (není spojována s onemocněním) nebo necyklická, která se obvykle vyskytuje v konkrétní oblasti prsu a signalizuje infekce, perforované cysty či nespecifická poškození. Bolestivých je však pouze 10 % nádorů prsu (Schmitt, Gruliow, 2010).

Sekretem je v rámci bradavky často mateřské mléko, což je ovlivněno prolaktinem, endokrinními syndromy, užíváním antikoncepce, některých antidepresiv, fenothiazinů apod. Zvláštní pozornost by měla mít sekrece serózní a sekrece s přítomností krve. Vznik těchto sekretů bývá podmíněn duktálními papilomy, cystami, ale také rychlým růstem prsu při graviditě (Schmitt, Gruliow, 2010).

Mezi další možné příznaky se řadí kalcifikace vznikající u nekróz a hyalinizované vazivové tkáně, které lze rozlišit na benigní (sklerotizující adenózy, apokrinní cysty) a maligní (drobné, nepravidelné). Velmi častý je duktální karcinom *in situ*. Objevuje se také vtahování kůže, anomálie bradavky (oploštění, vtažení, šupinatění a jiné), zvětšené a ztuhlé prsy, tzv. „pig skin“ (výskyt jemných lymfatických cév), rozšířená pleteň žil, sekrece z bradavky (především krev), vyšší teplota kůže a začervenání (upozorňující na eryzipeloidní nádor) a tvorba povrchových vředovitých útvarů, což signalizuje již pozdní stádium rakoviny (Schmitt, Gruliow, 2010; Abrahámová *et al.*, 2000).

2.1.3.5 Diagnostika a staging

Pravidelné vyšetřování pacientů a evidování jejich zdravotního stavu, tzv. screening, který je velmi významný pro úspěšnou léčbu. Tímto způsobem jsou častěji diagnostikovány počáteční stádia – tzv. karcinom *in situ*. Mnohé výzkumy dokládají snížení úmrtnosti u pacientek pravidelně se účastnících screeningu téměř o polovinu (Petruželka *et al.*, 2003; Abrahámová *et al.*, 2000).

Základem a nejjednodušším postupem k diagnostice změn či onemocnění je samovyšetření prsu pacientkami. Samovyšetření by mělo být aplikováno každý měsíc (vhodné je několik dní po ukončení periody) a skládá se z několika částí. Nejprve žena vizuálně ohodnotí vzhled prsou při svěšených rukou a vestoje, následuje svěšení ramen a založení rukou v bok, zvednutí jedné paže a palpace prsu, pozorování struktury bradavky a závěrem prohmatání prsu vleže a na zádech s rukou založenou pod hlavou (Abrahámová *et al.*, 2000).

Diagnostické postupy u nádoru prsu lze rozdělit na neinvazivní a invazivní. U neinvazivních je základem vyšetření pohmatem ošetřujícím lékařem. Hojně se používají zobrazovací metody, nejvyužívanější je mamografie. U tohoto vyšetření je využíváno měkké RTG (rentgenové) záření, které slouží jak pro preventivní prohlídku u pacientek bez symptomů a s nehmátnými nálezy, tak k určení změn v mléčné žláze. Často rozpoznané mikrokalcifikace, roztržené lemy ložisek a zmožnění povrchu kůže mohou signalizovat zhoubné změny. Na záznamu z mamografu je sledován stín vytvořený mléčnou žlázou, přítomnost ložisek a axilární uzliny. Existuje i efektivnější digitalizovaná mamografie důležitá především u starších pacientek s jasnějším hodnocením stínu (parenchym v atrofii). Přibližně je identifikováno až 96 % tumorů a kolem 60 % falešných pozitivit. Doplňující zobrazovací metodou je ultrazvuk, který snímá ve vrstvách. Aplikuje se při nálezech u mladších žen, po zákrocích a k detekci návratu onemocnění. Mezi další zobrazovací a neinvazivní metody patří magnetická rezonance (znázorňující léze diethentriaminpentaacetát gadoliniem (DTPA) a tvořící 3D obraz), výpočetní a pozitronová emisní tomografie, duktografie, pneumocystografie (sledující změny uvnitř cysty), ultrasonografie aj. (Petruželka *et al.*, 2003; Abrahámová *et al.*, 2000; Adam, Vorlíček, 2002)

V rámci invazivních vyšetření se odebírá vzorek potenciální nádorové tkáně, který je dále testován a zkoumán za použití histopatologických, mikroskopických,

imunochemických a molekulárně biologických technik. Pro lokalizaci a kontrolu odběrového místa se používá mamograf či ultrazvuk. Základní technikou je biopsie v několika modifikacích. Core cut biopsie (odebírající tkáň ve tvaru válce), stereotaktická biopsie a otevřená chirurgická biopsie (excise tkáně). Další technikou je vpich do tkáně tenkou jehlou neboli punkce. Tento odběr se provádí k rozlišení pevného ložiska od cysty a k odstranění tekuté výplně cyst. Ve vzorcích tkání pacienta lze stanovit koncentrace nádorových markerů, které jsou v souvislosti se vznikajícím nádorovým onemocněním zvýšené. Běžně se v případě karcinomu prsu vyšetřují receptory pro peptidické a steroidní hormony, sérové markery a biochemické markery – např. karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen, CEA), který je detekovatelný asi u poloviny pacientek s metastázami a nádorový antigen 15-3 (Cancer Antigen 15-3, CA-15-3) (Petruželka *et al.*, 2003; Abrahámová *et al.*, 2000; Adam, Vorlíček, 2002). U rodin s familiárním výskytem onemocnění lze využít lymfocytů získaných z krve k molekulárně-genetickému vyšetření DNA pro tumorsupresorové geny BRCA1 a 2 (Abrahámová *et al.*, 2000). Dalšími molekulárně-genetickými markery studovanými např. při detekci minimální reziduální choroby jsou mammaglobin (MAM), karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen, CEA) nebo receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor, EGFR).

Pro stanovení vhodné léčby u pacientky je důležitá jak morfologie karcinomu, tak rozsah onemocnění (tzv. staging). K určení typu a rozsahu nádoru před a po zákroku se používá klasifikace TNM. Kategorie T označuje tumor a je určována zejména pomocí zobrazovacích a invazivních metod. N kategorie vyjadřuje zasažení regionálních lymfatických uzlin metastázami, k vyšetření se používají zobrazovací metody a pohmat. Třetí skupinou je kategorie M, která charakterizuje jak metastázy v nadklíčkových uzlinách, tak metastázy vzdálené od primárního ložiska. Ke stanovení metastatického poškození se používá RTG, počítačová tomografie (Computed Tomography, CT), scintigrafie, magnetická rezonance, ultrasonografie aj. U všech kategorií se rozlišuje velikost sledovaných útvarů a jejich chování vzhledem k okolním tkáním. Kombinací těchto kritérií zařazujeme pacientky s karcinomem prsu do čtyř klinických stádií vyjadřujících stupeň pokročilosti nádoru a určujících léčebný postup (Abrahámová *et al.*, 2000; Adam, Vorlíček, 2002).

Svůj význam v diagnostice má i histologický grading, jehož prostřednictvím lze stanovit míru diferenciacie nádorové tkáně, např. velikost a tvar buněk, množství

tubulárních útvarů aj. Na základě tohoto kritéria byla vytvořena příslušná klasifikace nádorů: GX, G1, G2, G3 a G4, kdy kategorie GX vyjadřuje nestanovitelný stupeň vyžrávání, G1 zahrnuje nádor dobře diferencovaný a G4 nediferencovaný nádor (s horší prognózou). Tumory s menší schopností diferenciací bývají citlivé k ozařování a chemoterapii, avšak mohou být nestabilní a tudíž rizikové pro pacienta. Grading se však nemusí shodovat s TNM klasifikací a jeho určení je ovlivněno místem odběru vzorku nádoru (Petruželka *et al.*, 2003; Adam, Vorlíček, Koptíková, 2003; Adam, Vorlíček, 2002).

2.1.3.6 Léčba

Výběr vhodné léčby je podmíněn jednak klinickým stádiem karcinomu prsu pacientky, ale také jejím celkovým zdravotním stavem a věkem. Používané léčebné postupy se dělí na lokoregionální (chirurgie, radioterapie) a systémové (chemoterapie, hormonální terapie, biologická léčba) (Petruželka *et al.*, 2003; Adam, Vorlíček, 2002).

Chirurgický zákrok je primární alternativou léčby u ranějších stádií. V případě proliferace nádoru do svalů může být proveden jako modifikovaná radikální masektomie, při které je odejmut celý prs. Běžně se při masektomii odebírají i uzliny v oblasti axily (v počtu minimálně deseti) a to především z prognostických důvodů. Druhou možností je odběr sentinelové uzliny, což je první uzlina lymfatického systému vedoucího od nádoru. Vizualizace uzliny se provádí patentní modří. Druhým typem operativního zákroku je vyjmutí nádoru z prsu, provázené radioterapií (Petruželka *et al.*, 2003; Šimša *et al.*, 2010; Abrahámová *et al.*, 2000).

Radioterapie (lokální dávky gama či RTG záření) je důležitou modalitou terapie karcinomu prsu, přestože se prsní nádory řadí k méně senzitivním a určení vhodné dávky je limitováno přítomností plicního parenchymu, srdce, brachiálního plexu a míchy v blízkém okolí. U neoperabilních nádorů, při výskytu metastáz a u recidivy onemocnění se aplikuje radioterapie mírnící průběh nemoci (Abrahámová *et al.*, 2000; Adam, Vorlíček, 2002).

Chemoterapie funguje na principu podávání léčiv (tzv. cytostatik), která mají negativní vliv na buněčný cyklus nádorových buněk. Aplikovány do těla pacientky jsou buď nitrožilně či orální cestou, v současnosti je na výběr více než 40 cytostatik.

Tento způsob léčby je podáván neoadjuvantně (před chirurgickým zákrokem) či adjuvantně (po operaci) u pacientek s postiženými uzlinami metastázami a neoperabilními nádory. Většinou je podáváno více cytostatik najednou (nejznámější je kombinace cyklofosfamidu s metotrexátem a 5-fluorouracilem, CMF) nebo kombinace cytostatik s antracykliny (5-fluorouracil, adriamycin a cyklofosfamid – FAC; 5-fluorouracil, epirubicin a cyklofosfamid – FEC; adriamycin a cyklofosfamid - AC a epirubicin a cyklofosfamid - EC), taxany (paklitaxel, docetaxel) a dalšími látkami jako jsou vinorelbin a kapecitabin. Chemoterapie sebou bohužel přináší řadu vedlejších účinků jako nevolnost, vypadávání vlasů, nechutenství aj. (Petruželka *et al.*, 2003; Abrahámová *et al.*, 2000; Adam, Vorlíček, 2002; www.cancer.org)

Hormonální léčba se řadí k nejdéle používaným metodám. Blokuje účinek estrogenů, jako růstových hormonů podporujících proliferaci buněk nádoru. Hormonoterapie je prováděna třemi způsoby, kdy při prvním je odstraněna či vyřazena z funkce daná žláza (odstranění vaječnicků - ovariectomie), u druhého soutěží tzv. antiestrogeny (zejména tamoxifen) s estrogeny o vazbu na receptory a třetí způsob blokuje tvorbu estrogenů pomocí inhibitorů aromatáz (aminoglutetimid, hydrokortison, letrozol, formestan aj.) a gestagenů (deriváty progesteronu). Hormonální léčba se podává i jako prevence proti recidivě a vzniku metastáz (Abrahámová *et al.*, 2000; Adam, Vorlíček, 2002; www.cancer.org).

Nejnověji je využívána biologická léčba, kdy mohou být na základě molekulárně-biologického vyšetření indikovány např. monoklonální protilátky proti transmembránovému tyrosinkinázovému receptoru (lék trastuzumab) u nádorových buněk s amplifikací či zvýšenou expresí protoonkogenu pro lidský epidermální faktor (human epidermal growth factor receptor 2, Her-2) (Petruželka *et al.*, 2003).

Neinvazivní mnohočetný duktální karcinom *in situ* je převážně léčen radikální masektomií s radioterapií a dlouhodobým užíváním tamoxifenu z důvodu časté recidivy. Neinvazivní lobulární karcinom *in situ* se vyskytuje u obou prsů a prevencí před vznikem invazivity je opět masektomie a užívání tamoxifenu. V případě klinických stádií I, IIA a IIB je primární léčbou zákrok bez excise celého prsu, radioterapie či masektomie s odběrem uzlin a následnou adjuvantní chemoterapií (FEC, FAC, AC, CMF apod.) U pokročilejších stádií IIIA a IIIB se doporučuje masektomie, radioterapie a chemoterapie (FEC, AC, FAC a AC-T – adriamycin, cytoxan a taxol/taxotere). U metastazujícího karcinomu stádia IV se provádí paliativní

chemoterapie, hormonoterapie a radioterapie. Při nedostatečné citlivosti nádorů je vykonána sanační operace (Adam, Vorlíček, 2002).

Při výskytu kostních metastáz se předepisují bisfosfonáty mírnící bolest a proliferaci nádorových buněk. Snahou léčby u takto pozdních stádií je alespoň zmírnění příznaků onemocnění a zajištění pokud možno co nejlepší kvality života pacientky. U pacientek, u kterých se objevila místní recidiva, je postupováno s ohledem na prvotní způsob léčby a ve všech případech je navržena opět léčba systémová. I po úspěšné léčbě by měla pacientka docházet na pravidelné kontroly každé tři měsíce až půl roku v průběhu pěti let a samozřejmě je také každoroční mamografické vyšetření (Adam, Vorlíček, 2002).

2.2 Minimální reziduální choroba a její detekce

Pojem minimální reziduální choroba (MRD) nejčastěji označuje přítomnost potenciálních nádorových buněk v těle pacienta nacházejícího se v remisi (Hauwel, Matthes, 2014). Její detekcí lze předpovědět návrat onemocnění, vznik nových nádorových ohnisek (metastáz), posuzovat účinnost právě probíhající léčby (citlivost), specifikovat léčbu v případě jednotlivých pacientů a předem určit další vývoj nemoci.

Minimální reziduální choroba se vyznačuje výskytem cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells, CTCs) zejména v periferní krvi, lymfatickém systému a kostní dřeni (disseminating tumor cells, DTCs). Cirkulující nádorové buňky se vyskytují v těle ve velmi malém množství, až vzácně a je tedy třeba použít velmi citlivé detekční metody. Zjišťování těchto buněk z krve se označuje jako tzv. „tekutá biopsie“ a může nahradit bolestivé a více invazivní metody (Bednarz-Knoll, Alix-Panabières, Pantel, 2011). Volné nádorové buňky se od primárního tumoru odlišují heterogenitou. Dochází například ke ztrátám epitelových markerů a exprese receptorů pro estrogeny (Lianidou *et al.*, 2010).

CTCs mohou být prekuzory pro vznik mikrometastáz, které se dále vyvíjí v makrometastázy. Klíčovým krokem tohoto složitého kaskádovitého procesu je získání vlastností mezenchymových buněk u buněk původně epitelových (epithelial-mesenchymal transition, EMT) a uvolnění těchto buněk do krve či lymfy. Tyto nyní již cirkulující nádorové buňky poté běžně absolvují tzv. zpětný proces (mesenchymal-epithelial transition, MET), který má význam pro ukotvení buněk v dané lokalitě a tak možný vznik metastázy (Kallergi *et al.*, 2011; Hugo *et al.*, 2007). Pro vznik nových nádorových ohnisek musí nádorové buňky uniknout imunitnímu systému a najít vhodné podmínky pro usazení a růst. Není pravidlem, že u všech pacientů s detekovanými cirkulujícími nádorovými buňkami musí dojít k relapsu onemocnění (Oakman *et al.*, 2010). CTCs se vyskytují jak v již metastázující fázi onemocnění, tak v počátečním stádiu, kde má jejich detekce největší potenciál (Krishnamurthy *et al.*, 2010).

Navzdory podstoupené chemoterapii nejsou často nádorové buňky eliminovány a to díky jejich schopnosti uvedení se do klidového stavu, heterogenitě a tvorbě proteinů odolných vůči léčivům (Bednarz-Knoll, Alix-Panabières, Pantel, 2011; Lianidou *et al.*, 2010).

Pro detekci DTCs/CTCs z krve, kostní dřeně a některých tkání jsou aplikovány moderní a citlivé cytometrické, imunohistochemické a molekulární metody. Základem těchto metod je sledování exprese epiteliálních markerů specifických dle původu primárního nádoru (Riethdorf, Pantel, 2009; Winer-Jones, 2014).

Nepostradatelnou úlohu v separaci CTCs má průtoková cytometrie rozlišující buňky značené protilátkami s fluorescenčními sondami (Oakman *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Základem imunohistochemických metod je detekce nádorových markerů, např. specifických epiteliálních antigenů - cytokeratinů (CKs), povrchových adhezních molekul (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM), receptorů růstových faktorů (epidermal growth factor receptor, EGFR; estrogen receptor, ER aj.) pomocí protilátek (Riethdorf, Pantel, 2009; Nahta, Hortobagyi, Esteva, 2003; Fehm *et al.*, 2009).

K dnes již běžně používaným testům patří např. CellSearch system, který umožňuje vychytávání CTCs a stanovení jejich množství kombinací imunologických a cytometrických metod. Principem je interakce fluorescenčně značených protilátek proti EpCAM navázaných na magnetických nanočásticích železa s nádorovými buňkami ve vzorku krve. Buňky jsou poté identifikovány pomocí značených protilátek proti cytokeratinům a jádra jsou vizualizována použitím 4',6-diamidin-2-fenylindolu (DAPI). Případné kontaminující leukocyty jsou vyloučeny pomocí protilátek proti leukocytárnímu antigenu (Cluster of Differentiation 45, CD45). Výstupem je automatizovaná detekce CTCs ve vzorku pomocí CellTracks Analyzer II (Fehm *et al.*, 2009; www.cellsearchctc.com).

Technologie CTC chip izoluje CTCs z krve protékající přes malý silikonový čip, na kterém jsou až ve stovkách tzv. microposts navázané EpCAM protilátky. Identifikace buněk může probíhat podobným způsobem jako u CellSearch system metody, lze použít i různé protilátky specifické pro jednotlivé typy nádorů. Zachycené buňky mohou být z chipu izolovány a použity pro další analýzy či kultivaci (Oakman *et al.*, 2010).

Hojně používanou metodou je tzv. Adna-Test. Jeho prvním krokem je obohacení CTCs ve vzorku prostřednictvím interakcí protilátek např. proti EpCAM a MUC1 (mucin1). Následuje analýza genové exprese přepsáním mRNA transkriptů epiteliálních markerů do cDNA, která je amplifikována PCR reakcí (Fehm *et al.*, 2009).

Další možností detekce CTCs je metoda EPISPOT detekující proteiny (např. cytokeratin 19, mucin aj.) specifické pro životaschopné nádorové buňky (Mavroudis, 2010).

Široce známá a používaná molekulární metoda pro detekci cirkulujících nádorových buněk je polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR). PCR má řadu modifikací, jednou z nejběžnějších je reverzně transkriptázová PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) používající reverzní transkripci pro přepis DNA z původního vzorku RNA a v druhém kroku amplifikující mRNA transkripty exprimovaných genů. Metoda kvantitativní (Real-time, v reálném čase) RT-PCR (quantitative RT-PCR, qRT-PCR) dále umožňuje průběžně sledovat amplifikaci fluorescenčně značených molekul mRNA, resp. DNA a podstatně šetří čas. Kvantitativní Real-time RT-PCR je se svojí vysokou senzitivitou schopna detekovat i mRNA přítomnou ve vzorku ve velmi malém množství (Riethdorf, Pantel, 2009; Bustin, 2000).

Jak imunohistochemické, tak molekulární diagnostické přístupy mohou vykazovat falešně-pozitivní data. Nevýhodou imunohistochemických metod je možný výskyt interakcí protilátek s buňkami neoprávněně exprimujícími epiteliální markery (problém tzv. ilegální transkripce), hromadění fluorescenčních značek tvořících shluky podobné buňkám, nižší citlivost, delší doba přípravy aj. U molekulárních metod bývají častým problémem kontaminace nebo inhibice při izolaci RNA a reverzní transkripci nebo při přípravě samotné PCR reakce, výskyt pseudogenů u některých markerů, nemožnost stanovení heterogenity exprese u CTCs, patrná míra exprese epiteliálních transkriptů i u zdravých buněk apod. Potíže v diagnostice mohou způsobit buňky procházející EMT, při které je potlačována produkce epiteliálních nádorových markerů. (Mavroudis, 2010; Alix-Panabières, Pantel, 2014; Liu *et al.*, 2011; Nadal *et al.*, 2012; Kallergi *et al.*, 2011).

2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Již více jak čtvrt století je dnes každodenně v laboratořích využívána metoda polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR), která byla vynalezena v roce 1983 americkým biochemikem Kary Mullisem. Za tento objev, který se stal klíčovým nejen pro výzkum v oblasti molekulární biologie, ale i dalších oborech, byl v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou. PCR má řadu vyhledávaných předností, mezi které patří přesnost, rychlost, finanční nenáročnost a hlavně možnost amplifikace vybraného úseku i z poškozeného či malého množství vzorku DNA (Solanki, 2012; Owen, Henderson, 2006).

Metoda PCR, tzv. „molekulární kopírka“, je schopná nahradit primární postup klonování DNA (genů) využívající knihovny. Podstatou PCR je specifická mnohonásobná amplifikace konkrétní části DNA, kdy výsledkem mohou být až miliony kopií (amplikonů) původní templátové DNA. Reakce probíhá ve zkumavce v *in vitro* podmínkách, ale její složení a průběh se příliš neliší od replikací a syntéz probíhajících v živých buňkách (Alberts *et al.*, 1998; Solanki, 2012; Owen, Henderson, 2006).

Samotné PCR reakci samozřejmě předchází příprava reakční směsi, na které závisí průběh reakce. Základem směsi je vhodný pufr (zvolený dle polymerázy), voda (vhodná pro PCR), hořčnaté ionty (zásadně ovlivňující aktivitu a specifitu polymerázy), deoxynukleotidtrifosfáty (základní stavební jednotky DNA), 2 oligonukleotidové primery (krátké jednovláknové úseky nukleové kyseliny komplementární k templátové DNA), DNA polymeráza (enzym katalyzující připojování nukleotidů do nově vznikajícího vlákna) a vzorek templátové DNA (Solanki, 2012; Owen, Henderson, 2006).

Primery vymezují požadovaný úsek pro aktivitu polymerázy vazbou na komplementární vlákna templátové DNA. Jelikož se každý z primerů váže na dané vlákno DNA ve směru 5'→3', jsou jejich 3' konce orientovány naproti sobě. Základní funkcí polymeráz je katalýza nově vznikajícího řetězce ve směru 5'→3', avšak existují i polymerázy, které jsou schopny katalýzy i ve směru opačném a tudíž mohou tzv. „kontrolovat“ již navázané nukleotidy a případně opravit chyby. Nejčastěji je dnes používána tzv. *Taq* polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*. Tento enzym se

vyznačuje stabilitou své aktivity při vysokých teplotách. Některé komponenty reakční směsi mohou být pozměněny či přidány, např. různé typy polymeráz a pufrů, modifikované nukleotidy (fluorescenčně a radioaktivně značené, dUTP namísto dTTP aj.), degenerované primery (směs různých oligonukleotidů), fluorescenčně značené próby, minerální olej (ochrana před odpařením vzorku u cyklerů bez vyhřívaného víčka) apod. (Šmarda *et al.*, 2005; Owen, Henderson, 2006)

Samotná PCR reakce má tři hlavní mezníky: denaturace, hybridizace primerů a syntéza DNA. V prvním kroku probíhá rozrušení vazeb mezi řetězci dvouvláknové templátové DNA (denaturace) v důsledku vysokých teplot - rozmezí 90 až 97 °C po dobu 5 minut (v průběhu reakce pak stačí k denuraci u nově nasyntetizovaných molekul pouze 30 sekund). V druhém kroku dochází snížením teploty na 50 až 60 °C po dobu asi 1 minuty k připojení primerů k jednotlivým vláknům DNA. Třetí krok zahrnuje syntézu nového vlákna DNA, která začíná nasednutím termostabilní polymerázy ke koncům navázaných primerů na jimi vyznačeném úseku templátu ve směru 5'→3'. Tato elongační fáze běžně probíhá při teplotě 72 °C po dobu 2 až 5 minut. PCR probíhá v cyklech, v každém se počet amplikonů zdvojnásobí. Počet cyklů se odvíjí od koncentrace vzorku DNA a běžně se aplikuje kolem 25 až 40 opakování. Stěžejním přístrojem pro tuto metodu je termocykler, jehož schopností je měnit a udržovat teplotu po určitou dobu ve zkumavkách s reakční směsí dle zvolených parametrů a řídit tak počet cyklů (Solanki, 2012; Šmarda *et al.*, 2005; Owen, Henderson, 2006).

PCR je dnes běžně používaná metoda díky její univerzálnosti a flexibilitě. Uplatňuje se ve výzkumu u oborů jako je biologie, forenzní vědy, chemie, medicína, životní prostředí aj. Metoda je aplikována například pro kvantifikaci změn v expresi genů prostřednictvím RNA s využitím kvantitativní RT-PCR (např. diagnostika v onkologii a sledování účinnosti léčby onkologických pacientů), DNA klonování a sekvenování, blotovací metody, metody pracující s rekombinantní DNA, detekci patogenů, aj. (Solanki, 2012; Owen, Henderson, 2006)

2.4 Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

RT-PCR je modifikací polymerázové řetězové reakce, která se vedle dalších metod (Northern blot, microarray, in situ hybridization, aj.) používá ke studiu genové exprese. Oproti jiným metodám může být preferovanější díky kratší době provedení, vyšší přesnosti a vysoké schopnosti detekovat i velmi malé hladiny mRNA transkriptů (Owen, Henderson, 2006).

Od konvenční polymerázové řetězové reakce se RT-PCR liší nutností provedení reverzní transkripce. Jedná se o proces, jehož principem je zpětný přepis RNA do cDNA (complementary DNA, komplementární DNA), která je následně amplifikována PCR reakcí. Tuto reakci katalyzuje enzym RNA dependentní DNA polymeráza neboli reverzní transkriptáza běžně produkovaná retroviry při napadení buňky (Owen, Henderson, 2006).

Na počátku reverzní transkripce hybridizuje vyizolovaná mRNA s primery pro vyznačení cílového genu k přepisu. K běžně používaným oligonukleotidovým primerům patří náhodné primery, oligo-dT primery, genově specifické primery nebo směs náhodných a oligo-dT primerů. Enzym reverzní transkriptáza poté zahajuje syntézu cDNA ve směru 5'→3' od navázaných primerů obvykle při teplotě 40 až 50 °C. Nejčastěji využívanými jsou reverzní transkriptázy viru ptačí myeloblastózy (Avian Myeloblastosis Virus, AMV) a Moloneyho viru myší leukemie (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MuLV). Výsledkem reverzní transkripce je jednovláknová cDNA, která je v hybridní vazbě s původní templátovou mRNA. Pro amplifikaci takto získané DNA je nutno komplex oddělit denaturací, která je zároveň zahajujícím krokem PCR (Owen, Henderson, 2006; Bustin *et al.*, 2005; Bustin, 2002; Alberts *et al.*, 1998).

Pro provedení RT-PCR existují dvě možnosti: jednokroková (tzv. one tube) nebo dvoukroková (tzv. two tube) RT-PCR. V prvním případě probíhá syntéza cDNA i následná PCR ve stejné zkumavce. U dvoukrokové RT-PCR jsou od sebe obaprocesy odděleny použitím dvou zkumavek. Jednokroková RT-PCR je méně pracná, aplikací vysokých teplot snižuje výskyt problémových sekundárních struktur

RNA (vlášenek), ale je méně citlivá. Výhodou dvoukrokové RT-PCR je vznik cDNA, kterou lze dále dlouhodobě používat, problémem je zvýšené riziko kontaminací (Owen, Henderson, 2006; Bustin, 2002; Bustin, 2000).

V případě RT-PCR existují různé modifikace metody. Známé jsou například kompetitivní a nekompetitivní RT-PCR. Principem kompetitivní RT-PCR je současná amplifikace mRNA vzorku a RNA standardů, které mezi sebou soutěží o primery a enzym. Je často využívána pro semikvantifikaci. Pokud je v reakci méně zkoumané mRNA, bude ve výsledku silnější signál u standardů a naopak. Standardy mohou sloužit také jako kontrola reverzní transkripce a PCR. U nekompetitivní RT-PCR není signál RNA vzorku ovlivňován signálem standardů. PCR reakce probíhá běžně *in vitro*, existuje ale i tzv. *in situ* RT-PCR, kterou lze aplikovat na fixovaný materiál (tkáň nebo buňky na sklíčku) a detekovat tak mRNA lokalizovanou v konkrétní části tkáně nebo buňky (Freeman, Walker, Vrana, 1999; Owen, Henderson, 2006).

RT-PCR je vzhledem k vysoké citlivosti a práci s RNA rizikovější a problémovější než konvenční PCR. K hlavním rizikům patří degradace RNA všudypřítomnými RNasami, kontaminace RNA prostřednictvím DNA, nespécifické vazby primerů (díky nízkým teplotám a malému množství vzorku může dojít k předčasnému ukončení reakce), narušení funkce enzymu či vynechání některých úseků k přepisu (vyšší frekvence výskytu vlásenkových struktur RNA aj. (Bustin, 2002) Značného omezení zmíněných nežádoucích jevů lze dosáhnout dodržováním zásad práce s RNA (používání pipet a dalších pomůcek určených pouze pro tyto účely, popř. vymezení speciálního pracovního místa či celé laboratoře pro práci s RNA) a používáním RNase-free chemikálií či inhibitorů těchto enzymů.

2.5 Real-time reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Real-time RT-PCR)

Na rozdíl od klasické PCR, kde jsou amplikony detekovány a hodnoceny až po ukončení reakce pomocí post-PCR analýz je principem real-time přístupu tzv. „online“ detekce hromadících se produktů pomocí fluorescenčního značení v průběhu každého cyklu. Fluorescenční signál odpovídá množství DNA syntetizující se během reakce. Tento vysoce citlivý systém je používán ke kvantifikaci sledované genové exprese. Termocyklery pro real-time PCR jsou vybaveny speciální optikou pro měření signálu fluorescence (Owen, Henderson, 2006; Mitas *et al.*, 2001; Bustin, 2002).

Sledování fluorescenčního signálu zajišťují DNA-interkalační barviva nebo primery a próby (sondy), značené fluorofory. Tyto molekuly fungují na principu fluorescence, kdy je absorbováno světlo s nižší vlnovou délkou a následně emitováno světlo s vyšší vlnovou délkou. U duálně značených prób je navíc používán tzv. „zhášec“ (quencher), který je určen k absorpci energie vyslané fluoroforem. Přeměna energie je výrazně ovlivněna vzdáleností mezi reagujícími molekulami. Pokud nejsou zhášec a fluorofor v těsné blízkosti, světelná energie je přeměněna v tepelnou (např. scorpions próby a molekulární majáky). Při jejich oddálení uvolní zhášec absorbovanou energii jako světlo o vyšší vlnové délce (např. hydrolytické próby). Jedná se o přenos energie fluorescenční rezonancí (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Nejčastěji jsou používány 6-karboxyfluorescein a 5-karboxytetrametylrodamin fluorofory (Šmarda *et al.*, 2005; Bustin, 2002).

2.5.1 Způsoby detekce amplikonů získaných metodou Real-time RT-PCR

2.5.1.1 DNA-interkalační barviva

DNA-interkalační barviva patří mezi nejjednodušší systémy detekující fluorescenci, jsou založena na interakci barviva s dvouvláknovou DNA. Nejznámějším typem těchto barviv je SYBR Green I vázající se do oblasti malých žlábků dvoušroubovice. Fluorescenční signál se exponenciálně zvyšuje spolu s hromadícím se produktem a naopak se snižuje nebo je sotva detekovatelný během denaturace DNA. Mezi výhody této technologie lze zařadit všestrannost použití barviva pro jakýkoli dvouvláknový úsek DNA, stabilitu vůči teplotám a polymeráze a finanční nenáročnost. Naopak právě vazebná univerzálnost barviva může být poměrně významným problémem vzhledem k nespecifickému značení např. dimerů primerů. Z tohoto důvodu se provádí analýza křivky tání (melting curve analysis), pomocí které lze stanovit teplotu denaturace produktu a tím vyloučit chybný signál dimerů nebo nespecifických produktů. Dalším nežádoucím jevem použití interkalačních barviv je příliš silný signál v důsledku značení amplikonů o velkých rozměrech, což lze omezit použitím primerů ohraničujících úseky vhodné délky. (Van der Velden *et al.*, 2003; Owen, Henderson, 2006).

2.5.1.2 Hydrolytické próby

Hydrolytické próby využívají k detekci amplikonů 5'→3' exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy. Nejznámějším zástupcem je TaqMan próba vybavená fluoroforem na 5' konci a zhášečem na 3' konci. Pro vyzáření fluorescenčního signálu je nutné oddělení zhášeče od fluoroforu. Toho je docíleno vazbou próby na nově vzniklý specifický úsek DNA, která vytváří strukturu podobající se vidlici. Její vazby jsou poté rozštěpeny Taq polymerázou postupující po řetězci ve směru 5'→3'. Je-li próba v reakci přítomna nenavázaná, zhášeč pohlcuje energii uvolněnou fluoroforem a nevzniká žádný signál. Běžným typem zhášeče je 5-karboxytetrametylrodamin neboli TAMRA (Šmarda *et al.*, 2005; Bustin, 2000; Van der Velden *et al.*, 2003).

TaqMan próby vykazují díky vyšší teplotě tání (asi o 10 °C) vyšší specifitu k cílovým sekvencím DNA než primery. Problémy mohou nastat, pokud je próba na 5' konci zakončena guanidinovou bází, což může být podnětem pro zhášení signálu quencherem i navzdory již dříve odštěpené próbě a uvolněnému fluoroforu. K dalším nevýhodám patří finanční náročnost a menší citlivost oproti jiným systémům (Owen, Henderson, 2006; Van der Velden *et al.*, 2003).

2.5.1.3 Hybridizační próby

Základem detekce hybridizačními próbami je dvojice fluorescenčně značených prób, které jsou komplementární ke konkrétním sekvencím a po nasednutí na vlákno vytváří tzv. head-to-tail uskupení. Obvykle má jedna próba navázaný donorový fluorofor, který poskytuje zelené fluorescenční záření (3' konec) a druhá nese akceptorový fluorofor, který energii vyslanou donorem pohlcuje a sám emituje detekovatelný červený fluorescenční signál (5' konec). Energie mezi próbami je transportována prostřednictvím fluorescenční rezonance (FRET). Vzdálenost mezi sondami je pro přenos energie velmi důležitá, obvykle je mezi nimi 1 až 5 nukleotidů. Díky použití dvou prób namísto jedné se zvyšuje specifita značení (Bustin, 2000; Van der Velden *et al.*, 2003).

2.5.1.4 Další typy používaných prób

Molekulární majáky (molecular beacons) jsou hybridizační próby tvořené smyčkou s próbou a oligonukleotidem vytvářejícím sekundární strukturu vlásenky. Smyčka se specificky váže k vybrané sekvenci DNA. Vlásačka je tvořena dvěma rameny, která jsou navzájem komplementární a tvoří obrácenou repetici. Na konci jednoho z ramen je navázaný fluorofor, na konci druhého zhášeč. Pokud jsou ramena vlásenky blízko sebe, pohlcuje zhášeč veškerou energii a uvolňuje se teplo. V případě, kdy se próba naváže na DNA, dojde ke konformační změně celé struktury, molekuly zhášeče a fluoroforu se od sebe oddálí, dojde ke fluorescenční rezonanci a vzniku fluorescenčního signálu. Nevýhodou metody je obtížnost syntézy majáků a jejich optimalizace (Bustin, 2000; Owen, Henderson, 2006).

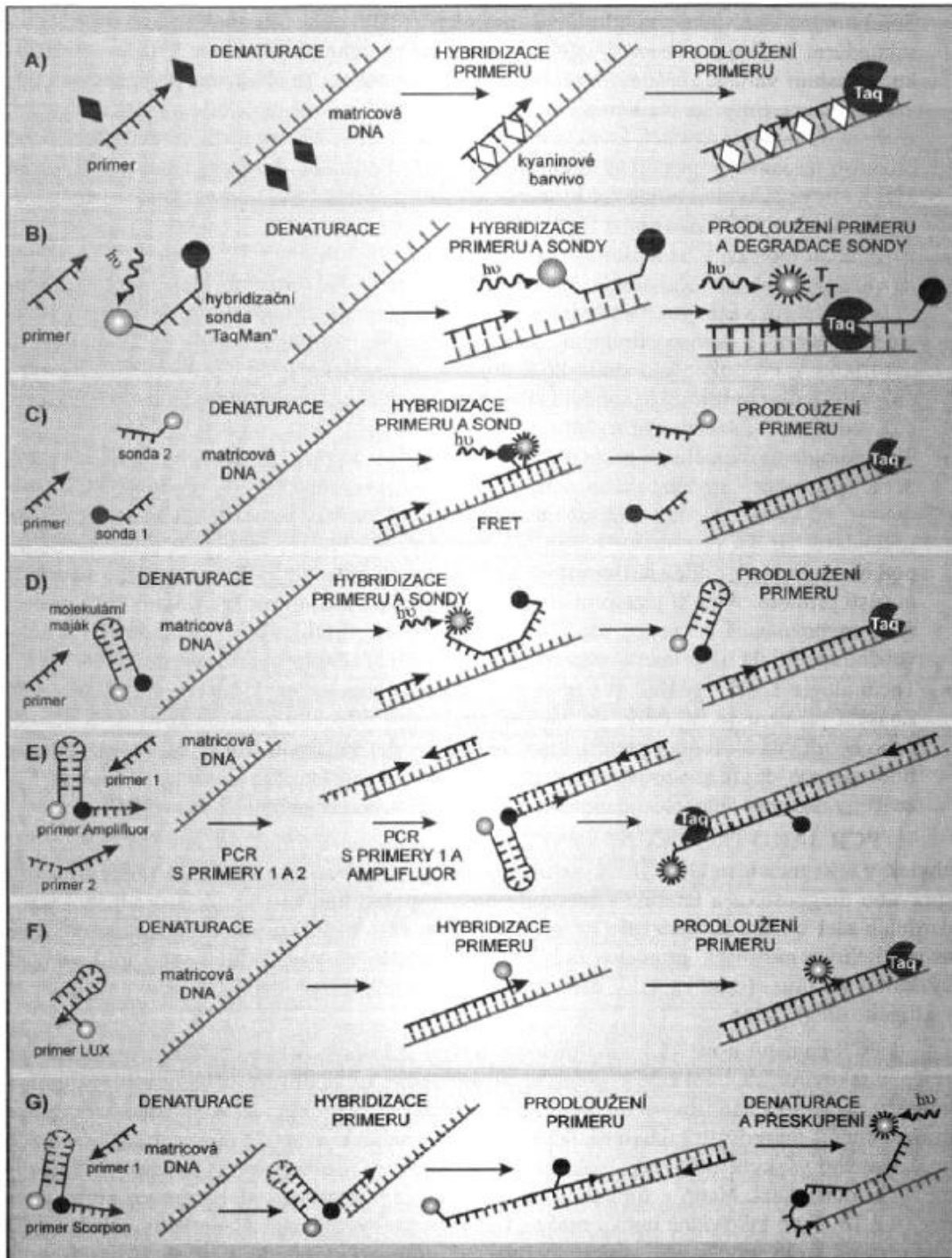
Další technologií využívající struktury vlásenky je Amplifluor. Pracuje na principu začlenění primeru s fluorescenční značkou, zhášedčem a vlásenkou ke komplementárnímu úseku nově vznikajícího amplikonu. Vznik signálu je podmíněn změnou struktury primeru s vlásenkou (Šmarda *et al.*, 2005).

Detekční systém LUX (Light Upon Extension) využívá 2 primery, z nichž jeden je fluorescenčně značený. Opět se uplatňuje vlásenková struktura, na jejímž 3' konci je umístěn zhášedč fluorescence. Po nasednutí a amplifikaci primeru dojde ke změně struktury vlásenky a k emisi fluorescence (Šmarda *et al.*, 2005).

Scorpions jsou detekční molekuly vytvářející vlásenky podobně jako molekulární majáky. Kombinují primer kovalentně navázaný k próbě a vlásenkovou strukturu, která obsahuje zhášedč (3' konec) a fluorofor (5' konec). Principem je vazba primeru na komplementární úsek DNA, amplifikace, denaturace a konformační změna, čímž dojde k navázání próby na konkrétní část řetězce za současného uvolnění fluorescence (Van der Velden *et al.*, 2003; Owen, Henderson, 2006; Šmarda, 2005).

LightUp próby jsou peptidové nukleové kyseliny (analogy DNA) s kyanidovým barvivem. Próba s barvivem se váže ke specifickému úseku DNA, čímž dojde ke zvýšení fluorescenčního signálu rozpoznatelného i pouhým okem (Owen, Henderson, 2006).

Dalšími detekčními systémy jsou Minor groove-binding probes (MGB), Hy-Beacon a ResonSense. MGB jsou sondy napojující se na molekuly, které velmi dobře interagují s oblastmi malých žlábků DNA. Jednovláknové fluorescenčně značené Hy-Beacon próby se používají k rychlé detekci hledaných sekvencí. ResonSense využívá fluorescenčně značené jednovláknové próby a DNA-interkalační barviva, mezi nimiž dochází k přenosu energie po vazbě próby ke komplementárnímu úseku DNA. Hy-Beacon a ResonSense jsou stále testované (Van der Velden *et al.*, 2003; French *et al.*, 2008; Lee, Siddle, Page, 2002).



Obr. č. 4: Technologie používané pro detekci produktů při kvantitativní PCR. A) DNA-interkalační barviva. B) Technologie TaqMan. C) FRET mezi fluorofory nesenými dvěma próbami. D) Molekulární majáky. E) Technologie primerů AmpliFluor. F) Technologie primerů LUX. G) Bifunkční molekuly Scorpion (Šmarda *et al.*, 2005).

2.6 Detekce minimální reziduální choroby karcinomu prsu metodou Real-time RT-PCR

Od roku 1869, kdy byla Ashworthem na veřejnost uvedena prvotní studie zabývající se cirkulujícími nádorovými buňkami nalezenými v krvi pacienta zemřelého následkem nádorového onemocnění, došlo k významnému pokroku. Polymerázová řetězová reakce se primárně zaměřovala na malignity oběhového a lymfatického systému. V pozdějších letech však našla jedna z aplikací PCR, tzv. RT-PCR významné uplatnění i u ostatních typů nádorových onemocnění, karcinomem prsu nevyjímaje (Ghossein, Rosai, 1996).

Téměř u poloviny pacientek s již diagnostikovaným a léčeným karcinomem prsu dochází k relapsu, který může být podmíněn přítomností cirkulujících nádorových buněk již během prvotní léčby. Nádorové buňky jsou nejčastěji detekovány v periferní krvi, kostní dřeni a uzlinách. Detekce minimální reziduální choroby u rakoviny prsu se stává velmi důležitou z hlediska budoucí prognózy pacienta, předcházení vzniku mikrometastáz, efektivnějšího navržení léčby a tím snížení zátěže pacientů (Silva *et al.*, 2002; Benoy *et al.*, 2006; Luppi *et al.*, 1996; Ghossein, Rosai, 1996).

V současnosti nejpoužívanější aplikací PCR pro detekci minimální reziduální choroby je real-time RT-PCR. Její diagnostický význam spočívá ve srovnání exprese tkáňově či epiteliálně specifických genů (markerů) prostřednictvím kvantifikace mRNA u buněk zdravé a potenciálně nádorové tkáně. Významným rysem cirkulujících nádorových buněk je jejich epiteliální původ a škála či množství exprimovaných genů. Toto množství lze vztáhnout na počet volných nádorových buněk. Real-time RT-PCR je extrémně citlivá metoda, která je schopna prokázat přítomnost i jediné nádorové buňky mezi až deseti miliony zdravých buněk. Mezi další důvody preferující tuto metodu patří poměrně snadné provedení, detekce pouze živých buněk, vyšší specifita oproti jiným metodám a časová a finanční nenáročnost (Ghossein, Rosai, 1996; Andergassen *et al.*, 2013; Strati *et al.*, 2013; Lianidou, Markou, 2011).

Komplikací real-time RT-PCR může být výskyt pseudogenů (geny které nekódují žádný protein) a exprese nádorových markerů i ve zdravé tkáni. Metoda není schopna detekovat nádorové buňky nacházející se v dormantním období či procházející epiteliálně-mezenchymální proměnou. Také není schopna charakterizovat morfologii nádorových buněk a DNA aberace. Nedostatkem detekce volných nádorových buněk u karcinomu prsu je poměrně málo tkáňově specifických a dostatečně citlivých markerů (Ignatiadis, Reinholz, 2011; Nadal *et al.*, 2012; Alix-Panabières, Pantel, 2014; Bernstein *et al.*, 2005; Ghossein, Rosai, 1996).

Pro vyhodnocování výsledků je důležitá normalizace dat. Ke srovnávání množství exprimované mRNA mezi rozličnými vzorky je tedy žádoucí použít shodné množství materiálu pro reakci. K tomuto účelu se využívají referenční neboli „housekeepingové“ geny. Jak název napovídá, jde o geny, které se podílejí na základních funkcích buňky, jsou tedy exprimovány ve všech buňkách a to ve stabilním množství. Jedním z běžně používaných referenčních genů je GAPDH (glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza), který kóduje stejnojmenný enzym katalyzující přeměnu glyceraldehyd 3-fosfátu na 1,3-difosfoglycerát. Samotný gen je tvořen 9 exony a 8 introny. Přestože je uváděno, že se nachází na chromozomu 12, má i řadu různě lokalizovaných pseudogenů (Šmarda *et al.*, 2005; Andergassen *et al.*, 2013; Ercolani *et al.*, 1988).

2.6.1 Nejčastěji používané markery k detekci cirkulujících nádorových buněk u karcinomu prsu

Osvědčenými a proto hojně používanými markery u karcinomu prsu jsou cytokeratiny – CK8, CK18 a CK19. V cirkulujících nádorových buňkách jsou tyto epiteliální geny exprimovány ve velkém množství. Detekce markeru CK19 je spojována s nižšími šancemi na přežití nezávisle na léčbě (Andergassen *et al.*, 2013).

Dalšími používanými markery jsou receptory epidermálních růstových faktorů (např. EGFR a Her) a hormonální receptory. Problémem je fakt, že estrogenové receptory ER α , ER β a Her2 jsou stabilně exprimovány jak ve zdravé, tak v nádorové tkáni. Z tohoto důvodu nejsou tyto markery k detekci CTCs vhodné (Oloomi *et al.*, 2013).

Adhezní molekula epiteliálních buněk (EpCAM) je důležitá pro ukotvení CTCs v dané lokalitě. EpCAM je vysoce exprimovaná u karcinomů epiteliálního původu a konkrétně u primárního i metastazujícího karcinomu prsu byla zaznamenána zvýšená exprese tohoto markeru. V posledních letech je EpCAM řazen k novým cílům genové terapie pro karcinom prsu (Osta *et al.*, 2004).

Mucin 1 (MUC 1) je výhodným markerem, jelikož je vysoce exprimován až u 90 % všech karcinomů prsu. Ačkoliv se běžně vyskytuje i ve zdravé prsní tkáni, dosahuje zde jeho exprese daleko nižších hodnot než v tkáni nádorové (Oloomi *et al.*, 2013; Cremoux *et al.*, 2000).

Obecně je pro detekci minimální reziduální choroby efektivní kombinovat více markerů najednou, tzv. multimarkerový genový panel (Andergassen *et al.*, 2013). Přítomnost CTCs u karcinomu prsu může být vyšetřována kombinací výše zmíněných markerů. Volba markerů a jejich nejvhodnější kombinace jsou aktuální náplní řady výzkumných projektů.

Dalšími markery, které lze využít pro detekci CTCs u karcinomu prsu jsou mammaglobin (MAM) a karcinoembryonální antigen (CEA).

2.6.1.1 Mammaglobin (MAM)

Mammaglobin je gen kódující glykoprotein tvořený 93 aminokyselinami, funkce tohoto proteinu ale nejsou zcela jasné. MAM patří do skupiny ureoglobulinů a je umístěn na 11 chromozomu v oblasti dlouhého raménka. Tato oblast je často amplifikována při vzniku neoplazií prsu. Mammaglobin je vysoce specifický právě pro karcinom prsu. U 23 % primárních nádorů probíhá intenzivnější exprese tohoto markeru (Wang *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2003).

Množství exprimované mRNA mammaglobinu nesouvisí přímo s histologickým typem nádoru a stádiem onemocnění. MAM je tedy hlavně používán ke sledování zdravotního stavu pacientek po operativních zákrocích, respektive ke sledování možné recidivy onemocnění či vývoji metastáz. Významně nižší exprese MAM byla zaznamenána v periferní krvi pacientek s lokalizovaným karcinomem prsu ve srovnání s pacientkami s přítomností metastáz, kde byla exprese vyšší (Lin *et al.*, 2003).

Lin *et al.*, 2003 označil mammaglobin za nejvíce citlivý marker pro detekci minimální reziduální choroby karcinomu prsu a to zejména v kostní dřeni a axiálních lymfatických uzlinách, kde byl exprimován ve vyšším množství. V periferní krvi nedosahoval MAM takových výsledků, především u raných stádií onemocnění.

2.6.1.2 Karcinoembryonální antigen (CEA)

Karcinoembryonální antigen je glykoprotein podílející se zejména na adhezi buněk. Gen kódující CEA se nachází na dlouhém raménku chromozomu 19. Je součástí rodiny 29 genů, z nichž transkribovaných je pouze 18. CEA je exprimován jak ve zdravé, tak v nádorové tkáni, zdravé a nádorové buňky se liší mírou jeho exprese. Zvýšená exprese byla zaznamenána až u 70 % pacientek s metastázami. Marker CEA je standardem pro detekci cirkulujících nádorových buněk. Nejběžnějšími vzorky odebíranými pro detekci CEA jsou kostní dřeň a periferní krev. Kromě karcinomu prsu je CEA zvýšeně exprimován i u celé řady jiných nádorových onemocnění (Zimmermann *et al.*, 1988; Hammarström, 1999; Gerhard *et al.*, 1994; Tormey *et al.*, 1977).

Abnormálně zvýšené hodnoty exprese CEA v krvi a kostní dřeni byly zjištěny převážně u pacientek s výskytem metastáz karcinomu prsu. Lze jej proto označit za prognostický marker, který by mohl umožnit určení účinnější léčby a zlepšit tak prognózu pacientky díky odhalení prekursorů mikrometastáz. Vyšetřením exprese CEA v krevním a lymfatickém systému lze také sledovat účinnost podané léčby (Tormey *et al.*, 1977).

Obecně je pro detekci minimální reziduální choroby efektivní kombinovat více markerů najednou, tzv. multimarkerový genový panel (Andergassen *et al.*, 2013). Přítomnost CTCs u karcinomu prsu může být vyšetřována kombinací výše zmíněných markerů. Volba markerů a jejich nejvhodnější kombinace jsou aktuální náplní řady výzkumných projektů.

3 Experimentální část

3.1 Metodika

Expresi genů v buňkách reprezentuje RNA. Pro studium a kvantifikaci exprese je využívána metoda qRT-PCR založená na izolaci RNA, reverzní transkripci za vzniku komplementární DNA (complementary DNA, cDNA) a amplifikaci cDNA pomocí PCR reakce.

3.1.1 Izolace RNA a reverzní transkripce

RNA byla izolována fenol-chloroformovou metodou za použití TRI reagentu (směs guanidinu thiokyanátu a fenolu) s následnou precipitací RNA izopropanolem. Reverzní transkripce byla následně provedena s využitím random primerů a H minus M-MuLV reverzní transkriptázy.

3.1.1.1 Vyšetřovaný materiál

K izolaci RNA byly použity vzorky sentinelových uzlin od pacientek s karcinomem prsu odebrané a uchované v RNA Lateru. Tato reagentie (směs disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny, dihydrátu citranu trisodného, síranu amonného, kyseliny sírové a vody) slouží ke stabilizaci a ochraně RNA ve vzorku čerstvé tkáně před její izolací (<http://www.sigmaaldrich.com>; <https://wikis.nyu.edu/dashboard.action>).

3.1.1.2 Chemikálie a spotřební materiál

Izolace RNA

RNA Later (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA); TRI reagent - fenol a guanidin izothiokyanát (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA); chloroform, 96% a 75% ethanol (31 ml 96% ethanol + 9 ml vody ošetřené DEPC) (vše Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE); izopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); voda ošetřená DEPC (Ambion, Austin, TX, USA); skleněné kuličky o průměru 5 mm (vše Retsch, Haan, DE); zkumavky typu Eppendorf – 1,5 a 2ml a epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

Reverzní transkripce

Random primery (hexamery); RNAsin inhibitor ribonukleáz; deoxyribonukleotid trifosfáty (10mmol/l, které byly připraveny ze 100mmol/l dCTP, dTTP, dGTP, dATP: 4 x 0,1 ml jednotlivých nukleotidů doplněných vodou ošetřenou DEPC do 1 ml) (vše Promega, Madison, WI, USA); RevertAid H Minus M-MuLV reverzní transkriptáza (Fermentas, Vilnius, LI); 5x ředěný RT pufr (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); voda ošetřená DEPC (Ambion, Austin, TX, USA); epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE) a 0,2ml Thermo-Tube (ABgene, Epsom, UK)

3.1.1.3 Přístroje a pomůcky

Laminární box (BioAir, EuroClone Group, Milano, IT); vortex (Scientific Industries, Genie, NY, USA); minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE); kombinovaná chladnička (Gorenje, Velenje, SI); homogenizér Mixer Mill 300 (Retsch, Haan, DE); termocykler PTC 100 (MJ Research, St. Bruno, Q, CDN); termoblok (Major Science, Saratoga, CA, USA); chlazená centrifuga (Hermle, Labortechnik, Wehingen, DE); NanoDrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA) a automatické pipety (Eppendorf, Hamburg, DE)

3.1.1.4 Pracovní postup

Izolace RNA

1. Před izolací musí být analyzovaná tkáň homogenizována. Nejprve byly vychlazeny bílé nástavce k homogenizéru a do popsané 2ml zkumavky přidány 2 skleněné kuličky a 1 ml TRI reagentu.
2. Zkumavka byla zvážena, přidán vzorek sentinelové uzliny a znovu následovalo vážení.
3. Množství tkáně bylo spočítáno a zapsáno a byla provedena homogenizace po dobu 4 minut při maximální rychlosti 30 Hz.
4. Pro následující izolaci je nutné vyhřát termoblok na 60 °C a vychladit centrifugu na 4 °C.
5. Vzorky buněčných TRI lyzátů (30 – 100 mg tkáně sentinelové uzliny/1 ml TRI reagentu) byly řádně zvortexovány.
6. Takto připravené vzorky v 1,7ml zkumavkách byly ponechány 5 minut při pokojové teplotě kvůli kompletní disociaci nukleoproteinů. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 µl chloroformu a následovalo vortexování (asi 30 sekund). Vzorky byly ponechány 10 minut při pokojové teplotě.
7. Pro separaci vzniklých fází byly vzorky centrifugovány 15 minut při 4 °C při 12 000 g.
8. Po centrifugaci byly ve zkumavkách zřetelné 3 vrstvy: spodní růžová vrstva (detrit, lipidy, proteiny a DNA), mezivrstva (DNA) a horní čirá vrstva (RNA).
9. Do nových a popsaných 1,7ml zkumavek byla po částech, aby se nerozvířily jednotlivé fáze, přepipetována horní vodná fáze s RNA. Celkově je vhodné odebrat 400 – 500 µl vodné fáze.
10. Zbylý chloroform a TRI reagent byl odstraněn do speciální láhve označené jako: „Infekční odpady ze zdravotnictví 18006 Chemikálie obsahující nebezpečné látky – fenol“.
11. Dále byla zahájena precipitační fáze, kdy bylo k přenesené vodné fázi RNA přidáno stejné množství izopropanolu (400 - 500 µl). Tyto dvě vrstvy byly promíchány opakovaným protřepáním (2x - 4x), aby nezůstal mléčný prstenec.

12. Pro precipitaci RNA byly zkumavky ponechány 5 minut při pokojové teplotě.
13. Vzorky byly poté centrifugovány 10 minut při 4 °C při 12 000 g za vzniku bílé či průhledné peletky RNA na dně zkumavky.
14. Vzniklý supernatant byl odpipetován a peletka byla promyta 1,5 ml 75% ethanolu a převrácením zkumavek odlepena ode dna.
15. Zkumavky byly centrifugovány 5 minut při 4 °C při 12 000 g.
16. Supernatant byl opět odstraněn a peletka opatrně sušena ve flow-boxu po dobu 3 – 10 minut (pro zachování dobré rozpustnosti RNA nesmí dojít k přesušení peletky). Během sušení peletka zprůhledněla.
17. RNA byla poté rozpuštěna v 15 – 50 µl vody ošetřené DEPC (dle velikosti peletky). Obsah byl několikrát propipetován.
18. Zahřátím na 60 °C po dobu 10 minut bylo urychleno rozpouštění RNA. Následně byly vzorky ochlazeny na ledové tříšti.
19. Z takto získané RNA ve zkumavkách byl odebrán alikvot (asi 1,4 µl do 0,2ml zkumavky) a na přístroji NanoDrop ND 1000 byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota vyizolované RNA dle návodu k přístroji ($A_{260}/A_{280} \geq 1,8$). Ze změřené koncentrace bylo vypočítáno množství RNA potřebné pro reverzní transkripci
20. Rozpuštěnou RNA lze uchovat krátkodobě při -18 až -20 °C, dlouhodobě při -70 až -80 °C.

Reverzní transkripce

1. Chemikálie pro reverzní transkripci (dNTPs, RT pufr, hexamery a voda ošetřená DEPC) jsou skladovány při -18 až -30 °C, před zahájením práce byly rozmrazeny na ledové tříšti, zvortexovány a krátce stočeny. RNasin a reverzní transkriptáza byly po krátkém stočení přidány přímo z mrazáku.
2. Reverzní transkripce byla provedena ze 3 µg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 µl.
3. Do předem vychlazené destičky byly naskládány popsané 0,2ml zkumavky. Po spočítání objemů byly reagenty pipetovány v pořadí „voda-RNA-hexamery“. Množství použité RNA odpovídalo 3 µg RNA, dále bylo v reakci použito 0,6 µl (0,3 µg) hexamerů a voda do objemu 19,5 µl. Vše bylo krátce zvortexováno a stočeno.
4. Připravená směs byla inkubována v termocykleru s vyhříváním víčkem 5 minut při 70 °C. Následně byla směs zchlazena na ledu po dobu 1 minuty.
5. V mezičase byl připraven MasterMix. Na jeden vzorek pro transkripci 3 µg RNA ve 30 µl je potřeba 6 µl 5x RT pufru, 3 µl 10 mmol/l dNTP a 0,75 µl (30 U) RNAsinu (připravováno s rezervou). Všechny komponenty reakce byly smíchány ve 0,2ml zkumavce, zvortexovány a stočeny.
6. Ke zchlazené směsi vzorku RNA, hexamerů a vody bylo přidáno 9,75 µl MasterMixu. Obsah byl propipetován a zkumavky byly ponechány 5 minut při pokojové teplotě ve flowboxu.
7. Ke vzorku RNA s MasterMixem bylo následně přidáno 0,75 µl (150 U) reverzní transkriptázy. Směs byla zvortexována, stočena a zkumavky byly ponechány 10 minut při pokojové teplotě ve flowboxu.
8. Reakční směs byla poté inkubována v termocykleru s vyhříváním víčkem 60 minut při 42 °C a následně 10 minut při 70 °C.
9. Po inkubaci byly zkumavky se získanou cDNA zchlazeny na ledu, stočeny, popsány a uloženy do mrazicího boxu při -20 °C. cDNA lze uchovat krátkodobě při -18 až -20 °C, dlouhodobě při -70 až -80 °C.

3.1.2 Real-time PCR

Pro každou PCR je důležitý MasterMix neboli směs, ve které probíhá samotná reakce. U real-time PCR obsahuje kromě běžných komponent (pufr, primery, polymeráza, deoxyribonukleotid trifosfáty, hořčnaté ionty a voda) navíc i fluorescenčně značené specifické próby. K průběžné detekci signálu u vznikajícího produktu jsou využívány speciální termocyklery s příslušným programem. Ke kvantitativnímu hodnocení získaných amplikonů ve vzorcích se používají standardy a kalibrační křivka (Owen, Henderson, 2006).

3.1.2.1 Chemikálie a spotřební materiál

Specifické primery a TaqMan sondy (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ); deoxyribonukleotid trifosfáty (Promega, Madison, WI, USA); reakční pufr, Thermo-Start DNA polymeráza a $MgCl_2$ (vše Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); voda ošetřená DEPC (Ambion, Austin, TX, USA); zkumavky typu Eppendorf – 1,7ml; 0,1ml PCR zkumavky s víčky ve stripu po čtyřech (GeneTiCA, Praha, CZ); vychlazený kovový stojan pro stripy (Corbett-Research, Sydney, AU) a epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

3.1.2.2 Přístroje a pomůcky

PCR box (Biosan, Riga, LI); laminární box (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); real-time PCR termocykler RotorGene 3 000 (Corbett-Research, Sydney, AU); vortex (Labnet International, NJ, USA); minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE); kombinovaná chladnička (Gorenje, Valenje, SI) a automatické pipety (Eppendorf, Hamburg, DE)

3.1.2.3 Pracovní postup

1. Reagencie pro real-time PCR (dNTPs, reakční pufr, primery, TaqMan próba, Mg^{2+} a voda ošetřená DEPC) jsou skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, před zahájením práce byly rozmrazeny, zvortexovány a krátce stočeny. Taq polymeráza se do reakční směsi přidává až na závěr přímo z mrazáku. Před použitím byla opatrně zvortexována a stočena.
2. MasterMix byl připraven dle rozpisů zoptimalizovaných pro jednotlivé qPCR reakce (MAM viz Tab. č. 2, resp. CEA viz Tab. č. 4, resp. GAPDH viz Tab. č. 6). Množství jednotlivých reagensů v tabulce odpovídá jedné reakci. Takto připravený mix v popsané 1,7ml zkumavce byl řádně zvortexován a stočen. Reakční směs byla připravována s rezervou.
3. K přípravě reakční směsi byly použity stripy obsahující čtyři 0,1ml zkumavky, které byly vloženy vychlazené destičky.
4. Reakce probíhala v objemu 25 μl , z čehož 24 μl tvořil MasterMix a 1 μl vyšetřovaný vzorek cDNA (100 ng v reakci), negativní kontrola (voda ošetřená DEPC), pozitivní kontrola nebo standardy. Analýzy všech komponent byly provedeny v dubletu.
5. Takto připravené zkumavky byly uzavřeny víčky a vloženy do rotoru termocykleru. Pro vyvážení byly použity prázdné stripy s víčky.
6. V počítači byl spuštěn software Rotor-Gene 6, provedena automatická kalibrace termocykleru pro snímání fluorescence a spuštěn příslušný program.
7. Po ukončení reakce byla provedena analýza PCR křivek a dle kalibrační křivky standardů byla kvantifikována exprese jednotlivých genů.

3.1.2.4 Primery a próby

Primery a próby jsou krátké oligonukleotidy, jejichž velikost se pohybuje kolem 20 bp. Primery určují úsek, který má být amplifikován a próby vytváří detekovatelný signál u vznikajících PCR produktů. Konkrétně TaqMan sonda je fluorescenčně značena jak barvivem, tak jejím zhášedčem. Při studiu exprese markerů pro detekci MRD byly použity duálně značené próby typu TaqMan označené hexachlorofluoresceinem (HEX) (na přístroji byl zvolen kanál JOE nebo přímo excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 556 nm, využíváno u MAM a CEA) nebo fluoresceinem (FAM) (na přístroji byl zvolen kanál FAM nebo přímo excitační vlnová délka 494 nm a emisní vlnová délka 525 nm, využíváno u GAPDH), které jsou zhášeny quencherem BHQ1. Primery a próby byly navrženy v laboratoři s využitím volně dostupných počítačových softwarů Primer3, BLAST, OligoAnalyzer aj. Navržené oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Generi Biotech, s. r. o. (Hradec Králové, CZ). Primery byly čištěny pomocí OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge) neboli purifikační oligonukleotidové kazety a próby za použití HPLC (High Performance Liquid Chromatography) neboli vysokotlaké kapalinové chromatografie.

3.1.2.4.1 Mammaglobin (MAM)

Ke stanovení exprese MAM mRNA byl navržen levý primer (MAMs) o délce 21 bp a pravý primer (MAMas) o délce 28 bp. Specifická TaqMan próba (MAM-P) měla délku 24 bp.

Hodnota exprese markeru MAM byla hodnocena na základě porovnání s experimentálně stanovenou cut-off hodnotou 10 kopií MAM/μg RNA. Exprese MAM v sentinelové uzlině větší nebo rovna 10 kopiím/ μg RNA byla považována za průkaz CTCs v sentinelové uzlině a uzlina byla označena za pozitivní.

Tab. č. 1: Sekvence a velikost primerů, próby a produktu MAM

	Sekvence (5'→3')	Délka
MAMs	catgaagttgctgatggctct	21 bp
MAMas	cttgtattcagtcttagacacttggtg	28 bp
MAM-P	agcactgctacgcaggctctggct	24 bp
Produkt MAM	/	131 bp

Tab. č. 2: Složení MasterMixu pro MAM real-time PCR v objemu 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace v reakci	Finální koncentrace
MAMs	2 μ l	0,01 mmol/l	20 pmol	800 nmol/l
MAMas	1 μ l	0,01 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
GAPDH-P	4 μ l	1,25 μ mol/l	5 pmol	200 nmol/l
dNTPs	0,5 μ l	10 mmol/l	5 nmol	200 μ mol/l
Taq polymeráza	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg²⁺	3 μ l	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	3 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	300 ng	12 ng/ μ l
DEPC H₂O	8,8 μ l	/	/	/

- PCR cyklování pro MAM:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA - 96 °C/15 minut
2. krok: dvoukroková amplifikace (50 cyklů): 95 °C/15 vteřin - 63 °C/20 vteřin a snímání v kanálu JOE při 63 °C

3.1.2.4.2 Karcinoembryonální antigen (CEA)

Ke stanovení exprese CEA mRNA byl navržen levý primer (CEA3) o délce 22 bp a stejně dlouhý pravý primer (CEA4). Specifická TaqMan próba (CEA-P) měla délku 25 bp.

Hodnota exprese markeru CEA byla hodnocena na základě porovnání s experimentálně stanovenou cut-off hodnotou 250 kopií CEA/ μ g RNA. Exprese CEA v sentinelové uzlině větší nebo rovna 250 kopiím/ μ g RNA byla považována za průkaz CTCs v sentinelové uzlině a uzlina byla označena za pozitivní.

Tab. č. 3: Sekvence a velikost primerů, próby a produktu CEA

	Sekvence (5'→3')	Délka
CEA 3	taagtgtgaccacagcgacc	22 bp
CEA 4	gttcccatcaatcagccaagaa	22 bp
CEA-P	atgtcctctatggcccagacgacc	25 bp
Produkt CEA	/	167 bp

Tab. č. 4: Složení MasterMixu pro CEA real-time PCR v objemu 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace v reakci	Finální koncentrace
CEA 3	0,5 μ l	0,015 mmol/l	7,5 pmol	300 nmol/l
CEA 4	1 μ l	0,015 mmol/l	15 pmol	600 nmol/l
CEA-P	4 μ l	1,25 μ mol/l	5 pmol	200 nmol/l
dNTPs	0,5 μ l	10 mmol/l	5 nmol	200 μ mol/l
Taq polymeráza	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg²⁺	3 μ l	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	3 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
DEPC H₂O	12,3 μ l	/	/	/

- PCR cyklování pro CEA:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA - 96 °C/15 minut
2. krok: dvoukroková amplifikace (50 cyklů): 95 °C/15 vteřin - 65 °C/15 vteřin a snímání v kanálu JOE při 65 °C

3.1.2.4.3 Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH)

Ke stanovení exprese GAPDH mRNA byl navržen levý primer (forward, GAPDH-F) o délce 20 bp a pravý primer (reverse, GAPDH-R) o délce 18 bp. Specifická TaqMan próba (GAPDH-P) měla délku 20 bp. GAPDH byl použit pro jeho stabilní míru exprese v buňkách jako referenční gen k ověření správnosti průběhu předchozích kroků analýzy (izolace RNA, reverzní transkripce). Hodnota exprese \geq 10 000 kopií GAPDH/ μ g RNA byla považována za znak dostatečného množství RNA pro vyhodnocení exprese markerů MAM a CEA.

Tab. č. 5: Sekvence a velikost primerů, próby a produktu GAPDH

	Sekvence (5'→3')	Délka
GAPDH-F	gaagatggtgatggatttc	20 bp
GAPDH-R	gaaggtgaaggtcggagt	18 bp
GAPDH-P	caagctcccgttctcagcc	20 bp
Produkt GAPDH	/	226 bp

Tab. č. 6: Složení MasterMixu pro GAPDH real-time PCR v objemu 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace v reakci	Finální koncentrace
GAPDH-F	1 μ l	7,5 μ mol/l	7,5 pmol	300 nmol/l
GAPDH-R	1 μ l	7,5 μ mol/l	7,5 pmol	300 nmol/l
GAPDH-P	4 μ l	1,25 μ mol/l	5 pmol	200 nmol/l
dNTPs	0,5 μ l	10 mmol/l	5 nmol	200 μ mol/l
<i>Taq</i> polymeráza	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg ²⁺	3 μ l	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	1 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
DEPC H ₂ O	11,8 μ l	/	/	/

- PCR cyklování pro GAPDH:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA - 96 °C/15 minut
2. krok: dvoukroková amplifikace (50 cyklů): 95 °C/15 vteřin - 60 °C/30 vteřin a snímání v kanálu FAM při 60 °C

3.1.2.4.4 Ředění primerů a prób

Primery a próby jsou dodávány v lyofilizovaném stavu a koncentrace jejich zásobních roztoků je 0,1 mmol/l neboli 100 pmol v 1 μ l. Naředěny jsou poté dle optimalizace jednotlivých PCR reakcí (viz Tab. 2, 4, 6).

3.1.2.4.5 Thermo-Start polymeráza

Pro zamezení vzniku nescifických interakcí primerů a jejich dimerů byla použita chemicky modifikovaná Thermo-Start DNA polymeráza, která zahájila svou aktivitu až po 15 minutách při 95 °C (www.thermoscientificbio.com). Tato polymeráza se používá pro hot-start PCR a je odvozena z bakterie *Thermus aquaticus*.

3.1.2.4.6 $MgCl_2$ a reakční pufr

Hořečnaté ionty jsou velmi důležité pro funkci polymerázy. Do reakce byly dodány ve formě chloridu hořečnatého. $MgCl_2$ a reakční pufr jsou dodávány v setu s Thermo-Start polymerázou.

3.1.2.5 Negativní kontrola, pozitivní kontrola a specifické standardy

Součástí každé PCR byly kromě vzorků i kontroly a diluční řada standardů studovaného genu.

3.1.2.5.1 Negativní kontrola

Jako negativní kontrola byl do reakce místo vzorku cDNA přidán 1 μ l vody ošetřené DEPC.

3.1.2.5.2 Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrola sloužila cDNA získaná ze vzorku tkáně karcinomu prsu ST 2050 (u MAM) a ze vzorku tkáně karcinomu kolorekta MRD 696T (pro CEA a GAPDH).

3.1.2.5.3 Specifické standardy

K absolutní kvantifikaci genové exprese MAM, CEA a GAPDH byly použity v PCR reakcích diluční řady standardů: $10^2 - 10^7$ kopií MAM/ μ g RNA, $30 - 10^6$ kopií CEA/ μ g RNA a $10^4 - 10^9$ kopií GAPDH/ μ g RNA. Standardy obsahovaly PCR produkty se sekvencemi MAM, CEA a GAPDH. Expze jednotlivých markerů byla kvantifikována pomocí kalibračních křivek standardů a byla provedena normalizace dat na vstupní množství RNA.

3.1.3 Příprava standardů referenčního genu GAPDH

Standardy testovaného genu jsou u real-time PCR důležité pro sestavení kalibrační křivky a stanovení míry jeho exprese. V každé reakci jsou standardy amplifikovány zároveň se vzorky a kontrolami. Pro přípravu diluční řady standardů pro GAPDH je nutné provést amplifikaci úseků zahrnujících sekvenci detekovanou GAPDH primery GAPDH - F a GAPDH - R pomocí tzv. outer primerů GAPDHfor - out a GAPDHrev - out. Produkty amplifikace je poté nutné zanalyzovat pomocí elektroforézy, změřit jejich koncentraci a vypočítat finální ředění.

Amplifikace GAPDH out

Amplifikace byla provedena pomocí real-time RT-PCR a skládala se ze dvou kroků, kdy v prvním byla ověřena exprese genu ve vybraném vzorku a ve druhém byl gen amplifikován přímo pro DNA analýzu. Amplifikace GAPDH out pro analýzu získaných PCR produktů probíhala dle postupu v kap. 4.1.2, ale bez fluorescenčního značení próbou. Její objem v reakci byl nahrazen stejným množstvím vody ošetřené DEPC (4 µl) a do reakce nebyla zařazena ani negativní kontrola. Pozitivní kontrola byla v této reakci pipetována 3x a proto byly získány 3 GAPDH out produkty, které byly analyzovány pomocí elektroforézy na přístroji Agilent a spektrofotometrie použitím NanoDropu.

Tab. č. 7: Sekvence a velikost primerů, próby a produktu GAPDH out

	Sekvence (5'→3')	Délka
GAPDHfor- out	agccacatcgctcagacac	19 bp
GAPDHrev - out	tcatacttctcatggttcacacc	23 bp
GAPDH-P	caagcttcccgttctcagcc	20 bp
Produkt GAPDH out	/	442 bp

Tab. č. 8: Složení MasterMixu pro GAPDH out real-time PCR v objemu 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace v reakci	Finální koncentrace
GAPDHfor – out	2 μ l	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
GAPDHrev – out	2 μ l	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
GAPDH-P	4 μ l	1,25 μ mol/l	5 pmol	200 nmol/l
dNTPs	0,5 μ l	10 mmol/l	5 nmol	200 μ mol/l
Taq	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg²⁺	3 μ l	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	1 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
DEPC H₂O	9,8 μ l	/	/	/

- PCR cyklování pro GAPDH out:
 1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA - 96 °C/15 minut
 2. krok: dvoukroková amplifikace (50 cyklů): 95 °C/15 vteřin - 61°C/35 vteřin a snímání v kanálu FAM při 61 °C

Analýza PCR produktu

3.1.3.1 Chemikálie a spotřební materiál

Ladder (standard molekulových hmotností); Marker (nanášecí roztok pro vzorky DNA a ladder); gel; barvivo pro vizualizaci rozdělených fragmentů DNA v gelu; Electrode Cleaner chip (plastová kazeta pro čištění elektrod) (vše Agilent, Santa Clara, CA, USA); TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); voda ošetřená DEPC (Ambion, Austin, TX, USA); 0,2ml zkumavky typu Eppendorf a epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

3.1.3.2 Přístroje a pomůcky

Agilent 2100 bioanalyzátor; DNA chip; chip priming station; IKA vortex mixer (vše Agilent, Santa Clara, CA, USA); minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE); vortex (Labnet International, NJ, USA); kombinovaná chladnička (Gorenje, Velenje, SI); NanoDrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA) a automatické pipety (Eppendorf, Hamburg, DE)

3.1.3.3 Pracovní postup

1. Před zahájením elektroforetické analýzy bylo nutné připravit priming station. Byla vložena stříkačka a upraveny parametry: v horní části byla nastavena nejnižší poloha pístu vzhledem k použitému typu chipů.
2. Reagencie uchovávané v lednici byly před zahájením práce inkubovány 30 minut při pokojové teplotě.
3. Gel pro elektroforézu byl připraven přidáním 25 μ l DNA barviva do gelu, směs byla zvortexována, nanese na kolonku a centrifugována 15 minut při 2 240 g. Gel byl po 9 μ l rozpipetován do 3 jamek označených písmenem G v DNA chipu uloženém v priming station. Následně byl gel po dobu 60 sekund roztlačen pomocí stlačení pístu priming station nastaveného na 1 ml dolů. Případné bubliny v gelu byly odstraněny pomocí injekční jehly.
4. Dále byl do jamek napipetován roztok markeru obsahující nejkratší a nejdelší sekvenci později naneseného Ladderu. Pro naše 3 PCR produkty byl nanesen do tří jamek pro vzorky po 5 μ l a následně do zbývajících jamek po 6 μ l. Do jamky specificky označené pro Ladder (standard molekulových hmotností) bylo nanese 5 μ l roztoku stejně jako u vzorků.
5. Na závěr byly do chipu přidány vzorky PCR produktů a Ladder v množství 1 μ l.
6. Takto připravený chip byl horizontálně vložen do IKA vortex mixeru a vortexován 1 minutu při 2 400 otáčkách.
7. Pro analýzu byl chip vložen do Agilent 2100 bioanalyzátoru a v softwaru Agilent 2100 Expert byla spuštěna analýza.
8. Po proběhnuté analýze byl chip vyjmut a elektrody byly omyty pomocí Electrode Cleaner chipu 350 μ l DEPC vody.

9. Byla provedena analýza výsledků elektroforézy v softwaru 2100 Expert.
10. Pomocí NanoDropu ND 1000 byla spektrofotometricky stanovena koncentrace PCR produktů.
11. Po naředění diluční řady standardů byla pro kontrolu jejich správné přípravy provedena GAPDH real-time RT-PCR.

3.1.4 Pacienti

Do studie bylo zařazeno 211 pacientek operovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc pro karcinom prsu klinického stádia I až IV. Žádná z pacientek nepodstoupila neoadjuvantní terapii. Klinická charakteristika pacientek je uvedena v tabulce č. 9.

Expres markerů MAM a CEA byla stanovena ve vzorcích sentinelových uzlin odebraných pacientkám po podepsání informovaného souhlasu za účelem vyšetření přítomnosti MRD.

Tab. č. 9 Klinická charakteristika pacientek

		n	Prům. věk (roky) (min;max)	Grading			Postižení uzlin		ER		PR		Her2 amplif.	
				1	2	3	N0	N poz.	poz.	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.
Klin. stádium	I	153	59,9 (32;86)	48	72	26	144	9	129	25	106	44	18	118
	II	52	59,3 (28;80)	7	23	20	23	29	103	20	31	20	8	34
	III	4	53,3 (34;62)	0	1	3	0	4	3	1	3	1	0	4
	IV	2	66,5 (65;68)	1	1	0	1	1	2	0	2	0	0	2
Celkem		211	59,8 (28;86)	56	97	49	168	43	237	46	142	65	26	158

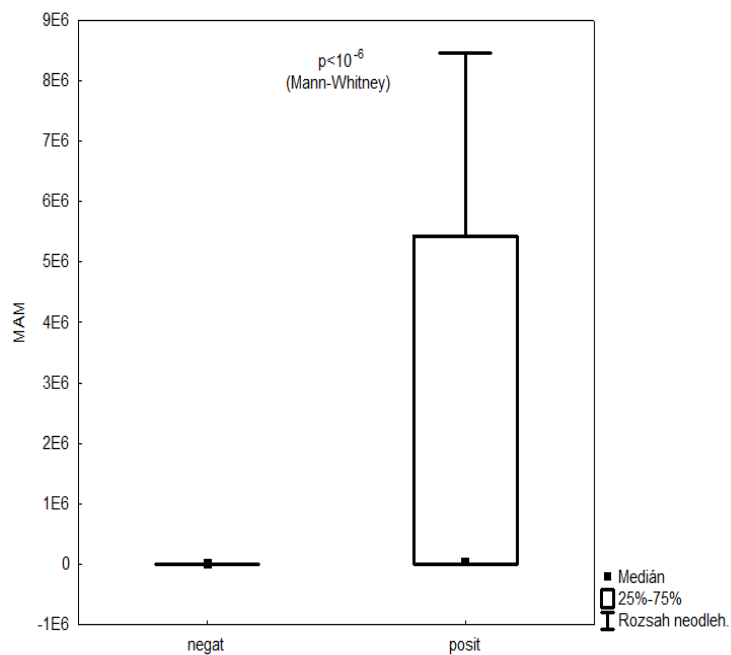
3.2 Výsledky

3.2.1 Stanovení přítomnosti CTCs pomocí vyšetření exprese nádorových markerů MAM a CEA ve vzorcích sentinelových uzlin u souboru pacientek s karcinomem prsu

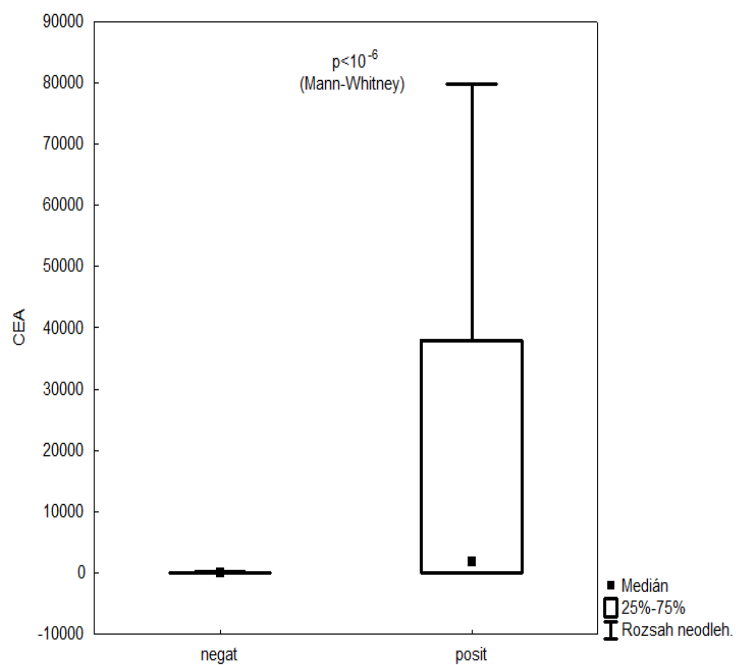
Ve vzorcích sentinelových uzlin od 211 pacientek s karcinomem prsu (charakteristika souboru viz kap. 4.1.4) byla stanovena míra exprese markerů MAM a CEA. Exprese byla hodnocena dle experimentálně stanovených cut-off hodnot (viz kap. 4.1.2.4.1 a 4.1.2.4.2) a uzliny byly označeny jako pozitivní nebo negativní.

Byla provedena analýza přežití pacientek bez relapsu (relapse-free survival, RFS) pomocí log-rank testu.

Obr. č. 5 a č. 6 znázorňují rozsah míry exprese markerů MAM a CEA u negativních a pozitivních uzlin. Zařazení do skupin negativních a pozitivních uzlin je vymezeno cut-off hodnotami (10 kopií MAM/ μg RNA, resp. 250 kopií CEA/ μg RNA). U pacientek s pozitivními uzlinami byla zaznamenána vyšší exprese MAM oproti CEA, což může být dáno vysokou specifitou mammaglobinu pro prsní tkáň.

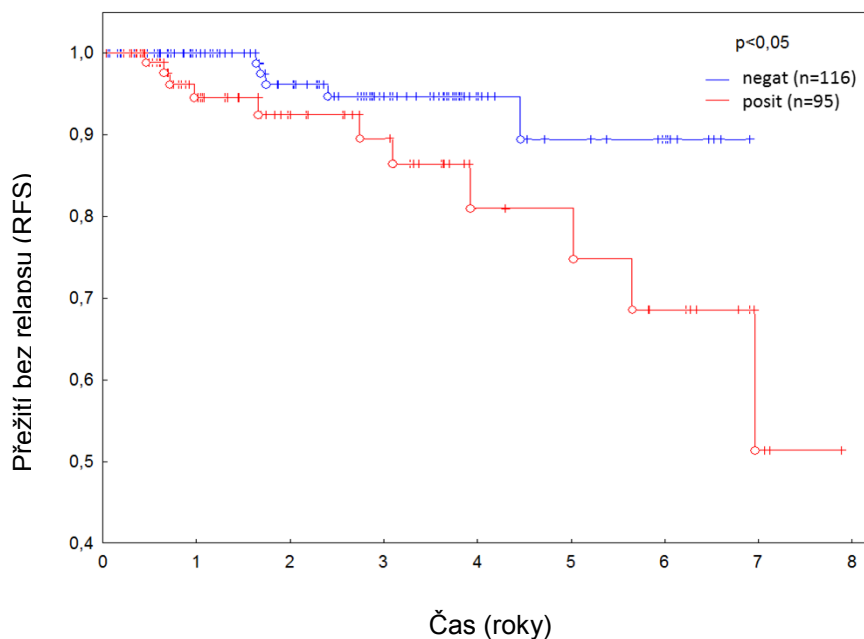


Obr. č. 5: Expres markeru MAM v pozitivních a negativních uzlinách znázorněná krabicovým grafem



Obr. č. 6: Expres markeru CEA v pozitivních a negativních uzlinách znázorněná krabicovým grafem

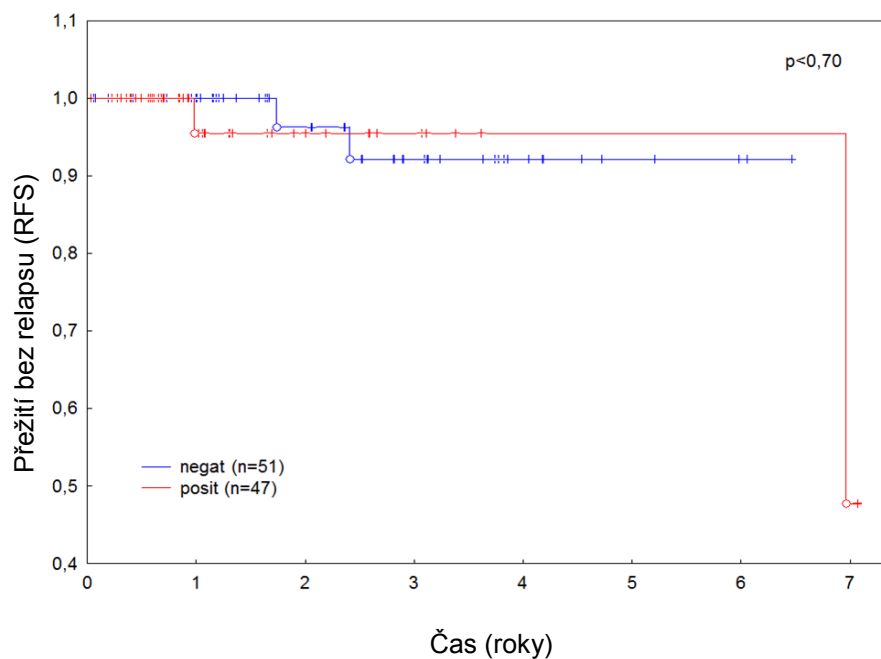
Při analýze přežití bez relapsu v souboru 211 pacientek s karcinomem prsu byla prokázána významně ($p < 0,05$) kratší doba přežití bez relapsu u pacientek s přítomností CTCs v sentinelové uzlině stanovené pomocí real-time RT-PCR s použitím markerů MAM a CEA oproti pacientkám s uzlinami negativními pro cirkulující nádorové buňky (viz Obr. č. 7). Získané výsledky však mohly být zkresleny zahrnutím pacientek s horší prognózou, které křivku přežití u pozitivních uzlin mohly ovlivnit ve směru jejího většího oddělení od křivky přežití u uzlin negativních.



Obr. č. 7: Křivky přežití bez relapsu souboru 211 pacientek s pozitivními a negativními sentinelovými uzlinami na přítomnost CTCs detekovaných pomocí markerů MAM a CEA

Proto byla ze souboru pacientek vyloučena tato rizikovější skupina, tedy pacientky s tumorem vyššího stádia, s postižením uzlin, s přítomností vzdálených metastáz, s negativními estrogenovými a progesteronovými receptory a s pozitivní amplifikací HER2. Do analýzy přežití byly tedy zahrnuty pacientky s tumory nižšího

rozsahu (T1-T2), bez postižení uzlin, bez přítomnosti vzdálených metastáz, s pozitivními estrogenovými a progesteronovými receptory a s negativní HER2 amplifikací. U těchto pacientek však již nebyla pozorována souvislost přítomnosti CTCs v sentinelové uzlině s délkou přežití bez relapsu (viz Obr. č. 8). Z křivek je zřejmé, že byl prozatím zaznamenán pouze malý počet událostí (recidiv) z důvodu krátké doby sledování pacientek. Prognostický význam nebyl tedy prokázán, buď neexistuje, nebo ještě není znatelný kvůli nedostatečně dlouhé době sledování souboru.



Obr. č. 8: Křivky přežití bez relapsu souboru pacientek (T1-2, N0, M0, ER+, PR+, HER2-) s pozitivními a negativními sentinelovými uzlinami na přítomnost CTCs detekovaných pomocí markerů MAM a CEA

3.2.2 Ředění a příprava standardů GAPDH

Pro výpočet ředění standardů bylo nutné zjistit, kolik je v 1 μ l PCR kopií GAPDH out u dsDNA (double-stranded DNA, dvouvláknové DNA).

Nejprve byla pomocí programu OligoAnalyzer 3.1 stanovena velikost sekvence PCR produktu GAPDHout (442 bp).

- Ověření velikosti sekvence PCR produktu GAPDHout a stanovení jeho molekulové hmotnosti:
 1. rozměr části sekvence GAPDH out: 125bp
 $M_1 = 38769,0 \text{ g/mol}$
 2. rozměr části sekvence GAPDH out: 180bp
 $M_2 = 55335,8 \text{ g/mol}$
 3. rozměr části sekvence GAPDH out: 137bp
 $M_3 = 42375,3 \text{ g/mol}$

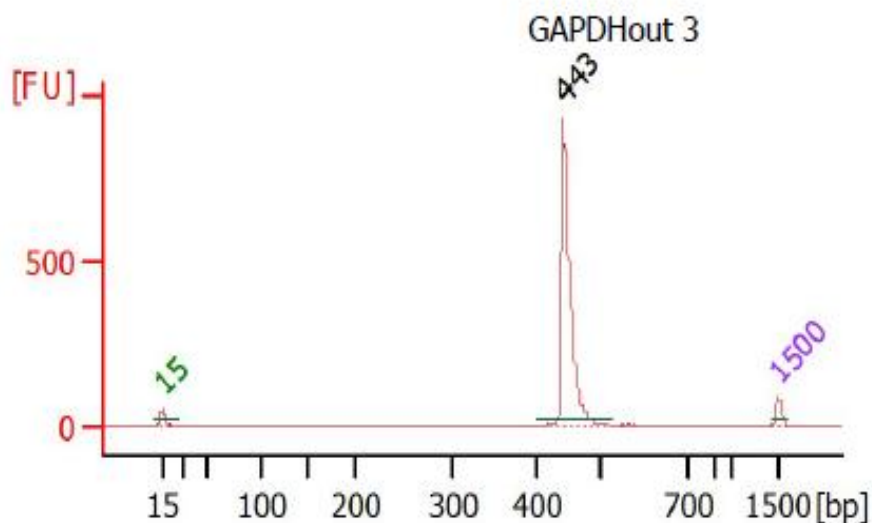
$$M = M_1 + M_2 + M_3 \times 2 \text{ (dsDNA)}$$

$$M = 136480,1 \text{ g/mol} \times 2$$

$$M = \underline{272960,2 \text{ g/mol}}$$

$$125\text{bp} + 180\text{bp} + 137\text{bp} = \underline{442\text{bp}}$$

Produkty získané amplifikací vzorku MRD 696T za podmínek GAPDHout PCR (viz kap. 4.1.3) byly analyzovány s využitím chipové elektroforézy na přístroji Agilent Bioanalyzer. Délka ampliconů GAPDHout 1 – 3 odpovídala teoreticky stanovené délce 442 bp a zároveň nebyly detekovány žádné nespecifické produkty či dimery primerů (Obr. č. 9).



Obr. č. 9: Elektroferogram znázorňující velikost jednoho ze 3 PCR produktů GAPDHout (velikost 443 bp) mezi horním a spodním markerem (15 a 1 500 bp)

Dále byly produkty GAPDHout 1 – 3 sloučeny do jedné zkumavky a byla změřena koncentrace DNA na přístroji NanoDrop ND 1000. Ze čtyř opakování měření byla vypočtena průměrná hodnota koncentrace.

- Měření koncentrace DNA na NanoDropu:

$$c_1 = 451,01 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_2 = 486,61 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_3 = 453,83 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_4 = 461,16 \text{ ng}/\mu\text{l} \Rightarrow c = \underline{\underline{463,1525 \text{ ng}/\mu\text{l}}}$$

Průměrná hodnota koncentrace $c = 463,1525 \text{ ng}/\mu\text{l}$ a stanovená molekulová hmotnost PCR produktu GAPDHout byly použity pro výpočet počtu kopií v objemu 1 μl a následně ředění řady standardů pro GAPDH.

- Výpočet počtu kopií:

1 mol je $6,023 \times 10^{23}$ (Avogadrova konstanta) částic neboli kopií

$$c = 463,1525 \text{ ng}/\mu\text{l} = 463,1525 \times 10^{-9} \text{ g/mol}$$

$$M = 272960,2 \text{ g/mol}$$

$$1 \text{ mol} = 6,023 \times 10^{23} \text{ kopií}$$

$$\begin{array}{l} \uparrow \\ \frac{272960,2 \text{ g} \dots\dots\dots 1 \text{ mol}}{463,1525 \times 10^{-9} \text{ g} \dots\dots\dots x \text{ mol}} \uparrow \end{array}$$

$$x = \frac{463,1525 \times 10^{-9}}{272960,2}$$

$$x = \underline{696776673 \times 10^{-12} \text{ mol};}$$

$$1,696776673 \times 10^{-12} \times 6,023 \times 10^{23} = \underline{1,02196859 \times 10^{12}} \text{ kopií}$$

- Výpočet ředění:

$$\begin{array}{l} \uparrow \\ \frac{1,02196859 \times 10^{12} \text{ kopií} \dots\dots\dots 1 \mu\text{l}}{5 \times 10^{13} \text{ kopií} \dots\dots\dots x \mu\text{l}} \uparrow \end{array}$$

$$x = \frac{5 \times 10^{13}}{1,02196859 \times 10^{12}}$$

$$x = \underline{4,8925 \times 10^1 \mu\text{l}} = \underline{48,925 \mu\text{l dsDNA};}$$
 a zbytek TRIS (451,075 μl) do 500 μl

$$\begin{array}{l} \uparrow \\ \frac{500 \mu\text{l} \dots\dots\dots 5 \times 10^{13} \text{ kopií}}{1 \mu\text{l} \dots\dots\dots x \text{ kopií}} \uparrow \end{array}$$

$$x = \frac{5 \times 10^{13}}{500}$$

$$x = \underline{1 \times 10^{11} \text{ kopií v } \mu\text{l};}$$

- Ředění:

5 μ l 10^{11} kopií dsDNA + 45 μ l TRISU $\Rightarrow 10^{10}$

5 μ l 10^{10} kopií dsDNA + 45 μ l TRISU $\Rightarrow 10^9$

5 μ l 10^9 kopií dsDNA + 45 μ l TRISU $\Rightarrow 10^8$

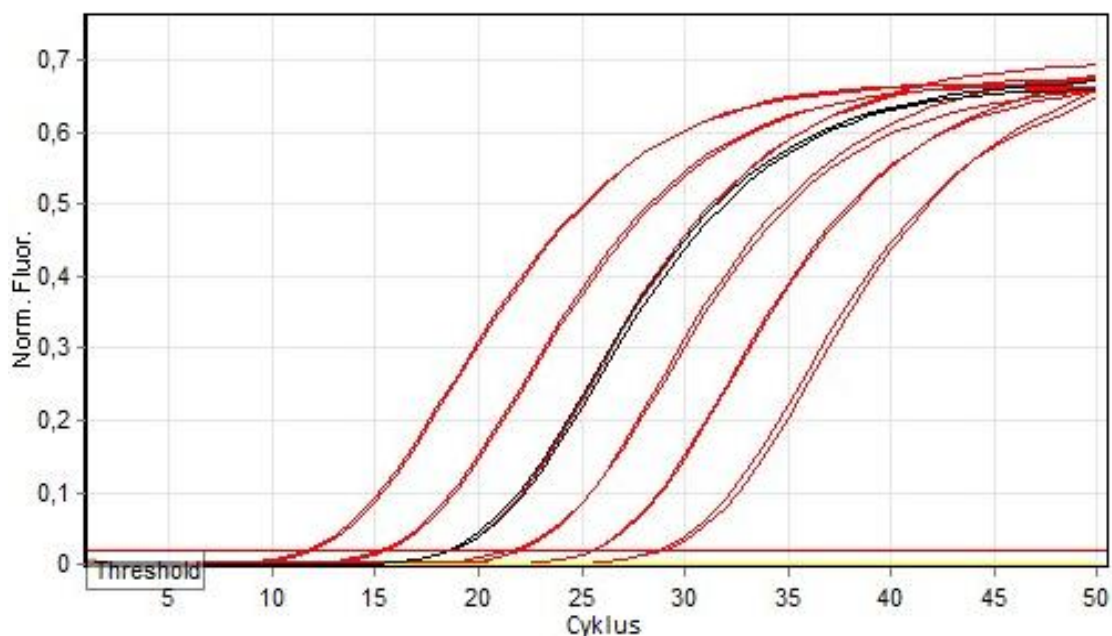
5 μ l 10^8 kopií dsDNA + 45 μ l TRISU $\Rightarrow 10^7$

5 μ l 10^7 kopií dsDNA + 45 μ l TRISU $\Rightarrow 10^6$

5 μ l 10^6 kopií dsDNA + 45 μ l TRISU $\Rightarrow 10^5$

5 μ l 10^5 kopií dsDNA + 45 μ l TRISU $\Rightarrow 10^4$

Správnost připravené řady standardů byla ověřena pomocí qPCR pro GAPDH (Obr. č. 10). Standardy byly poté uchovávány při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. č. 10: qPCR analýza připravené řady standardů pro GAPDH (červené křivky – diluční řada standardů, černá křivka - pozitivní kontrola a žlutá křivka – negativní kontrola)

3.3 Diskuze

U pacientek s karcinomem prsu je detekce metasáz v lymfatických uzlinách velmi významná z hlediska prognózy. Důležitý je však výběr metody k detekci často velmi malého množství cirkulujících nádorových buněk ve vzorku, které mohou později zapříčinit vznik mikrometastáz. Proto klasické metody, které se používají pro vyšetření uzlin (např. histologie), mohou být značně nedostačující (Nissan *et al.*, 2006). V posledních letech nachází vysoké uplatnění v této oblasti metoda real-time RT-PCR. Tento vysoce citlivý přístup využívá detekce nádorových markerů ke stanovení přítomnosti CTCs.

Nissan *et al.*, 2006 se svými kolegy vyšetřili RNA získanou ze sentinelových uzlin odebraných 28 pacientkám. V počtu 30 vzorků vyšetřovaných uzlin byla přítomnost mezastáz potvrzena u 6 z nich pomocí histologie, u 8 pomocí imunohistochemie a u 15 metodou multimarkerové RT-PCR, což jen dokazuje vysokou citlivost metody PCR ve srovnání s ostatními technikami.

Krishnamurthy *et al.*, 2010 studovali vzorky periferní krve a kostní dřeně u souboru 92 pacientek s karcinomem prsu s tumory stádia 1 a 2. Výskyt CTCs detekovali u 33 % pacientek s pozitivním ER, u 32 % pacientek s pozitivním PR a u 31 % pacientek s negativní amplifikací HER2. Došli k závěru, že přítomnost CTCs u pacientek s počátečním stádiem karcinomu prsu nijak zvlášť nesouvisí s výše uvedenými charakteristikami (se stádiem tumoru, ER, PR, HER2).

Na základě vyšetření exprese markerů MAM a CEA v sentinelových uzlinách jsme stanovili pozitivitu a negativitu těchto uzlin pomocí cut-off hodnot určujících hranici mezi oběma skupinami. Pro mammaglobin bylo stanoveno 10 kopií MAM/ μ g RNA a pro karcinoembryonální antigen 250 kopií CEA/ μ g RNA. U pacientek s pozitivními uzlinami jsme zaznamenali vyšší míru exprese MAM oproti CEA, což může být dáno vysokou specifitou mammaglobinu pro prsní tkáň. Vysoká exprese a specifita mammaglobinu v periferní krvi a pozitivních uzlinách karcinomu prsu byla potvrzena i dalšími studiemi (Zehentner *et al.*, 2004 a Wang *et al.*, 2009).

U souboru 211 pacientek jsme na základě statisticky získaných křivek přežití pozorovali souvislost přítomnosti CTCs v sentinelových uzlinách s délkou přežití bez relapsu. Významně kratší doba přežití jsme prokázali u uzlin pozitivních na přítomnost CTCs. K těmto účelům jsme využili metodu real-time RT-PCR s markery MAM a CEA. Je však nutné si uvědomit, že ve skupině se vyskytovaly i rizikové pacientky. Druhá sledovaná skupina sestávala pouze z pacientek s tumory nižšího rozsahu (T1-T2), bez postižení uzlin, bez přítomnosti vzdálených metastáz, s pozitivními estrogenovými a progesteronovými receptory a s negativní HER2 amplifikací. U těchto pacientek však již nebyla potvrzena souvislost přítomnosti CTCs v SU s délkou přežití bez relapsu a to zejména kvůli nedostatečně dlouhému časovému úseku pro sledování pacientek. Lze říci, že prognostický význam CEA a MAM nebyl neprokázán nebo není ještě znatelný, což však vyvrací studie Bidarda *et al.*, 2010, kteří považují detekci CTCs před chemoterapií za nezávislý prognostický faktor pro přežití bez vzdálených metastáz.

Vzhledem k přítomnosti cirkulujících nádorových buněk již u raných stádií karcinomu prsu by včasná detekce minimální reziduální choroby (zejména pomocí vysoce specifického mammaglobinu), mohla být pro pacientky přínosem nejen v rámci počínajících metastáz, ale i pro určení budoucí prognózy a navržení vhodnější léčby. Problémem je však nutnost poměrně dlouhého období pro sledování pacientek k potvrzení prognostického významu.

3.4 Závěr

Tato práce byla zaměřena na detekci minimální reziduální choroby u karcinomu prsu pomocí metody real-time reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce, kdy cílem bylo ověřit vhodnost markerů MAM a CEA pro detekci MRD u karcinomu prsu a stanovit jejich prognostickou hodnotu.

Byla prokázána jak vhodnost MAM a CEA k detekci MRD u karcinomu prsu dle jejich cut-off hodnot, tak souvislost mezi přítomností CTCs detekovaných pomocí MAM a CEA v SU a délkou přežití pacientek s karcinomem prsu bez relapsu, která však nebyla podruhé potvrzena. U celkového souboru pacientek byla totiž pozorována kratší doba přežití bez relapsu s uzlinami pozitivními na CTCs, ale u souboru pacientek s vyřazenou kritickou skupinou (s horší prognózou) se spojitost mezi délkou přežití a pozitivitou uzlin pro MRD nepotvrdila. Prognostický význam detekce MRD u karcinomu prsu pomocí MAM a CEA zatím nebyl prokázán pro krátkou dobu ke sledování pacientek.

4 Seznam použité literatury

Abrahámová J., Foretová L., Horák J., Kubala E., Matouš-Malbohan I., Nepomucká J., Pafko P., Povýšil C., Štípek S., Vermousek I. *Atlas nádorů prsu*. 1. Vydání. Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 80-7169-771-0.

Adam Z., Vorlíček J. (eds.). *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 1. Vydání. Praha: Grada Publishing, 2002. ISBN 80-7169-792-3.

Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J. (eds.). *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. Vydání. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0677-6.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Přeložil Kotyk A. 2. Vydání. Ústí nad Labem: Espero publishing. 1998. ISBN 80-902906-2-0.

Alix-Panabières C., Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*, 2014, 14, 57.

American cancer society [online]. c2014, [cit. 2014-2-14]. <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-chemotherapy>>.

American cancer society [online]. c2014, [cit. 2014-2-14]. <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-hormone-therapy>>.

Andergassen U., Kölbl A. C., Hutter S., Friese K., Jeschke U. Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR. *Cancers*, 2013, 5, 1212-1220.

Bednarz-Knoll N., Alix-Panabières C., Pantel K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Research*, 2011, 13, 228.

Benoy IH., Elst H., Philips M., Wuyts H., Dam Van P., Scharpe S., Marck Van E., Vermeulen PB., Dirix LY. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2006, 94, 672-680.

Bernstein J. L., Godbold J. H., Raptis G., Watson M. A., Levinson B., Aaronson S. A., Fleming T. P. Identification of Mammaglobin as a Novel Serum Marker for Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11, 6528-6535.

Bidard F. C., Mathiot C., Delaloge S., Brain E., Giachetti S., Cremoux de P., Marty M., Pierga J. Y. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 2010, 21, 729–733.

Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, 25, 169–193.

Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, 29, 23–39.

Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34, 597–601.

Cell Search Circulating Tumor Cell Test [online]. c2014, [cit. 2014-3-4]. <<https://www.cellsearchctc.com/about-cellsearch/how-cellsearch-ctc-test-works>>.

Cremoux de P., Extra J. M., Denis M. G., Pierga J. Y., Boursstyn E., Nos C., Clough K. B., Boudou E., Martin E. C., Müller A., Pouillart P., Magdelénat H. Detection of MUC1-expressing Mammary Carcinoma Cells in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Clin Cancer Res*, 2000, 6, 3117-3122.

Čihák R., Druga R., Grim M. *Anatomie 3. 2. Upravené a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-1132-X.

Ercolani L., Florence B., Denaro M., Alexan M. Isolation and Complete Sequence of a Functional Human Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene. *Journal of biological chemistry*, 1988, 263, 15335-15341.

Fehm T., Hoffmann O., Aktas B., Becker S., Solomayer E. F., Wallwiener D., Kimmig R., Kasimir-Bauer S. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Research*, 2009, 11, R59.

Fentiman S. I. *Detection and treatment of breast cancer*. 2nd Edition. London: Martin Dunitz, 1998. ISBN 1-85317-223-5.

Freeman W. M., Walker S. J., Vrana K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques*, 1992, 26, 112-125.

French D. J., McDowell D. G., Debenham P., Gale N., Brown T. HyBeacon probes for rapid DNA sequence detection and allele discrimination. *Methods Mol Biol*, 2008, 429, 171-85.

Gerhard M., Juhl H., Kalthoff H., Schreiber H. W., Wagener Ch., Neumaier M. Specific Detection of Carcinoembryonic Antigen-Expressing Tumor Cells in Bone Marrow Aspirates by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Oncology*, 1994, 12, 725-729.

Ghossein R. A., Rosai J. Polymerase Chain Reaction in the Detection of Micrometastases and Circulating Tumor Cells. *CANCER*, 1996, 78, 1.

Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in cancer biology*, 1999, 9, 67-81.

Hauwel M., Matthes T. Minimal residual disease monitoring: the new standard for treatment evaluation of haematological malignancies?. *Swiss Medical Weekly*, 2014, 144, w13907.

Horyna M., Houdek L. (eds.). *Chirurgie orgánových metastáz*. 1. Vydání. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-493-5.

Hugo H., Ackland L. M., Blick T., Lawrence M. G., Clements J. A., Williams E. D., Thompson E. W. Epithelial-Mesenchymal and Mesenchymal-Epithelial Transitions in Carcinoma Progression. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 213, 374–383.

Ignatiadis M., Reinholz M. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2011, 13, 222.

International Agency For Research On Cancer [online]. c2012, [cit. 2014-1-27]. <<http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=968>>.

International Agency For Research On Cancer [online]. c2012, [cit. 2014-1-30]. <<http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=203>>.

International Agency For Research On Cancer [online]. c2014, [cit. 2014-1-27]. <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>.

Kallergi G., Papadaki A. M., Politaki E., Mavroudis D., Georgoulas V., Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 2011, 13, R59.

Krishnamurthy S., Cristofanilli M., Singh B., Reuben J., Gao H., Cohen E. N., Andreopoulou E., Hall C. S., Lodhi A., Jackson S., Lucci A. Detection of Minimal Residual Disease in Blood and Bone Marrow in Early Stage Breast Cancer. *Cancer*, 2010, 116, 3330–7.

Lee M. A., Siddle A. L., Page R. H. ResonSense[®]: simple linear fluorescent probes for quantitative homogeneous rapid polymerase chain reaction. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 457, 61–70.

Lianidou E. S., Markou A. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Detection Systems, Molecular Characterization, and Future Challenges. *Clinical Chemistry*, 2011, 57, 1242–1255.

Lianidou E. S., Mavroudis D., Sotiropoulou G., Agelaki S., Pantel K. What's new on circulating tumor cells? A meeting report. *Breast Cancer Research*, 2010, 12, 307.

Lin Y.-Ch., Chen S.-Ch., Hsueh S., Lo Y.-F., Chow-Wu Y.-H., Liaw I.-Ch., Cheng A.-J. Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in

peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. *Cancer Sci*, 2003, 94, 99–102.

Liu X., Hsieh H. B., Dario Campana D., Bruce R. H. A New Method for High Speed, Sensitive Detection of Minimal Residual Disease. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*, 2012, 81A, 169-175.

Luppi M., Morselli M., Bandieri E., Federico M., Marasca R., Barozzi P., Ferrari M. G., Savarino M., Frassoldati A., Torelli G. Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Annals of Oncology*, 1996, 7, 619-624.

Mačák J. - Mačáková J. *Patologie*. 1. Vydání. Praha: Grada publishing, 2004. ISBN 80-247-0785-3.

Mavroudis D. Circulating cancer cells. *Annals of Oncology*, 2010, 21, vii95–vii100.

Mitas M., Mikhitarian K., Walters Ch., Baron P. L., Elliott B. M., Brothers T. E., Robison J. G., Metcalf J. S., Palesch Y. Y., Zhang Z., Gillanders W. E., Cole D. J. QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR DETECTION OF BREAST CANCER MICROMETASTASIS USING A MULTIGENE MARKER PANEL. *Int. J. Cancer*, 2001, 93, 162–171.

Nadal R., Fernandez A., Sanchez-Rovira P., Salido M., Rodríguez M., García-Puche J. L., Macià M., Corominas J. M., Delgado-Rodríguez M., Gonzalez L., Albanell J., Fernández M., Solé F., Lorente J. A., Serran M. J. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 2012, 14, R71.

Nahta R., Hortobágyi G. N., Esteva F. J. Growth Factor Receptors in Breast Cancer: Potential for Therapeutic Intervention. *The Oncologist*, 2003, 8, 5-17.

Nissan A., Jager D., Roystacher M., Prus D., Peretz T., Eisenberg I., Freund H. R., Scanlan M., Ritter G., Old L. J., Mitrani-Rosenbaum S. Multimarker RT–PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, 2006, 94, 681–685.

NYU wikis. [online]. c2013, [cit. 2014-5-3]. <<https://wikis.nyu.edu/display/greshamlab/Preparation+of+an+Exemplary+RNA+later-++RNA+Preservation+Medium>>.

Oakman C., Pestrin M., Bessi S., Galardi F., Leo Di A. Significance of Micrometastases: Circulating Tumor Cells and Disseminated Tumor Cells in Early Breast Cancer. *Cancers*, 2010, 2, 1221-1235.

Oloomi M., Bouzari S., Mohagheghi M.-A., Khodayaran-Tehrani H. Molecular Markers in Peripheral Blood of Iranian Women with Breast Cancer. *Cancer Microenvironment*, 2013, 6, 109–116.

Osta W. A., Chen Y., Mikhitarian K., Mitas M., Salem M., Hannun Y. A., Cole D. J., Gillanders W. E. EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy. *Cancer Res*, 2004, 64, 5818-5824.

Owen E., Henderson K. (eds.). *PCR*. 2nd Edition. Abingdon: Taylor & Francis Group, 2006. ISBN 0-203-00267-9.

Petrovický P., Druga R., Seichert V. *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi III.: svazek neuroanatomie, smyslová ústrojí a kůže*. 1. Vydání. Martin: Osveta, 2002. ISBN 80-8063-048-8.

Petruželka L., Konopásek B., Aschermannová A., Helmichová E., Janků F., Kleibl Z., Mališ J., Mareš P., Novotný J., Příbylová O., Špička I., Tesařová P. *Klinická onkologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0395-0.

Reinholz M. M., Nibbe A., Jonart L. M., Kitzmann K., Suman V. J., Ingle J. N., Houghton R., Zehentner B., Roche P. C., Lingle W. L. Evaluation of a Panel of Tumor Markers for Molecular Detection of Circulating Cancer Cells in Women with Suspected Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11, 3722-3732.

Riethdorf S., Pantel K. Clinical relevance and current challenges of research on disseminating tumor cells in cancer patients. *Breast Cancer Research*, 2009, 11, S10.

Schmitt W., Gruliow R. (eds.). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 8th Edition. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010. ISBN 978-1-4160-3121-5.

Sigma-Aldrich. [online]. c2014, [cit. 2014-5-3]. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0901?lang=en®ion=CZ>>.

Silva A. L., Tomé M. J., Correia A. E., Passos-Coelho J. L. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Annals of Oncology*, 2002, 13, 422–429.

Solanki G., POLYMERASE CHAIN REACTION. *International Journal of Pharmacological Research*, 2012, 2.

Strati A., Kasimir-Bauer S., Markou A., Parisi C., Lianidou E. S. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2013, 15, R20.

Systém pro vizualizaci onkologických dat - Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Ver. 7.0, [cit. 2014-2-1]. <<http://www.svod.cz/report.php?diag=C50,D05>>.

Šimša J., Astl J., Hes O., Hoch J., Jarolím L., Klein J., Krajsová I., Křížová H., Mrzena L., Neoral Č., Rob L., Stárek I., Strnad P., Wald M. *Sentinelová uzlina: lymfadenektomie u solidních nádorů*. 1. Vydání. Praha: Maxdorf, 2010. ISBN 978-80-7345-213-1.

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. *Metody molekulární biologie*. 1. Vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

Thermo Fisher Scientific [online]. c2013, [cit. 2014-4-11]. <<http://www.thermoscientificbio.com/pcr-enzymes-master-mixes-and-reagents/thermo-start-taq-dna-polymerase/>>.

Tormey D. C., Waalkes T. P., Snyder J. J., Simon R. M. BIOLOGICAL MARKERS IN BREAST CARCINOMA: III. Clinical Correlations with Carcinoembryonic Antigen. *Cancer*, 1977, 39, 2397-2404.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [dokument ve formátu PDF]. c2010-2013, [cit. 2014-1-28]. <<http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>>.

Velden Van der VHJ., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 2003 17, 1013–1034.

Wang Z., Spaulding B., Sienko A., Liang Y., Li H., Nielsen G., Gong G. Y., Ro J. Y., Zhai Q. J. Mammaglobin, a Valuable Diagnostic Marker for Metastatic Breast Carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 2009, 2, 384-389.

Watson W. A., Darrow Ch., Zimonjic D. B., Popescu N. C., Fleming T. P. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to Chromosome 11q13. *Oncogene*, 1998, 16, 817-824.

Winer-Jones J. P., Vahidi B., Arquilevich N., Fang C., Ferguson S., Harkins D., Hill C., Klem E., Pagano P. C., Peasley Ch., Romero J., Shartle R., Vasko R. C., Strauss W. M., Dempsey P. W. Circulating Tumor Cells: Clinically Relevant Molecular Access Based on a Novel CTC Flow Cell. *PLoS ONE*, 2014, 9, e86717.

Zehentner B. K., Dillon D. C., Jiang Y., Xu J., Bennington A., Molesh D. A., Zhang X., Reed S. G., Persing D. H., Houghton R. L. Application of a Multigene RT-PCR assay for the detection of Mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem*, 2002, 48, 1225–1231.

Zehentner B. K., Persing D. H., Deme A., Toure P., Hawes S. E., Brooks L., Feng Q., Hayes D. C., Critchlow C. W., Houghton R. L., Kiviat N. B. Mammaglobin as a Novel Breast Cancer Biomarker: Multigene Reverse Transcription-PCR Assay and Sandwich ELISA. *Clinical Chemistry*, 2004, 50, 2069–2076.

Zhang W., Katerb A. P., Widhopf II G. F., Chuang H.-Y., Enzlerd T., James D. F., Poustovoitova M., Tsenge P.-H., Janzf S., Hohg C., Herschmanh H., Karina M., Kippsc T. J. B-cell activating factor and v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) influence progression of chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*, 2010, 107, 18956–18960.

Zimmermann W., Weber B., Ortlieb B., Rudert F., Schempp W., Fiebig H.-H., Shively J. E., Kleist von S., Thompson J. A. Chromosomal Localization of the Carcinoembryonic Antigen Gene Family and Differential Expression in Various Tumors. *CANCER RESEARCH*, 1988, 48, 2550-2554.

5 Seznam použitých zkratek

AC - adriamycin a cyklofosfamid

AC-T – adriamycin, cytoxan a taxol/taxotere

AMV - virus ptačí myeloblastózy (Avian Myeloblastosis Virus)

BHQ1 – zhášec (Black Hole Quencher 1)

BRCA 1 a 2 - gen karcinomu prsu (breast cancer gene)

CA-15-3 - nádorový antigen 15-3 (Cancer Antigen 15-3)

CD4 - leukocytární antigen (Cluster of Differentiation 45)

cDNA - komplementární DNA (Complementary Deoxyribonucleic Acid)

CEA – karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)

CKs – cytokeratiny

CMF – cyklofosfamid, metotrexát a 5-fluorouracil

CT – počítačová chromatografie (Computed Tomography)

CTCs – cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells)

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenylindol

DCIS – intraduktální karcinom *in situ* (Ductal Carcinoma *In Situ*)

DDE - dichlordifenyldichlorethen

DDT – dichlordifenyiltrichlorethan

DEPC - diethyl pyrokarbonát

DNA - deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs – deoxynukleotidtrifosfáty

dsDNA - dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (Double Stranded Deoxyribonucleic Acid)

DTCs – diseminované nádorové buňky (disseminated tumor cells)

DTPA - diethentriaminpentaacetát gadolinium

EC - epirubicin a cyklofosfamid

EGFR - receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)

EMT - epiteliálně-mezenchymální tranzice (epithelial-mesenchymal transition)

EpCAM – povrchově adhezní molekula (epithelial cell adhesion molecule)

ER – estrogenový receptor

FAC - 5-fluorouracil, adriamycin a cyklofosfamid

FAM - 6-carboxyfluorescein

FEC - 5-fluorouracil, epirubicin a cyklofosfamid

FRET - přenos energie fluorescenční resonancí (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Fw primer - levý primer (Forward Primer)

GAPDH - glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza

Her2 - lidský epidermální faktor (human epidermal growth factor receptor)

HEX – hexachlorofluorescein

HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

LCIS – lobulární karcinom *in situ* (Lobular Carcinoma *In Situ*)

LUX - Light Upon Extension

M – metastáze

MAM – mammaglobin

MET – mezenchymálně-epiteliální přeměna (mesenchymal-epithelial transition)

MGB - Minor groove-binding probes

M-MuLV - Moloneyho virus myší leukemie (Moloney Murine Leukemia Virus)

MRD – Minimální reziduální choroba (Minimal Residual Disease)

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleic Acid)

MUC 1 – mucin1

N – uzlina (node)

OPC - purifikační oligonukleotidová kazeta (Oligonucleotide Purification Cartridge)

p53 – gen pro nádorový protein 53

PCBs - polychlorované bifenyly

PCR - polymerase chain reaction

PR – progesteronový receptor

PTEN - fosfatázový a tenzinový homolog (phosphatase and tensin homolog)

qPCR - kvantitativní, v reálném čase PCR (qPCR, real-time PCR)

Rev primer - pravý primer (Reverse primer)

RFS – přežití bez relapsu (relapse-free survival)

RNA - ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)

RTG – rentgenové záření

RT-PCR – reverzně transkriptázová PCR (reverse transcription PCR)

T – tumor

TAMRA - 5-karboxytetrametylrodamin

Taq – *Thermus aquaticus*