

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie



Jakub ONDROUCH

**Profilování exprese miRNA u onemocnění jícnu**

*Bakalářská práce*

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Olomouc 2013

„Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Olomouci dne

.....  
podpis

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat zejména MUDr. Josefu Srovnalovi Ph.D za ochotu a čas věnovaný řešení mé bakalářské práce, dále Mgr. Andree Benedíkové a Bc. Michaele Sedláčkové za dozor a pomoc při práci v laboratoři, a dále celému kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny za poskytnutí zázemí pro řešení úkolů spojených s mou prací. Děkuji.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Jakub Ondrouch
Název práce:	Profilování exprese miRNA u onemocnění jícnu
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny
Školitel:	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2013
Abstrakt:	Mezi nejčastější nádorové onemocnění jícnu patří adenokarcinom a dlaždicobuněčný karcinom. Obě tyto onemocnění mají velice špatnou prognózu. I po léčbě se pětileté přežití pohybuje pod 20 %. Cílem současné medicíny je nalézt vhodnou metodu pro včasnou a přesnou diagnózu s co nejmenším negativním dopadem na pacienta. Jako vhodnou se jeví profilování exprese miRNA. V této práci se využívá platforma Affymetrix, díky které jsme schopni stanovit expresní profil a porovnat ho s profily zdravých pacientů.
Klíčová slova:	miRNA, jícen, adenokarcinom, dlaždicobuněčný karcinom, microarray, Barrettův jícen, gastroesofagální reflux
Počet stran:	43
Počet příloh:	5
Jazyk:	čeština

## **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname:	Jakub Ondrouch
Title:	MiRNA expresion profilig in oesophageal disease
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Institute of Molecular and Translational Research
Advisor:	Josef Srovnal, MD, PhD
The year of presentation:	2013
Abstract:	Adenocarcinoma and spinocelular carcinoma belongs among most common oesophageal cancer. Both have very bad prognosis. The five-years survival rate is below 20 %. Currently, medicine has focused to find appropriate method for quick and less invasive diagnosis. As the most suitable seems miRNA expression profilig, using Affymetrix platform, thanks to which we are able to compare patient profile with fit subject.
Keywords:	miRNA, esophagus, adenocarcinoma, spinocellular carcinoma, microarray, Barrett's esophagus, gastroesophageal reflux
Number of pages:	43
Number of appendixes:	5
Language:	Czech

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíle práce .....	9
3. Teoretická část .....	10
3.1. Úloha miRNA .....	10
3.2. Onemocnění jícnu a jejich klasifikace .....	11
3.2.1 Barrettův jícen.....	11
3.2.2 Adenokarcinom jícnu .....	12
3.2.3 Dlaždicobuněčný karcinom jícnu.....	13
3.2.4 Stádia onemocnění .....	13
3.3. Histopatologie .....	15
3.4. Incidence .....	16
3.5. Etiologie.....	18
3.6. Klinický obraz.....	19
3.7. Diagnóza .....	19
3.8. Léčba.....	20
3.8.1. Chirurgie .....	21
3.8.2. Radioterapie .....	21
3.8.3. Chemoterapie .....	21
3.8.4. Odpověď na léčbu .....	21
4. Praktická část .....	23
4.1. Izolace miRNA .....	23
4.2. Použité metody.....	23
4.2.1. miRNeasy mini kit – Qiagen.....	24
4.2.2. High pure miRNA isolation kit – Roche.....	25
4.2.3. NucleoSpin® miRNA - Macherey-Nagel .....	26
4.2.4. mirVana™ miRNA isolation kit – Ambion .....	28
4.3. Hodnocení kvality a kvantifikace RNA .....	29
5. Výsledky .....	31

5.1. Porovnání ceny a použitelnosti kitů .....	35
6. Diskuze.....	36
7. Závěr .....	38
8. Seznam zkratek .....	39
9. Seznam použité literatury.....	40
10. Přílohy .....	44

# 1. Úvod

K volbě tématu mé bakalářské práce a volbě pracoviště mě vedl jednak můj zájem o spojení chemie, biologie a medicíny a také fakt, že rakovinové onemocnění jako takové, ať už solidní nádory plic, nebo solidní nádory tlustého střeva či jiné jsou jedním z nejrozšířenějších a nejprogresivněji se vyvíjejícím zdravotním problémem v celé populaci. Pro práci jsem si zvolil onemocnění jícnu, protože se jedná o velmi závažnou chorobu. Svou práci se snažím přehledně rozdělit do dvou celků. Na teoretickou část, ve které se snažím popsat a charakterizovat jednotlivé typy onemocnění a problémy s nimi spojené, jejich výskyt, příčiny a současně používanou léčbu. Ve druhé, teoretické, části jsem provedl optimalizaci metod izolace RNA a porovnání jednotlivých kitů, které jsem použil. V práci bych rád pokračoval a dále ji rozvíjel

Karcinom jícnu patří v současné době k osmému nejrozšířenějšímu nádorovému onemocnění na světě (Globocan, 2008), postihujícím především muže. Mezi nejrizikovější faktory, jak je tomu u většiny solidních nádorů, patří věk, ale i kouření a špatná životospráva. Ve své podstatě vznikají nádory jícnu z epitelální tkáň, označujeme je tedy jako karcinom. Z histologického hlediska můžeme karcinom rozdělit na dva typy, a to na adenokarcinom dolní části jícnu (EAC – esophageal adenocarcinoma) a dlaždicobuněčný karcinom (ESCC – esophageal squamous cell carcinoma). Obě onemocnění provází dlouhé bezpříznakové období, pacient tudíž přichází do ordinace až s pokročilým stádiem onemocnění. Pětileté přežití se i po komplexní protinádorové léčbě pohybuje pod 20 %. Neoadjuvantní léčba může pacienta vyléčit, zlepšit kvalitu života a pacientovy polykací funkce zmenšením nádoru, prodloužit délku života, ale hlavně umožnit operovatelnou respektive radikalitu chirurgického zákroku. Bez operace je v současnosti šance na vyléčení minimální. V současné době neexistuje žádná metoda, která by spolehlivě určila, jak bude pacient na léčbu reagovat. Studium miRNA nám poskytuje velice cenné údaje o dění v nádorové buňce. Cílem studie je na základě profilu exprese miRNA nalézt biomarkery, které by predikovaly odpověď na tuto neoadjuvantní terapii u pacientů s karcinomem jícnu. U části pacientů s predikcí dobré odpovědi by se mohla terapie zintenzifikovat s cílem kompletní remise nádoru. U skupiny pacientů s predikcí rezistentního onemocnění by tato toxická léčba s častými nežádoucími účinky a malým benefitem pro pacienta nemusela být podána.

Metoda miRNA microarray nám poskytuje ucelený expresní profil miRNA každého pacienta, podle kterého jsme schopni zpřesnit jeho diagnózu a určit vhodnou a cílenou léčbu.



## 2. Cíle práce

- a) Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice profilování exprese miRNA u pacientů s onemocněním jícnu, získat teoretické a praktické znalosti technologie miRNA microarrays, naučit se pracovat s příslušnými databázemi a softwarem
- b) Zoptimalizovat metodiky izolace miRNA z archivovaného i čerstvého materiálu (FFPE, plazma, kartáčekový stěr), práce s platformou Affymetrix
- c) Stanovit profily miRNA exprese u pacientů s onemocněním jícnu

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Úloha miRNA

MikroRNA představuje krátký úsek nekódující RNA čítající okolo 23 nukleotidů. Tyto miRNA jsou schopné na základě komplementarity interagovat s molekulou mRNA a regulovat tak genovou expresi. Odhaduje se, že miRNA regulují expresi až 60 % všech protein-kódujících genů v organismu nezbytných pro správný průběh buněčného cyklu, proliferaci buňky, apoptózu a správný metabolismus (Friedman RC et al., 2009).

MiRNA hraje u všech nádorů důležitou roli, a to jako tumor-supresor nebo onkogen tzv. tumor-supresorové a onkogenní miRNA. Mapováním hladin některých vybraných miRNA je možné rozdělit pacienty do konkrétních skupin, ať se již jedná o odpověď na zvolenou léčbu, nebo rizikovost výskytu onemocnění u pacienta. Pokud bychom byli schopni jakýmkoliv způsobem regulovat hladiny miRNA specifických pro určitý typ nádoru, ať už se jedná o jakýkoliv, měli bychom bezpochyby v rukou také účinnou léčbu.

**Tabulka 1. Vybrané miRNA a jejich regulace ve vztahu k onemocnění (Převzato od Lužná, Ehrmann 2012)**

Dg.	MikroRNA	Regulace	Korelace	Tkáň	Literatura
ESCC	miR-103	↑	ESCC vs. NSE	T	Guo et al. [19]
	miR-21			T, CC	Hiyoshi et al. [21]
	miR-21			T, CC	Mori et al. [23]
	miR-129			T	Ogawa et al. [20]
	miR-205			T, CC	Matsushima et al. [17]
	miR-10a, miR-22, miR-100, miR-148b, miR-223, miR-133a, miR-127-3p			S	Zhang et al. [38]
	miR-21			T	Akagi et al. [27]
	miR-31			T, S	Zhang et al. [61]
	miR-145			T	Akagi et al. [27]
	miR-21			P	Komatsu et al. [39]
	miR-92a			T, CC	Chen et al. [57]
	miR-21			S	Kurashige et al. [58]
	miR-142-3p			T	Lin et al. [25]
	miR-223			T, CC	Kurashige et al. [40]
	miR-107			T	Guo et al. [19]
	miR-10a			T, CC	Matsushima et al. [17]
	miR-145, miR-133a, miR-133b			T, CC	Kano et al. [54]
	miR-375			P	Komatsu et al. [39]
	miR-29c			CC	Ding et al. [53]
miR-375	T	Kong et al. [55]			
EAC	miR-196a	↑	EAC vs. NSE	T, CC	Luthra et al. [60]
	polycistron miR-106b-25		EAC vs. BE	T	Kan et Meltzer [16]
	miR-196a		EAC vs. NSE, EAC vs. BE	T	Maru et al. [31]
	miR-21, miR-143, miR-145, miR-194, miR-215		BE, EAC vs. NSE	T	Wijnhoven et al. [18]
	miR-215, miR-560, miR-615-3p, miR-192, miR-326, miR-147		EAC vs. NSE, EAC vs. BE	T	Fassan et al. [33]
	miR-143, 145, 215		EAC vs. BE	T	Wijnhoven et al. [18]
	miR-203, 205		NSE vs. BE	T	Wijnhoven et al. [18]
	miR-141, miR-200c		BE vs. GE, BE vs. DE	T, CC	Smith et al. [56]
	rodina miR-200		HGD vs. BE	T, CC	Smith et al. [56]
	miR-100, miR-23a, miR-605, miR-99a, miR-205, let-7c, miR-203		EAC vs. NSE, EAC vs. BE	T	Fassan et al. [33]

BE – Barrettův jícn, CC – buněčná kultura, DE – duodenální epitel, EAC – ezofageální adenokarcinom, GE – žaludeční epitel, HG – high grade dysplazie (intraepiteliální neoplazie), miR – mikroRNA, NSE – normální dlaždicobuněčný epitel, P – krevní plazma, S – krevní sérum, T – tkáň

## 3.2. Onemocnění jícnu a jejich klasifikace

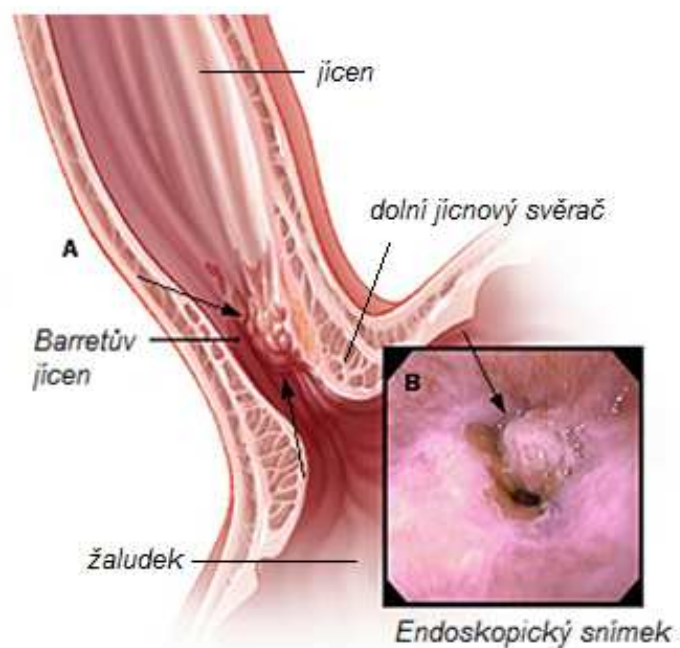
Jícen postihují nádorová i nenádorová onemocnění. Nenádorová mohou být jak vrozená, například atrézie (jícen je neprůchodný, nebo je pístělí spojen s průdušnicí) nebo stenóza (zúžení jícnu), tak získaná, mezi něž patří záněty jícnu, divertikly (vychlípeniny stěny jícnu), hiátová hernie (kýla, při níž se část žaludku dostává do hrudní dutiny), jícnové varixy (způsobené poškozením či poleptáním jícnu či jinou závažnou chorobou, např. jaterní cirhózou), achalazie (dochází k poruše peristaltiky) a difúzní spasmus jícnu (ztráta motility). Podle biologického chování můžeme nádory rozdělit na maligní (tvořící metastázy, rychle rostoucí a destruktivní vůči okolí – adenokarcinomy a dlaždicobuněčné karcinomy), benigní (netvoří metastázy, expanzivní, ale ohraničený a nedestruktivní) a prekancerózní léze (Barrettův jícen). Anatomicky dělíme nádory jícnu na tumory krčního oddílu, hrudního oddílu (horní, střední, dolní) a gastroesofageální junkce.

Velice častým onemocněním je GERD (Gastroesophageal reflux disease) čili gastroesofageální refluxní onemocnění jícnu, při kterém pronikají kyselé žaludeční šťávy do jícnu a poškozují jeho sliznici, což je příčinou zánětu jícnu, tzv. ezofagitidy.

### 3.2.1 Barrettův jícen

Barrettův jícen je název pro prekancerózu vznikající metaplazií dlaždicobuněčného epitelu v cylindrický epitel. Primární příčinou Barrettova jícnu je gastroesofageální refluxní choroba (GERD), způsobená částečným uvolněním dolního jícnového svěrače nebo hiátovou kýlou. Chronické pronikání obsahu žaludku a vystavení dlaždicobuněčného epitelu kyselým žaludečním šťávám vede k jeho poškození a metaplazii v cylindrický epitel, který je vůči kyselému prostředí odolnější. Podle progresu onemocnění se zavádí označení low-grade a high-grade intraepiteliální neoplazie (Schlemper et al., 2001). U 0,5 % pacientů za rok progreduje Barrettův jícen v adenokarcinom což je 1 pacient z 200, u pacientů s diagnostikovanou high-grade neoplazií je toto číslo dokonce vyšší, 10 % pacientů ročně (Shaheen et al., 2009, Koppert et al., 2005). Výrazným symptomem Barrettova jícnu je „pálení žáhy“ (pyróza), ale velice často pacient nepocítuje žádné příznaky (Shaheen et al., 2009). Dalšími mohou být například říhání, epigastrické bolesti, krvácení, ztráta hmotnosti, dysfagie (Kala et al., 2003).

U Barrettova jícnu bylo zjištěno zvýšení exprese miR-196a ve srovnání se zdravou tkání a pozitivní korelace její hladiny s progresí onemocnění (Lužná et al., 2011). Oproti tomu byla zjištěna snížená hladina miR-203, která se jeví jako anti-metastatickou a je uvažována jako cíl případné terapie (Saini et al., 2011). Na obrázku 1A je znázorněna lokalizace Barrettova jícnu a na obrázku 1B je endoskopický snímek, na kterém je metaplazie velice dobře patrná.



**Obrázek 1A. Průřez Barretovým jícnem (šipky ukazují místa zasažená metaplazií)  
1B. Endoskopický snímek Barretova jícnu (převzato z hopkins-gi.org)**

### 3.2.2 Adenokarcinom jícnu

Adenokarcinomy napodobují stavbu a vzhled žláz, ze kterých vycházejí. U jícnu vzniká maligním transformací metaplastického epitelu jako důsledek GERD a tvoří 10 % všech případů nádorů jícnu na světě (Global Cancer Facts & Figures, 2011). Karcinom je tedy lokalizován v dolní třetině jícnu. U 80 % pacientů postižených adenokarcinomem je pozorována metaplazie.

Exofyticky rostoucí nádory zasahují výrazně nad povrch sliznice a vytváří polypózní nebo tubulární útvar, kromě sliznice postihují i podslizniční vazivo (submukózu) a muscularis propriae. Endofyticky rostoucí nádory naopak prorůstají stěnou sliznice, kdy v pokročilejším stádiu růstu dochází k ulceraci a tvorbě plochého vředu, někdy s mírně prohloubeným středem. Centra větších solidních ložisek bývají v důsledku špatného zásobení krví a rychlého růstu zasažena nekrózou. Buňky jsou často deformované tlakem okolí a ztrácí polaritu. Pokud u karcinomu dochází ke zvýšení sekrece hlenu do mezibuněčných prostor, mluvíme o mucinózním karcinomu, jehož buňky plavou v hlenu a často ztrácejí původní tvar. Oproti tomu sekrece hlenu u hlenotvorného karcinomu je směřována do cysticky rozšířených tubulárních útvarů vystlaných epitelem bez volně plovoucích buněk (Rejthar, Vojtěšek, 2002).

Podobně jako u Barrettova jícnu byla popsána zvýšená exprese miR-21a miR-192 a snížená exprese miR-203 (Fassan M, Volinia S et al., 2011, Mathé et al., 2009). Značné expresní rozdíly byly identifikovány pouze mezi high-grade dysplazií a adenokarcinomem (Yanga et al., 2009).

### 3.2.3 Dlaždicobuněčný karcinom jícnu

Tento typ karcinomu je nejrozšířenějším typem. Tvoří kolem 90 % případů všech karcinomů jícnu ve světě (Global Cancer Facts & Figures, 2011). Oproti adenokarcinomu nevykazuje dlaždicobuněčný karcinom v brzkých stádiích žádné výraznější příznaky. Pacient přichází do ordinace až s pozdějším stádiem doprovázeným úbytkem na váze a problémy s polykáním. ESCC se ve většině případů vyskytuje ve střední a horní třetině jícnu a vniká malignizací dlaždicobuněčného epitelu. Buňky epiteliálních nádorů jsou poměrně velké a dobře rozlišitelné od buněk nenádorových. Často si zachovávají vlastnosti původního epitelu, a to hlavně tigmotaxi. Stejně tak i dlaždicobuněčný karcinom napodobuje stavbu vrstevnatého dlaždicového epitelu a je složen z větších buněk s výrazným jádrem. V pozdějších stádiích dochází k rohování nádoru. Lze říci, že kromě *ca in situ*, čím nižší je diferenciace buněk, čím méně je vyznačeno rohování a čím méně je vyjádřena stratifikace vrstevnatého dlaždicového epitelu, tím je dlaždicobuněčný karcinom méně diferenciován a současně i více proliferující a malignější (Rejthar, Vojtěšek, 2002). Karcinom roste opět buď exofyticky, nebo endofyticky a jeho povrch bývá v pozdějších stádiích ulcerován.

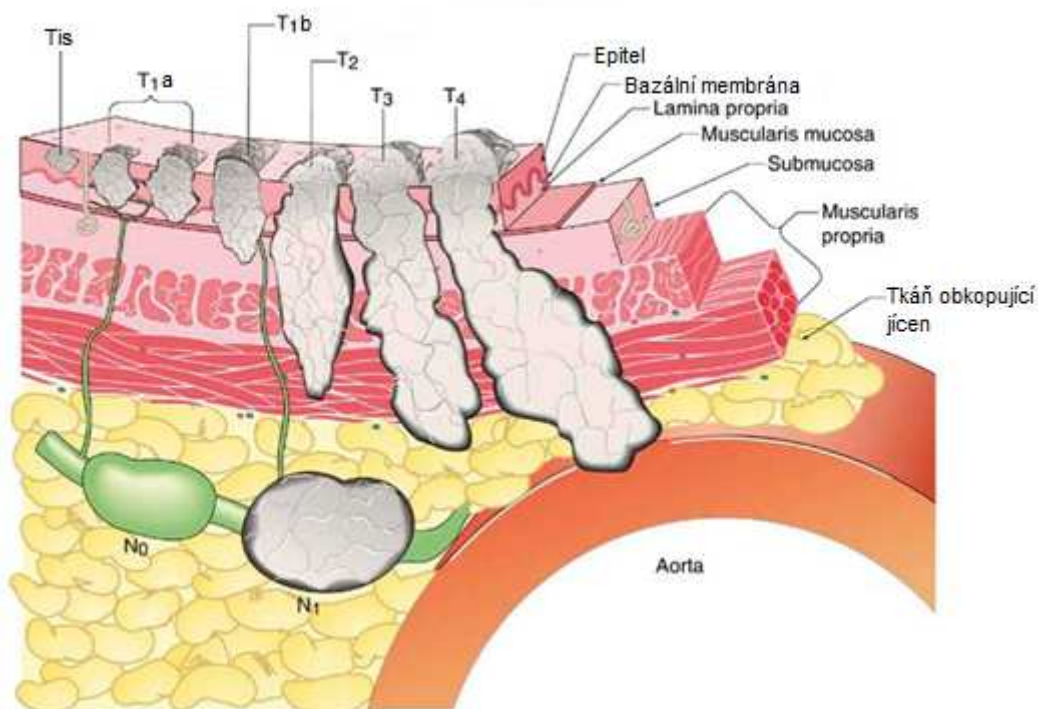
Jako u jiných solidních hraje i u ESCC důležitou roli v kancerogenezi miR-21. Bylo zjištěno, že hladina miR-21 koreluje s progresí onemocnění (Hyiohi et al., 2009). Jako nezávislý prognostický faktor se ukazuje miR-129 (Ogawa et al., 2009). Středem zájmu je ještě několik dalších miRNA, ale doposud neproběhly studie, který by dokázaly a hlavně potvrdily korelaci jejich hladiny s progresí onemocnění.

### 3.2.4 Stádia onemocnění

Pro klasifikaci onemocnění je v současnosti nejpoužívanější systém TNM, který nám pomáhá určit jedno z celkových čtyř stádií onemocnění. TNM se zaměřuje na tyto faktory: T-grese primárního nádoru, N-metastázy v regionálních mízních uzlinách a M-vzdálené metastázy. Jednotlivé kategorie se dále dělí na další stupně. U primárního nádoru hodnotíme jeho prorůstání tkání až invazi do dalších orgánů. Dále hodnotíme počet zasažených regionálních lymfatických uzlin. Jednotlivé třídy a podtřídy klasifikace jsou popsány v následující tabulce.

Tabulka 2. TNM klinická klasifikace karcinomu jícnu

<b>T-míra invaze primární nádor</b>		<b>N-postižení regionálních lymfatických uzlin</b>	
TX	nelze hodnotit	NX	nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru	N0	mízní uzliny bez metastáz
Tis	Karcinom in situ/high-grade dysplazie	N1	metastáza v 1-2 uzlinách
T1a	lamina propria mucosae, muscularis mucosae	N2	metastáza v 3-6 uzlinách
T1b	submukóza	N3	metastáza v 7 a více uzlinách
T2	muscularis propria	<b>M-vzdálené metastázy</b>	
T3	adventicie	MX	nelze hodnotit
T4a	pleura, perikard bránice	M0	bez metastáz
T4b	aorta, tělo obratle, trachea a jiné	M1	vzdálené metastázy



Obrázek 2. Míra invaze karcinomu jícnu (převzato a upraveno podle Ishwaran et al, 2009).

Z TNM klasifikace vycházíme při určování stádia onemocnění. Obecně platí, že nádory lokalizované v místě původu bez metastáz řadíme do kategorie I a II. Pokročilejší, metastazující nádory do kategorie III a nádory v pokročilém stádiu se vzdálenými metastázemi do kategorie IV, viz následující tabulka.

**Tabulka 3. Stádia karcinomu jícnu určená podle TNM klasifikace**

<b>Stádium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T1, T2	N1	M0
<b>IIIA</b>	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T1, T2	N2	M0
<b>IIIB</b>	T3	N2	M0
<b>IIIC</b>	T4a	N1,N2	M0
	T4b	jakékoliv N	M0
	jakékoliv T	N3	M0
<b>IV</b>	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

### 3.3. Histopatologie

Dlaždicobuněčný karcinom je definovaný jako maligní epiteliální tumor s dlaždicobuněčnou diferenciací. Nádorový dlaždicobuněčný epitel proniká bazální membránou a šíří se do lamina propria anebo do hlubších vrstev tkáně. Začíná invazí z karcinomu in situ a proliferací neoplastického epitelu, který proniká do lamina propria a následně disociuje do malých shluků nádorových buněk. Současně s vertikální invazí probíhá i horizontální růst, který utlačuje a poškozují epitelální sliznici přilehlou ke karcinomu. Karcinom napadá také lymfatické cévy a uzliny, a to už v brzkém stádiu onemocnění. Četnost výskytu napadení se zvyšuje s hloubkou invaze karcinomu (Sarbia et al., 1995). Nádorové buňky se v krevním řečišti a lymfatických cévách vyskytují do vzdálenosti několika centimetrů. Karcinom postihuje přilehlé orgány a tkáně, hlavně průdušnici a průdušky. ESCC vykazuje dva typy růstu expanzivní nebo infiltrativní. Expanzivní růst je charakteristický rozsáhlou hladkou expanzí nádorových buněk bez disociace. Infiltrativní růst je velice nepravidelný a vykazuje disociaci tumorových buněk (Hamilton S. R., 2000). Z histopatologického hlediska známe tři formy dlaždicobuněčného karcinomu, a to ulcerózní forma která tvoří 25 % výskytu, infiltrativní forma s 15 % výskytu a cirkulární stenózující forma se 60 % výskytu (Beckeretal, 2005). Prekuzory ESCC jsou intraepiteliální neoplázie, hyperplazie bazálních buněk a dlaždicobuněčný papilom, většinou způsobený HPV (Hamilton, 2000).

Adenokarcinom vzniká většinou z Barrettova jícnu a je tubulárního nebo papilárního typu. V některých případech se vyskytuje zmenšený typ vykazující glandulární uspořádání (Paraf et al., 1995). Diferenciace může vést k produkci endokrinních buněk a dlaždicobuněčného epitelu. Dalšími variantami adenokarcinomu jsou adenodlaždicobuněčný

karcinom, mukoepidermoidní karcinom, adenoidní cystický karcinom a mucinózní adenokarcinom (Hamilton, 2000).

### 3.4. Incidence

Míra incidence karcinomu jícnu je u mužů 2–4 krát větší než u žen, ale u obou pohlaví je trend výskytu velice podobný. Dlaždicobuněčný karcinom jícnu je v současnosti nejrozšířenější nádorové epiteliální onemocnění jícnu na světě. V posledních letech je však zaznamenán stále se zvyšující výskyt adenokarcinomu. Shodně ve vyspělých i rozvojových zemích postihuje karcinom jícnu převážně muže s mediánem 65 let. Jen ojediněle se vyskytuje u jedinců mladších 30 let (Hamilton, 2000). Rozložení případů napříč populací s ohledem na věk má vzestupný trend korelující se stářím pacientů, můžeme tedy říct, že počet případů a rizikovost výskytu roste s věkem. Nejpočetnější skupinu pacientů tvoří osoby mezi 55. a 65. rokem života.

Míra incidence se mezi zeměmi s nejmenším počtem případů na 100 000 obyvatel a zeměmi s nejvyšším počtem případů na 100 000 obyvatel velmi liší. Nejvíce jsou postiženy země jižní a východní Afriky a středovýchodní Asie. Ve vyspělých zemích je výskyt spíše nižší. Česká republika je v tomto ohledu na 87. příčce (obrázek 3). 80 % všech úmrtí spojených s karcinomem jícnu pochází z rozvojových zemí. (Global Cancer Facts & Figures, 2011) Karcinom jícnu je osmé nejčastější nádorové onemocnění ve světě a tvoří celé 4 % všech nádorových onemocnění vůbec. Současně je to šestá nejčastější příčina úmrtí na rakovinu (Globocan, 2008).

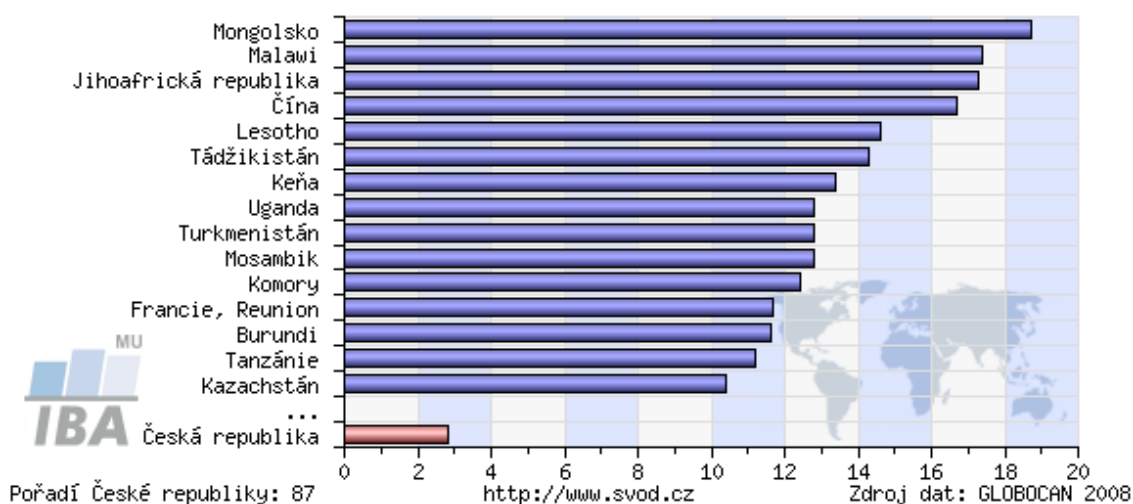
Největší standardizovanou incidenci na 100 000 obyvatel má v mužské populaci Jihoafrická republika, a to 23,5 případu. V ženské populaci drží prvenství Mongolsko s 16,1 případu. Spolu s těmito zeměmi nají vysokou míru výskytu karcinomu jícnu v přepočtu na 100 000 obyvatel i další země v těchto oblastech jako Čína, Kazachstán, Japonsko, Afghánistán, Keňa, Mosambik, Zambie, Zimbabwe a Somálsko. Nejmenší výskyt je potom zaznamenaný v zemích západní a střední Afriky (Globocan, 2008).

V Evropě drží prvenství v incidenci i mortalitě v mužské populaci Velká Británie s hodnotou incidence 15 případů a mortalitou 13 případů na 100 000 obyvatel. V ženské populaci má nejvyšší hodnoty incidence Irsko – 5,6 případu a mortality Velká Británie – 4 případy na 100 000 obyvatel (Globocan, 2008).



### C15 - Jícen

srovnání incidence v ČR s ostatními zeměmi světa, ASR - světový standard

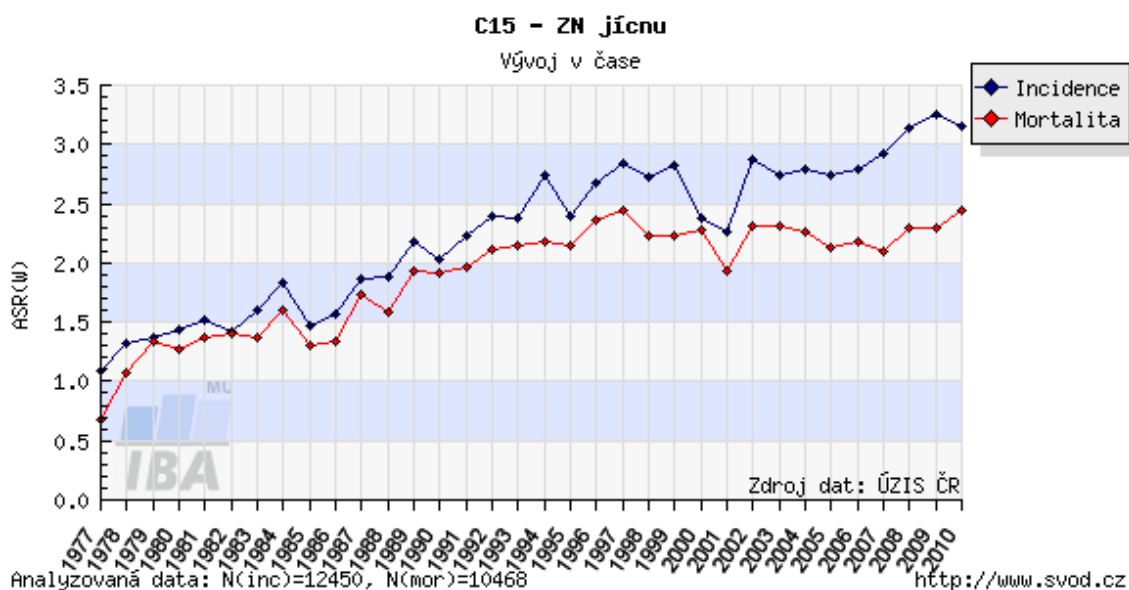


Obrázek 3. Srovnání incidence v ČR a ostatních zemích (zdroj: www.svod.cz)

Nejvíce případů je v České Republice zaznamenáno v Moravskoslezském a Zlínském kraji. Při interpretaci těchto dat je nutné brát v úvahu, že rizikovost regionálního výskytu je ovlivněna mnohými faktory a samotným demografickým složením populace v daném kraji. Obecněji je vyšší incidence v krajích s rozvinutější průmyslovou výrobou a horší kvalitou životního prostředí.

Z údajů ve statistické databázi SVOD vyplývá, že výskyt karcinomu jícnu je rok od roku vyšší. Celkově tvoří se svou incidencí 4 případy na 100 000 obyvatel ročně 0,7 % ze všech zhoubných nádorů. Data také ukazují, že incidence u mužů je 6 krát vyšší než u žen. Ročně zaznamenáváme 6 nových případů na 100 000 obyvatel mezi muži se 4 případy úmrtí. U žen je to potom jeden případ s mortalitou 0,6 na 100 000 obyvatel.

Mortalita dosahuje 90 % hodnoty incidence ať už v celosvětovém měřítku, nebo v rámci České republiky (Kollarova et al., 2007).



**Obrazek 4. Srovnání incidence a mortality mezi lety 1977 – 2010 (zdroj: [www.svod.cz](http://www.svod.cz))**

### 3.5. Etiologie

Mezi nejrizikovější faktory dlaždicobuněčného karcinomu patří kouření a pití alkoholu. Za karcinogenní metabolit odbourávání alkoholu je považován acetaldehyd. Toto tvrzení je podporováno spojitostí mezi četností výskytu dlaždicobuněčného karcinomu a polymorfismem genu ALDH2 kódujícího alkoholdehydrogenázu u alkoholiků (Hamilton S. R., 2000). Dalším výrazným rizikovým faktorem je způsob stravování. Nedostatek vitamínů a stopových prvků, chronická konzumace horkých nápojů a kořeněných jídel nebo nedostatek vlákniny mohou vést k poranění jícnu teplem a chronické esofagitidě a prekancerózním lézím (Hamilton S. R., 2000). Dietní a environmentální faktory jsou méně významné než kouření a konzumace alkoholu, nejsou však zcela zanedbatelné. Dlaždicobuněčný karcinom může být rovněž způsoben infekcí papilomaviry, nejčastěji HPV 16, které působí spolu s kouřením a alkoholismem synergicky. (Laco J., 2012)

U adenokarcinomu je nejvýznamnějším rizikovým faktorem GERD a obezita (Enzinger, 2003). Nejrizikovější faktory karcinomu jícnu shrnuje následující tabulka.

**Tabuka 4. Rizikové faktory karcinomu jícnu. Počet znaků „+“ udává míru rizikovosti (upravené podle Enzinger, M.D., 2003)**

<b>rizikový faktor</b>	<b>dlaždicobunečný karcinom</b>	<b>adenokarcinom</b>
kouření	+++	++
pití alkoholu	+++	—
Barrettův jícen	—	++++
reflux	—	+++
obezita	—	++
achalázie	+++	—
Palmoplantární keratoderma	++++	—
Poleptání jícnu	++++	—
Plummer-Vinsonův syndrom	++++	—
nádorové onemocnění hlavy a krku v minulosti	++++	—
nádor prsu léčený radioterapií	+++	+++
častá konzumace velmi teplých nápojů	+	—

Jako protektivní faktory působí dostatečný přísun ovoce a zeleniny ve stravě, dostatek vitamínů (především A, C, E), selenu, karotenoidů, vlákniny a omezení dalších negativních dietních vlivů.

### **3.6. Klinický obraz**

Prvotní stádia karcinomů jícnu nejsou doprovázena výraznějšími příznaky, přičemž včasná diagnóza je důležitým faktorem pro přežití pacienta. V pozdějších stádiích se objevuje dysfagie a úbytek na váze až u 90 % pacientů, doprovázená bolestmi při polykání tuhé potravy, v pokročilých stádiích i problémy s polykáním tekutin. Pokud úbytek váhy představuje více než 10 % tělesné hmotnosti, pak se téměř jistě jedná o pokročilé stádium onemocnění se špatnou prognózou. Pokud nádor prorůstá do cév, může docházet i ke zvracení krve. Při invazi do průdušek se objevuje krvavý kašel.

Dysfagie se může zhoršit i v průběhu radiologické léčby, kdy dochází k otoku tkáně. Další komplikací jsou perforace jícnu způsobené buď progresí onemocnění, nebo endoskopickým vyšetřením či snahou o zavedení stentu pro dysfagii (Klener, 2002).

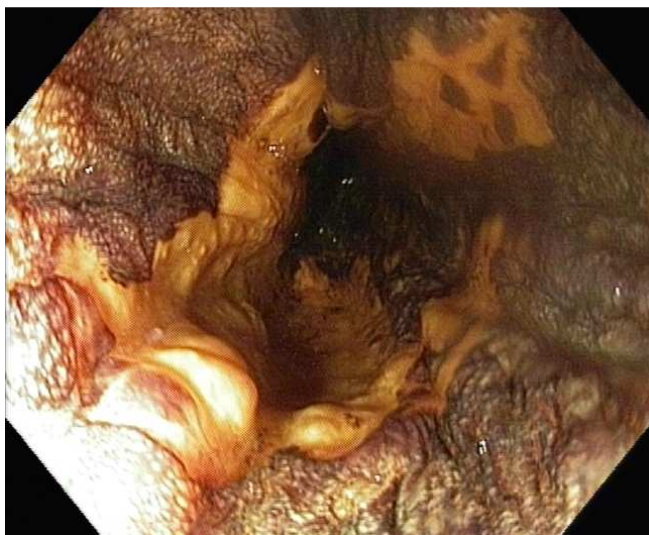
### **3.7. Diagnóza**

Předoperační diagnóza slouží k prokázání a určení stádia nádoru, k posouzení operability a vyloučení sekundárních nádorů. Právě správné určení stádia nádoru je nejdůležitějším prognostickým parametrem. Diagnóza sestává z kombinace endoskopického

vyšetření a biopsie, RTG a CT, popřípadě endosonografie. Zároveň jsou odebrány vzorky pro další laboratorní vyšetření a popřípadě pro archivaci pro pozdější ověření nebo výzkum.

Primárně je pacientovi odebrána krev pro laboratorní biochemické vyšetření krve, vyšetření krevního obrazu, funkce jater a ledvin a stanovení nádorových markerů. Nejčastěji stanovovaným markerem je CEA (carcinoembryonic antigen) a SCC (Squamous cell carcinoma antigen), jejich předoperační hladiny mají význam pro posouzení léčebné odpovědi.

Běžnou vyšetřovací metodou je endoskopické vyšetření, které nám poskytne základní data o lokalizaci a rozsahu nádoru, umožní nám přesně posoudit stav sliznice a provést biopsii pro histologické vyšetření, popřípadě jiné výzkumné metody. Teprve tímto postupem můžeme s určitostí stanovit přítomnost nádoru.



**Obrázek 5. Endoskopický snímek jícnu po obarvení kontrastní látkou (Lugolův roztok) (zdroj: [www.wikiskripta.eu](http://www.wikiskripta.eu))**

Další diagnostickou metodou je rentgenové vyšetření jícnu, které nám po vypití kontrastní látky ukáže na nerovnosti sliznice. Díky endosonografii a CT jsme schopni diagnostikovat i procesy odehrávající se mimo stěnu jícnu a odhalit hloubku invaze nádoru. Endosonografie využívá zavedení ultrazvukové sondy do jícnu a umožňuje nám tím posoudit stav stěny jícnu v celé své šíři. CT hrudníku a břicha nám díky sérií řezů může odhalit napadení dalších orgánů a uzlin a vzdálené metastázy.

### **3.8. Léčba**

Po nejnnutnějších vyšetřeních se posoudí operabilita nádoru a zvolí se vhodný typ terapie v závislosti na stavu pacienta, lokalizaci, klinickém stádiu a typem nádoru.

### **3.8.1. Chirurgie**

Provedení kompletní resekce karcinomu je možné pouze v I. a II. klinickém stádiu, kdy se jako náhrada odstraněné části jícnu používá část žaludku nebo střeva (Adam Z, Vorlíček J., 2002). Volí se jako první možnost terapie kromě pacientů s nádory lokalizovanými v krční části, u kterých je radikální zákrok technicky nemožný (Stahletal, 2010). Kvůli dlouhému bezpříznakovému období karcinomu je chirurgický zákrok možný v méně než 50 % případů a není vhodné ho odkládat (Kwee, 2010). Pokud je nádor neoperovatelný přistupuje se k paliativní léčbě, a to konkrétně k zavedení stentu do jícnu, který umožní pacientovi uspokojivě přijímat potravu (Klener, 2002).

### **3.8.2. Radioterapie**

Radioterapie využívá ničivých účinků ionizujícího záření na nádorové buňky. Účinná je zejména na dlaždicobuněčný karcinom. Využívá se v konkomitantní neoadjuvantní chemoterapii ke zmenšení nádoru a zvýšení šance na kompletní resekci nádoru. Vzhledem ke komplikacím vyplývajícím z použití radioterapie a jejím ne příliš uspokojivým výsledkům není tato metoda vhodná pro každého pacienta. Velice často se využívá radioterapie v kombinaci s chemoterapií využívající deriváty cis-platiny a 5-fluoruracilu. Tato terapie vede k nárůstu počtu pacientů s dobou přežití delší než pět let o 25 % (Enzinger, 2003).

### **3.8.3. Chemoterapie**

Pro výsledek chemoterapie je důležitý výběr vhodného cytostatika nebo jejich kombinace, které působí cíleně na nádorové a všechny rychle proliferující buňky v těle. Chemoterapie je základní léčebnou modalitou pro pokročilá klinická stádia. Léčba probíhá v cyklech, kdy je pacient střídavě léčen a kdy je tělu dán čas na částečnou regeneraci zdravých nenádorových buněk ovlivněných cytostatiky, tedy sliznic a krevetvorby. Jednotlivé cykly trvají 2–4 týdny a volí se tak, aby cytostatika účinkovala v určité míře i mezi jednotlivými podáními a pacient tak byl léčen v podstatě neustále. Chemoterapie se využívá rovněž jako neoadjuvantní metoda léčby pro umožnění operability nádoru a případně prodloužení bezpříznakového období. Paliativní požití chemoterapie pro prodloužení bezpříznakového období a zkvalitnění života pacienta má účinnost necelých 20 % (Klener 2002).

### **3.8.4. Odpověď na léčbu**

V roce 2000 došlo ke sjednocení a zpřesnění kritérií k hodnocení léčebné odpovědi pro solidní tumory (RECIST – response evaluation criteria in solid tumors). Byla převzata a upravena původní kritéria WHO, definovány podmínky, za jakých je nádor měřitelný a jakými metodami jej lze klasifikovat a bylo také přesně určeno, jak nádor hodnotit. Tyto kritéria jsou v současnosti nejrozšířenější a nejpoužívanější mezi jednotlivými onkologickými pracovišti ve světě. Pokud jsou léze větší než 20 mm (měřeno konvenčními technikami), popř. větší než

10 mm (měřeno CT) jsou považovány za měřitelné, léze menší než tyto hodnoty řadíme mezi neměřitelné, třetí skupinu tvoří skutečně-neměřitelné léze, které není možné žádnou metodou klasifikovat. Všechna základní hodnocení by měla být prováděna v co nejkratší době po započítí léčby a měření velikosti nádorů uváděno v metrické soustavě, abychom mohli co nejpřesněji porovnat nádor před a po léčbě. Léčebnou odpověď posuzujeme podle vývoje po zákroku a dělíme ji do čtyř skupin. Při úplném vymizení nádoru a všech lézí hovoříme o kompletní odpovědi na danou léčbu. Při zmenšení o minimálně 30 % označujeme odpověď jako částečnou. Zvětšení nádoru o nejméně 20 % anebo výskyt nových lézí označujeme jako progresi onemocnění a pokud změna nedosáhla ani jedné z těchto hodnot označujeme stav jako stabilizaci onemocnění. Rozsah nádoru porovnáваме s jeho velikostí před započítím léčby (Therasse et al, 2000).

Ne všichni pacienti odpovídají na neoadjuvantní terapii. Pro jejich odlišení se používají stejné diagnostické metody jako ty, které již byly zmíněny výše. Bylo zjištěno, že pacienti, kteří odpovídají dobře na neoadjuvantní léčbu mají po zákroku lepší prognózu a delší dobu přežití, než pacienti, kteří na léčbu neodpovídali (Law, 1997). Pro ty se jeví jako zcela zbytečná a neměl by se odkládat chirurgický zákrok (Kwee, 2010).

Četnost a intenzita nežádoucích účinků použité léčby závisí na jejím typu a individuální reakci organismu. Chirurgické zákroky bývají často velmi rozsáhlé a jejich zátěž kladená na organismus vysoká. Pacient v prvních pooperačních dnech přijímá stravu parenterálně, poté přechází na tekutou a mixovanou stravu a nakonec i tuhou stravu. Účinky radioterapie se odvíjejí od velikosti ozařované oblasti, typu zvolené metody ozařování a citlivosti organismu pacienta. Může se objevovat drobné zarudnutí kůže až puchýřky a mokvání, poškození sliznic, zhoršené polykání a vyšší náchylnost k infekcím. Proto je důležité udržovat při radioterapii hygienu, a to hlavně dutiny ústní. Vedlejší účinky chemoterapie opět závisí na individuální reakci pacienta, ale hlavně na typu podávaného cytostatika. Ty totiž v drtivé většině nepůsobí pouze na nádorové buňky, ale na všechny rychle se množící buňky daného organismu, jako jsou krvinky, výstelky orgánů nebo vlasové buňky. Z toho vyplývají nežádoucí účinky, jako únava, slabost, náchylnost k nemocem, nevolnosti, průjemy, poruchy krevní srážlivosti, vypadávání vlasů a větší náchylnost k infekcím. Některá cytostatika mají i své vlastní nežádoucí účinky, jako poškození jater a ledvin (Hynie, Sixtus et al., 1996).

I po ukončení léčby je pacient stále sledován a jsou u něho prováděny pravidelné ambulantní kontroly, při nichž se sledují onkomarkery v krvi a provádí se i celkové prošetření pomocí esofagoskopie, CT, RTG, endosonografie či PET.

## 4. Praktická část

### 4.1. Izolace miRNA

Pro izolace miRNA je dostupná celá řada komerčních kitů většinou založených na fenol chloroformové metodě. Jednotlivé kity se neliší v základě metody, pouze v použitých pufrech, jiných speciálních reagentech a v přiloženém postupu. Volili jsme postupy pro izolaci celkové RNA, při kterých nedochází ke ztrátě miRNA. Izolace využívá rozdělení vzorku po přidání reagentů a centrifugaci na organickou fázi obsahující většinu proteinů a DNA, bílý prsteneček obsahující vysráženou DNA a vodnou fázi obsahující různé typy RNA. Po odebrání vodné fáze se RNA oddělí a promyje na kolonce vhodným přiloženým pufrem a následně eluuje (tzn. vymyje z kolonky) vhodným elučním činidlem v závislosti na typu kolonky, nejčastěji voda nebo přiložený eluční roztok. Při izolaci je nutné postupovat podle návodu přiloženého výrobcem, neboť neznáme přesné složení jednotlivých roztoků ani složení sorbentu kolonky. Je nutné dbát také na to, zda jsou dodané roztoky připraveny přímo k použití nebo je nutné je ředit, popř. přidat etanol.

### 4.2. Použité metody

V rámci mé bakalářské práce jsem provedl porovnání několika dostupných metod pro izolaci RNA z různých vzorků, abychom byli schopni vybrat takovou, která poskytuje co nejvyšší koncentrace RNA v přijatelné kvalitě s ohledem na cenu a využitelnost kitu pro více typů vzorků.

Pro izolaci RNA z plazmy bylo použito 200  $\mu$ l 2x centrifugované plazmy, získané z periferní krve pacientů s karcinomem jícnu. RNA z plazmy byla izolována ze tří vzorků za použití čtyř níže uvedených kitů. Vzorky 1A, 1B, 1C byly eluovány 50  $\mu$ l, zbylé vzorky 2A-4CII 100  $\mu$ l elučního roztoku.

V případě vzorků uchovaných v FFPE bločcích je nejprve nutné provést deparafinizaci. Tu je možno provést metodami za použití xylenu nebo bez něj. Pro srovnání byla izolována RNA ze dvou vzorků deparafinizovaných xylenem (A, B) a dvou bez xylenu (C, D). Vzorky A, C a B, D jsou shodné, pět 10  $\mu$ m řezů nádoru jícnu z FFPE z jednoho bloku. Pro postupy deparafinizace viz Přílohy 1 a 2. Pro deparafinizaci byl použit vlastní postup, i když je možné používat postupy a reagenty, jež jsou součástí jednotlivých kitů. Všechny vzorky byly eluovány 100  $\mu$ l elučního činidla, a to z důvodu vyšších výtěžků a možnosti později vzorky zakonzentrovat.

#### 4.2.1. miRNeasy mini kit – Qiagen

Plazma:

Doba izolace: 180 minut

Vzorky: 1A, 1B, 1C

FFPE:

Doba izolace: 140 minut

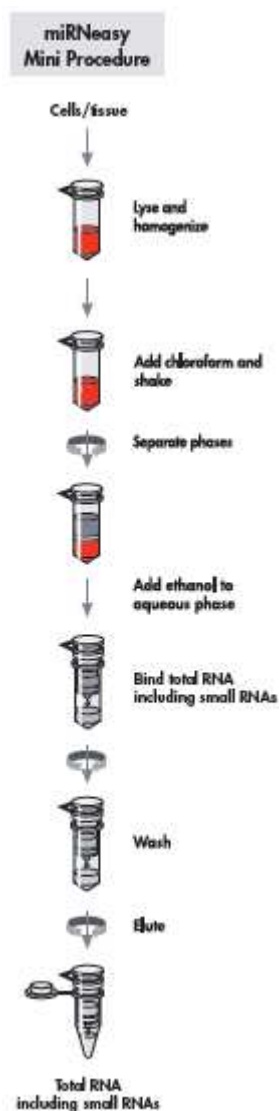
Vzorky: 3A, 3B, 3C, 3D

Kit kombinuje lysi vzorku zaleženou na fenol/guanidinu (QIAzol Lysis Reagent) a purifikaci RNA na silikátové membráně. QIAzol Lysis Reagent obsahuje fenol a guanidin thiokyanát v definovaném objemu tak, aby prováděl spolehlivě lysi tkání, zároveň inhiboval RNasy a odstraňoval většinu DNA a proteinů organickou extrakcí.

Vzorky jsou homogenizovány v QIAzolu. Po přidání chloroformu se provede centrifugace, při které dojde k extrakci RNA do vodné fáze. K odebrané vrchní vodné fázi se přidá etanol pro navození vhodných podmínek pro fixaci RNA od 18 nukleotidů výše na kolonku. Poté se vzorek nanese na kolonku, kde je celková RNA včetně miRNA fixována na membránu a fenol včetně dalších kontaminací jsou vymyty. RNA se poté eluuje RNase-free vodou.

Kit je vhodný jak pro izolace RNA z plazmy, tak pro izolace z FFPE bločků.





Obrázek 6. Přehled jednotlivých kroků izolace kitem miRNeasy (převzato z miRNeasy Mini Handbook)

#### 4.2.2. High pure miRNA isolation kit – Roche

Plazma:

Doba izolace: 50 minut

Vzorky: 2A, 2B, 2C

FFPE:

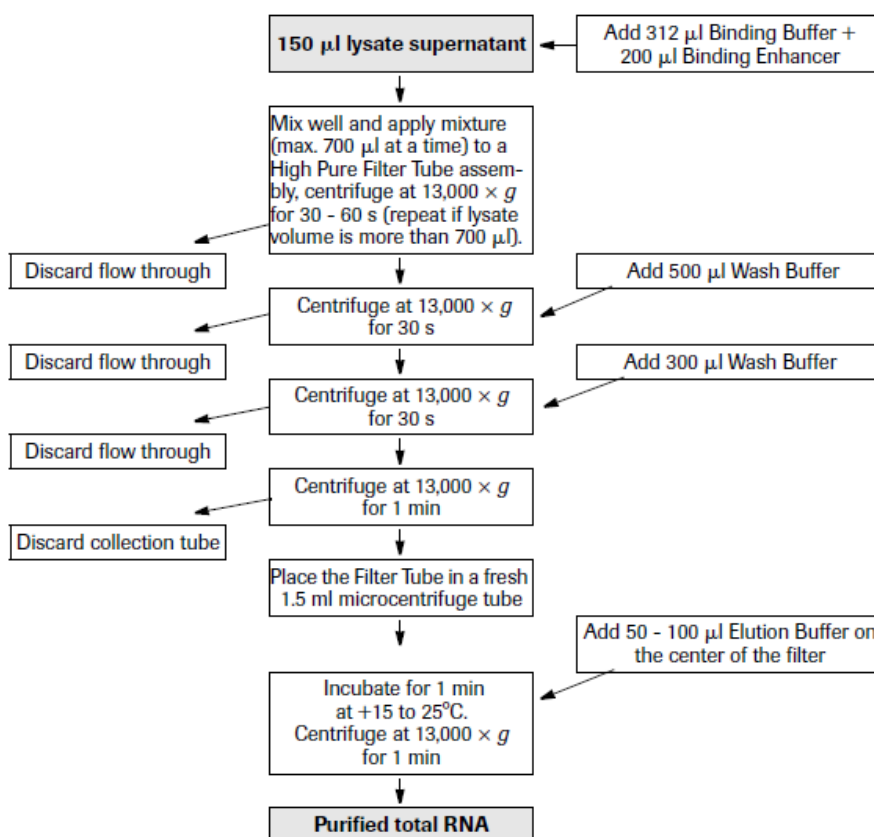
Doba izolace: 100 minut

Vzorky: 1A, 1B, 1C, 1D

Kit je navržen pro izolace RNA z živočišných buněk, tkání a FFPE tak, aby výsledná RNA byla obohacena o krátké RNA. Kvalita výsledné RNA uváděná výrobcem je vhodná pro klonování, northern blotting, miRNA array a pro kvantifikace miRNA pomocí RT-PCR.

Udávaná časová náročnost činí 30 minut. Pro vysokou účinnost kitu je doporučována důkladná disrupce a homogenizace vzorku.

RNA je v přítomnosti chaotropní soli guanidin thiokyanátu selektivně vázána na vlákna kolony zatímco ostatní složky jsou sérií rychlých kroků vymyty. RNA je eluována pomocí Elution buffru. Tato metoda nevyžaduje extrakci a RNA precipitaci organickým rozpouštědlem. Velikost úseků vázaných RNA je závislá na koncentraci Biding bufferu, zvýšením standardního objemu přidávaného ke vzorku jsme schopni zvýšit výtěžek krátkých RNA a naopak.



Obrázek 7. Přehled jednotlivých kroků izolace kitem firmy Roche (převzato z High Pure miRNA Isolation Kit)

#### 4.2.3. NucleoSpin® miRNA – Macherey-Nagel

Plazma:

Doba izolace: 100 minut

Vzorky: 3A, 3B, 3C






FFPE:

Doba izolace: 125 minut

Vzorky: 4A, 4B, 4C, 4D


Tento kit je navržen pro současnou izolaci krátkých RNA, dlouhých RNA a proteinů do tří izolovaných frakcí. Vhodný je pro širokou škálu vzorků od buněčných kultur po plazmu a FFPE. Veškeré potřebné vybavení a reagentie jsou pro snadnější orientaci v postupu barevně odlišeny. Výsledná RNA je vhodná pro další následné analýzy.

Kit umožňuje izolace RNA bez nutnosti použít fenol/chloroformovou metodu. Vzorek je rozrušen v ML pufru. Po přidání podílu etanolu jsou na kolonce zachyceny dlouhé RNA spolu s DNA. Ta je následně trávena přítomnými DNasami. K filtrátu obsahujícímu krátké RNA je přidán MP pufr pro odstranění proteinů následnou centrifugací a jejich precipitací na dně zkumavky. Po přidavku MX pufru se na kolonce zachytí i krátké RNA již zbavené proteinů. Po promytí se celková RNA eluuje RNase-free vodou.

<b>1 Prepare sample</b>		< 50 mg animal tissue, < 10 <sup>7</sup> cultured cells, <u>or</u> < 50 µL liquid sample 800 µL TRIzol®
<b>2 Cell lysis</b>		Vortex 15 s 5 min RT
<b>3 Phase separation</b>		160 µL chloroform Vortex 15 s 3 min RT 15 min 12,000 x g 2–8 °C Transfer 400 µL aqueous upper phase
<b>4 Adjust binding conditions</b>		1000 µL MX Vortex 5 s
<b>5 Bind small and large RNA</b>	 <b>Blue or green ring</b>	Load sample stepwise 30 s 11,000 x g

(Steps 6-9 are not necessary with this protocol)

Obrázek 8. Přehled jednotlivých kroků izolace kitem NucleoSpin část 1.(převzato z NucleoSpin® miRNA User manual)

<b>10 Wash and dry silica membrane</b>	 <b>Blue or green ring</b>	<table border="0"> <tr> <td><b>1<sup>st</sup></b></td> <td>600 <math>\mu</math>L MW1 30 s 11,000 x <i>g</i></td> </tr> <tr> <td><b>2<sup>nd</sup></b></td> <td>700 <math>\mu</math>L MW2 30 s 11,000 x <i>g</i></td> </tr> <tr> <td><b>3<sup>rd</sup></b></td> <td>250 <math>\mu</math>L MW2 2 min 11,000 x <i>g</i></td> </tr> </table>	<b>1<sup>st</sup></b>	600 $\mu$ L MW1 30 s 11,000 x <i>g</i>	<b>2<sup>nd</sup></b>	700 $\mu$ L MW2 30 s 11,000 x <i>g</i>	<b>3<sup>rd</sup></b>	250 $\mu$ L MW2 2 min 11,000 x <i>g</i>
<b>1<sup>st</sup></b>	600 $\mu$ L MW1 30 s 11,000 x <i>g</i>							
<b>2<sup>nd</sup></b>	700 $\mu$ L MW2 30 s 11,000 x <i>g</i>							
<b>3<sup>rd</sup></b>	250 $\mu$ L MW2 2 min 11,000 x <i>g</i>							
<b>11 Elute small and large RNA</b>	 <b>Blue or green ring</b>	30–100 $\mu$ L RNase-free H <sub>2</sub> O  1 min RT  30 s 11,000 x <i>g</i>						

Obrázek 9. Přehled jednotlivých kroků izolace kitem NucleoSpin část 2. (převzato z NucleoSpin® miRNA User manual)

#### 4.2.4. mirVana™ miRNA isolation kit – Ambion

Plazma:

Doba izolace: 75 minut

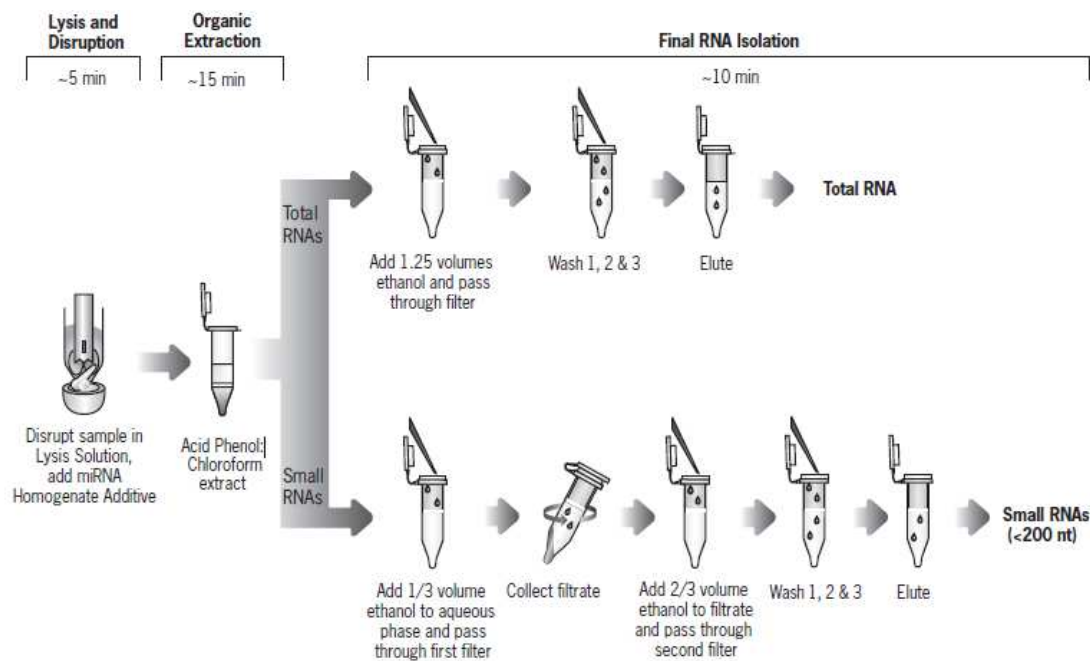
Vzorky: 4A, 4B, 4C, 4AII, 4BII, 4CII

FFPE:

Doba izolace: 80 minut

Vzorky: 2A, 2B, 2C, 2D

MirVana kombinuje fenol/chloroformovou extrakci RNA spolu s její imobilizací na silikátovém filtru. První fáze zahrnuje disruptci vzorku v Lysis buffru a extrakci za využití vysoce koncentrovaných chaotropních solí ve spojení s roztokem fenol/chloroformu, sloužícímu k deaktivaci RNAs a purifikaci vzorku od zbylých biomolekul. Vzorek je odsolen přidávkem alkoholu, který zároveň sníží afinitu RNA k vodě a zvýší její afinitu k použitému filtru. Filtr je promyt a RNA eluována roztokem o nízké iontové síle (Elution solution, RNase-free voda).



**Obrázek 10. Přehled jednotlivých kroků izolace kitem firmy Ambion (převzato z *mirVana™* miRNA Isolation Kit protocol)**

### 4.3. Hodnocení kvality a kvantifikace RNA

Hodnocení kvality RNA a její koncentrace je stěžejní pro provádění dalších analýz jako jsou microarraye a RT-PCR. V současnosti nejsou dostupná žádná ucelená kritéria pro hodnocení RNA. Nejběžnějšími metodami kvantifikace je spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA ve vzorku a jeho čistoty a stanovení integrity RNA gelovou elektroforézou.

Jelikož jsou měřené koncentrace velmi nízké, je splněna fundamentální podmínka pro platnost Lambert-Beerova zákona a spektrofotometrické stanovení se tím pádem stává velice vhodnou metodou pro měření koncentrace RNA na základě její absorpce při 260 nm. Pro měření byl použit spektrofotometr NanoDrop ND-1000, který je schopný proměřit několik vlnových délek najednou. Některé látky, jako například proteiny, mají absorpenci závislou na pH roztoku, mohlo by se tedy stát, že hodnoty koncentrace RNA bude těmito kontaminacemi zkreslena. Přístroj je proto schopen měřit několik různých vlnových délek. Při 230 nm absorbují proteiny, chaotropní soli, guanidinium isothiocyanát a fenol, tedy vesměs látky použité při extrakci. Při 280 nm mají absorpční maximum některé proteiny popřípadě jiné kontaminující látky. Tato hodnota slouží zejména pro zjištění pH-dependentních látek a může se výrazně lišit podle pH vody používané při měření. Příložený software je potom schopen vypočítat z absorpční koncentraci RNA ve vzorku a z poměrů A260:A230 a A260:A280 přibližnou

čistotu vzorku. Pokud se poměr A260:A230 vyskytuje v rozmezí 2,0–2,2 považujeme RNA za čistou, pro A260:A280 je to potom 1,8–2,2.



**Obrázek 11. Spektrofotometr NanoDrop 1000 společnosti Thermo Fisher Scientifics (převzato z [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com))**

Kontrola integrity a kvality je obecně možná gelovou elektroforézou. Přístroje jako Agilent 2100 Bioanalyser automaticky měří průběh elektroforézy v mikrokapilárách a softwarově vyhodnocují kvalitu analyzovaného vzorku. RIN číslo, které je vypočítáno pomocí výrobcem dodávaného softwaru, udává kvalitu a integritu vzorku. Čím více se RIN číslo blíží hodnotě 10, tím je vyizolovaná RNA kvalitnější. Přístroj funguje na principu měření fluorescence barviva přidávaného do samotného gelu. Detekční limity přístroje závisí na použité metodě a čipu, na který se vzorek nanáší. V závislosti na očekávané koncentraci vzorku používáme Nano Chip pro koncentrace od 25–500 ng/μl, pro menší koncentrace použijeme Pico Chip, který má vyšší citlivost. Opět postupujeme podle přesného návodu dodaného spolu s přístrojem.



**Obrázek 12. Čipy používané v Agilent 2100 Bioanalyser, na obrázku RNA Nano LabChip (převzato z [www.biomedicalgenomics.org](http://www.biomedicalgenomics.org))**

Grafickým výstupem je elektroforeogram. Kalibrace přístroje je provedena standardem (tzv. Ladderem) obsahujícím fragmenty RNA o specifické délce a koncentraci. Na ose x je vynesena počet nukleobází daného fragmentu (popř. čas, větší fragmenty putují gelem pomaleji). Na ose y potom fluorescence, ze které je metodou kalibrační křivky za pomoci softwaru vypočtena koncentrace RNA. První pík (25nt) náleží markeru, ten prochází gelem nejrychleji a je brán jako základní linie, výpočet koncentrace RNA a RIN čísla se odvíjí právě od něj. Podle počtu a tvaru jednotlivých píků jsme schopni pouhým okem odhadnout množství a úroveň degradace RNA ve vzorku. Celková buněčná RNA má díky obsahu ribozomálních RNA specifický tvar elektroforeogramu s píky ribozomálních RNA.

Dalším výstupem jsou tzv. Gel Image, což jsou softwarová zobrazení elektroforeogramu standardu a jednotlivých vzorků, ze kterých můžeme rovněž vyčíst kvalitu i kvantitu RNA ve vzorku. Šířka jednotlivých pruhů ukazuje míru fragmentace RNA.

Příklad kompletního výstupního protokolu Agilent 2100 Bioanalyser viz Příloha 3.

## 5. Výsledky

Nejvyšších hodnot koncentrace u vzorků plazmy dosahovaly vzorky 1A, 1B, 1C. Vysokou koncentraci RNA vykazoval rovněž vzorek 4B jako jediný izolovaný daným kitem. Z tohoto důvodu byla celá izolace zopakována. Po následném měření koncentrace nebyla stejná hodnota prokázána. Vysoké čistoty bylo dosaženo u vzorků 3A-C, jejich koncentrace však byla v porovnání s vzorky 1A-C poloviční. Díky absenci ribozomálních píků je RIN číslo velmi nízké, nebo ho přístroj nebyl chopen vůbec vyhodnotit.

**Tabulka 5. Výsledky spektrofotometrického měření a elektroforézy pro vzorky plazmy**

vzorek	Nanodrop			Agilent pico	
	c RNA ng/μl	A620/A280	A260/A230	c (Agilent) ng/μl	RIN
1A	9,51	1,29	1,28	10,74	3,1
1B	15,18	0,91	0,27	8,47	2,5
1C	10,23	0,83	0,33	9,07	-
2A	1,96	1,08	0,15	-	-
2B	4,80	1,75	0,33	1,02	-
2C	0,80	0,57	0,04	0,53	-
3A	5,73	1,58	0,16	0,57	-
3B	5,56	1,77	0,18	0,04	-
3C	4,73	1,75	0,18	0,04	-
4A	3,61	1,84	0,21	0,03	1,2
4B	10,00	0,95	0,16	0,04	1
4C	0,64	5,08	0,75	0,04	1
4AII	0,59	0,61	0,07	0,02	1
4BII	3,14	0,56	0,12	0,04	1
4CII	0,70	0,41	0,14	0,03	1

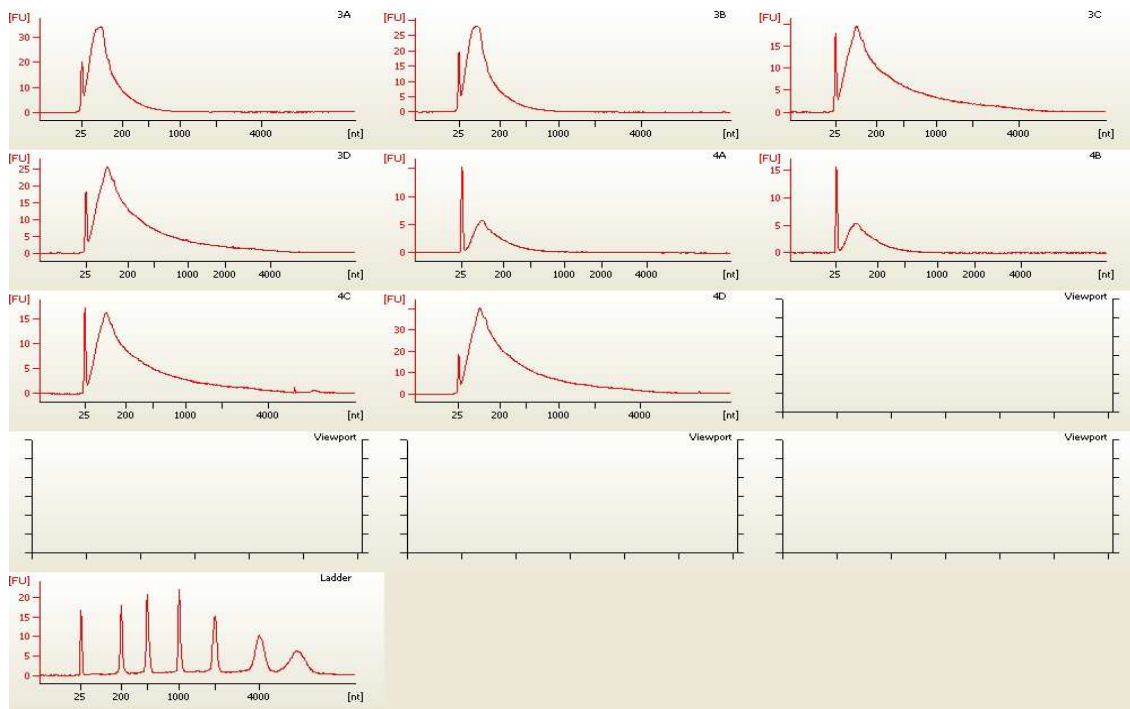
Vzorky FFPE tkáně poskytují lepší výsledky jak s ohledem na koncentraci, tak na čistotu. Nejvyšších koncentrací bylo dosaženo u vzorků 3A-D, které rovněž vykazovaly vysokou čistotu. V porovnání s ostatními sériemi vzorků vykazovaly vyrovnané hodnoty koncentrace mezi vzorky deparafinizovanými xylenem a bez něj. Vysokých koncentrací bylo dosaženo také u vzorků 1C, 1D, 4C, 4D deparafinizovaných bez xylenu. Agilent 2100 Bioanalyzer potvrdil výsledky měření NanoDropem při zohlednění možnosti nekvantitativní interakce RNA s barvivem.



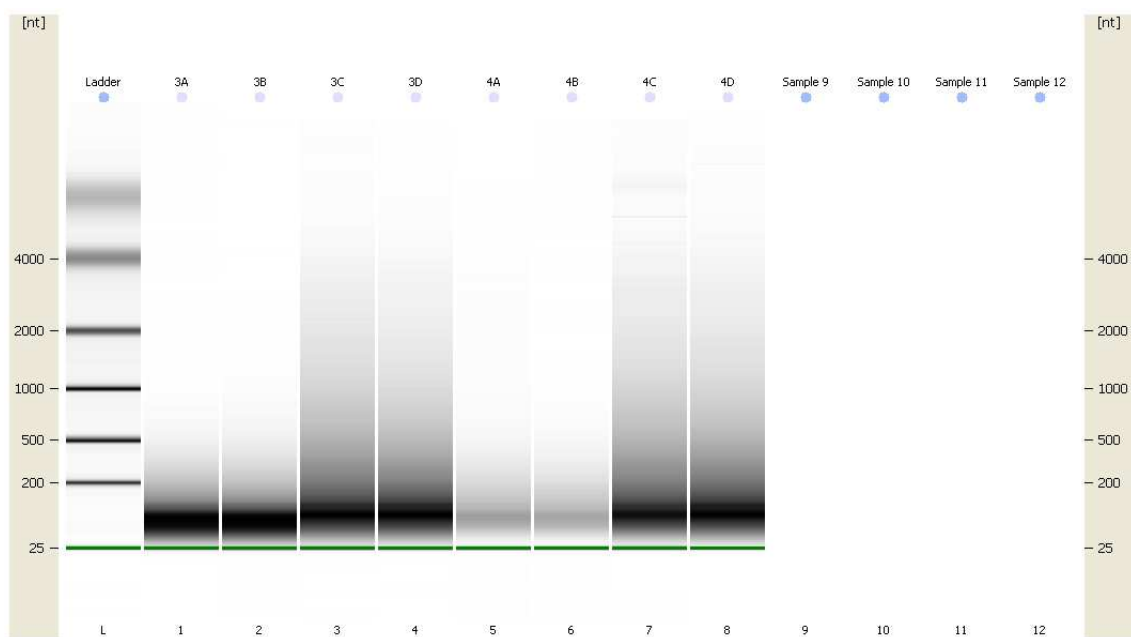
**Tabulka 6. Výsledky spektrofotometrického měření a elektroforézy pro FFPE vzorky**

vzorek	NanoDrop			Agilent nano	
	c RNA ng/μl	A620/A280	A260/A230	c (Agilent) ng/μl	RIN
1A	51,97	1,56	0,66	71,00	2,6
1B	43,69	1,43	0,53	29,00	2,6
1C	111,73	1,75	1,28	151,00	2,4
1D	144,63	1,86	0,61	536,00	-
2A	56,59	1,95	1,44	25,00	2,1
2B	85,07	1,94	1,71	62,00	2,5
2C	73,51	1,98	0,86	40,00	2,1
2D	121,00	1,92	1,64	64,00	2,4
3A	193,85	1,85	1,87	379,00	2,5
3B	157,86	1,84	1,34	331,00	2,5
3C	205,47	1,87	1,00	345,00	2,3
3D	222,21	1,87	1,63	429,00	2,4
4A	46,41	1,79	0,60	69,00	2,5
4B	31,39	1,9	0,50	59,00	2,4
4C	162,05	1,81	1,65	288,00	2,3
4D	330,05	1,79	1,76	712,00	1,6

Z elektroforeogramu je dobře patrný pík markeru následovaný širokým píkem náležícím RNA. Rovněž je dobře vidět fragmentace RNA u každého vzorku FFPE deparafinizovaného xylenem a bez něj. Nejvíce fragmentů se nacházelo v rozmezí délek 90–120 nukleobází. Vzorky deparafinizované xylenem vykazují vyšší míru fragmentace což je patrné na obrázku 13. Vzorky nedeparafinizované xylenem obsahovaly i fragmenty o délce 4000 nukleobází. Na následujících obrázcích 13 a 14 je dobře porovnatelná výška píku elektroforeogramu s intenzitou pruhu na Gel Image.



**Obrázek 13. Vybrané elektroforegramy některých vzorků v porovnání se standardem (vlevo dole). Na ose x je vynesena počet nukleobází, osa y znázorňuje míru fluorescence. První pík náleží markeru.**



**Obrázek 14. Softwarové zobrazení elektroforegramu**

## 5.1. Porovnání ceny a použitelnosti kitů

Následující tabulka shrnuje počet izolací jednotlivých kitů, jejich celkovou cenu a cenu za izolaci jednoho vzorku. Nezohledňuje cenu energií a cenu chemikálií, které nejsou součástí kitu.

**Tabulka 7. Porovnání ceny a počtu izolací jednotlivých kitů**

Kit	Výrobce	počet izolací	Cena kitu cca (Czk)	cena 1 izolace (Czk)
miRNeasy mini kit	Qiagen	50	5 800	116
NucleoSpin <sup>®</sup> miRNA	Macherey-Nagel	10	1 300	130
High pure miRNA isolation kit	Roche	50	7 800	156
mirVana <sup>™</sup> miRNA isolation kit	Ambion	40	10 400	260

Pozn.: firma Macherey-Nagel nabízí rovněž kit pro 50 izolací za cenu cca 6 100 CZK

## 6. Diskuze

Jednotlivé kity mají své pro a proti. Kit firmy Qiagen poskytuje vysoké výtěžky s dobrou čistotou vzorku. Cena jedné izolace je rovněž nejpříznivější ze všech použitých kitů. Činí 116 Kč. Postup je ovšem počtem kroků a svou délkou časově náročný. Problémy může činit větší objem vzorku, který je nutný nanášet na kolonku několikrát, což úměrně prodlužuje dobu izolace.

Kit firmy Roche je počtem kroků a dobou izolace nejkratší. Výrobce uvádí dobu trvání okolo 30 minut, čehož se nám dosáhnout nepodařilo. Neposkytuje tak dobré výsledky jako kit Qiagen. Jeho předností je, že se vyhýbá toxickým reagentům, jako je chloroform, což je nejspíše také příčina nízkých výtěžků. Problém se vyskytl u izolací z FFPE bločků. Po přidání Binding Buffru vzorky pěnily a bylo nutné je častěji centrifugovat a pipetovat po menších částech, což zvyšuje riziko možné kontaminace vzorku.

Časově náročnější byl také kit firmy Macherey-Nagel. Postup byl nejpřehledněji členěn za použití barevných značek jak v postupu, tak na jednotlivých součástech kitu, podle potřeb izolace. Komplikací by mohl být velký objem odebrané vodné fáze obsahující RNA, kterému je nutné přizpůsobit následující kroky izolace a jejich počet a opakování. I přesto, že výrobce uvádí počet izolací 10, kit obsahuje pouze 5 kolonek modré a 5 zelené barvy. Je to dáno tím, že je možné je mezi sebou zaměnit, což může být pro někoho matoucí, na izolaci to však žádný vliv nemá, o čemž jsme se přesvědčili i během izolací.

Posledním je kit firmy Ambion. Postup se řadí ke kratším, což bylo velkým problémem v případě izolací z plazmy. Nedošlo k dostatečnému oddělení vodné fáze od prstence DNA, centrifugací tak bylo nutné opakovat několikrát, aby nedošlo ke kontaminaci RNA DNA. Došlo tak k prodloužení doby izolace. Postup poskytoval velmi čisté vzorky, ale s nižší koncentrací RNA než v případě kitu od Qiagenu. U izolací FFPE vzorků k takovým potížím nedocházelo, fáze se dělily lépe než v případě plazmy.

Výsledky izolací RNA z FFPE bločků jsou o mnoho povzbudivější než naměřené koncentrace z plazmy. Koncentrace i čistota vzorků jsou mnohem vyšší, což je zapříčiněno tím, že pracujeme se solidní tkání, jejíž buňky následně lyzujeme. Koncentrace RNA tudíž musí být větší než v případě plazmy. Nejlepší výsledky opět poskytuje miRNeasy mini kit, a to ve všech parametrech. Mezi vzorky deparafinizovanými xylenem a bez něj byl patrný rozdíl ve fragmentaci RNA, xylene štěpil RNA na úseky o délce cca 100 nukleobází. Jeho použití proto můžeme zvážit na základě jeho nebezpečných fyzikálně chemických vlastností a účinku na zdraví.

Hodnoty koncentrací vyizolované RNA získané za využití Agilent 2100 Bioanalyzeru jsou v práci uvedeny pouze pro srovnání obou metod a nelze je považovat za relevantní, jelikož měření je zde závislé na fluorescenci přidaného barviva, které se nemusí vždy vázat kvantitativně. Vzorky plazmy jsou pro analýzu na Agilent 210 Bioanalyzeru méně vhodné, neboť koncentrace RNA v nich je příliš nízká a RNA je fragmentovaná, což se projeví málo patrným a pozvolným nárůstem a klesáním základní linie elektroforeogramu, nikoliv viditelnými píky. Zároveň nejsou viditelné ribozomální píky 18S a 28S, které jsou u jiných vzorků dobře viditelné. Vzorky z FFPE bločků poskytovaly daleko lepší hodnoty jak koncentrací, tak RIN čísla. RNA byla rovněž fragmentovaná a ribozomální píky nejsou taktéž v důsledku fixace vzorku v parafinu a následné deparafinizace zřetelné.

Všechny výše zmíněné kity poskytují výtěžky RNA použitelné pro následné analýzy. Ve všech případech je rozštěpena na kratší úseky nejčastěji o délce okolo 100 nukleobází, což pro analýzu miRNA není překážkou, jelikož analyzujeme úseky okolo 23 nukleotidů. Pokud bychom chtěli například metodou RT-PCR amplifikovat úseky delší (např. 500 nukleobází) není žádný z těchto kitů vhodný, a musel by se zvolit jiný, vhodnější kit dle nabídky výrobců.

Mým cílem bylo najít izolační postup miRNA, který by poskytoval vysoké výtěžky s přijatelnou kvalitou a který by byl zároveň univerzálním a použitelným na více typů vzorků. Výrobci ve většině případů vyrábí také kity, šité na míru jednotlivým typům vzorků například pouze pro izolace z FFPE, nebo buněčných kultur apod. Jako nejvhodnější se jeví miRNeasy mini kit od Qiagenu, který poskytoval u porovnávaných vzorků srovnatelné a vyvážené výsledky s dobrou kvalitou měřenou jak spektrofotometricky, tak elektroforézou. Co do počtu izolací a ceny se jedná o nejlevnější kit ze všech použitých. Složky kitu vystačí na 50 izolací za cenu necelých 6000 Kč, což je až o polovinu levnější než u nejdražšího kitu. Mým závěrem je tedy to, že dražší kity sice zaručují časovou nenáročnost a jednoduchost postupu, ovšem za cenu nižších a méně kvalitních výtěžků RNA.

Po izolacích RNA přistoupíme k stanovení expresních profilů miRNA, Práce je naplánována na podzim roku 2013. Mezitím jsem se naučil pracovat se softwarem Partek, který slouží k analýze dat a jejich statistickému hodnocení. Software je schopný hodnotit expresi již známých miRNA, porovnáváním zjištěných dat s knihovnou umožňuje identifikaci nových miRNA a také umožňuje porovnávat hodnoty námi sledovaných miRNA s expresí genu a jejich korelaci s cílovou mRNA. Partek software je kompatibilní s GeneChip® Command Console® Softwarem, který slouží k ovládání platformy Affymetrix. Obsahuje veškeré ovládací prvky GeneChip systému, umožňuje základní hodnocení získaných arrayí a import dat do kompatibilních systémů, jako je výše zmíněný Partek. V rámci práce jsem se s příslušnými softwary nejprve seznámil, analýza vlastních dat bude provádět koncem roku 2013.

## 7. Závěr

Karcinom jícnu je onemocnění s velice špatnou prognózou. Incidence má v celosvětovém měřítku stále vzestupný trend a současná medicína nemá dostupné prostředky, jak jej účinně léčit. Důležitá je prevence a včasná diagnóza. Nalezení biomarkerů predikujících odpověď na terapii je zcela klíčové pro kompletní vyléčení pacienta či zmírnění příznaků onemocnění. MiRNA mají schopnost regulovat velké množství procesů buněčného cyklu. Z tohoto důvodu se řada pracovišť zaměřuje právě na profilování exprese těchto RNA a hledání vhodných biomarkerů.

V teoretické části bakalářské práce byla provedena rešerše týkající se onemocnění jícnu a jejich regulace a progresu. V experimentální části byly popsány metody izolace RNA a hodnocení její kvality a kvantity. Dále bylo provedeno několik izolací RNA z různých vzorků pacientů postižených nádory jícnu, na základě kterých byl vybrán kit, který se pro tyto izolace nejvíce hodí.

V průběhu práce jsem se naučil pracovat s veškerým vybavením v laboratoři a chemikáliemi potřebnými pro izolace a purifikace RNA, zorientoval jsem se v dané problematice a vytvořil si tak pevný základ pro další práci v této oblasti. Nalezl jsem vhodný kit pro izolace RNA, a to miRNeasy mini kit firmy Qiagen, se kterým budu dále pracovat při stanovování expresních profilů miRNA pomocí platformy Affymatrix.

## 8. Seznam zkratk

ALDH2	- gen kódující aldehyd dehydrogenázu 2
CEA	- carcinoembryonic antigen – karcinoembryonální antigen
CT	- komputer tomography - počítačová tomografie
DNA	- deoxyribonucleotic acid - deoxyribonukleová kyselina
EAC	- Esophageal Adenocarcinoma – adenokarcinom jícnu
ESCC	- Esophageal Squamous cell carcinoma – dlaždicobuněčný karcinom jícnu
FFPE	- Formalin-fixed, Paraffin-embedded – formalínem fixovaná tkáň uložená v parafínu
GERD	- Gastroesophageal Reflux Disease – reflexní onemocnění jícnu
miRNA	- mikro RNA
ND	- NanoDrop
PET	- positron emission tomography - pozitronová emisní tomografie
RIN	- RNA integrity number
RNA	- ribonucleotic acid - ribonukleová kyselina
RT-PCR	- Real-time polymerase chain reaction
RTG	- Radioisotope Thermionic Generator - rentgen
SCC	- Squamous cell carcinoma antigen – antigen dlaždicobuněčného karcinomu
Tis	- karcinom in situ

## 9. Seznam použité literatury

ADAM, Zdeněk et al. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. 1. vyd. Praha: Galén, ©2010. xxi, 417 s. ISBN 978-80-7262-648-9.

Ashida A., Boku N., Aoyagi K., Sato H., Tsubosa Y., Minashi K. *Expression profiling of esophageal squamous cell carcinoma patients treated with definitive chemoradiotherapy: clinical implications*. Int J Oncol. 2006, **28**,1345–1352.

BECKER, Horst D. et al. *Chirurgická onkologie*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. xxv, 854 s. ISBN 80-247-0720-9.

Berger A.C., Farma J., Scott W.J., Freedman G., Weiner L., Cheng J.D., Wang H., Goldberg M. *Complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal carcinoma is associated with significantly improved survival*. J Clin Oncol. 2005, **23**, 4330-4337.

Brucher B.L.D., Stein H.J., Zimmermann F., Werner M., Busch R., Dittler H.J., Molls M., Fink U., Siewert J.R. (2004) *Responders benefit from neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma: Results of a prospective phase-II trial*. Eur J Surg Oncol. 2004, **30**, 963-971.

ČIHÁK, Radomír, GRIM, Miloš, ed. a FEJFAR, Oldřich, ed. *Anatomie*. 3., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011- . sv. ISBN 978-80-247-3817-8.

Duda, Miloslav a kol. *Jícen: pohled z mnoha úhlů v zrcadle zkušeností olomoucké jícnové školy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 362 s. ISBN 978-80-244-3001-0.

Enzinger M.D., Mayer M.D. *Esophageal cancer*. N Engl J Med. 2003, **349**, 2241-2252.

Friedman R.C. et al. *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res. 2009, **19**, 92-205.

Geh J.I., Crellin A.M., Glynn-Jones R. *Preoperative (neoadjuvant) chemoradiotherapy in oesophageal cancer*. Br J Surg. 2001, **88**, 338-356.

Globocan 2008, internetová databáze. [online] [cit. 25.8.2012]. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>



Hamilton S.R., Aaltonen L.A. (Eds.) *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. IARC Press, Lyon. 2000, 9-30.

Helm J., Enkemann S.A., Coppola D., Barthel J.S., Kelly S.T., Yeatman T.J. *Dedifferentiation precedes invasion in the progression from Barrett's metaplasia to esophageal adenocarcinoma*. Clin Cancer Res. 2005, **11**, 2478–2485.

Hennessy T.P.J. *Cancer of the oesophagus*. Postgrad Med J. 1996, **72**, 458-463.

HYNIE, Sixtus. *Farmakologie pro bakalářské studium*. Díl 2. 2. přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 1996. 10 s., S. 273-550. ISBN 80-7184-185-4.

Ishwaran H., Blackstone E.H., Apperson-Hansen C., Rice T.W. *A novel approach to cancer staging: application to esophageal cancer*. Biostatistics. 2009, **10**, 603-620.

Joon Oh Park et al. *Measuring Response in Solid Tumors: Comparison of RECIST and WHO Response Criteria*. Jpn J Clin Oncol. 2003, **33(10)**, 533–537.

Kala, Zdeněk a kol. *Refluxní choroba jícnu: diagnostika a chirurgická léčba: reflexe nových diagnostických a terapeutických trendů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2003. 132 s., 54 barev. il. na příl. ISBN 80-247-0431-5.

Kim TJ, Kim HY, Lee KW, Kim MS. *Multimodality assessment of esophageal cancer: preoperative staging and monitoring of response to therapy*. Radiographics. 2009, **29**, 403–421.

Klener, Pavel, et al. *Vnitřní lékařství*. 3. vydání. Praha : Galén, 2006. s. 558. ISBN 80-7262-430-X.

Kollarova H., Machova L., Horakova D., Janoutova G., Janout V. *Epidemiology of esophageal cancer – an overview article*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2007, **151**, 17–28.

Laco, Jan. *Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu*. 1. vyd. Praha: Galén, ©2012. 163 s. ISBN 978-80-7262-874-2.

Lam B, Simkin M, et al. *Revised Guidelines for Quality Assessment for Diversed Biological Sample Inpu*. App note 47 RNA Sample prep., Norgen Biotek Corp. 2012.

Law S., Fok M., Chow S. *Preoperative chemotherapy versus surgical therapy alone for squamous cell carcinoma of the esophagus: a prospective randomized trial*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1997, **114**, 210–217.

Lužna P., Ehrmann J. MikroRNA u karcinomu jícnu. In: Slabý O., Svoboda M. et al. *Mikro RNA v Onkologii*. Praha: Galén, 2012. s. 157-168. ISBN 978-80-7262-587-1.

Malati T. *Tumor markers: an overview*. Indian J Clinical Biochem. 2007, **22**, 17-31.

Rejthar, Aleš a Vojtěšek, Bořivoj. *Obecná patologie nádorového růstu*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2002. 206 s. ISBN 80-247-0238-X.

Robert M. Kwee, MD. *Prediction of Tumor Response to Neoadjuvant Therapy in Patients with Esophageal Cancer with Use of <sup>18</sup>F FDG PET: A Systematic Review*. Radiology. 2007, **254**, 707-717.

Sarbia M., Porschen R., Borchard F., Horstmann O., Willers R., Gabbert H.E. *Incidence and prognostic significance of vascular and neural invasion in squamous cell carcinomas of the esophagus*. Int J Cancer. 1995, **61**, 333-336.

SOBIN, L. H., ed. a WITTEKIND, Christian, ed. *TNM - klasifikace zhoubných novotvarů*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2004, ©2002. 196 s. ISBN 80-7280-391-3.

Stahl M., Budach W., Meyer H.-J., Cervantes A. *Esophageal cancer: Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology. 2010, **21**, 46–49.

Sutton S., Clark P. *Neo-adjuvant treatment for oesophageal cancer*. GI Cancer. 2000, **3**, 231-238.

Therasse P., Susan G. et al. (2000) *New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors*. J Natl Cancer Inst. 2000, **92**, 205-16.

Wang K, Yuan Y, Cho J-H, McClarty S, Baxter D, et al. *Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma*. PloS ONE. 2012, 7(7).

Watanabe H., Jass J.R., Sobin L.H. *Histological Typing of Oesophageal and Gastric Tumours*. Springer 2nd Ed, Berlin. 1990, 5-7.

Weber W.A., Avril N., Schwaiger M. *Relevance of positron emission tomography (PET) in oncology*. Strahlenther Onkol. 1999, **175**, 356–373.

Westerterp M., van Westreenen H.L. , Reitsma J.B. *Esophageal cancer: CT, endoscopic US, and FDG PET for assessment of response to neoadjuvant therapy–systematic review* . Radiology. 2005, **236**, 841 – 851.

## 10. Přílohy

### Příloha 1. Deparafinizace tkání xylenem

Deparafinizace se provádí u vzorků tkání uchovávaných v FFPE bločcích. Tkáň zalitá v parafinu je nejprve rozkrájena na co nejmenší kousky, aby byla lépe přístupná deparafinizaci a trávení. Následně je přidán xylén, který odstraní parafin. Poté jsou vzorky inkubovány s příslušným lyzačním pufrem, který obsahuje proteinázu K, aby mohlo dojít k uvolnění RNA. Následná inkubace při zvýšené teplotě částečně odstraní cross-linky způsobené parafinem, a zvýší tak kvalitu a výtěžky RNA. Další postup je shodný jako v případě izolace RNA z tkání.

#### Reagencie a vybavení

XYLEN, Absolutní etanol, Proteináza K (Sigma), No: P2308-100MG, NaCl, TRIS, HCL, EDTA, SDS

Centrifuga Eppendorf MiniSpin, Termoblok, pH metr, skalpel

#### Pracovní postup – deparafinizace

Příprava pufru pro proteinázu K, 50ml zásobního roztoku:

0,292g NaCl

0,06g Tris

0,466g EDTA

Uprav pH na 8,0, doplň destilovanou vodou do konečného objemu 50 ml.

#### Příprava roztoku proteinázy K

Lyofilizovaný prášek proteinázy K rozpust' v destilované vodě na výslednou koncentraci 20mg/ml (tj. 100mg v 5 ml vody). Udělej aliquoty po 500ul a zamraž na -20°C.

## Deparafinizace

1. 4  $\mu\text{m}$  parafínové řezy umístěte do 1,5 ml zkumavky (cca  $\frac{1}{2}$  zkumavky) a pomocí skalpelu nařežte na co nejmenší části. Pracujte v boxu s vypnutou vzduchotechnikou za účelem zabránění rozfoukání vzorku.
2. Zapněte laminární box a přidejte ke vzorku 1000  $\mu\text{l}$  XYLENU, 5 minut převracejte v ruce.
3. Centrifugujte vzorky po dobu 2 minut při maximálních otáčkách.
4. Pokud se nevytvoří pevná peleta, nahřejte vzorek po 3 minuty na 50°C v termobloku a opakujte krok 3.
5. Opatrně odeberte supernatant bez narušení pelety. Pokud by hrozilo narušení pelety či ztráta vzorku, neodebírejte supernatant kompletně.
6. Přidejte 1 ml absolutního etanolu a zvortexujte, Mělo by dojít k zakalení obsahu.
7. Centrifugujte vzorky po dobu 2 minut při maximálních otáčkách a odstraňte supernatant.
8. Opakujte krok 6–7.
9. Krátce centrifugujte a důkladně odstraňte zbytky supernatantu.
10. Vložte otevřenou zkumavku do termobloku a sušte 10 minut.
11. Přidejte 100  $\mu\text{l}$  pufru pro proteinázu K, 16  $\mu\text{l}$  10 % SDS, 40  $\mu\text{l}$  Proteinázy K, zvortexujte, krátce centrifugujte a inkubujte min. 3 hod při 55 °C v termobloku v případě izolace RNA.
12. Pokračujte izolací nukleových kyselin.

## Příloha 2. Deparafinizace tkání bez xylenu

### Lysis Buffer

Příprava: Lyzační pufr si připravíme těsně před použitím. Rozpis na 20 ml (pokud budeme izolovat málo vzorků, tak si připravíme jen potřebné množství):

RNAasin 10 000 U	- 0,25 ml
EDTA 0,5 M	- 0,8 ml
Proteinasa K (10 mg/ml)	- 1 ml
SDS 10 %	- 2 ml
TRIS 1M pH 7,4	- 2 ml
DEPC water	- 13,95 ml

### Postup deparafinizace:

1. parafínové řezy (cca 8 – 10 řezů) seškrábneme do 2 ml zkumavky a přidáme 500  $\mu$ l lyzačního pufru
2. propipetujeme, zvortexujeme, stočíme a necháme inkubovat 12 hod. při 60 °C.
3. necháme stát při pokojové teplotě 1 min.
4. pokračujeme izolací RNA dle protokolu

### Příloha 3. Postup přípravy Agilent Pico Chipu (převzato z Agilent RNA 6000 Pico Kit Quick Start Guide)

#### Preparing the Gel

- 1 Pipette 550  $\mu\text{L}$  of RNA gel matrix (red ●) into a spin filter.
- 2 Centrifuge at 1500 g  $\pm$  20 % for 10 min at room temperature.
- 3 Aliquot 65  $\mu\text{L}$  filtered gel into 0.5 mL RNase-free microcentrifuge tubes. Use filtered gel within 4 weeks. Store at 4 °C.

#### Preparing the Gel-Dye Mix

- 1 Allow the RNA dye concentrate (blue ●) to equilibrate to room temperature for 30 min.
- 2 Vortex RNA dye concentrate (blue ●) for 10 s, spin down and add 1  $\mu\text{L}$  of dye into a 65  $\mu\text{L}$  aliquot of filtered gel.
- 3 Vortex solution well. Spin tube at 13000 g for 10 min at room temperature. Use prepared gel-dye mix within one day.



#### Loading the Gel-Dye Mix

- 1 Put a new RNA 6000 Pico chip on the chip priming station.
- 2 Pipette 9  $\mu\text{L}$  of gel-dye mix in the well marked G.
- 3 Make sure that the plunger is positioned at 1 mL and then close the chip priming station.
- 4 Press plunger until it is held by the clip.
- 5 Wait for exactly 30 s then release clip.
- 6 Wait for 5 s. Slowly pull back plunger to 1 mL position.
- 7 Open the chip priming station and pipette 9  $\mu\text{L}$  of gel-dye mix in the wells marked G.
- 8 Discard the remaining gel-dye mix.



#### Loading the Conditioning Solution and Marker

- 1 Pipette 9  $\mu\text{L}$  of the RNA conditioning solution (white ○) into the well marked CS.
- 2 Pipette 5  $\mu\text{L}$  of RNA marker (green ●) in all 11 sample wells and in the well marked S.



#### Loading the Diluted Ladder and Samples

- 1 Pipette 1  $\mu\text{L}$  of the heat denatured and aliquoted ladder in the well marked L.
- 2 Pipette 1  $\mu\text{L}$  of sample in each of the 11 sample wells. Pipette 1  $\mu\text{L}$  of RNA Marker (green ●) in each unused sample well.
- 3 Put the chip horizontally in the IKA vortexer and vortex for 1 min at 2400 rpm.
- 4 Run the chip in the Agilent 2100 Bioanalyzer instrument within 5 min.



## Příloha 4. Postup přípravy Agilent Nano Chipu (převzato z Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide)

### Preparing the Gel

- 1 Pipette 550  $\mu\text{L}$  of RNA gel matrix (red ●) into a spin filter.
- 2 Centrifuge at  $1500\text{ g} \pm 20\%$  for 10 min at room temperature.
- 3 Aliquot 65  $\mu\text{L}$  filtered gel into 0.5 mL RNase-free microcentrifuge tubes. Use filtered gel within 4 weeks. Store at  $4^\circ\text{C}$ .

### Preparing the Gel-Dye Mix

- 1 Allow the RNA dye concentrate (blue ●) to equilibrate to room temperature for 30 min.
- 2 Vortex RNA dye concentrate (blue ●) for 10 seconds, spin down and add 1  $\mu\text{L}$  of dye into a 65  $\mu\text{L}$  aliquot of filtered gel.
- 3 Vortex solution well. Spin tube at  $13000\text{ g}$  for 10 min at room temperature. Use prepared gel-dye mix within one day.



### Loading the Gel-Dye Mix

- 1 Put a new RNA 6000 Nano chip on the chip priming station.
- 2 Pipette 9  $\mu\text{L}$  of gel-dye mix in the well marked G.
- 3 Make sure that the plunger is positioned at 1 mL and then close the chip priming station.
- 4 Press plunger until it is held by the clip.
- 5 Wait for exactly 30 s then release clip.
- 6 Wait for 5 s. Slowly pull back plunger to 1 mL position.
- 7 Open the chip priming station and pipette 9  $\mu\text{L}$  of gel-dye mix in the wells marked G.
- 8 Discard the remaining gel-dye mix.

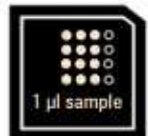


### Loading the Marker

- 1 Pipette 5  $\mu\text{L}$  of RNA marker (green ●) in all 12 sample wells and in the well marked G.

### Loading the Ladder and Samples

- 1 Pipette 1  $\mu\text{L}$  of prepared ladder in well marked G.
- 2 Pipette 1  $\mu\text{L}$  of sample in each of the 12 sample wells. Pipette 1  $\mu\text{L}$  of RNA Marker (green ●) in each unused sample well.
- 3 Put the chip horizontally in the IKA vortexer and vortex for 1 min at 2400 rpm.
- 4 Run the chip in the Agilent 2100 Bioanalyzer instrument within 5 min.





# Příloha 5. Elektrophoresis file run summary

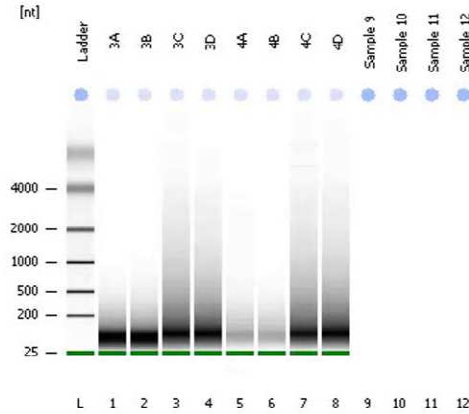
2100 expert\_Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Page 1 of 16

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
 Modified: 22.4.2013 12:02:44

## Electrophoresis File Run Summary



### Instrument Information:

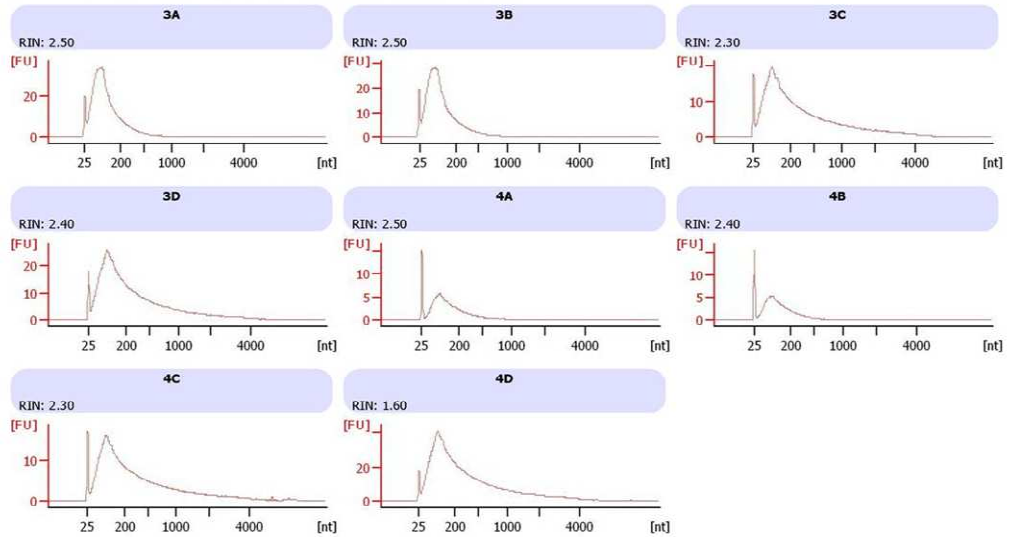
Instrument Name: DE54704332      Firmware: C.01.069  
 Serial#: DE54704332      Type: G2938C

### Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy  
 Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Version: 2.6  
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Eukaryote)  
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

### Chip Information:

Chip Lot #:  
 Reagent Kit Lot #:  
 Chip Comments:



Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Created: 11.4.2013 17:47:33  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)**

Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
3A		✓	RIN: 2.50	
3B		✓	RIN: 2.50	
3C		✓	RIN: 2.30	
3D		✓	RIN: 2.40	
4A		✓	RIN: 2.50	
4B		✓	RIN: 2.40	
4C		✓	RIN: 2.30	
4D		✓	RIN: 1.60	
Sample 9				
Sample 10				
Sample 11				
Sample 12				
Ladder		✓	All Other Samples	

Chip Lot #

Reagent Kit Lot #

Chip Comments :

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano

Created: 11.4.2013 17:47:33

Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Electrophoresis Assay Details****General Analysis Settings**

Number of Available Sample and Ladder Wells (Max.) : 13

Minimum Visible Range [s] : 17

Maximum Visible Range [s] : 70

Start Analysis Time Range [s] : 19

End Analysis Time Range [s] : 69

Ladder Concentration [ng/ $\mu$ l] : 150Lower Marker Concentration [ng/ $\mu$ l] : 0Upper Marker Concentration [ng/ $\mu$ l] : 0

Used Lower Marker for Quantitation

Standard Curve Fit is Logarithmic

Show Data Aligned to Lower Marker

**Integrator Settings**

Integration Start Time [s] : 19

Integration End Time [s] : 69

Slope Threshold : 0,6

Height Threshold [FU] : 0,5

Area Threshold : 0,2

Width Threshold [s] : 0,5

Baseline Plateau [s] : 6

**Filter Settings**

Filter Width [s] : 0,5

Polynomial Order : 4

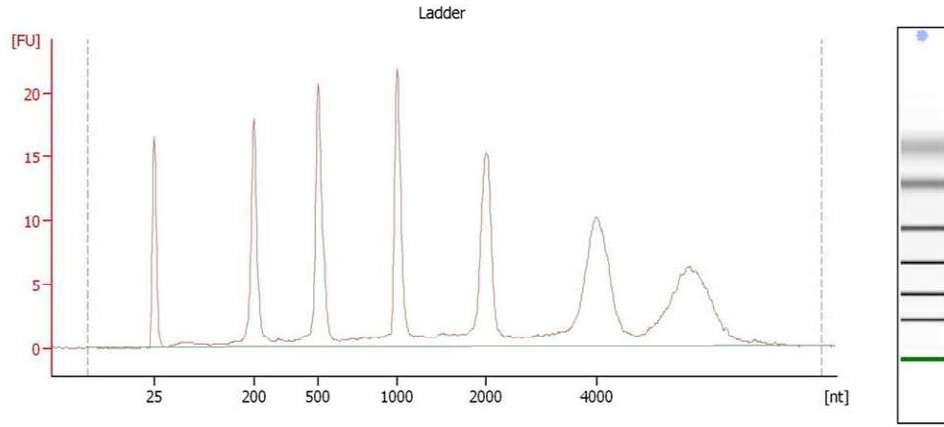
**Ladder**

Ladder Peak	Size
1	25
2	200
3	500
4	1000
5	2000
6	4000

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Electropherogram Summary**



**Overall Results for Ladder**

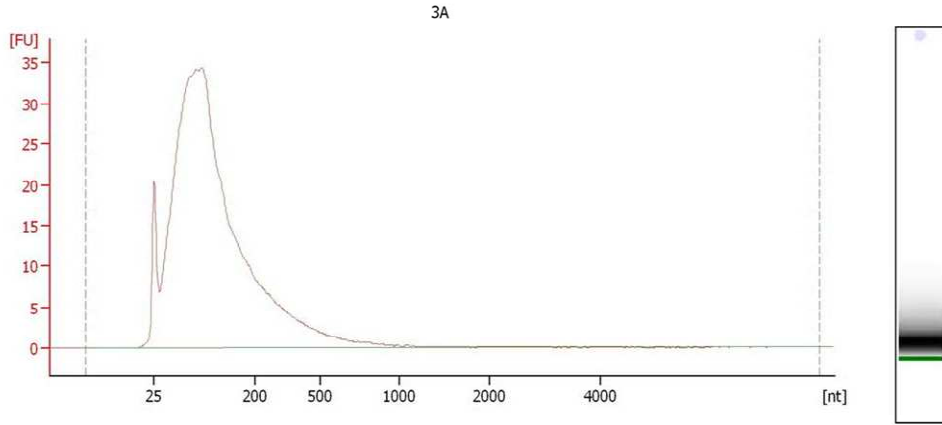
RNA Area: 226,6  
RNA Concentration: 150 ng/μl

Result Flagging Color:   
Result Flagging Label: All Other Samples

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
Modified: 22.4.2013 12:02:44

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 1 : 3A

RNA Area:	571,9	RNA Integrity Number (RIN):	2.5 (B.02.08)
RNA Concentration:	379 ng/µl	Result Flagging Color:	<span style="border: 1px solid black; background-color: #ccccff; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.0	Result Flagging Label:	RIN: 2.50

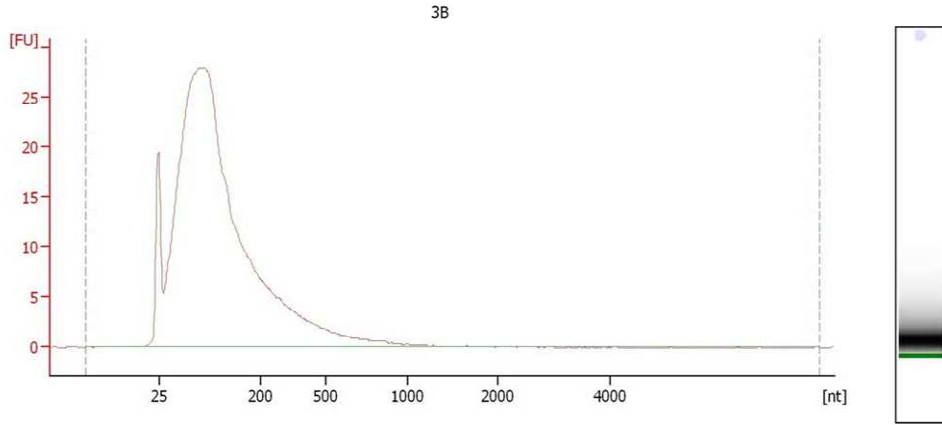
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano

Created: 11.4.2013 17:47:33

Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Modified: 22.4.2013 12:02:44

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 2 : 3B

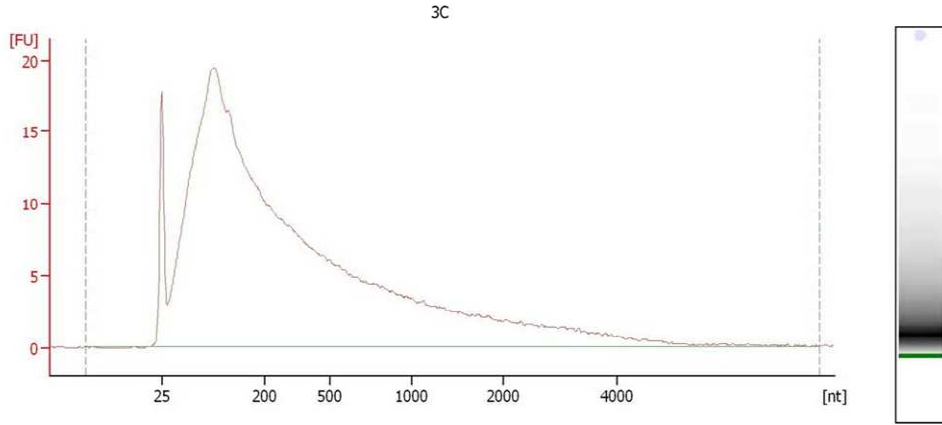
RNA Area: 469,2  
RNA Concentration: 311 ng/µl  
rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0

RNA Integrity Number (RIN): 2.5 (B.02.08)  
Result Flagging Color:   
Result Flagging Label: RIN: 2.50

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
Modified: 22.4.2013 12:02:44

Electropherogram Summary Continued ...



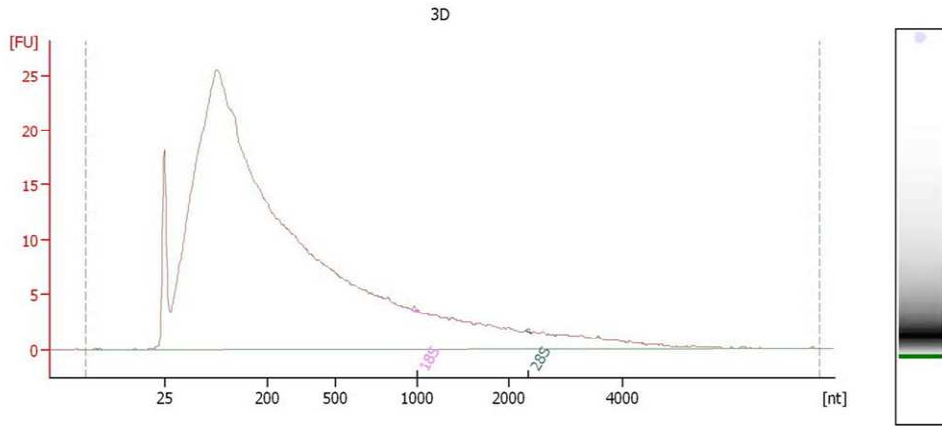
Overall Results for sample 3 : 3C

RNA Area:	520,3	RNA Integrity Number (RIN):	2.3 (B.02.08)
RNA Concentration:	345 ng/ $\mu$ l	Result Flagging Color:	<span style="border: 1px solid black; background-color: #ccccff; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.0	Result Flagging Label:	RIN: 2.30

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
 Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 4 : 3D**

RNA Area:	648,2	RNA Integrity Number (RIN):	2.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	429 ng/µl	Result Flagging Color:	<span style="border: 1px solid black; background-color: #ccccff; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,4	Result Flagging Label:	RIN: 2.40

**Fragment table for sample 4 : 3D**

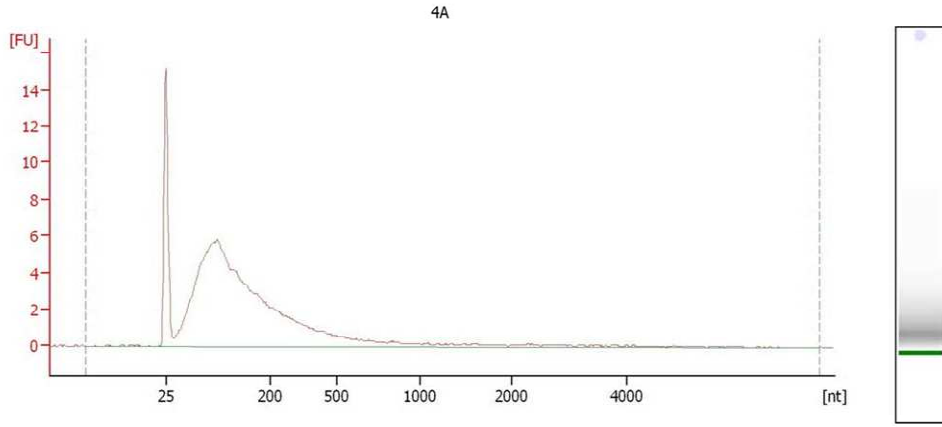
Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	969	1 058	0,3	0,0
28S	2 298	2 389	0,1	0,0



Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
Modified: 22.4.2013 12:02:44

Electropherogram Summary Continued ...

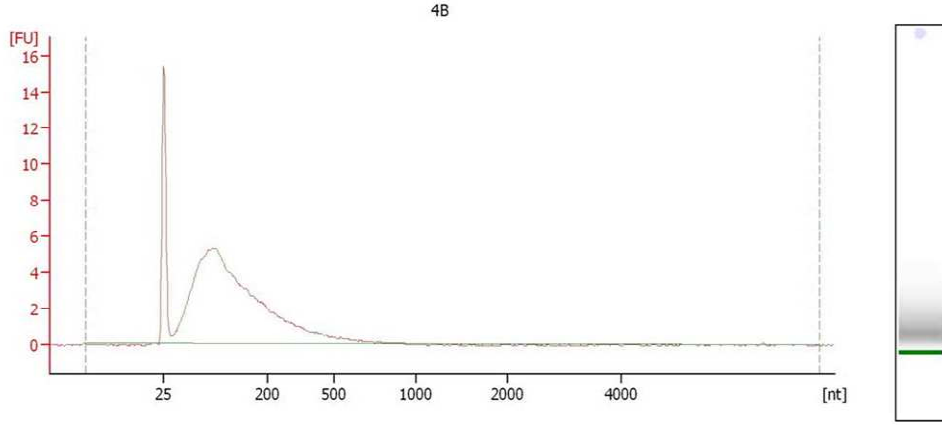


Overall Results for sample 5 : **4A**

RNA Area:	104,9	RNA Integrity Number (RIN):	2.5 (B.02.08)
RNA Concentration:	69 ng/μl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #ccccff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN: 2.50

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Created: 11.4.2013 17:47:33  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 6 : 4B**

RNA Area:	89,9	RNA Integrity Number (RIN):	2.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	59 ng/μl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #ccccff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN: 2.40

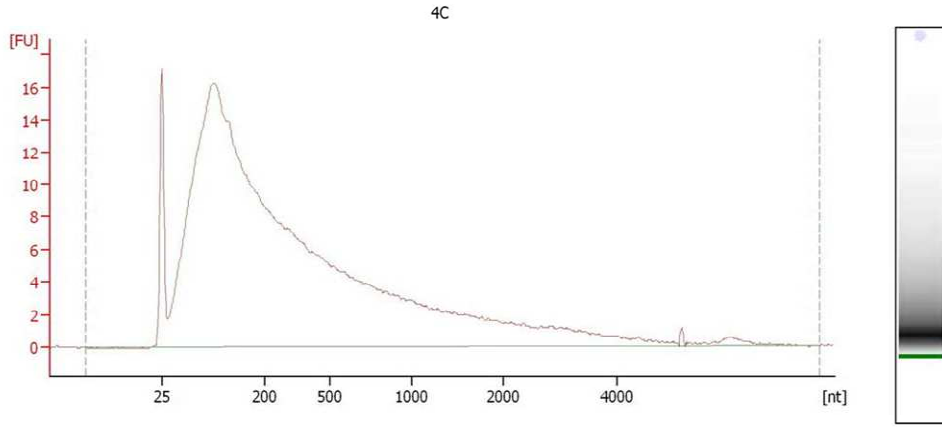
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano

Created: 11.4.2013 17:47:33

Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Electropherogram Summary Continued ...**



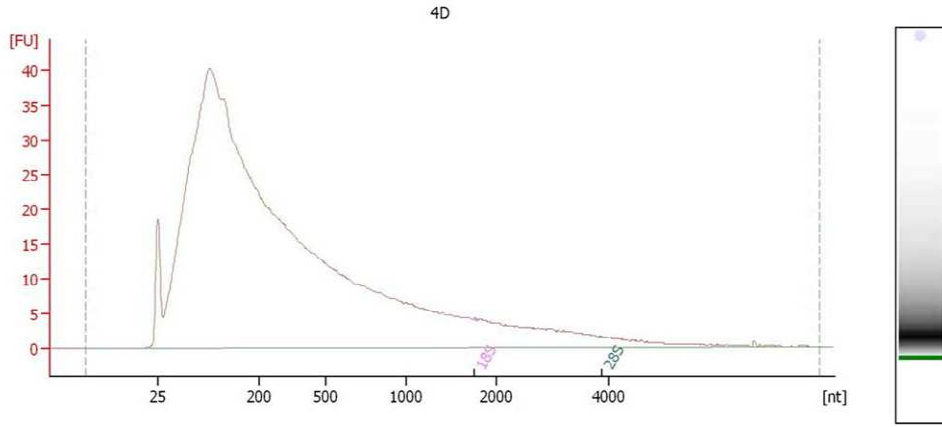
**Overall Results for sample 7 : 4C**

RNA Area:	434,9	RNA Integrity Number (RIN):	2.3 (B.02.08)
RNA Concentration:	288 ng/µl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #ccccff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN: 2.30

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
 Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 8 : 4D**

RNA Area:	1 076,1	RNA Integrity Number (RIN):	1.6 (B.02.08)
RNA Concentration:	712 ng/µl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #ccccff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,4	Result Flagging Label:	RIN: 1.60

**Fragment table for sample 8 : 4D**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 741	1 790	0,1	0,0
28S	3 802	3 986	0,1	0,0

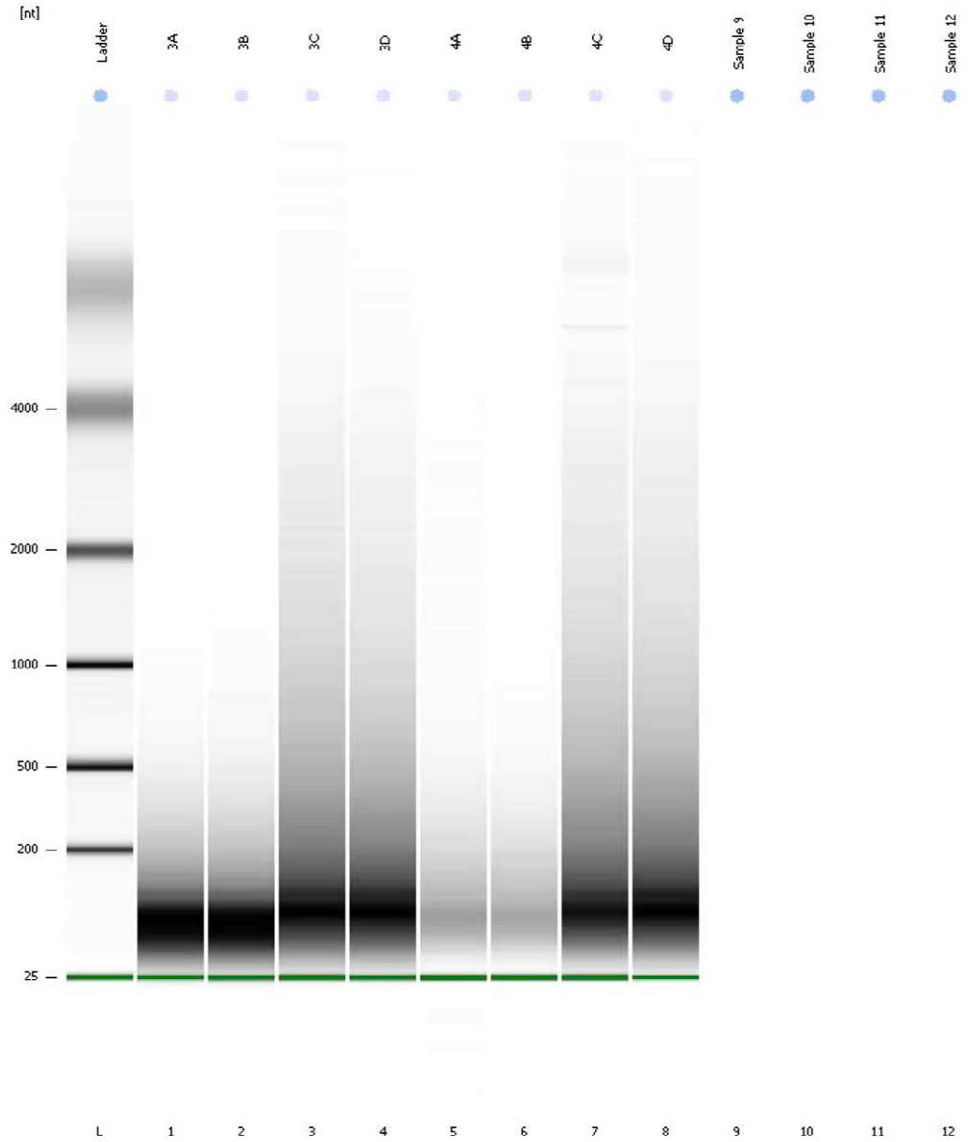
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano

Created: 11.4.2013 17:47:33

Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Modified: 22.4.2013 12:02:44

Gel Image

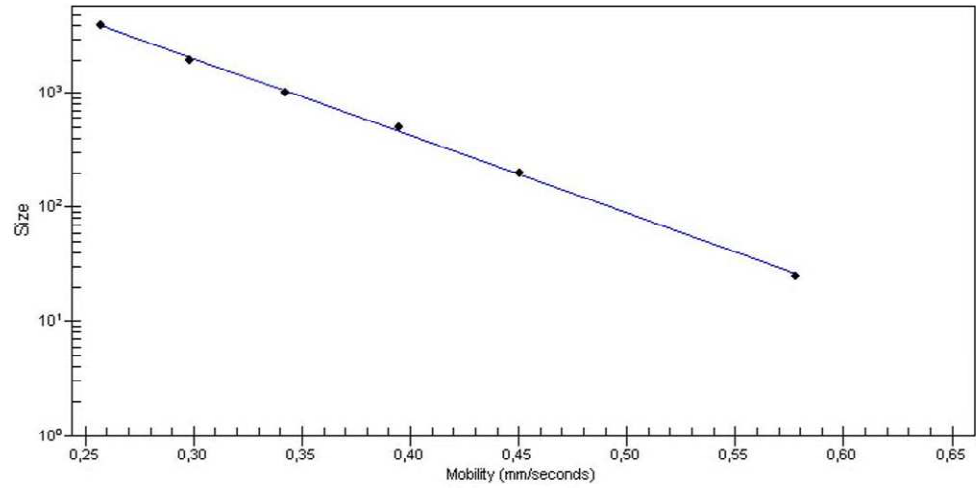


Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad

Created: 11.4.2013 17:47:33  
Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Curves**

**Standard Curve**



---

Assay Class:	Eukaryote Total RNA Nano	Created:	11.4.2013 17:47:33
Data Path:	C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE54704332_2013-04-11_17-47-33.xad	Modified:	22.4.2013 12:02:44

**Invalid Samples**

Sample 9 has not been run, no results available.  
Sample 10 has not been run, no results available.  
Sample 11 has not been run, no results available.  
Sample 12 has not been run, no results available.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Created: 11.4.2013 17:47:33  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE54704332\_2013-04-11\_17-47-33.xad Modified: 22.4.2013 12:02:44

**Run Logbook**

Description	Number	Source	Category	Sub Category	Time	Time Zone	User	Host
Run ended on port 1 (Number of wells acquired: 9)		Instrument	Run		11.4.2013 18:05:51	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1
Run started on port 1 (File: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\Data\2013-04-11\2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE54704332_2013-04-11_17-47-33.xad)		Instrument	Run		11.4.2013 17:47:39	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1
Product Number : G2938C		Instrument	Run		11.4.2013 17:47:39	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1
Name :		Instrument	Run		11.4.2013 17:47:39	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1
Vendor : Agilent Technologies		Instrument	Run		11.4.2013 17:47:38	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1
Serial# : DE54704332		Instrument	Run		11.4.2013 17:47:38	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1
Firmware : C.01.069		Instrument	Run		11.4.2013 17:47:38	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1
Cartridge : Electrode		Instrument	Run		11.4.2013 17:47:38	(GMT +02:00) Střední Evropa (běžný čas)	Administrator	OEM-1