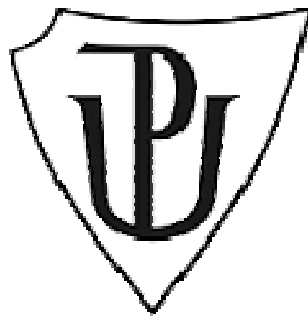


Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie a genetiky



**Minimální reziduální choroba u karcinomu
plic**

Bakalářská práce

Monika Vahalíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Mgr. Andrea Benedíková

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

V Olomouci dne

.....

Monika Vahalíková

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Mgr. Andree Benedíkové za odborné vedení, cenné rady a připomínky, poskytnutí literatury a trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracovávání bakalářské práce a zpracování výsledků. Dále děkuji Věře Růžkové za pomoc při práci v laboratoři.

Souhrn:

Karcinom plic je po kolorektálním karcinomu a karcinomu prsu nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním v České republice. Neustále se hledají potenciální markery pro přesnější diagnostiku tohoto onemocnění. Mezi ně patří i LunX (plicní specifický X protein) a c-met (receptor pro růstový faktor hepatocytů). Oba tyto markery můžeme využít pro detekci minimální reziduální choroby (MRD) u pacientů s nemalobuněčným karcinodem plic (NSCLC). MRD rozumíme přítomnost izolovaných nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byl odstraněn primární tumor, a který nejeví známky systémového onemocnění. Nejcitlivější metodou pro detekci MRD je real-time reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (real-time RT-PCR). Cílem této studie bylo navrhnout, optimalizovat a ověřit vhodnost markerů LunX a c-met pro detekci MRD u plic pomocí real-time PCR. Stanovili jsme cut-off hodnoty pro tyto markery v krvi a kostní dřeni, které jsou využívány k posouzení MRD positivity či negativity při vyšetření vzorků pacientů s NSCLC. Prokázali jsme vysokou specifitu LunX pro plicní karcinom. Jeho míra exprese je zároveň závislá na klinickém stádiu pacientů. Marker c-met specifitu pro plicní nádory postrádá, je však možné jeho využití v kombinaci s jinými markery. Zaznamenali jsme vyšší míru exprese c-met v krvi z plicní žíly u pacientů s postižením lymfatických uzlin proti pacientům s histologicky negativními uzlinami. Detekce MRD u karcinomu plic za použití real-time RT-PCR s markery LunX a c-met je dle naší studie potenciálním prognostickým faktorem.

Summary:

Lung cancer is the most frequently occurring cancer disease in Czech Republic after colorectal and breast cancer. Unceasingly, there is searching for potential markers for accurate diagnosis of this disease, where LunX (Lung Specific X Protein) and c-met (Hepatocyte Growth Factor Receptor) belongs to. Both of these markers can be used for minimal residual disease (MRD) detection in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). MRD means the presence of isolated tumour cells in the body of patient, who underwent curative surgery and is without any signs of cancer systemic spreading. The real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) is the most sensitive method for MRD detection. The aim of this study was to design, optimize and verify the suitability of LunX and c-met markers for MRD detection in lungs. We set the cut-off values for these markers in the blood and bone marrow, which are used to assess the MRD positivity or negativity during the examination of NSCLC patient's samples. We demonstrated high specificity of LunX for lung cancer. The level of its expression depends on the clinical stage of patients. Marker c-met lacks specificity for lung cancer, it is possible to use it in combination with other markers. We noticed a higher level of c-met expression in the pulmonary blood in patients with lymph nodes involvement than in patients with histologically negative nodes. MRD detection in lung cancer using real-time RT-PCR with LunX and c-met markers is, according to our study, a potential prognostic factor.

Obsah

I. Cíle práce	8
II. Úvod	9
III. Teoretická část	11
1 Plíce	11
1.1 Tvar a popis	11
1.2 Vlastnosti plicní tkáně	11
1.3 Karcinom plic	12
1.3.1 Epidemiologie	12
1.3.2 Typy nádorů	14
1.3.3 Etiologie	15
1.3.4 Klinický obraz	16
1.3.5 Diagnostika a staging	16
1.3.6 Terapie	17
2 Minimální reziduální choroba (MRD)	19
3 Detekce cirkulujících nádorových buněk	20
4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
5 Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)	24
6 Real-time reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Real-time RT-PCR)	26
6.1 Detekce produktů Real-time RT-PCR	26
6.1.1 DNA-vazebná barviva (DNA-binding dyes)	27
6.1.2 Hybridizační próby	27
6.1.3 Hydrolytické próby	27
6.1.4 Vlásokové próby	28
7 Detekce minimální reziduální choroby pomocí Real-time PCR	30
7.1 Detekce minimální reziduální choroby u karcinomu plic	30
7.1.1 Markery používané pro detekci cirkulujících nádorových buněk u nemalobuněčného karcinomu plic	31
7.1.1.1 Plicní specifický X protein (LunX)	31
7.1.1.2 Protoonkogenní protein c-met	32
IV. Experimentální část	34

1	Metodika.....	34
1.1	Izolace RNA a reverzní transkripce.....	34
1.1.1	Materiál	34
1.1.2	Přístroje.....	35
1.1.3	Postup.....	35
1.2	Real-time PCR.....	37
1.2.1	Primery a próby	38
1.2.1.1	Plicní specifický X protein (LunX)	38
1.2.1.2	Protoonkogenní protein c-met.....	38
1.2.1.3	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH)	39
1.2.1.4	Ředění primerů a prób.....	39
1.2.2	Negativní kontrola, pozitivní kontrola, specifické standardy	40
1.2.2.1	Negativní kontrola.....	40
1.2.2.2	Pozitivní kontrola	41
1.2.2.3	Specifické standardy.....	41
1.2.3	Další složky reakční směsi	41
1.2.4	Materiál	43
1.2.5	Přístroje.....	44
1.2.6	Postup.....	44
1.3	Pacienti.....	44
1.4	Statistické metody.....	45
2	Výsledky.....	46
2.1	Stanovení cut-off hodnot pro expresi LunX a c-met v krvi a kostní dřeni	46
2.2	Stanovení specificity LunX a c-met pro karcinom plic.....	47
2.3	Vyšetření exprese LunX a c-met u souboru pacientů s karcinomem plic.....	49
3	Diskuse.....	53
4	Závěr	55
V.	Seznam použité literatury.....	56
VI.	Seznam použitých zkratk	64

I. Cíle práce

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

Naučit se izolaci RNA z různých typů vzorků, event. různými metodikami a stanovit expresi vybraných markerů ve vzorcích pacientů s karcinomem plic metodikou kvantitativní RT-PCR.

Odhadnout možnosti použití vybraných markerů pro detekci MRD u karcinomu plic, v tomto ověření a dalším sledování vybraných pacientů event. pokračovat v rámci diplomové práce.

II. Úvod

Rakovina je významným problémem veřejného zdraví v Evropě - u 1 ze 3 Evropanů je během života diagnostikována rakovina a 1 ze 4 úmrtí v Evropě je způsobeno rakovinou. V roce 2004 byla rakovina diagnostikována přibližně 2,9 milionu Evropanů (54% muži, 46% ženy), a 1,7 milionu na rakovinu zemřelo (56% muži, 44% ženy) (Boyle, Ferlay, 2005).

V České republice bylo v roce 2008 do Národního onkologického registru ČR nahlášeno celkem 77 541 případů zhoubných novotvarů, z toho 39 299 u mužů a 38 242 případů u žen. Každý rok počet nově zjištěných nádorů roste hlavně u mužů, ale také u žen.

Zatímco úroveň incidence novotvarů v České republice v dlouhodobém pohledu roste, úmrtnost na zhoubné nádory vykazuje trendy opačné. K poklesu úmrtnosti dochází již od druhé poloviny 90. let u obou pohlaví, i když výrazněji se projevuje u mužů. V roce 2008 byla u mužů i u žen zaznamenána dlouhodobě nejnižší věkově standardizovaná míra úmrtnosti (www.uzis.cz).

Snižování úmrtnosti je především zásluhou moderní medicíny, včasného zjištění onemocnění a způsobů léčby.

Existuje mnoho v současnosti užívaných metod diagnostiky zhoubných nádorů. Mezi nejčastěji používané diagnostické metody patří vyšetření buněk nebo tkání metodami cytologie a histologie (speciální histologická a cytologická barvení např. mucikarmin na hlen u karcinomů), dále imunohistochemie (detekce proteinů pomocí protilátek) a na ně navazující rychle se rozvíjející metody molekulární diagnostiky (PCR, RT-PCR, Real-time RT-PCR, RFLP, FISH, PRINS, blotovací metody a jiné).

Poté co patolog určí typ nádoru, musí upřesnit jeho stadium, aby zjistil rozsah invaze, kompletnost resekce a u některých nádorů také jejich chování. K určení stadia nádoru se používá tzv. patologický staging opřený o mikroskopické vyšetření.

V posledních letech se rozvinula diagnostika tzv. minimální reziduální choroby (Minimal Residual Disease, MRD). Tento pojem byl původně zaveden u leukemií a lymfomů při monitorování ústupu onemocnění nebo jeho hrozícího relapsu při vyšetření kostní dřeně. Postupně však vychází najevo, že sledování

MRD má význam i u solidních nádorů. Pomocí molekulárních metod prokazujeme diseminaci zhoubného nádoru do kostní dřeně mnohem častěji, než bylo dosud možné zjistit pomocí klasické cytologie (Koutecký *et al.*, 2004).

III. Teoretická část

1 Plíce

Plíce jsou párové orgány ležící v pravé a v levé pohrudniční dutině, v nichž při dýchání probíhá výměna plynů mezi vzduchem a krví. V plicích se větví bronchiální strom končící plicními sklípky. Spolu s ním běží i plicní tepny a žíly, sledované řídkým vazivem, nervovými pleteněmi a mízními cévami. Vzduch do plic přivádějí a z plic odvádějí bronchy, které se v plicích více než dvacetkrát větví. Výměna O_2 a CO_2 mezi krví a vzduchem se uskutečňuje přes stěnu plicních sklípků a přes stěnu kapilár (Petrovický *et al.*, 2001).

1.1 Tvar a popis

Plíce vyplňují pleurální dutinu a kopírují její tvar. Jsou-li fixovány uvnitř organismu, jsou na nich patrné otisky sousedních orgánů (hlavně mediastinálních), což je způsobeno měkkou konzistencí plic (Petrovický *et al.*, 2001). Každá plíce má základní tvar kužele s otupeným vrcholem a se zploštěnou a vkleslou mediální plochou obrácenou proti mediastinu a srdci (Čihák, 1988).

Pravá a levá plíce, jsou rozděleny hlubokými zářezy na plicní laloky. Pravá plíce má laloky tři, levá jen dva. Do každého plicního laloku vstupuje laloková průduška větvící se na hlavní průdušky (Petrovický *et al.*, 2001).

1.2 Vlastnosti plicní tkáně

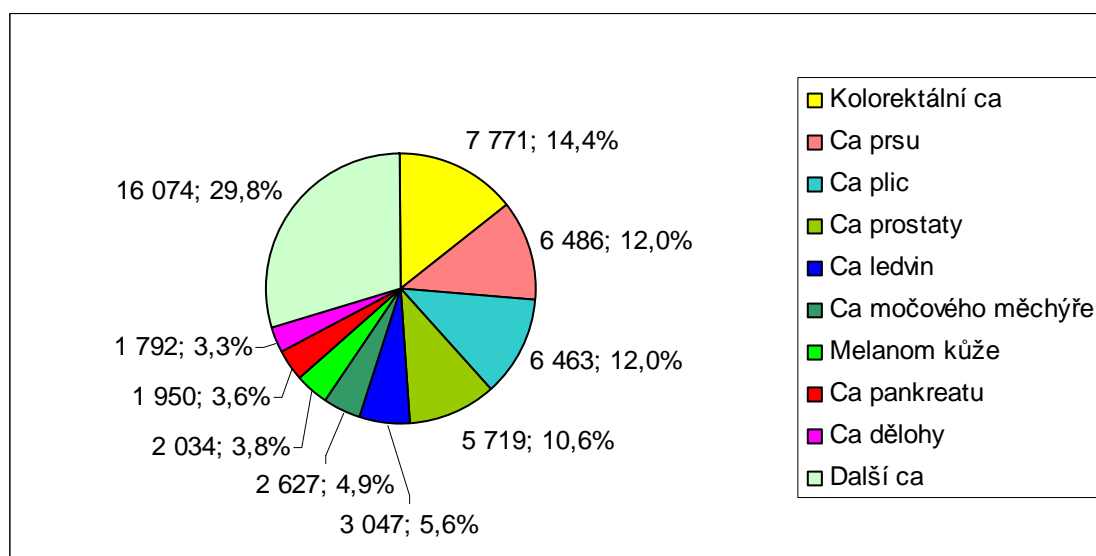
U novorozence a v raném dětství je barva plic nejprve růžová, pak plíce přijímají šedavý nádech, později s šedočerným mramorováním na povrchu. Postupná změna je způsobena vdechovaným prachem a částicemi sazí. Zbarvení plic je ovlivněno i povahou vdechovaného prachu (je známá narezlá

barva plic u dělníků železáren, bělavá barva u pracovníků vápenek, apod.) (Čihák, 1988).

Jedna plice má objem asi 2 l, ale její hmotnost je jen 200 - 400 g. Pravá plice je asi o 1/10 objemnější než levá. Uvádí se, že plice obsahují 300 - 400 milionů sklípků, které u dospělého při vdechu zaujímají plochu kolem 100 m² (Petrovický *et al.*, 2001).

1.3 Karcinom plic

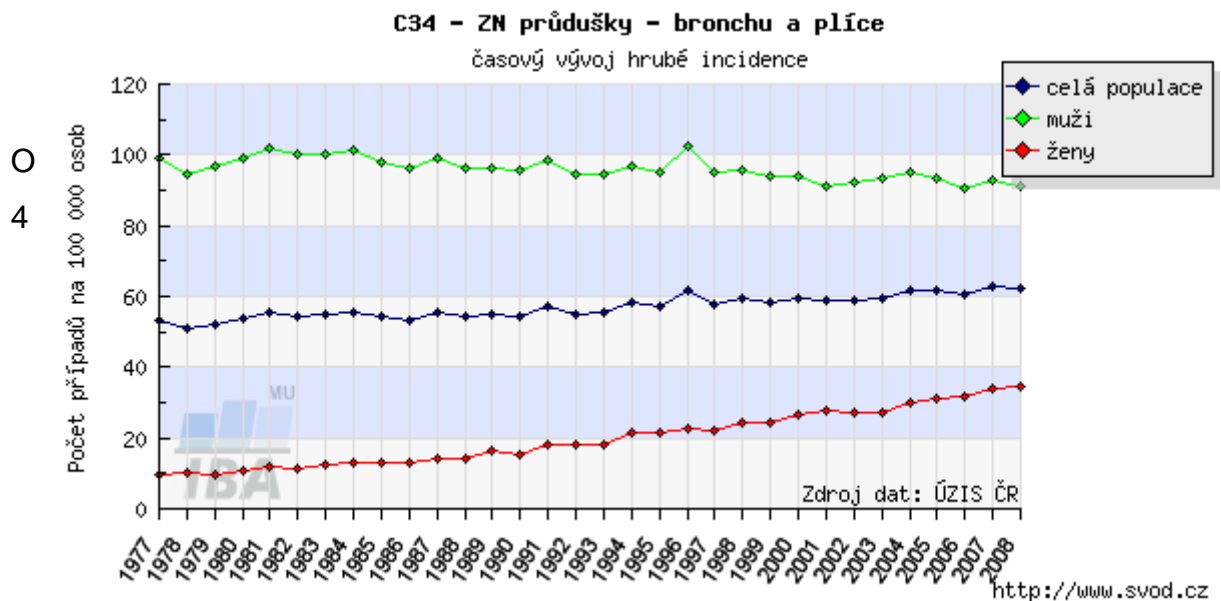
Karcinom plic je po kolorektálním karcinomu a karcinomu prsu nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním v České republice. U žen je zaznamenán nejvyšší výskyt karcinomu prsu a u mužů pak karcinomu prostaty.



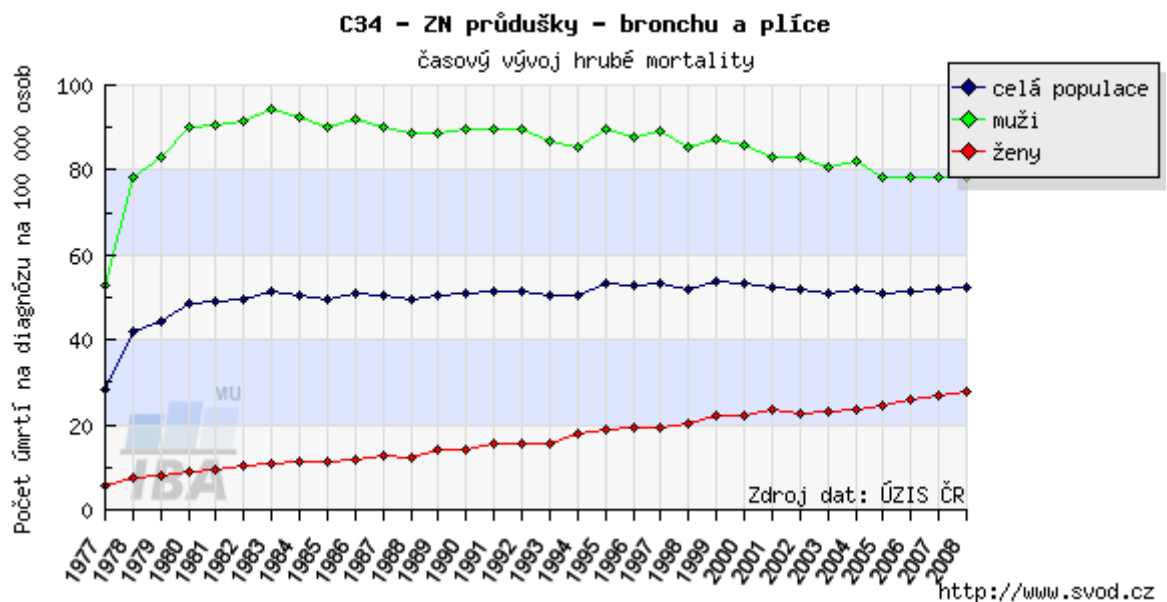
Obr. 1: Incidence nejčastěji se vyskytujících zhoubných nádorů v České republice za rok 2008 (Upraveno dle: www.globocan.iarc.fr).

1.3.1 Epidemiologie

Karcinom plic postihuje převážně muže, ale v posledních letech došlo u mužů k pozvolnému poklesu incidence i mortality, zatímco u žen dochází k postupnému nárůstu.

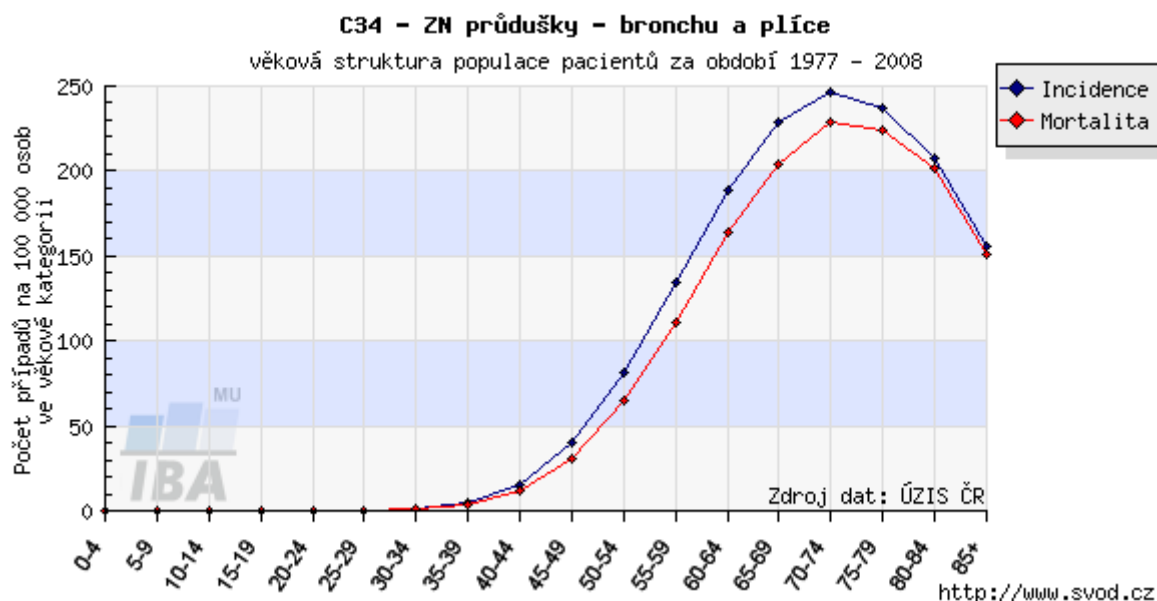


Obr. 2: Časový vývoj hrubé incidence v počtu případů na 100 000 osob – srovnání mužů a žen (www.svod.cz)



Obr. 3: Časový vývoj hrubé mortality v počtu případů na 100 000 osob – srovnání mužů a žen (www.svod.cz)

Onemocnění se objevuje převážně u starších osob ve věku kolem 70 let. V posledních letech dochází ke zvýšení výskytu u mladších věkových skupin, způsobenému patrně zvyšujícím se počtem mladých kuřáků.



Obr. 4: Věkově specifická incidence a mortalita v počtu případů na 100 000 osob (www.svod.cz)

1.3.2 Typy nádorů

Nádory obecně dělíme na pravé a nepravé. Nepravé nádory jsou útvary, které svým vzhledem nádory připomínají, ale vznikly jiným způsobem než abnormálním dělením buněk, např. nahromaděním tekutiny (cysty). Pravé nádory dělíme na benigní, nezhoubné, ohraničené od ostatní tkáně, nešířící se metastázami, a na maligní, prorůstající do okolí se schopností se hematogenně (krví), lymfogenně (lymfatickými cestami) nebo přímým šířením rozsévat do ostatních částí těla a zakládat metastázy (Čapov *et al.*, 2008; Petruželka *et al.*, 2003).

Zhoubné nádory plic patří k nejčastěji se vyskytujícím nádorům v lidském organismu. Většinou se jedná o karcinomy, které vychází ze sliznice bronchů, tedy o bronchogenní karcinomy (Mačák, Mačáková, 2004). Bronchogenní karcinom vyrůstá buď z centrální části bronchiálního stromu (centrální forma), nebo z periferních bronchů (periferní forma). V malém procentu vychází nádorové bujení z výstelky průdušek a alveol (bronchioloalveolární forma) (Gvozdják *et al.*, 1995). Podle biologického chování rozlišujeme dva typy bronchogenního karcinomu, malobuněčný karcinom (Small Cell Lung

Carcinoma, SCLC) a nemalobuněčný karcinom (Non-Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC).

Asi 20 % všech bronchogenních karcinomů představuje centrálně lokalizovaný malobuněčný karcinom. Výrazně se odlišuje od všech ostatních variant plicních karcinomů, velmi brzy metastazuje a v období diagnózy mají dvě třetiny nemocných již vzdálené mikrometastázy. Buňky nádoru se vyznačují mimořádnou hormonální aktivitou a produkují četné specifické peptidy a aminy, které způsobují paraneoplastické syndromy (Klener *et al.*, 1999).

Nemalobuněčný karcinom můžeme rozdělit na tři typy, které se od sebe liší morfologicky, ale jejich biologické chování je podobné. Prvním a nejčastějším typem je epidermoidní (spinocelulární) karcinom. Většinou se nachází centrálně při rozvětvení segmentálních nebo subsegmentálních bronchů a může způsobit uzávěr bronchů. Často metastazuje, především do mediastinálních uzlin, přilehlé plicní tkáně a může působit syndrom horní duté žíly. Asi u poloviny nemocných se objevují extrathorakální metastázy (zejména do jater a kostí). Dalším typem nemalobuněčného karcinomu je adenokarcinom, jenž tvoří asi 30 % plicních nádorů. Často vzniká u lidí, kteří prodělali plicní onemocnění jako tuberkulózu, fibrózu nebo pneumokoniózu a vyskytuje se i u nekuřáků. Poměrně brzy metastazuje, hlavně do jater, nadledvin a mozku. Posledním typem je málo diferencovaný velkobuněčný karcinom. Vyskytuje se asi v 15 % případů a stejně jako adenokarcinom je lokalizován v periferii (Klener *et al.*, 1999).

1.3.3 Etiologie

Za nejčastější příčinu vzniku většiny výše jmenovaných typů karcinomu plic se považuje kouření. Kuřáci, kteří vykouří po dobu 20 let denně více než 20 cigaret, vykazují 20x vyšší riziko vzniku bronchogenního karcinomu než nekuřáci (Klener *et al.*, 1999). Kouření způsobuje 90 % úmrtí na karcinom plic u mužů a 75-80 % úmrtí u žen. Cigaretový kouř obsahuje více jak 4000 chemických látek, z nich 60 patří mezi prokázané lidské karcinogeny (Adam *et al.*, 2003).

Další významnou příčinou vzniku plicního karcinomu je inhalace výfukových plynů obsahujících aromatické uhlovodíky a dioxiny, radiace

(vdechování radonu) nebo vdechování dalších chemických látek při jejich průmyslovém zpracování (např. azbest, nikl, chróm) (Mačák, Mačáková, 2004). Lidé, vystavení ionizujícímu či UV záření, mykotoxinům, chlorovaným uhlovodíkům a podobně, patří taktéž k ohrožené skupině. Vznik onemocnění je také závislý na genetických predispozicích a znečištění ovzduší, známý je například nepříznivý vliv oxidu siřičitého (Klener *et al.*, 1999).

1.3.4 Klinický obraz

Nádory plic jsou obvykle v raných stádiích bezpříznakové. Spolu s jejich růstem se začínají objevovat příznaky, které můžeme rozdělit na centrální, intrathorakální a extrathorakální (Gvozdják *et al.*, 1995). Nejčastějším příznakem je kašel. Protože rakovina plic často postihuje lidi s chronickou bronchitidou, při níž je kašel samozřejmostí, rozhodujícím údajem je změna charakteru kašle. Může být více dráždivý, záchvatovitý, může se změnit množství a charakter vykašlávaného hlenu. Dalšími příznaky jsou teplota, hemoptýza (vykašlávání krve) a chrapot. Příznaky pokročilejšího onemocnění jsou dušnost, nechutenství, úbytek hmotnosti a bolesti na hrudi. U některých typů nádorů se může objevit tzv. Pancoastův syndrom. Jedná se o soubor příznaků zahrnujících bolesti ramene a paže, atrofii svalů ruky a slabost. V souvislosti s tímto syndromem se může objevit také tzv. Horneova trias (zúžení zornice, stejnostranný pokles očního víčka a zdánlivé vklesnutí oka do očnice). Rostoucí nádor může utlačovat cévní stěnu horní duté žíly a tím bránit dostatečnému průtoku krve do pravé síně srdeční, vzniká tzv. syndrom horní duté žíly. Způsobuje otok obličeje a paže, kašel, dušnost, bolest hlavy, dysfagii (porucha polykání) nebo synkopu (náhlá a krátkodobá ztráta vědomí) (Dítě *et al.*, 2007).

1.3.5 Diagnostika a staging

Diagnostika je založena na bioptickém, resp. cytologickém vyšetření. Vzorek potřebný pro vyšetření se při centrální lokalizaci nádoru získává za použití bronchofibroskopie (kartáčová biopsie) a různých přídatných metod

(bronchiální výplach nebo laváž, transbronchiální punkce lymfatických uzlin). Součástí každého vyšetření je CT (Computed Tomography), HRCT (High Resolution Computed Tomography) a PET (Positron Emission Tomography), případně PET-CT (Positron Emission Tomography – Computed Tomography), provádí se také rentgenové vyšetření hrudníku (Klener *et al.*, 1999).

Diagnostika periferního nádoru je složitější, někdy je třeba použít transparietální aspirační biopsii (odběr vpichem skrz hrudní stěnu), popř. mediastinoskopii (pozorování postižení mediastinálních uzlin v celkové anestezii) či videotorakoskopii (operační metoda, při které se vpichy v mezižebří zavádí přístroje, kterými je možné prohlédnout plíce a pleurální dutinu) (Klener *et al.*, 1999; Klener, 2002).

Při laboratorním vyšetření stanovujeme nádorové markery – karcinoembryonální antigen (Carcinoembryonic Antigen, CEA), tkáňový polypeptidový antigen (Tissue Polypeptide Antigen, TPA), antigen skvamózních nádorových buněk (Squamous Cell Carcinoma Antigen, SCC), neuron specifická enolasa (Neuron Specific Enolase, NSE), které se využívají k monitorování léčby a zjištění eventuální recidivy nádoru. K časně detekci se zdají být užitečnější biomarkery – růstové faktory nádorů např. bombesin, transformující růstový faktor alfa (Transforming Growth Factor Alpha, TGF α) nebo insulinu podobný růstový faktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF I). Některé markery (chromogranin A, epidermální růstový faktor) a cytogenetické změny slouží k diferenciaci malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu (Klener *et al.*, 1999).

V klinické praxi rozlišujeme čtyři stadia nádorů dle rozsahu a pokročilosti onemocnění. Časné stádium I, pozdější stádium II, které je charakterizováno postižením regionálních mízních uzlin, stádium III zahrnující nemocné s rozsáhlým nádorem a stádium IV zahrnující pacienty se známkami vzdálených metastáz (Klener *et al.*, 1999).

1.3.6 Terapie

Největší naději na přežití mají pacienti s nemalobuněčným karcinodem plic v raném stádiu (I-II-IIIa stádium), který lze odstranit chirurgicky. Operabilita

nádoru vyplývá z funkčního stavu nemocného, je závislá na jeho věku, stavu kardiovaskulárního systému a funkčních rezervách plic. Mezi paliativní chirurgické výkony řadíme resekci větší části nádoru k usnadnění chemoterapie nebo k odstranění mechanického tlaku na okolní struktury (Klener *et al.*, 1999).

Kromě chirurgického zákroku bývá pacient také léčen pomocí radioterapie a to buď cíleně na vlastní nádor, nebo symptomaticky k ovlivnění vzniklých komplikací (syndrom komprese horní duté žíly, lokální bolesti, metastáza do CNS). Radioterapie má přitom svá omezení vyplývající z velikosti nádoru a jeho rozsahu. Je vhodná pro pacienty s horším stavem, kteří netolerují operaci nebo chemoterapii. V současné době se používá druh velmi přesné radioterapie tzv. IMRT (Intensity-Modulated Radiation Therapy), která využívá počítačem řízené lineární urychlovače, jež umožňují zacílit přesné dávky záření na zhoubný nádor, nebo do určité oblasti uvnitř nádoru, a umožňuje měnit intenzitu záření během léčby. K léčbě se často používá kombinace radioterapie a chemoterapie. Zdá se totiž, že malé dávky cisplatinu používané při chemoterapii mohou zvýšit účinek záření (Klener *et al.*, 1999; www.irsa.org).

V některých případech můžeme také použít lokální endobronchiální terapii, která umožňuje obnovení průchodnosti dýchacích cest. K tomuto účelu se používá laser, lokální aplikace zářiče, popřípadě kryoterapie (Klener *et al.*, 1999; Čapov *et al.*, 2008).

Průběh malobuněčného karcinomu je natolik rychlý, že naději na úspěch může mít jen systémová léčba pomocí chemoterapie, případně v kombinaci s radioterapií. Mezi moderní metody chemoterapie patří biologická léčba, která se zaměřuje na molekuly a pochody specifické pro nádorové buňky. Léky používané při biologické léčbě mohou být např. inhibitory tyrosinkinázy (erlotinib), jež zablokují enzym tyrosinkinázu a tedy i přenos signálu do buňky. Buňka přestane růst a vrací se jí schopnost apoptózy. Pro léčbu některých solidních nádorů např. NSCLC byl v USA schválen lék crizotinib, který je inhibitorem fúzního proteinu ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase). Dále se používají monoklonální protilátky zaměřené specificky proti jednomu antigenu. Mezi ně patří např. cetuximab, který se váže na receptor pro epidermální růstový faktor, což je antigen nacházející se na povrchu určitých nádorových buněk. Nádorová buňka pak nemůže přijímat zprávy, které potřebuje pro svůj růst a metastázování (Klener *et al.*, 1999; www.linkos.cz; www.cancer.gov).

2 Minimální reziduální choroba (MRD)

Minimální reziduální chorobou jsou nazývány subklinické zbytky nádorů, které jsou nejčastější příčinou rekurence onkologických onemocnění (Černý *et al.*, 2003). Časné šíření nádorových buněk do lymfatických uzlin, kostní dřeni (Hosch *et al.*, 2001) a jiných orgánů představuje významný krok při vzniku metastáz (Ignatiadis, Reinholz, 2011). Podle Pantel *et al.*, 1999, je metastatický relaps u pacientů se solidními nádory způsoben systémovým předoperačním, nebo peroperačním šířením nádorových buněk.

Cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumour Cells, CTCs) jsou detekovány v krvi, kostní dřeni či lymfatickém systému pacienta, u něhož byla provedena resekce primárního tumoru, a který je bez známek klinického onemocnění. Tyto izolované nádorové buňky můžeme považovat za prekurzory mikrometastáz, přestože jejich koncentrace je hluboko pod detekčním limitem standardních vyšetřovacích metod jako jsou imunohistochemie nebo průtoková cytometrie (Pantel *et al.*, 2008; Lacroix, 2006; Paterlini-Brechot *et al.*, 2007).

Přítomnost jednotlivých nádorových buněk v kostní dřeni a periferní krvi může být detekována pomocí imunologických či molekulárních metod a je považována za klinicky významný prognostický faktor. Charakteristika těchto buněk umožňuje zlepšit hodnocení rizika, výběr a monitorování léčby a může mít vliv na vývoj nových terapeutických látek (Pantel *et al.*, 1999; Ignatiadis, Reinholz, 2011).

3 Detekce cirkulujících nádorových buněk

K detekci CTCs se používá průtoková cytometrie, nebo metody klasické cytogenetiky a imunocytochemie. Tyto techniky jsou ale poměrně málo citlivé vzhledem k jejich závislosti na interakci protilátek s antigeny umístěnými na povrchu nádorových buněk. Naproti tomu mohou vykazovat falešně pozitivní výsledky, dojde-li ke zkřížené reakci mezi protilátkami a antigeny na povrchu normálních buněk, nebo v případě, že jsou antigeny nádorových buněk zachyceny na povrchu buněk imunitního systému (Johnson *et al.*, 1995; Heyderman *et al.*, 1985). Vývoj v oblasti molekulární biologie, hlavně rozvoj polymerázové řetězové reakce (PCR), umožnil citlivou detekci CTCs v periferní krvi (Johnson *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1991). Mezi v současnosti běžně využívanými metodami vykazuje nejvyšší diagnostickou senzitivitu pro detekci jednotlivých nádorových buněk v různých vzorcích tkání a tělních tekutin reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) (Krüger *et al.*, 1996), zvláště pak kvantitativní RT-PCR v reálném čase (Quantitative Real-Time RT-PCR), která je poměrně jednoduchá a rychlá (Bieche *et al.*, 1998).

Dále však dochází také ke zdokonalování metod přímé detekce nádorových buněk. Mezi nejnovější z nich patří CTC-chip a CellSearch system.

CTC-chip je vysoce citlivá technologie, pomocí které lze z krve izolovat viabilní nádorové buňky. Jedná se o silikonový čip velikosti mikroskopického sklíčka, na němž je na tzv. microposts nanosena protilátka proti adhezni molekule epiteliálních buněk (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM). Krev je tlačena povrchem čipu, CTCs interagují s EpCAM, a jsou tak z krve vychytávány. Buňky lze poté detekovat použitím značených protilátek např. proti cytokeratinům, izolovat a dále s nimi pracovat (Hansen *et al.*, 2003; Sequist *et al.*, 2009; Went *et al.*, 2004). Druhou generací CTC-chipu je tzv. HB-chip (Herringbone-Chip), který poskytuje větší prostor pro interakce mezi CTCs a protilátkou a tedy efektivnější záchyt nádorových buněk (Stott *et al.*, 2010).

Poloautomatizovanou detekci CTCs epiteliálního původu v krvi umožňuje CellSearch system firmy Veridex. Tento komerční test využívá k izolaci nádorových buněk magnetické nanočástice potažené EpCAM protilátkou, buňky

jsou poté selektovány pomocí směsi protilátek proti cytokeratinům 8, 18 a 19 značených phycoerythrinem, pomocí protilátek proti CD45 značených allophycocyaninem a pomocí DAPI pro značení jader buněk. Buňky jsou dle jejich signálu softwarem automaticky spočítány a je vyhodnocen jejich počet v 1 ml krve. Nevýhodou tohoto systému je však nemožnost CTCs izolovat a dále s nimi pracovat (Van der Auwera *et al.*, 2010; www.veridex.com).

4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Před rokem 1983 bylo jediným způsobem detekce genů klonování DNA pomocí knihoven. V tomto roce ovšem přišel Kary B. Mullis s rychlejší a méně nákladnou metodou k detekci genů a mnohým dalším DNA aplikacím. Tato metoda se nazývá polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) a probíhá zcela v podmínkách *in vitro* (Alberts *et al.*, 1998). V roce 1993 obdržel Kary Mullis za objev PCR Nobelovu cenu za chemii.

PCR patří dnes ke klíčovým metodám užívaným v molekulární diagnostice. Její podstatou je enzymatická amplifikace krátkého úseku DNA (řádově stovky až tisíce bází) ohraničeného syntetickými oligonukleotidy specifickými pouze pro analyzovaný úsek genu. Při syntéze DNA se používají termostabilní DNA-polymerázy (např. Taq DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus*), které odolávají vysokým teplotám, při nichž se DNA denaturuje (Adam *et al.*, 2003; Šmarda *et al.*, 2005). Optimálně pracují při teplotě kolem 72 °C a snášejí jen s malým úbytkem aktivity po určitou dobu i teploty nad 90 °C (Ráclavský, 1998).

Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken protisměrně. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů (Šmarda *et al.*, 2005).

V reakční směsi jsou na počátku PCR ve vhodném pufru a ve vhodných koncentracích přítomny:

- 1) dsDNA, jejíž část chceme namnožit, tedy tzv. templátová DNA
- 2) dva jednovláknové oligonukleotidy (primery), schopné vázat se na komplementární sekvence v templátové DNA
- 3) termostabilní DNA-polymeráza
- 4) dNTPs – deoxynukleotidtrifosfáty, sloužící jako stavební kameny nově syntetizované DNA (Ráclavský, 1998)

Samotná metoda PCR zahrnuje tři kroky, které se mnohokrát opakují. V prvním kroku je genomová DNA obsahující sekvence, které mají být amplifikovány, denaturována zahřátím na 92 - 95 °C po dobu asi 30 sekund.

Druhý krok zahrnuje hybridizaci denaturované DNA s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů při 50 - 60 °C po dobu 30 sekund. Ve třetím kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseku DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům (Snustad, Simmons, 2009).

Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat (Šmarda *et al.*, 2005). Interakce mezi Taq polymerázou a templátovou DNA je závislá na hořčnatých iontech, optimální koncentrace Mg^{2+} iontů určuje charakteristickou sekvenci, která bude amplifikována. Vztah mezi enzymem a sekvencí DNA není dostatečně známý, proto je optimální koncentrace Mg^{2+} iontů určována experimentálně vždy, když je navržena nová PCR (Brown, 2001).

Amplifikace DNA pomocí PCR může být klinicky využita k rychlé diagnostice infekčních virových a bakteriálních nemocí, monitorování rakoviny, k detekci vzácných patogenních jevů jako např. translokace chromosomů a prenatalní diagnostice. V soudním lékařství může být podle DNA z jediného vlasu či jediné spermie jednoznačně určen původce. Použitím PCR lze amplifikovat i RNA, přepíšeme-li ji na cDNA pomocí reverzní transkriptázy (Voet, Voetová, 1990, Šmarda *et al.*, 2005).

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

Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce RT-PCR je metoda založená na detekci RNA, která vyžaduje přepis mRNA do cDNA pomocí enzymu reverzní (zpětné) transkriptázy. Enzym katalyzuje syntézu řetězců, které jsou komplementární k templátům mRNA. Syntéza je zahájena random, oligo-dT nebo genově specifickým oligonukleotidovým primerem, který nasedá na studovanou mRNA (Snustad, Simmons, 2009).

Celá RT-PCR zahrnuje tři hlavní kroky. Nejprve dochází k přepisu RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptázy. Tento krok probíhá při teplotě mezi 40 a 50 °C, v závislosti na použitém enzymu. Nejčastěji používanými enzymy jsou AMV odvozený z viru ptačí myeloblastosy a MMLV odvozený z Moloneyho viru myší leukemie. Dále dochází k denaturaci dsDNA při 95 °C a k navázání primeru při 55 - 65 °C za přítomnosti Taq-polymerázy. Řetězce DNA jsou následně amplifikovány pomocí PCR (Snustad, Simmons, 2009; Šmarda *et al.*, 2005; Bustin, 2000).

RT-PCR může probíhat dvěma způsoby. Jako takzvaná „one-tube“, kdy reverzní transkripce i PCR probíhají v jedné zkumavce, čímž se omezí riziko kontaminace. Nebo jako „two-tube“, při které reverzní transkripce probíhá v jedné zkumavce a PCR následně v jiné. Výhodou této aplikace je získání stabilní cDNA, která může být dlouhodobě uchovávána a využita (Bustin, 2000).

Metoda RT-PCR je natolik citlivá, že umožňuje detekci specifické mRNA v jediné buňce. Používá se proto při detekci molekul mRNA, které se v buňce vyskytují při velmi nízkých koncentracích a pro analýzu genové exprese u buněk, které je obtížné získat ve větších počtech (Šmarda *et al.*, 2005).

Pro metodu RT-PCR je charakteristické množství variací, které vznikají v různých laboratořích i při použití identických vzorků. Pokud polymerázová řetězová reakce neprobíhá opravdu exponenciálně, nemůžeme získat spolehlivé výsledky jednoduchou amplifikací templátu a měřením získaného produktu. Tento problém se dá částečně vyřešit přidáním známého množství druhého templátu, který je amplifikovatelný identickou sadou primerů, ale je odlišitelný

po gelové elektroforéze. V praxi byl však tento přístup nahrazen metodou PCR v reálném čase (Bustin, 2000; Šmarda *et al.*, 2005).

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

Metoda real-time RT-PCR umožňuje sledovat množství produktu vznikajícího v průběhu PCR prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu v termocykléru vybaveném optikou. Současná metoda používá oddělené fluorescenčně značené primery a próby.

Pro značení primerů a hybridizačních sond se používají specifické molekuly - fluorofory, které po předchozí absorpci světla určité vlnové délky emitují světlo odlišné vlnové délky. Dvojitě fluorescenčně značené sondy obsahují také zhášec, což je molekula, která přijímá energii z fluoroforu ve formě světla a rozptyluje ji jedním ze dvou způsobů. V prvním případě dochází k přímému kontaktu mezi fluoroforem a zhášečem a k rozptýlení energie ve formě tepla. Ve druhém případě donor (fluorofor) přenese energii na akceptor (zhášec; quencher) a energie je vyzářena pomocí světla o vyšší vlnové délce. Tento způsob je nazýván jako přenos energie fluorescenční resonancí (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) (Šmarda *et al.*, 2005; Bustin, 2002).

6.1 Detekce produktů Real-time RT-PCR

Detekce produktů se může provádět celou řadou technologií. Existují čtyři srovnatelné techniky, které dokáží detekovat amplifikovaný produkt se stejnou citlivostí. Využívají fluorescenční barviva a kombinují procesy amplifikace a detekce RNA, resp. DNA s cílem umožnit monitorování průběhu PCR v reálném čase. Nejjednodušší metoda využívá fluorescenční barvivo, které se specificky váže na vznikající dsDNA. Ostatní tři spoléhají na hybridizaci fluorescenčně značených prób na správný amplikon.

6.1.1 DNA-vazebná barviva (DNA-binding dyes)

Tato metoda je založena na detekci vazby fluorescenčního barviva (např. SYBR Green, Eva Green) na DNA. Nevázané barvivo vykazuje v roztoku jen malou fluorescenci, ale během elongace se stále větší množství barviva váže na vznikající dvoušroubovici DNA. Při monitorování v reálném čase to vede ke zvýšení fluorescenčního signálu, který lze pozorovat během polymerizace a zmenšuje se, když je DNA denaturována. Tato metoda nepotřebuje specifické fluorescenční próby, nevýhodou je ale možnost vzniku dimerů primerů, které vydávají nespecifické signály (Bustin, 2000; Šmarda *et al.*, 2005).

Nedávno byla objevena metoda vysokorozlišovací analýzy tkání (High Resolution Melting, HRM), která určuje bod tání (T_m) dvoušroubovice DNA sledováním ztráty fluorescence iterkalačního barviva vázaného na dvouvláknovou DNA (Von Keyserling *et al.*, 2011; Do *et al.*, 2008).

6.1.2 Hybridizační próby

Metoda využívá dva primery a dvě sekvenčně specifické próby, které se váží do tzv. head-to-tail uspořádání. Jedna z prób nese na svém 3' konci donor (fluorescein), jenž emituje zelené fluorescenční světlo, které přijímá fluorofor připojený na 5' konci druhé próby. Excitace donoru vede k přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET) na akceptor a k emisi červeného fluorescenčního světla. Fluorescenční signál je detekován pouze jako výsledek hybridizace dvou nezávislých prób na správnou cílovou sekvenci (Wong, Medrano, 2005; Bustin, 2000).

6.1.3 Hydrolytické próby

Hlavním zástupcem hydrolytických prób je TaqMan systém, který využívá 5'-nukleázovou aktivitu DNA polymerázy. Próba obsahuje fluorescenční barvivo vázané na 5' konci, jehož emisní spektrum je zhaseno quencherem vázaným na 3'-konci. Je-li próba v intaktním stavu, jsou oba fluorofory drženy v prostorové

blízkosti a zhášec pohlcuje fluorescenční záření emitované reporterem. Pokud sonda zhybridizuje s cílovou sekvencí, je během elongační fáze PCR štěpena prostřednictvím 5'-3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy, čímž dochází k prostorovému oddělení fluoroforů a zvýšení fluorescenční aktivity reporteru. Většina prób má teplotu tání (melting temperature, T_m) kolem 70 °C, proto TaqMan systém používá kombinaci annealingu a polymerizace při 60 - 62 °C. Tím je zajištěno, že próba zůstane při prodloužení navázána na cílovém místě (Bustin, 2000; www.generi-biotech.com).

6.1.4 Vlášenkové próby

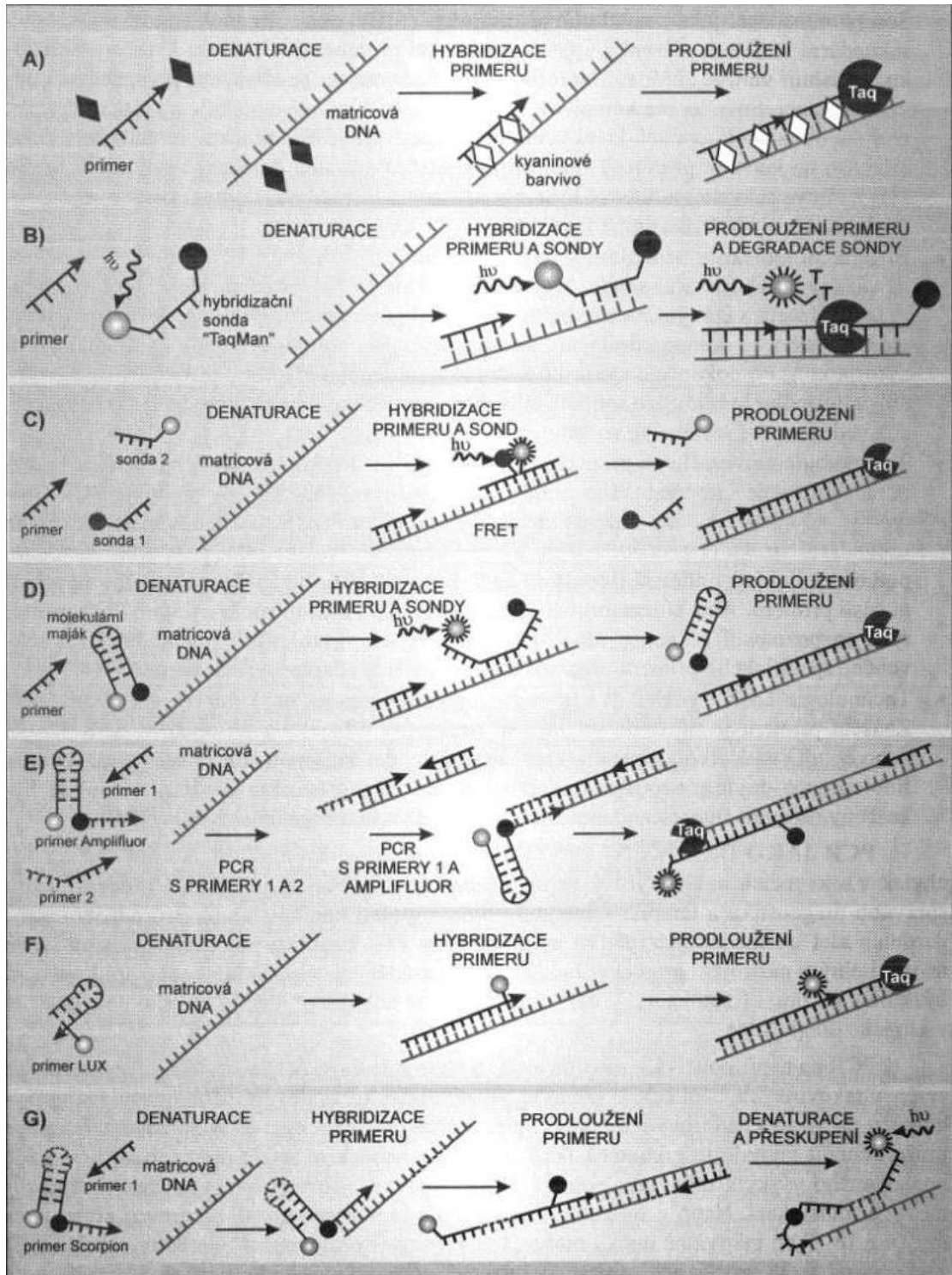
Molekulární majáky (Molecular beacons) vytvářejí sekundární strukturu vlásenky. Smyčka je komplementární k cílové molekule nukleové kyseliny a krátká vlásenka tvořená obrácenou repeticí, udržuje v těsné blízkosti na koncích připojený fluorofor a zhášec. Po navázání cílové molekuly dojde k ukončení zhášení a k emisi fluorescence (Šmarda *et al.*, 2005; Bustin, 2000).

Scorpions primery mají na svém 5' konci navázaný fluorofor, který je ve vlášenkové smyčce zhášen složkou vázanou na 3' konec. Po prodloužení primeru je próba schopna vázat se do komplementárního místa DNA. Tato hybridizace otevře vlášenkovou smyčku, takže se fluorofor oddělí od zhášeče a můžeme pozorovat fluorescenční signál (Bustin, 2002).

SunriseTM primery jsou podobné Scorpions, jedna molekula slouží zároveň jako PCR primer i próba a má opět vlášenkovou smyčku na 5' konci, fluorofor a zhášec (Wong, Medrano, 2005).

LUXTM (z Light Upon Extension) jsou velmi podobné Sunrise primerům. Zhášení je zde ale zajištěno sekundární strukturou vlásenky a přítomností specifické sekvence na 3' konci primeru. K emisi fluorescence pak dochází po prodloužení primeru (Šmarda *et al.*, 2005; Wong, Medrano, 2005).

AmpliFluorTM je technologie založená na inkorporaci fluorescenčně značeného primeru s vlášenkovou smyčkou do produktu PCR (Šmarda *et al.*, 2005).



Obr. 5: Technologie používané pro detekci produktů při kvantitativní PCR. A) Fluorescenční barvivo vázající se na DNA. B) Technologie TaqMan. C) FRET mezi fluorofory nesenými dvěma sondami. D) Molekulární majáky. E) Technologie primerů AmpliFluor. F) Technologie primerů LUX. G) Bifunkční molekuly Scorpion (Šmarda *et al.*, 2005).

7 Detekce minimální reziduální choroby pomocí Real-time PCR

Pomocí Real-time RT-PCR lze stanovit rozdíl v genové expresi mezi nádorovými a nenádorovými buňkami. Nádorové buňky exprimují jiné geny ze své výbavy, což se projeví změnou množství a spektra exprimované mRNA (Bieche *et al.*, 1998; Bustin, 2000). Výhodou tohoto přístupu je nízká stabilita RNA po uvolnění z buňky a tudíž detekce živých buněk (Ballestrero *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 1998). Ve srovnání s imunocytochemií je real-time RT-PCR 10x až 100x citlivější, jsme tak schopni detekovat až jednu nádorovou buňku mezi deseti miliony buňkami nenádorovými (Pantel *et al.*, 1999; Gerhard *et al.*, 1994, Paterlini-Brechot *et al.*, 2007).

Vysoká senzitivita metody sebou nese problém ilegální transkripce, tedy detekci znaků epitelálních buněk v kompartmentech mesenchymálního původu u zdravých jedinců (Srovnal *et al.*, 2005).

Dalším problémem je, že se při vyšetřeních mohou objevit některé nádorově specifické genové exprese hned u několika rozdílných nádorů, například prostatický specifický antigen nebo melanomový antigen mohou být detekovány u pacientů s karcinomem prostaty, s melanomem, ale také s karcinomem prsu (Shingyoji *et al.*, 2003). Proto se stále hledají nejvhodnější markery pro daný typ karcinomu.

7.1 Detekce minimální reziduální choroby u karcinomu plic

Detekce minimální reziduální choroby se během posledních let začala rychle rozvíjet a čím dál častěji se využívá také u solidních nádorů. Pomocí molekulárních metod můžeme prokázat brzkou diseminaci zhoubného nádoru tzv. ultrastaging mnohem časněji, než tomu bylo dříve s použitím cytologie (Koutecký *et al.*, 2004).

7.1.1 Markery používané pro detekci cirkulujících nádorových buněk u nemalobuněčného karcinomu plic

Pro detekci CTCs u pacientů s nemalobuněným karcinomem plic se používají markery jako například prepro-gastrin-uvolňující peptid (Prepro-Gastrin-Releasing Peptide, preproGRP), cytokeratin 19 (CK19) a karcinoembryonální antigen (CEA). Nicméně většina z nich vykazuje falešnou pozitivitu ve vzorcích periferní krve zdravých dárců (Li *et al.*, 2005) nebo pacientů s jiným typem epitelálního karcinomu (Cheng *et al.*, 2008).

Ge *et al.*, 2006, upřednostňují pro detekci CTCs marker CEA. Dle jejich studie probíhá uvolňování buněk s jeho expresí do cirkulace především po operaci, na rozdíl od buněk exprimujících CK19, které se šíří již během operace.

Pro detekci CTCs u NSCLC pacientů může být také použit nový marker BJ-TSA-9 (Li *et al.*, 2005). Samotný BJ-TSA-9 však není dostatečně citlivý pro detekci nádorových buněk v periferní krvi, citlivost výrazně zvyšuje jeho použití v kombinaci např. s antigenem skvamózních nádorových buněk (Squamous Cell Carcinoma Antigen, SCCA) (Cheng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005).

Obecně je vhodné většinu markerů použít v kombinaci s jinými, abychom dosáhli potřebné citlivosti a specificity. Pro diagnostiku plicních nádorů a posouzení jejich klinického stádia se jeví jako velmi vhodná například kombinace receptoru pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) s lidskou reverzní telomerasou (Human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT) (Miura *et al.*, 2006).

Dalšími markery pro detekci nemalobuněčného karcinomu plic jsou plicní specifický X protein (Lung Specific X Protein, LunX) a receptor pro růstový faktor hepatocytů (Hepatocyte Growth Factor Receptor, HGFR, c-Met).

7.1.1.1 Plicní specifický X protein (LunX)

LunX je specifický gen, jehož exprese probíhá výhradně v plicní tkáni, proto je vhodný jako citlivý marker pro detekci plicních nádorů (Iwao *et al.*, 2001; Mitas *et al.*, 2003).

Gen LunX je lokalizován v pericentromerické oblasti na chromozómu 20, kde byly zaznamenány chromozomální aberace u různých nádorů (Concannon *et al.*, 1974; Santabarbara *et al.*, 1988; Sculier *et al.*, 1985; Ariyoshi *et al.*, 1983). Pomocí semikvantitativní RT-PCR bylo prokázáno, že exprese LunX je vyšší v nádorové tkáni v porovnání s normální plicní tkání (Iwao *et al.*, 2000) a zároveň nebyla detekována v periferní krvi pacientů s jinými epiteliálními karcinomy ani u pacientů se zápallem plic (Cheng *et al.*, 2008).

Pozitivní detekce LunX mRNA v periferní krvi není ovlivněna pohlavím, věkem ani typem nádoru pacientů. Nicméně existuje vztah mezi stádiem nádoru a mírou exprese. Čím vyšší je exprese LunX mRNA, tím pokročilejší je stádium nemoci. LunX je zároveň vysoce citlivý biomarker pro diferenciální diagnostiku NSCLC z plicního výpotku. Jako jediný marker dokáže uspokojivě odlišit plicní výpotek pocházející z maligního plicního nádoru od plicního výpotku u pacientů s benigním onemocněním plic jako je tuberkulózní zánět pohrudnice (Cheng *et al.*, 2008).

Vysokou citlivost tohoto markeru prokázali Iwao *et al.*, 2001, kteří detekovali LunX mRNA už při koncentraci 10^{-4} μg nádorové RNA v 1 μg normální RNA pocházející z lymfatických uzlin.

7.1.1.2 Protoonkogenní protein c-met

C-met je novým cílem při diagnostice a léčbě nádorů plic. Bylo zjištěno, že k jeho expresi dochází u NSCLC. Exprese c-met je stejná v nádorových tkáních i v cirkulujících buňkách, ale zároveň není exprese c-met mRNA ovlivněna pohlavím, věkem ani histologickým typem nádoru. Pro diagnostiku je důležité, že míra exprese c-met závisí na stádiu nádoru. Pacienti, u nichž bylo prokázáno zvýšené množství c-met mRNA v periferní krvi, mají zvýšené riziko recidivy onemocnění (Cheng *et al.*, 2005; Sheu *et al.*, 2006).

Samotný c-met není jako diagnostický marker pro NSCLC dostatečně citlivý, Sheu *et al.*, 2006, však prokázali, že v kombinaci s CEA a CK19 se citlivost detekce cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi výrazně zvýšila.

C-met se stává také atraktivním cílem pro léčbu. Bylo studováno několik odlišných přístupů k zablokování činnosti c-met, např. protilátky proti

c-met/HGFR (Burgess *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Martens *et al.*, 2006) nebo inhibitory kináz (Sattler *et al.*, 2003). Většina z těchto intervenčních strategií prokázala protinádorovou aktivitu. (Bellon *et al.*, 2007). Protoonkogen c-met kóduje receptor s vysokou afinitou pro růstový faktor hepatocytů, proto kombinace inhibitoru c-met s látkami blokujícími tyrosinkinázovou aktivitu HGFR (např. gefitinib) hrají důležitou roli v protinádorové léčbě (Liska *et al.*, 2011; Stabile *et al.*, 2010).

IV. Experimentální část

1 Metodika

1.1 Izolace RNA a reverzní transkripce

Stanovení genové exprese metodou reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) je založeno na izolaci RNA z buněk pacienta, reverzní transkripci a PCR analýze.

1.1.1 Materiál

Izolace RNA

TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), chloroform a ethanol (Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE), DEPC Treated Water (Ambion, Austin, TX, USA), zkumavky Eppendorf 1,5 ml, 2 ml, epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

Reverzní transkripce

Random primers, RNAsin ribonuclease inhibitor, Deoxyribonucleotide triphosphates (vše Promega, Madison, WI, USA) (pozn.: připraveno jako 10 mM dNTPs ze 100 mM dCTP, dGTP, dTTP, dATP; příprava: 4 x 0,1 ml jednotlivých zásobníků nukleotidů doplněno DEPC vodou do 1 ml), RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Vilnius, LI), 0,2 ml Thermo-Tube (ABgene, Epsom, UK), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

1.1.2 Přístroje

Laminární box (BioAir, EuroClone Group, Milano, IT), kombinovaná chladnička (Gorenje, Velenje, SI), vortex (Scientific Industries, Genie, NY, USA), minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE), termocyklér TProfessional Basic (Biometra, Goettingen, DE), chlazená centrifuga (Hermle Labortechnik, Wehingen, DE), termoblok (Major Science, Saratoga, CA, USA), Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA), pipety (Eppendorf, Hamburg, DE)

1.1.3 Postup

Izolace RNA

RNA izolujeme z buněk lyzovaných pomocí komerční chemikálie TRI reagent (směs guanidinu thiokyanátu a fenolu) metodou dle Chomczynského (Chomczynski *et al.*, 1987).

- 1) Zkontrolujeme termoblok (60 °C), necháme vychladit centrifugu (4 °C).
- 2) Připravíme si vzorky pro izolaci. Použijeme čerstvé nebo zamražené buněčné TRI lyzáty (c = 5 - 11 miliónů buněk/1 ml TRI reagentu), rozmrazení probíhá na ledu cca 15 min a vzorky silně zvortexujeme.
- 3) Vzorky TRI lyzátů v 1,7 ml zkumavkách necháme stát 5 min při pokojové teplotě, aby mohla proběhnout kompletní disociace nukleoproteinů, potom ke vzorkům přidáme 200 µl chloroformu a silně je zvortexujeme (cca 30 sec). Vzorek opět necháme stát 5 min při pokojové teplotě.
- 4) Centrifugujeme 15 min při 12 000g a 4 °C (probíhá separace fází), nachystáme a popíšeme si 1,7 ml zkumavky.
- 5) Po centrifugaci spodní růžová vrstva obsahuje detrit, lipidy a proteiny, prostřední mezivrstva je prstenec DNA a horní, čirá vrstva obsahuje RNA.
- 6) Vrchní vodnou fázi obsahující RNA přeneseme do čisté zkumavky (pipetujeme po částech, např. po 200 µl abychom si nerozvířili jednotlivé fáze), vhodné je odebrat celkem 400 – 500 µl vodné fáze.
- 7) Ke vzorku přidáme stejné množství isopropanolu, jako jsme v předchozím kroku sebrali vodné fáze, tedy 400 – 500 µl a krátkým opakovaným

protřepáním (2x – 4x) promícháme obě vrstvy (nesmí zůstat mléčný prsteneček).

- 8) Vzorky necháme stát 5 min při pokojové teplotě, probíhá precipitace RNA.
- 9) Centrifugujeme 10 min při 12 000 g a 4 °C (na dně zkumavky by se měla vytvořit bílá popř. průhledná RNA peletka).
- 10) Opatrně odstraníme supernatant a RNA peletku omyjeme 1,5 ml 75% ethanolu, peletku jemně odlepíme převrácením zkumavky.
- 11) Centrifugujeme 5 min při 12 000 g, 4 °C.
- 12) Odstraníme supernatant a peletu usušíme na vzduchu ve flow-boxu cca 3-10 min (nesmí se nechat vysušit moc, byla by špatně rozpustná), peleta během sušení zprůhlední.
- 13) K RNA peletě přidáme cca 25 µl DEPC treated vody (21 – 60 µl podle velikosti peletky) a obsah několikrát propipetujeme.
- 14) Rozpuštění RNA urychlíme zahřátím vzorku na 60 °C po dobu 10 min, poté ochladíme na ledové tříšti.
- 15) Odebereme alikvot (cca 1,4 µl do 0,2 ml zkumavky) a spektrofotometricky na přístroji NanoDrop ND 1000 stanovíme koncentraci a čistotu vyizolované RNA dle návodu k přístroji ($A_{260}/A_{280} \geq 1,8$). Ze změřené koncentrace vypočteme množství RNA potřebné pro reverzní transkripci (reverzní transkripci provádíme ze 3 µg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 µl).
- 16) Rozpuštěnou RNA dlouhodobě uchováváme při –70 °C až –80 °C.

Reverzní transkripce:

Chemikálie uchováváme při –18 °C až –30 °C. Před začátkem práce rozmrazíme na ledové tříšti 10 mM dNTPs, 5x RT pufr, hexamery, DEPC H₂O. Po rozpuštění je krátce zvortexujeme a stočíme. RNAsin a RTáza se přidávají přímo z mrazáku po krátkém stočení.

- 1) Reverzní transkripci provádíme ze 3 µg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 µl.
- 2) Připravíme si 0,2 ml zkumavky do vychlazené destičky, popíšeme a po spočítání objemů pipetujeme v pořadí „voda-RNA-hexamery“ (množství RNA odpovídající 3 µg RNA (promíchat špičkou

před pipetováním), 0,3 µg hexamerů a vodu do objemu 19,5 µl). Krátce zvertexujeme a stočíme.

- 3) Vzorky necháme inkubovat v termocykléru s vyhřívaným víčkem při 70 °C po dobu 5 min. Poté rychle zchladíme na ledu po dobu cca 1 min.
- 4) Mezitím si připravíme MasterMix. Množství na jeden vzorek pro transkripci 3 µg RNA ve 30 µl je 6 µl 5x RT pufru, 3 µl 10 mM dNTP a 30 U RNAsinu. Připravujeme s rezervou a pipetujeme do 0,2 ml zkumavky. Krátce zvertexujeme a stočíme.
- 5) Ke zchlazenému vzorku RNA s hexamery a vodou přidáme 9,75 µl MasterMixu, promícháme špičkou a necháme stát 5 min při pokojové teplotě, např. ve flowboxu.
- 6) Poté ke vzorku RNA s MasterMixem přidáme 150U RTázy, krátce zvertexujeme, stočíme a necháme stát 10 min při pokojové teplotě, např. ve flowboxu.
- 7) Zkumavky poté rovnoměrně naskládáme do termocykléru a inkubujeme s vyhřívaným víčkem při 42 °C po dobu 60 min a poté 10 min při 70 °C.
- 8) Zchladíme na ledu, popíšeme, krátce stočíme a uložíme do mrazicího boxu při -20 °C.

1.2 Real-time PCR

Polymerázová řetězová reakce s detekcí v reálném čase (real-time PCR) je enzymatická reakce umožněná primery, specifickou fluorescenčně značenou sondou a termostabilní DNA-polymerázou. Průběh reakce je snímán termocyklérem v reálném čase na základě změn fluorescence. Po přidání standardů k reakci a vytvoření kalibrační křivky, lze hodnotit množství specifické vyšetřované sekvence ve vzorku.

Ke každé polymeráze je dodáván reakční pufr ve vhodném složení. Pro každou sadu primerů je testována optimální koncentrace hořčičnatých iontů. Pro reakci je výhodné použít DNA-polymerázu s tzv. „HotStartem“, pro jejíž aktivaci je nutné 10 až 15 minutové zahřívání na 90 - 95 °C.

1.2.1 Primery a próby

Primery jsou krátké oligonukleotidy (o délce cca 20 bp), které vymezují amplifikovaný úsek DNA. Specifická hydrolyzační TaqMan próba je krátký oligonukleotid značený fluorescenční barvou a zhášečem. Syntéza primerů a prób dle vlastního návrhu je prováděna firmou Generi Biotech, s.r.o. (Hradec Králové, CZ). Teplota nasedání primerů je orientačně vypočítána z nukleotidového složení a následně experimentálně ověřena při optimalizaci amplifikačního cyklu.

1.2.1.1 Plicní specifický X protein (LunX)

Pro určení exprese LunX mRNA byl navržen levý primer (forward; LUNX-Fw) o délce 20 bp a pravý primer (reverse; LUNX-Rev) také dlouhý 20 bp. Dále byla použita próba (LUNX-P) o délce 24 bp.

Tab. 1: Sekvence a velikost primerů a próby, velikost produktu pro LunX

	Sekvence (5´ - 3´)	Velikost (bp)
LUNX-Fw	gatggccaccgtctctatgt	20
LUNX-Rev	acagccagcctcaacagact	20
LUNX-P	ccatccctctcggcataaagctcc	24
Produkt LUNX		93

1.2.1.2 Protoonkogenní protein c-met

Pro určení exprese c-met mRNA byl navržen levý primer (c-met-Fw) o velikosti 20 bp a pravý primer (c-met-Rev) také o délce 20 bp. Próba c-met-P má velikost 26 bp.

Tab. 2: Sekvence a velikost primerů a próby, velikost produktu pro c-met

	Sekvence (5' - 3')	Velikost (bp)
c-met-Fw	tggacaatgatggcaagaaa	20
c-met-Rev	gatgattccctcggtcagaa	20
c-met-P	tcactgtgctgtgaaatccttgaaca	26
Produkt c-met		99

1.2.1.3 Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH)

Pro určení exprese GAPDH mRNA byl navržen levý primer (GAPDH-Fw) o velikosti 20 bp a pravý primer (GAPDH-Rev) o délce 18 bp. Próba GAPDH-P má velikost 20 bp.

GAPDH byla použita jako referenční gen při stanovení specifity markerů LunX a c-met (viz Kapitola 2.2, Obr. 7)

Tab. 3: Sekvence a velikost primerů a próby, velikost produktu pro GAPDH

	Sekvence (5' - 3')	Velikost (bp)
GAPDH-Fw	gaagatggtgatgggatttc	20
GAPDH-Rev	gaaggtgaaggtcggagt	18
GAPDH-P	caagctccccgttctcagcc	20
Produkt GAPDH		226

1.2.1.4 Ředění primerů a prób

Všechny primery a próby jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Primery jsou čištěny pomocí purifikační oligonukleotidové kazety (Oligonucleotide Purification Cartridge, OPC), próby pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC). Zásobní roztoky mají koncentraci 0,1 mM, tj. 100 pmol v 1 µl.

Primery LUNX-Fw, LUNX-Rev a c-met-Fw, c-met-Rev:

Pracovní koncentrace je 0,005 mM.

Primery GAPDH-Fw a GAPDH-Rev:

Pracovní koncentrace je 7,5 μ M.

Próba LUNX-P a c-met-P:

Duálně značená próba typu TaqMan je označena hexachlorofluoresceinem (HEX), který je zhášen quencherem (zhášečem) BHQ1; na přístroji se zvolí kanál JOE nebo přímo excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 556 nm.

Pracovní koncentrace je 1,25 μ M.

Próba GAPDH-P:

Duálně značená próba typu TaqMan je označena fluoresceinem (FAM), který je zhášen quencherem BHQ1; na přístroji se zvolí kanál FAM nebo přímo excitační vlnová délka 494 nm a emisní vlnová délka 525 nm.

Pracovní koncentrace je 1,25 μ M.

1.2.2 Negativní kontrola, pozitivní kontrola, specifické standardy

V každé PCR reakci jsme současně se vzorky vyšetřovali také negativní a pozitivní kontrolu a diluční řadu specifických standardů.

1.2.2.1 Negativní kontrola

Pro účely negativní kontroly jsme do reakce namísto vzorku přidávali DEPC Treated Water v množství 1 μ l.

1.2.2.2 Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrolu jsme použili cDNA získanou v případě stanovení exprese LunX a c-met ze vzorku tkáně karcinomu plic ST 1615, u stanovení exprese GAPDH ze vzorku tkáně karcinomu kolorekta MRD 696 T.

1.2.2.3 Specifické standardy

Pro absolutní kvantifikaci exprese LunX, c-met a GAPDH jsme v práci použili diluční řady standardů (30 – 10⁶ kopií LunX, resp. c-met; 10⁴ – 10⁹ kopií GAPDH). Standardy jsou tvořeny amplikony obsahujícími sekvenci LunX, resp. c-met, resp. GAPDH vymezenou primery LunX Fw a LunX Rev, resp. c-met Fw a c-met Rev, resp. GAPDH Fw a GAPDH Rev. Kvantifikace je poté prováděna pomocí standardizační křivky těchto standardů.

1.2.3 Další složky reakční směsi

dNTPs:

Zásobní koncentrace deoxynukleotidů dTTP, dCTP, dATP, dGTP je 100 mM. Pracovní koncentrace je 10 mM dNTPs.

Thermo-Start DNA Polymerase:

Enzymem je chemicky modifikovaná termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza od *Thermus Aquaticus*. Enzym je určen pro hot-start PCR. Pracovní koncentrace je 5 U/μl, používáme 1 U na reakci.

MgCl₂ má pracovní koncentraci 25 mM, finální koncentrace v reakční směsi pro LunX činí 4 mM, pro c-met 6 mM a pro GAPDH 3 mM.

Reakční pufr je 10x koncentrovaný, finální koncentrace je 1x, tj. při celkovém objemu reakční směsi 25 μl dáme do reakce 2,5 μl 10x konc. reakčního pufru.

Tab. 4: Složení reakční směsi (MasterMixu) pro LunX real-time PCR, reakční objem 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace na reakci	Finální koncentrace
LUNX-Fw	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
LUNX-Rev	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
LUNX-P	4 μ l	1,25 μ M	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	5 nmol	200 μ M
Taq	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg ²⁺	4 μ l	25 mM	100 nmol	4 mM
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
H ₂ O	8,8 μ l	/	/	/

Průběh PCR reakce – cyklování pro LunX:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96 °C / 15 minut
2. krok: amplifikace – dvoukroková – 50 cyklů
95 °C / 15 vteřin - 62 °C / 10 vteřin
snímání v kanálu JOE při 62 °C

Tab. 5: Složení reakční směsi (MasterMixu) pro c-met real-time PCR, reakční objem 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace na reakci	Finální koncentrace
c-met-Fw	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
c-met-Rev	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
c-met-P	4 μ l	1,25 μ M	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	5 nmol	200 μ M
Taq	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg ²⁺	6 μ l	25 mM	150 nmol	6 mM
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
H ₂ O	6,8 μ l	/	/	/

Průběh PCR reakce – cyklování pro c-met:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96 °C / 15 minut
2. krok: amplifikace – dvoukroková – 50 cyklů
95 °C / 15 vteřin - 58 °C / 15 vteřin
snímání v kanálu JOE při 58 °C

Tab. 6: Složení reakční směsi (MasterMixu) pro GAPDH real-time PCR, reakční objem 25 µl

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace na reakci	Finální koncentrace
GAPDH - F	1 µl	7,5 µM	7,5 pmol	300 nM
GAPDH - R	1 µl	7,5 µM	7,5 pmol	300 nM
GAPDH probe	4 µl	1,25 µM	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 µl	10 mM	5 nmol	200 µM
Taq	0,2 µl	5 U/µl	1 U	0,04 U/µl
Mg ²⁺	3 µl	25 mM	75 nmol	3 mM
Pufr	2,5 µl	10x	1x	1x
cDNA	1 µl	0,1 µg cDNA/µl	100 ng	4 ng/µl
H ₂ O	11,8 µl	/	/	/

Průběh PCR reakce – cyklování pro GAPDH:

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

1.2.4 Materiál

Specifické primery a TaqMan sondy (Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ), deoxyribonukletid trifosfáty (Promega, Madison, WI, USA), Thermo-Start DNA Polymerase, MgCl₂, reakční pufr (ABgene, Epsom, UK), DEPC Treated Water (Ambion, Austin, TX, USA), 0,1 ml Tubes & Caps (Corbett-Research, Sydney, AU), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

1.2.5 Přístroje

PCR box (Biosan), kombinovaná chladnička (Gorenje, Valenje, SI), vortex (Scientific Industries, Genie, NY, USA), minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE), real-time PCR termocyklér RotorGene (Corbett-Research, Sydney, AU)

1.2.6 Postup

Chemikálie uchováváme při -20 °C. Před začátkem práce rozmrazíme na ledové tříšti 10 mM dNTP's, primery, próbu, DEPC H₂O, reakční pufr a MgCl₂. Po rozpuštění krátce zvortexujeme a stočíme. Thermo-Start DNA polymerázu přidáváme přímo z mrazáku po jemném zvortexování a krátkém stočení.

- 1) PCR provádíme ze 100 ng cDNA v reakčním objemu 25 µl.
- 2) Připravíme si MasterMix pro LunX (viz Tab. 4), resp. pro c-Met (viz Tab. 5). Uvedené množství v tabulce je pro jeden vzorek, připravujeme s rezervou. Krátce zvortexujeme a stočíme.
- 3) Do vychlazené destičky si připravíme 0,1 ml zkumavky.
- 4) Pipetujeme 24 µl MasterMixu, 1 µl cDNA vzorků, 1 µl DEPC vody jako negativní kontrolu, 1 µl cDNA pozitivní kontroly a 1 µl specifických standardů.
- 5) Zkumavky vložíme do karuselu a vyvážíme.
- 6) Pomocí softwaru Rotor-Gene 6 provedeme automatickou kalibraci snímání fluorescence přístroje a spustíme příslušný program.
- 7) Po ukončení teplotního cyklování provedeme analýzu real-time PCR reakce.

1.3 Pacienti

Do studie bylo zařazeno 75 pacientů operovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc pro plicní karcinom klinického stádia I - III. U všech pacientů byl histologicky prokázán nemalobuněčný karcinom plic, žádný z pacientů nepodstoupil neoadjuvantní terapii. Klinická charakteristika pacientů je shrnuta v tabulce č. 7.

Pro stanovení exprese markerů LUNX a c-met byly pacientům při operaci odebrány vzorky kostní dřeně, systémové krve, krve z plicní žíly a tumoru.

Všichni vyšetřovaní podepsali formulář informovaného souhlasu.

Tab. 7: Charakteristika pacientů

		n	Pohlaví (muži/ženy)	Průměrný věk (roky) (min;max)	Grading			N staging	
					1	2	3	0	1+2
Klinické stádium	I	40	28/12	66,7 (51;82)	4	10	17	40	0
	II	19	13/6	66,4 (54;77)	0	6	6	2	17
	III	16	12/4	66,7 (53/75)	0	4	8	0	16
Celkem		75	53/22	66,7 (51;82)	4	20	31	42	33

1.4 Statistické metody

Statistická analýza byla provedena ve statistickém softwaru STATISTICA 10. Nejprve byl popsán vzorek pacientů pomocí popisných statistik a četnostních tabulek. Ke znázornění cut-off hodnot byly použity bodové grafy. Exprese v tumorech byla znázorněna pomocí box-plotů a vzájemně porovnána Kruskal-Wallisovým ANOVA testem. Neparametrická obdoba ANOVA testu byla zvolena, protože se na vzorku pacientů neprokázala normalita. V případě, že Kruskal-Wallis ANOVA test prokázal významné rozdíly ve skupinách, byl následně použit test vícenásobného porovnávání k získání přesných rozdílů, resp. shod mezi jednotlivými skupinami.

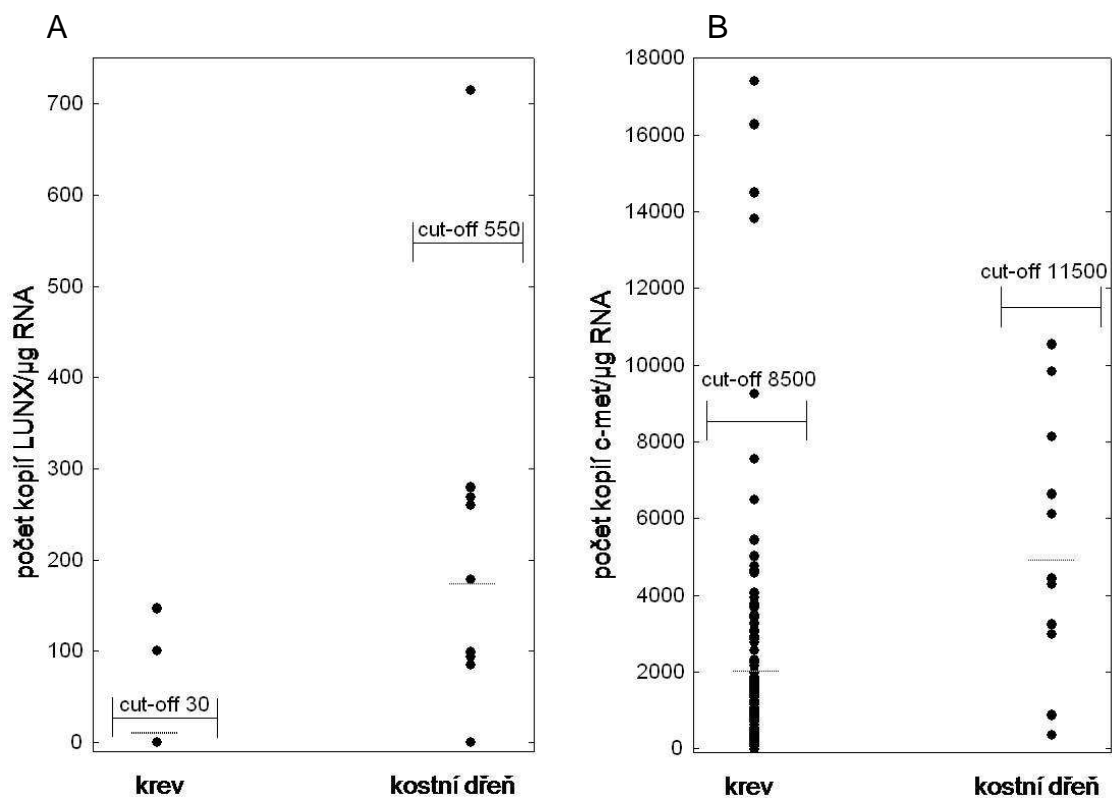
2 Výsledky

2.1 Stanovení cut-off hodnot pro expresi LunX a c-met v krvi a kostní dřeni

Vzhledem k vysoké citlivosti real-time RT-PCR metody může být detekována určitá míra exprese zvolených markerů i u zdravých jedinců nebo pacientů s nenádorovým onemocněním. Proto jsme nejprve na základě vyšetření vzorků krve od 98 zdravých dárců a kostní dřene od 12 pacientů s nenádorovými a nezávažnými onemocněními, stanovili cut-off hodnoty pro jednotlivé markery v daném kompartmentu (cut-off hodnota = průměrná exprese + 2 směrodatné odchyly) (Tab. 8; Obr. 6).

Tab. 8: Cut-off hodnoty pro markery LunX a c-met v krvi a kostní dřeni

		Kostní dřeň (počet kopií/ μ g RNA)	Systémová krev (počet kopií/ μ g RNA)
LUNX	Průměr	1,51	172,27
	Směrodatná odchylna	14,92	205,38
	Cut-off	30,00	550,00
c-met	Průměr	2 357,47	5 211,82
	Směrodatná odchylna	3 203,68	3 387,77
	Cut-off	8 500,00	11 500,00



Obr. 6: Grafické znázornění stanovení cut-off hodnot pro (A) LunX a (B) c-met

Stanovené cut-off hodnoty jsou použity pro posouzení positivity či negativity přítomnosti CTCs detekovaných s využitím markerů LunX a c-met u pacientů s karcinomem plic.

2.2 Stanovení specifity LunX a c-met pro karcinom plic

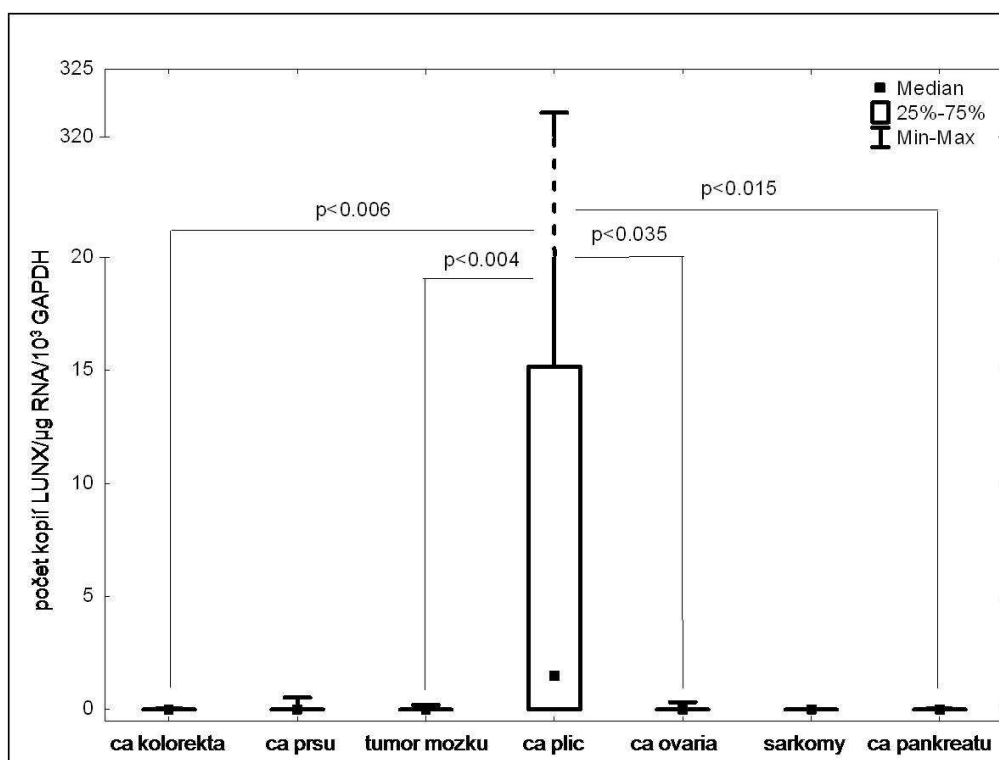
Dále jsme pro stanovení specifity zvolených markerů provedli analýzu jejich exprese ve vzorcích nádorové tkáně nejčastěji se vyskytujících tumorů. Celkem jsme vyšetřili 124 vzorků tkání různého histogenetického původu (Tab. 9). Stanovená exprese markerů LunX a c-met byla normalizována k referenčnímu genu GAPDH.

Prokázali jsme, že LunX je vysoce specificky exprimován v nádorech plicního původu, naopak c-met tuto specifitu postrádá. (Obr. 7)

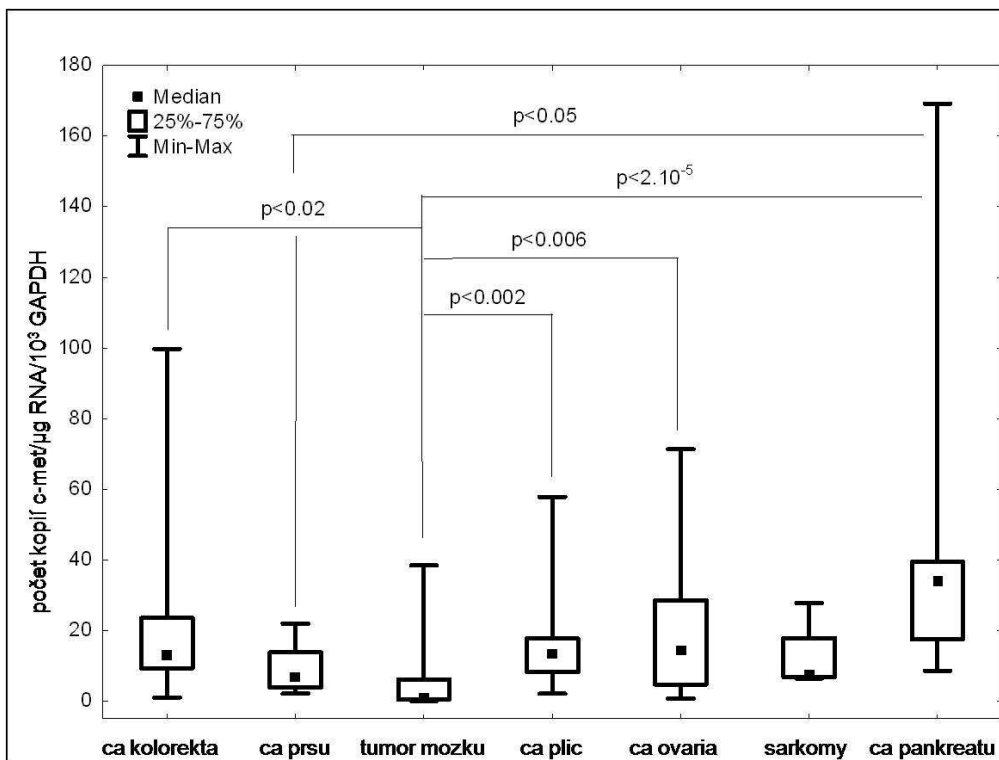
Tab. 9: Histogenetický původ a počet jednotlivých vzorků tkání:

Typ nádoru (kód diagnózy)	Počet vyšetřených vzorků
kolorektální karcinom (C18-C21)	23
karcinom prsu (C50)	23
tumor mozku (C71)	21
karcinom plic (C34)	23
karcinom ovaria (C56)	20
sarkomy (C43, C49, C81-C83)	5
karcinom pankreatu (C25)	9

A



B

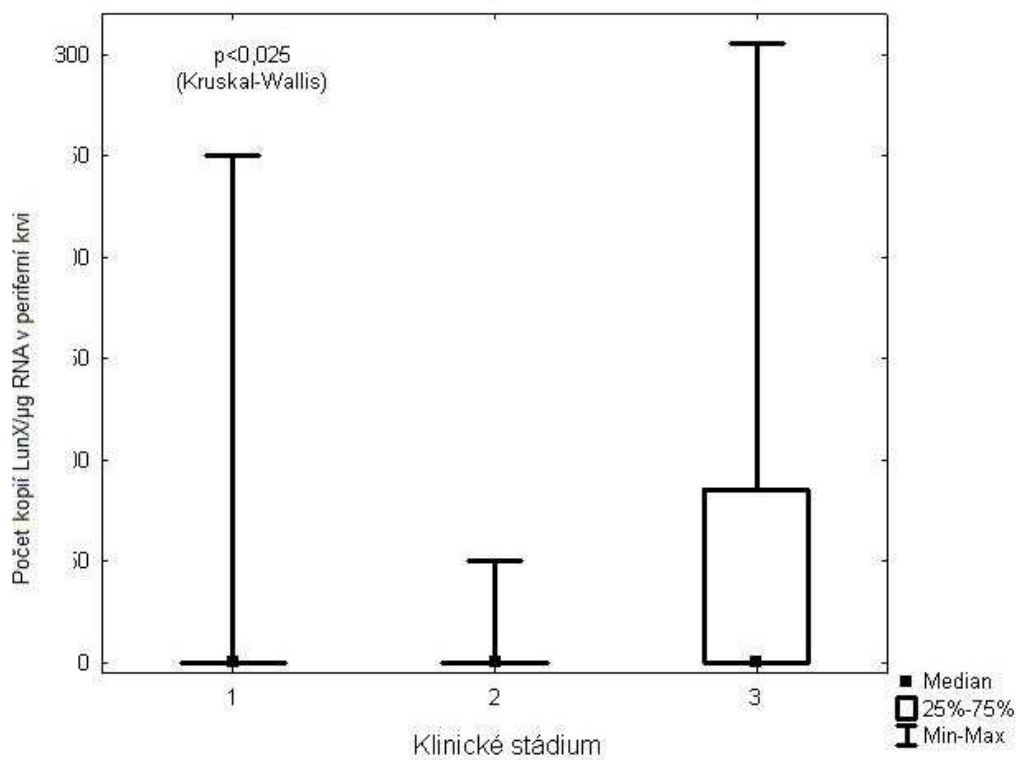


Obr. 7: Expresa (A) LunX a (B) c-met v tumorech rúzného histogenetického pôvodu.

2.3 Vyšetrení exprese LunX a c-met u souboru pacientů s karcinomem plic

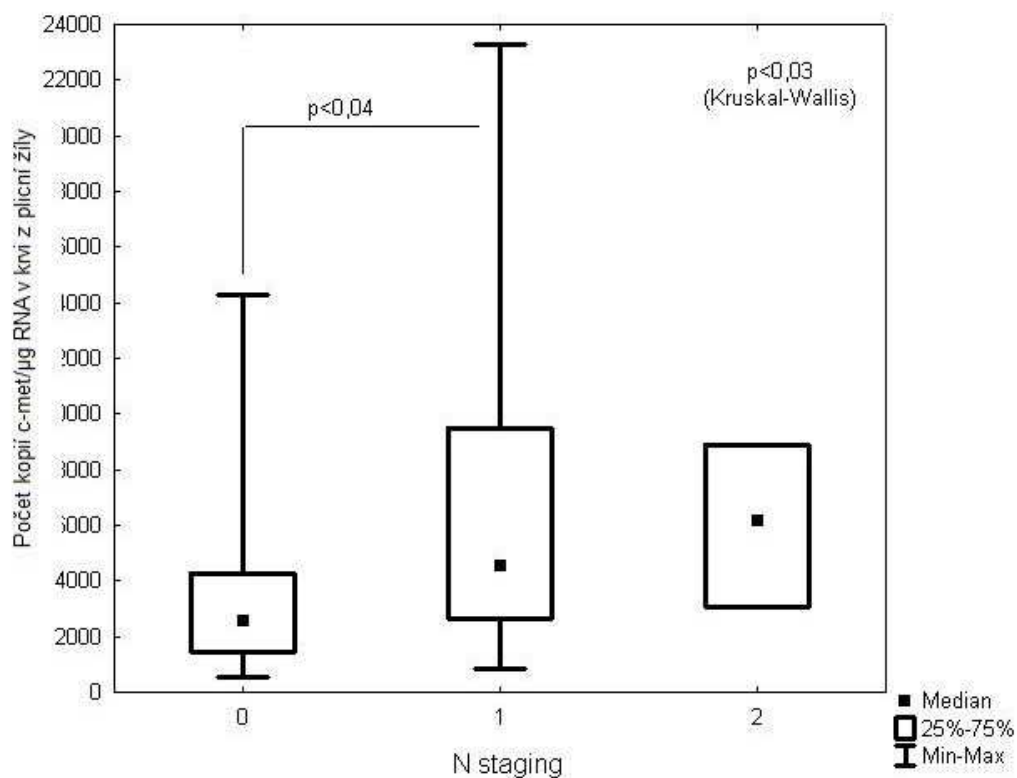
Nakonec jsme stanovili míru exprese markerů LunX a c-met ve vzorcích systémové krve, krve z plicní žíly a kostní dřeně u 75 pacientů s karcinomem plic (Tab. 7). Naměřené hodnoty exprese testovaných markerů byly korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami.

Zaznamenali jsme statisticky významně vyšší expresi markeru LunX u pacientů v klinickém stádiu III oproti pacientům s nižším stádiem (Obr. 8).



Obr. 8: Expres markeru LunX v periferní krvi v závislosti na klinickém stádiu nádoru.

Dále jsme pozorovali statisticky významně vyšší míru exprese c-met v krvi z plicní žíly u pacientů s postižením lymfatických uzlin proti pacientům s histologicky negativními uzlinami (Obr. 9).



Obr. 9: Expres markeru c-met v krvi v plicní žíly v závislosti na postižení uzlin.

Dle stanovených cut-off hodnot jsme dále analyzovali pozitivitu markerů LunX a c-met v jednotlivých kompartmentech u pacientů rozdělených dle klinického stádia. Pozorovali jsme vyšší procento pozitivních vzorků systémové krve a krve z plicní žíly u pacientů s pokročilejším onemocněním (klinické stádium II, resp. III) (Tab. 10/a).

Oba markery vykazují dostatečnou citlivost pro záchyt CTCs u pacientů s karcinomem plic. Při analýze celkové positivity pro jednotlivé markery jsme zaznamenali vyšší citlivost markeru LunX. Použitím kombinace obou markerů při hodnocení celkové MRD positivity u pacientů s NSCLC jsme pozorovali výrazné zvýšení citlivosti a zvyšující se procento MRD pozitivních pacientů s rostoucím klinickým stádiem (Tab. 10/b).

Tab. 10/a: Procentuální zastoupení MRD pozitivních vzorků ve skupinách pacientů rozdělených dle klinického stádia.

Stádium	Pozitivita v krvi z plicní žíly % (pozitivní /celkem)		Pozitivita v systémové krvi % (pozitivní/celkem)		Pozitivita v kostní dřeni % (pozitivní/celkem)	
	LunX	c-met	LunX	c-met	LunX	c-met
I	7,5 % (3/40)	12,5 % (5/40)	15,0 % (6/40)	5,0 % (2/40)	15,0 % (6/40)	10,0 % (4/40)
II	15,8 % (3/19)	26,3 % (5/19)	10,5 % (2/19)	15,8 % (3/19)	10,5 % (2/19)	5,2 % (1/19)
III	18,8 % (3/16)	25,0 % (4/16)	31,3 % (5/16)	25,0 % (4/16)	18,8 % (3/16)	0,0 % (0/16)
Celkem	12,0 % (9/75)	18,7 % (14/75)	16,0 % (12/75)	12,0 % (9/75)	14,7 % (11/75)	6,7 % (5/75)

Tab. 10/b: Procentuální zastoupení MRD pozitivních vzorků ve skupinách pacientů rozdělených dle klinického stádia.

Stádium	Celková pozitivita pro jednotlivé markery % (pozitivní/celkem)		Celková pozitivita % (pozitivní/celkem)
	LunX	c-met	LunX/c-met
I	32,5 % (13/40)	20,0 % (8/40)	37,5 % (15/40)
II	26,3 % (5/19)	36,8 % (7/19)	57,9 % (11/19)
III	50,0 % (8/16)	31,3 % (5/16)	68,8 % (11/16)
Celkem	34,7 % (26/75)	26,7 % (20/75)	49,3 % (37/75)

3 Diskuse

Problematika MRD byla podrobně zkoumána zejména u hematologických malignit a u karcinomu kolorekta, prsu a pankreatu. Braun *et al.*, 2001, prokázali, že detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni pacientek s časnými stádii karcinomu prsu může přispět k zdokonalení stagingových klasifikací a tím k přesnějšímu odhadu prognózy nemocné. Podobně Srovnal *et al.*, 2010, zjistili u karcinomu pankreatu statisticky významnou závislost mezi mírou exprese EGFR v portální krvi a klinickým stádiem, kde pacienti s pokročilým onemocněním mají vyšší expresi EGFR v portálním řečišti, než pacienti s nízkým klinickým stádiem. Dále prokázali vysokou expresi EGFR v peritoneální laváži pacientů s metastatickým onemocněním, na rozdíl od pacientů bez přítomnosti metastáz.

Detekce MRD u karcinomu plic je potenciálním prognostickým markerem, její význam však není dosud zcela objasněn. Cílem této bakalářské práce bylo přispět k poznatkům o možnostech detekce MRD a o prognostické hodnotě přítomnosti MRD u pacientů s plicním karcinomem.

Minimální reziduální choroba může být detekována mnoha metodami. Real-time RT-PCR je jednou z nejcitlivějších metod detekce cirkulujících nádorových buněk a využívá nádorově specifických biomarkerů.

Vyšetřením exprese LunX a c-met v krvi a kostní dřeni dárců jsme stanovili cut-off hodnoty udávající hranici positivity a negativity pacienta na přítomnost MRD. Cut-off hodnoty LunX, resp. c-met jsou v systémové krvi a v krvi z plicní žíly 30 kopií LunX/ μ g RNA, resp. 8 500 kopií c-met/ μ g RNA a v kostní dřeni 550 kopií Lunx/ μ g RNA, resp. 11 500 kopií c-met/ μ g RNA.

Prokázali jsme, že marker LunX je vysoce specifický pro detekci CTCs u karcinomu plic, což je v souladu s již publikovanými studii. (Cheng *et al.*, 2008; Iwao *et al.*, 2001) Dále jsme prokázali závislost exprese LunX mRNA na klinickém stádiu nádoru. U pacientů s klinickým stádiem III byla exprese markeru LunX výrazně vyšší, než u nižších klinických stádií I a II. Tyto výsledky korespondují se studií publikovanou Cheng *et al.*, 2008.

Pro c-met jsme prokázali závislost míry exprese tohoto markeru na stupni postižení lymfatických uzlin. U pacientů s metastatickým postižením uzlin jsme

zaznamenali vyšší míru exprese c-met ve srovnání s pacienty s histologicky negativními uzlinami. Pro c-met je uváděno, že samotný není jako diagnostický marker pro NSCLC dostatečně citlivý. Sheu *et al.*, 2006, však prokázali, že v kombinaci s markery CEA a CK19 se citlivost detekce cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi výrazně zvýšila.

Analýza positivity markerů LunX a c-met v systémové krvi, v krvi z plicní žíly a v kostní dřeni dokazuje dostatečnou citlivost těchto markerů pro detekci MRD u karcinomu plic.

Posouzení přítomnosti minimální reziduální choroby u pacientů s plicním karcinomem může přispět k eliminaci zatěžujícího chirurgického zákroku u nemocných se systémovou molekulární diseminací, k včasnému podání léčby a ke zpřesnění prognózy onemocnění.

4 Závěr

V předkládané práci jsem se zaměřila na detekci minimální reziduální choroby u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic metodou real-time reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce. Cílem studie bylo navrhnout, optimalizovat a ověřit vhodnost markerů LunX a c-met pro detekci MRD u plic.

Prokázali jsme dostatečnou citlivost a specifitu real-time RT-PCR pro detekci MRD u pacientů s karcinomem plic.

V souboru 75 pacientů s plicním karcinomem jsme poté identifikovali závislosti exprese studovaných markerů na stupni pokročilosti nádorového onemocnění.

Stanovili jsme cut-off hodnoty pro markery LunX a c-met v krvi a kostní dřeni, které jsou využívány k posouzení pozitivita či negativita přítomnosti MRD při vyšetření vzorků pacientů s karcinomem plic.

Prokázali jsme vysokou specifitu LunX pro karcinom plic, jeví se tak jako vhodný kandidát na pozici markeru pro stanovení přítomnosti MRD u pacientů s NSCLC. Jeho míra exprese je zároveň závislá na klinickém stádiu pacientů.

Marker c-met specifitu pro plicní nádory postrádá, je však vhodné ho využít v kombinaci s jinými markery. Zaznamenali jsme vyšší míru exprese c-met v krvi z plicní žíly u pacientů s postižením lymfatických uzlin proti pacientům s histologicky negativními uzlinami.

Detekce MRD u karcinomu plic za použití real-time RT-PCR s markery LunX a c-met je dle naší studie potenciálním prognostickým faktorem. Prezentované výsledky ověříme delším sledováním většího souboru pacientů, což umožní také provést analýzu přežití pacientů. Toto bude předmětem následné diplomové práce.

V. Seznam použité literatury

Adam Z. - Vorlíček J. - Koptíková J. Obecná onkologie a podpůrná léčba. 1. vydání. Praha: Grada publishing. 2003. ISBN 80-247-0677-6.

Alberts B. *et al.* Základy buněčné biologie. 1. vydání. Brno: Espero publishing. 1998. ISBN 80-902906-2-0.

Ariyoshi Y. - Kato K. - Ishiguro Y. *et al.* Evaluation of serum neuron-specific enolase as tumor marker for carcinoma of the lung. Japanese Journal of Cancer Research, 1983, 74: 219-225

Ballestrero A. - Garuti A. - Bertolotto M. *et al.* (2005) Effect of different cytokines on mammaglobin and maspin gene expression in normal leukocytes possible relevance to the assays for the detection of micrometastatic breast cancer. British Journal of Cancer, 2005, 92(10): 1948-1952

Bellon S. F. - Kaplan-Lefko P. - Yang Y. *et al.* c-Met inhibitors with novel binding mode show activity against several hereditary papillary renal cell carcinoma-related mutations. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(5): 2675–2683

Bieche I. - Olivi M. - Champeme M. H. *et al.* Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. International Journal of Cancer, 1998, 78: 661-666

Boyle P. - Ferlay J. Cancer incidence and mortality i Europe, 2004. Annals of Oncology, 2005, 16(3): 481-488

Braun S. – Pantel K. Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. The Oncologist, 2001, 6: 125-132

Brown T. A. Essential molecular biology. 1. vydání. Oxford: Oxford University Press. 2001. ISBN 0-19-963645-1.

Burgess T. - Coxon A. - Meyer S. *et al.* Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-met-dependent human tumors. *Cancer Research*, 2006, 66: 1721-1729

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. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 2000, 25: 169-193

Concannon J. P. - Dalbow M. H. - Liebler G. A. *et al.* The CEA assay in bronchogenic carcinoma. *Cancer*, 1974, 34(1): 184-192

Čapov *et al.* Chirurgie orgánových metastáz. 1. vydání. Praha: Galén. 2008. ISBN 978-80-246-1450-2.

Černý J. - Trněný M. - Klener P. Význam minimální reziduální nemoci a metody jejího stanovení u pacientů s některými hematologickými malignitami. *Klinická onkologie*, 2003, 16(2): 41-48

Česká onkologická společnost: <<http://www.linkos.cz>> [cit. 2012-1-24]

Čihák R. Anatomie 2: Splanchnologia. 1. vydání. Praha: Avicenum. 1988. ISBN 08-060-88.

Dítě P. *et al.* Vnitřní lékařství. Praha: Galén. 2007. ISBN 978-80-7262-496-6.

Do H. – Krypuy M. – Mitchell P. L. *et al.* High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*, 2008, 8: 142

Ge M. J. - Shi D. - Wu Q. C. *et al.* Observation of circulating tumour cells in patient with non-small cell lung cancer by real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction in peroperative period. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2006, 132(4): 248-256

Generi Biotech – Compounds and services for molecular biology:
<<http://www.generi-biotech.com>> [cit. 2012-1-24]

Gershard M. - Juhl H. - Kalthoff H. *et al.* Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumour cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Oncology*, 1994, 12(4): 725-729

Gvozdják J. *et al.* *Interná medicína. 2. vydání.* Martin: Vydavatelstvo Osveta. 1995. ISBN 80-217-0464-0.

Hansen C. - Quake S. R. Microfluidics in structural biology: smaller, faster and leader better. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, 13(5): 538-544

Heyderman E. - McCartney J. C. Epithelial membrane antigen and lymphoid cells. *Lancet*, 1985, 1: 109-110

Hosch S. B. - Scheunemann P. - Izbicki J. R. Minimal residual disease in non-small cell lung cancer. *Seminars in surgical oncology*, 2001, 20(4): 278-281

Cheng M. - Chen Y. - Yu X. *et al.* Diagnostic utility of LunX mRNA in peripheral blood and pleural fluid in patients with primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2008, 8: 156

Cheng T. L. - Chang M. Y. - Huang S. Y. *et al.* Overexpression of circulating c-met messenger RNA is significantly correlated with nodal stage and early recurrence in non-small cell lung cancer. *Chest*, 2005, 128: 1453-1460

Chomczynski P. - Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156-159

Ignatiadis M. - Reinholz M. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2011, 13(5): 222

International Agency For Research On Cancer <www.globocan.iarc.fr> [cit. 2012-2-21]

International RadioSurgery Association <www.irsa.org> [cit. 2012-1-24]

Iwao K. - Watanabe T. - Fujiwara Y. *et al.* (2001) Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 2001, 91: 433-437

Johnson P. - Burchill S. - Selby P. The molecular detection of circulating tumour cells. *British Journal of Cancer*, 1995, 72(2): 268-276

Jung R. - Kruger W. - Hosch S. *et al.* Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *British Journal of Cancer*, 1998, 78(9): 1194-1198

Kim K. J. - Wang L. - Su Y. *et al.* Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12: 1292-1298

Klener P. *Klinická onkologie*. 1. vydání. Praha: Galén. 2002. ISBN 80-7262-151-3.

Klener P. *et al.* *Vnitřní lékařství*. 3. vydání. Praha: Galén. 2006. ISBN 80-2461-252-6.

Koutecký J. *et al.* *Klinická onkologie I*. Přerov: Riopress. 2004. ISBN 80-86221-77-6.

Krüger W. H. - Stockschröder M. - Hennings S. *et al.* Detection of cancer cells in peripheral blood stem cells of women with breast cancer by RT-PCR and cell culture. *Bone Marrow Transplant*, 1996, 18(1): 18-20

Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine Related Cancer*, 2006, 13(4): 1033-1067

Li Y. - Dong X. - Yin Y. *et al.* BJ-TSA-9, a novel human tumor-specific gene, has potential as a biomarker of lung cancer. *Neoplasia*, 2005, 7(12): 1073-1080

Liska D. - Chen C. - Bachleitner-Hofmann T. *et al.* HGF rescues colorectal cancer cells from EGFR inhibition via MET activation. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17: 472-482

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

Martens T. - Schmidt N. - Eckerich C. *et al.* A novel one-armed anti-c-met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12: 6144-6152

Mitas M. - Hoover L. - Silvestri G. *et al.* LunX is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood [corrected]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2003, 5(4): 237-242

Miura N. - Nakamura H. - Sato R. *et al.* Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Science*, 2006, 97(12): 1366-1373

National Cancer Institute <www.cancer.gov> [cit. 2012-1-24]

Pantel K. - Brakenhoff R. H. - Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(5): 329-340

Pantel K. - Cote R. J. - Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91(13): 1113-1124

Paterlini-Brechot P. - Benali N. L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Letters*, 2007, 253(2): 180-204

Petrovický *et al.* Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi II.: Svazek orgány a cévy. 1. vydání. Martin: Vydavatelstvo Osveta. 2001. ISBN 80-8063-046-1.

Petruželka L., Konopásek B. *et al.* Klinická onkologie. 1. vydání. Praha: Karolinum. 2003. ISBN 80-246-0395-0.

Ráclavský V. Úvod do základních metod molekulární genetiky. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 1998. ISBN 80-7067-892-5.

Santabarbara P. - Molina R. - Estape J. *et al.* Phosphohexose isomerase and carcinoembryonic antigen in sera of patients with primary lung cancer. *The International Journal of Biological Markers*, 1988, 3(2): 113-122

Sattler M. - Pride Y. B. - Ma P. *et al.* A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer Research*, 2003, 63: 5462-5469

Sculier J. P. - Feld R. - Evans W. K. *et al.* Carcinoembryonic antigen: a useful prognostic marker in small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1985, 3(10): 1349-1354

Sequist L. V. - Nagrath S. - Toner M. *et al.* The CTC-chip an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *Journal of Thoracic Oncology*, 2009, 4(3): 281-283

Sheu C. C. - Chang M. Y. - Chang H. C. *et al.* Combined detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer. *Oncology*, 2006, 70: 203-211

Shingyoji M. - Takiguchi Y. - Watanabe R. *et al.* Detection of tumor specific gene expression in bone marrow and peripheral blood from patients with small cell lung carcinoma. *American Cancer Society*, 2003, 97(4): 1057-1062

Smith B. - Selby P. - Southgate J. *et al.* Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*, 1991, 338(8777): 1227-1229

Snustad D. P. - Simmons M. J. *Genetika*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita. 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.

Srovnal J. - Benedíková A. – Klos D. *et al.* Minimální reziduální choroba u pacientů s karcinomem pankreatu - pilotní studie. In: Edukační sborník: Brněnské onkologické dny a ... Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky: Brno. Brno: Masarykův onkologický ústav, [1976]-. 2010, 285-286

Srovnal J. - Kořínková G. - Vysloužil K. *et al.* Předběžné výsledky vyšetření minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu - korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci. In: Edukační sborník: Brněnské onkologické dny a ... Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky: Brno. Brno: Masarykův onkologický ústav, [1976]-. 2005, 168

Stabile L. P. - Rothstein M. E. - Keohavong P. *et al.* Targeting of both the c-Met and EGFR pathways results in additive inhibition of lung tumorigenesis in transgenic mice. *Cancers*, 2010, 2: 2153-2170

Stott S. L. - Hsua C. - Tsukrova D. I. *et al.* Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *PNAS*, 2010, 43(107): 18392-18397

System pro vizualizaci onkologických dat - Epidemiologie zhoubných nádorů v České Republice <www.svod.cz> [cit. 2011-9-13]

Šmarda J. *et al.* *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita. 2005. ISBN 80-210-3841-1.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR <www.uzis.cz> [cit. 2011-9-13]

Van der Auwera I. - Peeters D. - Benoy I. H. *et al.* Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2010, 102(2): 276-284

Voet D. - Voetová J. *Biochemie*. 1. vydání. Praha: Victoria publishing. 1990. ISBN 80-85605-44-9.

Von Keyserling H. – Bergmann T. – Wiesel M. *et al.* The use of melting curves as a novel approach for validation of real-time PCR instruments. *BioTechniques*, 2011, 51: 179-184

Went P. T. *et al.* Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*, 2004, 35(1): 122-128

Wong M. L. - Medrano J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 2005, 39(1): 75-85

VI. Seznam použitých zkratk

ALK – kináza anaplastického lymfomu (Anaplastic Lymphoma Kinase)

AMV - Virus ptačí myeloblastosy (Avian Myeloblastosis Virus)

ANOVA – analysis of variation

BHQ1 – zhášec (Black Hole Quencher 1)

CD45 – leukocytární antigen (Cluster of Differentiation 45)

cDNA - komplementární DNA (Complementary Deoxyribonucleic Acid)

CEA - karcinoembryonální antigen (Carcinoembryonic Antigen)

CK19 - cytokeratin 19

CT - Počítačová tomografie (Computed Tomography)

CTCs - cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumour Cells)

DAPI - 4'-6-diamidino-2-phenylindole

DEPC - diethyl pyrokarbonát

DNA - deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs - deoxynukleotidtrifosfáty

dsDNA - dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (Double Stranded Deoxyribonucleic Acid)

EGFR - receptor pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor)

EpCAM - adhezní molekula epiteliálních buněk (Epithelial Cell Adhesion Molecule)

FAM - 6-carboxyfluorescein

FISH - Fluorescenční in situ hybridizace (Fluorescence In Situ Hybridization)

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

Fw primer - levý primer (Forward Primer)

GAPDH - Glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza

HB-chip - Herringbone-chip

HEX - Hexachlorofluorescein

HGFR (c-met) - receptor pro růstový faktor hepatocytů (Hepatocyte Growth Factor Receptor)

HPLC - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

HRCT - Výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností (High Resolution Computed Tomography)

HRM – vysokorozlišovací analýza tání (High Resolution Melting)

hTERT - lidská reverzní telomeráza (Human Telomerase Reverse Transcriptase)

IGF I - insulínu podobný růstový faktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1)

IMRT – Radioterapie s modulovanou intenzitou svazku (Intensity-Modulated Radiation Therapy)

LunX - plicní specifický X protein (Lung Specific X Protein)

LUX™ - Light Upon Extension

MMLV - Moloneyho virus myší leukemie (Moloney Murine Leukemia Virus)

MRD - Minimální reziduální choroba (Minimal Residual Disease)

mRNA - Mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleic Acid)

NSCLC - Nenalobuněčný plicní karcinom (Non-Small Cell Lung Carcinoma)

NSE - Neuron specifická enolasa (Neuron Specific Enolase)

OPC - Purifikační oligonukleotidová kazeta (Oligonucleotide Purification Cartridge)

PCR - Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PET - Pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)

PET-CT – Pozitronová emisní tomografie – počítačová tomografie (Positron Emission Tomography – Computed Tomography)

preproGRP - prepro-gastrin-uvolňující peptid (Prepro-Gastrin-Releasing Peptide)

PRINS - Primed In Situ Labeling

Rev primer - pravý primer (Reverse primer)

RFLP - Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RNA - Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)

RT-PCR - Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

SCC (SSCA) - Antigen skvamózních nádorových buněk (Squamous Cell Carcinoma Antigen)

SCLC - Malobuněčný plicní karcinom (Small Cell Lung Carcinoma)

TGF α - transformující růstový faktor alfa (Transforming Growth Factor Alpha)

T_m - teplota tání (Melting Temperature)

TPA - tkáňový polypeptidový antigen (Tissue Polypeptide Antigen)