

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Nové markery pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| Autor: | Bc. Lucie Resutíková |
| Studijní program: | N1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | MUDr. Josef Srovnal |
| Termín odevzdání práce: | 26. dubna 2010 |

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

V Olomouci dne 26. dubna 2010

.....

Bc. Lucie Resutíková

Děkuji především svému školiteli MUDr. Josefu Srovnalovi za odborné vedení, cenné rady a připomínky, poskytnutí literatury a trpělivost při vypracování diplomové práce. Dále děkuji Věře Růžkové za pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Lucie Resutíková |
| Název práce | Nové markery pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | MUDr. Josef Srovnal |
| Rok obhajoby práce | 2010 |
| Abstrakt | <p>Karcinom pankreatu je jedním z nejzhoubnějších karcinomů u člověka a naděje na trvalé vyléčení je i dnes velmi malá. Je to onemocnění s nejvyšší mortalitou ze všech malignit zažívacího traktu. Potencionálním markerem pro přesnější diagnostiku a staging tohoto onemocnění se dle současných poznatků jeví být telomerasa (hTERT). Telomerasu můžeme využít v klinické praxi pro detekci minimální reziduální choroby (MRD) u pacientů se solidními nádory. 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 (RT-PCR). V této práci jsme se zabývali stanovením hodnot exprese hTERT metodou RT-PCR ve vzorcích tumoru, systémové a portální krve, kostní dřeni a peritoneální laváže u pacientů s karcinomem pankreatu a ve vzorcích krve zdravých dárců. Z dosažených výsledků byly stanoveny cut-off hodnoty. Nad tyto hodnoty byly pacienti považováni za pozitivní na přítomnost minimální reziduální choroby. Cut-off hodnoty hTERT byly pro systémovou i portální krev 5000 kopií hTERT/ug RNA, pro kostní dřeň 60 000 kopií hTERT/ug RNA a pro peritoneální laváž 200 kopií hTERT/ug RNA. Bylo prokázáno statisticky významně kratší přežití u pacientů s pozitivitou hTERT v portální a systémové krvi. Pozitivita hTERT v systémové a/nebo portální krvi je negativním prognostickým faktorem u pacientů s karcinomem pankreatu.</p> |
| Klíčová slova | Karcinom pankreatu, real-time RT-PCR, telomerasa, minimální reziduální choroba |
| Počet stran | |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification:

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Lucie Resutíková |
| Title | Novel markers for minimal residual disease detection in pancreatic cancer patients |
| Type of thesis | Graduation thesis |
| Department | Department of Biochemistry |
| Supervisor | MUDr. Josef Srovnal |
| The year of presentation | 2010 |
| Abstract | <p>Pancreatic cancer is one of the most aggressive malignant human tumor and the mortality is the highest in gastrointestinal tumors. The probability of cure is still very small today. Telomerase (hTERT) is promising marker for more accurate diagnosis and disease staging. In the clinical practise, we can use telomerase for minimal residual disease (MRD) detection in solid tumors patients. 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 (RT-PCR) is the most sensitive method for MRD detection. The aim of study was to determinate hTERT expression using RT-PCR method in samples of tumor, portal and peripheral blood, bone marrow, peritoneal lavage in pancreatic cancer patient and in the samples of blood of healthy patients. The cut-off values of hTERT were determined for peripheral and portal blood (5000 copies of hTERT/μg RNA), bone marrow (60 000 copies of hTERT/μg RNA) and peritoneal lavage (200 copies of hTERT/μg RNA). The poorer overall survival was found in patients, who were positive for hTERT in peripheral and portal blood. MRD detection using RT-PCR for hTERT in peripheral and/or portal blood is negative prognostic factor in pancreatic cancer.</p> |
| Keywords | Pancreatic cancer, real-time RT-PCR, telomerase, minimal residual disease |
| Number of pages | |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

I. Obsah

| | | |
|--------|---|----|
| I. | Obsah | 6 |
| II. | Cíle práce | 7 |
| III. | Teoretická část | 8 |
| 1. | Úvod..... | 8 |
| 2. | Slinivka břišní..... | 11 |
| 2.1. | Stavba slinivky břišní..... | 11 |
| 2.2. | Karcinom slinivky břišní..... | 12 |
| 2.2.1. | Epidemiologie..... | 12 |
| 2.2.2. | Etiopatogeneze..... | 13 |
| 2.2.3. | Klinický obraz..... | 16 |
| 2.2.4. | Diagnostika a staging..... | 16 |
| 2.2.5. | Terapie..... | 17 |
| 3. | Polymerásová řetězová reakce..... | 18 |
| 4. | Reverzně transkriptasová polymerásová řetězová reakce..... | 20 |
| 4.1. | Primery..... | 21 |
| 4.2. | Termostabilní polymerasy..... | 22 |
| 5. | Real-time reverzně-transkriptasová polymerásová řetězová reakce... 24 | |
| 6. | Molekulární detekce cirkulujících nádorových buněk..... | 28 |
| 6.1. | Cirkulující nádorové buňky a metastázy..... | 28 |
| 6.2. | Detekce cirkulujících nádorových buněk..... | 21 |
| 7. | Telomerasa..... | 31 |
| 7.1. | Lidská telomerasa reverzní transkriptasa..... | 31 |
| 7.2. | Struktura telomer a Shelterin komplex..... | 33 |
| 7.3. | Telomerasa jako diagnostický marker u karcinomu pankreatu..... | 34 |
| 7.4. | Zesílení aktivity telomerasy (TRAP)..... | 34 |
| 7.5. | Detekce hTERT v maligních a benigních nádorech pankreatu..... | 35 |
| IV. | Experimentální část | 37 |
| 1. | Optimalizace real-time RT-PCR..... | 37 |
| 1.1. | Primery a próba..... | 37 |
| 1.2. | Reakce real-time RT-PCR..... | 37 |
| 1.3. | Standardy..... | 38 |
| 1.4. | Materiál a chemikálie..... | 40 |
| 1.5. | Použité přístroje..... | 41 |
| 2. | Výsledky..... | 42 |
| 2.1. | Analýza přežití..... | 52 |
| V. | Diskuze | 57 |
| VI. | Závěr | 58 |
| VII. | Seznam použité literatury | 59 |
| VIII. | Použité zkratky | 64 |

II. Cíle práce

1. Vyšetřit expresi hTERT ve vzorcích systémové a portální krve, kostní dřeně a peritoneální laváže u pacientů s karcinomem pankreatu a ve vzorcích krve zdravých dárců.
2. Ověřit vhodnost použití hTERT jako markeru pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu.
3. Stanovit prognostickou hodnotu minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu.
4. Zavést novou metodiku pro stanovení MRD u pacientů s karcinomem pankreatu.

III. Teoretická část

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních onemocněních druhou nejčastější příčinou úmrtí obyvatel České republiky. V počtu onkologicky nemocných pacientů zaujímá Česká republika přední místa v Evropě. V ČR každý rok onemocní na nádorová onemocnění 66 000 lidí a zemře na rakovinu 29 000 lidí ročně, což je asi 80 lidí každý den. V incidenci i mortalitě karcinomu tlustého střeva obsazuje Česká republika dlouhodobě první místa nejen v Evropě. V posledních desetiletích přibývá nádorů plic, tlustého střeva a především konečníku. Zvyšuje se také počet případů rakovin prsu, kůže, ledvin, močového měchýře a štítné žlázy. Nejčastějším zhoubným onemocněním u mužů je karcinom plic (v roce 2003 zemřelo 4 600 mužů), výrazně přibýlo karcinomů tlustého střeva, konečníku a prostaty, naopak se snižuje výskyt karcinomu žaludku. U žen je pak nejčastějším zhoubným onemocněním karcinom prsu (v roce 2002 zemřelo 1965 žen), roste také incidence karcinomu plic, poklesl výskyt karcinomu žaludku a stacionární zůstává incidence karcinomu děložního čípku. Celkově se zvyšuje počet případů nádorových onemocnění a stále zůstává velký počet pacientů umírající na toto onemocnění, v dnešní době najdeme nemocného v každé širší rodině. (www.linkos.cz)

Nádorová onemocnění provázejí lidstvo od pradávna, důkaz nám o tom podávají archeologické nálezy. U egyptských mumií byly objeveny známky svědčící pro nádorová onemocnění, v egyptských papyrech byly nalezeny popisy příznaků zhoubných onemocnění. Zmínky o nádorech a nejrůznější doporučení k jejich léčbě se objevují již ve spisech starověkých učenců všech civilizací. V antickém Řecku popsal nádorová onemocnění Hippokratés, od něhož pochází i název karcinom (karkinóma). Tento název pravděpodobně zvolil podle pokročilého karcinomu prsu, který při svém šíření s průvodní lymfangitidou může připomínat klepeta kraba (krab – karkínos). Také Galén se věnoval nádorovým onemocněním, když se zmiňuje o rozdílné prognóze časných a pokročilých stádií nádorových onemocnění. Méně pokročilé formy byly léčeny chirurgicky a zkoušela se již také medikamentózní léčba. V období středověku nebyla nádorová onemocnění zrovna středem zájmu. Vzrůstající zájem o problematiku zhoubných nádorů a jejich léčbu se začal projevovat v 19. století. Jedinou léčebnou modalitou té doby byla chirurgická léčba, která byla však stále limitovaná např. chyběním anestezie, antibiotik a pravidel asepse. Naději na lepší prognózu zhoubných nádorů přinesl objev rentgenových paprsků v roce 1895 a radia v roce 1899. (Klener, 2002)

V současnosti jsou základními léčebnými metodami chirurgická léčba, radioterapie, chemoterapie, hormonální léčba a biologická léčba. Radioterapie je neodmyslitelnou součástí

onkologické léčby, která využívá ionizujícího záření. Nádorové buňky jsou často k záření vnímavější než zdravé, tyto ozářené nádorové buňky umírají a nejsou schopny se dále dělit. Asi 50% pacientů je podrobena radioterapii s cílem úplného vyléčení (kurativní záměr) nebo ke zmírnění obtíží způsobené nádorem (paliativní záměr). Chemoterapie spočívá v podávání léků s cytotoxickým nebo s cytostatickým účinkem. Tyto léky často naruší nádorovou DNA nebo ovlivní buněčnou strukturu nutnou pro dělení buněk, dojde k zastavení růstu až smrti narušených buněk. Standardní chemoterapeutika mají vliv i na zdravé buňky, čímž způsobují mnohdy závažné nežádoucí účinky léčby. Proto je léčba prováděna v cyklech, aby se zdravé buňky mohly zregenerovat. Chemoterapie může být kurativní, má za cíl vyléčit pacienta. U adjuvantní chemoterapie dochází k podávání cytostatik po chirurgické léčbě tam, kde se předpokládá vznik metastáz. Podává se pouze u některých typů nádorů, kde byl význam adjuvantní terapie prokázán. Před operací se praktikuje zejména neoadjuvantní chemoterapie, která má za cíl zmenšit lokálně pokročilý tumor. Dalším typem chemoterapie je paliativní, je nejčastější, zmenšuje velikost tumoru a vede ke zmírnění obtíží pacienta. V medicíně se také kombinuje záření s chemoterapií (radiochemoterapie), protože některé léky zvyšují účinnost záření a naopak. Tato kombinovaná léčba je toxičtější nejen pro nádor, ale pro celý organismus. Lékař musí zvážit možné výhody i rizika spojená s touto léčbou. Hormonální léčba brání účinku hormonů podporující růst nádoru. Účinek je vázán na přítomnost specifických buněčných receptorů. Je lépe snášena než chemoterapie a můžeme ji ve své podstatě považovat za biologicky cílenou léčbu. (Klener, 2002; Vorlíček et al. 2000) Biologická léčba obnovuje porušenou funkci protinádorové imunity a zapojuje se do léčby nádorového onemocnění. Je schopna cíleně útočit na nádorové buňky a pochody, které se dějí v nádorech. Mezi biologickou léčbu řadíme antiangiogenní léčbu, diferenciační léčbu, léčbu pomocí inhibitorů proteazomu a inhibitorů tyrosinkinasy. Angiogenní léčba není přímo mířena na nádor, ale na nádorové cévy, tlumí tvorbu cév v nádoru. K nádoru se nedostává kyslík a dochází ke zpomalení nebo zastavení růstu nádoru. Diferenciační léčba indukuje proces buněčné diferenciace a brzdí tak růst nádoru. Inhibitory proteazomu brání odbourávání bílkovin, v buňce nastává chaos a buňka umírá. Inhibitory tyrosinkinasy blokují enzym tyrosinkinasu, který přenáší signály do buňky. Buňka nemůže přijímat signál ze svého okolí a přestává růst. (www.linkos.cz, Klener, 2002)

V duchu „evidence based medicine“ vznikla začátkem třetího tisíciletí v České republice síť onkologických pracovišť, která se zabývají moderní a stále dražší komplexní léčbou nádorových onemocnění a mají pro tuto léčbu všechny potřebné předpoklady. Do této sítě bylo zařazeno 17 komplexních onkologických center (KOC) a 1 komplexní onkologická skupina (KOS). Seznam onkologických center nalezneme na internetových stránkách www.linkos.cz, www.onconet.cz. (www.linkos.cz)

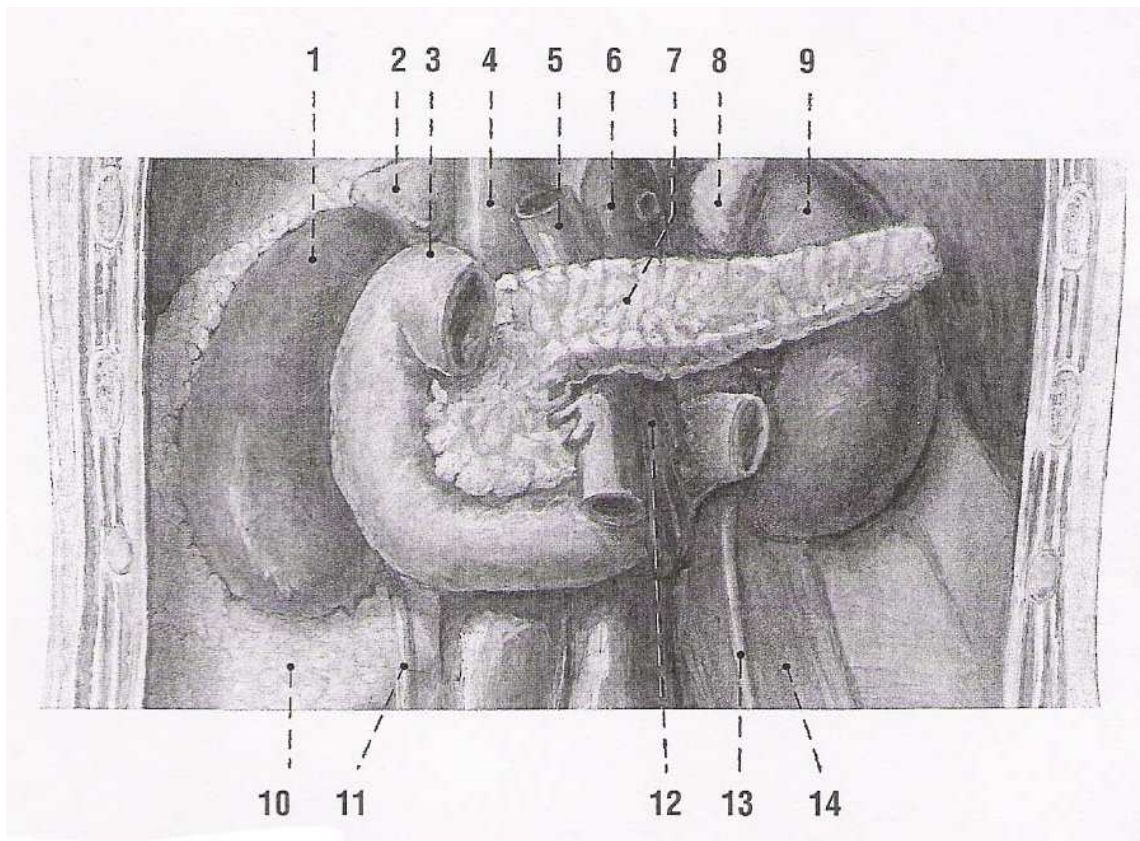
V současné době byl také zpracován Národní onkologický program ČR. Mezi cíle Národního onkologického programu patří snižování incidence a mortality nádorových onemocnění, zlepšení kvality života nemocného a racionalizace nákladů na diagnostiku a léčbu onkologicky nemocného pacienta. (www.linkos.cz)

2. Slinivka břišní

Slinivka břišní neboli pankreas je důležitou součástí trávicího ústrojí. Histologicky se jedná o žlázu s exokrinní a endokrinní sekrecí. Exokrinní složka tvoří asi 84% a endokrinní 2%, zbytek orgánu tvoří vývody a cévy. Exokrinní část slinivky produkuje trávicí enzymy (např. trypsin, amylázu, lipázu) secernované do dvanáctníku. V parenchymu exokrinní žlázy je roztroušeno asi 1-2 miliony Langerhansových ostrůvků, které jsou složeny z endokrinních buněk, hlavně z α a β buněk. α buňky produkují glukagon a β buňky insulin, což jsou hormony s protichůdným vlivem na metabolismus sacharidů v organismu. Součástí ostrůvků jsou i další buňky produkující gastrin, VIP, somatostatin, serotonin, pankreatický polypeptid a další. (Čihák, 2002) Každá z histologických částí pankreatu má svá typická onemocnění. (Nečas, 2003)

2.1. Stavba slinivky břišní

Slinivka svým tvarem připomíná velkou šedě růžovou hrušku. Je 12 – 16 cm dlouhá a má hmotnost 60 – 90 g. Je umístěná v retroperitoneu za žaludkem, v ohbí duodena, před páteří v úrovni prvního až třetího bederního obratle a je zde kryta pobřišnicí. Je v kontaktu s játry, duodenem, slezinou a levou ledvinou. V těsné blízkosti slinivky dále prochází řada životně důležitých tepen a žil, což zařazuje zákroky na slinivce mezi nejtěžší břišní operativu vůbec. (Čihák, 2002)



Obr. 1: Retroperitoneální orgány po odstranění nástěnného peritonea (Číhák, 2002)

1 pravá ledvina, 2 pravá nadledvina, 3 dvanáctník, 4 dolní dutá žíla, 5 vrátnice, 6 břišní aorta, 7 slinivka břišní, 8 levá nadledvina, 9 levá ledvina, 10 corpus adiposum pararenale, 11 pravý močovod, 12 arteria mesenterica superior, 13 levý močovod, 14 velký sval bederní

Na pankreatu anatomicky rozlišujeme tři hlavní části: hlavu (*caput pancreatis*), tělo (*corpus pancreatis*) a ocas (*cauda pancreatis*). Hlava je okrouhlá, umístěná v ohybu dvanáctníku vpravo od páteře. Tělo je tvarem protáhlé, trojboké a kříží páteř a břišní aortu. Zaoblený ocas dosahuje až ke slezině. (obr. 1) (Číhák, 2002)

2.2 Karcinom pankreatu

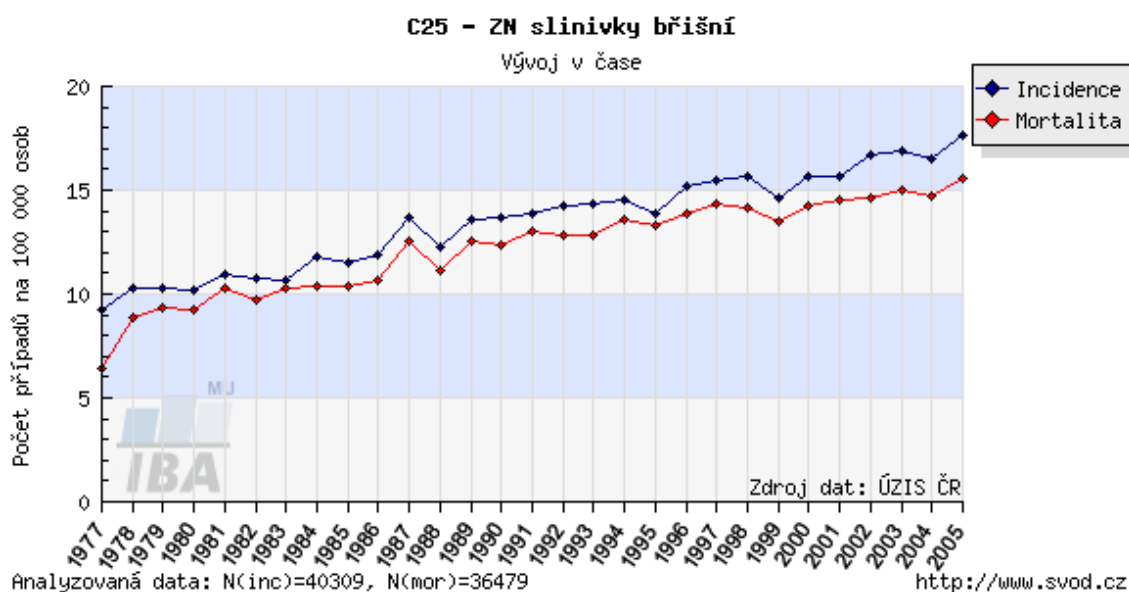
2.2.1. Epidemiologie

V počtu úmrtí se karcinom pankreatu řadí na páté místo ze všech zhoubných nádorů vůbec. Je jedním z nejzhoubnějších maligních onemocnění u člověka a naděje na trvalé vyléčení je i přes dnešní pokroky v léčbě velmi malá. Je to způsobeno zejména pozdní diagnózou, protože klinické potíže často nepoukazují na karcinom pankreatu. (Ohuchida et al., 2006) Karcinom nejčastěji postihuje hlavu a tělo, méně často se vyskytuje v ocasu slinivky. Většina nádorů vzniká v kanálcích, kudy prochází pankreatická šťáva. Velmi zřídka vzniká nádor

v buňkách, které produkují inzulín nebo u žlučového, což způsobí poruchu odtoku žluče. (Nečas et al., 2003; Mačák & Mačáková, 2004; Vorlíček et al., 2000)

Od 50. let se výskyt karcinomu slinivky břišní neustále zvyšuje. Vyšší výskyt je pozorován u pacientů s chronickou pankreatitidou, dále u kuřáků, alkoholiků a u lidí požívajících energeticky bohatou potravu. První případy nádoru slinivky se objevují již v 35. roce věku a od 45 let výskyt karcinomu výrazně stoupá. 63% případů je v době diagnózy určeno jako primárně pokročilé onemocnění, pouhé 4,5% jako časné stádium a 32% případů karcinomu pankreatu je neléčeno a diagnostikováno až při úmrtí. (Klener, 2001)

V roce 1999 byla incidence karcinomu pankreatu 14,5/100 000 obyvatel, to je 5,5% všech nově vzniklých nádorů a asi 5% všech nádorových úmrtí. O něco častěji se vyskytuje u mužů. (Petruželka & Konopásek, 2003)



Obr. 2: Incidence a mortalita v počtu případů na 100 000 obyvatel (www.svod.cz - C25-zhoubný nádor slinivky břišní; zpracováno ve spolupráci s ÚZIS ČR)

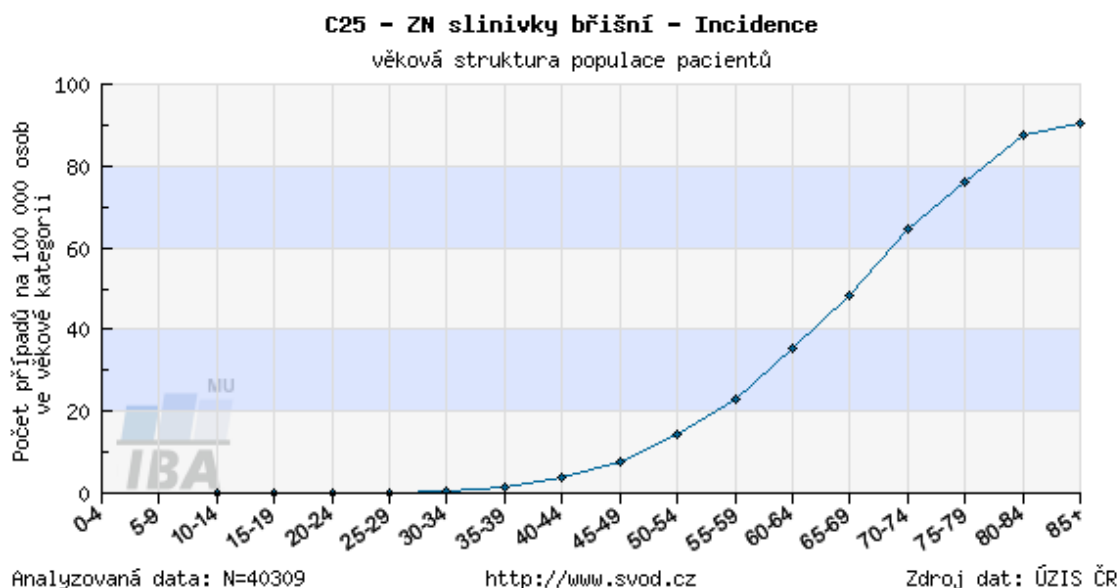
2.2.2. Etiopatogeneze

Doposud není zcela objasněna přesná příčina vzniku karcinomu slinivky břišní. Avšak vznik karcinomu pankreatu může být spojen s řadou rizikových faktorů.

Mezi rizikové faktory řadíme:

- Věk (obr. 3) – je to nejsilnější neovlivnitelný rizikový faktor obecně, střední věk při stanovení diagnózy činí 65 let, 80% diagnostikovaných dosáhlo věku 60 a více let. Kumulativní riziko

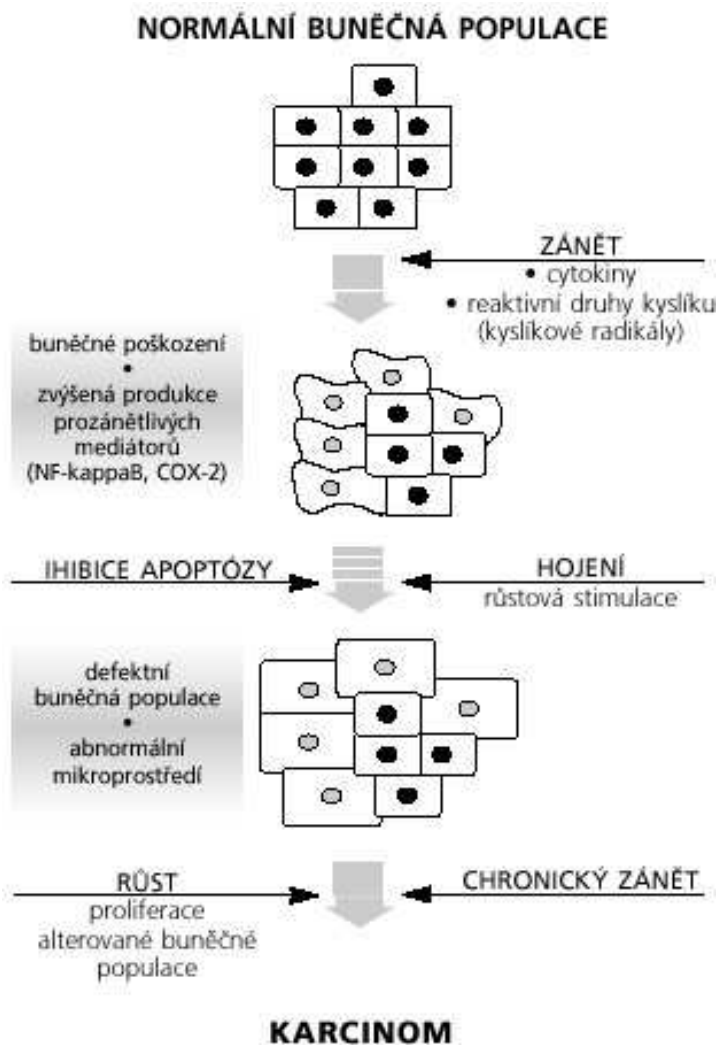
onemocnění pro osobu starší 75 let činí až 1%. (Mačák & Mačáková, 2004; Klener, 2001; Šálek, 2004)



Obr. č. 3: Incidence karcinomu pankreatu podle věku (www.svod.cz - C25-zhoubný nádor slinivky břišní; zpracováno ve spolupráci s ÚZIS ČR)

- Kouření – řadíme ho mezi nejsilnější preventabilní rizikový faktor nejen u karcinomu pankreatu. Zvyšuje riziko vzniku karcinomu ve srovnání s nekuřáky až dvakrát. U mužů s minimálně 35 letou anamnézou kouření dvaceti cigaret denně bylo oproti nekuřákům popsáno relativní riziko onemocnění 1,46; stejně silné kuřáčky mají po 23 letech relativní riziko zvýšené na 1,84. U exkuřáků pomíjí riziko karcinomu až po 15 letech abstinence. Pasivní kuřáctví zatím nebylo potvrzeno jako samostatný rizikový faktor.
- Diabetes mellitus – problematika vztahu mezi diabetem a karcinomem byla dlouhodobě zdrojem protichůdných informací. Na jedné straně byl diabetes chápán jako rizikový faktor pro nádorové onemocnění, na straně druhé byl považován za jeho následek ve smyslu pankreatogenního diabetu. V dnešní době se ukazuje, že vlastním rizikovým faktorem je zvýšená postprandiální glykémie, a tedy snížená glukosová tolerance. Jako promotor karcinogeneze je označován inzulin, nádorové buňky exprimují inzulinové receptory, jejichž aktivace může stimulovat buněčné dělení. Riziko představuje diabetes mellitus druhého typu, pěti a víceleté trvání diabetu dvakrát zvyšuje relativní riziko následného rozvoje karcinomu.
- Chronická pankreatitida – předpokládá se, že chronická pankreatitida indukuje genetické změny v tkáni a současně probíhající hojivý proces vystavuje defektní buňky zánětlivým růstovým faktorům, vzniká tak abnormální prostředí, ve kterém buňky stromatu „pěstují“ defektní populaci buněk a tím usnadňují růst nádorových buněk. (obr. 4)

- Životospráva – strava bohatá na tuky, časté požívání masa, vysoký cholesterol, vysoký body max index (BMI), nedostatek ovoce a zeleniny má také vliv na vznik karcinomu pankreatu. (Mačák & Mačáková, 2004; Klener, 2001; Šálek, 2004; Adam et al., 2002)



Obr. 4: Vývoj chronické pankreatitidy až ke karcinomu slinivky břišní (Šálek, 2004)

- Dědičnost – riziko vzniku je třikrát vyšší u člověka, jehož příbuzný měl toto onemocnění. Také karcinom tlustého střeva a vaječníků u příbuzných představuje vyšší riziko pro vznik karcinomu pankreatu.
- Molekulární etiologie – karcinom pankreatu je dnes považován za primárně genetické onemocnění. Na molekulární úrovni je sledována akumulace genetických změn v DNA buněk slinivky. Kumulativní efekt získaných mutací v onkogenech K-ras a Her-2/neu a v tumor supresorových genech p16^{INK4A/CDKN2A}, p53, DPC4/SMAD4 a BRCA2 se projeví vznikem nádorového onemocnění. Popisována je v této souvislosti zvýšená aktivita telomerasy. (Mačák & Mačáková, 2004; Klener, 2001; Šálek, 2004) Nejčastější genetickou abnormalitou

v pankreatických adenokarcinomech jsou mutace genu *K-ras* a delece nebo mutace *p53* genu. Detekce těchto mutací může být použito jako diagnostického markeru pro zpřesnění diagnózy rakoviny pankreatu. (Hiyama et al., 1997)

2.2.3. Klinický obraz

Časná stadia karcinomu pankreatu jsou bohužel ve většině případů asymptomatická. První obtíže spojené s karcinomem slinivky se objevují až v pokročilém stádiu. Při klinickém vyšetření můžeme zjistit hmatný, nebolestivý zvětšený žlučník. U nádoru hlavy pankreatu, která se vyskytuje přibližně ve dvou třetinách případů, je varovným příznakem náhle vzniklá hyperbilirubinémie až ikterus. Asi 3 měsíce před vznikem ikteru se objevuje epi- a mezogastrická bolest břicha. Nádory těla a kaudy jsou naproti tomu dlouho bezbolestivé. Bolestmi páteře se projevuje karcinom kaudy, pacienti často pociťují úlevu v předklonu nebo při „schoulení se“ na břicho. (Klener, 2001, 2002) Pokročilejší stadia karcinomu pankreatu provází bolest v horní části břicha nebo v zádech, anorexie, hubnutí, dyspepsie, slabost, únava, nechutenství, ztráta chuti k jídlu, váhový úbytek, u 10-20 % nemocných se vyvine diabetes. (Klener, 2001, 2002; Koutecký et al. 1989)

2.2.4. Diagnostika a staging

Diagnóza karcinomu pankreatu bývá většinou pozdní. U nemocných nacházíme bezbolestný ikterus, hmatný a nebolestivý žlučník (Courvoisierovo znamení), ascites nebo palpujeme nádorové masy. Základním vyšetřením je ultrasonografie, jejíž citlivost je 75%, velmi důležitá je také endoultrasonografie zobrazující drobná ložiska na pankreatu a stav peripankreatických uzlin. Nejdůležitější diagnostickou metodou je počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance. CT nám také slouží ke klinickému stagingu onemocnění. Další diagnostickou metodou je endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie (ERCP), kdy pomocí kontrastní látky zobrazujeme žlučové a pankreatické vývodné cesty. Pomocí této metody můžeme snadno odlišit karcinom pankreatu od nemaligního onemocnění, jako je chronická pankreatitida. V pankreatické šťávě je také možné sledovat specifickou nádorovou mRNA, díky které můžeme rovněž odlišit karcinom od chronické pankreatitidy. U laboratorního vyšetření stanovujeme nádorové markery – CEA, CA 19-9, CA 50 a DUPAN-2. Tyto markery nejsou spojeny s časnou diagnostikou, ale pomocí nich monitorujeme průběh nemoci a efektivitu léčby. (Klener, 2001; Ohuchida et al., 2006; Adam et al., 2002)

Karcinom pankreatu dělíme dle pokročilosti na časná stadium (nádor omezený na žlázu), lokálně pokročilé (inoperabilní nádor) a metastatické. (Klener, 2001)

2.2.5. Terapie

Jedinou v současnosti potencionálně kurabilní metodou je chirurgická léčba, a to v případě, že karcinom je resekabilní. Operace může výrazně prodloužit a zlepšit délku a kvalitu života pacienta. Radikální resekce se podaří pouze u 20% pacientů, u ostatních je onemocnění velmi rozsáhlé, neoperovatelné, nebo se prokáží metastázy. Pouze 20% pacientů, u kterých byla provedena radikální resekce, žije 5 let po operaci. (Adam et al., 2002) U 70-80% pacientů dochází k lokálnímu relapsu, příčinou může být nekompletní resekce tumoru, vzdálené metastázy nebo peritoneální karcinosa. (Vogel et al., 2007) Samostatná radioterapie se v léčbě karcinomu pankreatu příliš nepoužívá, jelikož buňky karcinomu pankreatu nepatří zrovna k radiosensitivním a navíc v těsné blízkosti slinivky leží několik důležitých orgánů. Uplatňuje se spíše v kombinaci s chemoterapií. Chemoterapie spočívá v podávání kombinace cytostatik. Základním cytostatikem je 5-fluorouracil kombinován s mitomycinem, cisplatinou a s gemcitabinem. Je také zkoušena tzv. čtyřkombinace (5-fluorouracil, leukovorin, karboplatina a epirubicin), ale pouze s parciální regresí u 15% nemocných. Stále se hledají i jiné léčebné možnosti, např. aplikace flutamidu nebo aplikace inhibitorů matrixmetaloproteáz. (Klener, 2002; Klener, 2001) V současnosti se stává rozšířenou metodou biologická léčba, která při léčbě karcinomu pankreatu zatím nedosahuje pozitivních výsledků v klinických studiích. (Šafanda & Oliverius, 2008)

Na sledování pacientů po ukončení léčby jsou protichůdné názory, protože časná diagnóza relapsu nezlepšuje prognózu pacienta. Doporučená kontrola se provádí první rok po léčbě v tříměsíčních intervalech. (Adam et al., 2002)

Karcinom pankreatu bývá často doprovázen exokrinní i endokrinní pankreatickou nedostatečností. Vhodná je léčba pankreatickými enzymy nebo léčba inzulinem, která závisí na stupni poruchy sacharidové intolerance. (Klener, 2001)

3. Polymerázová řetězová reakce

Metodu polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction - PCR) objevil pro vznikající svět molekulární biologie Karry B. Mullis, když v roce 1983 přišel na myšlenku exponenciální amplifikace DNA. Tato technika byla poprvé představena odborné veřejnosti v roce 1985 a v roce 1989 časopis Science jmenoval stěžejní molekulu PCR – *Taq polymerasu* – molekulou roku. V roce 1991 se metoda PCR již používala po celém světě v různých oborech jako medicína, molekulární biologie, kriminalistika nebo biochemie. V roce 1993 získal Karry B. Mullis Nobelovu cenu za objev PCR. (www.biologicaltargets.com)

PCR umožňuje amplifikovat zvolený úsek DNA, vymezený vazbou dvou jednovláknových oligonukleotidů, tzv. oček, primerů. Využívá vlastností termostabilních DNA dependentních DNA-polymeras, které byly izolovány z termofilních bakterií, žijících v podmínkách extrémně vysokých teplot. Tyto DNA-polymerasy optimálně pracují při teplotě 72°C a snášejí i krátkodobé teploty nad 90°C. Samotná reakce je kontrolována cyklickými změnami teplot, které se opakují, a probíhá standardně ve třech krocích:

- 1) zahřátí na 94°C - 96°C, což vede k denaturaci templátové DNA
- 2) ochlazení na annealingovou teplotu, T_m , primerů (30°C - 65°C), to umožní jejich vazbu v místě komplementární sekvence templátové DNA
- 3) opětovné zahřátí na teplotu 65°C - 75°C, kdy má termostabilní polymerasa optimální podmínky pro syntézu nového řetězce DNA ve směru 5' → 3' podle denaturované templátové DNA (Ráclavský, 1999; Šmarda et. al., 2005)

S každým krokem se počet produktů za optimálních podmínek zdvojnásobí, proto tuto reakci označujeme jako řetězovou. (Ráclavský, 1999)

Rychlost samotné PCR záleží na délce syntetizovaného produktu, výkonnosti polymerasy, optimálních teplotních podmínkách a je ovlivněna kvalitou použitého termocycleru (přístroj, který cyklicky řídí změnu teplot ve zkumavce). (Ráclavský, 1999)

Na výtěžnost a přesnost PCR mají vliv:

- a) annealingová teplota - tato vazebná teplota primerů by měla být přibližně stejná pro oba primery
- b) koncentrace iontů Mg^{2+} - správná koncentrace Mg^{2+} ovlivňuje výtěžnost a specificitu reakce
- c) kvalita a koncentrace primerů - vysoká koncentrace může zapříčinit tvorbu nespecifických produktů, naopak nízká koncentrace snižuje citlivost reakce
- d) počet cyklů - s počtem cyklů se zvyšuje riziko amplifikace nespecifických produktů

- e) kvalita a kvantita polymerasy – zvýšená koncentrace polymerasy také vede ke tvorbě nespecifických produktů, naopak nízká koncentrace snižuje citlivost reakce (Haškovec, 2004)

PCR je v současnosti základní a nepostradatelnou metodikou molekulárně biologických laboratoří a má široký rozsah použitelnosti. Využívá se při např. při DNA profilování, k detekci dědičných chorob a specifických polymorfismů, k prenatální diagnostice, k detekci virové, bakteriální a houbové infekci či kontaminaci, ke klonování genů, cílené mutagenězi a kvantifikaci nukleových kyselin, v soudním lékařství a kriminalistice pro identifikaci osob, v zemědělství a v potravinářství v souvislosti s geneticky modifikovanými potravinami a v mnoha dalších oblastech lidské činnosti. (Šmarda et. al., 2005)

4. Reverzně-transkriptásová polymerásová řetězová reakce

Reverzně-transkriptásová polymerásová řetězová reakce (RT-PCR) je metoda s nejvyšší senzitivitou pro detekci a kvantifikaci RNA, která je v současné době používána. V porovnání se dvěma dalšími používanými technikami pro kvantifikaci RNA – Northern blot a Rnase protection assay, může být RT-PCR použita k analýze RNA z velmi malého množství vzorku, umožní dokonce amplifikaci RNA z jediné buňky. (www.ambion.com)

Prvním krokem RT-PCR je přepis, reverzní transkripce, RNA templátu do komplementární DNA, cDNA, a následná amplifikace cDNA. Reverzní transkripce vyžaduje použití specializovaných RNA-dependentních DNA polymeras, které přepisují RNA na cDNA. (Bustin, 2000; Šmarda et al., 2005)

Mezi běžně používané reverzní transkriptasy patří reverzní transkriptasy odvozené z viru ptačí myeloblastosy (AMV) a Moloneyho viru myší leukémie (MMLV). AMV transkriptasa se vyznačuje polymerizační aktivitu i při vyšších teplotách a to až do 55°C. Vysoké teploty při polymerizaci eliminují sekundární struktury RNA. MMLV reverzní transkriptasa má významně menší aktivitu RNasy H než AMV transkriptasa. (Bustin, 2000) RNasa H je ribonukleový enzym, který degraduje RNA v RNA-cDNA hybridu, což může být nežádoucí při syntéze prvního řetězce cDNA. (Steffen et al., 1999)

Reverzní transkripce se dle typu použitého enzymu obvykle provádí mezi 40°-50°C. Při těchto relativně nízkých teplotách mohou vznikat nespecifické produkty reakce, jelikož přesnost zpětné transkripce RNA na cDNA je poměrně nízká. Dochází k nespecifickému nasedání primerů a v případě velmi nízké koncentrace templátu dochází k inhibici reakce. Velkým problémem jsou také sekundární struktury RNA. (Bustin, 2005; Šmarda et al., 2005)

Při reverzní transkripci můžeme použít specifické primery, náhodné hexamery nebo oligo-dT primery. Použití specifických oligo-dT primerů selektuje mRNA molekuly z celkové RNA s nadbytkem hlavně ribosomálních rRNA. Použití různých typů primerů může být příčinou významných změn ve výsledném počtu kopií mRNA. (Bustin, 2000)

Reverzní transkripce z RNA do cDNA může v zásadě probíhat dvěma způsoby:

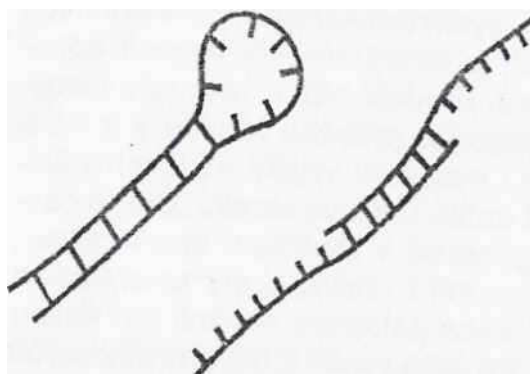
- 1) one tube - jednoduchá technika: v jedné zkumavce proběhne sériově za sebou reverzní transkripce a poté PCR. Tato technika minimalizuje riziko kontaminace tím, že reverzní transkripce a PCR probíhá v jedné zkumavce najednou.
- 2) two tube - separační technika: v jedné zkumavce nejdříve proběhne reverzní transkripce a v další zkumavce poté PCR. Velkou výhodou této metody je získání cDNA, která může být uchována dlouhodobě, rok až dva, skladována pro další

použití. Po reverzní transkripci probíhá PCR tak, jak bylo popsáno výše. (Bustin, 2000)

RT-PCR se používá ke studiu genové exprese, k validaci dat získaných z DNA microarrays, k analýze sekvence RNA, k diagnóze infekčních chorob nebo genetických onemocněních. (Steffen et al., 1999)

4.1. Primery

Pro úspěšné provedení PCR je klíčové použití správných primerů. Předně bychom měli znát sekvenci, kterou chceme amplifikovat, analyzovat. Nejčastěji se používají primery o délce cca 20bp. Na konci primeru by se neměly vyskytovat navzájem komplementární úseky, jinak by došlo ke spojení těchto komplementárních úseků a primer by vytvořil tzv. vlásenku, hairpin (obr. 5). Také může dojít ke vzniku dimerů spárováním dvou primerů navzájem. (obr. 5) Pokud je vzniklý dimer příliš stabilní, může jeho tvorba převážit nad nasedáním primeru na templátovou DNA a inhibovat tak vznik specifického PCR amplikonu. (Ráclavský, 1999)



Obr.5: Vlásenka a primerový dimer (Ráclavský, 1999)

Místo nasednutí primeru určuje, od kterého místa a kterým směrem se začíná syntetizovat komplementární vlákno DNA. Hovoříme o tzv. extenzi primeru (prodlužování primeru přidáváním dalších nukleotidů na 3'-konci). Kdybychom použili pouze jeden primer, došlo by k syntéze pouze jednoho templátového vlákna, vznikla by jen jedna kopie a nedošlo by tak k požadované amplifikaci produktu. Ta je zajištěna použitím dvou protisměrných primerů, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denurací dvojvláknové DNA a primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci. (obr. 6) Po opakovaných cyklech denaturace a nasedání primerů vznikají produkty, které dále slouží jako templáty pro nový cyklus. (Haškovec, 2004; Ráclavský, 1999; Šmarda et al. 2005)



Obr. 6: Nasednutí primeru na templátové DNA (Storchová, 1998)

Pro úspěšnou amplifikaci je dále dobré optimalizovat reakční podmínky, jako například teplotní profil, poměry mezi primery a množstvím DNA v reakci, koncentraci nukleotidů, hořčičných kationtů a polymerasy. (Ráclavský, 1999)

Při navrhování primerů pro standardní RT-PCR by měla být dodržena následující pravidla:

- 1) Primery a próba by neměly přesahovat přes sebe.
- 2) Ideální délka ampliconu by měla být mezi 75 – 150 bp.
- 3) Obsah GC bází by měl být mezi 30 – 70%.
- 4) Vyhnout se sekvenci identických nukleotidů – ne více jak čtyři G za sebou.
- 5) Zjistit, zda primery a próba netvoří dimery nebo vlásenky.
- 6) Délka sekvence primeru by měla být 20 nukleotidů a délka próby by neměla být delší než 30 nukleotidů.
- 7) T_m próby by měla být mezi 68 – 70°C a T_m primeru mezi 58 – 60°C.
- 8) Na 5'konci próby by se neměly vyskytovat G báze.
- 9) Posledních pět bází na 3'konci by nemělo obsahovat více než dvě C nebo G. (Steffen et al., 1999)

4.2. Termostabilní polymerasy

Termostabilní DNA dependentní DNA polymerasy jsou enzymy pocházející z bakterií, žijících v extrémních podmínkách, např. v hloubce moří poblíž ústí podmořských sopek, v pramenech horkých až 100°C. Tyto polymerasy vykazují vysokou enzymatickou aktivitu i po dlouhé expozici vysokým teplotám. Nejčastěji používaná termostabilní polymerasa je *Taq*, pochází z eubakterie *Thermus aquaticus*. Mezi další používané polymerasy patří *Tht* (z eubakterie *Thermus thermophilus*), *Pwo* (izolovaná z hypertermofilní archey *Pyrococcus woesei*), *Pfu* (získaná z hypertermofilní archeobakterie *Pyrococcus furiosus*). (Bustin, 2002)

V současné době se *Taq* a *Pwo* DNA polymerasa vyrábí pomocí *E.coli* ve formě rekombinantních enzymů. *Pwo* DNA polymerasa má 3'→5' exonukleázovou aktivitu, ale nemá

5'→3' exonukleázovou aktivitu. *Taq* a *Tht* DNA polymerasy postrádají 3'→5' exonukleázovou aktivitu, ale mají vysokou 5'→3' polymerační aktivitu a 5'→3' exonukleázovou aktivitu. *Tht* DNA polymerasa má vysokou vnitřní reverzní transkriptázovou aktivitu, tato aktivita je mnohem vyšší než aktivita DNA polymerasy I u *E.coli* nebo *Taq* DNA polymerasy. Pro real-time PCR reakci s použitím hydrolyzačních sond typu TaqMan je nutné, aby použité polymerasy měly 5'→3' exonukleázovou aktivitu. (Bustin 2002; Steffen et al., 1999)

5. Real-time reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce

Principem real-time PCR je rychlé a přesné zaznamenávání vznikajících PCR produktů, založené na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace v každém cyklu PCR. Narůstající fluorescence odpovídá vzrůstajícímu množství amplikonu ve vzorku. Je to vysoce citlivá metoda, která v případě detekce minimální reziduální choroby umožňuje detekci až 1 nádorové buňky mezi 10 milióny buňkami nenádorovými. (Bustin, 2005, Šmarda et al., 2005)

Pro značení primerů a hybridizačních sond se používají specifické fluorofory. Tyto fluorofory emitují světlo určité vlnové délky po předchozí absorpci světla odlišné vlnové délky. Emitovaná vlnová délka světla je vždy vyšší než absorbovaná. Dvojitě fluorescenčně značené sondy obsahují zhášeč. (Šmarda et al., 2005)

Zhášeč přijímá energii z fluoroforu a ztrácí ji dvěma způsoby:

- mezi zhášečem a fluoroforem je uzavřen kontakt a energie je vydána ve formě tepla,
- zhášení je dosaženo přenosem energie fluorescenční rezonancí (fluorescence resonance energy transfer – FRET), kde fluorofor přenáší energii ke zhášeči, který uvolní energii ve formě světla o vysoké vlnové délce. (Bustin, 2002)

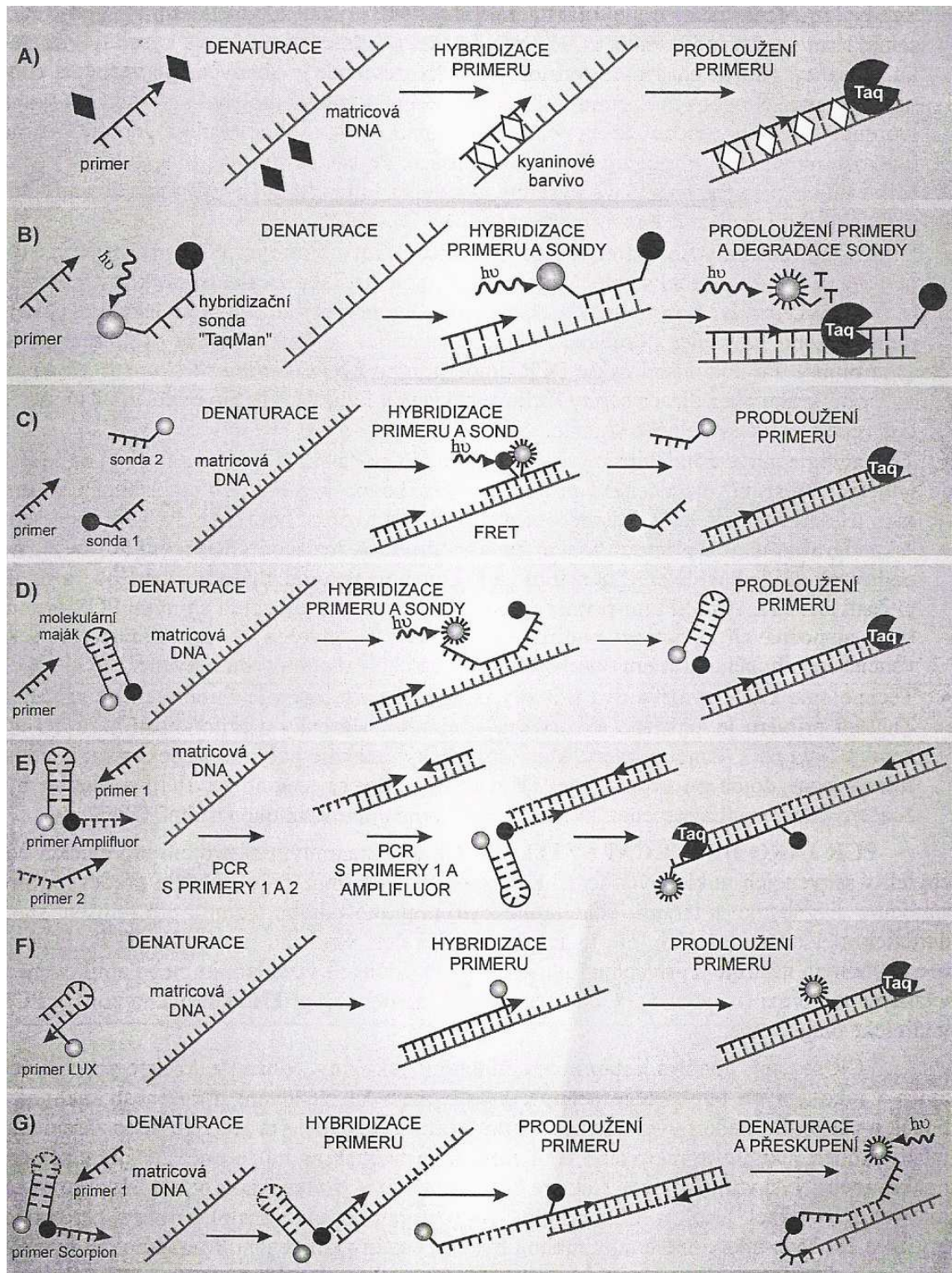
Při kvantitativní real-time PCR provádíme detekci vznikajících amplikonů následujícími technologiemi:

- Specifická DNA barviva – tato metoda je založena na vazbě specifického interkalačního fluorescenčního barviva (např. SYBR Green) do vznikající dvojšroubovice DNA. Barvivo má ve volné formě nízkou intenzitu fluorescence, avšak v navázané formě je intenzita jeho fluorescence mnohonásobně vyšší. Během PCR stoupá množství navázaného barviva při vzniku dvouvláknové DNA. (Bustin, 2000) Barviva, která se vážou na DNA, nemohou být použita u multiplexních PCR reakcí, protože neodliší od sebe specifické produkty ani event. vzniklé nespecifické produkty.
- Sondy typu TaqMan – váží se na vnitřní část amplifikované sekvence, kde jsou hydrolyzovány *Taq polymerasou* její 5' exonukleázovou aktivitou. Dojde k ukončení zhášení a emisi specifické fluorescence.
- Molekulární majáky (molecular beacons - MB) – jsou to oligonukleotidy vytvářející sekundární strukturu vlásenky. Obsahují zhášený fluorofor, jehož fluorescence je obnovena po vazbě na sekvenci. Podstatou detekce je stabilnější vazba MB k cílové sekvenci než volná forma MB.
- Scorpions[®] – jsou to oligonukleotidy obsahující PCR-primer kovalentně vázaný k hybridizační sondě. Molekula obsahuje fluorofor, který interaguje se zhášečem. Po dokončení cyklu dojde

k intramolekulárnímu přeskupení „škorpiónu“ v důsledku hybridizace sondy k cílové sekvenci. Fluorofor se oddělí od zhášeče, dojde k emisi světelného signálu.

- AmpliFluorTM – je to detekční systém založený na inkorporaci fluorescenčně značeného primeru s vlásenkovou smyčkou do produktu PCR. Fluorescenční signál je tvořen tehdy, je-li porušena sekundární struktura primeru během syntézy druhého řetězce. Dojde k oddělení fluoroforu na 5'konci primeru od zhášeče vázaného ve střední části primeru. AmpliFluor - primery jsou univerzální a mohou pracovat s jinými primery.

- LUX – tato technologie využívá dva primery, ale pouze jeden je fluorescenčně značený. Zhášení je zajištěno sekundární strukturou vlásenky a přítomností páru dG-dC nebo dC-dG na 3'konci. K emisi fluorescence dojde po prodloužení primeru. (Šmarda et al., 2005)



Obr. 7: Technologie používané při detekci produktů kvantitativní PCR. A) Fluorescenční barvivo vázající se na DNA. B) Technologie TaqMan. C) Fret mezi fluorofory nesenými dvěma sondami. D) Molekulární majáky. E) Technologie AmpliFluor. F) Technologie LUX. G) Scorpion. (Šmarda et al., 2005)

Kvantifikace má význam při studiu genové exprese, diagnostice patogenů, v klinické diagnostice pro genotypizační analýzu bodových mutací, delecí nebo chromozomových aberací, při detekci minální reziduální choroby, při detekci genetických změn nejen v nádorových buňkách a k detekci bakteriálních a virových onemocněních. (Šmarda et al., 2005)

6. Molekulární detekce cirkulujících nádorových buněk

Maligní nádory vycházející z epiteliálních tkání jsou nejčastější formou nádorového onemocnění v západních zemích. (Pantel et al., 1999) Nejčastější solidní tumory odvozené z epiteliálních tkání jsou karcinomy prsu, prostaty, plic a kolorekta. (Riethdorf et al., 2008) I přes obrovský pokrok v léčbě onkologických onemocnění, však zůstává mortalita stále vysoká. Pokrok v léčbě je v současnosti obecně nejlépe vidět na poměru stále rostoucí incidence nádorových nemocí, avšak stagnující mortalitě. Mortalita je stále více spojená se vznikem vzdálených metastáz, které se objeví až během nebo po skončení protinádorové léčby, avšak nejsou diagnostikovatelné v čase primární diagnózy. Riziko vzniku metastáz se dá odhadnout pomocí statistických dat, které vycházejí z údajů jako je velikost primárního tumoru, postižení lymfatických uzlin, gradingu, angioinvasivnosti apod. Nediagnostikovatelné mikrometastázy mohou přispět k neúspěchu primární léčby tím, že léčba je podhodnocena, což vede ke zhoršení prognózy pacienta. V současnosti neexistuje standardní metoda pro detekci mikrometastáz nebo okultních nádorových buněk. Pokud by existovala, bylo by možné identifikovat pacienty s vyšším rizikem vzniku metastáz, na které by se mohla zaměřit adjuvantní chemoterapie, určená primárně k eliminaci zbylých, okultních nádorových buněk. A naopak by bylo možné identifikovat pacienty s nízkým rizikem, u kterých by bylo možné se vyhnout podání drahé a často velmi zatěžující chemoterapie. (Pantel et al., 1999)

Přítomnost okultních nádorových buněk u solidních nádorů se vyšetřuje ve vzorcích periferní krve, kostní dřeně nebo lymfatickém systému, kde může přítomnost těchto nádorových buněk předpovědět recidivu nemoci, ovlivnit volbu léčebné modalitě a předpovědět prognózu pacienta. (Pantel et al., 1999; Wang et al., 2006)

Pro detekci okultních nádorových buněk lze použít několika metodik, které se mezi sebou liší specifitou, pracností, cenou a hlavně senzitivitou. Senzitivita metody je v tomto případě tím nejdůležitějším předpokladem, mezi nejcitlivější metody patří metodiky založené na principu real-time RT-PCR, které umožňují detekci až jedné nádorové buňky mezi 10 miliony buňkami nenádorovými. (Bustin, 2000; Pantel et al., 1999)

6.1. Cirkulující nádorové buňky (CTC) a metastázy

Metastázy se rozvíjejí u velké části onkologických pacientů. Tento fenomén je připisován cirkulujícím nádorovým buňkám nebo malým buněčným klastrům. Cirkulující nádorové buňky pocházejí z primárního tumoru před chirurgickým zákrokem a jsme schopni je detekovat v různých částech těla pacienta. Klastry jsou definovány jako shluk několika

nádorových buněk a jsou nazývány také jako cirkulující nádorové mikroembolie, které mají vysoký metastatický potenciál. (Tsouma et al., 2008)

Současné studie potvrzují maligní charakter cirkulujících nádorových buněk a jejich genetickou příbuznost s primárním tumorem. Proces tvorby metastáz má několik kroků: migraci nádorových buněk pocházejících z primárního tumoru, intravasaci (vstup do cévního řečiště), cirkulaci nádorových buněk v krvi, extravasaci (vystoupení z krevního řečiště a zachycení na orgánu), angiogenezi (tvorba nového cévního systému, kdy musí dojít k zásobování metastáz kyslíkem a dalšími látkami potřebnými pro růst), proliferaci a formaci metastáz. (Tsouma et al., 2008)

Cirkulující nádorové buňky metastazují do orgánů, které mají specifické prostředí vhodné pro tyto nádorové buňky. Tato hypotéza byla poprvé zveřejněna již v 19. století Stephenem Pagetem, nazval ji hypotézou „semene a půdy“. Jeho hypotéza má tři principy. Prvním principem je genetická rozdílnost nádorových buněk, buňky mají rozdílný metastatický potenciál. Druhou podmínkou je, že všechny metastázy musí projít metastatickým procesem. Každá z metastáz tak může být originálem. Za třetí, metastázy se uchytí pouze v okolí orgánu, který má pro metastázy specifický antigen (Tsouma et al., 2008)

Cirkulující nádorové buňky je možné detekovat v těle pacienta až několik let po kompletním odstranění nádoru. (Riethdorf et al., 2008)

6.2. Detekce cirkulujících nádorových buněk

Jednoznačná identifikace a charakterizace cirkulujících nádorových buněk v systémové krvi a v kostní dřeni vyžaduje extrémně citlivé a specifické metody. (Alix-Panabières et al., 2008). V současnosti se pro detekci minimální reziduální choroby využívá několik metod s různou citlivostí. Mezi nejčastější metody patří imunohistochemické metody a metody molekulární biologie. (Wolfrum et al., 2005; Riethdorf et al. 2008)

Při imunohistochemickém barvení se často používá koktail různých protilátek (CEA, CK, mAb, AE1/AE3). Kombinace a druh protilátek závisí na histologickém původu tumoru a také na tom, zda-li detekujeme minimální reziduální chorobu v kostní dřeni, v peritoneální laváži nebo v krvi. (Wolfrum, 2005)

K detekci cirkulujících nádorových buněk se široce využívá metoda PCR. (Tsouma et al., 2008) Nevýhodou PCR metod je nemožnost použití nádorových buněk k dalším analýzám. Buňky nejsme schopni morfologicky odlišit a identifikovat je. Metody využívající ke své analýze DNA spoléhají na detekci známých mutací nebo methylocí v nádorových buňkách. (Riethdorf et al., 2008) Mezi mutaci, kterou využívají molekulárně biologické techniky, patří *K-ras* mutace vyskytující se nejčastěji u pacientů s nádory pankreatu. PCR analýza *K-ras* mutace

slouží jako prediktivní faktor rekurence onemocnění u pacientů s nádorem pankreatu. (Wolfrum et al., 2005)

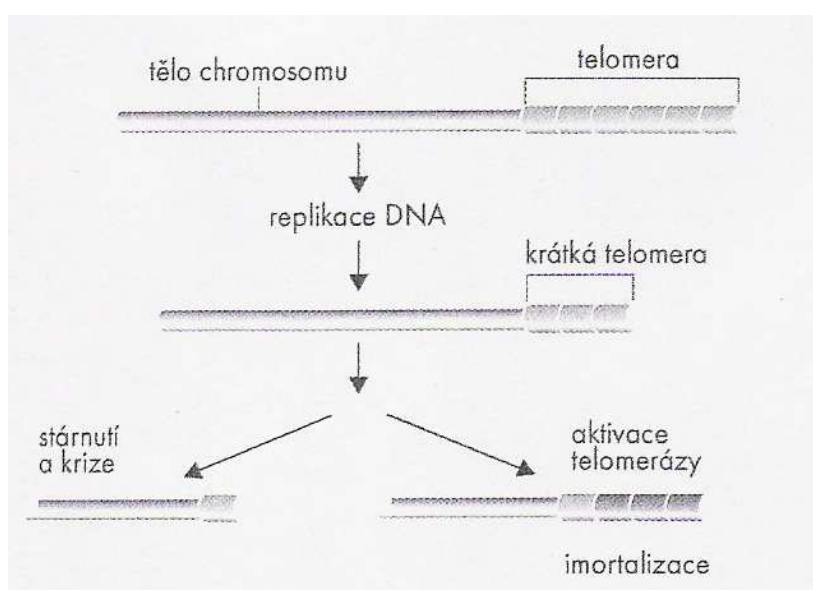
Další metodou, která se používá pro detekci cirkulujících nádorových buněk, je imunocytometrie a průtoková cytometrie. Imunocytometrické metody využívají protilátek proti cirkulujícím nádorovým buňkám. (Tsouma et al., 2005). Cirkulující nádorové buňky pomocí imunocytometrie detekujeme v kostní dřeni pacientů s karcinomem plic, prsu, prostaty, žaludku, kolorekta, pankreatu nebo s neuroblastomem. (Vogel et al., 2007)

Detekce a zároveň charakterizace cirkulujících nádorových buněk přináší informace o průběhu pacientovi nemoci a určuje tak jeho individuální prognózu, možnost včasného zachytu relapsu, zároveň dochází k rozlišení pacientů pro adjuvantní terapii, identifikaci terapeutických cílů a monitorování protirakovinné terapie. (Riethdorf et al., 2008; Alix-Panabières et al., 2008)

Všechna získaná data dávají nový biologický a molekulární pohled na vývoj metastáz u pacientů trpících rakovinou. Lepší pochopení metastatického procesu vede k objevení nových terapeutických cílů pro onkologicky nemocné pacienty. (Alix-Panabières et al., 2008)

7. Telomerasa

Telomerasa je ribonukleoproteinový enzym, který je aktivní na konci telomer. (Suehara et al., 1997 a; Suehara et al., 1997 b) Telomery tvoří konce chromozomů a jsou významné pro stabilizaci a ochranu chromozomů před jejich vzájemnými fúze, exonukleolytickou degradací, pro správnou mitotickou a meiotickou separaci sesterských chromatid a chrání chromozomový konec před jeho degradací. Lidské telomery jsou tvořeny několika tisíci kopiemi repetitivní nukleové sekvence (TTAGGG). V normálních buňkách je jejich délka mezi 7 až 13 kb. S každým buněčným dělením dochází ke zkracování délky o 50 – 100 bp, čímž se snižuje replikační potenciál dané buňky. (Lam et al., 2000; Kolář, 2003; Gertler et al. 2004)



Obr. 8: Znárodnění funkce telomerasy. Aktivita telomerasy brání zkracování telomer a tím i buněčnému stárnutí; naopak umožňuje permanentní buněčnou proliferaci (Klener, 2002)

Telomerasa je DNA-dependentní RNA polymerasa. Lidská telomerasa ke své funkci využívá několik podjednotek: lidskou telomerasu reverzní transkriptasu (hTERT), RNA podjednotku (hTERC), protein asociovaný s telomerasou 1 (TP₁) a další asociované proteiny jako dyskerin, NOP10, NHP2 a GAR1. (Zhou et al. 2003; Carroll & Ly, 2009) RNA podjednotka slouží jako templát pro syntézu telomerických repeticí, je nezávislá na aktivitě katalytické podjednotky. Proteinové komponenty telomerasy regulují její katalytickou aktivitu při syntéze telomerických konců. (Suehara et al., 1997; Tsouma et al., 2008)

V kmenových a zárodečných buňkách je důležité, aby jak dceřinné, tak mateřské buňky měly dostatečně dlouhý replikační potenciál, který je daný délkou jejich telomer. Zde je aktivní

enzym telomerasa, který zajišťuje prodloužení telomer, tím získává buňka „nesmrtelnost“. (Kolář, 2003) Telomerasa je aktivní nejen v zárodečných buňkách, ale i ve zdánlivě konečně diferencovaných buňkách, jako například v lymfocytech periferní krve. (Lam et al., 2000)

Buněčná smrt je typická pro normální buňky, je to limitující schopnost buněk dále růst a dělit se, zároveň umožňuje udržovat homeostázu lidského těla. Ke zkrácování telomer běžně dochází během buněčného cyklu, čímž buňky stárnou. Dojde ke zkrácení telomer na „kritickou délku“ a buňky vstoupí do replikativní senescence. Nádorové buňky potřebují udržet svůj proliferační potenciál na vysoké úrovni a zachovat své telomery dostatečně dlouhé. Jedním z mechanismů jak toho nádorové buňky dosahují, je zvýšená telomerasová aktivita. (Rha et al., 2000; Gertler et al., 2004)

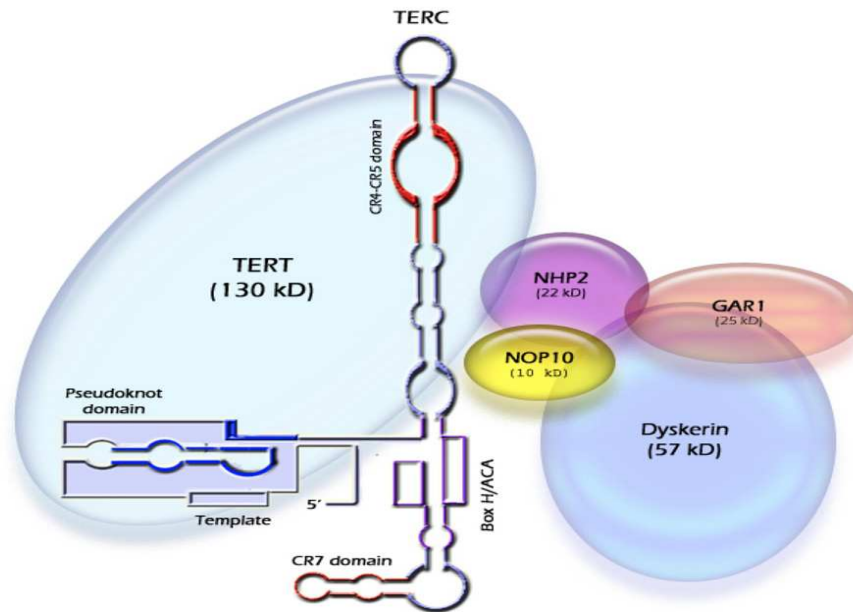
Zvýšená telomerasová aktivita byla detekována v 85% lidských nádorů, např. v karcinomu pankreatu, plic, žaludku, tlustého střeva, prsu, močového měchýře, neuroblastomu a hepatocelulárním karcinomu, a to především ve fázi hlavního růstu tumoru. Nejenom z tohoto důvodu se na telomerasu zaměřilo vědecké úsilí jako na potencionální prognostický marker a cíl protinádorové terapie. (Lam et al., 2000; Yajima et al. 1998)

Výsledky posledních studií navrhují použití telomerasy jako diagnostického nástroje pro včasnou diagnostiku karcinomu pankreatu. (Ohuchida et al., 2006; Zhou et al., 2007)

7.1. Lidská reverzní transkriptasa telomerasy

Lidská telomerasová reverzní transkriptasa (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) je jedna podjednotka telomerasy skládající se ze sedmi reverzních transkriptas důležitých pro enzymatickou aktivitu. Druhou podjednotkou telomerasy je vlákno RNA (hTERC), která je templátem pro syntézu telomerické repetice. (Gertler et al., 2002; Carroll & Ly, 2009)

C konec enzymu je krátký, odlišený od ostatních částí, ale jeho funkce není zcela objasněna. Naopak T konec se skládá z několika evolučně zachovaných jednotek důležitých pro buněčnou lokalizaci hTERT, RNA interakci, protein-protein multimerizaci a enzymatickou funkci. Dále obsahuje tzv. pseudoknot důležitý pro telomerickou aktivitu, správnou vazbu hTERT a hTERC RNA dimerizaci, zatímco Box H/ACA doména je důležitá pro stabilitu RNA. (obr. 9) (Carroll & Ly, 2009)

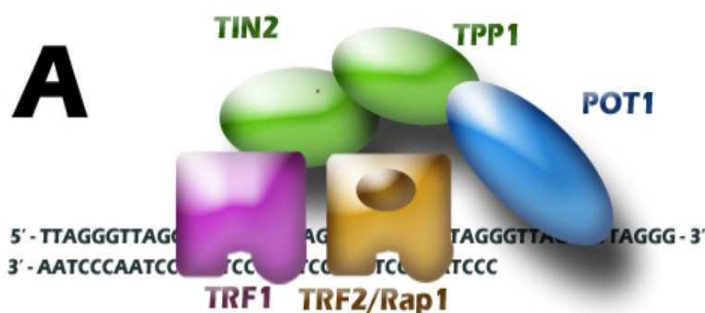


Obr. 9: Holoenzym telomerasy ukazující jednotlivé části enzymu: hTERT, hTERC, dyskerin, NOP10, NHP2 a GAR1. (Caroll &Ly, 2009)

Inhibice hTERT vede ke zkracování telomer a limituje dělení buněk. Exprese hTERT a aktivace onkogenů large-T a H-ras jsou zodpovědné za maligní transformaci v lidských epiteliálních tkáních. (Gertler et al., 2002)

7.2. Struktura telomer a Shelterin komplex

Chromozomové konce se skládají z dlouhého a přesahujícího vlákna obsahující repetitivní sekvence TTAGGG. Toto složení je schopné rozpoznat zlomy v DNA a opravit je nebo poslat buňku do apoptózy. Dlouhou jednovláknovou sekvenci zastrčí do sebe a vytvoří tak T smyčku. Tato struktura se formuje pomocí 6 proteinů zvaných Shelterin komplex, který s telomerickou DNA vytváří celou nukleoproteinovou strukturu pojmenovanou jako telomery. Shelterin komplex je složen z dvouvláknové DNA vázající proteiny TRF1 a TRF2, vazebných partnerů TRF2 a RAP1, jednovláknové DNA vázající protein POT1 a dvou proteinů tvořících můstek TIN2 a TPP2. (obr. 10) Funkce Shelterinského komplexu nespočívá jen v ochraně chromozomových konců, ale také v regulaci telomerických konců. (Caroll &Ly, 2009)



Obr. 10: Shelterin komplex (Caroll &Ly, 2009)

7.3. Telomerasa jako diagnostický marker u karcinomu pankreatu

Byly nalezeny významné rozdíly v expresi hTERT u karcinomu pankreatu, sekundární a chronické pankreatitidy a IPMN (indtraduktální papilární mucinózní neoplasma). Výsledky studií, které jako vzorek používaly pankreatickou šťávu, ukazují, že rozdíl exprese hTERT mezi IPMN a karcinomem pankreatu je mnohem vyšší, než mezi karcinomem pankreatu a chronickou pankreatitidou. Exprese hTERT ve vzorcích pacientů s chronickou pankreatitidou není způsobena falešnou pozitivitou, ale v těchto vzorcích se nachází aktivované lymfocyty nebo hyperplastické epiteliální buňky vykazující vysokou expresi hTERT. Toto může být příčinou špatné diagnózy pacienta. Tomuto problému se můžeme vyhnout izolací cílených epiteliálních buněk ze vzorku pankreatické šťávy pomocí sortování. Kvantitativní analýza hTERT mRNA pak může být užitečná při diferenciální diagnostice karcinomu pankreatu v terénu chronické pankreatitidy. (Ohuchida et al., 2006)

Zhou et al. detekovali telomerasu v 87% chirurgicky léčených pacientů s karcinomem pankreatu, zatímco v sousedních tkáních byla detekována telomerasa pouze v 10% případů. Aktivita telomerasy je tak detekována i u včasných stádií karcinomu pankreatu, kde tyto tumory nemohou být detekovány jinými metodami. Stává se tak snadno dostupným diagnostickým markerem. (Zhou et al., 2007)

7.4. Zesílení aktivity telomerasy (TRAP)

Ohuchida a spolupracovníci (2004) poukázali na diagnostickou užitečnost detekovat telomerasu v pankreatických vzorcích použitím metodiky TRAP (telomeric repeat amplification protocol) za použití velmi malého množství pankreatické šťávy. Principem TRAP metody je dvoukrokový proces. V prvním kroku je známý primer prodloužen různými počty telomerického opakování. Tento krok probíhá při 30°C po dobu 45 min. K prodloužení dojde,

pokud vzorek obsahuje telomerasu. Ve druhém kroku dochází k obarvení nebo označení tohoto prodlouženého telomerásového produktu a jeho detekci. (Ohuchida et al., 2004; Vezzosi et al., 2005; Seki et al., 2001)

Hlavním problémem standardní TRAP metody bylo, že vyžadovala radioaktivní značení. Byla také zkoušena detekce TRAP produktu na polyakrylamidovém gelu s GelStar a SYBR Green barvením, které mají vyšší citlivost než barvení s ethidium bromidem, avšak ani to nevedlo k úspěchu. Hirose et al. objevili hybridizační protekční analýzu (HPA) a zkombinovali ji s TRAP (TRAP/HPA). Tato metoda je jednoduchá, rychlá, citlivá a používá se pro kvantitativní měření telomerasové aktivity malých množství různých tkáňových vzorků. (Ohuchida et al., 2004, Seki et al., 2001)

7.5. Detekce hTERT v maligních a benigních nádorech a použité metody

Seki et al. detekovali vysokou expresi hTERT v 88% adenokarcinomu pankreatu a v 17% chronické pankreatitidy, ale ne v normálních buňkách. (Seki et al., 2001)

Seki et al. vyšetřili 36 pacientů, vzorek jejich pankreatické šťávy byl získán a zpracován podle Hiyama et al. (1997). K amplifikaci a detekci hTERT bylo použito RT-PCR. RNA byla izolována použitím IsoGenu (Wako, Osaka, Japan) a pomocí RAV-2 reverzní transkriptasy byla syntetizována cDNA. Byly použity primery 5'-AATGCACAAGCTCTGCCACTC-3' (sense) a 5'-GGCCACTGCTACCTTGGTACTC-3' (antisense). Produkty byly potom analyzovány na 6% polyakrylamidovém gelu a obarveny ethidium bromidem.

Suehara et al. měřili telomerásovou aktivitu ve vzorcích 20 pankreatických duktálních karcinomů, 12 adenomů, 5 pankreatitid, 14 normálních pankreatických vývodů a 13 normálních pankreatických tkání. Telomerásová aktivita nebyla detekována v žádném vzorku normálních tkání, duktů a pankreatitid. Aktivita telomerasy u adenomů nebyla zcela zřejmá, její aktivita však byla vyšší než u normálních tkání a duktů. Předpokládalo se však, že mucinózní cystadenomy a intraduktální adenomy budou mít vyšší telomerásovou aktivitu, než serózní cystadenomy, ale telomerásová aktivita zde nebyla výrazně odlišná. Telomerásová aktivita byla jednoznačně detekována ve všech vzorcích pankreatických duktálních karcinomů. Míra její aktivity byla výrazně vyšší než u normálních tkání, duktů a adenomů. (Suehara et al., 1997 a)

Telomerásová aktivita byla hodnocena metodou PCR. Jako standard byla použita buněčná linie MIA PaCa-2. (Suehara et al., 1997a)

V tom samém roce Suehara et al. detekovali telomerasu ve většině případů karcinomu pankreatu. Nevýznamné rozdíly získali ve výsledcích lokalizace karcinomu, pankreatická hlava versus pankreatické tělo a ocas. Telomerasu nedetekovali v normálních pankreatických šťávách, které byly získány od pacientů s adenomem nebo pankreatitidou. (Suehara et al., 1997b)

Tkáňové vzorky byly získány od 34 pacientů (12 s pankreatickým duktálním karcinomem, 12 s pankreatickým adenomem a 10 s chronickou pankreatitidou). Vzorky těchto pacientů byly zpracovány podle Suehara et. al. (1997 b) a podrobeny PCR. Produkty PCR byly analyzovány elektroforeticky v 0,5 M Tris-borátovém EDTA pufru na 12% polyakrylamidovém nedenuroujícím gelu. Vzorky byly porovnány s telomerásovou aktivitou lidských pankreatických buněčných liniích MIA PaCa-2. (Suehara et al., 1997 b)

Lam et al. vyšetřili vzorky od deseti pacientů s pankreatickým endokrinním tumorem. Telomerásová aktivita byla detekována u třech z deseti pacientů s endokrinním tumorem. Vzorky byly zpracovány podle Lam et al. 2000 a měřeny pomocí TRAP a PCR-ELISA. TRAP produkt byl analyzován elektroforeticky v 0,5 M Tris-borátovém EDTA pufru na 12% polyakrylamidovém nedenuroujícím gelu. K vizualizaci bylo použito SYBR Gold. PCR-ELISA proběhla podle Lam et al. 2000. Pozitivní kontrolou byl papilární karcinom štítné žlázy a negativní kontrolou byl teplotou inaktivovaný tkáňový extrakt. (Lam et al. 2000)

Vezzosi et al. vyšetřovali 31 rozdílných endokrinních pankreatických nádorů, z toho bylo 14 benigních, 5 nejistého chování, 12 maligních, z toho 7 metastatických. Telomerásová aktivita byla detekována v sedmi metastatických tumorech, v jednom z pěti tumorů nejistého chování a pouze v jednom ze 14 benigních tumorů. Telomerásová aktivita byla významně odlišná mezi benigními a maligními tumory. (Vezzosi et al. 2006)

Vezzosi et al. použili k vyšetření 31 lidských primárních endokrinních pankreatických tumorů metodu TRAP. Vzorky byly zpracovány podle Vezzosi et al. 2005. V PCR reakci použili primery 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' (sense) a 5'-(CCCTTA)₃CCCTAA-3' (antisense). PCR produkty byly analyzovány na nedenuroujícím polyakrylamidovém gelu. DNA produkty byly obarveny SYBR Greenem. Jako pozitivní kontrolu použili buněčnou linii karcinomu pankreatu, vzorek bez tumoru sloužil jako negativní kontrola. (Vezzosi et al., 2005)

Iwao et al. detekovali telomerásovou aktivitu ve 41 z 43 karcinomů pankreatu a v žádném z devíti benigních tumorů. Poté studovali telomerásovou aktivitu v pankreatických duktech, které byly získány předoperačně, u všech pacientů se předpokládalo, že mají pankreatický tumor. Telomerásová aktivita nebyla detekována v žádném ze 17 benigních pankreatických onemocnění a byla detekována ve 13 z 15 pankreatických tumorů. K detekci telomerasy byl použit TRAP protokol podle Hiyama et al. 1997. (Iwao et al., 1997)

Doposud byly publikovány pouze studie zabývající se detekcí exprese hTERT v nádorové tkáni u pacientů s karcinomem pankreatu. Žádná studie se zatím nezabývala detekcí exprese hTERT jako markeru minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu. Naše pilotní studie ukázala, že hTERT je vhodný marker pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu.

IV. Experimentální část

1. Optimalizace real-time RT-PCR

1.1. Primery a próba

V práci byly navrženy sekvence primerů a próby pro real-time RT-PCR pro hTERT (tab. č. 1). Levý primer má T_m 59,8°C a pravý primer má T_m 61,8°C. Délka primerů je 20 nukleotidů. Délka próby je 24 nukleotidů a T_m je 62,5°C. Levý primer byl nazván hTERTs, pravý hTERTas a próba hTERTp.

Tab. č. 1: Sekvence primerů a próby

| | sekvence primerů a próby | velikost produktu |
|----------------|---------------------------------------|----------------------|
| hTERTs | 5'-ATG TCA CGG AGA CCA CGT TT-3' | 105 bp |
| hTERTas | 5'-GCA CCC TCT TCA AGT GCT GT-3' | |
| hTERTp | 5'-TGG AGC AAG TTG CAA AGC ATT GGA-3' | |

1.2. Reakce real-time RT-PCR

V jednotlivých krocích real-time RT-PCR reakce byla zoptimalizována teplota a koncentrace $MgCl_2$ (tab. č. 2). Optimální teplotní schéma je následující: aktivace polymerasy 96°C po dobu 15 minut, následované 50 dvoukrokovými cykly: 95°C po dobu 15 sekund a poté 60°C po dobu 15 sekund. Reakční objem je 25 μ l.

Tab č. 2: Výsledné koncentrace reagensů pro reakci real-time RT-PCR pro hTERT

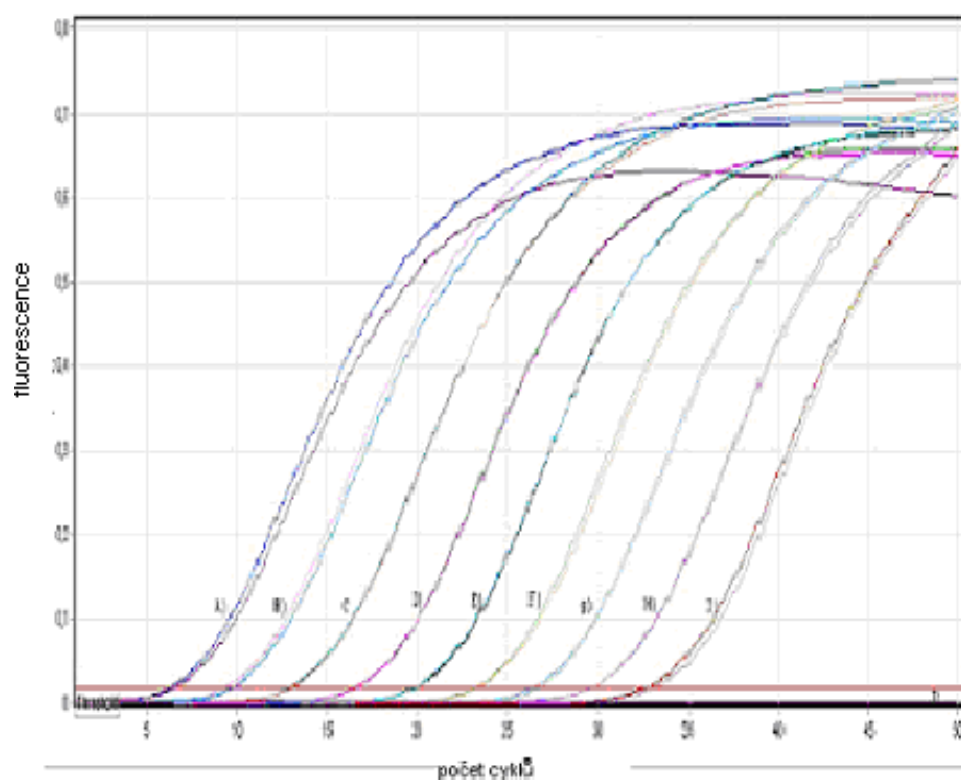
| reagencie (koncentrace) | množství (μ l) | finální koncentrace |
|--------------------------|------------------------|---------------------|
| hTERTs (0,005 mM) | 2 | 300 nM |
| hTERTas (0,005 mM) | 2 | 300 nM |
| hTERT p (1,25 μ M) | 4 | 200 nM |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 200 μ M |
| Taq (5 U/ μ l) | 0,2 | 0,04 U/ μ l |
| Mg ²⁺ (25 mM) | 3 | 3 mM |
| pufr (10 x) | 2,5 | 1x |
| cDNA | 1 | 4 ng/ μ l |
| H ₂ O | 7,8 | / |

1.3. Standardy

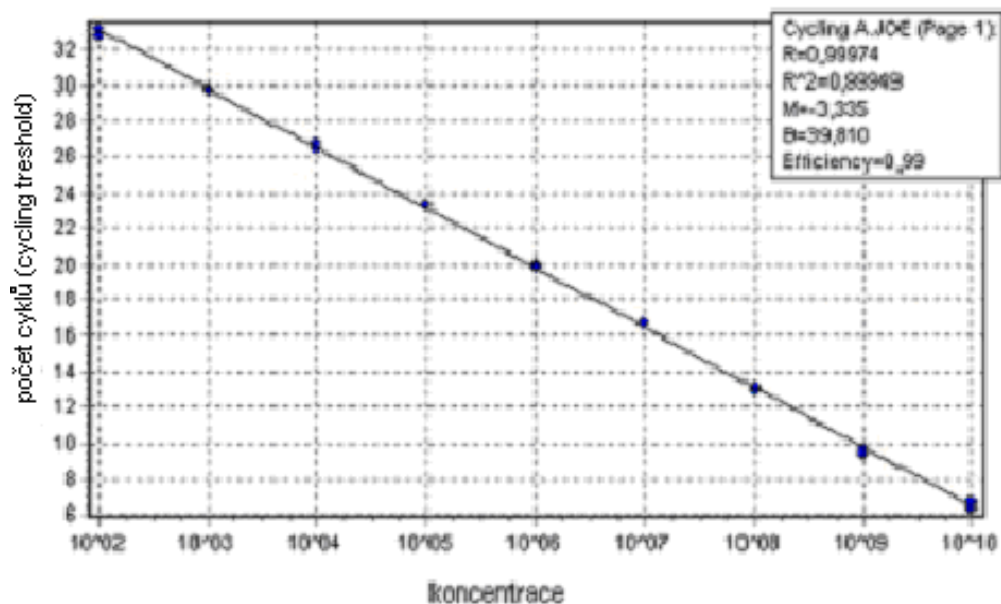
V práci byl také navrhnout systém vlastních standardů pro absolutní kvantifikaci exprese hTERT. Standardy jsou tvořeny amplicony obsahující ve své vnitřní části sekvenci hTERT , o velikosti 105 bp, vymezenou primery hTERTs a hTERTas. Pro tyto standardy bylo nutné navrhnout nové, „vnější“ primery. Jedná se o podobný systém jako u nested PCR.

Po navržnutí vnějších primerů, které byly nazvány hTERTs out a hTERTas out byla optimalizována reakce real-time RT-PCR. Při této reakci byla optimalizována annealingová teplota, koncentrace MgCl₂, koncentrace primerů a také se zvýšilo množství cDNA. I přes veškerou snahu vznikaly při reakci nespecifické produkty, proto byla provedena touchdown real-time RT-PCR reakce. Při touchdown real-time RT-PCR reakci dochází ke zvýhodnění specifických produktů na úkor nespecifických. Po této reakci došlo k výraznému snížení těchto nespecifických produktů a k vytvoření standardů byl použit vzorek, který obsahoval nejmenší koncentraci těchto nespecifických produktů. Počet kopií hTERT out v tomto vzorku byl $1,932 \cdot 10^{12}$ molekul v 1 μ l. Množství kopií bylo zjištěno přepočtem za použití molekulové hmotnosti, koncentrace a Avogadrovy konstanty. Byla připravena diluční řada standardů hTERT out od 10^{10} kopií po 10^2 kopií (obr. 11) a standartizační křivka standardů hTERT (obr. 12).

Zároveň byla provedena reakce real-time RT-PCR pro hTERT této diluční řady (obr. 11). Koncentrace reagensů jsou uvedeny v tabulce. č. 2. Byly použity standardy hTERT out od 10^{10} po 10^2 kopií hTERT, poslední dvě zkumavky byly bezvzorkové kontroly, vždy v dubletu. Celkový objem reakční směsi byl 25 μ l. Byla sestavena diluční řada standardů.



Obr. 11: Diluční křivka standardů hTERT out pro reakci real-time RT-PCR. A) 10¹⁰ kopií hTERT, B) 10⁹ kopií hTERT, C) 10⁸ kopií hTERT, D) 10⁷ kopií hTERT, E) 10⁶ kopií hTERT, F) 10⁵ kopií hTERT, G) 10⁴ kopií hTERT, H) 10³ kopií hTERT, I) 10 kopií hTERT a J) bezvzorková kontrola.



Obr. 12: Standardizační křivka standardů hTERT.

1.4. Materiál a chemikálie

Próba hTERTp (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česká republika) je duálně značená próba typu TaqMan, je označena hexachlorofluoresceinem (HEX), který je zhasen quencherem BHQ1 (Black Hole Quencher), excitační vlnová délka sondy je 530 nm a emisní vlnová délka je 556 nm. Próba je HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie) čištěna. Pracovní koncentrace próby je 1,25 μ M. (ředění: 5 μ l zásobního 0,1mM + 395 μ l H₂O = 400 μ l 1,25 μ M pracovního roztoku)

Primery hTERTs a hTERTas i hTERTs outer a hTERTas outer (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česká republika): Primery jsou OPC (Oligonucleotid Purification Cartridge) čištěny. Pracovní koncentrace je 0,005mM. (ředění: 15 μ l zásobního 0,1mM + 285 μ l H₂O = 300 μ l 0,005mM pracovního roztoku). Všechny primery a próba jsou dodávány v lyofilizovaném stavu dNTPs (Promega, Madison, WI, USA): Zásobní koncentrace deoxynukleotidů dTTP, dCTP, dATP, dGTP je 100mM. Pracovní koncentrace je 10mM dNTPs. (ředění:

0,1ml dTTP + 0,1ml dCTP + 0,1ml dATP + 0,1ml dGTP + 0,6ml H₂O = 1ml 10mM dNTPs)

Thermo-Start DNA Polymerase (ABgene, Epsom, UK): Enzymem je chemicky modifikovaná termostabilní DNA dependentní DNA polymerasa odvozená od *Thermus Aquaticus*. Enzym je určen pro hot-start PCR. Pracovní koncentrace je 5 U/ μ l, používáme 1 U na reakci.

MgCl₂ (ABgene, Epsom, UK): má pracovní koncentraci 25mM.

Reakční pufr (ABgene, Epsom, UK): je 10x koncentrovaný, při celkovém objemu reakční směsi 25 μ l dáváme do reakce 2,5 μ l 10x koncentrovaného reakčního pufru.

DEPC Treated Water (Ambion, Austin, TX, USA)

Vzorek: Bylo vyšetřeno 72 pacientů s karcinom pankreatu na expresi hTERT pomocí real-time RT-PCR reakce. (tab. č. 3) Bylo vyšetřeno 52 vzorků tumoru, 60 vzorků portální krve, 71 vzorků systémové krve, 72 vzorků kostní dřevě a 54 vzorků peritoneální laváže. Dále bylo vyšetřeno 52 vzorků krve zdravých dárců.

Tab. č. 3: Soubor pacientů zahrnutých do studie, N – postižení lymfatických uzlin, G - grading

| | pohlaví | | N | | | | G | | | věk | | velikost tumoru (cm) | | | | | | | |
|---------|---------|----|-----------|-----------|-------|----|-------|--------|---------|--------|---------|----------------------|-------|----|-------|------|-------|------|------|
| | F | M | pozitivní | negativní | 1 | 2 | 3 | medián | min-max | medián | min-max | | | | | | | | |
| celkem | 28 | 42 | 23 | 14 | 2 | 42 | 19 | 63 | 40-84 | 5 | 1-10 | | | | | | | | |
| stádium | I | 0 | 0% | 5 | 11,9% | 0 | 0% | 5 | 35,8% | 1 | 50% | 4 | 9,5% | 0 | 0% | 55 | 44-71 | 2,5 | 1-5 |
| | II | 3 | 10,7% | 5 | 11,9% | 0 | 0% | 8 | 57,1% | 0 | 0% | 7 | 16,7% | 1 | 5,2% | 60,5 | 52-84 | 3,25 | 1-4 |
| | III | 5 | 17,9% | 10 | 23,8% | 15 | 65,2% | 0 | 0% | 1 | 50% | 14 | 33,3% | 0 | 0% | 66 | 46-78 | 3,5 | 1-8 |
| | IV | 20 | 71,4% | 22 | 52,4% | 8 | 34,8% | 1 | 7,1% | 0 | 0% | 18 | 19,5% | 18 | 94,8% | 64,5 | 40-76 | 5 | 3-10 |

1.5. Použité přístroje

Real-time PCR termocyklér Rotor Gene 3000 (Corbett-Research, Sydney, Australia) – je určen pro analýzu 36 nebo 72 vzorků, přenos tepla se uskutečňuje ve vzduchové komoře. Cyklér je vybaven snímačem pro čtyři základní vlnové délky emitované fluorescence. Může být použit také k analýze křivek teplot tání.

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kalifornie, USA) – přístroj slouží k analýze RNA, DNA, proteinů a buněčných populací. Použili jsme ho pro analýzu PCR produktů při optimalizaci real-time RT-PCR. Principem je mikrokapilární elektroforéza.

Vortex (Scientific Industries, New York, USA)

Minicentrifuga (Labnet, New York, USA)

2. Výsledky

Výsledky real-time RT-PCR reakce byly přepočítány na počty kopií hTERT v 1 μ g RNA vzorku. Z výsledků exprese hTERT negativních kontrol a následné analýzy patientského souboru byly určeny cut-off hodnoty udávající hranici positivity a negativity pacienta na přítomnost MRD. Tyto cut-off hodnoty byly nejprve stanoveny na základě exprese hTERT ve vzorcích krve zdravých dárců, a následně pak byly upřesněny na základě statistické analýzy patientského souboru. Pacienti s hodnotami exprese hTERT nad cut-off hodnoty byli považováni za pozitivní na přítomnost MRD. Cut-off hodnoty hTERT byly pro systémovou i portální krev 5 000 kopií hTERT/ug RNA, pro kostní dřeň 60 000 kopií hTERT/ug RNA a pro peritoneální laváž 200 kopií hTERT/ug RNA.

Tab. č. 4: Výsledky hodnot exprese hTERT v systémové krvi zdravých dárců

| vzorek | hTERT (kopie/μg RNA) | vzorek | hTERT (kopie/μg RNA) |
|---------------|--|---------------|--|
| VL 1979 | 514 | HP 1973 | 405 |
| NH 1976 | 771 | EA 1980 | 357 |
| MV 1978 | 501 | NP 1973 | 147 |
| SP 1978 | 454 | SO 1958 | 2095 |
| KT 1985 | 513 | LK 1958 | 530 |
| KJ 1976 | 639 | SJ 1960 | 1109 |
| PJ 1952 | 507 | BL 1955 | 628 |
| DM 1972 | 194 | SM 1959 | 2574 |
| BL 1950 | 495 | PE 1960 | 729 |
| JK 1976 | 1591 | BP 1970 | 1424 |
| SA 1953 | 1412 | PV 1959 | 912 |
| PM 1960 | 1785 | KP 1972 | 1145 |
| SS 1950 | 781 | DR 1968 | 2052 |
| NJ 1961 | 1194 | UI 1950 | 962 |
| VV 1977 | 1190 | OJ 1969 | 831 |
| ChM 1977 | 1183 | BJ 1973 | 503 |
| FA 1979 | 2046 | JA 1977 | 443 |
| JP 1971 | 154 | MM 1972 | 703 |
| LL 1980 | 240 | PJ 1956 | 242 |
| KP 1962 | 416 | BN 1975 | 863 |
| HR 1958 | 347 | PV 1973 | 896 |
| HT 1972 | 617 | PL 1981 | 3468 |
| SV 1970 | 505 | KZ 1978 | 838 |
| UV 1976 | 533 | SD1977 | 1062 |
| VJ 1959 | 457 | SV 1960 | 559 |
| PR 1972 | 313 | SM 1983 | 4490 |

Tab. č. 5: Hodnoty exprese hTERT v tkáni kracinomu pankeatu; Ž – v době analýzy pacient žil

| pohlaví | pacient | hTERT (kopie/μg RNA) | přežití (měsíc) | pohlaví | pacient | hTERT (kopie/μg RNA) | přežití (měsíc) |
|----------------|----------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------|----------------|-------------------------------------|----------------------------|
| M | P001 | 70 | Ž | F | P037 | 1 810 | 6 |
| M | P002 | 16 385 | Ž | M | P044 | 8 930 | 14 |
| F | P003 | 920 | 12 | F | P045 | 1 565 | 9 |
| M | P005 | 5 035 | 10 | F | P046 | 1 125 | 10 |
| F | P006 | 730 | 11 | M | P050 | 3 585 | Ž |
| M | P007 | 0 | 7 | M | P051 | 0 | Ž |
| M | P008 | 500 | 11 | M | P052 | 1 000 | 14 |
| M | P009 | 460 | 8 | M | P054 | 335 | Ž |
| M | P011 | 1 980 | 0 | M | P056 | 80 | 13 |
| M | P012 | 12 610 | 7 | F | P057 | 765 | Ž |
| F | P013 | 638 | 4 | F | P058 | 725 | Ž |
| M | P014 | 2 245 | 23 | M | P061 | 1 880 | Ž |
| M | P015 | 2 040 | 4 | M | P062 | 0 | Ž |
| M | P016 | 330 | 6 | M | P064 | 60 | Ž |
| M | P017 | 63 765 | 7 | M | P065 | 90 | Ž |
| F | P018 | 1 840 | 11 | F | P070 | 275 | 5 |
| M | P021 | 1 930 | 10 | M | P071 | 605 | Ž |
| F | P026 | 3 556 | 8 | M | P072 | 200 | Ž |
| F | P027 | 1 250 | 18 | M | P074 | 470 | 4 |
| M | P028 | 360 | 9 | F | P075 | 215 | Ž |
| M | P029 | 12 090 | 3 | M | P078 | 210 | Ž |
| M | P030 | 2 795 | 4 | F | P083 | 1 905 | Ž |
| F | P031 | 8 405 | 2 | F | P084 | 2 520 | Ž |
| F | P032 | 6 261 | 4 | M | P085 | 2 530 | Ž |
| M | P033 | 0 | 10 | F | P087 | 128 | Ž |
| F | P036 | 8 040 | 9 | | | | |

Tab. č. 6: Hodnoty exprese hTERT v portální krvi u pacientů s karcinomem pankreatu s negativitou hTERT; Ž - v době analýzy pacient žil

| hTERT | | | | hTERT | | | |
|---------|---------|----------------------|-----------------|---------|---------|----------------------|-----------------|
| pohlaví | pacient | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) | pohlaví | pacient | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) |
| M | P001 | 1 760 | Ž | M | P056 | 2 048 | 13 |
| M | P002 | 4 280 | Ž | F | P057 | 130 | Ž |
| F | P003 | 2 150 | 12 | F | P058 | 940 | Ž |
| F | P006 | 2 015 | 11 | M | P061 | 1 620 | Ž |
| M | P007 | 4 090 | 7 | M | P062 | 2 580 | Ž |
| M | P012 | 2 945 | 7 | M | P063 | 2 500 | 10 |
| M | P014 | 3 150 | 23 | M | P064 | 440 | Ž |
| F | P026 | 4 285 | 8 | M | P065 | 605 | Ž |
| F | P032 | 1 265 | 4 | M | P071 | 520 | Ž |
| M | P033 | 1 210 | 10 | M | P072 | 155 | Ž |
| M | P039 | 2 930 | 10 | M | P074 | 220 | 4 |
| M | P041 | 1 385 | Ž | F | P075 | 770 | Ž |
| F | P043 | 1 945 | 7 | F | P076 | 3 015 | Ž |
| M | P044 | 350 | 14 | F | P077 | 555 | Ž |
| F | P045 | 1 415 | 9 | M | P078 | 800 | Ž |
| F | P046 | 530 | 10 | M | P079 | 1 080 | Ž |
| M | P049 | 1 415 | 8 | M | P080 | 720 | Ž |
| M | P050 | 395 | Ž | F | P082 | 500 | Ž |
| M | P051 | 520 | Ž | F | P083 | 735 | Ž |
| M | P052 | 1 375 | 14 | F | P084 | 955 | Ž |
| M | P054 | 2 060 | Ž | M | P085 | 320 | Ž |
| F | P055 | 390 | Ž | F | P087 | 1 025 | Ž |

Tab. č. 7: Hodnoty exprese hTERT v portální krvi u pacientů s karcinomem pankreatu s pozitivitou hTERT; Ž – v době analýzy pacient žil

| pohlaví | pacient | hTERT (kopie/μg RNA) | přežití (měsíc) |
|----------------|----------------|--|----------------------------|
| M | P008 | 6 015 | 11 |
| M | P009 | 13 255 | 8 |
| M | P011 | 6 460 | 0 |
| M | P015 | 7 485 | 4 |
| M | P016 | 13 795 | 6 |
| M | P017 | 7 090 | 7 |
| F | P018 | 10 290 | 11 |
| M | P028 | 6 695 | 9 |
| M | P029 | 11 345 | 3 |
| M | P030 | 8 925 | 4 |
| F | P034 | 9 865 | Ž |
| M | P035 | 6 025 | 4 |
| F | P036 | 9 840 | 9 |
| F | P038 | 6 035 | 15 |

Tab. č. 8: Hodnoty exprese hTERT v systémové krvi u pacientů s karcinomem pankreatu s negativitou hTERT; Ž – v době analýzy pacient žil

| hTERT | | | | hTERT | | | |
|---------|---------|----------------------|-----------------|---------|---------|----------------------|-----------------|
| pohlaví | pacient | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) | pohlaví | pacient | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) |
| M | P001 | 1805 | Ž | F | P058 | 1470 | Ž |
| F | P003 | 2530 | 12 | M | P061 | 770 | Ž |
| M | P005 | 1890 | 10 | M | P063 | 1615 | 10 |
| F | P006 | 2370 | 11 | M | P064 | 555 | Ž |
| M | P007 | 2435 | 7 | M | P065 | 1140 | Ž |
| M | P008 | 2190 | 11 | M | P066 | 160 | Ž |
| M | P012 | 4485 | 7 | M | P067 | 795 | Ž |
| F | P013 | 3235 | 4 | F | P070 | 320 | 5 |
| F | P031 | 2350 | 2 | M | P071 | 410 | Ž |
| M | P033 | 3130 | 10 | M | P072 | 220 | Ž |
| M | P039 | 3255 | 10 | M | P074 | 260 | 4 |
| M | P041 | 3945 | Ž | F | P075 | 2640 | Ž |
| F | P043 | 3770 | 7 | F | P076 | 1105 | Ž |
| M | P044 | 1220 | 14 | F | P077 | 450 | Ž |
| F | P045 | 940 | 9 | M | P078 | 725 | Ž |
| F | P046 | 725 | 10 | M | P079 | 900 | Ž |
| M | P047 | 815 | 6 | M | P080 | 575 | Ž |
| M | P049 | 945 | 8 | M | P081 | 1020 | Ž |
| M | P050 | 1015 | Ž | F | P082 | 810 | Ž |
| M | P051 | 610 | Ž | F | P083 | 1146 | Ž |
| M | P052 | 1420 | 14 | F | P084 | 1560 | Ž |
| M | P054 | 2380 | Ž | M | P085 | 237 | Ž |
| M | P056 | 1820 | 13 | M | P086 | 2110 | Ž |
| F | P057 | 294 | Ž | | | | |

Tab. č. 9: Hodnoty exprese hTERT v systémové krvi u pacientů s karcinomem pankreatu s pozitivitou hTERT; Ž – v době analýzy pacient žil

| pohlaví | pacient | hTERT | |
|----------------|----------------|--------------------------------------|------------------------|
| | | (kopie/μg RNA) | přežití (měsíc) |
| M | P002 | 9375 | Ž |
| M | P009 | 27015 | 8 |
| M | P011 | 13265 | 0 |
| M | P014 | 10715 | 23 |
| M | P015 | 13085 | 4 |
| M | P016 | 15780 | 6 |
| M | P017 | 10330 | 7 |
| F | P018 | 13630 | 11 |
| M | P021 | 8085 | 10 |
| F | P023 | 7410 | 3 |
| F | P026 | 7130 | 8 |
| F | P027 | 5555 | 18 |
| M | P028 | 6475 | 9 |
| M | P029 | 15795 | 3 |
| M | P030 | 5975 | 4 |
| F | P032 | 5130 | 4 |
| F | P034 | 7425 | Ž |
| M | P035 | 7760 | 4 |
| F | P036 | 10345 | 9 |
| F | P037 | 5810 | 6 |
| F | P038 | 7365 | 15 |
| F | P040 | 23920 | 4 |
| M | P062 | 5535 | Ž |
| F | P087 | 9450 | Ž |

Tab. č. 10: Hodnoty exprese hTERT v kostní dřeni u pacientů s karcinomem pankreatu s negativitou hTERT; Ž – v době analýzy pacient žil

| pohlaví | pacient | hTERT | | pohlaví | pacient | hTERT | |
|---------|---------|----------------------|-----------------|---------|---------|----------------------|-----------------|
| | | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) | | | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) |
| F | P003 | 41 270 | 12 | M | P050 | 8 885 | Ž |
| M | P005 | 1 935 | 10 | M | P051 | 5 555 | Ž |
| M | P007 | 20 895 | 7 | M | P052 | 3 890 | 14 |
| M | P008 | 14 745 | 11 | M | P054 | 13 015 | Ž |
| M | P009 | 35 995 | 8 | F | P055 | 17 955 | Ž |
| M | P011 | 9 810 | 0 | M | P056 | 13 790 | 13 |
| M | P012 | 10 380 | 7 | F | P057 | 19 255 | Ž |
| M | P014 | 56 120 | 23 | F | P058 | 10 770 | Ž |
| M | P015 | 42 505 | 4 | M | P061 | 6 025 | Ž |
| M | P016 | 31 550 | 6 | M | P062 | 13 890 | Ž |
| M | P017 | 24 075 | 7 | M | P063 | 18 605 | 10 |
| F | P018 | 36 445 | 11 | M | P064 | 8 685 | Ž |
| M | P021 | 41 065 | 10 | M | P065 | 31 365 | Ž |
| F | P023 | 34 915 | 3 | M | P067 | 6 965 | Ž |
| F | P026 | 47 520 | 8 | F | P070 | 3 280 | 5 |
| M | P028 | 50 305 | 9 | M | P071 | 3 085 | Ž |
| F | P031 | 30 205 | 2 | M | P072 | 2 735 | Ž |
| F | P032 | 10 340 | 4 | M | P074 | 8 740 | 4 |
| M | P033 | 10 230 | 10 | F | P075 | 6 670 | Ž |
| M | P035 | 27 045 | 4 | F | P076 | 7 380 | Ž |
| F | P036 | 55 985 | 9 | F | P077 | 6 215 | Ž |
| F | P037 | 32 900 | 6 | M | P078 | 5 555 | Ž |
| M | P039 | 31 785 | 10 | M | P079 | 210 | Ž |
| F | P040 | 20 995 | 4 | M | P080 | 9 080 | Ž |
| M | P041 | 16 835 | Ž | M | P081 | 7 160 | Ž |
| F | P043 | 21 930 | 7 | F | P082 | 15 285 | Ž |
| M | P044 | 22 960 | 14 | F | P083 | 17 480 | Ž |
| F | P045 | 11 745 | 9 | F | P084 | 5 080 | Ž |
| F | P046 | 9 965 | 10 | M | P085 | 9 670 | Ž |
| M | P047 | 4 865 | 6 | M | P086 | 6 535 | Ž |
| M | P049 | 3 840 | 8 | F | P087 | 8 060 | Ž |

Tab. č. 11: Hodnoty exprese hTERT v kostní dřeni u pacientů s karcinomem pankreatu s pozitivitou hTERT; Ž – v době analýzy pacient žil

| pohlaví | pacient | hTERT | |
|---------|---------|----------------------|-----------------|
| | | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) |
| M | P001 | 71 680 | Ž |
| M | P002 | 133 315 | Ž |
| F | P006 | 85 650 | 11 |
| F | P013 | 66 610 | 4 |
| F | P027 | 84 490 | 18 |
| M | P029 | 65 515 | 3 |
| M | P030 | 66 050 | 4 |
| F | P034 | 75 200 | Ž |
| F | P038 | 156 975 | 15 |
| M | P066 | 64 560 | Ž |

Tab. č. 12: Hodnoty exprese hTERT v peritoneální laváži u pacientů s karcinomem pankreatu s negativitou hTERT; Ž – v době analýzy pacient žil

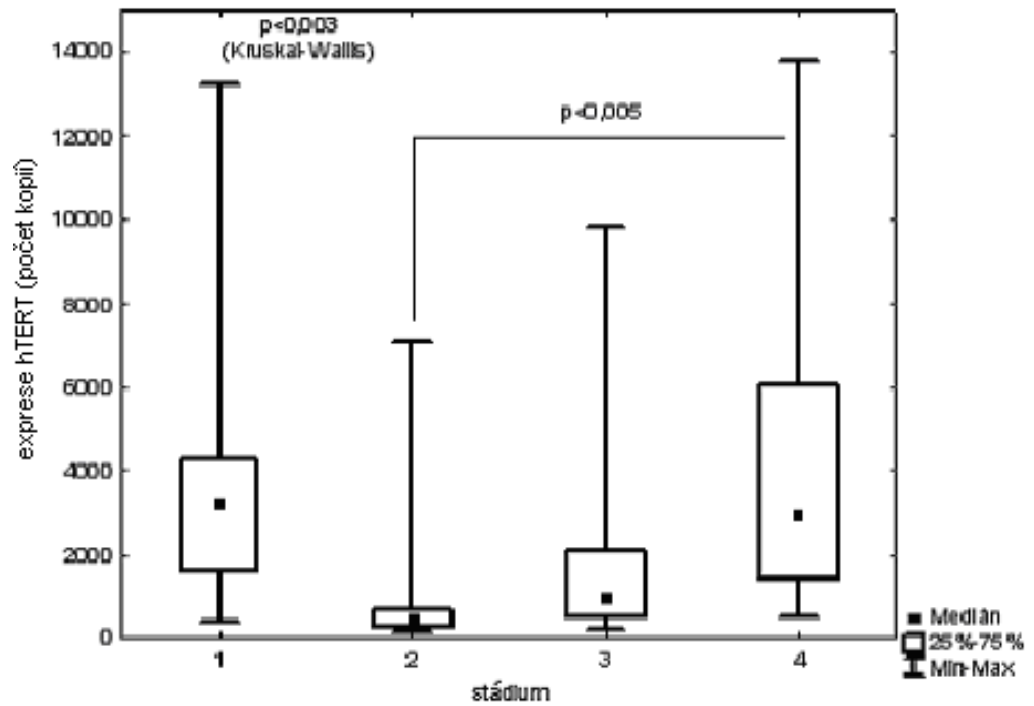
| pohlaví | pacient | hTERT | |
|---------|---------|----------------------|-----------------|
| | | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) |
| M | P012 | 105 | 7 |
| F | P013 | 0 | 4 |
| F | P031 | 0 | 2 |
| F | P032 | 30 | 4 |
| M | P033 | 0 | 10 |
| F | P034 | 185 | Ž |
| M | P035 | 70 | 4 |
| M | P039 | 0 | 10 |
| F | P040 | 0 | 4 |
| M | P041 | 0 | Ž |
| M | P044 | 196 | 14 |
| M | P051 | 136 | Ž |
| M | P052 | 66 | 14 |
| F | P055 | 118 | Ž |
| M | P056 | 142 | 13 |
| F | P070 | 140 | 5 |
| M | P071 | 107 | Ž |
| M | P074 | 41 | 4 |
| F | P082 | 146 | Ž |
| M | P086 | 85 | Ž |

Tab. č. 13: Hodnoty exprese hTERT v peritoneální laváži u pacientů s karcinomem pankreatu s pozitivitou hTERT; Ž – v době analýzy pacient žil

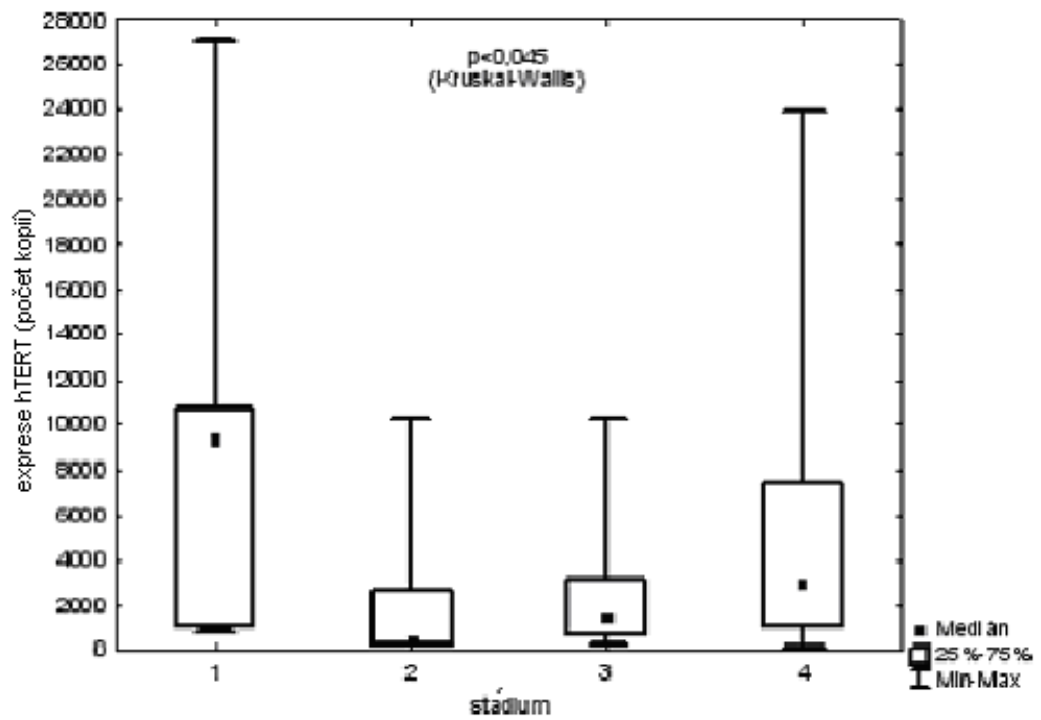
| pohlaví | pacient | hTERT | |
|---------|---------|----------------------|-----------------|
| | | (kopie/ μ g RNA) | přežití (měsíc) |
| F | P003 | 230 | 12 |
| M | P005 | 1 000 | 10 |
| F | P006 | 500 | 11 |
| M | P007 | 735 | 7 |
| M | P008 | 1 465 | 11 |
| M | P011 | 1 535 | 0 |
| M | P014 | 540 | 23 |
| M | P015 | 850 | 4 |
| M | P016 | 945 | 6 |
| M | P017 | 360 | 7 |
| F | P018 | 1 780 | 11 |
| M | P021 | 715 | 10 |
| F | P023 | 725 | 3 |
| F | P026 | 1 015 | 8 |
| F | P027 | 440 | 18 |
| M | P030 | 530 | 4 |
| F | P036 | 740 | 9 |
| F | P037 | 695 | 6 |
| F | P038 | 1 030 | 15 |
| F | P043 | 393 | 7 |
| F | P046 | 353 | 10 |
| M | P049 | 440 | 8 |
| M | P054 | 305 | Ž |
| F | P057 | 1 667 | Ž |
| M | P061 | 726 | Ž |
| M | P062 | 429 | Ž |
| M | P064 | 341 | Ž |
| M | P066 | 532 | Ž |
| F | P075 | 1 826 | Ž |
| F | P076 | 687 | Ž |
| M | P078 | 888 | Ž |
| F | P087 | 429 | Ž |

Průměrné hodnoty exprese hTERT byly v krvi zdravých dárců 948 kopií/ μ g RNA, ve tkáni karcinomu pankreatu 3 632 kopií/ μ g RNA. Průměrné hodnoty exprese hTERT byly v portální krvi u pacientů s karcinomem pankreatu s negativitou hTERT 1 457 kopií/ μ g RNA, s pozitivitou hTERT 8 794 kopií/ μ g RNA, v systémové krvi u pacientů s karcinomem pankreatu s negativitou hTERT 1 501 kopií/ μ g RNA, s pozitivitou hTERT 10 515 kopií/ μ g RNA, v kostní dřeni s negativitou hTERT 17 936 kopií/ μ g RNA, s pozitivitou hTERT 87 500 kopií/ μ g RNA a

v peritoneální laváži s negativitou hTERT 78 kopií/μg RNA a s pozitivitou hTERT 776 kopií/μg RNA.



Obr. č. 13: Výsledky hodnot exprese hTERT v portální krvi pacientů s karcinomem pankreatu klinických stádií I-IV.

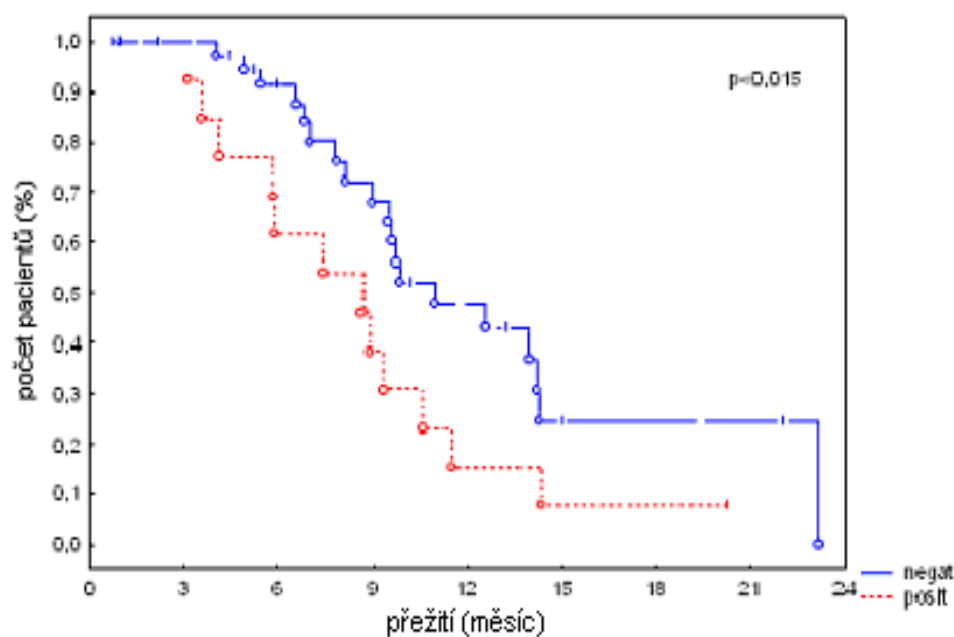


Obr. č. 14: Výsledky hodnot exprese hTERT v systémové krvi pacientů s karcinomem pankreatu klinických stádií I-IV.

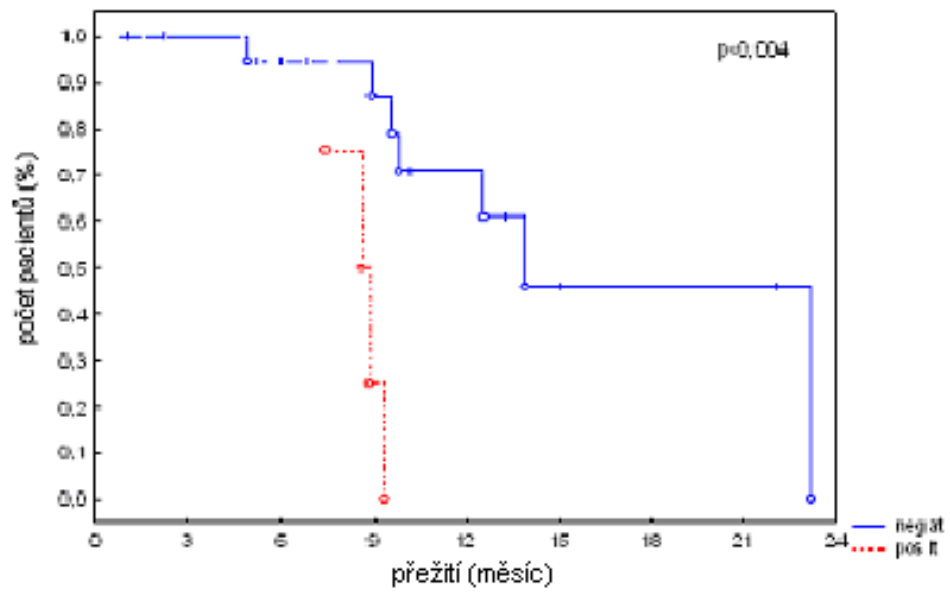
Prokázali jsme rostoucí závislost mezi počtem kopií hTERT v portální a systémové krvi pacientů s karcinomem pankreatu klinických stádií I-IV, čím vyšší stádium, tím vyšší je hodnota exprese hTERT v systémové a v portální krvi (obr. 13 a 14). Exprese hTERT se tedy zdá být závislým faktorem na klinickém stádiu nemoci. V kostní dřeni a peritoneální laváži jsme podobnou závislost mezi expresí hTERT a klinickým stádiem onemocnění neprokázali.

2.1. Analýza přežití

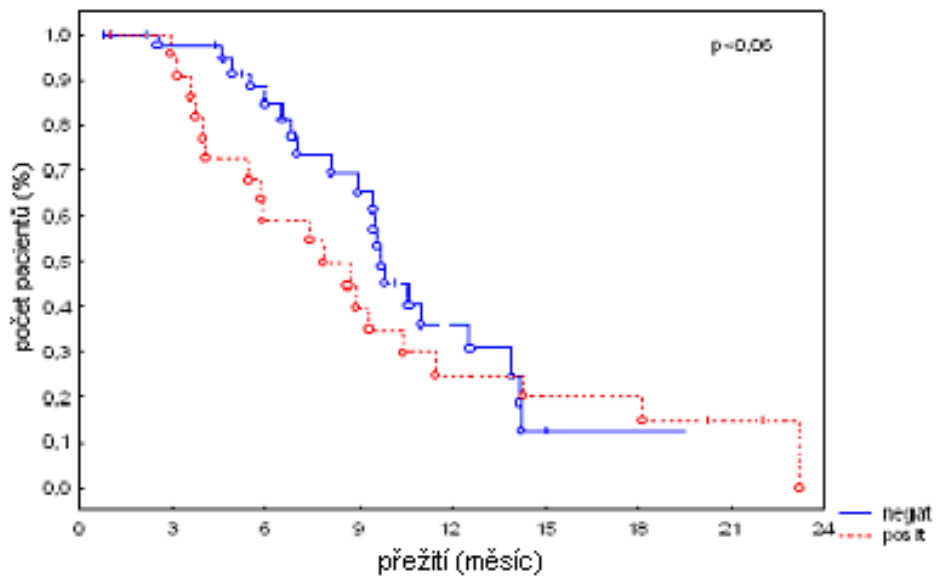
Byla provedena analýza přežití (Kaplan-Meier) dle přítomnosti minimální reziduální choroby na základě positivity vs. negativity hTERT v jednotlivých vyšetřovaných kompartmentech. Celkové přežití (overall survival) bylo hodnoceno jednak u celého souboru pacientů s karcinomem pankreatu, jednak pouze u klinických stádií I-III (obr. 15-21).



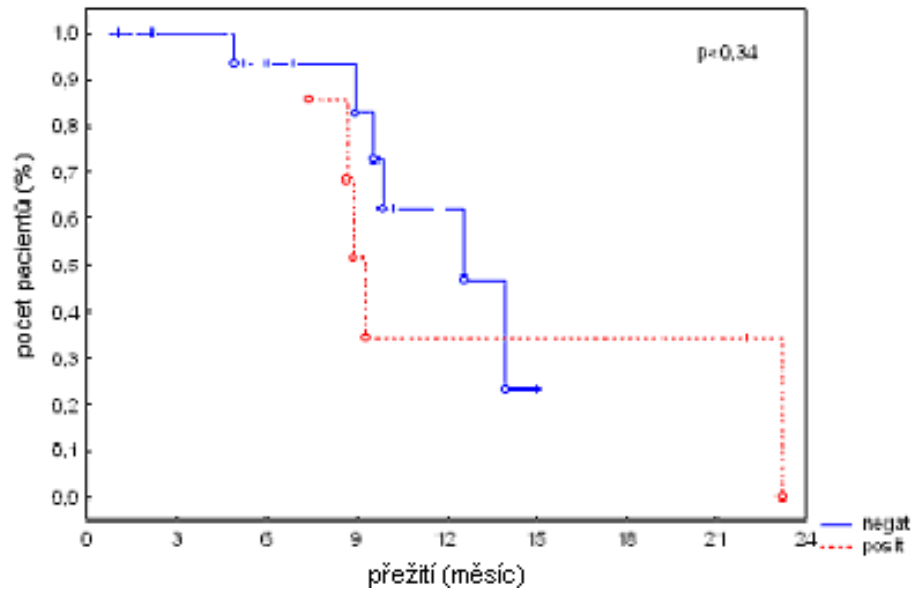
Obr. 15: Analýza celkového přežití dle positivity hTERT ve vzorcích portální krve pacientů s karcinomem pankreatu klinického stádia I-IV.



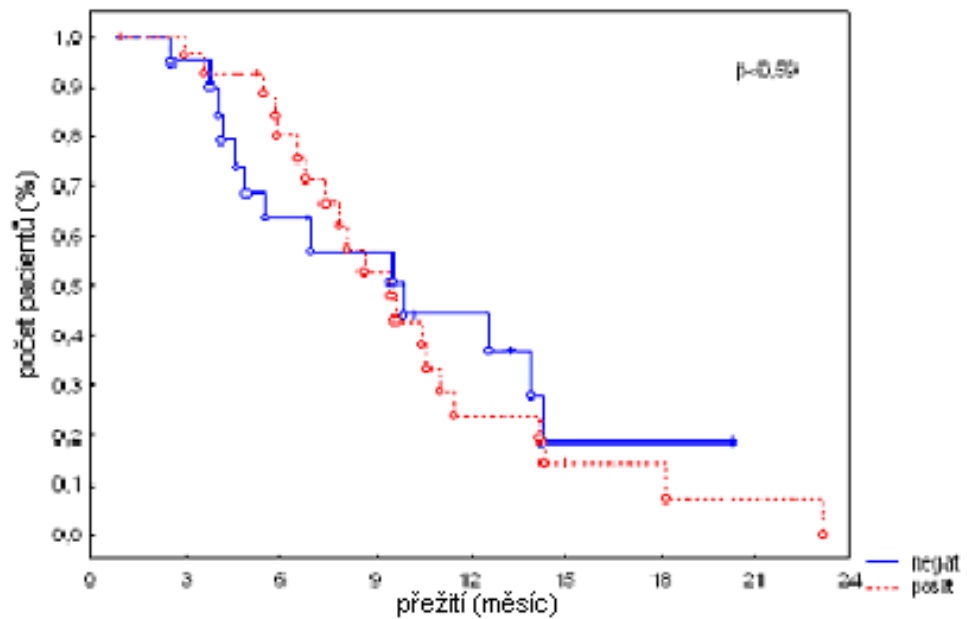
Obr. 16: Analýza celkového přežití dle positivity hTERT ve vzorcích portální krve pacientů s karcinomem pankreatu klinického stádia I-III.



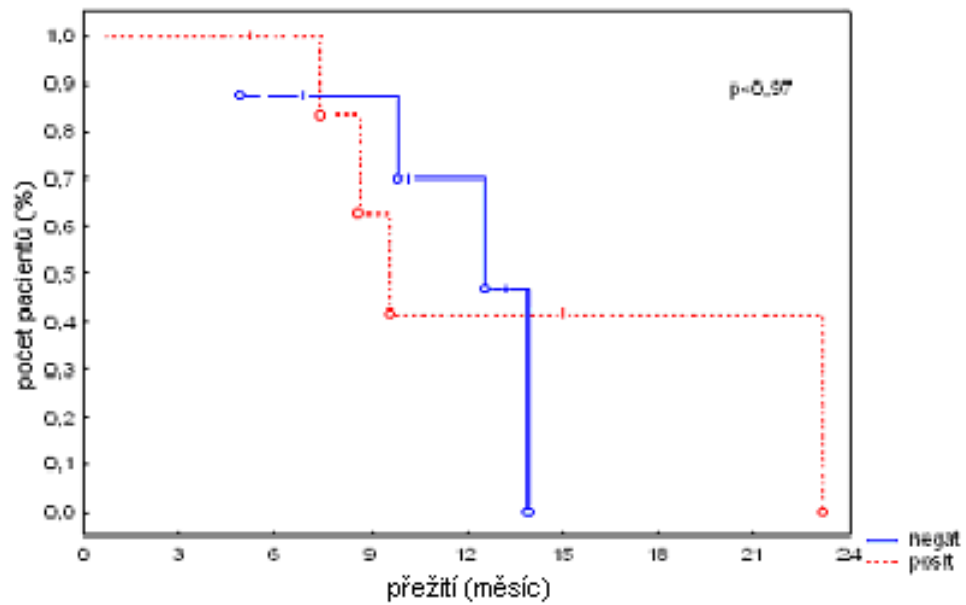
Obr. 17: Analýza celkového přežití dle positivity hTERT ve vzorcích systémové krve pacientů s karcinomem pankreatu klinického stádia I-IV.



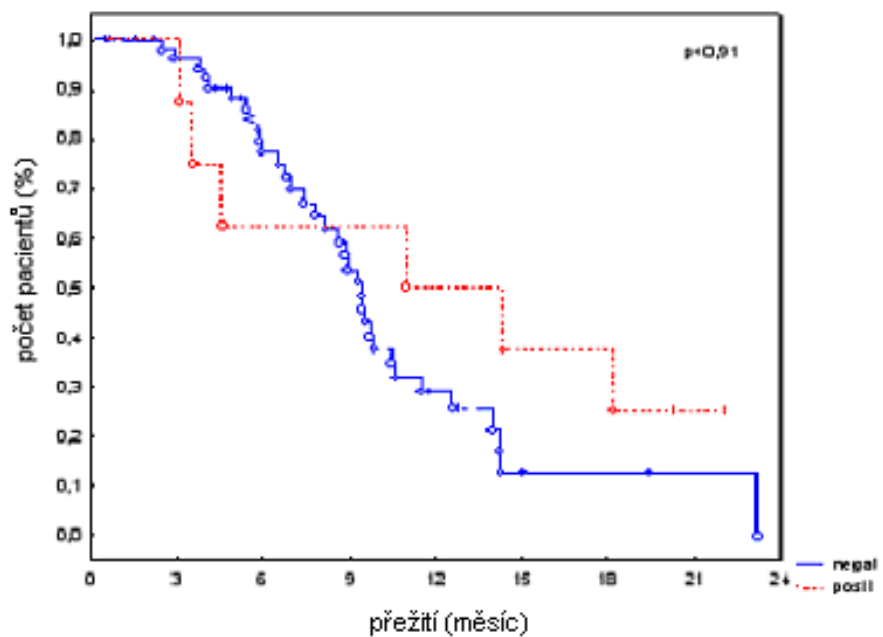
Obr. 18: Analýza celkového přežití dle positivity hTERT ve vzorcích systémové krve pacientů s karcinomem pankreatu klinického stádia I-III.



Obr. 19: Analýza celkového přežití dle positivity hTERT ve vzorcích peritoneální laváže pacientů s karcinomem pankreatu klinického stádia I-IV.



Obr. 20: Analýza celkového přežití dle positivity hTERT ve vzorcích peritoneální laváže pacientů s karcinomem pankreatu klinického stádia I-III.



Obr. č. 21: Analýza celkového přežití dle positivity hTERT ve vzorcích kostní dřeně pacientů s karcinomem pankreatu klinického stádia I-IV.

V analýze celkového přežití byla prokázána statisticky významná negativní prognostická hodnota přítomnosti minimální reziduální choroby na základě positivity hTERT v systémové krvi ($p < 0,06$) a v portální krvi ($p < 0,015$) u pacientů s karcinomem pankreatu všech klinických stádií. Statisticky významnějších hodnot ($p < 0,004$) bylo dosaženo v portální krvi u klinických stádií I-III. Pacienti s přítomností MRD mají signifikantně kratší celkové přežití. Nebyla prokázána statisticky významná prognostická hodnota přítomnosti minimální reziduální choroby na základě positivity hTERT v kostní dřeni ($p < 0,91$) a v peritoneální laváži ($p < 0,59$).

V. Diskuze

Diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci real-time RT-PCR pro hTERT jako markeru pro detekci MRD a stanovení prognostické hodnoty přítomnosti MRD u pacientů s karcinomem pankreatu.

Výsledky exprese hTERT byly získány pomocí metody real-time RT-PCR reakce. Byly stanoveny cut-off hodnoty, které byly získány z výsledků hodnot exprese hTERT v krvi zdravých dárců a z výsledků statistické analýzy přežití. Cut-off hodnoty hTERT byly stanoveny pro systémovou i portální krev 5 000 kopií/ug RNA, pro kostní dřeň 60 000 kopií/ug RNA a pro peritoneální laváž 200 kopií/ug RNA. Nad tyto hodnoty byli pacienti považováni za pozitivní na přítomnost minimální reziduální choroby. Průměrná hodnota exprese hTERT v krvi zdravých dárců byla 948 kopií/ug RNA. Průměrná hodnota exprese hTERT v primárních tumorech byla 3 632 kopií/ug RNA.

Z výsledků analýzy přežití vyplývá, že pacienti negativní na hTERT v portální krvi přežívají déle než pacienti s pozitivitou hTERT v portální krvi. Medián přežití u pacientů s karcinomem pankreatu s pozitivitou na hTERT je devět měsíců, ale u pacientů s negativitou hTERT to je více než 12 měsíců. Podobný trend můžeme sledovat i u vzorků systémové krve pacientů s karcinomem pankreatu. Pacienti s pozitivitou hTERT mají medián přežití 8 měsíců, ale pacienti s negativitou hTERT mají medián přežití více než 12 měsíců. Ve vzorcích kostní dřeně a peritoneální laváže se nám prognostickou hodnotu přítomnosti MRD na základě positivity hTERT nepodařilo prokázat. To může být dáno relativně nízkým počtem pacientů ve studii a také biologickými vlastnostmi karcinomu pankreatu

Z výsledků bylo prokázáno významně kratší celkové přežití u pacientů s pozitivitou v systémové a portální krvi. Pozitivita hTERT v systémové a portální krvi pacientů s karcinomem pankreatu se zdá být závislým prognostickým faktorem na klinickém stádiu. Čím vyšší klinické stádium, tím vyšší je exprese hTERT ve vzorcích portální a systémové krve pacientů s karcinomem pankreatu. Na dalších faktorech jako věk, velikost tumoru, grading a rozsah poškozených uzlin je přítomnost MRD na základě hTERT nezávislá. U výsledků kostní dřeně a peritoneální laváže pacientů s karcinomem pankreatu nebyla prokázána významná prognostická hodnota positivity hTERT.

VI. Závěr

Teoretická část byla zaměřena na problematiku karcinomu pankreatu, význam minimální reziduální choroby u pacientů se solidními nádory, dále na problematiku enzymu telomerasy. V teoretické části byl také popsán princip techniky real-time RT-PCR, která byla použita v samotném experimentu.

Experimentální část navazovala na bakalářskou práci, ve které byla zoptimalizována metoda real-time RT-PCR pro detekci MRD u solidních nádorů. V bakalářské práci byl navrhnout systém standardů pro absolutní kvantifikaci exprese hTERT.

Cílem diplomové práce bylo zavést novou metodiku pro detekci MRD u pacientů s karcinomem pankreatu. Tuto metodiku použít u souboru pacientů s karcinomem pankreatu. Byly použity vzorky nádorové tkáně, kostní dřeň, systémové krve, portální krve a peritoneální laváže pacientů s karcinomem pankreatu. Pomocí metody real-time RT-PCR byla zjištěna absolutní hodnota exprese hTERT v jednotlivých vzorcích a také ve vzorcích krve zdravých dárců.

Po vyšetření souboru pacientů byly určeny cut-off hodnoty, nad tyto hodnoty byly pacienti považováni za pozitivní na přítomnost MRD. Cut-off hodnoty byly určeny na základě výsledků krve zdravých dárců, poté byly následně upraveny dle analýzy přežití. Cut-off hodnoty hTERT byly stanoveny pro systémovou i portální krev 5000 kopií/ug RNA, pro kostní dřeň 60 000 kopií/ug RNA a pro peritoneální laváž 200 kopií/ug RNA.

V diplomové práci bylo prokázáno významně kratší přežití u pacientů s pozitivitou hTERT v systémové krvi a v portální krvi. Pozitivita hTERT v systémové krvi a v portální krvi se zdá být nezávislým prognostickým markerem. Naopak v kostní dřeni a v peritoneální laváži nebyla prokázána prognostická hodnota positivity hTERT. Vyšetření přítomnosti MRD v systémové krvi pacientů s karcinomem pankreatu nízkých klinických pacientů identifikuje pacienty s hematogenním rozsevem onemocnění se zásadním dopadem na jejich prognózu. U těchto pacientů je vzhledem k pokročilosti nádorového onemocnění vhodné uvažovat o odmítnutí radikálního chirurgického výkonu, jelikož pravděpodobně nepřinese očekávaný benefit v podobě delšího celkového přežití.

K definitivnímu objasnění těchto výsledků bude zapotřebí většího souboru pacientů a delšího sledování pacientů, zejména pacientů s nízkými klinickými stádii.

VII. Seznam použité literatury

Adam Z, Vorlíček J., Vaníček J. (2002) Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob, pp. 97-105, Grada Publishing

Alix-Panabières C., Riethdorf S., Pantel K. (2008) Circulating Tumor cells and bone marrow micrometastasis, *Clinical Cancer Research* 14(16), 5013-5021

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

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

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

Carroll K.A., Ly H. (2009) Telomere dysfunction in human diseases: the long and short of it!, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2, 528-543

Česká onkologická společnost ČLS JEP. URL < www.linkos.cz >

Číhák R. (2002) *Anatomie* 2, pp. 119-127, 157, 409-410, Grada Publishing, Praha

Gertlel R., Rosenberg R, Stricker D., Friederichs J., Hoos A., Werner M., Ulm K., Holzmann B., Nekarda H., Siewert J. R. (2004) Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma, *Journal of Clinical Oncology* 22, 1807-1814

Gertlel R., Rosenberg R, Stricker D., Werner M., Lassmann S., Ulm K., Nekarda H., Siewert J. R. (2002) Prognostic potential of the telomerase subunit human telomerase reverse transcriptase in tumor tissue and nontumorous mucosa from patients with colorectal carcinoma, *American Cancer Society* 95, 2103-2111

Haškovec C.: *Kurz metod molekulární biologie*, Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha 2004

Hiyama E., Kodama T., Shinbara K., Iwao T., Itoh M., Hiyama K., Shay J. W., Matsuura Y., Yokoyama T. (1997) Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors, *Cancer Research* 57, 326-331

Iwao T., Hiyama E., Yokoyama T., Tsuchida A., Hiyama K., Murakami Y., Shimamoto F., Shay J. W., Kajiyama G. (1997) Telomerase activity for the preoperative diagnosis of pancreatic cancer, *Journal of National Cancer Institute* 89, 1621-1623

Kaboev O. K., Luchkina L. A., Tret'jakov A. N., Bahrmand A. R. (2000) PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure), *Nucleic Acids Research* 28

Klener P. (2002) *Klinická onkologie*, pp. 16-18, 46-51, Galén, Praha

Klener P. (1991, 2001) *Vnitřní lékařství*, pp. 508-519, 725-735, Galén, Praha

Kolář Z. (2003) *Molekulární patologie nádorů*, pp. 28-32, Epava, Olomouc

Koutecký J. a kolektiv (1989) *Klinická onkologie*, pp. 120-124, 214-215, Avicenum, Praha

Laboratoř experimentální medicíny dětské kliniky a lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci < lem.ocol.cz >

Lam K. Y., Lo C. Y., Fan S. T., Luk J. M. (2000) Telomerase activity in pancreatic endocrine tumours: a potential marker for malignancy, *Clin Pathol: Mol Pathol* 53, 133-136

Mačák J., Mačáková J. (2004), *Patologie*, pp. 245-248, Grada Publishing, Praha

Nečas E., Šulc K, Vokurka M. (2003), *Patologická fyziologie orgánových systémů II.*, pp. 462-468, Karolinum, Praha

Ohuchida K., Mizumoto K., Ishikawa N., Sato N., Nagai E., Yamaguchi K., Takaishi H., Ide T., Tanaka M. (2004) A highly sensitive and quantitative telomerase activity assay with pancreatic juice is useful for diagnosis of pancreatic carcinoma without problems due to polymerase chain reaction inhibitors, *Cancer* 101, 2309-2317

Ohuhida K., Mizumoto K., Ogura Y., Ishikawa N., Nagai E., Yamaguchi K., Tanaka M. (2005) Quantitative assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA levels in pancreatic juice samples for diagnosis of pancreatic cancer, *Clinical Cancer Research* 11, 2285-2292

Ohuchida K., Mizumoto K., Yamada D., Yamaguchi H., Konomi H., Nagai E., Yamaguchi K., Tsuneyoshi M., Tanaka M. (2006) Quantitative analysis of human telomerase reverse transcriptase in pancreatic cancer, *Clinical Cancer Research* 12(7), 2066-2070

Pantel K., Cote F. J., Fodstat Q. (1999) Detection and clinical importance of micrometastatic disease, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, No. 13, 1113-1120

Ráčlavský V. (1999) Úvod do základních metod molekulární genetiky, pp. 34-39, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc

Petruželka Z., Konopásek B. (2003) *Klinická onkologie*, pp. 151-153, Karolinum, Praha

Rha S. U., Izbicka E., Lawrence R., Davidson K., Sun D., Moyer M. P., Roodman G. D., Hurley L., Hoff Von D. (2000) Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines, *Clinical Cancer Research* 6, 987-993

Seki K., Suda T., Aoyagi Y., Sugawara S., Natsui M., Motoyama H., Shirai Y., Sekine T., Kawai H., Mita Y., Waguri N., Kuroiwa T., Igarashi M., Asakura H. (2001) Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in pancreatic juice with sample qualification. *Clinical Cancer Research* 7, 1976-1981

Seki K., Suda T., Aoyagi Y., Sugawara S., Natsui M., Motoyama H., Shirai Y., Sekine T., Kawai H., Mita Y., Waguri N., Kuroiwa T., Igarashi M., Asakura H. (2001), *Clinical Cancer Research* 1976 Vol. 7, 1976-1981

Steffen C., Ankenbauer W., Bauer-Hofmann R., Bye S., Eisel D., Frey B., Keeseey J., Rosenstraus M., Schäferkordt S., Chlicht H. (1999) *Roche Molecular Biochemicals: PCR Applications Manual*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 11-25, 88-98

Suehara N., Mizumoto K., Muta T., Tominaga Y., Shimura H., Kitajima S., Hamasaki N., Tsuneyoshi M., Tanaka M. (1997 a) Telomera elevation in pancreatic ductal carcinoma compared to nonmalignant pathological states, *Clinical Cancer Research* 3, 993-998

Suehara N., Mizumoto K., Tanaka M., Niiyama H., Yokohota K., Tominaga Y., Shimura H., Muta T., Hamasaki N. (1997 b) Telomerase activity in pancreatic juice differentiates ductal carcinoma from adenoma and pancreatitis, *Clinical Cancer Research* 3, 2479-2483

Šafanda M., Oliverius M. (2008) Léčba karcinomu pankreatu ve 21. století, *Onkologie* 2, 103-106

Šálek C. (2004) Nové poznatky k epidemiologii nádorů pankreatu, *Bulletin* 3, ročník 12

Štorchová Z. (1998) Molekuly na povel IV., *Vesmír* 77, 444 -446

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. (2005) Metody molekulární biologie, pp.73-103, Masarykova univerzita, Brno

Targeted biotechnical solutions for agriculture, medicine and environment
<www.biologictargets.com>

The web guide of the polymerase chain reaction technique < www.pcr.links.com >

Tsouma A., Aggeli Ch., Pissimissis N., Lembessis P., Zografos G. N., Koutsilieris M. (2008) Circulating tumor cells in colorectal cancer: Detection methods and clinical significance, *Anticancer Research* 28, 3945-3960

Vezzosi D., Bouisson M., Escourou G., Laurell H., Selves J., Seguin P., Pradayrol L., Caron P., Buscail L. (2006) Clinical utility of telomerase for the diagnosis of malignant well-differentiated endocrine tumours, *Clinical Endocrinology* 64, 63-67

Vogel I., Krüger U., Marxsen J., Soeth E., Kalthoff H., Henne-Bruns D., Kremer B., Juhl H. (2007) Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytology: a new prognostic factor, *Clinical Cancer Research* 5, 593-599

Vorlíček J., Vyzula R., Adam Z. (2000) Praktická onkologie – vybrané kapitoly, pp. 17-18, 30, Grada Publishing,

Wang J. Y., Wu Ch. H., Lu Ch. L., Hsieh J. S., Wu D. Ch., Huang S. Y., Lin S. R. (2006) Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with coorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis, World Journal of Surgery, 1007-1013

Yajima T., Yagihashi A., Kameshima H., Kobayashi D., Furuya D., Hirata K., Watanabe N.(1998) Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection systém, Clinical Chemistry 44:12, 2441-2445

Zhou G.X., Huang J.F., Zhang H., Chen J.P. (2007) Diagnosis of pancreatic cancer by cytology and telomerase activity in exfoliated cells obtained by pancreatic duct brushing during endoscopy, Hepatobiliary Pancreat Dis Int 6, 308-311

Zhou J.H., Zhang H.M., Chen Q., Han D.D., Pei F., Zhang L.S., Yang D.T. (2003) Relationship between telomerase activity and its subunit expression and inhibitory effect of antisense hTR on pancreatic carcinoma, World Journal of gastroenterology 9 (8), 1808-1814

VIII. Seznam použitých zkratek

| | |
|------------|--|
| AMV | virus ptačí myeloblastosy |
| BHQ1 | zhášec, Black Hole Quencher |
| BRCA 4 | tumor supresorový gen |
| CA 19-9 | nádorový marker |
| CA 50 | nádorový marker |
| cDNA | komplementární deoxyribonukleová kyselina |
| C | cytosin |
| CEA | karcinoembryonální antigen, nádorový marker |
| CT | počítačová tomografie |
| dATP | 2'-deoxyadeosin-5'-trifosfát |
| dCTP | 2'-deoxycytidin-5'-trifosfát |
| dGTP | 2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát |
| DM | diabetes mellitus |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTPs | deoxynukleotid trifosfáty |
| dTTP | 2'-deoxythymidin-5'-trifosfát |
| DPC4/SMAD4 | tumor supresorový gen |
| DUPAN-2 | nádorový marker |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| ERCP | endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie |
| FRET | Fluorescence resonance energy transfer (Přenos fluorescenční rezonanční energie) |
| G | guanin |
| gDNA | genomická deoxyribonukleová kyselina |
| Her-2/neu | Human Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor lidského epidermálního růstového faktoru), protoonkogen |
| HEX | hexafluorescein |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| hTERT | lidská telomeráza reverzní transkriptasa |
| IPMN | intraduktální papilární mucinózní neoplázie |
| H-ras | onkogen |
| K-ras | onkogen |
| KOC | Komplexní onkologické centrum |
| KOS | Komplexní onkologická skupina |

| | |
|-----------------|--|
| large T | onkogen |
| MB | molekulární maják |
| MIA PaCa-2 | buněčná linie karcinomu pankreatu |
| MMLV | Moloneyho virus ptačí leukémie |
| MRD | minimální reziduální choroba |
| mRNA | mediátorová ribonukleová kyselina |
| OPC | Oligonucleotid Purification Cartridge (Purifikační oligonukleotidová kazeta) |
| p | korelační koeficient |
| p16INK4A/CDKN2A | tumorsupresorový gen |
| p53 | protein lokalizován na 17. chromozomu, tumorsupresorový gen |
| PCR | polymerásová řetězová reakce |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| <i>Pwo</i> | <i>Pyrococcus woesei</i> |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| SVOD | System pro vizualizaci onkologických dat |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| <i>Tht</i> | <i>Thermus thermophilus</i> |
| TRAP | Telomeric repeat amplification protocol (Protokol amplifikace telomerických opakování) |
| ÚZIS | Ústav zdravotnických informací a statistiky |