

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Oliver Pešát**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Štandardizácia automatickej FISH  
metódy u pacientov s nádormi**

**Bakalárska práca**

**Oliver Pešát**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Šporiková**

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracoval samostatne v priebehu bakalárskeho štúdia pod vedením vedúcej bakalárskej práce Mgr. Zuzany Šporikovej a s použitím citovaných literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa 12.5.2017

.....

## Súhrn

Automatické zobrazovacie cytogenetické systémy využívajúce fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu sa za posledné desaťročie značne zdokonalili a dostávajú sa do výskumných ale aj klinických cytogenetických laboratórií. Ich použitie pomáha zrýchliť prácu a zvýšiť presnosť odpočtu minimalizovaním ľudského faktoru.

V experimentálnej časti tejto bakalárskej práce bola vykonaná optimalizácia metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie na použitie pri automatizovanej analýze amplifikácie génu *HER2* systémom Metafer scanning and imaging platform (MetaSystems). Optimalizované bolo aj nastavenie klasifikačných algoritmov, ktoré systém využíva na vyhľadávanie buniek vo vzorke. Následne za použitia optimalizovaných parametrov vzoriek a predúpravy bolo vykonané vyšetrenie dvadsiatich patientskych vzorkách za použitia automatického zobrazovacieho systému a porovnanie výsledkov s manuálnou metódou.

Optimalizáciou bolo zistené, že najlepšia hrúbka rezu vzorky použitej na vyšetrenie je 3  $\mu\text{m}$ . Z reagentí používaných pri príprave vzorky bol vybraný ako najvhodnejší komerčne dostupný hybridizačný pufer a komerčne dostupný roztok DAPI. Ako ideálna voľba sondy sa ukázala komerčne dostupná sonda ERBB2(17q12)/SE 17 od firmy Kreatech™ alebo kit na prípravu sondy od firmy Invitrogen™. Bolo vykonané porovnanie dostupných klasifikačných algoritmov a spomedzi nich bol na základe parametrov zvolený klasifikačný algoritmus HER2-TissueFISH-V6B. Po vyšetrení 20 vzoriek optimalizovanou metódou a porovnaním s manuálnou sa zistilo že v 5 prípadoch sa výsledky metód líšia.

Optimalizáciu sa podarilo štandardizovať metódu fluorescenčnej *in situ* hybridizácie a nastavenia systému pre automatickú analýzu systémom Metafer scanning and imaging platform. Z porovnania automatickej a manuálnej metódy nebolo možné vyvodiť štatistické závery, kvôli nedostatočnému množstvu použitých vzoriek. Táto práca môže slúžiť na potencinálne zavedenie automatického zobrazovacieho systému v klinickej praxi.

## Summary

Automatic cytogenetic imaging systems using fluorescent *in situ* hybridization have greatly improved in last decade and are being introduced into both research and clinical cytogenetic laboratories. Their use helps to speed up the work rate and increase the accuracy of enumeration by minimizing the human error.

In the experimental part of this bachelor thesis, optimization of the fluorescence *in situ* hybridization method was performed for use with the automated analysis of HER2 gene amplification by Metafer scanning and imaging platform (MetaSystems). The settings of classification algorithms that the system uses to look for cells in the sample were also optimized. Subsequently, using optimized sample parameters and pre-treatment, an examination of 20 patient samples was performed using an automated imaging system and results were compared to a manual method.

By optimization it was found that the best section thickness of the sample used for the examination was 3  $\mu\text{m}$ . From the reagents used in the preparation of samples, the most preferred commercially available hybridization buffer and a commercially available DAPI solution were selected. The ideal probe was the commercially available Kreatech™ ERBB2 (17q12) / SE 17 probe or Invitrogen™ probe kit. A comparison of the available classification algorithms was performed and the HER2-TissueFISH-V6B algorithm was chosen. After examining twenty patient samples by an optimized method and comparing with the manual, it was found that in 5 cases the test results were different.

Optimization has been successful for standardization of the method of fluorescence *in situ* hybridization and system settings for automatic analysis by the Metafer scanning and imaging platform. From the comparison of the automatic and manual method, statistical conclusions could not be drawn due to the insufficient number of samples used. This work can be used for the potential introduction of automatic imaging system in clinical practice.

Chcel by som sa poďakovať Mgr. Zuzane Šporikovej za cenné rady, pripomienky a vedenie pri spracovávaní bakalárskej práce. Množstvo cenných rád pri vypracovaní experimentálnej časti mi poskytol RNDr. Radek Trojanec, PhD., za čo mu taktiež patrí veľká vďaka. V neposledom rade by som chcel poďakovať pani Soni Mlčochovej za jej rady a pomoc s prácou v laboratóriu.

## Obsah

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Úvod.....  | 9  |
| 2       | Ciele práce.....   | 10 |
| 3       | Literárny prehľad .....  | 11 |
| 3.1     | Princíp fluorescenčnej in situ hybridizácie.....                         | 11 |
| 3.1.1   | Sondy na fluorescenčnú in situ hybridizáciu.....                         | 12 |
| 3.1.2   | Biologický materiál používaný pri FISH.....                              | 14 |
| 3.1.3   | Metafázna vs. interfázna FISH.....                                       | 14 |
| 3.2     | História fluorescenčnej in situ hybridizácie.....                        | 15 |
| 3.2.1   | In situ hybridizácia .....   | 15 |
| 3.2.2   | Fluorescenčná in situ hybridizácia .....                                 | 16 |
| 3.3     | Automatizované zobrazovacie cytogenetické systémy.....                   | 17 |
| 3.3.1   | Prvé automatizované cytogenetické systémy .....                          | 17 |
| 3.3.2   | Automatizované zobrazovacie cytogenetické systémy využívajúce FISH ..... | 19 |
| 3.3.3   | Stavba automatických zobrazovacích systémov .....                        | 20 |
| 3.3.3.1 | Mikroskop a kamera.....  | 21 |
| 3.3.3.2 | Počítač a softvér .....  | 22 |
| 3.3.4   | Výhody automatických systémov.....                                       | 23 |
| 3.3.5   | Nevýhody a limitácie.....  | 23 |
| 3.4     | Karcinóm prsníka.....  | 24 |
| 3.4.1   | Epidemiológia.....   | 24 |
| 3.4.2   | Rizikové faktory .....   | 25 |
| 3.4.3   | Diagnóza a prognóza .....  | 26 |
| 3.4.4   | HER2 pozitívne karcinómy prsníka .....                                   | 26 |
| 3.5     | HER2 gén.....  | 27 |
| 3.5.1   | ERBB rodina tyrozínkinázových receptorov.....                            | 27 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.5.2   | Ligandy .....   | 27 |
| 3.5.3   | Aktivácia a bunková signalizácia ERBB receptorov.....                                   | 28 |
| 3.6     | HER2 a jeho asociácia s rakovinou .....   | 30 |
| 3.6.1   | Amplifikácia HER2 génu .....  | 30 |
| 3.6.2   | Stanovenie amplifikácie HER2 .....  | 31 |
| 3.6.2.1 | Stanovenie pomocou FISH .....   | 31 |
| 3.6.3   | Cielená liečba karcinómu prsníka.....   | 33 |
| 4       | Materiál a metódy .....   | 34 |
| 4.1     | Izolácia plazmidu .....   | 34 |
| 4.2     | Značenie a príprava sondy pomocou kitu BioPrime® Array CGH Genomic labeling system..... | 35 |
| 4.3     | Značenie a príprava sondy pomocou kitu Platinum bright .....                            | 36 |
| 4.4     | FISH.....   | 37 |
| 4.5     | Odčítanie fluorescenčných signálov .....  | 38 |
| 4.6     | Použité chemikálie .....  | 39 |
| 4.7     | Použité roztoky .....   | 39 |
| 4.8     | Pomôcky .....   | 41 |
| 4.9     | Použité kity .....  | 42 |
| 4.10    | Použité prístroje .....   | 42 |
| 5       | Výsledky .....  | 43 |
| 5.1     | Optimalizácia automatizovanej FISH .....  | 43 |
| 5.1.1   | Optimalizácia metódy FISH .....   | 43 |
| 5.1.2   | Nastavenie klasifikátora v softvéri Metafer4.....                                       | 46 |
| 5.2     | Vyšetrenie vzoriek automatizovaným systémom a porovnanie s manuálnym odpočtom .....     | 50 |
| 6       | Diskusia.....   | 56 |
| 7       | Záver .....   | 60 |



|     |                                  |    |
|-----|----------------------------------|----|
| 8   | Zoznam použitých skratiek .....  | 61 |
| 9   | Použitá literatúra .....         | 63 |
| 9.1 | Použité internetové zdroje ..... | 74 |

## 1 Úvod

Karcinóm prsníka je malígne nádorové ochorenia mliečnych žliaz. U pacientov s karcinómom prsníka je nutné stanovenie molekulárno-cytogenetických charakteristík na určenie správnej diagnózy, odhadnutia prognózy a predurčenia pacientov na konkrétne typy liečby. Pochopenie molekulárnych mechanizmov a ich zmien pri tumorigenéze bolo základom pre vývoj tzv. cielených liečiv v rámci konceptu perosnalizovanej medicíny, ktoré značne zlepšujú prognózu a prežitie pacientov (Giordano *et* Petrelli, 2008). Informáciu o tom, či sa daná cytogenetická zmena, ktorá môže byť cieľom týchto liečiv v nádore vyskytuje, poskytuje cytogenetické vyšetrenie. Jedným z takýchto vyšetrení je aj vyšetrenie metódou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie, ktoré je dnes bežným vyšetrením rôznych cytogenetických zmien.

V laboratóriach, v ktorých je takéto vyšetrenie dennou rutinou, narastá potreba automatizácie takýchto vyšetrení z dôvodu rýchlejšieho spracovania vyšetrenia a tiež vylúčenia chybovosti ľudského faktora. Automatické cytogenetické systémy využívajúce fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu ponúkajú možnosť automatickej analýzy vzoriek a ich vyhodnotenie na základe ich digitalizácie a analýzy programovými algoritmami. Za asistencie vyškoleného operátora sú schopné značne urýchliť a zjednodušiť inak zdĺhavý proces vyhodnocovania a analýzy vzorky, navyše sú schopné i archivovať záznam vyšetrenia pre spätnú kontrolu.

Najčastejšie vyšetrovaná cytogenetická zmena u karcinómu prsníka je amplifikácia génu *HER2*. Na tento typ vyšetrenia je možné použiť automatický cytogenetický systém za použitia duálnej sondy na fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu. Nevyhnutným krokom pre zavedenie tohto systému do praxe je štandardizácia a optimalizácia parametrov vzorky ako aj nastavení systému (Wolff *et al.*, 2013).

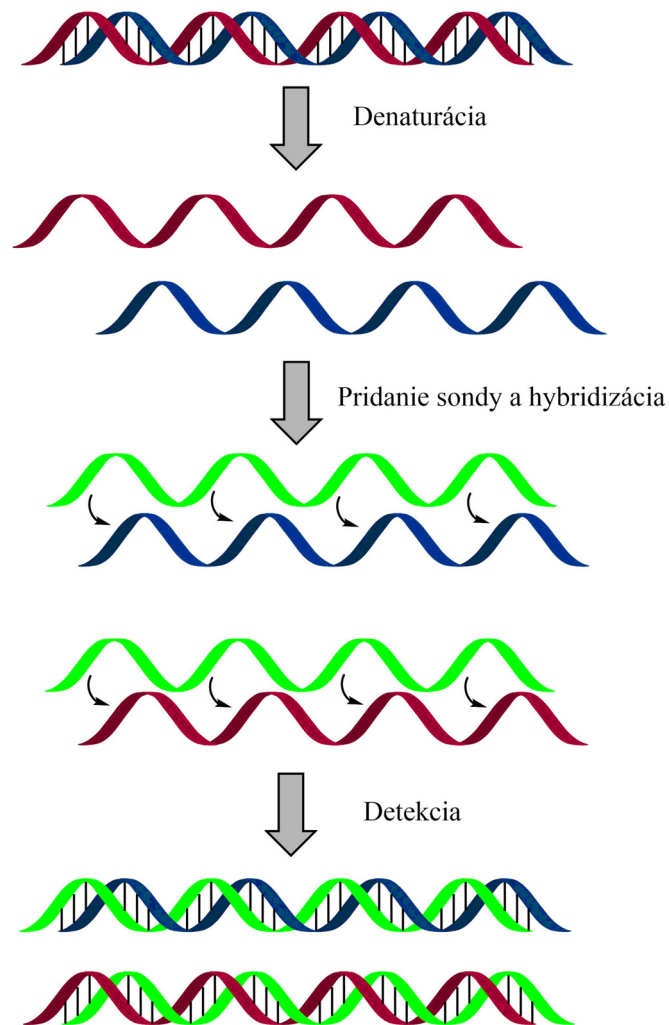
## 2 Ciele práce

- vypracovanie teoretickej rešerše na tému automatické cytogenetické systémy využívajúce fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu (FISH) a ich využitie na detekciu amplifikácie génu *HER2* u pacientov s karcinómom prsníka
- osvojenie metódy FISH a príprava fluorescenčne značených sond
- optimalizácia metódy FISH pre automatizovaný odpočet pomocou prístroja Metafer scanning and imaging platform na detekciu amplifikácie génu *HER2*
- optimalizácia hrúbky rezu a iných parametrov pre automatizovaný odpočet

### 3 Literárny prehľad

#### 3.1 Princíp fluorescenčnej *in situ* hybridizácie

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) je molekulárna cytogenetická metóda umožňujúca detekciu sekvencií nukleových kyselín. Jej princíp spočíva vo využití komplementarity dvoch vlákien nukleových kyselín. Pri denaturácii vplyvom vyššej teploty (94-96 °C) alebo chemických denaturačných činidiel napríklad formamidu, dochádza k rozpojeniu vodíkových väzieb medzi dusíkatými bázami jednotlivých vlákien nukleových kyselín a vznikajú jednovláknové molekuly DNA. Po ochladení na inkubačnú teplotu (obyčajne 37 °C) zasa dochádza k samovoľnej renaturácii a vlákna sa párujú so svojím komplementárnym vláknom. Tento proces sa nazýva hybridizácia. Hybridizáciu možno využiť, ak jedno z vlákien nahradíme vláknom, ktoré je fluorescenčne značené a zároveň komplementárne k vláknu cieľovému (pozri obrázok č.1). Takto značené sekvencie sa nazývajú sondy. Sonda sa po renaturácii nahybridizuje na cieľové vlákno. Po hybridizácii sondy je nutné odmytie nešpecificky naviazanej sondy, ktorá by potom vytvárala falošné signály (Serakinci *et* Kølvræa, 2009; Wolff *et* Schwartz, 2005)



Obr. č.1 Schematický princíp fluorescenčnej *in situ* hybridizácie.

Legenda: **zelené vlákna:** fluorescenčne značená sonda, **modré a červené vlákno** – cieľové vlákno nesúce hľadanú sekvenciu.

### 3.1.1 Sondy na fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu

Vďaka sekvenciám ktoré získaným v *Human Genome project* je dnes možné vytvoriť sondu pre takmer akúkoľvek oblasť ľudského genómu. Základné všeobecné delenie sond pre *in situ* hybridizáciu z hľadiska ich princípu fungovania je nasledovné:

- sondy značené rádioaktívne
- sondy neznačené rádioaktívne:
  - priamo značené sondy
  - nepriamo značené sondy

Rádioaktívne značené sondy sa využívajú pri *in situ* hybridizácii bez použitia fluorescencie. Detekcia prebieha na základe detekcie rádioaktivity izotopov, ktoré obsahuje sonda.

Pri použití fluorescenčných sond už hovoríme o fluorescenčnej *in situ* hybridizácii. Priame značenie znamená, že fluorescenčné farbivo je naviazané priamo na DNA a je možné ho vizualizovať ihneď po hybridizácii. Nepriame značenie znamená, že je na DNA naviazaný najprv haptén, napr. biotín, digoxigenín ich deriváty a pod. Na haptén sa potom naviaže protilátka s naviazaným fluorescenčným farbivom a až potom sa môže vzorka vizualizovať (Schwarzacher, 2003).

Technika značenia sond závisí na druhu použitej sekvencie ako aj na druhu použitého značenia. Medzi základné metódy patrí *random priming*, nick translácia alebo polymerázová reťazová reakcia (PCR). Existujú aj iné metódy priameho značenia ako je napríklad ULS<sup>®</sup> (Universal Likage System; Kreatech<sup>™</sup>). ULS<sup>®</sup> využíva komplexy platiny označené fluorescenčnou látkou, ktoré sa viažu priamo na pozíciu N7 guanínových nukleotidov,

V klinickej cytogenetike sa sondy delia na základe ich využitia na 3 základné kategórie:

- sondy repetitívnych sekvencií
- sondy lokusovo špecifické
- sondy celochromozómové

Sondy repetitívnych sekvencií sa najčastejšie využívajú na detekciu alfa repetitívnych sekvencií. Alfa repetitívne sekvencie sa nachádzajú v centromérach chromozómov, čo sa využíva na prípravu centromerických sond. Vďaka individualite každého chromozómu v počte repetícií základného motívu možno bezproblémovo pripraviť centromerické sondy pre každý chromozóm (Willard *et* Waye, 1987). Využitie centromerických sond spočíva v stanovení počtu kópií daného chromozómu v interfáznej a aj metafáznej bunke (*centromeric enumeration probes* – CEP). Ďalším menej častým využitím repetitívnych sekvencií sú telomerické repetície, pomocou ktorých možno stanovovať aberácie v telomerických oblastiach.

Celochromozómové sondy alebo tzv. „maľovacie“ sondy (*whole chromosome probes*-WCP) sú založené na unikátnych sekvenciách celého chromozómu alebo jeho ramienka. Takéto sekvencie možno napríklad získať triedením hybridných somatických buniek obsahujúcich jediný chromozóm alebo jeho časť pomocou prietokového cytometra. Následnou disekciou a amplifikáciou prostredníctvom PCR možno získať celochromozómové sondy (Jauch *et al.*, 1990). WCP nachádzajú využitie v detekcii štruktúrnej prestavby chromozómov ako napr.

nehomologické alebo homologické translokácie alebo aneuploidie. WCP sondy sa obyčajne detegujú v metafáznych bunkách (Kraker *et al.*, 1992).

Najčastejšie využívaným typom sond sú sondy lokusovo špecifické (*locus specific identifier* – LSI). LSI sondy hybridizujú na špecifické lokusy a pomáhajú identifikovať počet kópií génu v interfáznom jadre alebo počet oblasti chromozómu v metafáznom jadre. Citlivosť sond LSI rádovo od 10 kb do 1 Mb. LSI sekvencie sa získavajú z častí genómu klonovaných vo vektoroch ako BAC (*bacterial artificial chromosome*), YAC (*yeast artificial chromosome*), plazmidy alebo kozmidy. Selektívnu kultiváciu baktérii alebo kvasiniek je možné vyizolovať klonovanú DNA. Výhodou je dostupnosť komerčných kultúr pripravených na kultiváciu s vloženým konkrétnym inzertom (Strachan *et Read*, 2004; Trask, 2002; Trojanec, 2012; Wolff *et Schwartz*, 2005).

### 3.1.2 Biologický materiál používaný pri FISH

Vzhľadom na to, že táto práca sa zameriava na klinickú cytogenetiku budú popisované len druhy biologických materiálov využívaných v klinickej cytogenetike.

Forma a druh použitého biologického materiálu (vzorky) závisí od účelu a druhu vyšetrenia. Bežné materiály používané v prenatalnej diagnostike sú bunky choriových klkov a amniocyty. Na vyšetrenia leukemických ochorení sa používajú lymfocyty, nátery kostnej drene a krvné nátery. U solídnych tumorov sa vykonávajú biopsie z miesta výskytu tumoru.

FISH možno vykonať na živých alebo na neživých bunkách ktoré predtým prešli kultiváciou alebo fixáciou vo formalíne a boli zaliaté v parafríne (*formalin fixed paraffin-embed*; FFPE), bunkách nanesených na mikroskopických sklíčkach pomocou odstredivej sily metódou cytospin, odtlačkoch tkanív na mikroskopických sklíčkach a iných cytologických preparátoch.

FISH metódu možno aplikovať na obrovské spektrum vzoriek, navyše FISH nevyžaduje na preparáty živé bunky, čo je výhodné z pohľadu uchovania a archivácie vzoriek pred samotným aplikovaním FISH (Strachan *et Read*, 2004; Wolff *et Schwartz*, 2005).

### 3.1.3 Metafázna vs. interfázna FISH

Metafázne pozorovania za použitia prúžkovacích metód vyvinuté v minulom storočí sa považujú v cytogenetike stále za zlatý štandard, pretože poskytujú najlepší obraz o morfológii chromozómov (Liehr *et Claussen*, 2002; Vorsanova *et al.*, 2010). V biologických materiáloch sa však metafázne bunky najmä v solídnych nádoroch vyskytujú len zriedka, pretože ich

mitotická aktivita je relatívne nízka. Za účelom získania väčšieho počtu metafáz je potrebné kultivovať bunky a potom zastaviť ich delenie za požitia mitotického jedu. Tento proces je však časovo náročný (rádovo niekoľko dní). Napriek zavedenej praxi rastie potreba detekcie abnormalít v interfáznych bunkách pomocou FISH, pretože dostupný biologický materiál nemusí byť vhodný na klasickú analýzu prúžkovacou metódou alebo metafáznu FISH, čo sa pri interfáznej FISH v podstate stať nemôže, ak sa vo vzorke nachádza dostatok buniek (Iourov *et al.*, 2009).

Interfázna FISH je schopná poskytnúť informácie jednak o architektúre a zložení jadrového chromatinu (štúdia chromozómových teritórií) (Bolzer *et al.*, 2005), ako aj o aneuploidiách alebo polyploidiiach na základe centromerických alebo chromozóm-špecifických sond. Pomocou LSI sond možno získať informáciu o zlomoch, translokáciách, mikrodélciach, mikroduplicáciách, amplifikáciách a ďalších iných prestavbách, ktoré nie je schopné metafázna FISH odhaliť najmä v detekcii onkologických biomarkerov. Nevýhodou oproti prúžkovacím metódam je nutnosť dopredu poznať očakávanú abnormalitu a na základe toho vybrať sondu. Oproti metafáznej FISH je nevýhoda v nutnosti predúpravy vzorky s proteázou na odstránenie proteínov, ktoré sú obsiahnuté v jadre a jadrovej membráne a taktiež slabšia miera hybridizácie (Trask, 2002; Vorsanova *et al.*, 2010; Wolff *et Schwartz*, 2005).

## **3.2 História fluorescenčnej *in situ* hybridizácie**

### **3.2.1 *In situ* hybridizácia**

Prvé počiatky *in situ* hybridizácie sa datujú do roku 1969. K značeniu hybridizačnej sondy bolo vtedy využité značenie rádioizotopmi, ktoré obsahovala značená RNA (J. G. Gall *et M. L. Pardue*, 1969). Detekcia bola časovo veľmi náročná a poskytovala len veľmi nízke rozlíšenie, napriek vysokej citlivosti. Nevýhodou bola vysoká cena a časová náročnosť celého procesu a taktiež nebezpečenstvo pri zaobchádzaní s rádioaktívnymi látkami. Metóda bola vyvinutá aby prekonala limitácie prúžkovacích metód (*banding*) na identifikáciu chromozómov a ich prestavby, vzhľadom na to, že prúžkovacie metódy limitujú rozlíšenie, ktoré je maximálne 3 Mbp DNA (Yunis, 1976).



### 3.2.2 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia

Až o dekádu neskôr v roku 1980 bola zavedená fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH), ktorá využívala značenie RNA sondy priamo na 3' konci reťazca DNA (Bauman *et al.*, 1980). Postupným rozvojom tohto nového odvetvia *in situ* hybridizácie sa záujem o FISH začal zvyšovať. Bolo to spôsobené najmä vyšším rozlíšením, rýchlosťou, bezpečnosťou a širokými možnosťami detekcie a kvantifikácie viacerých cieľových úsekov DNA. Ako prvé sa rozvinuli v osemdesiatych rokoch metódy nepriameho značenia sondy prostredníctvom hapténov (biotín, digoxigenín, fluoresceín a pod.) (Manuelidis *et al.*, 1982). Neskôr v deväťdesiatych rokoch sa značenie zdokonalilo natolko, že umožnilo efektívne priame značenie sondy bez nutnosti zosilniť signál (Kislauskis *et al.*, 1993).

Tento rozvoj značne rozšíril využitie a možné ciele použitia FISH. Bola umožnená vizualizácia celých metafáznych chromozómov vďaka použitiu celochromozómových sond (WCP) pripravených klonovaním vo vektore, dnes tzv. „*chromosome painting*“. Za použitia neznačenej blokovacej DNA, ktorá mala za úlohu blokovat' repetície, ktoré spôsobujú nešpecifickú hybridizáciu sondy, sa dosiahlo efektívneho značenia celých chromozómov (Landegent *et al.*, 1987; Lichter *et al.*, 1988). Možnosť zobrazovať celé chromozómy dovolila diagnostikovať trizómie a translokácie na chromozómoch, čo znamenalo revolúciu v oblasti ľudskej cytogenetickej analýzy (Pinkel *et al.*, 1988).

V rokoch 1985 štartujúci *Human Genome Project* napomohol vzniku nových jednolokusových sond, ktoré mali pomôcť mapovať genóm a pomohli odhaliť miesta častých zlomov v DNA (Kearney *et al.*, 1991; Pinkel *et al.*, 1986) a boli kľúčové pri identifikácii nových translokácií spojených s onkologickými ochoreniami (Jaju *et al.*, 1999). Prvý ľudský jednokópiový gén bol detegovaný prostredníctvom FISH v roku 1985, jednalo sa vtedy o gén kódujúci tyreoglobulín (Landegent *et al.*, 1985). Citlivosť FISH sa od roku 1970 do roku 1985 zvýšila 10000 krát vďaka vývoju lepších, presnejších a spoľahlivejších sond (Trask, 2002).

Zavedenie kamier s nábojovo viazaným obvodom (*charge-coupled device camera* alebo CCD kamera) umožnilo kvantitatívnu analýzu FISH (Arndt-Jovin *et al.*, 1985). Digitalizácia obrazu a jeho úpravy sa vysporiadali s dlhodobým problémom nerovnomernej fluorescencie a autofluorescencie pozadia. Vďaka digitálnemu odčítaniu pozadia bolo možné získať kvalitnejšie signály bez nešpecifických signálov v pozadí (Bingham *et Hyvärinen*, 2000). Použitie kombinácie viacerých fluorofórov dovolilo vytvoriť sondy špecifické pre celé genómy (Nederlof *et al.*, 1990). Obrovským míľnikom dosiahnutým vďaka CCD kamerám bola

vizualizácia všetkých ľudských chromozómov vďaka spojeniu signálu z piatich sond, ktoré mali rôznu vlnovú dĺžku excitácie. Táto metóda je dnes známa ako M-FISH (*multiplex FISH*) alebo SKY (*spectral karyotyping*) (Schrock *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1996).

FISH sa stala bežnou a základnou cytogenetickou a molekulárnou technikou, ktorá je široko využívaná nielen vo výskume ale aj v diagnostike. Najväčšie výhody spočívajú vo vysokej citlivosti a špecificite. Dnešné klinické humánne aplikácie FISH zahrňujú prenatalnú diagnostiku, onkológiu, patológiu, forenznú analýzu, toxikológiu, radiačnú ochranu a mnohé iné (De Moors *et Frégeau*, 2011; Gaiser *et al.*, 2010; Romm *et al.*, 2016; Schunck *et al.*, 2004). Okrem klinických využití existuje nespočetné množstvo výskumných využití v molekulárnej biológii.

### **3.3 Automatizované zobrazovanie cytogenetické systémy**

Intenzívne rozrastajúce sa pole cytogenetiky vyžadovalo zapojenie automatizovaných systémov do vedeckej ale aj klinickej sféry. Je potrebné rozlišovať medzi automatizovanými prístrojmi na zobrazovanie a prístrojmi na automatickú prípravu a kultiváciu vzoriek. Prvé automatizované prístroje boli určené pre karyotypizáciu a nevyužívali fluorescenciu ale obyčajnú svetelnú mikroskopiu eventuálne *banding*. Fluorescenčná mikroskopia v súvislosti s *in situ* hybridizáciou bola vtedy ešte len v zrode. Najväčším tlakom na vytvorenie takýchto systémov bolo a v súčasnosti aj je narastajúce množstvo klinickej práce. Od automatizovaných systémov sa očakávala predovšetkým zvýšená rýchlosť spracovania vzoriek za súčasnej minimálnej asistencie obsluhy. Jedným z hlavných dôvodov na vytvorenie prvých automatizovaných systémov bola potreba biologického monitoringu u pracovníkov v jadrových elektrárnach, ktorí boli vystavení ionizujúcemu žiareniu. V neposlednom rade to bola potreba eliminácie ľudského faktoru, ktorý je nedokonalý v kvalitatívnom posudzovaní vzoriek. Prístroje mali byť citlivejšie a rýchlejšie ako človek (Rutovitz, 1968).

#### **3.3.1 Prvé automatizované cytogenetické systémy**

Prvý prototyp automatizovaného cytogenetického systému bol určený na lokalizáciu, počítanie a karyotypizáciu buniek v metafáze na mikroskopických sklách. Bol vytvorený za podpory amerického úradu pre letectvo a kozmonautiku (NASA) v Technickom kalifornskom inštitúte v Pasadene v roku 1976. Pozostával z mikroskopu s motorizovaným stolčekom, kamery v podobe katódovej trubice s fotosenzitívnou vrstvou na zachytávanie a digitalizáciu obrazu, počítača na vyhodnocovanie a úložného priestoru na ukladanie výsledkov (pozri obrázok č.2) Súčasťou bol aj automatický systém na prípravu vzoriek. Tento prvý systém

nakoniec napriek jeho nízkymi nákladom na zadováženie nebol rýchlejší ako operátor pri práci s bežným mikroskopom, a preto nebol nikdy použitý na klinické testovanie. Bolo to spôsobené najmä dlhým časom spracovania a nedostatočnou rýchlosťou výpočtovej techniky (Castleman *et al.*, 1976).



Obr. č.2: Prvý automatizovaný cytogenetický systém (Castleman *et al.*, 1976).

Až v roku 1983 bol do prevádzky zaradený prvý úspešný systém na lokalizovanie metafáz a karyotypizovanie, ktorý sa osvedčil v klinickej praxi. Tento systém zrýchlil proces z 1 hodiny a 30 minút až 3 hodín na 30-40 minút (Philip *et al.*, 1985). Po tomto roku počet nových modelov od rôznych výrobcov z rôznych zemí začal narastať (Lundsteen *et al.*, 1989).

Automatizované systémy v 80. rokoch sa zameriavali najmä na biologickú dozimetriu. Jej podstatou bolo vyhľadávať dicentrické chromozómy v metafáznych ľudských lymfocytoch periférnej krvi. Táto metóda sa využívala všade tam, kde chýbala alebo bola nedostatočná klasická prístrojová dozimetria (Bender *et al.*, 1988; Weber *et al.*, 1992). Problémom týchto nefluorescenčných systémov však bolo často rozlíšenie medzi dicentrickým chromozómom a dotykom dvoch monocentrických. Tento problém pomohla vyriešiť fluorescenčná *in situ* hybridizácia. Pomocou telomérických a centromerických sond sa jednoducho darilo odlíšiť pravé dicentrické chromozómy od falošne pozitívnych (Rutovitz, 1992).

Obrovský rozvoj v budúcnosti by mohol značne ovplyvniť rozvoj počítačových neurálnych sietí, ktoré sú postavené tak, aby simulovali ľudské učenie sa na základe rozpoznávania, napr. vo forme obrázkov. Implementácia neurálnych sietí do medicíny je

pomerne stará myšlienka (Lerner, 1998), avšak stále sa vyvíjajúca, keďže dnešné neurálne siete nedosahujú dostatočných kvalít, ich budúci vývoj je však veľmi sľubný (Abid *et al.*, 2016; Graham *et al.*, 1992; Lerner, 1998; Patel *et al.*, 2007).

### 3.3.2 Automatizované zobrazovacie cytogenetické systémy využívajúce FISH

Značné úsilie v poslednej dekáde sa venovalo rozvoju automatickej interfáznej FISH a to hlavne z dôvodu, že interfázna FISH je dôležitou metódou na detekciu numerických a štruktúrnych aberácií v jadre. To je využívané hlavne klinickou cytogenetikou na diagnostiku solídnych nádorov a leukémií (Theodosiou *et al.*, 2007). Počiatky vývoja automatickej interfáznej FISH siahajú k začiatku 90. rokov (Cremeri *et al.*, 1992; Nederlof *et al.*, 1992). Prvé pokusy o automatické odčítanie fluorescenčných signálov z tkanivových rezov boli publikované až koncom 90. rokov (Rodenacker *et al.*, 1997), zároveň bolo vtedy publikovaných niekoľko článkov, ktoré zdokonalili segmentačné algoritmy, dôležité pri rozoznávaní buniek systémom (Netten *et al.*, 1997, 1996).

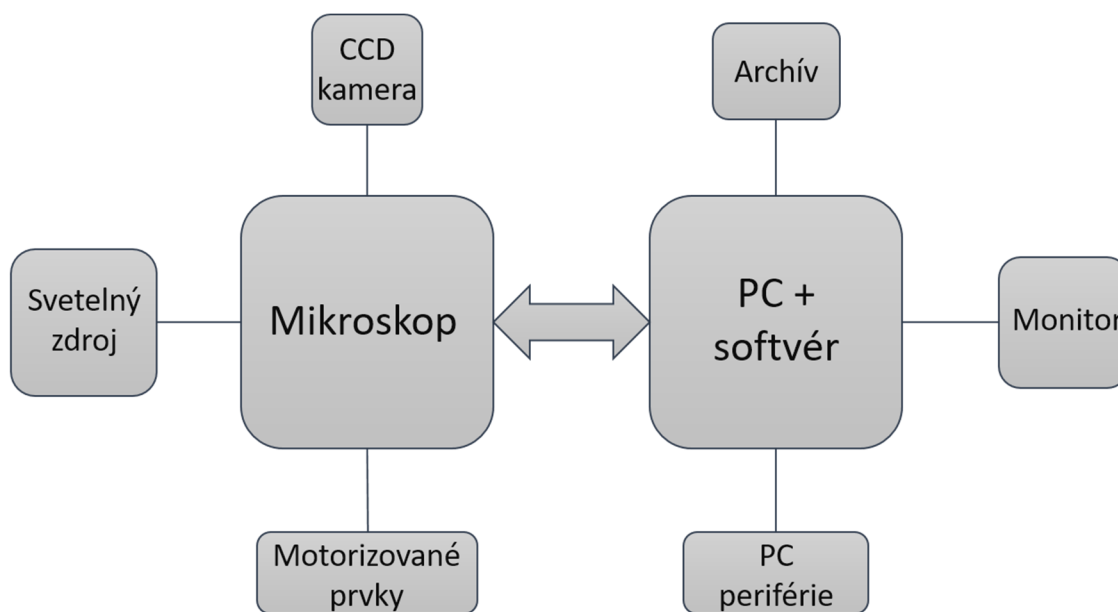
Začiatkom 21. storočia sa aplikácia automatickej FISH zamerala hlavne na aplikačné využitia v cytogenetike rakoviny, konkrétne na automatické hodnotenie amplifikácie génu *HER2*, ktorý sa vyskytuje najmä pri karcinóme prsníka (Klijanienko *et al.*, 1999; Raimondo *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2007). Súviselo to najmä s uvedením lieku trastuzumab, ktorý sa indikuje pri tzv. *HER2* pozitívnych nálezoch karcinómu prsníka (Iourov *et al.*, 2009). Obdobne bola automatizácia prispôbená na detekciu mnohých ďalších cytogenetických abnormalít týkajúcich sa onkologických nálezov napr. trizómii chromozómu 7 u pacientov s rakovinou prostaty, aneuzómii u rakoviny močového mechúra, rakoviny pľúc, krčka maternice, recipročných translokácií a rôznych aneuzómií u hematoonkologických ochorení a pod. (Kajtár *et al.*, 2006; Katz *et al.*, 2008; Pajor *et al.*, 2012a; Truong *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010). K ďalším neonkologickým využitiam patrí napríklad prenatálny skríning za použitia amniotickej tekutiny alebo matkinej krvi (Kilpatrick *et al.*, 2004) alebo automatická kvantifikácia dĺžky telomér (Narath *et al.*, 2005).

Automatizované systémy prispeli k novému rozvoju v oblasti ako FISH, interfázna FISH či komparatívna genómová hybridizácia. Práve ich aplikáciou do automatizovaných systémov sa podnietil vývoj vylepšených techník vyžadujúcich nižšie nároky na náročnosť a čas. FISH vyriešila problémy v oblasti biologickej dozimetrie (Rutovitz, 1992), rozšírila možnosti v klinickej a výskumnej sfére a sprístupnila nové metódy, ktoré mohli byť automatizované. Nové metódy boli napr. analýza jadierka v biologickej dozimetrii,

jednobunková gélová elektroforéza (*comet assay*), komparatívna genómová hybridizácia, kombinácie *comet assay* a FISH a pokročilejšie metódy kombinujúce fluorescenčnú a svetelnú mikroskopiú ako napr. *tissue array* (A. Kallioniemi *et al.*, 1992; Kononen *et al.*, 1998; McKenna *et al.*, 2003; Olive, 1989; Rothfuss *et al.*, 2000).

### 3.3.3 Stavba automatických zobrazovacích systémov

V základe automatický cytogenetický zobrazovací systém pozostáva z týchto komponentov: mikroskop, digitálna kamera s adaptérom pripojenia kamery na mikroskop a počítač s príslušným softvérom. V závislosti na finančných možnostiach a potrebách pracoviska pri zadovážení takéhoto systému je možné voliť doplnkové komponenty (pozri nižšie). Špeciálnym menej častým prípadom môže byť použitie sofistikovanejších systémov ako konfokálne mikroskopy (Pajor *et al.*, 2012b; Umesh Adiga *et Chaudhuri*, 2000). V tejto bakalárskej práci bol použitý systém Metafer scanning and imaging platform (MetaSystems) (pozri obrázok č.3 a 4).



Obr. č.3: Zloženie systému Metafer scanning and imaging platform.



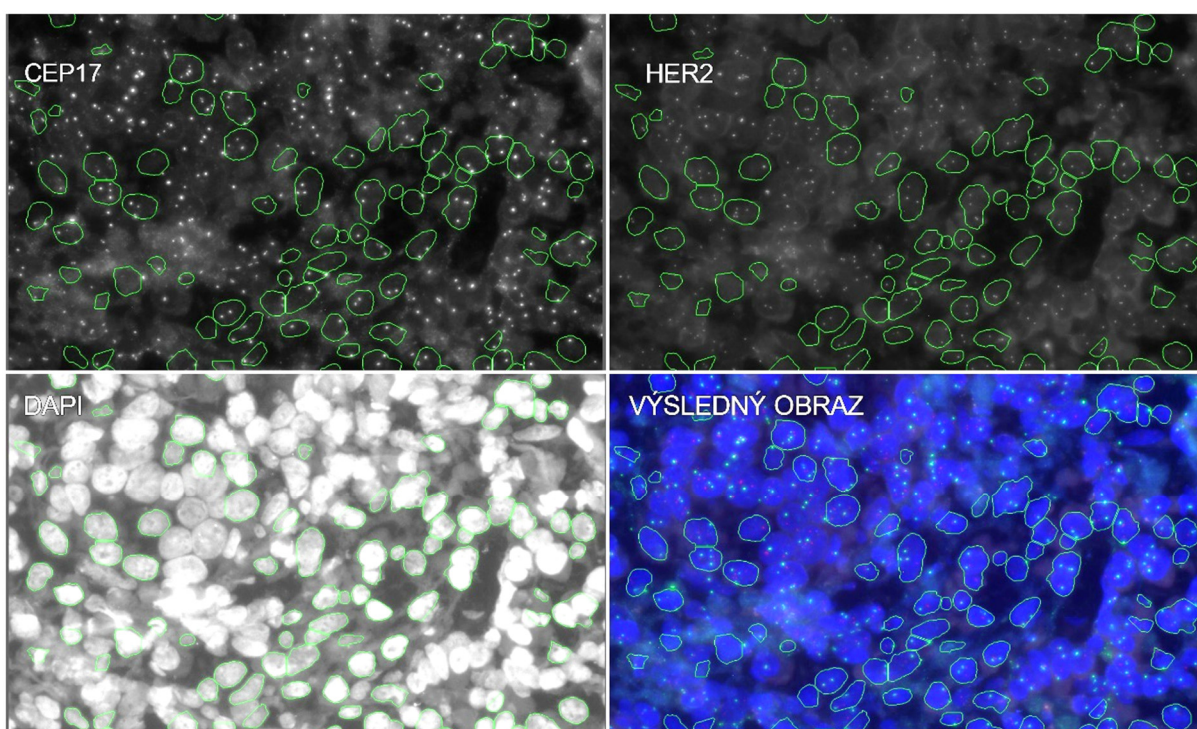
Obr.č.4: Systém Metafer scanning and imaging platform. (Prevzaté z: <https://metasystems-international.com/site/assets/files/6029/metafer2.jpg>)

### 3.3.3.1 Mikroskop a kamera

Voľba druhu mikroskopu závisí najmä od účelu použitia. Pri klasickej svetelnej karyotypizácii postačuje svetelný mikroskop, na fluorescenčné metódy je nutné zvoliť mikroskop fluorescenčný. Takýto mikroskop je potom prispôbený na fluorescenčné snímkovanie motorizovaným výmenníkom fluorescenčných filtrov a je pripojený k svetelnému zdroju s výbojkou. Mikroskop ďalej obsahuje motorizovaný stolček na fixáciu mikroskopických skiel so vzorkami. Väčšinou je možno upevniť do zásobníka na stolčeku niekoľko skiel naraz, napr. 8-12. Stolček sa môže pohybovať v osi horizontálnych osiach na lokalizovanie a posun vzorky a vo vertikálnej osi na zaostrovanie. Stolček je schopný pohybu v presnosti na mikrometre. Po nasnímaní a rozoznaní objektov vo vzorke je každej bunke priradená hodnota v osiach x, y, z a vďaka tomu je možné podľa potreby objekt relokovať, či dokonca znovu nasnímať za použitia iných parametrov. Špeciálnym voliteľným doplnkom je robotické rameno alebo výmenník, ktorý zabezpečuje výmenu celých zásobníkov skiel naraz za iný zásobník.

Kamera je upevnená na mikroskop cez špeciálny adaptér, ktorý umožňuje správne usmernenie svetla na svetlocitlivý čip. Medzi kamerou a okulármi je rozdeľovač svetelných lúčov, ktorý umožňuje presmerovať svetlo do okuláru pre obsluhu alebo do kamery podľa potreby. Dnes sú využívané farebné alebo čiernobiele CCD kamery, ktoré môžu byť chladené alebo nechladené.

Na fluorescenčné metódy musí byť kamera obzvlášť citlivá a schopná zachytiť aj slabé signály. Farebné kamery majú výhodu v možnosti zachytiť viacero farebne odlišných signálov naraz, čím odpadá nutnosť výmeny excitačného filtra, avšak počet farieb rozlišovaných jedným filtrom je limitovaný na 3-4 farby. Monochromatické kamery umožňujú na druhej strane oproti farebným úpravu integračného času jednotlivých farieb (Pajor *et al.*, 2012b). Po výmene filtra je softvér schopný sám si upraviť integračný čas kamery v prípade ak sa sila jednotlivých farebných signálov z fluorochrómov líši. Výsledný obraz je vytvorený prekrytím každej snímky za použitia jednotlivých filtrov a príp. umelým kolorovaním snímky (pozri obrázok č. 5).



Obr. č.5: Snímky fluorescenčných signálov jednotlivých sond a jadier značených DAPI zachytených monochromatickou CCD kamerou. Ich kombinácia do jednej umelo kolorovanej snímky vytvorí výsledný obraz.

### 3.3.3.2 Počítač a softvér

Celý systém je pripojený na počítač, preto musí byť dostatočne výkonný na výpočtové úlohy týkajúce sa analýzy a mať dostatočne veľký úložný priestor na archiváciu. Na archiváciu možno využiť aj sieťové servery na zdieľanie medzi viacerými stanicami či pracoviskami. Počítačový softvér, ktorý je individuálny v závislosti na výrobcovi systému, riadi celý proces snímkovania analýzy a vyhodnocovania za asistencie operátora.

Softvér väčšinou obsahuje:

- Klasifikačné algoritmy špecificky vyvinuté na analýzu pomocou rôznych metód, napr. interfázna FISH, M-FISH, karyotypizácia atď.
- Tréningové procedúry na vylepšenie algoritmov. Operátor manuálne vyznačuje pozitívne, negatívne, falošne pozitívne a falošne negatívne signály a softvér tieto úpravy zapracováva do algoritmov na optimalizáciu celého procesu.
- Galériu snímok určených na vizuálnu kontrolu pre operátora, ktorý rozhoduje ktoré výsledky budú označené ako platné v súhrnnej správe.
- Možnosť grafickej úpravy snímok po nasnímaní prostredníctvom pridania digitálnych filtrov ako napr. zaostrenie, odčítanie pozadia a pod. s následnou možnosťou exportu snímok.
- Možnosť vytvoriť po analýze súhrnnú správu s nálezom a popisom nálezu (Pajor *et al.*, 2012b).

### 3.3.4 Výhody automatických systémov

Automatické systémy patria k dôležitému vybaveniu cytogenetických laboratórií, kde je veľká záťaž z hľadiska počtu vzoriek. Ich úlohou je šetriť čas a minimalizovať chyby ľudského faktoru spôsobené najmä rutinnou prácou (napr. počítanie chromozómov pri karyotypizácii a pod.). Výhodou je možnosť digitalizácie a následnej archivácie vzoriek, ktoré boli nasnímané a analyzované a to v počítači alebo na zabezpečenej sieti. Vďaka sieťovému archivovaniu je možné zdieľať v reálnom čase výsledky s odbornými konzultantmi kdekoľvek na svete. Digitalizácia prináša aj možnosti vylepšenia kvality obrazu vizualizačnými technikami ako napr. odčítanie pozadia, zvýšenie alebo zníženie kontrastu či priradenie nepravých farieb fluorescenčným signálom a ich zlúčenie do jedného obrázku. Digitálne signály je potom možné ľahko kvantifikovať (Blandin *et al.*, 2008).

### 3.3.5 Nevýhody a limitácie

Hlavné limitácie automatického systému sú v kvalite jeho prístrojových komponentov. Kvalitnejšou kamerou možno dosiahnuť kvalitnejšie snímky. Avšak vyššie rozlíšenie snímok vyžaduje vyšší integračný čas a predlžuje celý proces. Kvalitnejší počítač zasa zrýchľuje celý proces analýzy. Nevýhodou je taktiež potreba veľmi dobrého zabezpečenia sieťových archivačných systémov na ochranu proti odcudzeniu osobných údajov pacientov. U automatických systémov je potreba zaškoliť operátorov a taktiež štandardizovať systém na



určité parametre vzoriek, pretože každá cytogenetická metóda ma určité špecifiká, ktoré vyhovujú tomu konkrétnemu systému (Furrer *et al.*, 2013; Pajor *et al.*, 2012b; Schunck *et al.*, 2004; Wolff *et Schwartz*, 2005).

### 3.4 Karcinóm prsníka

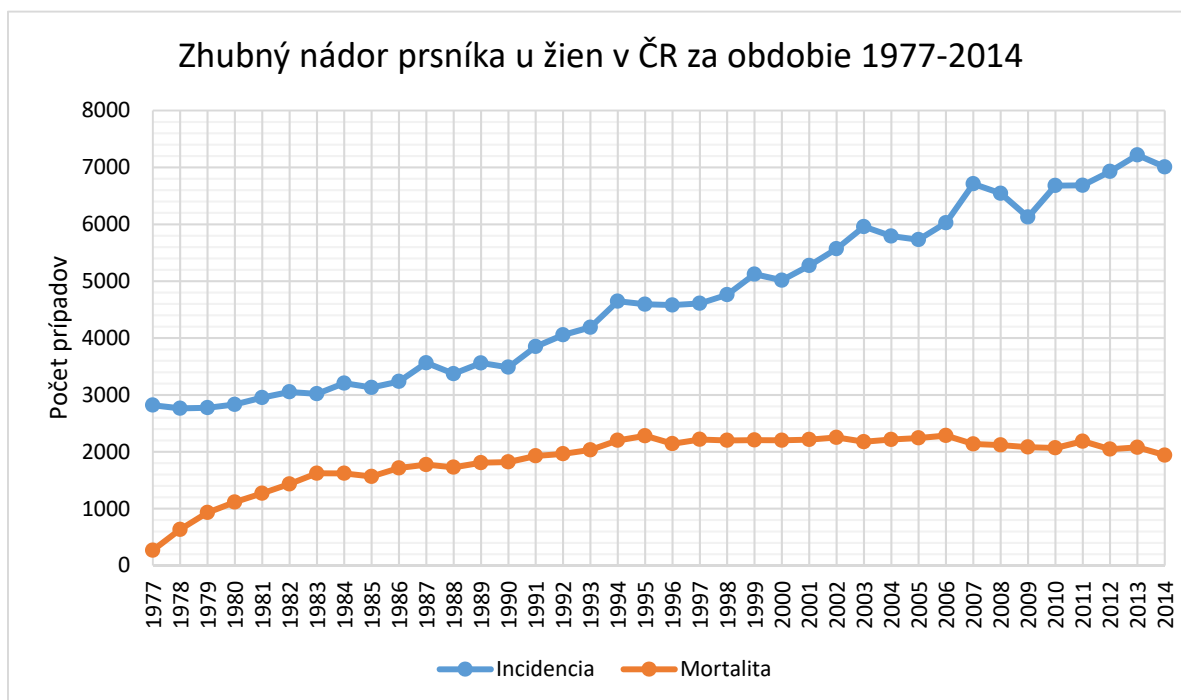
Karcinóm označuje malígy nádor epitelového pôvodu. Karcinóm prsníka patrí medzi najbežnejšie malígne nádorové ochorenia mliečnych žliaz. Vzniká z mliečnych žliaz prsníka, najčastejšie z terminálnych lalôčikov prsnej žľazy (*lobuli glandulae mammae*) a ich vývodov (*ductus lactiferus*). Základné delenie spočíva v stanovení invazívnej formy: karcinóm *in situ* a invazívny karcinóm. *In situ* karcinóm zostáva na mieste svojho vzniku naproti invazívnemu, ktorý metastázuje do iných častí tela a je oveľa ťažšie liečiteľný (Klener, 2002).

#### 3.4.1 Epidemiológia

Karcinóm prsníka je najčastejším zhubným nádorovým ochorením žien v Slovenskej a Českej republike (<http://www.uzis.cz/>; <http://svod.cz/>; <http://www.nczisk.sk>). Toto ochorenie sa vyskytuje aj u mužov aj keď pomer postihnutých mužov týmto ochorením ku ženám je cca 1:130. V roku 2014 bolo diagnostikovaných v českej republike 7008 nových prípadov karcinómu prsníka u žien. Incidencia každoročne stúpa a v roku 2013 prekročila 7000 novo-diagnostikovaných prípadov v českej populácii. Mortalita v českej republike napriek rastúcej incidencii v posledných rokoch stagnuje a darí sa ju držať na približne rovnakej úrovni (cca 2000 úmrtí každý rok) a to vďaka včasnej diagnostike a zlepšovaniu úspešnosti liečby (pozri graf č.1) (Mužík *et al.*, 2009).

Na Slovensku je situácia v rastúcej incidencii podobná. Posledné štatistické údaje z roku 2008 popisujú 2639 nových prípadov novo-diagnostikovaných prípadov karcinómu prsníka u žien. Incidencia vykazuje kontinuálny nárast počas obdobia z rokov 1978-2008. V roku 2013 zomrelo na Slovensku 974 žien s karcinómom prsníka. Mortalita vykazuje od roku 2000 pokles s miernym nevýznamným nárastom po roku 2009 nasledovaný opäť poklesom (údaje do roku 2014) (Ondrušová *et al.*, 2015).

Graf č.1: Incidencia a mortalita zhubného nádoru prsníka u žien za obdobie v rokoch 1977-2014. (<http://www.uzis.cz/>; <http://svod.cz/>).



Karcinóm prsníka bol v roku 2012 celosvetovo druhým (11,9 %) najčastejším diagnostikovaným onkologickým ochorením po rakovine pľúc a najčastejším druhom rakoviny u žien (okrem nemelanómových druhov ochorení). V príčine úmrtí je medzi onkologickými ochoreniami až na 5. mieste vďaka relatívne dobrej prognóze (Ferlay *et al.*, 2015).

### 3.4.2 Rizikové faktory

Existuje množstvo faktorov prispievajúcich ku vzniku karcinómu prsníka medzi ktoré možno zaradiť genetické, hormonálne, nutričné či faktory vonkajšieho prostredia. Vek sa považuje za najväčší rizikový faktor, vzhľadom na to, že výskyt začína stúpať po 30 roku života. Karcinóm prsníka patrí medzi hormonálne závislé ochorenia, expozícia estrogénom u žien z dlhodobého hľadiska indukuje zvýšenú expresiu niektorých onkogénov ktoré sú za normálnych okolností v rovnováhe, a tým prispieva k riziku vzniku ochorenia. So zvýšením rizikom teda súvisí aj: užívanie hormonálnej antikoncepcie, skorý nástup menštruácie, neskorá menopauza alebo hormonálna terapia. Medzi genetické faktory patrí najmä podmienenie mutovanými génmi *BRCA-1* a *BRCA-2*, ktoré zapríčiňujú hereditárne formy karcinómov prsníka a sú autozomálne dominantne dedičné. Spomedzi ďalších faktorov zvyšujúcich riziko

možno spomenúť obezitu, vplyv ionizujúceho žiarenia a nedostatok fyzickej aktivity (Klener, 2002; Konopásek *et Petruželka*, 2003; McPherson *et al.*, 2000).

### 3.4.3 Diagnóza a prognóza

Na presnú diagnózu je potreba vykonať viacero druhov vyšetrení. Základné je klinické vyšetrenie s osobnou a rodinnou anamnézou a vyšetrenie pohmatom. Medzi zobrazovacie metódy pri vyšetovaní patrí mamografia, ultrasonografia, počítačová tomografia či magnetická rezonancia. Biochemické vyšetrenie sa zameriava na hodnoty nádorový markerov. Veľmi dôležité je stanoviť hladiny hormonálnych receptorov z tkanivového rezu nádoru získaného biopsiou, najmä estrogénových a progesterónových receptorov. Zo vzorky tkaniva sa vyšetrujú aj molekulárne-biologické charakteristiky. Ide najmä o určenie mutácie génov *BRCA-1* a *2*, ďalej stanovenie zvýšenej expresie génu *HER2* a vyšetrenie jeho receptorovej rodiny ERBB a iných molekulárných markerov (Desmedt *et al.*, 2008; Klener, 2002; Konopásek *et Petruželka*, 2003).

Molekulárne a imunohistochemické vyšetrenia majú veľký význam v stanovení molekulárneho subtypu karcinómu prsníka. Každý z podtypov reaguje odlišne na rôzne druhy liečby (Blows *et al.*, 2010). V súčasnosti sa delí na 5 hlavných subtypov: Luminálny A, Luminálny B, *HER2* pozitívny, triple negatívny (TNBC) a typu normálnej prsnej žľazy (*normal-like*) (Livasy *et al.*, 2005; Perou *et al.*, 2000).

Prognózu možno stanoviť na základe zaradenia druhu a štádia karcinómu a určenia molekulárneho subtypu. Existuje veľmi veľké množstvo prognostických ukazovateľov z nich najvýznamnejšie sú: veľkosť nádoru, postihnutie uzlín, klinické štádium, vek, stupeň malignity a histologický typ nádoru, prítomnosť hormonálnych estrogénových a progesterónových receptorov, úroveň expresie *HER2* génu a iných molekulárne biologických markerov, ploidia DNA v nádorovom tkanive. Väčšia veľkosť nádoru a neprítomnosť hormonálnych receptorov majú vysoké riziko nepriaznivého priebehu na ochorenie (Klener, 2002).

### 3.4.4 *HER2* pozitívne karcinómy prsníka

Tento subtyp karcinómu sa vyznačuje neprítomnosťou estrogénových a progesterónových receptorov a zvýšenou expresiou *HER2* génu. Štúdie ukázali, že existuje vzťah medzi *HER2* a estrogénovými receptormi. Zvýšený počet estrogénových receptorov sa vyskytuje v bunkách s nižším počtom *HER2* receptorov a naopak blokovanie *HER2* receptoru môže mať za následok nárast počtu estrogénových receptorov (Lopez-Tarruella *et Schiff*, 2007;

Munzone *et al.*, 2006). Zvýšená expresia *HER2* génu, a teda aj zvýšený počet *HER2* receptorov je dôležitý prognostický faktor, ktorý je spájaný s agresívnejším priebehom ochorenia (Slamon *et al.*, 1987; Steward *et Thomas*, 2013; van de Vijver *et al.*, 1988). Dôvod prečo sa prikladá taká dôležitosť stanovovaniu miery expresie *HER2*, je možnosť cielenej liečby voči *HER2* pozitívnym subtypom (Engel *et Kaklamani*, 2007).

### 3.5 *HER2* gén

*HER2* (*human epidermal growth factor receptor 2*) gén je protoonkogén lokalizovaný na dlhom ramienku 17. chromozómu v oblasti q11.2-q12. Je tiež známy pod názvami ako *HER2/neu* alebo *ERBB2*. *HER2* gén kóduje transmembránový glykoproteín *HER2* pozostávajúci z 1255 aminokyselín o veľkosti 185 kDa s tyrozínkinázovou aktivitou uložený v plazmatickej membráne (Coussens, 1985). *HER2* je člen rodiny tyrozínkinázových receptorov pre epidermálne faktory.

#### 3.5.1 **ERBB rodina tyrozínkinázových receptorov**

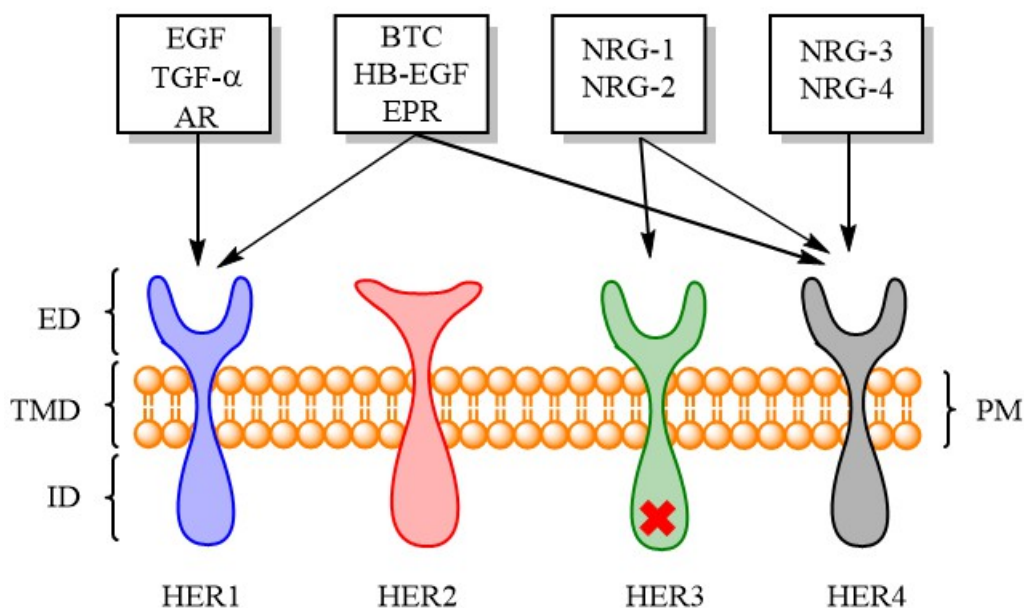
Doteraz identifikovaní členovia rodiny ERBB sú EGFR (*HER1*, *ERBB1*), *ERBB3* (*HER3*) a *ERBB4* (*HER4*). Génom kódovaný proteín je zložený z 3 domén: extracelulárnej, ktorá je glykozylovaná a homologická s extracelulárnou doménou receptoru *HER1* (Downward *et al.*, 1984); transmembránovej, zloženej prevažne z hydrofóbných aminokyselín a intracelulárnej s konzervovaným úsekom s katalytickou tyrozínkinázovou aktivitou (Bargmann *et al.*, 1986) a variabilným úsekom. Extracelulárna doména má za úlohu viazať ligandy a intracelulárna katalyzuje transfer  $\gamma$  fosfátu molekuly adenosíntrifosfátu (ATP) na hydroxylovú skupinu tyrozínu na cieľový proteín (Hunter, 1998).

#### 3.5.2 **Ligandy**

Všetky ligandy ERBB receptorov sú peptidy a majú spoločný motív 45-55 aminokyselín pomocou ktorých interagujú s receptormi. Existuje široká škála ligandov, ktoré sú receptory schopné viazať čo podmieňuje veľkú škálu bunkových odpovedí na tieto ligandy. Ligandy vznikajú v bunke ako súčasť väčšieho prekurzoru, ktorý prechádza viacerými úpravami až je začlenený do bunkovej membrány ako transmembránový proteín. V membráne je jeho extracelulárna časť proteolyticky odštiepená do medzibunkového priestoru, kde môže slúžiť ako ligand receptorov (Massague *et Pandiella*, 1993).

Ligandy sa delia na 3 hlavné skupiny: prvá skupina obsahuje epidermálny rastový faktor (EGF), transformujúci rastový faktor alfa (TGF- $\alpha$ ) a amfiregulín (AR). Druhá zahŕňa

betacelulín (BTC) a heparín viažuci EGF (HB-EGF). Poslednou, tretou skupinou sú neuregulíny (NRG-1 až NRG-4), ktoré sú produktom alternatívneho zstrihu jedného génu (Casalini *et al.*, 2004; Hynes *et MacDonald*, 2009; Marchionni *et al.*, 1993). V každej skupine existujú ešte iné ligandy a agonisti, avšak pre prehľadnosť sa v tejto práci neuvádzajú. Každý zo 4 receptorov z rodiny ERBB viaže odlišné ligandy (pozri obrázok č.6). HER2 nemá doteraz známy ani jeden ligand, čo nasvedčuje tomu že funguje čisto iba ako amplifikačný dimerizačný partner (Harris *et al.*, 2004; Olayioye *et al.*, 2000).



Obr. č.6: Väzba ligandov na jednotlivé receptory rodiny ERBB.

Legenda: **HER1-4** – jednotlivé receptory; **ED** – extracelulárna doména; **TMD** – transmebránová doména; **ID** – intracelulárna doména; **PM** – plazmatická membrána; **EGF** – epidermálny rastový faktor, **TGF- $\alpha$**  – transformujúci rastový faktor alfa, **AR** – amfíregulín, **BTC** – betacelulín, **HB-EGF** – heparín viažuci epidermálny rastový faktor, **NRG-1,2,3,4** – neuregulíny 1-4; **červený križik** značí neprítomnosť tyrozínkinázovej aktivity.

### 3.5.3 Aktivácia a bunková signalizácia ERBB receptorov

Aktivácia tyrozínkinázových receptorov vo všeobecnosti až na výnimky vyžaduje dimerizáciu receptorov. Po naviazaní ligandu na monomér uložený v plazmatickej membráne dochádza k zmene konformácie extracelulárnej domény. V dôsledku toho sa odhalia oblasti bohaté na cysteín a nastane dimerizácia dvoch receptorov (Burgess *et al.*, 2003; Lemmon *et Schlessinger*, 2010). Fyziologicky sa viažu len receptory s naviazanými ligandmi, výnimku tvorí HER2, ktoré doteraz nemá identifikovaný ligand a tvorí len heterodimerizačného partnera, keďže v homodimerickej konfigurácii nie je schopný aktivácie. Dimerizácia nie je čisto

náhodný proces, pretože existuje určitá preferenčná hierarchia, ktorá uprednostňuje HER2 receptor ako dimerizačného partnera (Tzahar *et al.*, 1996). Homodimerické kombinácie majú slabší efekt na signalizáciu ako heterodimerické a najsilnejšie signály vznikajú heterodimerizáciou práve s HER2. Je to spôsobené tým, že intracelulárna časť HER2 sa viaže preferenčne k proteínom a heterodimérom trvá dlhšie než sú podrobené endocytóze a častejšie sú recyklované na povrch bunky ako ostatné kombinácie dimérov (Baulida *et al.*, 1996; Riese *et al.*, 1995; Yarden *et Sliwkowski*, 2001).

Dimerizáciou dvoch receptorov dôjde k priblíženiu ich intracelulárnych domén a aktivácii ich katalytických tyrozínkinázových častí. Tyrozínkinázy vzájomne autofosforylujú svojho dimerizačného partnera za účasti ATP prenášajú fosfátovú skupinu na tyrozínové zvyšky C-koncovej intracelulárnej časti receptora. To, ktorá časť konkrétne bude fosforylovaná, a ktoré ďalšie signálne molekuly budú asociované s dráhou je podmienené typom ligandu a dimerizačným partnerom (Lemmon *et Schlessinger*, 2010; Olayioye *et al.*, 1998). HER3 receptor nedisponuje tyrozínkinázovou aktivitou na svojej intracelulárnej doméne, preto nemôže homodimér HER3-HER3 prenášať signál (Guy *et al.*, 1994).

Autofosforyláciou diméru receptorov sa spúšťa vnútrobunková časť signalizačnej dráhy, ktorá je veľmi komplexná, vybavená viacerými spätnoväzobnými mechanizmami a previazaná s inými druhmi signalizácie. Pre jednoduchosť budú spomenuté len niektoré signalizačné dráhy. Najdôležitejšie aktivované signalizačné dráhy sú PI3K (fosfatidylinozitol-3 kinázová dráha) a MAPK (mitogén-aktivovaná proteínkinázová dráha).

Na autofosforylovaný receptor sa viaže proteín GRB2, ktorý asociuje s proteínom SOS v blízkosti plazmatickej membrány, ktorý je spúšťačom Ras GTPázy. Hlavným integračným bodom mnohých dráh je proteín Ras. Aktivovaný Ras v MAPK dráhe spúšťa signalizačnú kaskádu serín-treonín kináz, ktorá vyústi do zvýšenia regulácie translácie v cytoplazme alebo transkripcie určitých génov v jadre prostredníctvom transkripčných faktorov. Transkribované gény a vzniknuté proteíny majú za následok bunkový rast a stimulujú potlačenie apoptózy. V PI3K dráhe Ras asociuje s PI3K a spúšťa kaskády, ktoré pozitívne regulujú rast a proliferáciu a syntézu proteínov (Citri *et Yarden*, 2006; Hynes *et MacDonald*, 2009; Lemmon *et Schlessinger*, 2010; Yarden *et Sliwkowski*, 2001).

Za fyziologických podmienok majú ERBB tyrozínkinázové receptory kľúčovú rolu v raste a diferenciácii nervového a kardiovaskulárneho systému a tiež prsných žliaz. Prostredníctvom signalizačných dráh a ligandov – rastových faktorov, dochádza v bunke

k stimulácii proliferácie, motility, diferenciácie a rastu. Deregulácia týchto dráh je častým molekulárnym patologickým prejavom u ľudských nádorových ochorení (Casalini *et al.*, 2004).

### 3.6 *HER2* a jeho asociácia s rakovinou

Tumorigenéza u človeka je viackrokový proces, ktorý prostredníctvom postupných genetických zmien transformuje normálnu bunku na bunku malígnu. V procese tumorigenézy je medzi normálnym a malígnym tkanivom široké spektrum postupných genetických zmien, ktoré vedú k agresívnejšiemu a invazívnejšiemu správaniu. Základné črty rakoviny sú schopnosť udržať si chronickú proliferáciu, vyhnúť sa rastovým supresorom a odolávať apoptotickým mechanizmom. Bunková proliferácia, ktorá je za normálnych okolností prísne kontrolovaná prostredníctvom mnohých mechanizmov je v rakovinových bunkách deregulovaná. Jedným z najčastejších mechanizmov deregulácie je vznik nezávislosti bunky na rastových faktoroch a mitogénnych signáloch na rôznych úrovniach signalizačných dráh prostredníctvom početných genetických a epigenetických zmien (Hanahan *et Weinberg*, 2011, 2000).

*HER2* je protoonkogén, ktorý sa v nádorových bunkách mení na onkogén. Hlavný mechanizmus, ktorým *HER2* vyvoláva proliferatívne zmeny je amplifikácia a následná zvýšená expresia jeho génu. Oveľa menej častejším javom je výskyt bodovej mutácie alebo inzercie v géne, ktorá má za následok expresiu receptoru napr. so zmenenou tyrozínkinázovou aktivitou alebo odlišnou extracelulárnou doménou, čo má za následok zvýšenú aktivitu receptoru alebo rezistenciu voči vybraným cieleným terapiám (Gilmer *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006). Diskutovanou témou s protichodnými výsledkami štúdií je aj polymorfizmus *HER2* génu a jeho asociácia s možnosťou vzniku rakoviny (Moasser, 2007; Sun *et al.*, 2015). Zvýšená expresia *HER2* génu sa pozoruje nie len pri karcinóme prsníka ale aj pri karcinóme žalúdka, pažeráku, močového mechúra, endometria či vaječníkov (Mimura *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2006; Slamon *et al.*, 1989).

#### 3.6.1 Amplifikácia *HER2* génu

Amplifikácia je selektívne zvýšenie počtu kópií génu bez proporčného navýšenia celého genómu (Schwab, 1999). Amplifikovaná DNA môže byť organizovaná ako extrachromozomálne elementy, tzv. *double minutes* alebo ako homogénne farbiaca sa oblasť chromozómu vo forme tandemových zoskupení alebo invertovaných palindromických duplikácií. (Albertson *et al.*, 2003). Napriek obrovským pokrokom v oblasti identifikácie amplifikácii génu *HER2* zostáva mechanizmus vzniku amplifikácie nejasný. Navrhnutých bolo

niekoľko možných mechanizmov na modeloch *in vitro* a *in vivo* avšak klinicky sa nepreukázali ako relevantné. Recentné výskumy však naznačujú, že najpravdepodobnejším mechanizmom amplifikácie je BFB (*bridge – fusion – bridge*) cyklus popísaný Barabarou McClintock, pri ktorom vznikajú tzv. homogénne farbiace sa oblasti chromozómu vo forme invertovaných palindromických duplikácií (Marotta *et al.*, 2017, 2012). Treba podotknúť, že v rámci nádorovej bunky nie je amplifikovaný iba gén *HER2*, ale aj jeho susedné gény ako napríklad *GRB7* alebo *PPARB*, ktoré sa podieľajú na signalizácii. To naznačuje, že amplikón je oveľa väčší ako samotný gén (Arriola *et al.*, 2008; Stein *et al.*, 1994).

V dôsledku amplifikácie sa zvýši počet génov *HER2* na 25-50 kópii, čo má za následok 40-100 násobné zvýšenie expresie proteínu HER2 (O. P. Kallioniemi *et al.*, 1992). Zvýšený počet receptorov HER2 je príčinou zvýšenej citlivosti bunky voči ligandom, pretože HER2 je preferovaným partnerom pri dimerizácii a heterodiméry s HER2 majú oveľa vyššiu efektivitu v signalizačnej dráhe ako homodiméry. Deregulácia signalizačnej dráhy vedie k zvýšenej signalizácii, čo sa na bunkovej úrovni prejaví ako zvýšená proliferácia, rýchlejšia rast či potlačenie apoptózy. Kľúčovú úlohu HER2 zohráva pravdepodobne v skorých štádiách ochorenia, kde poskytuje proliferatívnu výhodu nádorovým bunkám. Toto tvrdenie podporuje aj fakt, že väčšina *HER2* pozitívnych karcinómov prsníka je nájdená u počiatočných *in situ* karcinómov než v pokročilejších invazívnych formách (Allred *et al.*, 1992; Latta *et al.*, 2002).

### **3.6.2 Stanovenie amplifikácie *HER2***

Na stanovenie amplifikácie *HER2* génu možno využiť niekoľko molekulárnych vyšetrovacích techník. Dôležitá je reprodukovateľnosť výsledkov, ekonomická nenáročnosť a jednoduchosť vyšetrenia. Americká spoločnosť klinickej onkológie (ASCO) a spoločnosť amerických patológov (CAP) vydali spoločne návody a pravidlá na testovanie *HER2* génu u karcinómu prsníka s poslednou aktualizáciou v roku 2013 (Wolff *et al.*, 2013). Podľa tohto návodu je odporúčanou metódou imunohistochemické (IHC) vyšetrenie zamerané na detekciu HER2 proteínu alebo *in situ* hybridizácia zameraná na detekciu *HER2* génu.

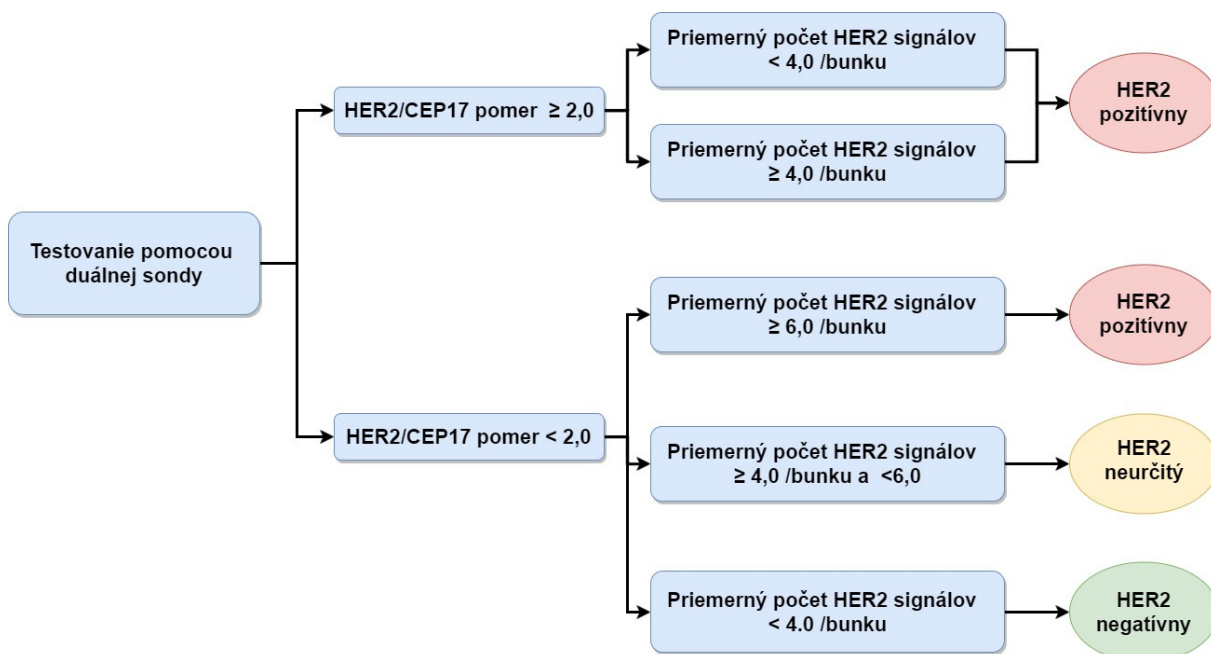
#### **3.6.2.1 Stanovenie pomocou FISH**

*In situ* hybridizáciu (FISH, CISH-chromogénna *in situ* hybridizácia, SISH – *in situ* hybridizácia striebrom) možno podľa ASCO/CAP použiť na detekciu *HER2* génu s jednolokusovou sondou zameranou na *HER2* alebo duálnou sondou CEP na 17. chromozóm a LSI sondou pre *HER2*. Výsledok hodnotenia sa interpretuje buď ako *HER2* pozitívny alebo *HER2* negatívny, podľa počtu jednotlivých signálov v bunke a ich pomeru (pozri obrázok č.8).



Pri výsledku *HER2* neurčitý je nutné buď použiť viacero buniek, ak to vzorka dovoľuje, použiť inú vzorku alebo porovnať výsledok s IHC (Wolff *et al.*, 2013). Funkciou CEP17 sondy je odlíšiť tzv. pravé amplifikácie od nepravých, teda polyzómie alebo monozómie 17. chromozómu od dizómie. Monozómie sa pri karcinnóme prsníka vyskytujú zriedka, avšak polyzómie môžu mať za následok zvýšený počet *HER2* kópií napriek tomu, že nie sú amplifikované a pomer *HER2*/CEP17 môže byť touto skutočnosťou ovplyvnený. Klinický význam polyzómie a jeho vplyvu na zvýšenú dávku *HER2* génu nie je pevne stanovený (Hanna *et al.*, 2014). Ukazuje sa, že polyzómia 17. chromozómu je však iba veľmi zriedkavým javom a preto sa odporúča všetky vzorky, ktoré vykazujú zvýšený počet CEP17 signálov hodnotiť iba podľa *HER2* signálu, aby sa vylúčila možnosť falošne negatívneho výsledku (Hanna *et al.*, 2014; Marchiò *et al.*, 2009; Wolff *et al.*, 2013; Yeh *et al.*, 2009).

Na FISH vyšetrenie solídnych tumorov sa najčastejšie používajú preparáty fixované vo formalíne a zaliate v parafíne (FFPE) vo forme malého bločku, ktoré môžu byť takto archivované veľmi dlho bez straty na kvalite. Rezy hrubé 3-6  $\mu\text{m}$  z týchto bločkov sa nafixujú na pozitívne nabitú mikroskopickú sklíčku a následnou deparafinizáciou a procesom predúpravy sa pripravujú na hybridizáciu so sondou (Lim *et al.*, 2017; Mueller *et al.*, 2003).



Obr. č.8: Návod na interpretáciu výsledkov podľa ASCO/CAP pri testovaní duálnou sondou. (Upravené podľa Wolff *et al.*, 2013)

Rutinné vyšetovanie *HER2* amplifikácie pomocou FISH metódy nesie zo sebou nevýhody z pohľadu časovej náročnosti na vyšetovanie vzoriek a pravdepodobnosť zlej interpretácie výsledkov na základe ľudského faktoru a subjektívneho pohľadu. Tieto nevýhody pomáhajú eliminovať automatické cytogenetické systémy, ktoré umožňujú rýchlu analýzu FISH. Automatický systém dokáže za pomoci operátora analyzovať naskenované snímky, vyhodnotiť počet signálov v bunkách a vyhotoviť finálnu správu so záverom (Stevens *et al.*, 2007).

### 3.6.3 Cílená liečba karcinómu prsníka

HER2 je dôležitým terapeutickým cieľom špeciálnych biologických liečiv, ktoré môžu inhibovať signalizáciu na rôznych úrovniach. Rozvoj týchto liečiv koncom osemdesiatych rokov podnietilo najmä zistenie, že HER2 je spätý so zlou prognózou a mortalitou v skorých štádiách. Jedným z prvých liečiv bol trastuzumab ktorý bol schválený americkou FDA (*food and drug administration*) pod obchodným názvom Herceptin<sup>®</sup> ako prvú terapeutickú protilátku cieleňú na špecifický molekulárny marker spojený s rakovinou (Cobleigh *et al.*, 1999).

Trastuzumab je humanizovaná monoklonálna protilátka proti extracelulárnej doméne HER2 receptoru. Mechanizmus účinku doteraz nie je presne známy. Publikácie naznačujú, že hlavné mechanizmy sú najmä blokácia dimerizácie, blokácia samovoľnej aktivácie a dimerizácie bez prítomnosti ligandu u mutantných foriem receptoru alebo zvýšená endocytóza receptoru (Hudis, 2007; Valabrega *et al.*, 2007). Dôležitým je protilátkový cytotoxický účinok spôsobený aktiváciou NK (*natural killer*) bunkami (Cooley *et al.*, 1999). Trastuzumab sa podáva buď samotný alebo v kombinácii s bežnou chemoterapiou v pokročilých, ale aj skorých štádiách karcinómu prsníka. Rovnaký mechanizmus má pertuzumab, ktorý je takisto humanizovanou monoklonálnou protilátkou ibaže rozoznáva odlišný epitop na extracelulárnej doméne HER2 (Petruželka, 2009).

Lapatinib je ďalším typom cieleňého biologického liečiva. Jeho princíp spočíva v inhibícii tyrozínkinázovej aktivity intracelulárnej domény diméru dvoch receptorov, najmä HER1 a HER2. Lapatinib kompetitívne inhibuje ATP viažucu doménu v proteín kinázovej časti intracelulárnej domény, a tým blokuje jej činnosť. Jeho výhodou je, že je účinný aj u mutantných receptorov, ktorým chýba extracelulárna doména a trastuzumab na nich nefunguje (Moy *et Goss*, 2006; Segovia-Mendoza *et al.*, 2015).

## 4 Materiál a metódy

### 4.1 Izolácia plazmidu

Na izoláciu plazmidu bol využitý Plasmid Mega kit 25 (QIAGEN). Izolované boli bakteriálne plazmidy obsahujúce inzert so sekvenciou pre gén *HER2* a s alfa repetitívnou sekvenciou centromerickej oblasti 17. chromozómu. Použité boli bunkové línie bA6N23 pre gén *HER2* a p717-14 pre centromerickú oblasť 17. chromozómu.

1. Bakteriálna línia, obsahujúca plazmidy s inzertom sekvencií pre daný gén alebo oblasť chromozómu, bola inokulovaná do 1 l LB média s 50 mg ampicilínu.
2. Baktérie boli centrifugované 15 minút v predchladenej centrifúge pri 4 °C a pri 6000 g.
3. Sediment bol resuspendovaný v 50 ml pufru P1 (súčasť kitu).
4. Následne bolo pridaných 50 ml pufru P2 (súčasť kitu) a roztok bol opatrne premiešaný prevrátením 4-6x a ponechaný stáť 5 minút pri izbovej teplote.
5. Potom bolo pridaných 50 ml pufru P3 (súčasť kitu) a roztok znovu opatrne premiešaný prevrátením 4-6x a ponechaný stáť 30 minút pri izbovej teplote.
6. Roztok bol následne centrifugovaný 30 min pri 2000 g a pri 4 °C.
7. Kolóna QIAGEN-tip bola upevnená na 1000ml zbernú nádobu a kolónu premytá 35 ml QBT pufru (súčasť kitu).
8. Na kolónu bol naliaty číry supernatant po centrifugácii z kroku č.6 a ponechaný voľne pretiecť.
9. Kolóna bola premytá 200 ml QC pufru (súčasť kitu) a pretečená tekutina bola vyliata z nádoby do odpadu. Kolóna bola umiestnená na novú čistú zbernú nádobu.
10. Bola eluovaná DNA z valca naliatím, 35 ml QF pufru (súčasť kitu).
11. K eluátu bolo pridaných 24,5 ml čistého izopropanolu, roztok bol zamiešaný a preliaty do čistej centrifugačnej falkóny.
12. Falkóna bola centrifugovaná 30 minút pri 15000 g a pri 4 °C.
13. Supernatant bol opatrne vyliaty do odpadu a k sedimentu bolo pridaných 7 ml 70% etanolu izbovej teploty.
14. Roztok bol znova centrifugovaný 10 minút pri 15000 g a pri 4 °C.
15. Supernatant bol vyliaty do odpadu a sedimentovaná peleta ponechaná vyschnúť cca 20 minút.
16. Peleta bola rozpustená v 10 ml TE pufru.

## 4.2 Značenie a príprava sondy pomocou kitu BioPrime® Array CGH Genomic labeling system

Sonda bola pripravená z vyizolovaných plazmidov pomocou kitu BioPrime® Array CGH Genomic labeling system (Invitrogen™) využívajúceho metódu náhodného značenia *random primed labeling*. Všetky pipetovania počas prípravy boli vykonávané v laminárnom boxe a ochranných rukaviciach.

1. 500 ng DNA vyizolovaného plazmidu bolo rozriedených pipetovaním do 21  $\mu$ l sterilnej deionizovanej vody do 1,5ml mikroskúmaviek.
2. Do skúmavky bolo ďalej pridaných 20  $\mu$ l roztoku 2,5x Random primers solution a skúmavka bola jemne premiešaná.
3. Uzavretá mikroskúmavka sa ponechala inkubovať vo vodnom kúpeli pri 95 °C po dobu 5 minút a potom bola okamžite prenesená na ľad, kde sa ponechala ďalších 5 minút. Počas toho ako bola mikroskúmavka na ľade bolo do nej pridané: 1,5  $\mu$ l 10x dUTP Nucleotide mix, 3  $\mu$ l Cy3™ - dUTP pre alfa repetitívnu sekvenciu centromerickej oblasti 17. chromozómu alebo 3  $\mu$ l Cy5™ - dUTP pre gén *HER2* a 1  $\mu$ l Exo-Klenow Fragment.
4. Po vychladení na ľade bola skúmavka jemne premiešaná a krátko centrifugovaná po dobu cca 5 sekúnd.
5. Uzavretá mikroskúmavka bola inkubovaná v termobloku 2 hodiny pri nastavenej teplote na 37 °C bez prístupu svetla.
6. Po inkubácii bolo do skúmavky pridaných 200  $\mu$ l pufru Binding Buffer B2 a roztok bol premiešaný na trepačke.
7. Na novú čistú 1,5ml mikroskúmavku bola umiestnená prečisťovacia kolóna (súčasť kitu) a na kolónu bol nanesený celý objem roztoku z predošlej mikroskúmavky.
8. Bola vykonaná centrifugácia pri 10000 g 1 minútu, tekutina čo pretiekla do mikroskúmavky bola vyliala do odpadu. Mikroskúmavka bola znova využitá.
9. Na kolónu bolo napipetovaných 650  $\mu$ l pufru Wash Buffer W1 a kolóny s mikroskúmavkami boli centrifugované pri 10000 g 1 minútu, tekutina čo pretiekla do mikroskúmavky bola vyliala do odpadu. Mikroskúmavka bola znova využitá. Následne bola skúmavka s kolónou cnetrifugovaná ešte pri 16000 g po dobu 3 minút.
10. Po centrifugácii bola kolóna prenesená na novú 1,5ml mikroskúmavku a stará mikroskúmavka bola vyhodená do odpadu. Na kolónu bolo napipetovaných 55  $\mu$ l pufru Elution Buffer E1. Kolón sa ponechala inkubovať po dobu 1 minúty pri izbovej teplote a potom bola centrifugovaná pri 13500 g po dobu 2 minút.

11. Kolóna bola vyhodенá do odpadu a k pretečenému roztoku bolo pridaných 25  $\mu$ l Cot-1 blokovacej DNA, 7,5  $\mu$ l octanu sodného o koncentrácii 3 mol/l a pH 5 a 206  $\mu$ l čistého etanolu.
12. Vzorky boli vložené na 20 minút do mrazničky pri -80 °C. Následne boli centrifugované 15 minút pri 13000 g v predchladenej centrifúge pri 4 °C.
13. Supernatant bol vyliaty a sedimentovaná peleta sa nechala vysušiť cca 20-25 min. Sedimentovaná peleta bola resuspendovaná v 50  $\mu$ l hybridizačného pufru a bola uchovávaná v mrazničke pri -18 °C.

#### 4.3 Značenie a príprava sondy pomocou kitu Platinum bright

Sonda bola pripravená z vyzolovaných plazmidov pomocou Platinum bright nucleic acid labeling kitu (Kreatech™) využívajúceho metódu priameho značenia ULS®. Samotnému značeniu predchádzala sonifikácia neznačenej DNA, ktorá musí byť pred značením fragmentovaná na fragmenty 1000 bp a menšie. Všetky pipetovania počas prípravy boli vykonávané v laminárnom boxe a ochranných rukaviciach.

1. 1  $\mu$ g DNA vyzolovaného plazmidu bol rozriedený pipetovaním do 100  $\mu$ l sterilnej deionizovanej vody do špeciálnych 0,5ml mikroskúmaviek určených pre sonifikátor.
2. Sonifikátor bol vopred naplnený vychladenou vodou a boli do neho vložené uzavreté vzorky. Sonifikácia bola nastavená na 20 cyklov. Každý cyklus pozostával z 30 sekúnd zapnutej sonifikácie a 90 sekúnd vypnutej sonifikácie.
3. Po sonifikácii bol roztok fragmentovanej DNA zakoncentrovaný na vákuovej odparke na konečný objem 16  $\mu$ l.
4. Po zahustení bol pridaný v laminárnom boxe 2  $\mu$ l ULS dye (orange/red pre gén *HER2*, green pre alfa repetitívnu sekvenciu centromerickej oblasti 17. chromozómu) a 2  $\mu$ l 10x labeling solution. Roztok bol premiešaný pipetovaním.
5. Uzavreté mikroskúmavky boli inkubované vo vodnom kúpeli 30 minút pri nastavenej teplote na 85 °C. Po inkubácii boli vzorky premiestnené do ľadu až do ich ďalšieho použitia.
6. Tekutá náplň prečisťovacích kolón bola resuspendovaná. Bol povolený horný uzáver a odlomený spodný uzáver a kolóna umiestnená na prázdnu 2ml mikroskúmavku.
7. Bola vykonaná centrifugácia pri 20000 g 1 minútu, tekutina čo pretiekla do mikroskúmavky bola vyliata do odpadu. Mikroskúmavka bola znova využitá.

8. Na kolónu bolo nanosených 300  $\mu$ l sterilnej deionizovanej vody a kolóny s mikroskúmavkami boli centrifugované pri 20000 g 1 minútu. Mikroskúmavka aj s pretečenou vodou bola vyhodенá a kolóna nasadená na novú mikroskúmavku.
9. Na kolónu boli nanosené vzorky, ktoré boli doteraz uložené v ľade a bola vykonaná centrifugácia pri 20000 g 1 minútu. Po centrifugácii bola kolóna vyhodенá aby zostala iba skúmavka so vzorkou, ktorá pretiekla cez kolónu.
10. Ku vzorkám bolo pridaných 3  $\mu$ l octanu sodného o koncentrácii 3 mol/l a pH 5, 10  $\mu$ l Cot-1 blokovacej DNA a 83  $\mu$ l čistého etanolu. Vzorky boli prevrátením skúmavky premiešané.
11. Vzorky boli vložené na 30 minút do mrazničky pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Následne boli centrifugované 30 minút pri 20000 g v predchladenej centrifúge pri  $4^{\circ}\text{C}$ .
12. Supernatant bol vyliaty a sedimentovaná peleta sa nechala vysušiť cca 20-25 min. Sedimentovaná peleta bola resuspendovaná v 25  $\mu$ l hybridizačného pufru a bola uchovávaná v mrazničke pri  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4 FISH

Na FISH boli použité tkanivové rezy o hrúbkach 2-5  $\mu\text{m}$  fixované vo formalíne a zaliate v parafíne (FFPE). Tieto rezy boli fixované na podložné mikroskopické sklíčko s pozitívne nabitou stranou. Sklíčka boli upravené procesom predúpravy a následne na nich bola nahybridizovaná sonda.

1. Sklá s fixovanými rezmi boli tri krát premyté v xyléne po dobu 7 minút a potom premyté v čistom etanole dva krát po dobu 5 minút.
2. Boli usušené v hybridizéri cca 3-5 minút nastavenom na konštantné udržovanie  $49^{\circ}\text{C}$ .
3. Sklá boli umiestnené do kyseliny chlorovodíkovej o koncentrácii 0,2 mol/l na 20 minút a potom do deionizovanej vody na 3 minúty.
4. Následne boli sklá premyté premývacím pufrom po dobu 3 minút.
5. Potom boli sklá umiestnené na 20 min do roztoku tiokynatánu sodného o koncentrácii 1 mol/l vyhriateho na  $80^{\circ}\text{C}$  vo vodnom kúpeli.
6. Sklá boli premyté deionizovanou na 1 minútu a potom dvakrát premývacím pufrom po dobu 5 minút.
7. Sklá boli umiestnené do proteázového pufru vyhriateho v inkubátore na  $37^{\circ}\text{C}$  do ktorého bol 10 minút pred samotným umiestnením skiel pridaný pepsín na výslednú koncentráciu 0,5 mg/ml. Enzým bol ponechaný pôsobiť v inkubátore po dobu 55 minút.

8. Po inkubácii boli sklá dvakrát premyté premývacím pufrom po dobu 5 minút.
9. Sklá boli usušené v hybridizéri cca 3-5 minút nastavenom na konštantné udržovanie 49 °C.
10. Sklá boli umiestnené do 10% pufrovaného formalínu na 10 minút a následne premyté dvakrát premývacím pufrom po dobu 5 minút a deionizovanou vodou 1 minútu.
11. Sklá boli usušené v hybridizéri po dobu 10 minút nastavenom na konštantné udržovanie 49 °C.
12. Následne bolo na tkanivo napipetovaných opatrne 5-10  $\mu$ l (podľa veľkosti tkaniva) zmiešanej duálnej sondy *HER2/CEP17* a priložené krycie sklíčko tak aby sa vytlačili všetky vzduchové bubliny a celý povrch tkaniva sa pokryl sondou.
13. Okraje krycieho sklíčka boli zalepené gumeným kaučukovým cementom aby sa predišlo vyschnutiu.
14. Takto pripravené sklíčka boli vložené do hybridizéru a nastavená teplota denaturácie na 85 °C po dobu 1 minúty a teplotu hybridizácie 37 °C po dobu 12-24 hodín.
15. Po hybridizácii boli odstránené krycie sklíčka a sklá premyté v najprv v premývacom roztoku I vyhriatom vo vodnom kúpeli na 73°C po dobu 1 minúty a 45 sekúnd a potom v premývacom roztoku II izbovej teploty po dobu 30 sekúnd.
16. Sklá boli krátko opláchnuté a nechané usušiť pri izbovej teplote bez prístupu svetla cca 30 minút.
17. Na tkanivo bolo nanosených cca 5  $\mu$ l DAPI roztoku (podľa veľkosti tkaniva) a priložené čisté krycie sklo, tak aby sa vytlačili všetky vzduchové bubliny.
18. Sklá boli uchovávané v tme a v chladničke pri teplote cca 5 °C.

#### 4.5 Odčítanie fluorescenčných signálov

Odčítanie prebehlo na prístroji Metafer scanning and imaging platform (MetaSystems). Mikroskopické sklá s tkanivom a nahybridizovanou sondou boli vložené do mikroskopu a naskenované softvérom Metafer4. Využitý bol fluorescenčný režim na interfáznu FISH a nastavené zväčšenie 400x za použitia filtrov pre excitačné oblasti farbiva DAPI, FITC a TRITC. Bol zvolený klasifikačný algoritmus, ktorý je určený na analýzu signálov génu *HER2* a centromerickej oblasti 17. chromozómu. Po naskenovaní prebehla analýza, ktorú vykonal softvér a vyznačenie minimálne 100 jadier (ak to kvalita vzorky umožňovala). Bola vyhotovená

záverečná správa s priemernými signálmi *HER2* na bunku, CEP17 na bunku a *HER2/CEP17* pomer. Vyhodnotenie vykonal softvér v súlade s najnovšími odporúčaniami ASCO/CAP.

#### 4.6 Použité chemikálie

70%, 96% etanol (Fagron), Xylén (Mikrochem), izopropanol (Lach-Ner), octan sodný (Lach-Ner), deionizovaná voda, deionizovaná sterilná voda (Ambion), Cot-1 DNA – FISH grade Cot (Kreatech), hybridization solution (Cytocell), formamid (Ambion), dextransulfát (Sigma-Aldrich), laurylsíran sodný (Lach-Ner), Salmon sperm (Thermo Fisher Scientific), aktívne uhlie (Sigma-Aldrich), glycerol 99% (Sigma-Aldrich), 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (Sigma-Aldrich), p-fenyléndiamín (Sigma-Aldrich), DAPI Antifade (Vysis), 35-38% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner), tiokyanát sodný (Sigma-Aldrich), chlorid sodný (Sigma-Aldrich), citrát sodný (Sigma-Aldrich), chlorid draselný (Lach-Ner), dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich), dihydrogénfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich), TRIS (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich), pepsín-2500 U/mg (Sigma-Aldrich), NP-40 (Vysis), LB broth base (Invitrogen), kaučukový cement (Marabu), NaOH na úpravu pH roztokov (PENTA), ampicilín (Sigma-Aldrich), komerčná duálna sonda ERBB2(17q12)/SE 17 (Kreatech)

#### 4.7 Použité roztoky

zásobný roztok 20x SSC

- 175 g NaCl
- 88 g citrátu sodného
- Doplniť do 1 l deionizovanou vodou, upraviť pH na 5,3

premyvací pufer

- 100 ml zásobného roztoku 20x SSC
- doplniť do 1 l deionizovanou vodou, upraviť pH na 7,0

proteázový pufer

- 0,9% roztok NaCl, pH upraviť na 2



#### 10x zásobný roztok PBS

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 30,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Doplniť do 1 l deionizovanou vodou

#### pufrovaný glycerol

- 1 ml 10x PBS
- 9 ml deionizovanej vody
- 90ml glycerolu
- lyžička aktívneho uhlia
- prefiltrovať roztok

#### 10% pufrovaný formalín

- 40 ml formaldehydu
- 100 ml zásobného 10x PBS
- doplniť do 0,5 l deionizovanou vodou a uchovávať v tme

#### premyvací roztok I

- 20 ml zásobného roztoku 20x SSC
- 3 ml NP-40
- doplniť do 1 l deionizovanou vodou, upraviť pH na 7

#### premyvací roztok II

- 100 ml zásobného roztoku 20x SSC
- 1 ml NP-40
- doplniť do 1 l deionizovanou vodou, upraviť pH na 7

#### LB médium

- 20 g LB broth base
- 4,7 g NaCl
- doplniť do 1 l vodou a autoklávovať

TE pufer

- 200  $\mu$ l 0,5mol/l TRIS
- 200  $\mu$ l 0,05 mol/l EDTA
- 9,6 ml deionizovanej vody

koncentrát DAPI

- 5 mg 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochloridu
- doplniť do 50 ml deionizovanej vody

roztok DAPI

- 1 ml pufrovaného glycerolu
- 2 zrnká p-fenyléndiamínu
- premiešať, centrifugovať 5 minút pri 10 000 g
- 15  $\mu$ l koncentrátu DAPI, premiešať a krátko centrifugovať, uchovávať v chladničke

hybridizačný pufer

- 5 ml formamidu
- 2 ml 50% dextransulfátu
- 100  $\mu$ l 10% SDS
- 16,5  $\mu$ l 0,05mol/l EDTA
- 250  $\mu$ l Salmon sperm
- doplniť do 10 ml deionizovanou vodou

#### 4.8 Pomôcky

Tkanivové karcinómu prsníka fixované vo formalíne a zliate v parafíne narezané na hrúbku 2,3,4,5  $\mu$ m, pozitívne nabité mikroskopické podložné sklá (Superfrost™ Plus Adhesion Slides – Thermo Fisher scientific), krycie mikroskopické sklá rôznych veľkostí (Thermo Fisher scientific) špičky do mikropipiet (Eppendorf dualfilter tips), mikroskúmavky, pasteurove pipety, ochranné rukavice, odmerné valce, buničitá vata, ľadová triešť, centrifugačné falkóny, centrifugačné mikroskúmavky, kadičky, dózy na mikroskopické sklá podľa Coplina, reagenčné autoklávovateľné fľaše

#### **4.9 Použité kity**

BioPrime<sup>®</sup> Array CGH Genomic labeling system (Invitrogen<sup>™</sup>), Platinum bright nucleic acid labeling kit (Kreatech<sup>™</sup>), Plasmid mega kit 25 (Qiagen),

#### **4.10 Použité prístroje**

Metafer scanning and imaging platform (MetaSystems): plne motorizovaný mikroskop Axio Imager 2 (Zeiss), svetelný zdroj X-cite exacte (Lumen Dynamics), kamera CoolCube1m 1360x1024 pixelov, 6.45  $\mu\text{m}$  x 6.45  $\mu\text{m}$ , 2/3" CCD, monochromatická (MetaSystems), počítač DELL (Intel<sup>®</sup> Core <sup>™</sup> i7, RAM 4GB, Windows7 x64, softvér Metafer4 v 3.12.151), mikropipety (research/plus-Eppendorf), laminárny box (Herasafe KS12 – Thermo Fisher Scientific), digestor (N1200 – Merci) minicentrifúga (miniSpin plus – Eppendorf), chladená centrifúga (Rotina 420R – Hettich), centrifúga (Smart 15 – Hanil), váhy (ED4235 – Sartorius), vírivá trepačka (Lab dancer-IKA, C24 – New Brunswick), vodný kúpeľ (TW8 – Julabo, ED5 – Julabo), termoblok (BSH200-Benchmark Scientific), hybridizér (Hot-Brite – Vysis, 5500-24 – Leica), magnetická miešačka (Arec-x – Velp scientific), pH meter (Hanna instruments), kombinovaná chladnička s mrazákom (Gorenje, Liebherr), inkubátor (Mettler), výrobnik ľadu (GB 902 – Brema) , vákuový rotačný koncentrátor (Concentrator 2301 – Eppendorf)

## 5 Výsledky

V prvej časti experimentálnej časti bola prevedená optimalizácia za účelom štandardizácie metódy FISH pre automatizovaný odpočet miery amplifikácie génu *HER2* prístrojom Metafer scanning and imaging platform. Druhá časť sa zameriavala na vyšetrenie vzoriek pacientiek s diagnózou karcinóm prsníka, u ktorých bola posudzovaná miera amplifikácie génu *HER2* pomocou optimalizovanej metódy na prístroji Metafer. Získané výsledky boli porovnávané s údajmi a výsledkami manuálneho odpočtu FISH signálov z databáze laboratória cytogenetiky Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny.

### 5.1 Optimalizácia automatizovanej FISH

#### 5.1.1 Optimalizácia metódy FISH

Na optimalizáciu bola použitá 1 bioptická vzorka solídneho tumoru fixovaná vo formalíne a zaliata v parafíne bez zistenej amplifikácie génu *HER2*. Vzorka pochádzala od pacientky s diagnostikovaným karcinómom prsníka, ktoré poskytol archív Ústavu patológie Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Optimalizácia prebehla celkovo v 5 pokusoch. V každom pokuse boli použité rezy tkaniva o hrúbke 2,3,4 a 5  $\mu\text{m}$ , ktoré boli fixované a upravené pre FISH vyšetrenie na mikroskopických podložných sklách. Pre posúdenie prekrytia a hustoty rozmiestnenia buniek boli vzorky pomocou softvéru Metafer4 iba naskenované a neprebehlo hodnotenie počtu signálov a vyhodnotenie vyšetrenia vzorky. Všetky pripravené sondy boli duálne sondy LSI *HER2/CEP17*. Každéj novej príprave sondy predchádzala selekčná kultivácia kultivácia baktérií s plazmidovým inzertom pre sekvenciu *HER2* a centromerickú oblasť chromozómu 17 a následná izolácia plazmidovej DNA. Cieľom optimalizácie bolo zistiť, aká hrúbka rezu vzorky, sonda a reagentie poskytujú najlepšie a najreprodukovateľnejšie výsledky pri diagnostike prostredníctvom automatizovaného odpočtu pomocou prístroja Metafer scanning and imaging platform.

V prvom pokuse bola pripravená a použitá duálna sonda č.1 pomocou kitu od výrobcu Invitrogen<sup>TM</sup>. Pri príprave sondy bol použitý laboratórne pripravený hybridizačný pufer. Sonda bola nahybridizovaná na všetky vzorky a bol použitý laboratórne pripravený roztok DAPI. V bunkách sa po hybridizácii nevyskytovali žiadne signály a v okolí buniek bolo veľa nešpecifických signálov. Laboratórne pripravený hybridizačný pufer teda nie je vhodný.

V druhom pokuse bola pripravená a použitá nová duálna sonda č.2 pomocou kitu od rovnakého výrobcu Invitrogen<sup>TM</sup>. Pri príprave sondy bol použitý komerčne dostupný

hybridizačný pufer. Sonda bola nahybridizovaná na všetky vzorky a bol použitý laboratórne pripravený roztok DAPI. V bunkách sa po hybridizácii nachádzali signály s minimom nešpecifických signálov v okolí buniek. Táto sonda je teda vhodná na odpočet signálov *HER2/CEP17* v diagnostike a zároveň bolo zistené, že komerčný hybridizačný pufer je vhodnejší ako laboratórne pripravený.

V treťom pokuse bola použitá duálna sonda č.2 z druhého pokusu. Pri príprave sondy bol použitý komerčne dostupný hybridizačný pufer. Sonda bola nahybridizovaná na všetky vzorky a bol použitý komerčne dostupný roztok DAPI. V bunkách sa po hybridizácii nevyskytovali žiadne signály a v okolí buniek bolo veľa nešpecifických signálov. Z tohto pokusu bolo zistené, že komerčný DAPI roztok je vhodnejší kvôli lepšej viditeľnosti jadier buniek než laboratórne pripravený.

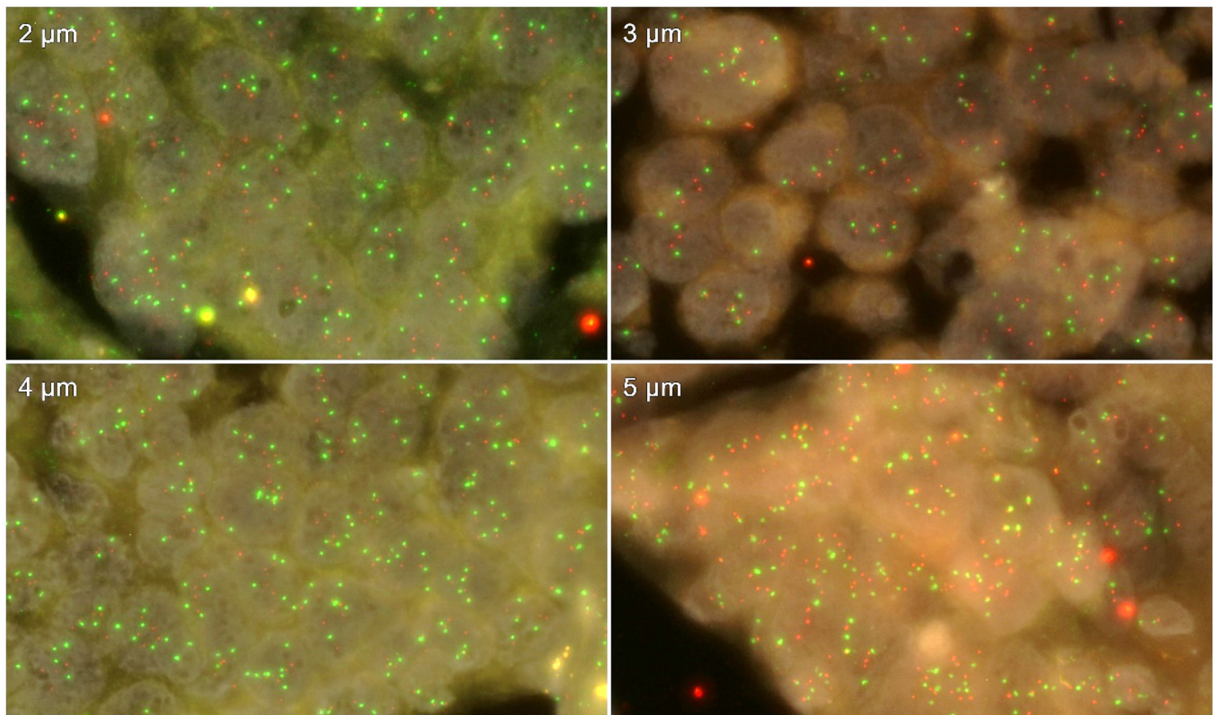
Vo štvrtom pokuse bola pripravená nová sonda č.3 pomocou kitu od výrobcu Kreatech™. Pri príprave sondy bol použitý komerčne dostupný hybridizačný pufer. Sonda bola nahybridizovaná na všetky vzorky a bol použitý komerčne dostupný roztok DAPI. V bunkách sa po hybridizácii nevyskytovali žiadne signály a v okolí buniek bolo veľa nešpecifických signálov a preto nie je sonda vhodná na využitie v diagnostike.

Ako najvhodnejšia hrúbka rezu bola na základe predtým získaných snímok a práce s tkanivom vybraná hrúbka 3 µm. S touto hrúbkou boli vykonané všetky ďalšie testy. Pri rezoch s hrúbkou 4 µm a 5 µm dochádzalo k prekrytiu jednotlivých buniek a teda aj jadier čo by znemožňovalo odpočet. Na obrázku č. 9 je porovnanie fotografií hrúbok rezov tkanivom ako boli zachytené prostredníctvom softvéru Metafer4 v druhom pokuse.

Na posledný piaty pokus bola z dôvodu predošlej neúspešnosti pokusov s komerčne dostupnými kitmi na prípravu sond použitá komerčne dostupná duálna sonda ERBB2(17q12)/SE 17 od výrobcu Kreatech™, ktorá bola pomenovaná ako sonda č. 4. Sonda bola nahybridizovaná na vzorku s hrúbkou rezu 3 µm a bol použitý komerčne dostupný roztok DAPI. V bunkách sa po hybridizácii nachádzali signály s minimom nešpecifických signálov v okolí buniek. Táto sonda je teda vhodná na odpočet signálov *HER2/CEP17* v diagnostike.

Na základe úspešnosti hybridizácie a možnosti ďalšej úspešnej reprodukovateľnosti pokusu boli vybrané komerčne dostupná duálna sonda ERBB2(17q12)/SE 17 od výrobcu Kreatech™ spolu s kitom Invitrogen™ pre prípravu vlastnej sondy, ktorých výsledky boli porovnateľné. V tabuľke č.1 je prehľad všetkých pokusov a ich jednotlivých obmien pri testovaní.

Ako najoptimálnejšie parametre a reagenty predúpravy boli zvolené nasledovné: hrúbka rezu 3  $\mu\text{m}$ , komerčný roztok DAPI, komerčný hybridizačný pufer a komerčná duálna sonda ERBB2(17q12)/SE 17 od výrobcu Kreatech™ a kit Invitrogen™ pre prípravu sondy. Súčasťou zloženia komerčnej sondy je vlastný hybridizačný pufer.



Obr. č. 9: Porovnanie rôznych hrúbok rezu vzoriek tkaniva v pokuse č.2.

Tabuľka č.1: Prehľad optimalizačných pokusov a obmeny parametrov pri testovaní.

| Č. pokusu | Č. sondy | Použitý kit/sonda        | Hybridizačný pufer     | DAPI roztok            | Úspešnosť hybridizácie | Hrúbky rezov [μm] |
|-----------|----------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| 1         | 1        | Invitrogen™ kit          | laboratórne pripravený | laboratórne pripravený | neúspešná              | 2,3,4,5           |
| 2         | 2        | Invitrogen™ kit          | komerčne dostupný      | laboratórne pripravený | úspešná                | 2,3,4,5           |
| 3         | 2        | Invitrogen™ kit          | komerčne dostupný      | komerčne dostupný      | neúspešná              | 2,3,4,5           |
| 4         | 3        | Kreatech™ kit            | komerčne dostupný      | komerčne dostupný      | neúspešná              | 2,3,4,5           |
| 5         | 4        | Kreatech™ komerčná sonda | súčasť sondy           | komerčne dostupný      | úspešná                | 3                 |

### 5.1.2 Nastavenie klasifikátora v softvéri Metafer4

Na odpočet a následné vyhodnocovanie signálov *HER2/CEP17* pomocou automatizovanej FISH bol použitý softvér Metafer4, ktorý je súčasťou systému Metafer scanning and imaging system. Vzhľadom na neschopnosť softvéru za použitia klasifikátora PathVysionV2 rozlišovať jednotlivé jadrá bola externou servisnou firmou vykonaná aktualizácia softvéru Metafer4 z verzie 3.10.156 na verziu 3.12.151. Klasifikátor PathVysionV2 bol aktualizovaný na najnovšiu verziu a taktiež boli pridané nové klasifikátory: HER2-TissueFISH-V6A, HER2-TissueFISH-V6B, HER2 TissueFISH-V6C, HER2 TissueFISH-V6D. Všetky klasifikátory boli otestované na vzorke z piateho pokusu v kapitole 5.1.1 s optimalizovanými parametrami v tzv. tréningovom režime klasifikátorov (*classifier training*) softvéru Metafer4. Porovnávané vlastnosti klasifikátora boli: schopnosť rozlišovať jadrá, najmä možnosť manuálne po naskenovaní pridávať a označovať jadrá a možnosť vyhotovenia záverečnej správy vzorky. Cieľom tejto experimentálnej časti bolo

nájsť optimálny klasifikátor na automatizovaný odpočet pomocou systému Metafer scanning and imaging platform.

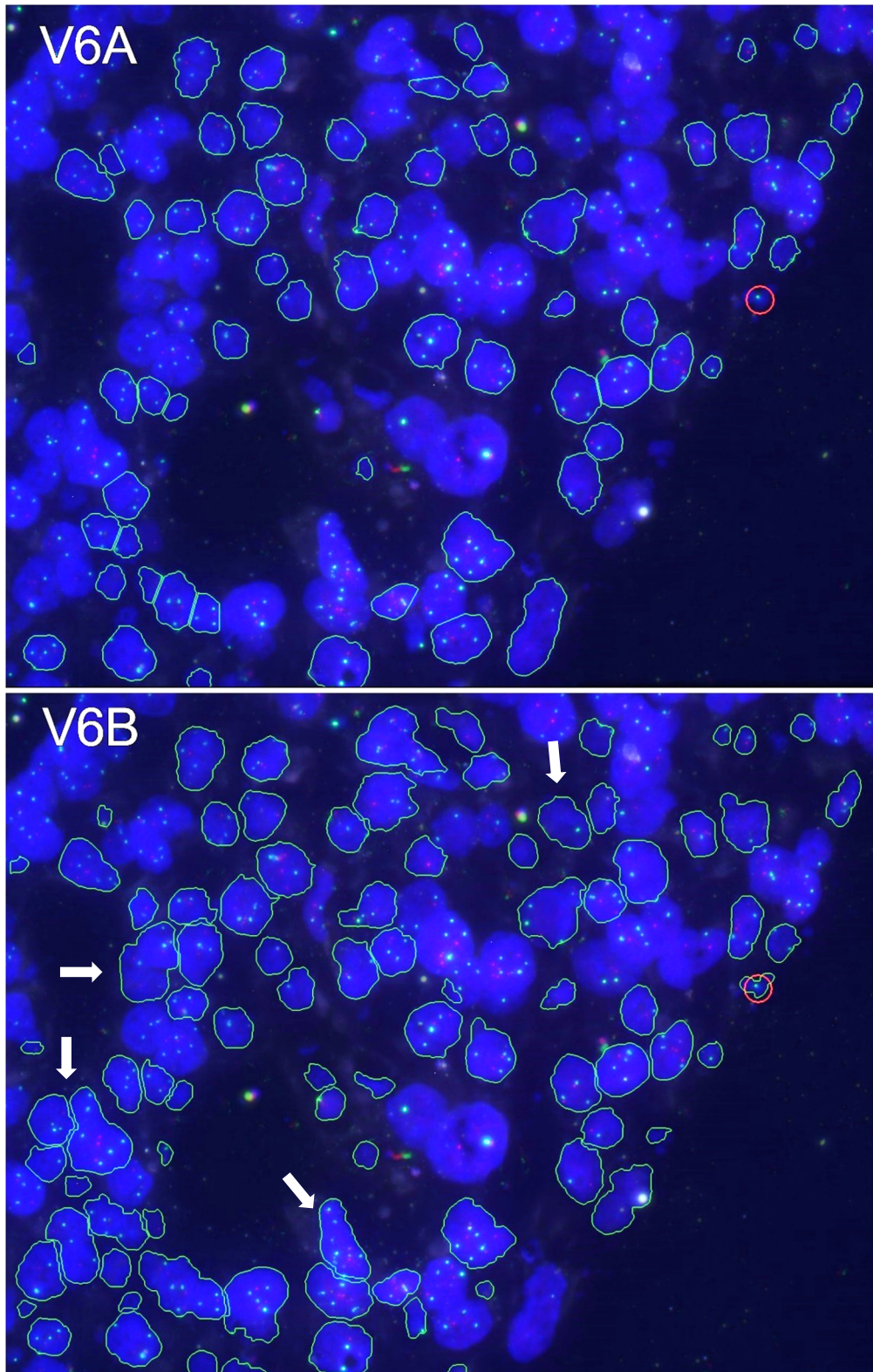
V tabuľke č.2 je prehľad klasifikátorov a ich zistených vlastností. Klasifikátory HER2-TissueFISH-V6A a HER2-TissueFISH-V6B poskytovali ako jediné možnosť manuálneho označovania a pridávania jadier po analýze. Klasifikátory HER2-TissueFISH-V6A, HER2-TissueFISH-V6B a PathVysionV2 nemali možnosť manuálneho označovania jadier, iba možnosť odmietnutia nájdeného a vyznačeného jadra v prípade, ak by operátor zhodnotil, že sa nejedná o jadro ale o artefakt alebo väzivo v tkanive. Klasifikátor PathVysionV2 navyše nedisponoval možnosťou vyhotoviť záverečnú správu s výsledkom (v súlade s odporúčaniami ASCO/CAP) (Wolff *et al.*, 2013) pričom ostatné klasifikátory túto možnosť mali. Výsledná správa obsahovala teda iba informáciu o priemernom počte signálov *HER2*, *CEP17* a pomeru priemerov *HER2/CEP17*. Taktiež bola zhodnotená efektivita označovania jadier klasifikátorom. Najviac jadier v jednej uloženej snímke testovacej vzorky rozlíšili zhodne klasifikátory HER2-TissueFISH-V6B a HER2-TissueFISH-V6D a to celkom 89 nájdených jadier. Ostatné klasifikátory zhodnotili snímky rovnako, 61 nájdených jadier. Bolo zistené, že klasifikátory V6B a V6D využívajú rovnaký algoritmus označovania jadier pretože ich výsledok bol zhodný. Obdobne aj V6A a V6C spolu s PathVysionV2 využívajú rovnaký algoritmus. Porovnanie efektivity označovania jadier klasifikátorov HER2-TissueFISH-V6A a HER2-TissueFISH-V6B je zachytené na obrázku č. 10.

Po porovnaní všetkých dostupných klasifikátorov a zhodnotení vyššie spomenutých kritérií bol na ďalšie testovanie vybraný klasifikátor HER2-TissueFISH-V6B. Tento klasifikátor preukázal najlepšie vlastnosti, parametre a možnosti manuálneho označovania jadier.



Tabuľka č.2: Prehľad klasifikátorov a ich vlastností.

| <b>Klasifikátor</b> | <b>Počet rozlíšených jadier</b> | <b>Manuálne označovanie jadier</b> | <b>Vyhodnocovacia správa</b> |
|---------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| HER2-TissueFISH-V6A | 61                              | áno                                | kompletná                    |
| HER2-TissueFISH-V6B | 89                              | áno                                | kompletná                    |
| HER2-TissueFISH-V6C | 61                              | nie                                | kompletná                    |
| HER2-TissueFISH-V6D | 89                              | nie                                | kompletná                    |
| PathVysionV2        | 61                              | nie                                | iba výpočet                  |



Obr. č. 10: Porovnanie označovania jadier klasifikátorov HER2-TissueFISH-V6A (horná časť) a HER2-TissueFISH-V6B (dolná časť).

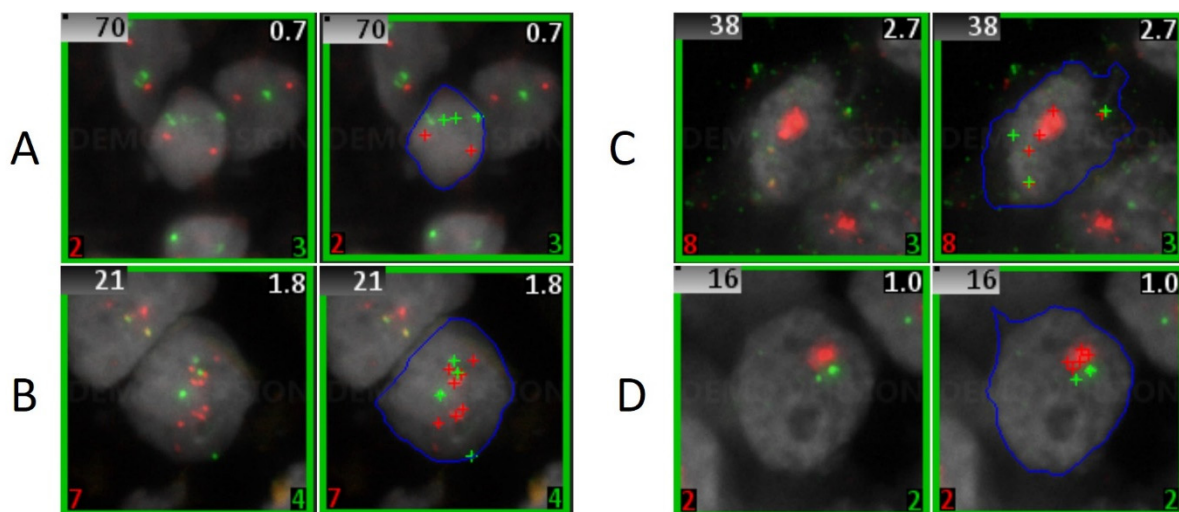
Legenda: biele šípky označujú skupiny buniek ktoré klasifikátor HER2-TissueFISH-V6A neoznačil

## 5.2 Vyšetrenie vzoriek automatizovaným systémom a porovnanie s manuálnym odpočtom

Na vyšetrenie bolo použitých dvadsať náhodne vybraných bioptických vzoriek solídneho tumoru. Vzorky pochádzali od pacientiek s diagnostikovaným karcinómom prsníka, ktoré poskytol archív Ústavu patológie Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Všetky vzorky boli vyšetrené metódou automatizovaného odpočtu FISH signálov na prístroji Metafer scanning and imaging system za použitia optimalizovaných parametrov, reagenícií predúpravy a nastavení klasifikátora softvéru, ktoré boli popísané v kapitole 5.1. Výsledky odpočtu a záverečné vyhodnotenia boli porovnávané s údajmi a výsledkami manuálneho odpočtu FISH signálov z databáze laboratória cytogenetiky Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny. V oboch metódach bolo vyhodnotených 100 jadier (pokiaľ to kvalita vzorky nedovoľovala tak minimálne 50) a vypočítaný priemerný počet signálov sondy *HER2* na bunku, CEP17 na bunku a pomer priemerov *HER2*/CEP17. Metodika vyhodnotenia bola v oboch metódach v súlade s najnovšími odporúčaniami ASCO/CAP (Wolff *et al.*, 2013). Cieľom tejto experimentálnej časti bolo demonštrovať presnosť a fungovanie optimalizovanej metódy automatického odpočtu v porovnaní s manuálnym odpočtom.

Výsledky sú uvedené tabuľke č.3. Hodnoty pri automatickom odpočte softvér nezaokruhuje iba zobrazí dve desatinné miesta zistených priemerov a pomerov. Výsledné hodnotenie automatického odpočtu sa u 15 z 20 vzoriek zhoduje s manuálnym odpočtom. Vo vzorkách č. 1, 6, 10, 13 a 18 sa výsledné hodnotenia odpočtov nezhodujú s manuálnym odpočtom. V niektorých prípadoch boli zaznamenané nesprávne hodnotenia softvéru v automatickom odpočte signálov z jednotlivých jadier. Najviac prípadov tejto chyby bolo zaznamenaných vo vzorkách č. 3, 8, 11, 12, 17 a 19, teda najmä u vzoriek, ktoré boli manuálne predtým vyhodnotené ako amplifikované. Ako príklad sú na obrázku č. 11 zachytené už analyzované jadrá priamo v softvérovom rozhraní, kde je názorné ukázané ako softvér označuje signály v jadrách. V prípade A išlo o nesprávne interpretovanie počtu signálov sondy CEP17 kde softvér napočítal 3 signály namiesto 5. V prípadoch C,D a E išlo o nesprávny resp. nepresný výpočet signálov *HER2*. Softvér v týchto prípadoch vyhodnotil menší počet signálov ako sa v jadre skutočne nachádzal.

V Grafoch č. 2, 3 a 4 sú porovnania automatickej a manuálnej metódy v priemerných počtoch signálov *HER2* a CEP17 sondy a ich pomerov v jednotlivých vzorkách. Vzhľadom na nízky počet vzoriek a charakter tejto práce nebolo vykonané štatistické hodnotenie.



Obrázok č.11: Ukážka nesprávnej automatickej detekcie signálov v jednotlivých jadrách.

Legenda: **A, B, C, D** sú jednotlivé bunky pričom na ľavom políčku z dvojice je snímka bez vyznačenia signálov a na pravom je **červeným (HER2) alebo zeleným (CEP17) krížikom** označené miesto detekcie ako to vyhodnotil softvér. V každom z políčok je vpravo a vľavo dole vyhodnotený počet signálov.

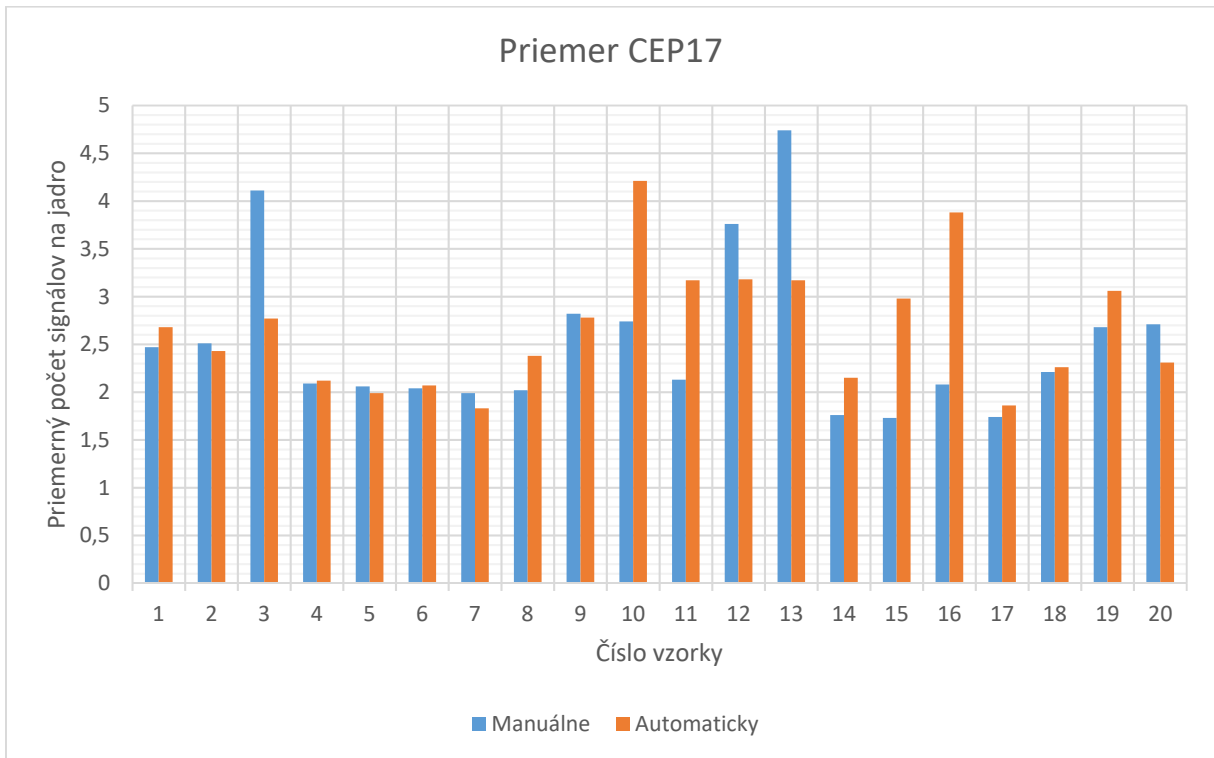
Tabuľka č.3: Výsledky automatického odpočtu a výsledky manuálneho odpočtu a ich vyhodnotenie.

| Č. vzorky | Metóda      | CEP17 | HER2  | <i>HER2</i> /CEP17 | Výsledok testu        |
|-----------|-------------|-------|-------|--------------------|-----------------------|
| 1         | Manuálne    | 2,47  | 13,54 | 5,48               | <i>HER2 pozitívny</i> |
|           | Automaticky | 2,68  | 4,13  | 1,53               | <i>HER2 neurčitý</i>  |
| 2         | Manuálne    | 2,51  | 3,68  | 1,47               | <i>HER2 negatívny</i> |
|           | Automaticky | 2,43  | 2,7   | 1,1                | <i>HER2 negatívny</i> |
| 3         | Manuálne    | 4,11  | 20    | 4,87               | <i>HER2 pozitívny</i> |
|           | Automaticky | 2,77  | 26,95 | 9,75               | <i>HER2 pozitívny</i> |
| 4         | Manuálne    | 2,09  | 2,13  | 1,02               | <i>HER2 negatívny</i> |
|           | Automaticky | 2,12  | 2,06  | 0,97               | <i>HER2 negatívny</i> |

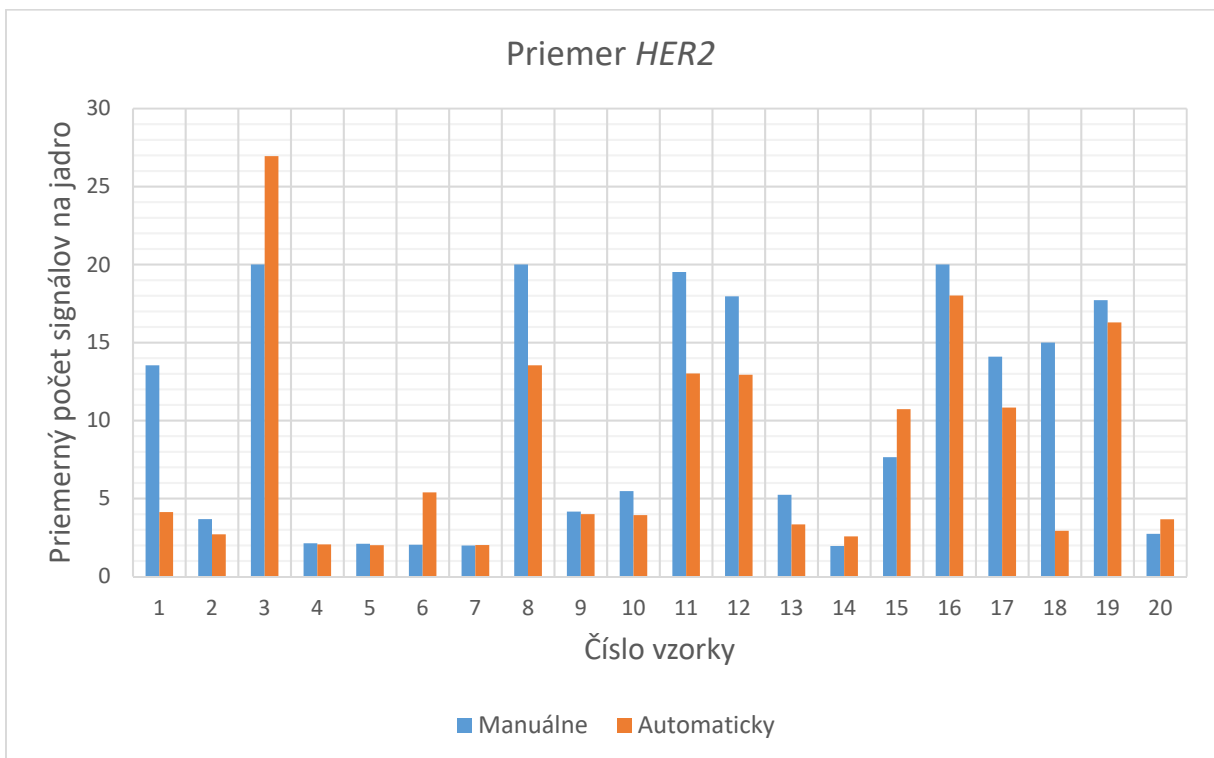
| Č. vzorky | Metóda      | CEP17 | HER2  | HER2 /CEP17 | Výsledok testu |
|-----------|-------------|-------|-------|-------------|----------------|
| 5         | Manuálne    | 2,06  | 2,1   | 1,02        | HER2 negatívny |
|           | Automaticky | 1,99  | 2,01  | 1,01        | HER2 negatívny |
| 6         | Manuálne    | 2,04  | 2,04  | 1           | HER2 negatívny |
|           | Automaticky | 2,07  | 5,39  | 2,6         | HER2 pozitívny |
| 7         | Manuálne    | 1,99  | 1,99  | 1           | HER2 negatívny |
|           | Automaticky | 1,83  | 2,02  | 1,1         | HER2 negatívny |
| 8         | Manuálne    | 2,02  | 20    | 9,89        | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 2,38  | 13,54 | 5,67        | HER2 pozitívny |
| 9         | Manuálne    | 2,82  | 4,16  | 1,47        | HER2 neurčitý  |
|           | Automaticky | 2,78  | 4     | 1,44        | HER2 neurčitý  |
| 10        | Manuálne    | 2,74  | 5,47  | 2           | HER2 neurčitý  |
|           | Automaticky | 4,21  | 3,94  | 0,93        | HER2 negatívny |
| 11        | Manuálne    | 2,13  | 19,52 | 9,18        | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 3,17  | 13,02 | 4,1         | HER2 pozitívny |
| 12        | Manuálne    | 3,76  | 17,96 | 4,78        | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 3,18  | 12,93 | 4,06        | HER2 pozitívny |
| 13        | Manuálne    | 4,74  | 5,24  | 1,11        | HER2 neurčitý  |
|           | Automaticky | 3,17  | 3,34  | 0,94        | HER2 negatívny |

| Č. vzorky | Metóda      | CEP17 | HER2  | HER2 /CEP17 | Výsledok testu |
|-----------|-------------|-------|-------|-------------|----------------|
| 14        | Manuálne    | 1,76  | 1,95  | 1,11        | HER2 negatívny |
|           | Automaticky | 2,15  | 2,57  | 1,19        | HER2 negatívny |
| 15        | Manuálne    | 1,73  | 7,65  | 4,41        | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 2,98  | 10,73 | 3,6         | HER2 pozitívny |
| 16        | Manuálne    | 2,08  | 20    | 9,62        | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 3,88  | 18,01 | 4,64        | HER2 pozitívny |
| 17        | Manuálne    | 1,74  | 14,09 | 8,1         | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 1,86  | 10,83 | 5,82        | HER2 pozitívny |
| 18        | Manuálne    | 2,21  | 15    | 6,79        | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 2,26  | 2,93  | 1,29        | HER2 negatívny |
| 19        | Manuálne    | 2,68  | 17,71 | 6,62        | HER2 pozitívny |
|           | Automaticky | 3,06  | 16,29 | 5,31        | HER2 pozitívny |
| 20        | Manuálne    | 2,71  | 2,73  | 1,01        | HER2 negatívny |
|           | Automaticky | 2,31  | 3,67  | 1,58        | HER2 negatívny |

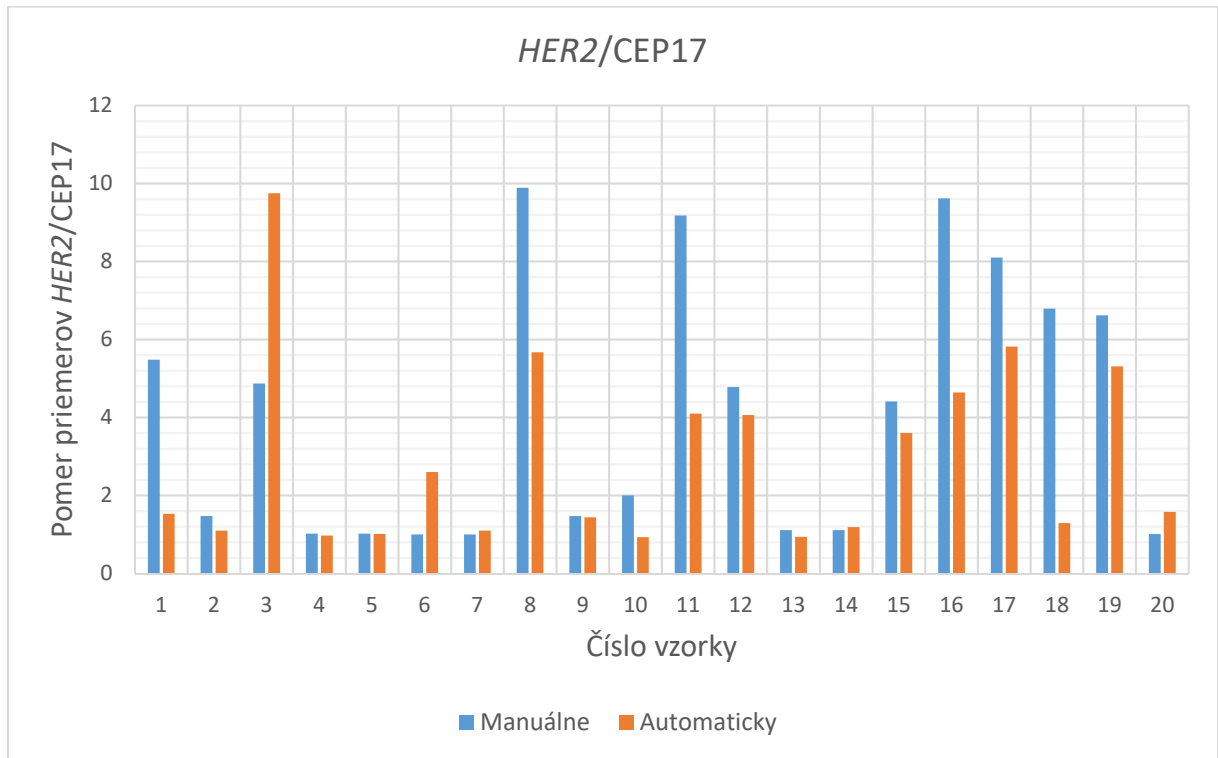
Graf č. 2: Porovnanie priemerných počtov signálov CEP17 sondy na jadro vyhodnotených automaticky a manuálne.



Graf č. 3: Porovnanie priemerných počtov signálov HER2 sondy na jadro vyhodnotených automaticky a manuálne.



Graf č. 4: Porovnanie pomeru priemerov signálov *HER2/CEP17* vyhodnotených automaticky a manuálne.





## 6 Diskusia

Automatizované systémy využívajúce FISH sú schopné značne uľahčiť prácu cytogenetikom a patológom najmä na pracoviskách, kde je klinické vyšetovanie metódou FISH dennou rutinou. Pomáhajú znížiť čas potrebný na vyhodnotenie vzoriek a tiež sú schopné objektívne interpretovať počty signálov na základe výpočtových algoritmov. Štandardizácia metodiky FISH pre automatickú analýzu je nevyhnutný proces pre zachovanie konzistentných výsledkov klinických testov.

Optimalizácia FISH metódy prebehla za použitia 3 sond. Dve sondy boli pripravené použitím dvoch rôznych kitov a tretia použitá sonda bola komerčne dostupná. Na optimalizáciu bola použitá jedna vzorka pacientky, u ktorej nebola preukázaná amplifikácia génu *HER2*. Súčasťou optimalizácie bola aj voľba vhodných reagensí na prípravu vzorky a to hybridizačný pufer a DAPI roztok. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté so sondou pripravenou kitom (Invitrogen™) a s komerčne dostupnou sondou ERBB2(17q12)/SE 17 (Kreatech™). V prvom pokuse bola hybridizácia neúspešná, pravdepodobne kvôli hybridizačnému pufru. V druhom pokuse bola pripravená nová sonda pomocou rovnakého kitu a hybridizačný pufer bol zmenený na komerčne dostupný najmä z dôvodu stálosti zloženia, ktoré je v komerčne dostupnom pufri garantované. Hybridizácia bola v tomto pokuse úspešná. V treťom pokuse bolo použitý namiesto laboratórne pripraveného komerčne dostupný roztok DAPI, ten preukázal oveľa lepšiu možnosť rozoznania jadier. Vo štvrtom pokuse bola pripravená nová sonda za použitia iného kitu na prípravu sondy (Kreatech™). Použitie tohto kitu sa ukázalo ako nevhodné z dôvodu neúspešnej hybridizácie sondy napriek použitému komerčne dostupnému hybridizačnému pufru a časovej náročnosti prípravy sondy. V poslednom pokuse bola použitá komerčne dostupná sonda, ktorej výsledky hybridizácie boli rovnako úspešné ako výsledky so sondou použitou v druhom pokuse. Jej najväčšou výhodou bola stálosť zloženia a kvalita prípravy garantovaná výrobcom, na druhej strane je však takáto sonda finančne nákladnejšia, a preto sa v ďalšej práci tejto bakalárskej práce pracovalo s oboma sondami – komerčne dostupnou a kitom na prípravu (Invitrogen™). Z reagensí mali lepší vplyv na výsledne možnosti hodnotenia vzorky komerčne dostupný roztok DAPI a komerčne dostupný hybridizačný pufer. Ich výhoda spočíva v garantovanom zložení a vylučuje možné chyby pri príprave vlastných laboratórnych reagensí, čo je žiadúce z pohľadu zachovania konzistencie výsledkov.

Pokračovaním optimalizácie FISH metódy na automatický odpočet a analýzu bolo určené vyhovujúcej hrúbky rezu vzorky. Posudzované hrúbky rezov tkaniva boli 2,3,4 a 5  $\mu\text{m}$ . Na základe porovnaní viditeľnosti buniek a jadier, ich prekryvu a práce s tkanivom bola ako najvhodnejšia vybraná hrúbka 3  $\mu\text{m}$ . Hrúbka 2  $\mu\text{m}$  bola nevhodná kvôli zlej práci s tkanivom hlavne po procese natrávenia proteázou, kedy dochádzalo k odlučovaniu rezu z podložného sklíčka alebo dochádzalo k "vyliatiu" obsahu jadier a preto nebolo možné správne vymedziť okraje buniek. Hrúbky 4 a 5  $\mu\text{m}$  boli posúdené ako nevyhovujúce kvôli prekryvu buniek a teda nebolo možné rozlíšiť jednotlivé bunky so signálmi. V publikovaných článkoch využívajúcich rovnaký prístroj na automatický odpočet vzoriek karcinómu prsníka je uvedená ako vhodná na použitie hrúbka 4  $\mu\text{m}$  (Furrer *et al.*, 2013) alebo rozmedzie 4-6  $\mu\text{m}$  (Schunck *et Mohammad*, 2011).

V druhej časti optimalizácie boli vykonané nastavenia a úpravy softvéru Metafer4, ktorý je súčasťou systému Metafer scanning and imaging platform. Na automatický odpočet bolo k dispozícii 5 klasifikačných algoritmov, tzv. klasifikátorov. Ako najvhodnejší pre vykonávanie klinických testov bol zvolený klasifikátor HER2-TissueFISH-V6B, a to z dôvodu jeho najlepšieho výkonu v počte nájdených buniek v zaznamenanom zornom poli. Ďalší dôvod voľby tohto klasifikátora spočíval v možnosti manuálne označovať bunky operátorom, čo je dôležitá vlastnosť najmä pri vzorkách s veľkým nahustením buniek, kedy klasifikátor zlyháva a nie je schopný nájsť a vyznačiť dostatočný počet buniek. Operátor je potom schopný po naskenovaní vzoriek manuálne vyznačiť potrebný počet jadier, ktorý softvér zahrnie do finálneho vyhodnotenia. Ostatné klasifikátory buď túto možnosť manuálneho označovania buniek nemali alebo nedosahovali potrebný výkon.

V poslednej časti bolo vykonané vyšetrenie amplifikácie *HER2* génu pomocou automatického odpočtu prístroja Metafer scanning and imaging platform a porovnanie automatického odpočtu na už optimalizovaných vzorkách s manuálnym odpočtom. Bolo použité už nastavenie klasifikátora podľa predošlých zistení. Výsledok vyšetrenia sa u 15 vzoriek zhodoval s manuálnym odpočtom a u 5 vzoriek vyhodnotil softvér výsledky odlišne v porovnaní s manuálnym odpočtom. Išlo o vzorky číslo 1, 6, 10, 13 a 18. Chybu vo výsledku vo vzorke 6 možno vysvetliť tak, že v jednom z nasnímaných zorných polí sa nachádzala izolovaná skupina buniek s amplifikáciou v *HER2* géne, čo malo vplyv na celkové hodnotenie vzorky a softvér teda vzorku vyhodnotil ako pozitívnu započítaním amplifikovaných buniek do priemeru. Podľa najnovších odporúčaní ASCO/CAP sa však ako amplifikované vzorky hodnotia iba tie, u ktorých sa amplifikácia vyskytuje v 10 % a viac celej populácie buniek vo

vzorke (Wolff *et al.*, 2013). Teda ak sa aj amplifikované bunky vo vzorke nachádzajú musí ich byť aspoň 10 % a viac aby sa vzorka mohla považovať za *HER2* pozitívnu. Softvér však tento fakt nedokáže rozlíšiť, preto je vždy nutná kontrola operátorom po odpočte. Vo vzorke číslo 18 vyšiel pri automatickom odpočte negatívny výsledok oproti manuálnemu odpočtu, kde bol výsledok pozitívny. Takúto chybu mohla zapríčiniť heterogenita tumoru, t.j. výskyt oboch amplifikovaných aj neamplifikovaných populácií buniek vo vzorke. Nesprávnou voľbou zorných polí boli naskenované zorné polia iba s negatívnou populáciou pričom pozitívne populácie boli chybne vynechané. Je možné, že pozitívne populácie sa v danom reze ani nevyskytovali, ale vyskytovali sa v reze z tkaniva, ktorý bol použitý v manuálnom odpočte. Obdobne vysvetlenie možno použiť na nezrovnalosti vo vzorke č.1, 10 a 13. Minimalizovať nesprávnu interpretáciu heterogénnych populácií vo vzorke je možné pred samotným predúpravou vzorky skontrolovať, či rez obsahuje nádorové bunky a (podľa doporučení ASCO/CAP) pri hodnotení vzorky ďalšou osobou, prípadne pri automatickom odpočte využiť spoluprácu druhého operátora na manuálne označovanie buniek a posudzovanie vhodných a nevhodných buniek (Wolff *et al.*, 2013).

Zaznamenané boli aj chybné detekcie v prípade automatického odpočtu a to najmä vo vzorkách 3, 8, 11, 12, 17 a 19. Išlo o vzorky, ktoré boli v oboch metódach zhodné vyhodnotené ako amplifikované a mali vysoký počet priemerných *HER2* signálov na bunku (10 a viac). V týchto prípadoch napriek správne vyhodnoteniu vzorky softvér nesprávne kvantifikoval signály vo všetkých prípadoch. V prípade, kedy sa červené signály *HER2* zlučujú do klastrov a nie je možná identifikácia jednotlivých bodov, zmena systému hodnotenia. Systém vyhodnocuje pomer plochy červeného signálu *HER2* ku signálu CEP17 a na základe tohto pomeru vypočíta približný počet signálov *HER2*, čo sa ukázalo u softvéru ako problematické. Riešením by mohlo byť posúdenie správnosti výpočtu softvéru a úprava priemerného počtu signálov jedným alebo viacerými operátormi. Na správnosti hodnotenia závisí aj hustota buniek vo vzorke. Vzorky s veľkým nahustením buniek vedľa seba softvér nedokáže účinne detegovať a často označuje nesprávne bunky alebo artefakty, ktoré nie sú vhodné. Účinnosť zafarbenia vzorky s roztokom DAPI je veľmi dôležitá, pretože na základe DAPI filtra systém rozoznáva bunky a jadrá v nich. Pri nedostatočnom zafarbení vznikajú problémy s nesprávnym označovaním jadier. V oboch prípadoch je potom nutný zásah operátora a zdĺhavé nápravy prostredníctvom manuálneho označovania.

Vzhľadom na nízky počet vyhodnotených vzoriek a charakter práce nebolo možné vyvodiť závery o presnosti a efektívite pri klinickom použití. Štúdie, v ktorých bolo vykonané

porovnanie manuálneho odpočtu s automatickým odpočtom pri klinickom stanovení amplifikácie génu *HER2* u karcinómu prsníka poukazujú na vysokú spoľahlivosť a presnosť systémov pri klinickom použití a to aj v starších publikáciách. Poukazujú však na nutnosť štandardizácie procesu pre dosiahnutie konzistentných výsledkov (Logt *et al.*, 2015; Öhlschlegel *et al.*, 2013; Stevens *et al.*, 2007; Tubbs *et al.*, 2006). V publikácii, ktorá využívala na porovnanie rovnaký systém Metafer scanning and imaging platform bola takisto zistená veľmi dobrá spoľahlivosť systému (Furrer *et al.*, 2013).

## 7 Záver

Súčasný smer vývoja klinickej praxe je koncept personalizovanej medicíny, kde sú pacienti selektovaní na základe presných molekulárno-cytogenetických charakteristík. Presné určenie klinického obrazu a histologického podtypu je dnes predpokladom pre presnú a cieleňú liečbu nádorových ochorení. V laboratóriách sú denne spracované desiatky vzoriek a s ich zvyšujúcim sa počtom je tiež vyvíjaný tlak na automatizované systémy, ktoré by pomohli minimalizovať ľudský faktor a tiež zvýšiť rýchlosť a presnosť odpočtu, v tomto prípade amplifikáciu génu *HER2*. Identifikácia amplifikácie *HER2* pomocou vyšetrenia metódy FISH má značný diagnostický a prognostický význam a okrem toho predurčuje pacienta na cieleňú liečbu špeciálnymi biologickými liečivami.

Na trhu existuje už rada takýchto automatizovaných prístrojov medzi ktorými je aj Metafer scanning and imaging platform (MetaSystems), ktorý bol vyskúšaný v rámci tejto bakalárskej práce. Pre exaktné automatizované odpočty FISH signálov u nádorov je však potrebné optimalizovať podmienky predúpravy. Bolo zistené, že pre presný odpočet FISH signálov je optimálna hrúbka rezu tkaniva 3  $\mu\text{m}$ . Ďalej bolo zistené, že komerčne dostupný roztok DAPI použitý spolu s komerčne dostupným hybridizačným pufrom poskytovali lepšie a konzistentnejšie výsledky z pohľadu rutinne vykonávaného vyšetrenia ako laboratórne pripravené roztoky. Ako najvhodnejší kit na prípravu sondy bol vyhodnotený kit od firmy Invitrogen™ a porovnateľné výsledky dosahovala komerčne dostupná sonda ERBB2 (17q12) / SE 17 od výrobcov Kreatech™. Pri cytogenetickom odpočte bol zistený ako najúčinnjší algoritmus alebo tzv. klasifikátor HER2-TissueFISH-V6B, ktorý dosahoval najlepšie výsledky vo všetkých sledovaných kritériách. Na základe toho bol vykonaný automatický odpočet FISH signálov v dvadsiatich náhodných patientskych vzorkách s už optimalizovanými parametrami a tie boli porovnané s manuálnym odpočtom.

Hoci literatúra dokumentuje veľmi dobrú spoľahlivosť automatizovaných systémov pre FISH odpočty, je vždy potrebná presná optimalizácia a aj napriek tomu sú tu isté limitácie. Vzhľadom k prognosticko-prediktívnej hodnote výsledkov vzoriek jednotlivých pacientov, sa stále v Cytogenetickom laboratóriu Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny využíva manuálny odpočet.

## 8 Zoznam použitých skratiek

ASCO/CAP – Americká spoločnosť klinickej onkológie (*American society of clinical oncology*) a spoločnosť amerických patológov (*College of american pathologists*)

ATP – adenzíntrifosfát

BFB – *bridge-fusion-bridge*

BRCA-1,2 – gény prispievajúce k riziku výskytu hereditárneho karcinómu prsníka (*breast cancer type 1 susceptibility gene*)

BTC – betacelulín

CCD – nábojovo viazaný obvod (*charge-coupled device*)

CEP – centromerická sonda (*centromeric enumeration probe*)

CISH – chromogénna *in situ* hybridizácia

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylyndol

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dUTP – deoxyuridín trifosfát

EDTA – kyselina etyléndiamíntetraoctová

EGF – epidermálny rastový faktor (*epidermal growth factor*)

ERBB1-4 – synonymné označenie HER1-4

FDA – *Food and drug administration*

FFPE – fixované vo formalíne a zaliaté v parafíne (*formalin fixed, paraffin embed*)

FISH – fluorescenčná *in situ* hybridizácia

FITC – fluoresceín izotiokyanát

GRB2 – *growth factor receptor bound protein 2*

GRB7 – *growth factor receptor bound protein 7*

HBEGF – heparín viažúci epidermálny rastový faktor (*heparin binding epidermal growth factor*)

HER 1-4 – receptor (gén) ľudského epidermálneho rastového faktora (*human epidermal growth factor receptor*)

Kb – kilobáz

LB - Luria-Bertani

LSI – lokusovo špecifická sonda (*locus specific identifier*)

MAPK – mitogénom aktivovaná proteín kináza

Mb – megabáz DNA

Mbp – megapárov bází

M-FISH – multiplexná FISH

NASA – americký úrad pre letectvo a kozmonautiku (*National Aeronautics and Space Administration*)

NK – *natural killer*

NRG1-4 – neuregulín 1-4

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PCR – polymerázová reťazová reakcia (*polymerase chain reaction*)

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

PPARB – *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta gene 2*

RNA – ribonukleová kyselina

SISH – *in situ* hybridizácia striebrom

SKY – spektrálna karyotypizácia (*spectral karyotyping*)

SOS – *Son of sevenless*

SSC – *saline-sodium citrate*

TNBC – trojitý negatívny subtyp karcinómu prsníka (*triple negative breast cancer*)

TRIS – tris-(hydroxymetyl)-aminometán

TRITC – tetrametylordamín izotiokyanát

WCP – celochromozómová sonda (*whole chromosome probe*)

## 9 Použitá literatura

- Abid, F., Hamami, L.,** (2016): A survey of neural network based automated systems for human chromosome classification. *Artificial Intelligence Review* 1–16.
- Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F., Gray, J.W.,** (2003): Chromosome aberrations in solid tumors. *Nature Genetics* 34, 369–376.
- Allred, D.C., Clark, G.M., Molina, R., Tandon, A.K., Schnitt, S.J., Gilchrist, K.W., Osborne, C.K., Tormey, D.C., McGuire, W.L.,** (1992): Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Human Pathology* 23, 974–979.
- Arndt-Jovin, D.J., Robert-Nicoud, M., Kaufman, S.J., Jovin, T.M.,** (1985): Fluorescence digital imaging microscopy in cell biology. *Science (New York, N.Y.)* 230, 247–256.
- Arriola, E., Marchio, C., Tan, D.S., Drury, S.C., Lambros, M.B., Natrajan, R., Rodriguez-Pinilla, S.M., Mackay, A., Tamber, N., Fenwick, K., Jones, C., Dowsett, M., Ashworth, A., Reis-Filho, J.S.,** (2008): Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Laboratory Investigation* 88, 491-503.
- Bargmann, C.I., Hung, M.-C., Weinberg, R.A.,** (1986): The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319, 226–230.
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., Di Fiore, P.P., Carpenter, G.,** (1996): All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 5251–5257.
- Bauman, J.G.J., Wiegant, J., Borst, P., van Duijn, P.,** (1980): A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Experimental Cell Research* 128, 485–490.
- Bender, M.A., Awa, A.A., Brooks, A.L., Evans, H.J., Groer, P.G., Littlefield, L.G., Pereira, C., Preston, R.J., Wachholz, B.W.,** (1988): Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 196, 103–159.
- Bingham, E., Hyvärinen, A.,** (2000): A fast fixed-point algorithm for independent component analysis of complex valued signals. *International Journal of Neural Systems* 10, 1–8.
- Blandin, A.T., Mühlematter, D., Bougeon, S., Gogniat, C., Porter, S., Beyer, V., Parlier, V., Beckmann, J.S., van Melle, G., Jotterand, M.,** (2008): Automated four-color interphase fluorescence in situ hybridization approach for the simultaneous detection of specific aneuploidies of diagnostic and prognostic significance in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 186, 69–77.
- Blows, F.M., Driver, K.E., Schmidt, M.K., Broeks, A., Leeuwen, F.E. van, Wesseling, J., Cheang, M.C., Gelmon, K., Nielsen, T.O., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Heikkinen, T., Nevanlinna, H., Akslen, L.A., Bégin, L.R., Foulkes, W.D., Couch, F.J., Wang, X., Cafourek, V., Olson, J.E., Baglietto, L., Giles, G.G., Severi, G., McLean, C.A.,**



- Southey, M.C., Rakha, E., Green, A.R., Ellis, I.O., Sherman, M.E., Lissowska, J., Anderson, W.F., Cox, A., Cross, S.S., Reed, M.W.R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Dunning, A.M., Humphreys, M., Easton, D.F., García-Closas, M., Caldas, C., Pharoah, P.D., Huntsman, D.,** (2010): Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. *PLOS Medicine* 7, e1000279.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., Cremer, T.,** (2005): Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLOS Biology* 3, e157.
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., Yokoyama, S.,** (2003): An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell* 12, 541–552.
- Casalini, P., Iorio, M.V., Galmozzi, E., Ménard, S.,** (2004): Role of HER receptors family in development and differentiation. *Journal of cellular physiology* 200, 343–350.
- Castleman, K.R., Melnyk, J., Frieden, H.J., Persinger, G.W., Wall, R.J.,** (1976): Computer-assisted karyotyping. *The Journal of reproductive medicine* 17, 53.
- Citri, A., Yarden, Y.,** (2006): EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 505–516.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D.J.,** (1999): Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease. *Journal of Clinical Oncology* 17, 2639–2639.
- Cooley, S., Burns, L.J., Repka, T., Miller, J.S.,** (1999): Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Experimental Hematology* 27, 1533–1541.
- Coussens, L.,** (1985): Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 23, 1132–1140.
- Cremeri, C., Remm, B., Bischoff, A., Vollweiler, T.,** (1992): Automated detection of radiation-induced chromosome aberrations following fluorescence in situ hybridization. *Journal of radiation research* 33, 189–205.
- De Moors A., Frégeau, C.J.,** (2011): Automated scoring of Sperm Hy-Liter™-stained spermatozoa by the MetaSystems Metafer image analysis software system in sexual assault specimens. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3, e35–e36.

- Desmedt, C., Haibe-Kains, B., Wirapati, P., Buyse, M., Larsimont, D., Bontempi, G., Delorenzi, M., Piccart, M., Sotiriou, C.,** (2008): Biological Processes Associated with Breast Cancer Clinical Outcome Depend on the Molecular Subtypes. *Clinical Cancer Research* 14, 5158–5165.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., Waterfield, M.D.,** (1984): Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521–527.
- Engel, R.H., Kaklamani, V.G.,** (2007): HER2-Positive Breast Cancer. *Drugs* 67, 1329–1341.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F.,** (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136, E359–E386.
- Furrer, D., Jacob, S., Caron, C., Sanschagrín, F., Provencher, L., Diorio, C.,** (2013): Validation of a new classifier for the automated analysis of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) gene amplification in breast cancer specimens. *Diagnostic Pathology* 8, 17.
- Gaiser, T., Berroa-García, L., Kemmerling, R., Dutta, A., Ried, T., Heselmeyer-Haddad, K.,** (2010): Automated Analysis of Protein Expression and Gene Amplification within the Same Cells of Paraffin-Embedded Tumour Tissue. *Analytical Cellular Pathology* 33, 105–112.
- Gilmer, T.M., Cable, L., Alligood, K., Rusnak, D., Spehar, G., Gallagher, K.T., Woldu, E., Carter, H.L., Truesdale, A.T., Shewchuk, L., Wood, E.R.,** (2008): Impact of common epidermal growth factor receptor and HER2 variants on receptor activity and inhibition by lapatinib. *Cancer Research* 68, 571–579.
- Giordano, S., Petrelli, A.,** (2008): From Single- to Multi-Target Drugs in Cancer Therapy: When Aspecificity Becomes an Advantage. *Current Medicinal Chemistry* 15, 422–432.
- Graham, J., Errington, P., Jennings, A.,** (1992): A Neural Network Chromosome Classifier. *Journal of Radiation Research* 33, 250–257.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A., Carraway, K.L.,** (1994): Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8132–8136.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A.,** (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A.,** (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanna, W.M., Rüschoff, J., Bilous, M., Coudry, R.A., Dowsett, M., Osamura, R.Y., Penault-Llorca, F., Van De Vijver, M., Viale, G.,** (2014): HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Modern Pathology* 27, 4–18.

- Harris, R.C., Chung, E., Coffey, R.J.**, (2004): EGF receptor ligands. The EGF receptor family biologic mechanisms and role in cancer. Elsevier, California 3–14.
- Hudis, C.A.**, (2007): Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine* 357, 39–51.
- Hunter, T.**, (1998): The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 353, 583–605.
- Hynes, N.E., MacDonald, G.**, (2009): ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology, Cell regulation* 21, 177–184.
- Iourov, I., Vorsanova, S., Soloviev, I., Yurov, Y.**, (2009): Interphase FISH: Detection of Intercellular Genomic Variations and Somatic Chromosomal Mosaicism. In: Liehr, T. (Ed.), *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 301–311.
- J. G. Gall, M. L. Pardue**, (1969): Formation and Detection of Rna-Dna Hybrid Molecules in Cytological Preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 63, 378-383.
- Jaju, R.J., Haas, O.A., Neat, M., Harbott, J., Saha, V., Boulwood, J., Brown, J.M., Pirc-Danoewinata, H., Krings, B.W., Müller, U., others**, (1999): A new recurrent translocation, t(5; 11)(q35; p15. 5), associated with del(5q) in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 94, 773–780.
- Jauch, A., Daumer, C., Lichter, P., Murken, J., Schroeder-Kurth, T., Cremer, T.**, (1990): Chromosomal in situ suppression hybridization of human gonosomes and autosomes and its use in clinical cytogenetics. *Human Genetics* 85, 145–150.
- Kajtár, B., Méhes, G., Lörch, T., Deák, L., Kneifné, M., Alpár, D., Pajor, L.**, (2006): Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 69, 506–514.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.-P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D.**, (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818–822.
- Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Kurisu, W., Thor, A., Chen, L.C., Smith, H.S., Waldman, F.M., Pinkel, D., Gray, J.W.**, (1992): ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5321–5325.
- Katz, R.L., Zaidi, T.M., Fernandez, R.L., Zhang, J., He, W., Acosta, C., Daniely, M., Madi, L., Vargas, M.A., Dong, Q., others**, (2008): Automated detection of genetic abnormalities combined with cytology in sputum is a sensitive predictor of lung cancer. *Modern pathology* 21, 950–960.

- Kearney, L., Watkins, P.C., Young, B.D., Sacchi, N.,** (1991): DNA sequences of chromosome 21-specific YAC detect the t(8;21) breakpoint of acute myelogenous leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 57, 109–119.
- Kilpatrick, M.W., Tafas, T., Evans, M.I., Jackson, L.G., Antsaklis, A., Brambati, B., Tsipouras, P.,** (2004): Automated detection of rare fetal cells in maternal blood: eliminating the false-positive XY signals in XX pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology* 190, 1571–1578.
- Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H., Taneja, K.L.,** (1993): Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort -cardiac and -cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *Journal of Cell Biology* 123, 165–165.
- Klener, P.,** (2002): *Klinická onkologie*. Galén.
- Klijanienko, J., Couturier, J., Galut, M., El-Naggar, A.K., Maciorowski, Z., Padoy, E., Mosseri, V., Vielh, P.,** (1999): Detection and quantitation by fluorescence in situ hybridization (FISH) and image analysis of HER-2/neu gene amplification in breast cancer fine-needle samples. *Cancer Cytopathology* 87, 312–318.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallionimeni, A., Bärland, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallionimeni, O.-P.,** (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 4, 844–847.
- Konopásek, B., Petruželka, L.,** (2003): *Klinická onkologie*, 1.vyd. ed. nakladatelství Karolinum, Praha.
- Kraker, W.J., Borell, T.J., Schad, C.R., Pennington, M.J., Karnes, P.S., Dewald, G.W., Jenkins, R.B.,** (1992): Fluorescent in situ hybridization: Use of whole chromosome paint probes to identify unbalanced chromosome translocations. *Mayo Clinic Proceedings* 67, 658–662.
- Landegent, J.E., Jansen in de Wal, N., van Ommert, G.-J.B., Baas, F., de Vijlder, J.J.M., van Duijn, P., van der Ploeg, M.,** (1985): Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. *Nature* 317, 175–177.
- Landegent, J.E., Wal, N.J. in de, Dirks, R.W., Ploeg, M. van der,** (1987): Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Human Genetics* 77, 366–370.
- Latta, E.K., Tjan, S., Parkes, R.K., O'Malley, F.P.,** (2002): The Role of HER2/neu Overexpression/Amplification in the Progression of Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Carcinoma of the Breast. *Modern Pathology* 15, 1318–1325.
- Lee, J.W., Soung, Y.H., Seo, S.H., Kim, S.Y., Park, C.H., Wang, Y.P., Park, K., Nam, S.W., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., Lee, S.H.,** (2006): Somatic Mutations of ERBB2 Kinase Domain in Gastric, Colorectal, and Breast Carcinomas. *Clinical Cancer Research* 12, 57–61.

- Lemmon, M.A., Schlessinger, J.,** (2010): Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Lerner, B.,** (1998): Toward a completely automatic neural-network-based human chromosome analysis. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B (Cybernetics)* 28, 544–552.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D.C.,** (1988): Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Human Genetics* 80, 224–234.
- Liehr, T., Claussen, U.,** (2002): Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Current Molecular Medicine* 2, 283–297.
- Lim, A.T., Lim, T.,** (2017): Fluorescence In Situ Hybridization on Tissue Sections. In: Wan, T.S.K. (Ed.), *Cancer Cytogenetics, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, pp. 119–125.
- Livasy, C.A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T., Perou, C.M.,** (2005): Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology* 19, 264–271.
- Logt, E.M.J. van der, Kuperus, D.A.J., van Setten, J.W., van den Heuvel, M.C., Boers, J.E., Schuurings, E., Kibbelaar, R.E.,** (2015): Fully automated fluorescent in situ hybridization (FISH) staining and digital analysis of HER2 in breast cancer: a validation study. *PloS One* 10, e0123201.
- Lopez-Tarruella, S., Schiff, R.,** (2007): The Dynamics of Estrogen Receptor Status in Breast Cancer: Re-shaping the Paradigm. *Clinical Cancer Research* 13, 6921–6925.
- Lundsteen, C., Martin, A.O., Reynolds, J.F.,** (1989): On the selection of systems for automated cytogenetic analysis. *American Journal of Medical Genetics* 32, 72–80.
- Manuelidis, L., Langer-Safer, P.R., Ward, D.C.,** (1982): High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. *The Journal of Cell Biology* 95, 619–625.
- Marchiò, C., Lambros, M.B., Gugliotta, P., Di Cantogno, L.V., Botta, C., Pasini, B., Tan, D.S., Mackay, A., Fenwick, K., Tamber, N., Bussolati, G., Ashworth, A., Reis-Filho, J.S., Sapino, A.,** (2009): Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *The Journal of Pathology* 219, 16–24.
- Marchionni, M.A., Goodearl, A.D., Chen, M.S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K.,** (1993): Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362, 312–318.
- Marotta, M., Chen, X., Inoshita, A., Stephens, R., Thomas Budd, G., Crowe, J.P., Lyons, J., Kondratova, A., Tubbs, R., Tanaka, H.,** (2012): A common copy-number breakpoint of ERBB2 amplification in breast cancer colocalizes with a complex block of segmental duplications. *Breast Cancer Research : BCR* 14, R150.

- Marotta, M., Onodera, T., Johnson, J., Budd, G.T., Watanabe, T., Cui, X., Giuliano, A.E., Niida, A., Tanaka, H.,** (2017): Palindromic amplification of the ERBB2 oncogene in primary HER2-positive breast tumors. *Scientific Reports* 7, 41921.
- Massague, J., Pandiella, A.,** (1993): Membrane-anchored growth factors. *Annual review of biochemistry* 62, 515–541.
- McKenna, D.J., Rajab, N.F., McKeown, S.R., McKerr, G., McKelvey-Martin, V.J.,** (2003): Use of the comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines. *Radiation Research* 159, 49–56.
- McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M.,** (2000): Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ : British Medical Journal; London* 321, 624.
- Mimura, K., Kono, K., Hanawa, M., Mitsui, F., Sugai, H., Miyagawa, N., Ooi, A., Fujii, H.,** (2005): Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 92, 1253–1260.
- Moasser, M.M.,** (2007): The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469–6487.
- Morrison, C., Zanagnolo, V., Ramirez, N., Cohn, D.E., Kelbick, N., Copeland, L., Maxwell, G.L., Maxwell, L.G., Fowler, J.M.,** (2006): HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 2376–2385.
- Moy, B., Goss, P.E.,** (2006): Lapatinib: Current Status and Future Directions in Breast Cancer. *The Oncologist* 11, 1047–1057.
- Mueller, R., O'Malley, F.,** (2003): FISH Detection of HER2 Amplification in Breast Cancer. In: Fan, Y.-S. (Ed.), *Molecular Cytogenetics, Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>. Humana Press, pp. 353–367.
- Munzone, E., Curigliano, G., Rocca, A., Bonizzi, G., Renne, G., Goldhirsch, A., Nolè, F.,** (2006): Reverting estrogen-receptor-negative phenotype in HER-2-overexpressing advanced breast cancer patients exposed to trastuzumab plus chemotherapy. *Breast Cancer Research* 8, R4.
- Mužík, J., Dušek, L., Abrahámová, J., Koptíková, J.,** (2009): Stručný přehled epidemiologie zhoubného novotvaru prsu v České republice. *Onkologie* 3, 7–11.
- Narath, R., Lörch, T., Greulich-Bode, K.M., Boukamp, P., Ambros, P.F.,** (2005): Automatic telomere length measurements in interphase nuclei by IQ-FISH. *Cytometry Part A* 68, 113–120.
- Nederlof, P.M., van der Flier, S., Verwoerd, N.P., Vrolijk, J., Raap, A.K., Tanke, H.J.,** (1992): Quantification of fluorescence in situ hybridization signals by image cytometry. *Cytometry* 13, 846–852.

- Nederlof, P.M., van der Flier, S., Wiegant, J., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ploem, J.S., van der Ploeg, M.,** (1990): Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 11, 126-131.
- Netten, H., van Vliet, L.J., Vrolijk, H., Sloos, W.C.R., Tanke, H.J., Young, I.T.,** (1996): Fluorescent dot counting in interphase cell nuclei. *Bioimaging* 4, 93–106.
- Netten, H., Young, I.T., van Vliet, L.J., Tanke, H.J., Vrolijk, H., Sloos, W.C.,** (1997): FISH and chips: automation of fluorescent dot counting in interphase cell nuclei. *Cytometry* 28, 1–10.
- Öhlschlegel, C., Kradolfer, D., Hell, M., Jochum, W.,** (2013): Comparison of automated and manual FISH for evaluation of HER2 gene status on breast carcinoma core biopsies. *BMC Clinical Pathology* 13, 13.
- Olayioye, M.A., Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Rohrer, J., Gay, B., Hynes, N.E.,** (1998): ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Molecular and Cellular Biology* 18, 5042–5051.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E.,** (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal* 19, 3159-3167.
- Olive, P.L.,** (1989): Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiation Research* 117, 79–92.
- Ondrušová, M., Mardiak, J., Pšenková, M.,** (2015): Vybrané ukazovatele epidemiológie karcinómu prsníka na Slovensku. *Onkológia* 4, 210–213.
- Pajor, G., Alpar, D., Kajtar, B., Melegh, B., Somogyi, L., Kneif, M., Bollmann, D., Pajor, L., Sule, N.,** (2012a): Automated signal pattern evaluation of a bladder cancer specific multiprobe-fish assay applying a user-trainable workstation. *Microscopy research and technique* 75, 814–820.
- Pajor, G., Kajtár, B., Pajor, L., Alpár, D.,** (2012b): State-of-the-art FISHing: Automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei. *Cytometry Part A* 81A, 649-663.
- Patel, J.L., Goyal, R.K.,** (2007): Applications of Artificial Neural Networks in Medical Science. *Current Clinical Pharmacology* 2, 217–226.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P.O., Botstein, D.,** (2000): Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Petruželka, L.,** (2009): Biologická léčba karcinomu prsu. *Onkologie* 3, 19–27.
- Philip, J., Lundsteen, C.,** (1985): Semiautomated chromosome analysis: A clinical test. *Clinical Genetics* 27, 140–146.

- Pinkel, D., Gray, J.W., Trask, B., Engh, G. van den, Fuscoe, J., Dekken, H. van,** (1986): Cytogenetic Analysis by In Situ Hybridization with Fluorescently Labeled Nucleic Acid Probes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 151–157.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J.,** (1988): Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 9138–9142.
- Raimondo, F., Gavrielides, M.A., Karayannopoulou, G., Lyroudia, K., Pitas, I., Kostopoulos, I.,** (2005): Automated evaluation of Her-2/neu status in breast tissue from fluorescent in situ hybridization images. *IEEE Transactions on Image Processing* 14, 1288–1299.
- Riese, D.J., Van Raaij, T.M., Plowman, G.D., Andrews, G.C., Stern, D.F.,** (1995): The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Molecular and cellular biology* 15, 5770–5776.
- Rodenacker, K., Aubele, M., Hutzler, P., Umesh Adiga, P.S.,** (1997): Groping for quantitative digital 3-D image analysis: an approach to quantitative fluorescence in situ hybridization in thick tissue sections of prostate carcinoma. *Analytical Cellular Pathology* 15, 19–29.
- Romm, H., Beinke, C., Garcia, O., Di Giorgio, M., Gregoire, E., Livingston, G., Lloyd, D.C., Martinez-Lopez, W., Moquet, J.E., Sugarman, S.L., Wilkins, R.C., Ainsbury, E.A.,** (2016): A New Cytogenetic Biodosimetry Image Repository for the Dicentric Assay. *Radiation Protection Dosimetry* 172, 192–200.
- Rothfuss, A., Schütz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., Speit, G.,** (2000): Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *Cancer Research* 60, 390–394.
- Rutovitz, D.,** (1968): Automatic chromosome analysis. *British medical bulletin* 24, 260–267.
- Rutovitz, D.,** (1992): Reflections on the Past, Present and Future of Automated Aberration Scoring Systems for Radiation Dosimetry. *Journal of Radiation Research* 33, 1–30.
- Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B.,** (1996): Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science; Washington* 273, 494.
- Schunck, C., Johannes, T., Varga, D., Lörch, T., Plesch, A.,** (2004): New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals. *Cytogenetic and Genome Research* 104, 383–389.
- Schunck, C., Mohammad, E.,** (2011): Automated Analysis of FISH-Stained HER2/neu Samples with Metafer. In: Al-Mulla, F. (Ed.), *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 91–103.



- Schwab, M.**, (1999): Oncogene amplification in solid tumors. *Seminars in Cancer Biology* 9, 319–325.
- Schwarzacher, T.**, (2003): DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome* 46, 953–962.
- Segovia-Mendoza, M., González-González, M.E., Barrera, D., Díaz, L., García-Becerra, R.**, (2015): Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. *American Journal of Cancer Research* 5, 2531.
- Serakinci, N., Kølvråa, S.**, (2009): Molecular Cytogenetic Applications in Diagnostics and Research: An Overview. In: Liehr, T. (Ed.), *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 3–21.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L.**, (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)* 235, 177–182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A.**, (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, N.Y.)* 244, 707–712.
- Speicher, M.R., Ballard, S.G., Ward, D.C., others**, (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature genetics* 12, 368–375.
- Stein, D., Wu, J., Fuqua, S.A., Roonprapunt, C., Yajnik, V., D'Eustachio, P., Moskow, J.J., Buchberg, A.M., Osborne, C.K., Margolis, B.**, (1994): The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *The EMBO Journal* 13, 1331–1340.
- Stevens, R., Almanaseer, I., Gonzalez, M., Caglar, D., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Schrock, D.S., Seemayer, T.A., Bridge, J.A.**, (2007): Analysis of HER2 gene amplification using an automated fluorescence in situ hybridization signal enumeration system. *The Journal of Molecular Diagnostics* 9, 144–150.
- Steward, W.P., Thomas, A.L.**, (2013): The Burden of Cancer. In: *The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside*. John Wiley & Sons, pp. 43–66.
- Strachan, T., Read, A.P.**, (2004): *Human Molecular Genetics* 3. Garland Science.
- Sun, Z., Shi, Y., Shen, Y., Cao, L., Zhang, W., Guan, X.**, (2015): Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19, 2691–2701.
- Theodosiou, Z., Kasampalidis, I.N., Livanos, G., Zervakis, M., Pitas, I., Lyroudia, K.**, (2007): Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: A review. *Cytometry Part A* 71A, 439–450.
- Trask, B.J.**, (2002): Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature Reviews Genetics* 3, 769–778.

- Trojanec, R.**, (2012): Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH). In: Detekce Nádorových Biomarkerů v Molekulárně Biologické Laboratoři. Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 83–94.
- Truong, K., Guilly, M.-N., Gerbault-Seureau, M., Malfoy, B., Vielh, P., Bourgeois, C.A., Dutrillaux, B.**, (1998): Quantitative FISH by image cytometry for the detection of chromosome 1 imbalances in breast cancer: a novel approach analyzing chromosome rearrangements within interphase nuclei. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 78, 1607–1613.
- Tubbs, R.R., Pettay, J.D., Swain, E., Roche, P.C., Powell, W., Hicks, D.G., Grogan, T.**, (2006): Automation of manual components and image quantification of direct dual label fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER2 gene amplification: A feasibility study. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM* 14, 436–440.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., Yarden, Y.**, (1996): A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology* 16, 5276–5287.
- Umesh Adiga, P.S., Chaudhuri, B.B.**, (2000): Segmentation and counting of FISH signals in confocal microscopy images. *Micron* 31, 5–15.
- Valabrega, G., Montemurro, F., Aglietta, M.**, (2007): Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology* 18, 977–984.
- van de Vijver, M.J., Peterse, J.L., Mooi, W.J., Wisman, P., Lomans, J., Dalesio, O., Nusse, R.**, (1988): Neu-Protein Overexpression in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 319, 1239–1245.
- Vorsanova, S.G., Yurov, Y.B., Iourov, I.Y.**, (2010): Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Molecular Cytogenetics* 3, 1.
- Wang, X., Zheng, B., Zhang, R.R., Li, S., Chen, X., Mulvihill, J.J., Lu, X., Pang, H., Liu, H.**, (2010): Automated analysis of fluorescent in situ hybridization (FISH) labeled genetic biomarkers in assisting cervical cancer diagnosis. *Technology in cancer research & treatment* 9, 231–242.
- Weber, J., Scheid, W., Traut, H.**, (1992): Time-saving in biological dosimetry by using the automatic metaphase finder Metafer2. *Mutation Research* 272, 31–34.
- Willard, H.F., Wayne, J.S.**, (1987): Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends in Genetics* 3, 192–198.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R.B., Mangu, P.B., Paik, S., Perez, E.A., Press, M.F., Spears, P.A., Vance, G.H., Viale, G., Hayes, D.F.**, (2013): Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical

Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. Journal of Clinical Oncology 31, 3997–4013.

**Wolff, D.J., Schwartz, S.,** (2005): Fluorescence In Situ Hybridization. In: Gersen, S.L., MEd, M.B.K. (Eds.), The Principles of Clinical Cytogenetics. Humana Press, pp. 455–489.

**Yarden, Y., Sliwkowski, M.X.,** (2001): Untangling the ErbB signalling network. Nature reviews. Molecular cell biology 2, 127–137.

**Yeh, I.-T., Martin, M.A., Robetorye, R.S., Bolla, A.R., McCaskill, C., Shah, R.K., Gorre, M.E., Mohammed, M.S., Gunn, S.R.,** (2009): Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. Modern Pathology 22, 1169–1175.

**Yunis, J.J.,** (1976): High resolution of human chromosomes. Science 191, 1268–1270.

## **9.1 Použité internetové zdroje**

<http://www.uzis.cz/>

<http://svod.cz/>

<http://www.nczisk.sk>